



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

**Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Genética**

**Aplicación de nuevas tecnologías para la
detección de reordenamientos genómicos en
pacientes con retraso del neurodesarrollo y
anomalías congénitas.**

TESIS DOCTORAL

Sandra Monfort Membrado

Valencia, 2014



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

LaFe
Hospital
Universitari
i Politècnic

*Innovación y experiencia
al servicio del paciente*

TESIS DOCTORAL

Aplicación de nuevas tecnologías para la detección de reordenamientos genómicos en pacientes con retraso del neurodesarrollo y anomalías congénitas.

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal.
Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

Realizado por:

Sandra Monfort Membrado

Directores:

Dra. Carmen Orellana Alonso

Dr. Francisco Martínez Castellano

Valencia, 2014



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Título Tesis Doctoral:

Aplicación de nuevas tecnologías para la detección de reordenamientos genómicos en pacientes con retraso del neurodesarrollo y anomalías congénitas.

Programa de doctorado:

Genética Molecular y Evolutiva Código: 194B
Departamento de Genética
Facultad de Ciencias Biológicas

Realizada por:

Sandra Monfort Membrado

Dirigida por:

Dra. Carmen Orellana Alonso

Dr. Francisco Martínez Castellano

Tutelada por:

Dr. Francisco J. Silva Moreno



La Dra. Carmen Orellana Alonso y el Dr. Francisco Martínez Castellano de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICAN

Que la memoria titulada “APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS EN PACIENTES CON RETRASO DEL NEURODESARROLLO Y ANOMALÍAS CONGÉNITAS” ha sido realizada bajo su dirección y supervisión en la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario y Politécnico La Fe por Dña. Sandra Monfort Membrado.

Que la memoria se considera satisfactoria y apta para ser presentada como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universitat de Valencia.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia, a 7 de diciembre del 2013,

Fdo. Dra. Carmen Orellana Alonso

Fdo. Dr. Francisco Martínez Castellano

Fdo. Dr. Francisco J. Silva Moreno
(Tutor de la Tesis)

A mi madre,
a mi padre,
a mis hermanos,
a mi marido,
a mi hija.

Agradecimientos:

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Carmen Orellana y el Dr. Francisco Martínez, estos años de formación. Gracias por darme la oportunidad de ser una de vuestras doctorandas, de formarme científicamente, de transmitirme esos valores y esa pasión por la ciencia. De todo corazón, Carmen, Paki, os doy las gracias por darme esta gran oportunidad. Y sobre todo, gracias por la paciencia que habéis tenido conmigo. Siempre seréis mis mentores, mis maestros.

Agradecer también al resto del grupo de Investigación Translacional en Genética. A todos y cada uno de los que han formado parte de él: Sonia, Ramiro, Irene, Rosa y especialmente a Silves y Mónica, sabéis que sin vosotros todo este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a todos por vuestro tiempo, vuestro apoyo y vuestra amistad.

Y al resto de personal de la Unidad de Genética del Hospital La Fe. A las becarias que coincidieron conmigo, Elena Aller, Elena Grau, Teresa. A todas las técnicas y enfermeras, (que han sido muchas), a las secretarias (Amparo y Julia), a la Dra. Beneyto, al Dr. Millan, al Dr. Prieto, la Dra. Badia, Angelines y Ana Sospedra.

Gracias a todos ellos por todo lo que hemos pasado juntos.

También quisiera agradecer a todas las familias que han querido participar en este proyecto, sin su colaboración no podríamos avanzar en el conocimiento de las bases genéticas de los trastornos del neurodesarrollo.

Y finalmente, hacer mención de las diferentes entidades públicas y privadas por conceder el apoyo económico, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2001-0404)

Red temática de Investigación Cooperativa (G03/098)

FIS (PI04/0421); (PI08/0648)

Consellería de Sanidad (AP-096/06)

INTRODUCCIÓN.....	15
1. DISCAPACIDAD INTELECTUAL	17
1.1 Definición	17
1.2 Clasificación y prevalencia	17
2. CAUSAS CONOCIDAS DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL	19
2.1 Causas de origen ambiental	19
2.2 Causas de origen genético	19
2.2.1 Enfermedades monogénicas.....	19
2.2.2 Anomalías cromosómicas	20
3. TIPOS DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS	22
3.1 Reordenamientos crípticos subteloméricos.....	22
3.2 Reordenamientos intersticiales.....	23
4. TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS	25
4.1 Análisis de segregación mediante marcadores polimórficos	25
4.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	25
4.3 Hibridación genómica comparada de alta resolución (HR-CGH)	27
4.4 FISH multicolor: Múltiple-FISH (M-FISH) y Cariotipo espectral (SKY).....	27
4.5 Amplificación múltiple con sondas dependientes de hibridación (MAPH) ...	27
4.6 Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA)	28
4.7 CGH basado en <i>Array</i>	30
5. UN PASEO HISTÓRICO EN LA BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS EN PACIENTES CON DISCAPACIDAD INTELECTUAL.....	31
5.1 Reordenamiento subteloméricos.....	31
5.2 Reordenamiento intersticiales	32
6. CONOCIENDO EL GENOMA.....	33
7. CRONOLOGIA	34
OBJETIVO.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
1. MATERIAL BIOLÓGICO	43
1.1 Pacientes y controles.....	43
1.1.1 Pacientes	43
1.1.2 Controles	44

Índice

1.1.3 Grupo de progenitores	44
1.2 Obtención de células en metafase a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica	44
1.3 Extracción y cuantificación de ADN a partir de sangre periférica.....	45
2. TÉCNICA DE FISH (FLUORECENT IN SITU HYBRIDIZATION).....	48
2.1 FISH con sondas teloméricas.....	48
2.2 FISH con sondas no comerciales.....	50
3. TÉCNICA DE MLPA (MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION).....	54
3.1 MLPA regiones subteloméricas	55
3.2 MLPA regiones de microduplicaciones y microdeleciones frecuentes	57
3.3 MLPA a la carta.....	57
4. ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN DE MARCADORES POLIMÓRFICOS	62
5. ESTUDIO DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	64
6. CGH-ARRAY badado en BACS.....	65
6.1 Descripción del ARRAY.....	65
6.2 Hibridación del ARRAY.....	65
6.2.1 Marcaje del ADN genómico	65
6.2.2 Aclarado y bloqueo de los arrays previo a la hibridación	67
6.2.3 Prehibridación e hibridación.....	68
6.2.4 Lavados.....	69
6.3 Análisis.....	69
6.4 Validación del ARRAY.....	72
6.5 Interpretación de los resultados	72
7. CGH-ARRAY BASADO EN OLIGONUCLEÓTIDOS	74
7.1 Descripción del ARRAY.....	74
7.1.1 Microarray comercial 44K	74
7.1.2 Microarray 44K a la carta	74
7.2 Preparación de las muestras	75
7.3 Hibridación.....	76
7.4 Análisis.....	76
7.5 Interpretación	77
RESULTADOS	79
1. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS SUBTELOMÉRICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISH.....	81
1.1 Reordenamientos subteloméricos detectados.....	81
1.1.1 Caso CGM967 ♂: 46,XY.ish der(6)t(3;6)(q29;p25)	82

1.1.2 Caso CGM935 ♀: 46,XX,ish der(5)t(5;9)(p15;p23)	84
1.1.3 Caso CGM1160 ♂: 46,XY,ish der(12)t(12;13)(p13;q34).....	86
1.1.4 Caso XF2337 ♂: 46,XY,ish der(2)t(1;2)(q44;q37)	88
2. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS SUBTELOMÉRICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MLPA	91
2.1 Validación de la técnica MLPA en 22 controles procedentes de individuos sanos	91
2.2 Validación de la técnica MLPA con casos previamente estudiados por la técnica de FISH.....	92
2.3 Análisis de la serie de pacientes con las tres SALSAs de MLPA subteloméricas P036, P019 y P020.....	92
2.4 Reordenamientos subteloméricos detectados.....	95
2.4.1 TIPO I: Casos que presentan una duplicación y una deleción en diferentes regiones.....	97
2.4.2.TIPO II: Casos que presentan una duplicación o una deleción pura....	107
2.4.3.TIPO III: Reordenamientos complejos en una misma región cromosómica.....	122
2.5 Interpretación de los resultados según su implicación patológica	125
3. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS MEDIANTE CGH BASADO EN ARRAY DE BACs	127
3.1 Puesta a punto de la técnica	127
3.2 Reordenamientos detectados	130
3.2.1 Variantes de dosis polimórficas	131
3.2.2 Artefactos técnicos.....	132
3.2.3 Variantes de dosis patológicas.....	134
4. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS MEDIANTE CGH basado en Arrays de oligonucleótidos.....	143
4.1 Desequilibrios detectados.....	143
4.1.1 Variantes de dosis consideradas polimórficas	144
4.1.2 Variantes de dosis patológicas.....	149
4.1.3 Variantes de dosis consideradas patológicas de penetrancia incompleta	159
4.1.4.Variantes de dosis de significado incierto.	160
5. RESUMEN DE LOS REORDENAMIENTOS PATOLÓGICOS DETECTADOS EN LA SERIE	161
DISCUSIÓN.....	165
1. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LAS VARIANTES DE DOSIS.....	167

Índice

2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA LA DETECCIÓN DE ALTERACIONES PATOLÓGICAS	173
2.1 FISH.....	173
2.2 MLPA.....	174
2.3 Comparación MLPA vs FISH.....	175
2.4 CGH-array basado en BACs	178
2.5 CGH-array basado en oligonucleótidos	180
2.6 Comparación de las técnicas de array basadas en BACs y oligonucleótidos.....	182
3. COSTE ECONÓMICO.....	185
4. FRECUENCIA DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS DETECTADOS CON CADA UNA DE LAS TÉCNICAS.....	187
4.1 FISH versus MLPA subteloméricos.....	187
4.2 arrays BACs versus arrays Oligonucleótidos	189
5. DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES POR CROMOSOMA Y PACIENTE.....	193
6. DE LA INVESTIGACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA	197
CONCLUSIONES	201
BIBLIOGRAFÍA.....	207
ANEXO 1	227
SALSA MLPA P019 Human Telomere probemix.....	229
SALSA MLPA P020 Human Telomere probemix.....	230
SALSA MLPA P070 Human Telomere-5 probemix.....	231
SALSA MLPA P036 Human telomere probemix	232
SALSA MLPA P036B Human telomere probemix	233
SALSA MLPA P036-D2 Human telomere-3	234
SALSA MLPA P064-B2 MR1 probemix.....	235
SALSA MLPA P245-A2 Microdeletion-1 probemix	236
SALSA MLPA P106-B1 MRX probemix.....	238
ANEXO 2	241
Marcadores microsatélite empleados en los estudios de confirmación.....	243
ANEXO 3	259
Representación gráfica de las alteraciones patológicas detectadas en distintos pacientes.....	261

ANEXO 4281
Estudios de segregación familiar mediante marcadores microsatélite en
diferentes pacientes. 283

Índice de tablas

Tabla 1: Relación de algunos síndromes clásicos causados por la pérdida de regiones subteloméricas. 23

Tabla 2: Relación de síndromes que cursan con discapacidad intelectual causados por microdeleciones o microduplicaciones intersticiales. 24

Tabla 3: Set de ToTelVysion..... 48

Tabla 4: Relación de las regiones comprendidas en el *array* a la carta. 75

Tabla 5: Resumen de las alteraciones detectadas por FISH subtelomérico 90

Tabla 6: Variantes de dosis subteloméricas identificadas por una sola *SALSA* de MLPA y no confirmadas por FISH..... 93

Tabla 7: Resumen de los reordenamientos detectados por MLPA subtelomérico. .. 96

Tabla 8: Controles positivos para el *array de BACs*: relación de variantes localizadas en diferentes cromosomas, caracterizadas y acotadas mediante marcadores microsatélite. 127

Tabla 9: Variantes de dosis polimórficas descritas en individuos sanos. 131

Tabla 10: Variantes de dosis no confirmadas con técnicas alternativas, considerados posibles artefactos de la técnica..... 132

Tabla 11: Variantes de dosis confirmadas por otras metodologías y consideradas patológicas. 134

Tabla 12: Distribución de variantes de dosis observadas por paciente mediante *CGH-array* basado en oligonucleótidos..... 143

Tabla 13: Relación de todas las variantes de dosis consideradas como polimórficas, ordenadas por cromosoma y posición. 145

Tabla 14: Relación de variantes de dosis consideradas polimórficas observadas en más de un paciente de nuestra serie. 148

Tabla 15: Relación de todas las variantes de dosis consideradas como patológicas, ordenadas por cromosoma y posición. 158

Tabla 16: Relación de todas las variantes de dosis consideradas como patológicas de penetrancia incompleta, ordenadas por cromosomas y posición..... 159

Tabla 17: Relación de todas las variantes de dosis de efecto desconocido, ordenadas por cromosoma y posición. 160

Tabla 18: Tabla-resumen de los resultados obtenidos del estudio de nuestra serie con las diferentes técnicas utilizadas. 162

Tabla 19: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de FISH. 174

Tabla 20: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de MLPA..... 175

Tabla 21: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de *array* basado en BACs considerando alteración a partir de 2 clones consecutivos alterados..... 178

Tabla 22: Alternativa de la tabla 2x2 para el cálculo de sensibilidad y especificidad cuando en la interpretación de los arrays basados en BACs se considera alteración si observamos tres clones consecutivos alterados. 178

Tabla 23: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de *array* basado en oligonucleótidos considerando las variantes de efecto desconocido como no patológicas. 180

Índice

Tabla 24: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de <i>array</i> basado en oligonucleótidos cuando consideramos las variantes de efecto desconocido como patológicas.	181
Tabla 25: Resumen del coste económico de cada una de las técnicas en euros por paciente.	185
Tabla 26: Relación de series publicadas para la detección de reordenamientos subteloméricos en pacientes con DI y criterios de selección empleados.	188
Tabla 27: Relación de series publicadas para la detección de reordenamientos en todo el genoma en pacientes con discapacidad intelectual mediante arrays basados en BACs.	190
A) Pacientes a los que se les ha descartado previamente alteraciones subteloméricas.	190
B) Pacientes a los que no se les ha descartado variantes de dosis subteloméricas.	190
Tabla 28: Relación de series publicadas para la detección de reordenamientos en todo el genoma en pacientes con discapacidad intelectual mediante <i>array</i> basado en oligonucleótidos 44K.	192
A) Pacientes a los que se les ha descartado previamente alteraciones subteloméricas.	192
B) Pacientes a los que no se les ha descartado variantes de dosis subteloméricas.	192
Tabla 29: Relación del número de alteraciones no polimórficas detectadas en cada cromosoma en el total de la serie.	194
Tabla 30: Relación del número de CNVs presentes en los pacientes de nuestra serie y el número de pacientes esperados.	196

Índice de figuras

Figura 1: Relación de las diferentes causas de Discapacidad Intelectual. 21

Figura 2: Hibridación *in situ* fluorescente sobre células en metafase: a) con sondas teloméricas (fluorocromo verde, rojo y naranja) y centromérica (fluorocromo aqua) b) con sondas de secuencia única. 26

Figura 3: Esquema sobre el procedimiento de la técnica MAPH. 28

Figura 4: Esquema sobre el procedimiento de la técnica MLPA. 29

Figura 5: Imagen del escáner utilizado para la lectura de los cristales de los *arrays* basados en BACs. 70

Figura 6: Imagen del análisis de datos del CGH-*array* basado en BACs con el programa GenePix Pro 6.0 70

Figura 7: Imagen de la página web de GEPAS donde debemos introducir nuestros ficheros *.gpr para realizar la normalización de los datos en el CGH-*array* basado en BACs. 71

Figura 8: Ejemplo de la representación gráfica de los resultados normalizados de la CGH-*array* de BACs. 71

Figura 9: Ejemplo de resultado analizado por DNA Analytics 4.0 76

Figura 10: Resultado del FISH subtelo mérico en el paciente CGM967. 82

Figura 11: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente CGM967 mediante marcadores microsatélite. 83

Figura 12: Resultado del FISH subtelo mérico en la paciente CGM935. 84

Figura 13: Resultado FISH subtelo mérico en el padre de la paciente CGM935. 84

Figura 14: Caracterización de las alteraciones encontradas en la paciente CGM935 mediante marcadores microsatélite. 85

Figura 15: Resultado del FISH subtelo mérico en el paciente CGM1160. 86

Figura 16: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente CGM1160 mediante marcadores microsatélite. 87

Figura 17: Resultado del FISH subtelo mérico en el paciente XF2337. 88

Figura 18: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente XF2337 mediante marcadores microsatélite. 89

Figura 19: Diagrama de caja (Box-plot) del comportamiento de las sondas de la SALSA P036. 91

Figura 20: Representación gráfica del resultado de MLPA SALSA P036 en la familia del paciente CGM1160 94

Figura 21: Resultado de FISH y MLPA subtelo mérico de la paciente CGM1387... 97

Figura 22: Representación gráfica del resultado de MLPA SALSA P036 en el paciente XF2463. 98

Figura 23: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente XF2463 mediante marcadores microsatélite. 98

Figura 24: Representación gráfica del resultado de CGH-*array* 44K en el cromosoma 2 del paciente XF2463. 99

Figura 25: Representación gráfica del resultado de MLPA (SALSA P036) en el paciente CGM1819. 100

Figura 26: Representación gráfica del resultado del CGH-*array* 44K en el cromosoma 8 del paciente CGM1819. 100

Índice

Figura 27: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 14 del paciente CGM1819.....	101
Figura 28: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036D</i>) en la paciente CGM245.....	102
Figura 29: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 13 de la paciente CGM245.....	102
Figura 30: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 15 de la paciente CGM245.....	103
Figura 31: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036D</i>) en la paciente CGM897.....	104
Figura 32: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 4 de la paciente CGM897.....	104
Figura 33: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 11 de la paciente CGM897.....	105
Figura 34: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036D</i>) en el paciente X3361.....	106
Figura 35: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 17 del paciente X3361.....	106
Figura 36: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 21 del paciente X3361.....	107
Figura 37: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036</i>) en el paciente CGM991.....	108
Figura 38: Caracterización y confirmación de la alteración encontrada en el paciente CGM991 mediante marcadores microsatélite.....	108
Figura 39: Paciente CGM991 imagen FISH de los clones tipo BACs marcados: RP11-52O23 (rojo) utilizado como sonda control del cromosoma 14 y RP11-53610 (verde) ubicada en la región 14q11 duplicada de este paciente.....	109
Figura 40: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 14 del paciente CGM991.....	109
Figura 41: Representación gráfica del resultado de MLPA <i>SALSA P036B</i> (parte superior) y <i>SALSA P064</i> (parte inferior) en el paciente CGM506.....	110
Figura 42: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036B</i>) en los pacientes CGM1388 y CGM1397.....	111
Figura 43: Caracterización de la alteración encontrada en los pacientes CGM1388 y CGM1397.....	112
Figura 44: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 9 de los pacientes CGM1388 y CGM1397.....	113
Figura 45: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036B</i>) en el paciente X2686.....	114
Figura 46: Caracterización de la alteración encontrada en el paciente X2686.....	115
Figura 47: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array de BACs</i> en el cromosoma 22 del paciente X2686.....	115
Figura 48: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta <i>SALSA K3</i> , que incluye la sonda ubicada en la región delecionada del paciente X2686.....	116
Figura 49: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 22 del paciente X2686.....	116
Figura 50: Representación gráfica de los resultados de MLPA en la paciente XF1054.....	117

Figura 51: Resultado de los marcadores microsatélite y <i>CGH-array de BACs</i> en la paciente X1054.....	118
Figura 52: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P245</i>) en la paciente CGM165.....	119
Figura 53: Representación gráfica del resultado del cromosoma 22q del <i>CGH-array</i> de oligonucleótidos del paciente CGM165.....	120
Figura 54: Representación gráfica de la posición de las diferentes sondas utilizadas con cada una de las técnicas, para el estudio de la región 22q13 en los tres pacientes con alteraciones en esta región.	121
Figura 55: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036</i>) en el paciente CGM1313.....	122
Figura 56: Caracterización de la alteración encontrada en el paciente CGM1313 mediante marcadores microsatélite.....	123
Figura 57: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array de BACs</i> en el cromosoma 8 del paciente CGM1313.....	123
Figura 58: Representación gráfica del resultado de MLPA (<i>SALSA P036B</i>) en el paciente CGM1525.....	124
Figura 59: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array 44K</i> en el cromosoma 4 del paciente CGM1525.....	124
Figura 60: Imágenes de los <i>arrays de BACs</i> de los cuatro controles con alteraciones conocidas y caracterizadas.	128
Figura 61: Representación gráfica de los resultados del MLPA a la carta utilizado para confirmar las alteraciones detectadas por la <i>CGH-array de BACs</i> no descritas previamente en la literatura.	133
Figura 62: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array de BACs</i> en el cromosoma 3 de la paciente CGM784.	135
Figura 63: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta en el cual se encuentra la sonda <i>NCBP2ex_3</i> ubicada en la región delecionada en la paciente CGM 784.....	136
Figura 64: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array de BACs</i> en el cromosoma 2 del paciente CGM1349.....	137
Figura 65: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta con la sonda <i>DRB1</i> en diversos pacientes.....	138
Figura 66: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array de BACs</i> en el cromosoma 8 del paciente X2019, donde se aprecia el aumento de dosis para 7 sondas.....	139
Figura 67: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta con la sonda <i>CHD7</i> en varios pacientes.....	140
Figura 68: Representación gráfica del resultado del <i>CGH-array de BACs</i> en el cromosoma 7 del paciente CGM1385.....	141
Figura 69: Representación gráfica del resultado de MLPA con la <i>SALSA P064</i> en el paciente CGM1385.....	142
Figura 70: Imagen FISH de la sonda LSI ELN (rojo) en el paciente CGM1385. ..	142
Figura 71: Resultado FISH del BACs RP11-268O21 y la sonda telomérica del brazo largo del cromosoma 19 en el paciente XF1702 (parte superior) y los BACs RP11-268O21 y RP11-384E6 en la madre del paciente (parte inferior).	156

Indice

Figura 72: Algoritmo de trabajo diseñado a partir de las conclusiones obtenidas de los criterios de clasificación de este trabajo. Actualmente es utilizado para clasificar las CNVs detectadas mediante estas técnicas.	172
Figura 73: Representación mediante diagrama de barras del número de clones alterados en cada uno de los <i>array</i> de BACs estudiados a modo de control de calidad de la hibridación de los <i>arrays</i>	179
Figura 74: Comparación entre el resultado del <i>array</i> basado en BACs y el <i>array</i> basado en oligonucleótidos en el paciente XF977.	183
Figura 75: Regresión del número de alteraciones patológicas detectadas frente al tamaño del cromosoma.	194
Figura 76: Regresión del número de alteraciones patológicas detectadas frente al tamaño del cromosoma, excluyendo los dos cromosomas con acúmulo de alteraciones patológicas de penetrancia incompleta (cromosoma 16 y X). ..	195

INTRODUCCIÓN

1. DISCAPACIDAD INTELECTUAL

1.1 Definición

La organización mundial de la salud (OMS, 1992; versión electrónica 8ª edición 2009) en su décima revisión de Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas relacionados con la Salud (CIE-10) define la deficiencia mental o discapacidad intelectual (DI) como:

Un trastorno definido por la presencia de un desarrollo mental incompleto o detenido, caracterizado principalmente por el deterioro de las funciones concretas de cada época del desarrollo y que contribuyen al nivel global de inteligencia, tales como las funciones cognitivas, las del lenguaje, las motrices y la socialización.

La adaptación al ambiente está siempre afectada. La determinación del grado de desarrollo del nivel intelectual debe basarse en toda la información disponible incluyendo las manifestaciones clínicas, el comportamiento adaptativo del medio cultural del individuo y los hallazgos psicométricos.

Uno de los criterios para diagnosticar la DI es tener un coeficiente intelectual (CI) inferior o igual a 70, es decir, significativamente por debajo de la media, donde la media poblacional es 100 y la desviación típica es 15 (Stevenson RE et al., 1992). El uso de este criterio para diagnosticar la DI tiene muchas dificultades desde la práctica clínica, puesto que el resultado del CI obtenido puede verse influenciado por muchos otros factores como pueden ser: las características socioeconómicas, las características del núcleo sociofamiliar, el idioma, el profesional que realiza el test, etc. Además, medir el CI a niños menores de 5 años es casi imposible, y en estos niños el diagnóstico se realiza según la apreciación de los profesionales si el niño tiene algún tipo de retraso del desarrollo.

Recientemente se ha publicado la “Guía de intervención mhGAP para trastornos mentales y neurológicos” que ayuda a los profesionales a evaluar y actuar ante pacientes con trastornos como la discapacidad intelectual (OMS, 2011).

1.2 Clasificación y prevalencia

Atendiendo al criterio del CI se **clasifica** el grado de DI en leve, moderado, grave o profundo (OMS, 2009).

Introducción

Leve: individuos que presentan un coeficiente intelectual aproximado de 50 a 69.

Moderado: individuos que presentan un coeficiente intelectual aproximado de 35 a 49.

Grave: Individuos que presentan un coeficiente intelectual aproximado de 20 a 35.

Profundo: Individuos que presentan un coeficiente intelectual inferior a 20.

Otra **clasificación** que se puede realizar en los individuos diagnosticados de DI es según si presentan una forma sindrómica de DI o una forma no-sindrómica de DI.

- Un individuo presenta una forma de DI sindrómica cuando la DI que padece estar asociada a otras anomalías físicas y de comportamiento como pueden ser rasgos dismórficos, anomalías congénitas o retraso en el desarrollo psicomotor.
- Un individuo presenta una forma de DI no-sindrómica cuando su única manifestación es la DI.

La DI representa una de las causas de minusvalía más frecuente en niños. Afecta a cuatro de cada mil nacimientos en su forma más grave, aunque la DI leve podría afectar a 1-3% de la población (Curry et al., 1997; Ropers, 2010).

2. CAUSAS CONOCIDAS DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL

La **etiología** de la DI es muy heterogénea y variada. Se estima que la mitad de los casos son de origen genético y la otra mitad de origen ambiental (Figura 1). En global, solo se conoce la causa de la DI en la mitad de los individuos que la presentan, aunque a medida que pasan los años, se va reduciendo la porción de casos de DI idiopática (Curry et al., 1997; Ropers, 2010).

2.1 Causas de origen ambiental

Las **causas de origen ambiental** son aquellos factores externos que pueden dañar el sistema nervioso central del individuo durante la fase prenatal, perinatal o postnatal. Estos factores externos pueden ser:

- **Químicos**: sustancias tóxicas a las que están expuestos durante el periodo prenatal. (ej.: alcohol, drogas...)
- **Radiológicos**: exposición a los rayos X durante el periodo prenatal.
- **Nutricionales**: malnutrición, deficiencia de yodo en la fase prenatal.
- **Infeciosos**: rubeola, citomegalovirus en la fase prenatal o meningitis en la fase postnatal.
- **Inmunológicos**: incompatibilidad del factor Rh.
- **Isquemias** cerebrales en la fase perinatal

2.2 Causas de origen genético

Las **causas de origen genético** incluyen tanto enfermedades monogénicas como anomalías cromosómicas.

2.2.1 Enfermedades monogénicas

Una mutación en un gen puede hacer que disminuya su función proteica y causar discapacidad intelectual. Dependiendo del gen mutado, del tipo de mutación y la repercusión que tenga en la función proteica, el tipo de DI puede ser diferente. Algunos ejemplos de mutaciones en genes que causan DI son:

- **DI autosómica dominante**: una mutación en el gen *CREBBP* localizado en 16p13.3 provoca el síndrome de Rubinstein-Taybi caracterizado por retraso en el desarrollo, rasgos faciales característicos, pulgar ancho y dedos de los pies largos (Petrij et al., 1995).
- **DI autosómica recesiva**: mutaciones en las dos copias de genes que producen enzimas metabólicas pueden causar desordenes metabólicos que provocan DI, como son las mutaciones en ambas copias del gen

Introducción

PKU fenilcetonuria, las cuales producen un déficit de fenilalanina hidroxilasa causando la DI autosómica recesiva más frecuente.

- DI ligada al cromosoma X: mutaciones en genes localizados en el cromosoma X como *MECP2*, *FMR1*, *FMR2*, *PAK3*, etc. son causantes de discapacidad intelectual (Chiurazzi et al., 2001; Kleefstra and Hamel, 2005a).

La causa conocida de DI monogénica más frecuente en la población es el síndrome del cromosoma X-frágil (mutaciones en el gen *FMR1*) responsable del 1-2% de los casos (Rooms et al., 2005).

2.2.2 Anomalías cromosómicas

Las anomalías cromosómicas que causan discapacidad intelectual, pueden ser tanto numéricas (falta o exceso de un cromosoma completo), como estructurales con pérdida o ganancia de material cromosómico (falta o exceso de una región cromosómica).

- Las numéricas son aquellas en donde la causa de discapacidad intelectual se produce por la ganancia (poliploidía) o la pérdida (monosomía) de un cromosoma entero. Existen 3 poliploidías autosómicas viables, es decir, que pueden nacer niños con esta patología, que son la trisomía 21 (Síndrome de Down), la trisomía 13 (Síndrome de Patau) y la trisomía 18 (Síndrome de Edwards), siendo la trisomía 21 la causa más común de DI de origen genético estimada en 5-16% de los casos (Rooms et al., 2005). Cualquier monosomía completa de otros cromosomas autosómicos es inviable, el feto muere antes de nacer, a no ser que dicha monosomía se encuentre en mosaico.

Las aneuploidías del cromosoma X más frecuentes son la monosomía X o síndrome de Turner (45,X), la triple X (47,XXX) y el síndrome de Klinefelter en varones (47,XXY). Todas ellas pueden asociar discapacidad intelectual aunque no en todos los casos. Pero un mayor número de copias del cromosoma X (48,XXXX o 48,XXXY) aumenta la probabilidad de presentar DI, siendo de mayor gravedad cuando mayor es el número de copias del cromosoma X.

- Las anomalías cromosómicas estructurales se pueden dividir en dos subtipos: anomalías estructurales desequilibradas y anomalías estructurales equilibradas.
 - o Las anomalías estructurales desequilibradas se producen cuando un fragmento de un cromosoma se pierde o se duplica. Estos fragmentos pueden ser relativamente grandes y pueden detectarse mediante técnicas de citogenética convencionales, o por el contrario, ser pequeños (microdeleciones o microduplicaciones) y no detectarse

mediante estas técnicas, como ocurre con muchos de los reordenamientos que implican a los extremos de los cromosomas (Knight et al., 2000a), o los reordenamientos producidos por recombinación homóloga no alélica entre dos duplicaciones segmentarias con un grado de homología alto (Lupski, 2003). Los reordenamientos que están por debajo del límite de resolución de las técnicas de citogenética convencional, se conocen como reordenamientos submicroscópicos o crípticos.

- Las anomalías estructurales equilibradas que producen DI se debe principalmente a dos situaciones. Por una parte dicho reordenamiento puede producir una interrupción en un gen implicado en el neurodesarrollo, y por otra parte, el reordenamiento puede alterar los niveles de expresión de genes cercanos al punto de rotura por un efecto posicional (Kleefstra et al., 2005b).

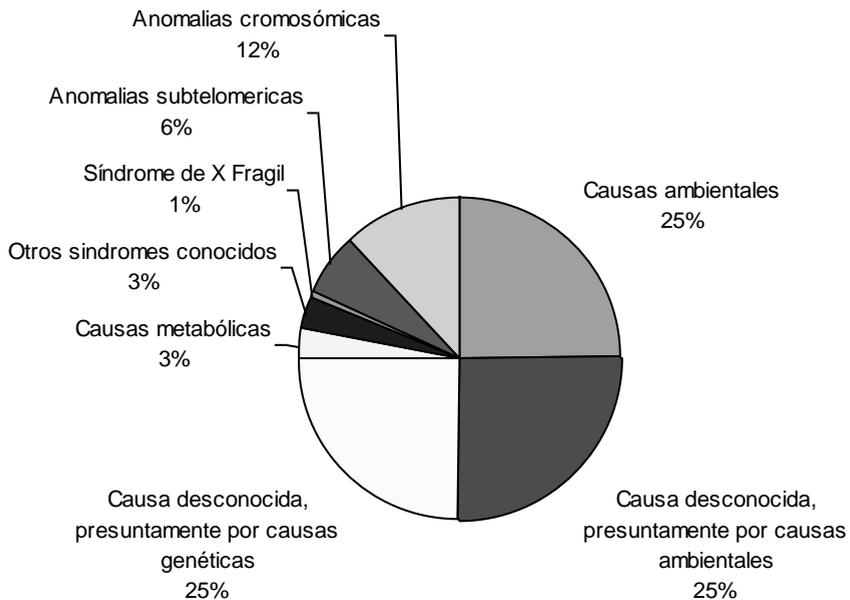


Figura 1: Relación de las diferentes causas de Discapacidad Intelectual.

3. TIPOS DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS

Podemos distinguir dos tipos de reordenamientos crípticos, dependiendo de la situación en el cromosoma:

- Reordenamientos crípticos subteloméricos: son los que implican a los extremos de los cromosomas.
- Reordenamientos crípticos intersticiales: se producen en toda la zona intersticial de los cromosomas.

Ambos tipos de reordenamientos están favorecidos por la presencia de secuencias repetidas en bajo número de copias presentes en todo el genóma (Venter et al., 2001).

3.1 Reordenamientos crípticos subteloméricos

El final de los cromosomas está formado por una región telomérica y una región subtelomérica, las cuales se organizan en dominios. Estos dominios están formados por familias de ADN repetitivo que pueden ser idénticos en diferentes cromosomas no homólogos, y esta homología es mayor cuanto más cercanas estén al extremo cromosómico, es decir, en la región telomérica (Brown et al., 1990). Se conoce que los dominios teloméricos juegan un papel importante en la longevidad de la célula, mientras que los dominios subteloméricos son regiones ricas en genes funcionales (Saccone et al., 1992).

El hecho que los dominios subteloméricos presenten un alto grado de homología entre cromosomas no homólogos (95%) y además estas regiones sean ricas en genes, las hace particularmente importantes. El alto grado de homología puede favorecer la recombinación y el intercambio de material entre cromosomas no homólogos, y la segregación posterior de estos cromosomas recombinantes, puede dar lugar a pérdidas y/o ganancias de toda una región subtelomérica con todos los genes que ella incluye.

Aunque el tamaño y la complejidad de estos dominios subteloméricos los hace muy difíciles de analizar a nivel molecular, se han desarrollado diferentes técnicas para poder estudiar estas regiones.

Hoy en día, son muchos los síndromes descritos causantes de DI por la pérdida de regiones subteloméricas (tabla 1).

Tabla 1: Relación de algunos síndromes clásicos causados por la pérdida de regiones subteloméricas.

Telómero delecionado	Síndrome	Referencia OMIM
1p36	S. monosomía 1p36	607872
4p16.3	S. Wolf-Hirschhorn	606026
5p15.2	S. Cri-du-chat	123450
16pter-p13.3	ATR-16	141750
17p13.3	S. Miller-Dieker	247200

Los reordenamientos que implican a los telómeros a menudo son reordenamientos crípticos no detectables por técnicas de citogenética convencional. Para poder detectar estos reordenamientos, se han aplicado otros tipos de técnicas como: el análisis mediante marcadores microsatélite, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas para todas las regiones subteloméricas, la amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA) entre otras. La mayoría de estas metodologías han aparecido de forma secuencial a lo largo de la última década.

Se estima que este tipo de reordenamientos crípticos causan entre un 5-10% de la DI sindrómica (Knight et al., 1999; Holinski-Feder et al., 2000; Hila et al., 2009; Pohovski et al., 2013).

3.2 Reordenamientos intersticiales

Se estima que más del 5% del genoma humano está integrado por secuencias repetidas en bajo número de copias. Muchas de estas secuencias constituyen duplicaciones segmentarias de entre 10 y 500 kb, que presentan un alto grado de homología (95%). A pesar de que su distribución no es aleatoria, podemos encontrarlas en cualquier parte del genoma (Venter et al., 2001; Carvalho et al., 2010). Estas secuencias predisponen a mutaciones genómicas o reordenamientos intersticiales recurrentes (deleciones, duplicaciones e inversiones) mediadas por recombinación homóloga no alélica (Lupski, 2003; Carvalho et al., 2010). Tanto las variantes en número de copias, también conocidas como CNVs, como las inversiones pueden influir en la expresión de genes por pérdida, ganancia o por la disrupción específica de los mismos (Buckland, 2003). Existen enfermedades genéticas causadas por reordenamientos genómicos recurrentes cuya incidencia global se supone que supera uno de cada 1.000 recién nacidos. Entre estas enfermedades se encuentran los síndromes de microdeleción y de microduplicación que podríamos considerar clásicos (tabla 2).

Introducción

Tabla 2: Relación de síndromes que cursan con discapacidad intelectual causados por microdelecciones o microduplicaciones intersticiales.

Región cromosómica	Síndrome	Referencia OMIM
22q11.2	DiGeorge	188400
7q11.23	Williams-Beuren	194050
15q11-q13	Prader-Willi/Angelman	600162
17p11.2	Smith-Magenis	182290
22q11	Cat eye	115470

Sin embargo las CNVs también pueden ser consideradas como variantes polimórficas sin repercusión fenotípica (Iafrate et al., 2004; Redon et al., 2006), bien porque los genes contenidos en ellas no son sensibles a dosis o bien porque su función no se relaciona con procesos cognitivos o del desarrollo.

4. TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS

Las técnicas de citogenética convencional permiten detectar reordenamientos cromosómicos relativamente grandes. Pero cuando estos reordenamientos escapan a la resolución de la citogenética convencional (5-10 Mb), debemos utilizar técnicas con un nivel de resolución mayor o técnicas que nos ayuden a detectar puntualmente la presencia o ausencia de fragmentos de ADN. Son muchas las técnicas que han sido y están siendo utilizadas para la detección de este tipo de reordenamientos. Algunos ejemplos son:

- Análisis de segregación mediante marcadores microsatélite.
- Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
- Hibridación genómica comparada de alta resolución sobre metafases (HR-CGH).
- FISH multicolor: Múltiple-FISH (M-FISH) y Cariotipo espectral (SKY).
- Amplificación múltiple con sondas dependientes de hibridación (MAPH).
- Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA).
- Hibridación genómica comparada sobre *array* (CGH-*array*).

4.1 Análisis de segregación mediante marcadores polimórficos

La técnica se basa en la utilización de regiones polimórficas hipervariables de ADN. Mediante un análisis de segregación, se compara el patrón de bandas obtenido del ADN del paciente con el patrón de bandas obtenido del ADN de los progenitores, pudiendo deducir pérdidas alélicas, ganancias alélicas o presencia de alelos de un solo progenitor, en caso que el marcador sea informativo.

En 1993 Wilkie aplicó esta técnica a la búsqueda de anomalías cromosómicas crípticas en pacientes con discapacidad intelectual inespecífica, utilizando un conjunto de polimorfismos hipervariables que cubrían todas las regiones subteloómicas (Wilkie, 1993).

4.2 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La técnica FISH permite marcar cromosomas enteros o porciones de éstos mediante la hibridación de sondas fluorescentes que se unen a secuencias específicas. Se pueden diferenciar cuatro tipos de sondas FISH comerciales: sondas específicas de gen o locus, sondas centroméricas, sondas subteloómicas y sondas de pintado cromosómico (figura 2).

Introducción

De todas ellas, las sondas más utilizadas para la búsqueda de reordenamientos cromosómicos submicroscópicos son las sondas de secuencia única (LSI), entre las que se incluyen las sondas subteloméricas.

- **Sondas específicas de gen o locus (LSI):** Estas sondas son específicas para un locus determinado. Tienen un tamaño de 0,8-1 Mb si se utilizan vectores de clonación de tipo BACs (Cromosomas Artificiales de Bacteria) y YACs (Cromosomas Artificiales de Levadura). Mediante estas sondas podemos detectar reordenamientos estructurales de genes o de regiones cromosómicas concretas, además de identificar deleciones y duplicaciones submicroscópicas. La aplicación de estas sondas requiere tener la sospecha previa de la implicación de la región a estudiar.
- **Sondas subteloméricas:** son sondas de ADN que se unen a secuencias específicas en la región subtelomérica. La longitud de estas sondas varía dependiendo de la región (30-120 kb). Existen disponibles grupos de sondas que permiten identificar todas las regiones subteloméricas a excepción de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Estas sondas se utilizan para la búsqueda de reordenamientos subteloméricos crípticos.

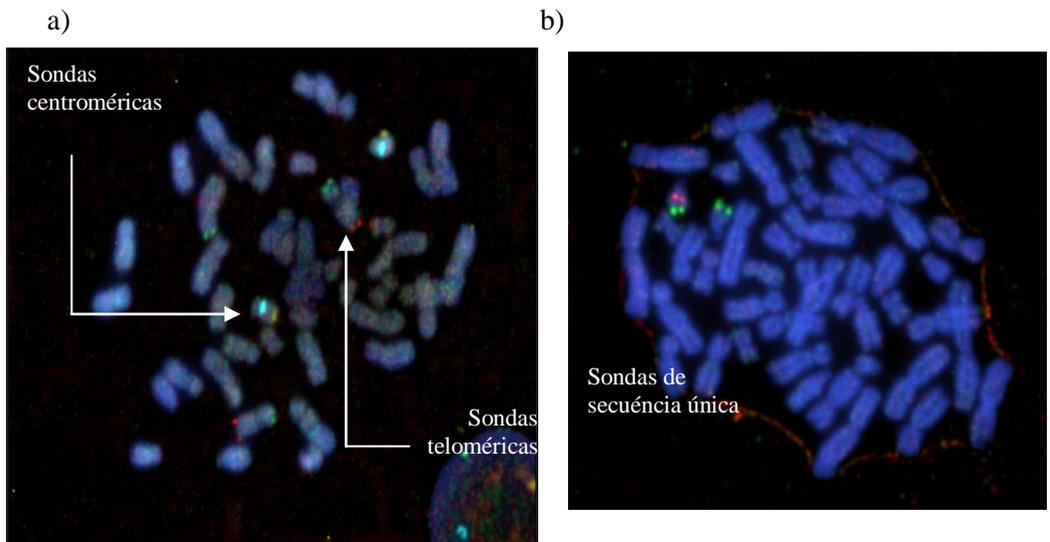


Figura 2: Hibridación *in situ* fluorescente sobre células en metafase: a) con sondas teloméricas (fluorocromo verde, rojo y naranja) y centromérica (fluorocromo azul) b) con sondas de secuencia única.

4.3 Hibridación genómica comparada de alta resolución (HR-CGH)

La técnica de la CGH sobre metafases fue descrita en 1992 por Kallioniemi y permite el rastreo de anomalías cromosómicas en todo el genoma mediante una única hibridación, con una resolución de entre 3-10 Mb (Kallioniemi et al., 1992).

Esta técnica consiste en marcar dos ADNs genómicos, uno perteneciente a la muestra problema y el otro a un individuo control, con fluorocromos distintos y co-hibridar ambos ADNs marcados en presencia de ADN cot-1 sobre una extensión cromosómica de un individuo normal. Durante esta hibridación, los dos ADNs entran en competición para hibridar sobre el ADN de los cromosomas en metafase. El análisis se realiza mediante un software específico para la CGH mediante el cual, inicialmente se obtenía un nivel de resolución similar al del cariotipo convencional. Posteriormente en 1999 Kirchhoff modifica el software utilizado para la CGH convencional, consiguiendo una CGH de alta resolución, con una sensibilidad de hasta 3 Mb (Kirchhoff et al., 1999).

4.4 FISH multicolor: Múltiple-FISH (M-FISH) y Cariotipo espectral (SKY)

Ambas técnicas se describen simultáneamente en el tiempo. En 1996 Speicher describe la técnica M-FISH (Speicher et al., 1996) y en el mismo año Schröck describe la técnica SKY (Schrock et al., 1996). Ambas técnicas se basan en el empleo simultáneo de un cóctel de 24 mezclas de sondas de pintado cromosómico, marcadas con distintas combinaciones de fluorocromos que hibridan en todos los cromosomas de una misma metafase, permitiendo una rápida identificación de todos los cromosomas. Se obtiene un cariotipo de colores que permite detectar y clasificar alteraciones numéricas y estructurales intercromosómicas, puesto que provocan un cambio en el patrón característico de pintado de cada cromosoma. Ambas técnicas tienen una resolución de aproximadamente 1 Mb y la diferencia entre ellas está en el modo de adquisición y análisis de las imágenes.

4.5 Amplificación múltiple con sondas dependientes de hibridación (MAPH)

Esta técnica descrita por Armour en el año 2000 se basa en la fijación de 1 µg de ADN genómico sobre una membrana de Nylon y la posterior hibridación con un grupo de sondas de secuencia específica sobre ese ADN genómico

Introducción

(Armour et al., 2000). Adyacente a cada uno de los extremos de las sondas, se encuentran unos cebadores universales marcados con fluorescencia. Tras unos lavados y una posterior desnaturalización, se amplifican las sondas que han hibridado con los cebadores universales y se realiza una separación de los fragmentos mediante electroforesis capilar. Se compara la intensidad relativa de los picos para determinar el número de copias que han hibridado. Mediante esta técnica podemos analizar 40 secuencias diferentes (figura 3).

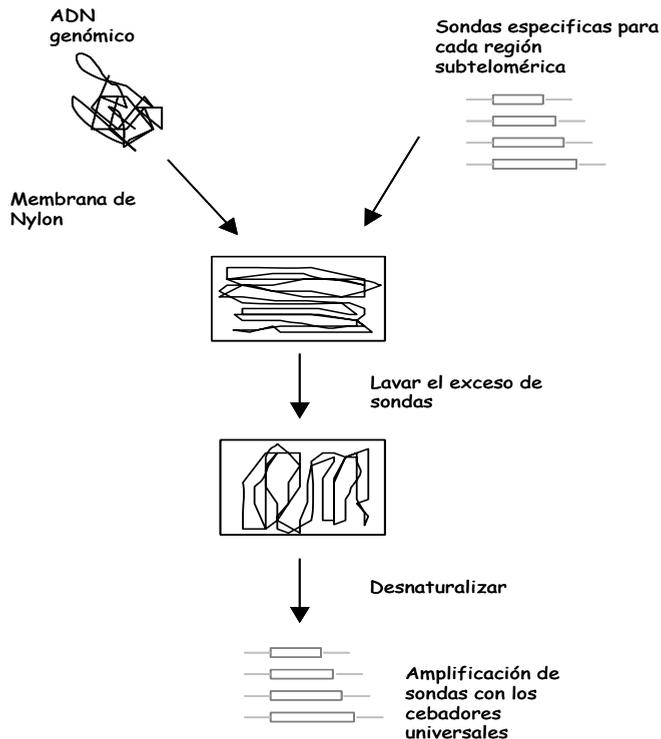


Figura 3: Esquema sobre el procedimiento de la técnica MAPH.

4.6 Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA)

En 2002 Schouten y colaboradores describen la técnica del MLPA (Schouten et al., 2002). Esta técnica (similar al MAPH) consiste en la identificación de secuencias diana por la hibridación de dos secuencias adyacentes que posteriormente se unen tras un proceso de ligación. Ambas sondas están unidas a cebadores universales y una de ellas presenta también una secuencia de relleno de longitud variable, de tal forma que en una misma reacción podemos analizar 45 secuencias diana. Después de la desnaturalización,

hibridación y ligación, estas sondas son amplificadas mediante PCR con los cebadores universales.

Posteriormente, mediante electroforesis capilar, se separan los diferentes fragmentos de sondas amplificadas. El área de los picos de cada producto amplificado refleja el número de copias de cada secuencia diana, pudiendo detectar duplicaciones y deleciones de regiones concretas (figura 4).

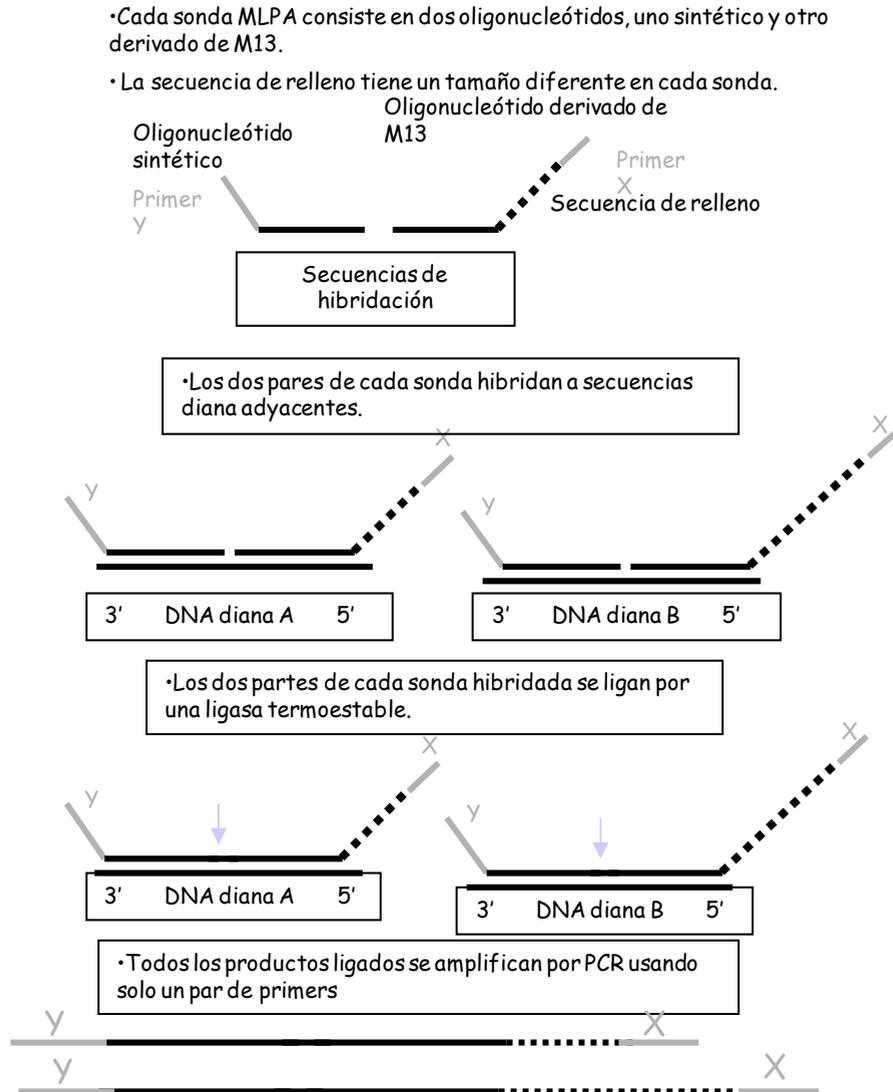


Figura 4: Esquema sobre el procedimiento de la técnica MLPA.

Esta técnica, al igual que el MAPH, se aplica para el diagnóstico de diferentes enfermedades como las referidas en el punto 3 de la introducción, que se basa en la detección de pérdidas o ganancias de fragmentos de ADN.

4.7 CGH basado en Array

Con la aparición de las primeras matrices o *arrays* de clones derivados de cromosomas humanos (BAC/PAC), se empezó a aplicar la técnica de la CGH en este tipo de soportes. Solinas-Toldo en 1997 fue el primero que aplicó la CGH a las matrices de BACs mejorando así la resolución de la CGH convencional y la HR-CGH, pudiendo valorar la dosis de las secuencias correspondientes a los clones incluidos en la matriz (Solinas-Toldo et al., 1997).

La hibridación genómica comparada sobre *arrays* o CGH-*array* se basa en el mismo principio de una CGH convencional, con la diferencia de que los cromosomas en metafase son sustituidos por fragmentos de ADN de localización conocida, fijados a un soporte formando una matriz.

Las matrices pueden estar formadas tanto por cromosomas artificiales de bacterias (BACs), como por secuencias generadas por PCR, como clones de cDNA o incluso por oligonucleótidos. Además, dependiendo de las secuencias que incorporen estas matrices, el *array* puede analizar cromosomas enteros (Albertson and Pinkel, 2003; Bruder et al., 2001), porciones de cromosomas (Yu et al., 2003), regiones específicas como las subteloméricas (Veltman et al., 2002) o rastrear el genoma completo (Snijders et al., 2001; Veltman et al., 2003; Vissers et al., 2003).

5. UN PASEO HISTÓRICO EN LA BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS EN PACIENTES CON DISCAPACIDAD INTELECTUAL

5.1 Reordenamiento subteloméricos

El primer estudio de búsqueda de reordenamientos subteloméricos en una serie de individuos con DI idiopática fue realizado en 1995 (Flint et al., 1995) utilizando marcadores de ADN polimórficos subteloméricos. Se detectaron deleciones y duplicaciones teloméricas analizando variantes de repetición del número de copias (VNTR), mediante Southern Blot, comparando el patrón de los marcadores entre padres e hijos. En este trabajo se estimó que los reordenamientos subteloméricos podían causar el 3% de los casos de DI idiopática.

En 1996 se completo el primer grupo de sondas FISH marcadas con fluorocromos localizadas a 300 kb de las repeticiones teloméricas (National Institutes of Health, 1996), que posteriormente fue mejorado por Knight (Knight and Flint, 2000). Aplicar la técnica de FISH con este grupo de sondas fluorescentes permitía detectar cualquier reordenamiento de las regiones teloméricas de todos los cromosomas a excepción de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Uno de los primeros estudios de FISH subtelomérico realizado en una serie de pacientes con discapacidad intelectual fue el estudio de Knight. Estudió 284 pacientes con DI moderada-severa y 182 pacientes con DI leve. El resultado fue la detección de un 7,4% de reordenamientos subteloméricos en pacientes con DI moderada-severa y un 0,5% en pacientes con DI leve (Knight et al., 1999).

En el año 2001 se realizó un estudio de búsqueda de reordenamientos subteloméricos mediante marcadores microsatélite fluorescentes de forma automatizada para detectar translocaciones desequilibradas y disomías uniparentales (Colleaux et al., 2001). Pero en este trabajo, Colleaux se encontró con el inconveniente de la falta de resultados para algunos telómeros en el estudio de algunos pacientes, debido a la escasez de marcadores microsatélite en las regiones subteloméricas y a la falta de informatividad.

Con la descripción en 2000 de la técnica MAPH, Sismani en 2001 empleó esta técnica para la detección de reordenamientos subteloméricos (Sismani et al., 2001). Pero fueron pocas las series estudiadas mediante esta técnica.

En el año 2002, Veltman diseñó un array específico de regiones subteloméricas (Veltman et al., 2002). Y dos años después, en el 2004 Harada utilizó esta técnica para la detección de reordenamientos subteloméricos en una serie con 69 pacientes (Harada et al., 2004).

En 2004, dos años después de la descripción de la técnica MLPA, Koolen publicó la primera serie de individuos con DI estudiada mediante esta

Introducción

técnica para la detección de reordenamientos subteloméricos. Estudió una serie de 210 pacientes obteniendo al final un 6,7% de individuos con alteraciones en estas regiones (Koolen et al., 2004).

Han sido muchos los estudios publicados para la búsqueda de estos reordenamientos subteloméricos como causa de DI. A medida que han aparecido nuevas tecnologías, se ha ido variando la técnica para su detección. Si sumamos los pacientes de las series publicadas hasta el 2011, en total se han estudiado al menos 31.841 pacientes con un porcentaje medio de detección de 6,9%. La técnica más utilizada para la búsqueda de este tipo de reordenamientos es la técnica del FISH, mediante la cual se han estudiado 17.824 pacientes con un porcentaje de detección de 7,3% (tabla 25).

5.2 Reordenamiento intersticiales

Una de las primeras técnicas que se utilizó para la búsqueda de reordenamientos intersticiales fue la técnica de FISH, en aquellas regiones conocidas, propensas a sufrir reordenamientos (ver 3.2 Introducción). Pero posteriormente, gracias al desarrollo de técnicas de CGH basadas en *arrays*, se empezó a detectar reordenamientos no descritos. En 2003 Vissers publicó una de las primeras series de rastreo de desequilibrios genómicos en pacientes con discapacidad intelectual y rasgos dismórficos. Utilizó la técnica CGH basada en *array* de clones BACs obteniendo un porcentaje de detección de alteraciones del 10% (Vissers et al., 2003). Posteriormente se han ido publicando otras series con la misma tecnología pero con plataformas de *arrays* diferentes y porcentajes de detección de alteraciones entre el 10 y el 25% (Shaw-Smith et al., 2004; Schoumans et al., 2005; Rosenberg et al., 2006; Fan et al., 2007; Hayashi et al., 2011).

Se están identificando una gran cantidad de variantes de dosis patológicas, pero también polimórficas, es decir, se han encontrado variantes de dosis en población normal sin repercusión clínica aparente (Redon et al., 2006; Iafrate et al., 2004). A día de hoy, se han descrito más de 3.500 variantes polimórficas, que implican a más del 5% de todo el genoma y se encuentran catalogadas en bases de datos como UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>).

6. CONOCIENDO EL GENOMA

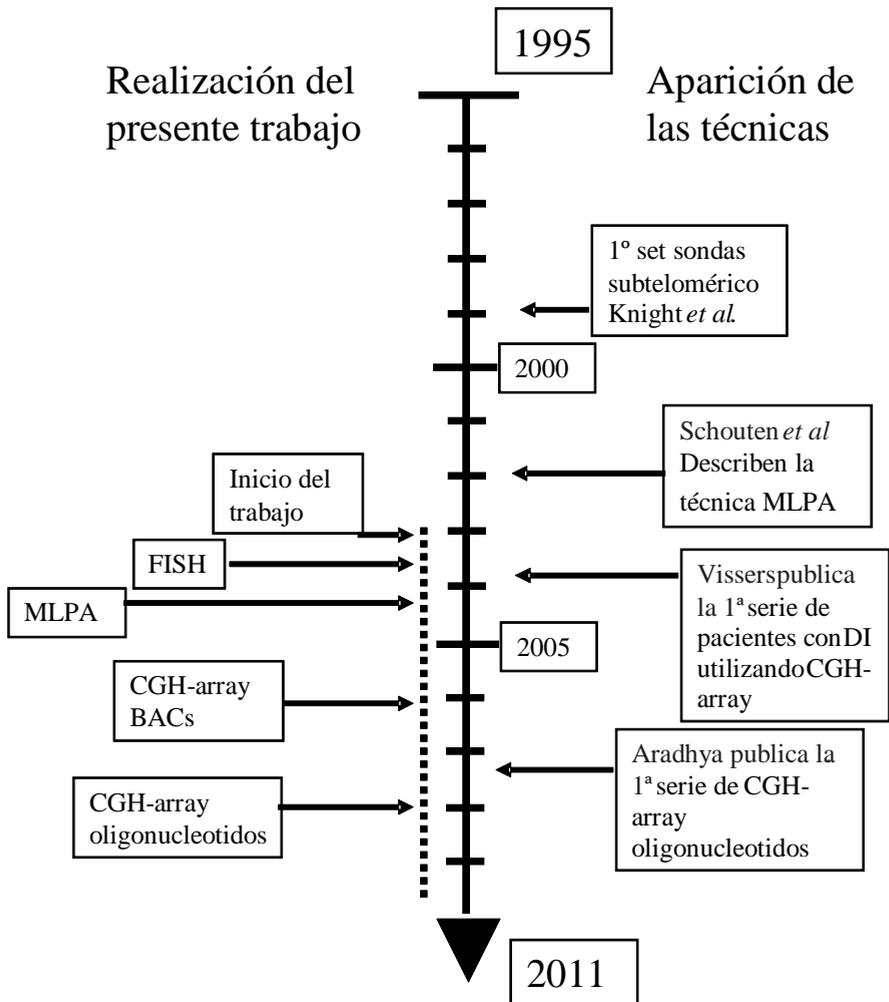
Los estudios realizados en pacientes con DI para la búsqueda de estos reordenamientos, así como los estudios realizados en población control, nos muestran la existencia de una gran cantidad de variantes del número de copias (CNVs) en el genoma. Estas CNVs, se clasifican en diferentes categorías:

- CNVs causantes de patología.
- CNVs polimórficas sin repercusión fenotípica.
- CNVs de significado incierto.

No resulta fácil clasificar las CNVs detectadas en los pacientes, puesto que en algunos casos dichas variantes son únicas y no se han descrito en otros pacientes, o son heredadas de un progenitor sano el cual no presenta clínica, o se ha detectado tanto en estudios de individuos con DI como en estudios de población control. Por ello, debemos conocer más a fondo este tipo de variantes, para poder clasificarlas adecuadamente y poder dar un diagnóstico a los pacientes y un consejo genético a las familias afectadas.

Todo ello, nos hace pensar que la arquitectura del genoma es mucho más dinámica de lo que se pensaba en un primer momento, y esto se puede observar gracias a trabajos como el que se presenta a continuación.

7. CRONOLOGIA



Objetivo

OBJETIVO

Objetivo

HIPÓTESIS

Los reordenamientos genómicos son una causa importante de retraso del neurodesarrollo y anomalías congénitas. La aplicación de diferentes tecnologías nos va a permitir evaluar qué método es el más adecuado para su detección y aplicación en la práctica clínica.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es evaluar la aplicabilidad de diferentes tecnologías para la detección de reordenamientos genómicos desequilibrados en pacientes con retraso psicomotor y anomalías congénitas.

Este objetivo general se desglosa en tres objetivos concretos:

1. Detección y clasificación de las variantes de dosis en las siguientes categorías:

- Causantes de la patología
- Variantes polimórficas
- Variantes de significado incierto

2. Valorar el coste-beneficio de las tres técnicas (FISH, MLPA y *CGH-array*) para la detección de reordenamientos genómicos desequilibrados.

Este objetivo se puede desglosar en:

- Análisis comparativo de la técnica FISH frente a la técnica MLPA para la detección de alteraciones subteloméricas: sensibilidad y frecuencia de CNVs patológicas.
- Valorar la utilización de dos tipos de *arrays* (BACs y Oligonucleótidos) para la detección de variantes en el número de copias en todo el genoma causantes de patología: sensibilidad y frecuencia de CNVs.

3. Estimar la frecuencia relativa de los reordenamientos genómicos submicroscópicos patológicos, detectables mediante cada una de estas técnicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado para la realización de este trabajo ha sido muestras de ADN genómico y cultivo de linfocitos de tres grupos de individuos diferentes. Por una parte se encuentran los individuos objeto de estudio, que son **pacientes con retraso del neurodesarrollo y anomalías congénitas** de etiología desconocida. Por otra parte se encuentra un grupo de **individuos control**, no relacionados con los pacientes, y por último, para poder completar y sacar conclusiones de los resultados obtenidos en los pacientes, ha sido necesario obtener muestra de los **progenitores**.

1.1 Pacientes y controles

1.1.1 Pacientes

La serie estudiada se compone de 202 pacientes, 95 mujeres y 107 varones, recogidos en la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario La Fe, tras la obtención del consentimiento informado por parte de los progenitores para la participación en el estudio. La mayoría de estos pacientes fueron remitidos por los neuropediatras del mismo hospital y otros centros públicos de la Comunidad Valenciana. Una minoría de casos fueron remitidos desde servicios de endocrinología y neonatología.

Todos los pacientes presentaban discapacidad intelectual o retraso del desarrollo, asociado a anomalías congénitas, no encuadrable en síndromes conocidos tras un examen clínico realizado al menos por dos especialistas diferentes. De esta forma, el criterio que se estableció para la selección de los pacientes que se incluyeron en este estudio fue la presencia de discapacidad intelectual o retraso del neurodesarrollo asociado a:

1. anomalías congénitas como rasgos dismórficos, cardiopatías, alteraciones renales, dérmicas, neurológicas, etc.
2. antecedentes familiares de retraso del neurodesarrollo.
3. antecedentes familiares de abortos de repetición en los progenitores.

Los pacientes debían presentar un estudio de cariotipo y Síndrome del X frágil normal.

La recogida de los datos clínicos de los pacientes se realizó por diferentes especialistas en el tema: Lourdes Badía, Francisco Martínez y Mónica Roselló.

Material y Métodos

1.1.2 Controles

Se recogió muestra de ADN de un total de 22 individuos sanos, 11 varones y 11 mujeres con edades comprendidas entre los 25 y los 40 años. Con las muestras de estos individuos control se obtuvieron dos mezclas de ADN de referencia, una mezcla con los varones (mezcla control de ADN de varón), y otra con las mujeres (mezcla control de ADN de mujer). Estas mezclas han sido utilizadas durante todo este trabajo en las técnicas de MLPA y CGH-*array* puesto que son técnicas de cuantificación relativa. El objetivo de utilizar en estos caso mezclas de ADN control es el de minimizar las posibles variantes de dosis polimórficas individuales.

1.1.3 Grupo de progenitores

Se extrajo muestra de ADN de la mayoría de progenitores de los pacientes incluidos en este estudio. Posteriormente, se obtuvo una nueva muestra de sangre para realizar cultivos celulares y obtener metafases para los estudios de FISH, en aquellos casos que fue necesario para completar el estudio.

1.2 Obtención de células en metafase a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica

La extracción de la muestra para la obtención de células en metafase a partir de un cultivo de sangre periférica, se realizó en un tubo con 0.1% de heparina sódica. Si la siembra se realizaba en el mismo día de la extracción, la muestra se podía conservar a temperatura ambiente, mientras que si la siembra se realizaba al día siguiente era conveniente mantenerla a 4°C, siendo aconsejable realizar dicha siembra antes de 24 horas. El medio de cultivo utilizado ya estaba preparado para la utilización de sangre total por lo que no fue necesario realizar una separación previa de los linfocitos.

Protocolo cultivo de linfocitos

Siembra

1. Preparar un tubo con 6 ml de medio de cultivo [PB-MAX™ Karyotyping Medium](#) (GIBCO)
2. Añadir 8 gotas de la muestra mediante una jeringa y una aguja estéril.
3. Dejar incubar a 37°C en una estufa durante 72 horas.

Sacrificio

1. Añadir al cultivo 0,1 ml del antimitótico colchicina “Colcemid” a una concentración de 10 µl/ml
2. Dejar actuar durante 1 hora a 37°C.

Choque hipotónico

1. Centrifugar 5 min. a 1500 rpm y aspirar el sobrenadante.
2. Añadir 5 ml de cloruro potásico (506 mg KCl /100 ml H₂O), y dejar actuar durante 15 min. a temperatura ambiente.

Fijación

1. Añadir 0,5 ml de fijador *Carnoy* (metanol:acético 3:1) a la suspensión celular con el choque, agitar y centrifugar 5 min. a 1500 rpm.
2. Aspirar el sobrenadante y añadir 5 ml de *Carnoy*, mezclar y dejar 10 min. a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 5 min. a 1500 rpm. y repetir el proceso del paso anterior de 2 a 3 veces más.

Una vez se tenía la suspensión de material nuclear suficientemente limpia, se procedía a realizar las extensiones sobre los portaobjetos. El material fijado se conservaba a -20°C hasta que se volviera a utilizar.

1.3 Extracción y cuantificación de ADN a partir de sangre periférica

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de una muestra de sangre periférica (SP) recogida en anticoagulante EDTA (1mM) en un volumen de aproximadamente 5 ml.

En este trabajo se utilizó el protocolo de extracción fenólica, descrito por Miller (Miller et al., 1988).

Extracción de ADN genómico

Lavado de la sangre

1. Depositar la sangre periférica en un tubo de 50 ml y enrasar con suero fisiológico (NaCl 0.9%).
2. Centrifugar a 2500 rpm. durante 10 min. a 4°C y eliminar el sobrenadante aspirando con una pipeta *pasteur*.
3. Repetir el proceso de nuevo (en este punto se puede detener el protocolo congelando el paquete celular a -20°C hasta el momento de la lisis celular).

Lisis celular

1. Añadir al paquete celular la solución de lisis de eritrocitos (5 ml Tris 2M pH 7,5 + 2,5 ml Cl₂Mg 1M + csp 500 ml H₂O) enrasando a 50 ml.
2. Agitar cuidadosamente hasta que el paquete celular se disuelva y dejar a 4°C durante 30 min. agitando de vez en cuando.
3. Centrifugar a 4°C durante 15 min. a 3000 rpm.
4. Decantar el sobrenadante y romper el pelet con vortex, procurando que éste se disgregue bien.
5. Añadir 25 ml de Nonidet P-40 al 0,1%, y mezclar suavemente.
6. Centrifugar a 4°C durante 15 min. a 3500 rpm y decantar el sobrenadante.
7. Valorar el tamaño del pelet, el cual se corresponde a la cantidad de leucocitos y romper el pelet con vortex.
8. Añadir de 3 a 5 ml de solución A (dependiendo del tamaño del pelet). La solución A consta de: 1ml ClNa 5M + 5ml EDTA 0.25M + 2,5 ml SDS al 10% + csp 50 ml H₂O.
9. Agitar con vortex para homogeneizar.
10. Añadir 20 µl/ml de proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml y dejar las muestras a 56°C en baño húmedo durante toda la noche.

La proteinasa K junto con la solución A producen la digestión de las proteínas.

Fenolización

1. Sacar los tubos del baño y añadir volumen por volumen (v/v) la mezcla fenol/cloroformo/isoamílico, agitar vigorosamente.
2. Centrifugar a 8°C durante 10 min. a 3000 rpm y desechar la parte inferior por aspiración con una pipeta *pasteur*. Repetir el proceso una segunda vez.
3. Añadir v/v de cloroformo/isoamílico y se agita. Así eliminamos el fenol.
4. Centrifugar a 8°C durante 10 min. a 3000 rpm y desechar la parte inferior por aspiración con una pipeta *pasteur*. Repetir el proceso una segunda vez.
5. Centrifugar a 8°C durante 5 min. a 3000 rpm y pasar la fase superior a otro tubo perfectamente rotulado. Con esto se consigue eliminar todo resto de fenol/cloroformo, quedándonos solo la fase superior que es donde se encuentra el ADN.

Precipitación del ADN

1. Añadir ClNa 5M a razón de 400 µl por cada 5 ml de solución A y etanol absoluto a razón de 2 v/v y agitar cuidadosamente.

2. Dejar las muestras a -20°C durante media hora para que el ADN termine de precipitar.
3. Recoger la medusa (si es visible y esta compacta) mediante una pipeta *pasteur* de vidrio a la que se le ha cerrado el extremo mediante calor, formando una especie de anzuelo. Si la medusa no es visible o se encuentra fragmentada, centrifugar a 4°C durante 10 min. a 3000 rpm y decantar el sobrenadante. El pelet que se obtiene se lava con etanol al 70%, se centrifuga de nuevo a 4°C durante 10 min. a 3000 rpm. Decantar el sobrenadante y dejar secar el pelet. Una vez seco, añadir Tris/EDTA para resuspender.
4. Lavar la medusa dos veces con etanol frío al 70% y resuspender con Tris/EDTA en un rango de volumen de 0,5-3 ml.
5. Cuantificar una vez resuspendido el ADN durante al menos 2 horas, mirando la absorción de la muestra a 160-280 nm mediante el sistema *NanoDrop*, para lo cual se requiere únicamente 1 μl de muestra.

Las muestras se pueden conservar a 4°C o a -80°C

2. TÉCNICA DE FISH (FLUORECENT IN SITU HYBRIDIZATION)

En una primera fase del estudio, esta técnica se utilizó para detectar reordenamientos genómicos subteloméricos en 34 pacientes cuando todavía no estaban descritas otras técnicas como el MLPA. En una segunda fase, se utilizó para confirmar resultados obtenidos mediante la técnica MLPA, así como para la detección de alteraciones estructurales equilibradas en los progenitores de pacientes con desequilibrios subteloméricos.

2.1 FISH con sondas teloméricas

Para realizar el rastreo de reordenamientos subteloméricos, se utilizó el set de sondas subteloméricas de VYSIS (ToTelVysion™ Multi-Color, VYSIS, Downers Grove, IL) que consiste en 62 sondas FISH de ADN, las cuales se distribuyen en 15 mezclas (Tabla 3).

Tabla 3: Set de ToTelVysion

	Fluorocromo green	Fluorocromo red	Fluorocromo orange	Fluorocromo Aqua
Mezcla 1	1p	1q	Xp/ Yp	Xcen
Mezcla 2	2p	2q	Xq/ Yq	Xcen
Mezcla 3	3p	3q	22q	22q11
Mezcla 4	4p	4q	21q	21q22
Mezcla 5	5p	5q		
Mezcla 6	6p	6q	13q	13q14
Mezcla 7	7p	7q	14q	
Mezcla 8	8p	8q	17p	17cen
Mezcla 9	9p	9q	17q	17cen
Mezcla 10	10p	10q	15q	15q22
Mezcla 11	11p	11q	18p	18cen
Mezcla 12	12p	12q	18q	18cen
Mezcla 13	16p	16q		
Mezcla 14	19p	19q		
Mezcla 15	20p	20q		

En estas 15 mezclas, se encuentran representados todos los telómeros de los cromosomas, a excepción de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22). El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante de las sondas con pequeñas modificaciones. Con el fin de reducir el gasto en sondas, se minimizó el área de hibridación de cada mezcla utilizando portaobjetos de inmunofluorescencia, los cuales contienen ocho pocillos de 6 mm de diámetro. De esta forma se pudo reducir el volumen de sonda utilizado a 0,8 µl/pocillo.

Protocolo FISH con sondas subteloméricas

Preparación de los portaobjetos

1. Lavar los portaobjetos con agua destilada e introducirlos en una jarra *coplin* con metanol durante al menos un día antes de utilizarlos.
2. Dejar secar los portaobjetos al aire. Humedecer con *Carnoy* y dejar escurrir.
3. Dejar caer aproximadamente 1,5 μ l de suspensión celular en cada pocillo y secar al aire.
4. Examinar las extensiones celulares mediante un microscopio de contraste de fases valorando los 15 mejores pocillos, los cuales se utilizarán para realizar la hibridación.
5. Dejar envejecer las preparaciones toda la noche para obtener una mejor calidad de la hibridación.

Prehibridación

1. Introducir los portaobjetos en una solución de formaldehído al 1% y dejar durante 15 min. a temperatura ambiente.
2. Lavar con una solución de PBS durante 5 min. a temperatura ambiente.
3. Incubar en una solución de HCl 1N a 37°C durante 15 min.
4. Lavar con una solución de PBS durante 3 min. a temperatura ambiente
5. Incubar en una solución de 2X SSC a 37°C durante 10 min.
6. Deshidratar en series de etanol creciente 70-90-100% y dejar secar.
7. Preparar la cámara húmeda de hibridación (*Thermobryte*) poniendo las bandas de papel en las ranuras y humedecerlas con H₂O.
8. Conectar y seleccionar el programa 73°C, 3min/ 37°C, 4-20horas.

En este momento se ha de procurar trabajar con la menor luz posible para no dañar la fluorescencia de las sondas.

Desnaturalización e hibridación:

1. Aplicar 0,8 μ l de sonda en el área de hibridación correspondiente.
2. Depositar el cubreobjetos de 50X24 mm
3. Someter a las extensiones con la sonda a una temperatura de 73°C durante 3 min. para realizar la desnaturalización tanto del ADN cromosómico como de las sondas.
4. Dejar hibridando a una temperatura de 37°C durante toda la noche.

Lavados

1. Preparar una jarra *coplin* con solución de primer lavado (0,4XSSC / 0,3% NP-40) y colocar en un baño a 73°C.
2. Preparar una jarra *coplin* con solución de segundo lavado (2XSSC / 0,1% NP-40) a temperatura ambiente
3. Eliminar el cubreobjetos e introducir el portaobjeto rápidamente en la solución de primer lavado. Agitar 2-3 segundos y repetir con otro porta. Dejar 2-3 min.
4. Pasar los portaobjetos a la solución de segundo lavado. Agitar 2-3 segundos y dejar 2 min.
5. Sacar los portas y dejar escurrir.

Material y Métodos

Contratinción

1. Aplicar 2µl de *DAPI* en cada área de hibridación (esta sustancia nos da contraste para poder localizar las metafases y los núcleos, y también es un protector de la fluorescencia, puesto que contiene *antifade*).
2. Cubrir con un cubreobjetos de 50X24 mm evitando que queden burbujas y sellar con esmalte de uñas por los lados.

En este momento ya se puede ver en el microscopio. En este trabajo se utilizó un microscopio *Nikon Eclipse E600 microscope (Tokyo, Japan)* y el programa informático de análisis de imagen: *the Quips R Imaging Software (VYSIS, Downers Grove, IL)*.

Para conservar las muestras hibridadas, se guardaron a -20°C .

2.2 FISH con sondas no comerciales

Las sondas utilizadas en este protocolo se obtuvieron a partir de clones BACs. Estos clones se seleccionaron de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se pidieron al Instituto de Investigación del Hospital de niños de Okland “Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI)” Email: BACPACorders@chori.org (<http://bacpac.chori.org/hmale11.htm>)

Estos clones BACs fueron:

- En el cromosoma 14: RP11-52O23 y RP11-53610
- En el cromosoma 19: RP11-268O21, RP11-30F17, RP11-242J2, RP11-384E6

Una vez recibido el vial con las bacterias transfectadas del BAC, se procedió a realizar el cultivo bacteriano, la purificación del ADN y el marcaje fluorescente siguiendo el siguiente protocolo:

Protocolo de obtención de una sonda FISH no comercial

Siembra

1. Sembrar la colonia de bacterias en cultivo líquido. El medio de cultivo está formado por medio LB + 20µg/µl de Clorafenicol.
2. Dejar durante toda la noche a 37°C en agitación.
3. Realizar la miniprep. Para ello se utiliza el kit de *PSI ψ Clone BAC DNA isolation (Princeton Separations)* siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial:

Purificación de BAC's, Miniprep:

Se recomienda crecer los cultivos de 20 a 24 horas con cloramfenicol. OD 600 de 4.0-6.0

1. Añadir 0,5 ml de *Resuspensión Buffer (1)* al tubo de RNase A. Mezclar bien. Añadir 0,25 ml de este RNase A al *Resuspensión Buffer (1)*
2. Centrifugar 3-5 ml de cultivo.
3. Resuspender el pelet celular con 0,5 ml de *Resuspensión Buffer (1)* con RNase (con pipeta) y transferir a un tubo *ependorf* de 1,5 ml.
4. Añadir 0,5 ml de *Lysis Buffer (2)* y mezclar bien, por inversión. Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
5. Añadir 0,5 ml de *Neutralization Buffer (3)* y mezclar bien, por inversión.
6. Dejar en hielo durante 10 min.
7. Centrifugar a 20.000g durante 10 min .
8. Recoger el sobrenadante (aprox. 1,4 ml.) y transferir a un tubo estéril de 15 ml Falcon.
9. Diluir el lisado con 1,0 ml de agua estéril y mezclar bien.
10. Añadir 0,5 ml de *Equilibration Buffer (4)* a las columnas BAC, vortex y dejar drenar por gravedad.
11. Pasar por las columnas en dos aplicaciones, los 2,4 ml.
12. Lavar las columnas BAC con 2x1,0 ml de *Wash Buffer (5)* y dejar drenar por gravedad.
13. Añadir 50-100 µl de *Elution Buffer (6)* tapando la parte de debajo de la columna.
14. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a 750g 2 min. para recoger el eluido.
16. Precipitar el BAC DNA añadiendo 1 volumen de alcohol isopropanol y mezclar.
17. Centrifugar 30 min. a 20.000 g.
18. Lavar el pellet con 200µl de 70% EtOH.
19. Centrifugar a 20.000g durante 5 min. y quitar el EtOH y dejar secar a temperatura ambiente.
20. Resuspender in 20µl de TE

Marcaje:

1. Utilizar el Kit de "Nick Translation Kit". Trabajar en oscuridad. Para marcar 2 µg de DNA preparar la siguiente mezcla.

x µl	para 2 µg de DNA
2.5 µl	0.2 mM SpectrumGreen o SpectrumRed dUTP
5 µl	0.1mM dTTP
10 µl	dNTP mix. (A,G y C)
5 µl	10X nick translation buffer
8 µl	nick translation enzyme
(17.5-x) µl	nuclease-free water
50 µl	volumen total

Programa: 2-4 hora a 15°C
 10 minutos a 70°C
 infinito a 4°C

2. Preparar un gel de agarosa al 1% (mini gel 10cm x 6,5 cm) para comprobar que el BAC este marcado electroforesis.
3. Cargar 5µl de la reacción con 1µl del tampón de carga (5X).
4. Dejar corre hasta que el azul esté 2-3 cm del final del gel.

Purificación del producto marcado con las columnas MicroSpin G-50 (Amersham)

Estas columnas nos ayudan a eliminar el fluorocromo no unido al BAC.

1. Agitar la columna en vortex, romper el extremo de la columna, introducir en un tubo *eppendorf* de 1,5µl y centrifugar durante 1 min. a 3000rpm.
2. Depositar el producto de *la nick translation* sobre esta gelatina. Cambiar de *eppendorf* y centrifugar durante 2 min. a 3000rpm.

Precipitación de la sonda:

1. Colocar en un tubo *eppendorf* los siguientes reactivos.

10 µl producto nick (1µg)
2,5 µl cot-1
1,3 µl Ac Na 3M (1/10vol)
36 µl EtOH 100% frío (2.5vol)

2. Invertir varias veces y dejar a -80°C durante 40 min. o bien a -20°C durante toda la noche
3. Centrifugar 30 minutos a 13000 rpm., desechar el sobrenadante cuidadosamente y dejar secar en oscuridad a temperatura ambiente.
4. Resuspender en 10 µl de tampón de hibridación (50% Formamida + 50% dextrán sulfato al 20%) y agitar vigorosamente.
5. Dejar durante 30 min. a 37°C para que la sonda se disuelva en el tampón de hibridación
6. Conservar a -20°C

El protocolo de hibridación fue ligeramente diferente para sondas de marcaje propio. La diferencia se encontraba en la desnaturalización. Para este tipo de sondas no comerciales la desnaturalización de la sonda y el porta se realizaba por separado. Posteriormente, hemos visto que este protocolo se puede utilizar con las sondas comerciales y lo cierto es que la calidad de la hibridación mejora con respecto al protocolo anterior.

Protocolo de Hibridación con sondas no comerciales

Preparación de los portas

La primera parte de la preparación de los portas (la extensión), es igual que en el protocolo anterior.

1. Deshidratar los portas en una serie de etanol crecientes 70-90-100% y dejar secar.
2. Colocar las extensiones celulares en una placa a 73°C y depositar sobre las extensiones 100µl de una solución de formamida al 70% cubriendo el porta con un cubre durante 3 minutos. En este tiempo lo que se consigue es la desnaturalización de los cromosomas.
3. Deshidratar con una serie de etanol creciente 70-90-100% fríos y dejar secar.

Preparación de la sonda

1. Desnaturalizar la sonda a 75°C durante 5 min. en baño
2. Depositar la sonda en hielo frío hasta que los portas estén desnaturalizados.

Hibridación de la sonda con la extensión

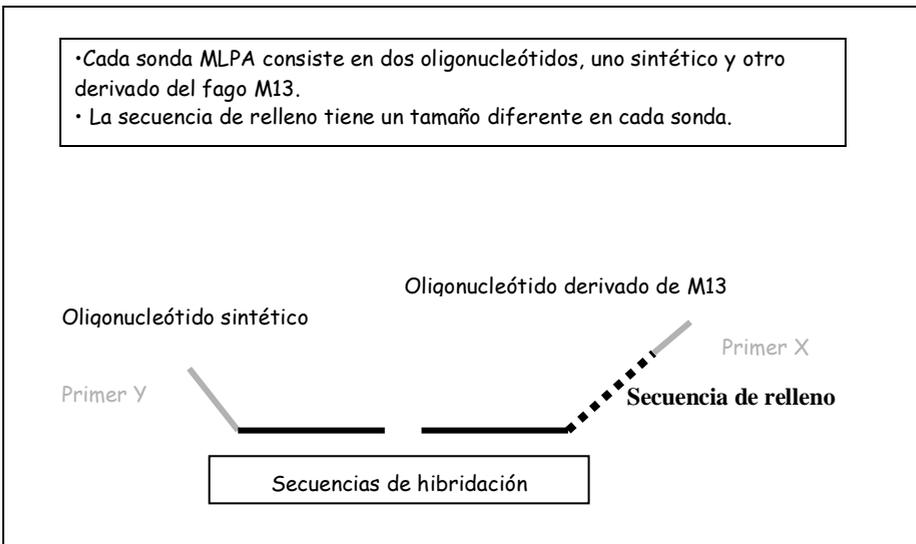
1. Aplicar la sonda desnaturalizada (0,8 μ l) al área de hibridación y cubrir con un cubre de 50X24 mm.
2. Colocar las extensiones con la sonda, (desnaturalizados previamente) y dejar hibridar a 37°C durante todo la noche.

A partir de aquí, todos los pasos siguientes son los mismos que para el protocolo de FISH con sondas comerciales.

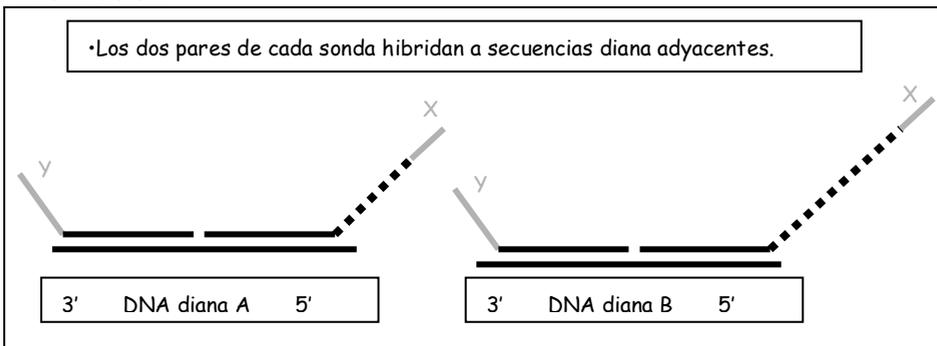
3. TÉCNICA DE MLPA (MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)

La técnica de MLPA permite analizar la dosis de 45 secuencias génicas distintas, de forma simultánea.

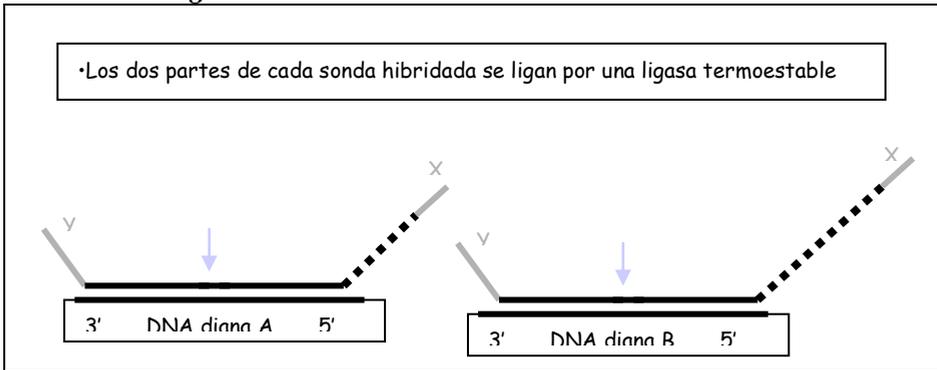
En este trabajo, la técnica se utilizó para realizar un rastreo de reordenamientos subteloméricos en el total de pacientes, así como para confirmar resultados obtenidos con la técnica de *CGH-array*.



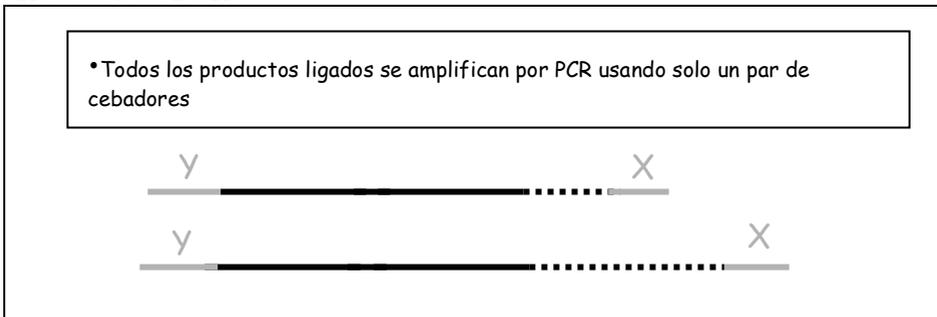
Hibridación



Reacción de ligación



Reacción de PCR



3.1 MLPA regiones subtelo méricas

Para la puesta a punto de esta técnica y la realización de este trabajo utilizamos inicialmente tres *SALSAs* de sondas subtelo méricas: *SALSA* P036, P019 y P020 human telomere test kits (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands; <http://www.mrc-holland.com>). La *SALSA* P036 contiene una secuencia diana para cada región subtelo mérica. La *SALSA* P019 contiene sondas para los cromosomas 1 a 11 y X, y la *SALSA* P020 contiene sondas para los cromosomas 12 a 22 e Y. Estas *SALSAs* han ido modificándose y mejorando en el tiempo, así pues, se han ido sustituyendo a medida que el fabricante mejoraba las *SALSAs*. Hemos pasado de la P036 a la P036B y a la P036D. De la P019 y P020 a la P070 (Ver anexo I).

En todas las *SALSAs* de sondas subtelo méricas, las secuencias diana de los cromosomas acrocéntricos están localizadas en ambos extremos del brazo largo, una situada en la región subtelo mérica y otra situada en la región subcentromérica.

Esta técnica se puso a punto en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo recomendado en la página web del fabricante (<http://www.mlpa.com>).

Protocolo del MLPA

Desnaturalización del DNA e hibridación de las sondas

Se preparan las muestras de ADN de tal forma que tengamos 50 ng de ADN en 5 µl de TE. Es importante que las muestras tengan la misma concentración para que los resultados sean cuantitativos.

1. Incubar durante 5 minutos a 98°C.
2. Dejar enfriar a 25°C.
3. Sin sacar los tubos del termociclador, agregar: 1,5 µl de SALSA Probe-mix y 1,5 µl de MLPA buffer, mezclar cuidadosamente con la pipeta.
4. Incubar 1 minuto a 95°C.
5. Incubar a 60°C durante 16 horas.

Ligación

1. Reducir la temperatura del termociclador a 54°C
2. Añadir 32 µl de mix Ligase-65 a cada muestra mezclando bien con la pipeta.

Mix Ligase-65:

- 3 µl de Ligase-65 buffer A
- 3 µl Ligase-65 buffer B
- 25 µl H₂O
- 1 µl Ligase-65

3. Incubar durante 15 minutos a 54°C.
4. Incuba 5 min. a 98°C para inactivar la acción de la ligasa.
5. Reducir la temperatura a 4°C.

Al finalizar esta fase, se pueden guardar las muestras a 4°C durante una semana para periodos más largos, se pueden guardar a -20°C.

PCR

1. Diluir la reacción de ligación de MLPA de la siguiente forma:

- 4 µl 10XSALSA PCR buffer
- 6 µl H₂O
- 30 µl de la reacción de ligación de MLPA.

2. Colocar los tubos con esta mezcla en el termociclador a 60°C.
3. Añadir 10 µl de *mix Polymerase* a cada tubo, mezclar bien con la pipeta.
 - mix Polymerase*
 - 2 µl de SALSA PCR-primers
 - 2 µl SALSA Enzyme Dilution buffer
 - 5,5 µl H₂O
 - 0,5 µl SALSA Polymerase

4. Empezar con el programa de PCR:

1. 5 minutos 98°C; pausa 25°.

2. 1 minuto 95°C; pausa 60°.
3. 15 minutos 54°C.
4. 5 minutos 98°C; pausa 4°.
5. pausa 60°;
6. 30 segundos 95°C; 30 segundos 60°C; 60 segundos 72°C. 33 ciclos.
7. 20 minutos 72°C; pausa 4°.

Posteriormente, el producto de la reacción, se analiza mediante análisis de fragmentos por electroforesis capilar en el ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems). Para poder realizar el análisis de los resultados, en cada tanda de MLPA, tenemos que añadir al menos una muestra de ADN control.

Análisis de los datos

Los resultados obtenidos por el software Genotyper del ABI-PRISM 310, se exportan a una hoja de cálculo (Microsoft Excel) para procesar los datos. Estos datos en bruto son procesados dividiendo la intensidad de la señal de cada sonda (área de los picos), por la suma de la intensidad de señal de todas las sondas de cada muestra (intensidad relativa). Posteriormente, cada valor obtenido es normalizado dividiéndolo por el valor correspondiente obtenido en la muestra control. Los valores que se obtendrán serán:

- Valores en el rango 0,8-1,2 se consideraron indicativos de una dosis normal.
- Valores en el rango 0,7-0,5 se consideraron indicativos de una dosis disminuida.
- Valores en el rango 1,3-1,5 se consideraron indicativos de una dosis aumentada.

3.2 MLPA regiones de microduplicaciones y microdeleciones frecuentes

Tanto el protocolo como el tipo de análisis que se realizó y se sigue realizando es el utilizado en las regiones subteloméricas. La diferencia se encuentra en el grupo de sondas que se utiliza. En la página web de mrc-holland se puede encontrar una gran variedad de *SALSA* (<http://www.mlpa.com>). En este trabajo se han utilizado las *SALSAs* P0245 P015C y P249-Telomere-8.

3.3 MLPA a la carta

Para el diseño de sondas a la carta se siguieron las recomendaciones descritas por MRC-HOLLAND. (<http://www.mlpa.com>). Se diseñaron 3 grupos de sondas (*SALSAs*) con 6 sondas cada uno de ellos. Esta técnica se utilizó para confirmar las posibles variantes de dosis detectadas en el *CGH-array* basado en BACs.

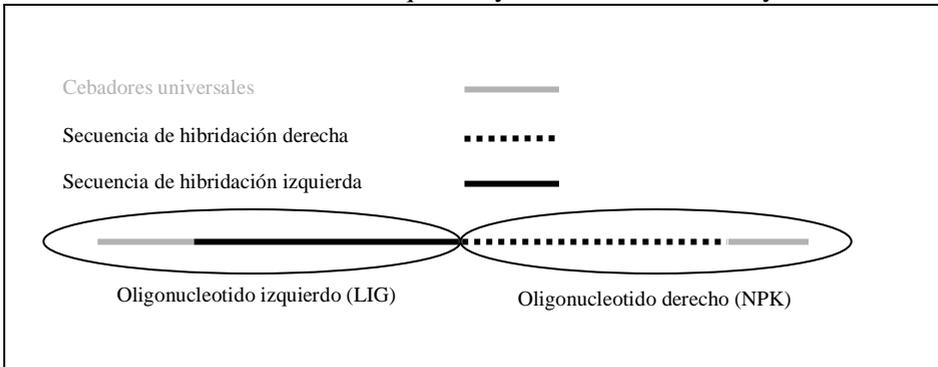
Material y Métodos

El protocolo para la realización de este MLPA a la carta o de diseño propio, es el mismo que el MLPA de regiones subtroméricas, con la excepción del programa de PCR, que en este caso consta de 30 ciclos en lugar de 33.

Cada sonda de diseño propio consta de dos secuencias de hibridación adyacentes:

1. Oligonucleótido izquierdo o LIG: En su extremo 5' se encuentra la secuencia de los cebadores universales seguida de la secuencia de hibridación izquierda.
2. Oligonucleótido derecho o NPK: En el extremo 5' se encuentra la secuencia de hibridación derecha fosforilada, seguida de la secuencia de cebadores universales.

Las secuencias de hibridación izquierda y derecha deben ser adyacentes.



A continuación se muestran las sondas diseñadas para cada *SALSA*

Sondas SALSA K-3

Gen: DRB1 exón_1	Chr.2 2q31.2	Long 74+42=116
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGTGCTGAGGGAGCGCTTCTCGCCTTTGGCGACATC3'		
NPK :5'Fosfo CAGGACATCTGGGTGGTGCGGGACAAGCACACCAAGGTC TAGATTGGATCTTGCTGGCGC 3'		
Gen: MAPK8IP2 exón_11	Chr.22 22q13.33	Long 70+42=112
LIG:5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCTTCATCACCAAACACCCCCTGCTGAGCCGCTTC3'		
NPK :5'Fosfo GCTGCCACGCTTTGTCTCCAGGAGTCCATGAGTCTAG ATTGGATCTTGCTGGCGC 3'		
Gen: CHD7 exón_3	Chr.8 8q12.2	Long 66+42=108
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGATTCCCCGTCGGAGCCCTTTCTAGAGAAACAGT 3'		
NPK :5'Fosfo GCCGGATATGACTCAGGTTAGTGGACCGAATGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCGC 3'		
Gen: CEN1A1 exón_9	Chr.7 7p22.3	Long 50+42=92
LIG-: 5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGCTTCCGGAAGCGCTGGTTCACCA3'		
NPK :5'Fosfo TGGATGACCGCAGGCTCATGTACTTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCGC3'		
Gen: MAPT exón_2	Chr.17 17q21	Long 58+42=100
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCA3'		
NPK :5'Fosfo TGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACTCTAGATTG GATCTTGCTGGCGC3'		
Gen: PAK2 exón_4	Chr.3 3q29	Long 62+42=104
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAAGAATCCTCAGGCTGTGCTGGATGTCCTAA3'		
NPK :5'Fosfo AGTTCTACGACTCCAACACAGTGAAGCAGATCTAGATTG GATCTTGCTGGCGC 3'		

Material y Métodos

Sondas SALSA K-4

Gen: DAAM2 exón _7	Chr.6 6p21.2	Long 50+42=92
LIG:5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCCTGCTGAACGAGCTAGACCGA AG3'		
NPK :5'Fosfo TCTGGGCCGGTACCGGGATGAAGTGTCTAGATTGGATCT TGCTGGCGC 3'		

Gen: ARHGAP12 exón _1	Chr.10 10q11.1	Long 54+42=96
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCCAGTATGTGAAGGAGGTCACG CGCA3'		
NPK :5'Fosfo AAGCTCTCATGCCACCTGTTAAGCAGGTCTAGATTGGAT CTTGCTGGCGC 3'		

Gen: COL11A1 exón _56	Chr.1 1p21	Long 58+42=100
LIG:5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCAGGTGCAGAAGGTCCTCCTGG AAAAAC3'		
NPK :5'Fosfo CGGCCAGTCGGTCCTCAGGGACCTGCAGTCTAGATTGG ATCTTGCTGGCGC 3'		

Gen: AUTS2 exón _2	Chr.7 7q11.22	Long 62+42=104
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGTAGCACTTAAGCCTCAGGAACG TGTGGAGA3'		
NPK :5'Fosfo AACGCCAGACGCCCTGACCAAGAAGAAACGTCTAGATT GGATCTTGCTGGCGC 3'		

Gen: FBXO8 exón _1	Chr.4 4q34.1	Long 70+42=112
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCGATTCCACACCGGTTCAAGA CTCCTGTGAAGA3'		
NPK :5'Fosfo GCGACTCCGCTGAGAGCCTCCTCAATGGCCAGTCCTCTA GATTGGATCTTGCTGGCGC 3'		

Gen: LRFN2 exón _1	Chr.6 6p21.2	Long 74+42=116
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCATCTGCCTGCATTCCCGGAG CCGCCGAGGGTT3'		
NPK :5'Fosfo AGCTCGAGTCTGTCTCGGGCGGGGAAGGATGCGTGGCTC TAGATTGGATCTTGCTGGCGC 3'		

Sondas SALSA K-5

Gen: CNKSR2 exón _2	Chr.X Xp22.12	Long 50+42=92
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGGGAGAAGATCAGTGGGGACC AG3'		
NPK:5' FosfoCTGCTGCGCATTACACATCAGGAGCTCTAGATTGGATCTT GCTGGCGC3'		

Gen: ZBTB46 exón _4	Chr.20 20q13.33	Long 52+42=94
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAAGAAGTTCAAGTGCCGTA CA3'		
NPK:5' FosfoGCTTCTCGGCCATGCACCAGTGCATCTCTAGATTGGATCTT GCTGGCGC3'		

Gen: NCBP2 exón _3	Chr.3 3q29	Long 56+42=98
LIG :5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGACGCGTCTGGATGACCGAATCA TTCG3'		
NPK:5' FosfoCACAGACTGGGACGCAGGCTTAAGGAGTCTAGATTGGAT CTTGCTGGCGC3'		

Gen: RASL11A exón _1	Chr.13 13q12.13	Long 60+42=102
LIG:5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGACTCGCAGAATGCCTGACTAG AGGCCA3'		
NPK :5' FosfoCTCGCGCGCTCTGGACGGTGGCCGTATCTCTCTAGATTGG ATCTTGCTGGCGC3'		

Gen: MBD3 exón _5	Chr.19 19p13.3	Long 64+42=106
LIG:5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGATGGCTGCACGGATGAGACGCTGCT GTCGGCCA3'		
NPK :5' FosfoTCGCCAGCGCCCTGCACACTAGCACCATGCCCTCTAGATT GGATCTTGCTGGCGC3'		

Gen: PPP3CA exón _14	Chr.4 4q24	Long 68+42=110
LIG:5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTTAACTCCATCAACAAGGCTCTCA CCTCAGAGA3'		
NPK :5' FosfoCTAACGGCACGGACAGCAATGGCAGTAATAGCAGTCTAGA TTGGATCTTGCTGGCGC3'		

Gen: TLR4 exón _1	Chr.9 9q33.1	Long 72+42=114
LIG:5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGTGCCTCAGAACTGCTCGGTC AGACGGTGATAG3'		
NPK :5' FosfoCGAGCCACGCATTCACAGGGCCACTGCTGCTCACAGTCTA GATTGGATCTTGCTGGCGC3'		

4. ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN DE MARCADORES POLIMÓRFICOS

Esta técnica se utilizó como método confirmatorio de las alteraciones encontradas tanto por FISH, MLPA como *CGH-array*, así como para determinar el origen parental de los reordenamientos detectados.

La batería de microsatélites utilizados se presenta en el **anexo 2**. Todos ellos están descritos en la base de datos NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>) a excepción de:

- Dos microsatélites no descritos del cromosoma 1: Cr1_1 y Cr1_2
- Dos microsatélites no descritos del cromosoma 5: Cr5_1 y Cr5_2
- Siete microsatélites no descritos del cromosoma 9: Cr9_1, Cr9_2, Cr9_3, Cr9_4, Cr9_5, Cr9_6, Cr9_7
- Dos microsatélites no descritos del cromosoma 12: Cr12_2, Cr12_3
- Dos microsatélites no descritos del cromosoma 16: Cr16_ EEF2K, Cr16_OTOA
- Dos microsatélites no descritos del cromosoma 17: Cr17_1, Cr17_2

Para la amplificación por PCR de estos microsatélites se utilizó el siguiente programa (SYN-ARAF)

```
SYN-ARAF
92°C → 5 min.
10 Ciclos { 94°C → 1 min.
            { 60°C → 1 min. -0.5°C/ciclo }
24 Ciclos { 94°C → 1 min.
            { 55°C → 1 min. }
72°C → 10 min.
4°C → ∞
```

Con este programa se amplificaron todos los microsatélites a excepción de 5 microsatélites no descritos y uno descrito. Los programas de PCR utilizados para amplificar estos 6 microsatélites fueron:

```
Microsatélites: Cr9_1, Cr9_5 y Cr9_6
95°C → 5 min.
32 Ciclos { 95°C → 30 seg.
            { 58°C → 30 seg.
            { 72°C → 10 seg. }
72°C → 5 min.
4°C → ∞
```

<p>Microsatélites : Cr9_4 y CR9_7</p>	
95°C	→ 5 min.
26 Ciclos	$\left(\begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ seg.} \\ 55^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ seg.} \end{array} \right)$
72°C	→ 5 min.
4°C	→ ∞

<p>Microsatélites: D13S286</p>	
92°C	→ 3 min.
30 Ciclos	$\left(\begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \rightarrow 1 \text{ min.} \\ 52^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ seg.} \end{array} \right)$
72°C	→ 3 min.
4°C	→ ∞

Los fragmentos obtenidos tras la amplificación se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (bisacrilamida 29:1 en TBE 1x). La electroforesis se realizó a 700 voltios durante 8 horas. La detección se realizó mediante tinción con nitrato de plata, siguiendo el siguiente protocolo.

Tinción con plata

1. Colocar el gel en una batea limpia con unos 300 ml de etanol al 10% y dejarlo en agitación suave un mínimo de 10 min. (Fijación).
2. Retirar el etanol y añadir el oxidante (ácido nítrico al 1% v/v), dejándolo 3 min. en agitación.
3. Lavar el oxidante brevemente con agua destilada por dos veces.
4. Incubar el gel en la solución de plata (nitrato de plata al 0,2% p/v) durante 20 min.
5. Lavar el exceso de plata una o dos veces en agua muy brevemente.
6. Incubar en la solución reveladora (carbonato sódico 2,94% p/v y formaldehído 0,2% v/v) hasta que la solución adquiera un color oscuro, decantar y añadir solución nueva fresca.
7. Una vez que aparezcan las bandas, retirar el revelador y detener la reacción durante 10 min. con ácido acético al 10% v/v.
8. Lavar con agua y secar.

5. ESTUDIO DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X

Esta técnica fue utilizada para ayudar a justificar la posible patogenicidad o no de las variantes de dosis situadas en el cromosoma X en mujeres. El protocolo utilizado fue el ensayo de metilación del receptor androgénico (gen *AR*) (Allen et al., 1992) con algunas modificaciones.

Protocolo modificado

1. Digestión de 30 ng de ADN genómico a 37°C durante 1 hora con 5 unidades de *RsaI* o *HpaII* (*HpaII* es sensible a metilación)
2. Inactivación de los enzimas a 94°C durante 4 min.
3. Amplificación del microsatélite (CAG)_n en el primer exón del gen *AR* a partir del producto de las digestiones.
4. El producto de la reacción, se analiza mediante análisis de fragmentos por electroforesis capilar en el ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems).

Este estudio fue realizado por el personal técnico de la Unidad de Genética y Diagnóstico prenatal puesto que se realiza de forma rutinaria.

6. CGH-ARRAY basado en BACS

6.1 Descripción del ARRAY

El *microarray* genómico utilizado en este estudio contiene una colección de 6.465 clones obtenidos tanto de cromosomas artificiales de bacterias (BACs) como de cromosomas artificiales basados en P1 (PACs). Este *microarray* fue diseñado y fabricado por el grupo del Dr. Klaas Kok del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Groningen, Holanda (Atayar et al., 2006). La colección se compone de BACs de 1 Mb obtenidos por el Dr. Nigel Carter, Wellcome Trust Sanger Institute, UK (Fiegler et al., 2003) complementada con clones procedentes de "the Human BAC Resource Consortium–1 Set" (Dr. Pieter de Jong, Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, Calif), y con una selección adicional de BACs del CNIO. La posición relativa de los BACs se estableció con la referencia de la secuencia del genoma humano de mayo de 2004 (UCSC versión hg16) basada en el NCBI *Build 35*. Todos los clones BACs fueron punteados por triplicado en cristales cubiertos con epoxi (*Schott Nexterion, Mainz, Germany*). Además, los cristales también presentan como control ADN COT Humano (*Roche Applied Sciences, Indianapolis, Ind*) y clones BAC de ADN de *Drosophila*.

6.2 Hibridación del ARRAY

El protocolo utilizado para la hibridación genómica comparada fue el recomendado por el fabricante de los *arrays* con alguna modificación.

6.2.1 Marcaje del ADN genómico

Digestión de los ADNs

1. Digerir 2µg del ADN control y del ADN problema (por separado) con los enzimas de restricción Alu I y Rsa I

Mezcla de digestión:

- 5 µl 10x buffer
- 1,25µl Alu I
- 1,25µl Rsa I
- 15 µl DNA (problema o control)
- c.s.p 50 µl H₂O

2. Incubar a 37°C en placa durante 3 horas
3. Purificar el producto con el Kit de purificación "QIAprep Spin Miniprep".
4. El eluido obtenido se cuantifica, esperando encontrar al menos 1500 ng de ADN.

5. Someter las muestras de ADN digerido a electroforesis en un gel de agarosa para comprobar que la digestión ha funcionado correctamente.

Marcaje del ADN digerido

Marcar los fragmentos de ADN con un fluorocromo diferente para el ADN control y el ADN problema. Fluorocromos utilizados: Cy3-dUTP y Cy5-dUTP (Amersham Biosciences) y el kit de marcaje “the BioPrime DNA Labelling System (Invitrogen)”.

1. Mezclar 1200 ng ADN digerido con 20 μ l de 2'5X *random primer solution*.
2. Ajustar el volumen a 42 μ l con H₂O.
3. Incubar a 99°C en el aparato de PCR durante 10 min.
4. Pasar el tubo a hielo durante 10 min.
5. Añadir al ADN desnaturalizado:
 - 5 μ l 10x dNTPs
 - 2 μ l 1 mM Cy3 o Cy5.
 - 1 μ l 40 U/ μ l Klenow DNA polymerase
6. Mezclar bien y dejar a 37°C durante 3-5horas.

Con un tiempo de marcaje de 3 horas es suficiente. Pasado este tiempo, se procede a la purificación del marcaje.

Purificación del ADN marcado

Para la purificación del ADN marcado se utilizaron “columnas sephadex G-50 de Amersham”. Con este proceso se pretende eliminar el fluorocromo que no se ha unido al ADN.

“columnas sephadex G-50 de Amersham”

1. Homogeneizar la resina en la columna
2. Aflojar el tapón y romper el cierre de la salida
3. Colocar la columna sobre un *ependorf* de 1,5 ml
4. Precentrifugar la columna 1 min. a 3000 rpm.
5. Transferir la columna a un nuevo *ependorf*
6. Depositar los 50 μ l de la reacción de marcaje en el centro de la columna, sin alterar el lecho de la resina.
7. Centrifugar a 3000 rpm durante 2 min.
8. Desechar la columna, puesto que en ella se retiene parte del fluorocromo no incorporado al ADN y fragmentos muy pequeños del mismo

En el eluido se encuentra la sonda (el ADN marcado). Este debe tener color, indicativo de la incorporación de fluoróforo durante el marcaje.

Preparación de la solución de hibridación

1. Unificar los dos ADN marcados, test y referencia y mezclar bien.
2. Pasar la mezcla de ADNs a una columna tipo *microcon YM30*. Estas columnas nos ayudan a concentrar la mezcla de ADNs.
3. Centrifugar durante 10 min. a 14000 rpm. a temperatura ambiente (importante para que se filtre bien). En este paso, el eluido que obtenemos debe ser claro, puesto que el ADN marcado (sonda) debe permanecer retenido en la membrana.

4. Lavar en la misma columna el ADN marcado con 200 μ l de solución de Tris-EDTA (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA pH 8
5. Centrifugar durante 10 min. a 14000 rpm.
6. Utilizar 50 μ l de la “Solución de hibridación” para disolver el ADN marcado.

Solución de hibridación para un *array*

- Preparar mezcla de hibridación:
 - 100 μ l Cot1 DNA 1 μ g / μ l
 - 25 μ l tRNA de levadura 20 μ g / μ l
 - 0,5 μ l Glucógeno 20 mg/ml
 - 25 μ l NH₄Ac 5M
 - 950 μ l 100% Etanol
- Incubar a -80°C durante al menos 15 min.
- Centrifugar la mezcla de hibridación a 14.000 rpm durante 5 min. a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y añadir 1 ml de Etanol al 70%.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 min. a 4°C
- Decantar y secar bien los restos de etanol.
- Dejar secar al aire.
- Añadir 60 μ l de “solvente de hibridación”⁽¹⁾ agitar vigorosamente y dejar 10 min. a 37°C. Posteriormente, preservar esta solución de hibridación a temperatura ambiente hasta su uso.

⁽¹⁾El **solvente de hibridación** consta de 5% de Dextran sulfato en una solución al 50% de Nexterion Hyb solution y 50% de formamida desionizada.

6.2.2 Aclarado y bloqueo de los *arrays* previo a la hibridación

Antes de empezar con el aclarado y bloqueo de los *arrays*, es importante que marquemos con un lápiz de diamante la parte inferior del mismo, puesto que después del proceso no se puede distinguir en que cara se encuentran punteados los clones.

Las soluciones de aclarado son las siguientes:

Solución de aclarado 1: 0,1% Triton-X100 (1ml Triton-X100 en 1 litro de H₂O, disolver a 60°C y dejar enfriar a temperatura ambiente antes de usar)

Solución de aclarado 2: H₂O pH: 4.0 (100 μ l de HCl 37% en 1 litro de H₂O

Solución de aclarado 3: 100 mM KCl (3073 g de KCl en 500 ml H₂O

Solución de aclarado 4: para 500ml: 125 ml de solución 4X (Nexterion Block E), 375 ml de H₂O y 100 μ l de HCl 37%

Las soluciones 1, 2, 3 se utilizan a temperatura ambiente, mientras que la solución 4 se utiliza a 50°C. Es importante que los cristales no se sequen durante este proceso.

Protocolo de aclarado y bloqueo

1. Sumergir los *arrays* en la solución de aclarado 1 durante 5 min.
2. Sumergir los *arrays* en la solución de aclarado 2 durante 30seg.
3. Sumergir en la solución de aclarado 3 durante 10 min.
4. Desnaturalizar los *arrays* durante 2 min. con agua hirviendo.
5. Lavar con agua a temperatura ambiente durante 1 min. en agitación.
6. Introducir los *arrays* en la solución 4 e incubar durante 15 min. con agitación.
7. Lavar el *arrays* con H₂O a temperatura ambiente durante 1 min.
8. Secar los *arrays*. Para ello se utilizan tubos de 50ml en los que se coloca en la parte inferior, un trozo de papel para que amortigüe y absorba el agua del tubo, y se centrifugan a 800 g durante 3min.

Realizado este proceso de aclarado y bloqueo de los *arrays*, estos ya están listos para la prehibridación y posterior hibridación.

6.2.3 Prehibridación e hibridación.

Para la prehibridación utilizamos la solución de prehibridación. Necesitamos 50 µl por *array*.

Solución de prehibridación: 10 µl de DNA de esperma de salmón (11µg/µl) en 40 µl de Nexterion Hyb.

Protocolo de prehibridación

1. Depositar 50 µl de solución de prehibridación en un cubre 24X60.
2. Colocar el *array* aclarado y bloqueado sobre el cubre con la solución por la cara donde se encuentran los clones punteados, dar la vuelta y comprobar que la solución se reparta uniformemente por toda el área del cristal.
3. Colocar los *arrays* con la solución de prehibridación en una cámara de hibridación e incubar durante 2 horas en estufa a 65°C.
4. Pasar los *arrays* a una cubeta con H₂O y agitar para quitar el cubre.
5. Lavar manualmente con H₂O a temperatura ambiente durante 15 min.
6. Secar los *arrays* (de la forma descrita en el protocolo de aclarado y bloqueo).

Una vez secos los *arrays* tras la prehibridación, pasamos a la hibridación.

Protocolo de hibridación

1. Desnaturalizar la sonda que en este caso consiste en el ADN marcado (control + problema) disuelto con la solución de hibridación. Se desnaturaliza a 95°C durante 5 min. en un termociclador.
2. Depositar la sonda sobre unos cubres con dos bandas laterales cuya función es crear un espacio para facilitar la hibridación.

3. Colocar los cubres con la sonda sobre el *array*.
4. Introducir los *arrays* con la sonda en la cámara de hibridación e incubar a 65°C en estufa durante 40 horas.

6.2.4 Lavados

Pasado este tiempo, se realizan los lavados posthibridación. Las soluciones utilizadas para realizar estos lavados son:

- Solución de lavado 1:** 2X SSC 0,2% SDS
Solución de lavado 2: 2X SSC
Solución de lavado 3: 0.2X SSC
Solución de lavado 4: H₂O

Las soluciones 2, 3 y 4 se utilizan a temperatura ambiente. La solución 1 se utiliza por una parte a temperatura ambiente y por otra parte a 60° C.

Protocolo de lavado posthibridación

1. Quitar el cubre con la ayuda de la solución de lavado 1 a temperatura ambiente.
2. Sumergir el *array* durante 25 min. en otra solución de lavado 1 a 60 °C.
3. Lavar con la solución de lavado 2 durante 5min.
4. Lavar con la solución de lavado 3 durante 5 min.
5. Lavar con la solución de lavado 4 durante 1 min.
6. Secar el *array*.

En este punto, el *array* ya está a punto para el escaneado y posterior análisis.

6.3 Análisis

Para realizar el análisis de los cristales, lo primero que tenemos que hacer es escanear estos cristales hibridados mediante un escáner laser. En nuestro caso, este proceso se realizó en el Laboratorio de Chips de ADN, sección de Chips de DNA-S.C.S.I.E. de la Universidad de Valencia. El escáner utilizado fue el modelo ScanArray LITE de Perkin-Elmer (figura 5) cuyas características son las siguientes:

- Resolución de pixel de 5 µm.
- Configuración con 2 láseres para longitudes de onda de 543 y 633 nm.
- 4 filtros de emisión.
- Sensibilidad hasta 0,1 molécula/µm².
- Área de escaneado de 22 x 73 mm (< 5 minutos).

Material y Métodos



Figura 5: Imagen del escáner utilizado para la lectura de los cristales de los *arrays* basados en BACs.

El escaneado nos da dos imágenes, una perteneciente a la hibridación con el fluoróforo Cy3 y otra perteneciente a la hibridación con el fluoróforo Cy5. En la situación más óptima, nos encontramos con que los dos fluorocromos dan una intensidad global similar, pero si no es así, con el software del escáner podemos compensar esa diferencia.

Una vez tenemos las dos imágenes, se utiliza el programa GenePix Pro 6.0 para el procesamiento de los datos. Para utilizar este programa es necesario tener una plantilla GenePix Array List (GAL) file, la cual nos la proporciona el mismo proveedor de *arrays*, para identificar cada punto con un clon concreto. Se introducen las dos imágenes en el programa y se solapan con la plantilla GAL, cuadrando bien todos los puntos con la plantilla. Posteriormente, se revisa punto por punto ya que en este *array*, no todos los puntos tienen el mismo diámetro. También se revisa y se desechan aquellos puntos que se encuentren en una zona donde exista ruido de fondo, mancha, etc. que puedan distorsionar el análisis (figura 6).

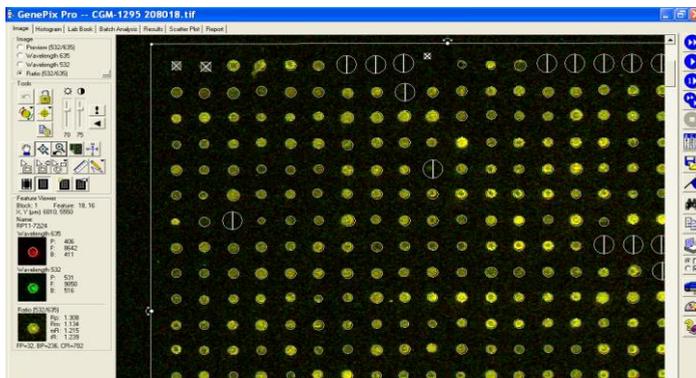


Figura 6: Imagen del análisis de datos del CGH-*array* basado en BACs con el programa GenePix Pro 6.0

Una vez ajustada la plantilla y revisados todos los puntos, ya se pueden analizar los datos. El programa analiza los datos calculando los valores específicos de cada pixel de la imagen, proporcionando una tabla de resultados mediante un fichero GPR-GenePix Results File (*.gpr). Teniendo los datos analizados, se procede a la normalización de los mismos, y para ello, se utiliza el programa de normalización DN MAD (Vaquerizas et al., 2004) que proporciona gratuitamente GEPAS (Suite de Análisis del Patrón de Expresión Génica) (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>)

The screenshot shows the GEPAS web interface. At the top, there is a navigation bar with tabs for 'Tools', 'Documentation', 'dataSets', 'Publications', and 'About'. The main content area is titled 'DN MAD : form' and contains several sections for configuring the normalization process:

- Array files:** Includes fields for 'Compressed file', 'File', 'Ratio' (with radio buttons for 'red(Cy5) / green(Cy3)' and 'green(Cy3) / red(Cy5)'), and 'Uncompressed files'. There is a 'Number of arrays' field and a 'Change to uncompressed files mode' button.
- Layout:** Includes 'Main grid' and 'Sub grid' sections, each with 'Rows' and 'Columns' input fields.
- Options:** Includes checkboxes for 'Negative flags' (with 'Use negative flags' and 'Return negative flagged points as NA'), 'Background correction' (with 'Use background correction' and 'Use background subtraction'), and 'Use global flags'.
- E-mail (optional):** Includes a text input field and 'Clear' and 'Submit' buttons.

At the bottom, there are 'References' and a 'Please consult How to cite GEPAS ?' link.

Figura 7: Imagen de la página web de GEPAS donde debemos introducir nuestros ficheros *.gpr para realizar la normalización de los datos en el CGH-array basado en BACs.

El resultado obtenido después de la normalización es el \log_2 del ratio Cy5/Cy3 de la media de las tres réplicas de cada clon. Los datos así obtenidos se pueden representar mediante una gráfica en excel para facilitar su análisis (figura 8).

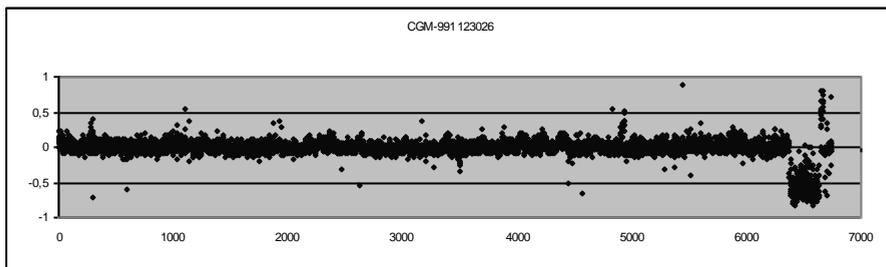


Figura 8: Ejemplo de la representación gráfica de los resultados normalizados de la CGH-array de BACs.

6.4 Validación del ARRAY

Para validar este array se utilizó ADN de 4 pacientes con alteraciones conocidas y previamente caracterizadas por otros métodos. En conjunto, estos cuatro pacientes nos permitieron valorar desequilibrios de dosis (ganancias y pérdidas) en 7 regiones con tamaños de 1,2 Mb a 22,3 Mb.

Caso 1: delección 4 pter (1 Mb) / duplicación 3qter (7,2 Mb)

Caso 2: delección 10q26 (5,8 Mb) / duplicación 5p21 (22,3 Mb)

Caso 3: duplicación 14q11 (5,6 Mb)

Caso 4: duplicación /delección 8pter (4,7 Mb/ 6,7 Mb)

El estudio de estos 4 casos nos permitió establecer el punto de corte para la interpretación de los resultados en +/-0,25. De esta forma, se consideró ganancia cuando dos o más clones consecutivos excedían de +0,25 y pérdida cuando dos o más clones consecutivos presentaban valores inferiores a -0,25.

6.5 Interpretación de los resultados

Para la interpretación de estas variantes de ganancias y pérdidas, así como para determinar su posible implicación en la patología de los pacientes seguimos los siguientes criterios:

- La herencia: si la variante es *de novo* se considerará patológica, a no ser que hubiera en la literatura individuos normales descritos con esta misma variante. Si la variante es heredada de un progenitor y este no presenta ningún tipo de afectación, a no ser que otros criterios indiquen lo contrario, no se considerará patológica.
- Casos patológicos descritos: la existencia de otros casos patológicos descritos con la misma alteración, con rasgos fenotípicos iguales o similares nos indica que esa alteración es patológica.
- Genes localizados en la región: si los genes localizados en la región alterada se relacionan con el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central y son sensibles a dosis, las evidencias respecto a que esa alteración pudiera estar implicada en la patología del paciente son mayores.
- El tamaño de la región alterada: a mayor tamaño más probable es que sea patológica, puesto que el número de genes en desequilibrio es mayor.

Para poder aplicar estos criterios se realizaron estudios complementarios que consistieron en:

- Búsqueda en fuentes bibliográficas y bases de datos para comprobar si las variantes de dosis encontradas estaban descritas o solapaban con variantes polimórficas:
 - UCSC Genome bioinformatic (<http://genome.ucsc.edu/>)
 - PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
 - Human Genome Segmental Duplication Database (<http://projects.tcag.ca/variation/>)
 - Institut SANGERN (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/>)
 - ECARUCA (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/>)
- Comprobación con un método alternativo (MLPA a la carta, análisis de segregación mediante marcadores microsatélite, FISH) para cerciorarnos si la alteración era real o pudiera tratarse de un artefacto de la técnica.
- Estudio de los progenitores para determinar si se trataba de variantes heredadas.
- Revisión de la descripción de estas variantes en otros pacientes y su patología asociada.
- Revisión de los genes localizados en la región alterada para ver si alguno de ellos se relaciona con el desarrollo, principalmente del sistema nervioso central y son sensibles a dosis.

7. CGH-ARRAY BASADO EN OLIGONUCLEÓTIDOS

Para este trabajo se utilizaron dos tipos de *CGH-array* de oligonucleótidos: un *array* comercial, que se utilizó para el rastreo en todo el genoma de todos los pacientes, y un *array* de diseño propio, utilizado para confirmar y caracterizar las alteraciones que no se habían podido confirmar por otras técnicas.

7.1 Descripción del ARRAY

7.1.1 Microarray comercial 44K

El *array* de oligonucleótidos utilizado fue el *Agilent Human Genome CGH Microarray 44K* (oaCGH 44K). Concretamente el formato del cristal 4 x 44K. Las características de este *array* son las siguientes:

- Contiene más de 43.000 secuencias codificantes y no codificantes del genoma humano, con mayor representación en las codificantes.
- Todos los genes bien caracterizados están representados por más de una sonda.
- Las secuencias de las sondas están basadas en el mapa 36 del NCBI (UCSC hg18, marzo 2006).
- La resolución es de 50-150 kb (es decir, el espacio medio entre dos sondas es de 50-150 kb).
- El cristal 4 x 44K usa la tecnología 60-mer SurePrint de Agilent.
- Cada cristal contiene cuatro *microarrays* 44K idénticos.

7.1.2 Microarray 44K a la carta

Mediante la base de datos de Agilent “High-Definition Comparative Genomic Hybridization (HD-CGH)” se puede crear un *microarray* CGH a la carta (oaCGH a la carta), centrado en regiones de interés y una muy alta resolución.

En este estudio, se diseñó un *array* a la carta para 25 regiones concretas, las cuales abarcan un total de 15.701 kb. Para ello, se siguieron las instrucciones indicadas en la página web de Agilent (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>).

Las características de este *array* a la carta son:

- Contiene 25 regiones genómicas (tabla 4) con un total de 15.744 puntos.
- El número de sondas control es 1.482.

- Las secuencias de las sondas están basadas en el mapa 36 del NCBI (UCSC hg18, marzo 2006).
- La resolución en cada región es de 1 kb.
- El cristal 8 x a la carta usa la tecnología 60-mer SurePrint de Agilent.
- Cada cristal contiene ocho *microarrays* idénticos.

Tabla 4: Relación de las regiones comprendidas en el *array* a la carta.

Cromosoma	Banda	Localización	Total pb
5	p13.1	chr5:39029000-39489000	460000
5	q13.2	chr5:73167000-74030000	863000
6	q14	chr6:80353000-80878000	525000
7	q31	chr7:114190000-114560000	370000
7	q11.22	chr7:65663000-68594000	2931000
8	q23.3	chr8:104219000-104554000	335000
8	q24.24	chr8:143786000-144060000	274000
8	q22.1	chr8:98700000-99084000	384000
9	q34.2	chr9:138713000-139303000	590000
10	q25.3	chr10:114992000-115501000	509000
10	p12.2	chr10:23299000-23727000	428000
12	qter	chr12:120630000-122060000	1430000
12	p11.22	chr12:29296000-29493000	197000
15	q23	chr15:67884000-69199000	1315000
15	q25.3	chr15:85851000-86020000	169000
16	p12.2	chr16:21674000-22357000	683000
16	p12.2	chr16:28380000-30174000	1794000
16	qter	chr16:88306000-88506000	200000
17	p11	chr17:21125000-21512000	387000
17	q11	chr17:22581000-23070000	489000
17	q12	chr17:34593000-34821000	228000
18	qter	chr18:75924000-76153000	229000
19	q13.41	chr19:58264343-58404762	140419
19	q13.43	chr19:62807000-62970000	163000
X	p22.2	chrX:15816000-16424000	608000
TOTAL			15701419

7.2 Preparación de las muestras

Todas las muestras fueron analizadas mediante un gel de agarosa al 1% para valorar la integridad del ADN. Tener una buena calidad es importante para que la hibridación sea óptima y la interpretación de los resultados sea fiable. De cada muestra, se prepararon de 2.000 a 4.000 ng de ADN disuelto en TE.

7.3 Hibridación

El marcaje, la hibridación, el escaneado y el procesamiento de los datos en bruto de los *arrays* de oligonucleótidos se realizó en el Instituto de Investigación Príncipe Felipe, concretamente en el servicio de *arrays*, dirigido por el Dr. David Blesa.

7.4 Análisis

El análisis de todos los *arrays*, tanto los *arrays* de genoma completo, como los *arrays* a la carta, se realizó con el programa DNA Analytics 4.0 que proporciona la casa comercial *Agilent*. Este programa muestra los resultados ya normalizados y con los oligonucleótidos representados en el ideograma del cromosoma al que corresponden.

Se estableció que para considerar posibles variantes de dosis (de ganancia o de pérdida) teníamos que encontrarnos dos o más oligonucleótidos consecutivos fuera del rango considerado dentro de la normalidad, el cual fue $\pm 0,5$. El algoritmo utilizado fue el Z-score, este algoritmo para definir las alteraciones, se basa en la utilización de ventanas definidas por un umbral, en nuestro caso una ventana es de 3 oligonucleótidos, y el punto de corte fijado en nuestro análisis en 0,5.

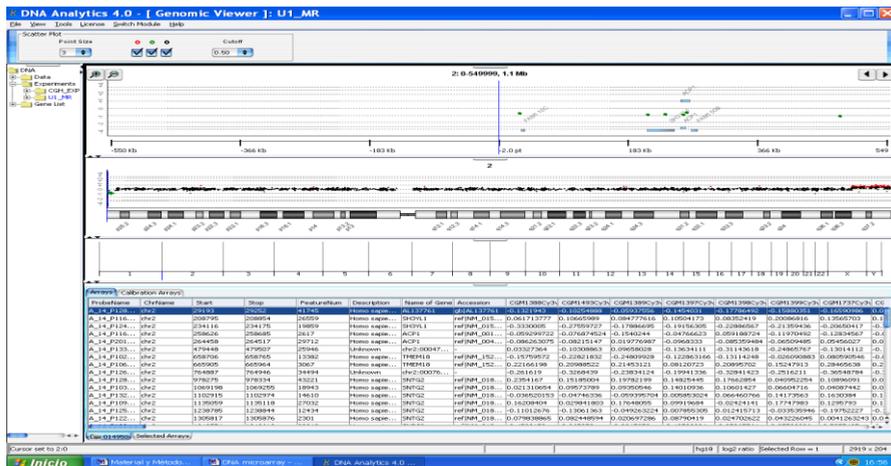


Figura 9: Ejemplo de resultado analizado por DNA Analytics 4.0

7.5 Interpretación

Siguiendo los criterios previamente establecidos, se registraron todas las variantes de dosis con el fin de establecer su posible relación con la patología de los pacientes.

Para la interpretación de los resultados obtenidos seguimos los mismos criterios que los utilizados con los *array* basado en BACs.

- La herencia.
- Casos patológicos descritos.
- Genes localizados en la región.
- El tamaño de la región alterada.

Al igual que con los resultados del *array de* BACs, para aplicar los criterios se realizaron los mismos estudios complementarios que se mencionan en el apartado 6.5 de material y métodos, a los que hay que añadir en este caso la técnica de CGH-*array* a la carta que se utilizó para caracterizar algunos de los casos.

Resultados

RESULTADOS

Resultados

1. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS SUBTELOMÉRICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISH

Por medio de esta técnica se estudiaron los primeros 34 pacientes. En cada uno de estos casos se empleó la tanda completa de sondas FISH subteloméricas descritas en el apartado 2.1 de material y métodos. Por cada paciente, se realizaron 15 hibridaciones (una por mezcla) y se revisaron al microscopio de fluorescencia, al menos, 10 metafases por área de hibridación. Por dificultades intrínsecas de la técnica, fue necesario repetir aproximadamente un 15 % de las hibridaciones. Concretamente, las mezclas de sondas que tenían una menor eficiencia de hibridación fueron la mezcla 3 y la mezcla 10, y dentro de éstas las sondas que habitualmente causaban más problemas fueron las sondas 3p, 3q, 10p y 10q. En algún caso fue necesario incluso la hibridación de estas sondas por separado, para poder terminar el estudio en el paciente.

Por otra parte, a lo largo del estudio de estos 34 casos, se observó que las hibridaciones eran de mayor calidad y con menos artefactos cuando las extensiones se realizaban el día anterior a la hibridación, dejándolas envejecer durante toda la noche. También se pudo observar la importancia de utilizar portaobjetos bien desengrasados. Durante este estudio se utilizaron dos lotes de portaobjetos, las hibridaciones obtenidas sobre portaobjetos del primer lote se pudieron evaluar sin problemas, pero cuando se empezó a utilizar portaobjetos del segundo lote, las sondas no hibridaban. Después de realizar pruebas modificando una a una todas las posibles variables que pudieran afectar a la hibridación, las sondas volvieron a hibridar cuando se utilizaron portaobjetos de otro lote diferente.

1.1 Reordenamientos subteloméricos detectados

De los 34 pacientes estudiados, se detectaron reordenamientos subteloméricos desequilibrados en cuatro de ellos. Las formulas cromosómicas se presentan a continuación:

<u>Caso</u>	<u>Fórmula cromosómica</u>
CGM967	46,XY.ish der(6)t(3;6)(q29;p25)
CGM935	46,XX.ish der(5)t(5;9)(p15;p23)
CGM1160	46,XY.ish der(12)t(12;13)(p13;q34)
XF2337	46,XY.ish der(2)t(1;2)(q44;q37)

Resultados

En estos cuatro casos se realizó el estudio FISH de los progenitores para averiguar si se trataba de un reordenamiento *de novo* o heredado. Además, se delimitó la región afectada mediante análisis de segregación con diferentes marcadores microsatélite polimórficos, pudiendo determinar el origen de la alteración (Tabla 5). De las cuatro alteraciones, una fue *de novo* y las otras tres fueron heredadas de uno de los progenitores, los cuales presentaban el reordenamiento en equilibrio.

1.1.1 Caso CGM967 ♂: 46,XY.ish der(6)t(3;6)(q29;p25)

Presenta un cromosoma derivado 6, con deleción de la región subteloamérica del brazo corto que ha sido sustituida por un fragmento de la región subteloamérica del brazo largo del cromosoma 3 (figura 10). Los estudios familiares por FISH mostraron que este cromosoma derivado 6 había sido heredado de la madre. Tanto la madre como una hermana del paciente eran portadoras de la translocación equilibrada 46,XX,t(3;6)(q29;p25). Mediante el análisis de segregación de marcadores polimórficos, se comprobó que el paciente presentaba una deleción parcial de entre 6,9-7,9 Mb en la región distal del brazo corto del cromosoma 6 y una duplicación parcial de la región distal del brazo largo del cromosoma 3, de un tamaño entre 3,9-6 Mb (figura 11).

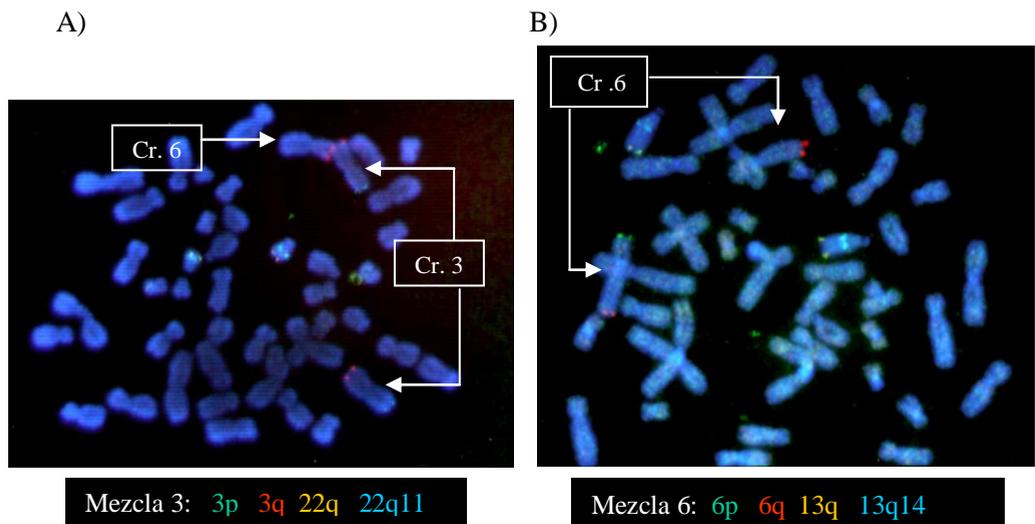


Figura 10: Resultado del FISH subteloamérica en el paciente CGM967.

A) Con la mezcla 3 podemos observar tres señales rojas correspondientes a la región subteloamérica del brazo largo del cromosoma 3, dos situadas en dicha posición y la otra situada en el brazo corto del cromosoma 6. B) Con la mezcla 6 observamos sólo una de las dos señales verdes esperadas correspondientes a la región subteloamérica del brazo corto del cromosoma 6.

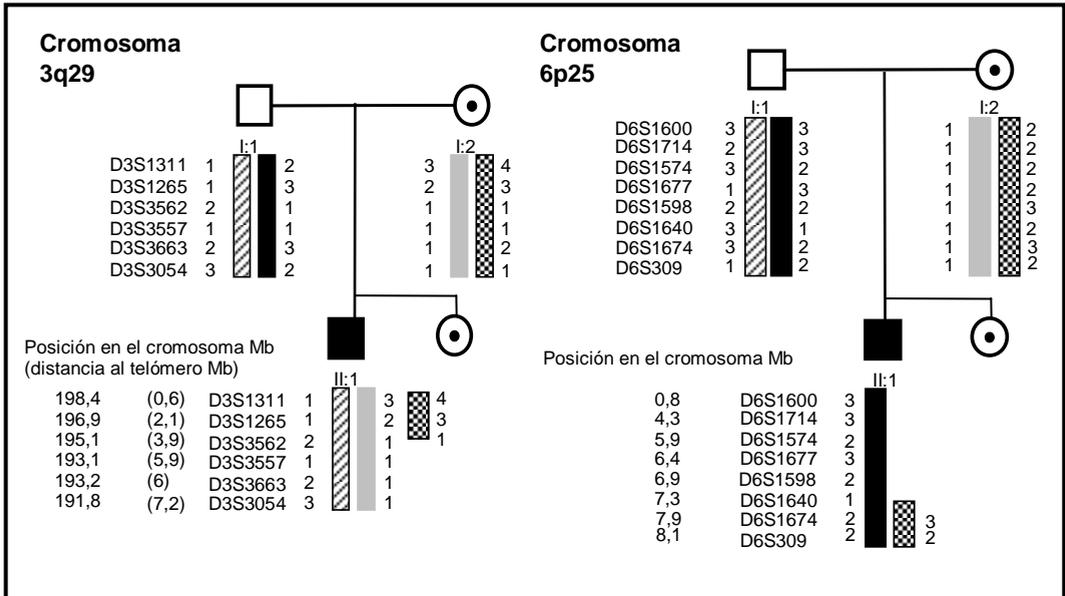


Figura 11: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente CGM967 mediante marcadores microsatélite. Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados, ordenados desde el más telomérico al más centromérico (hg16).

Resultados

1.1.2 Caso CGM935 ♀: 46,XX,ish der(5)t(5;9)(p15;p23)

La paciente presenta un cromosoma derivado 5 (figura 12) con una deleción parcial de la región terminal del brazo corto del cromosoma 5 de entre 13,5 y 22,5 Mb y una duplicación parcial de la región terminal del brazo corto del cromosoma 9 de 6,2 a 7,2 Mb. Estas regiones alteradas fueron caracterizadas mediante marcadores microsatélite (figura 14). Además, por medio de estudios familiares se vio que el cromosoma derivado había sido heredado del padre, quien era portador equilibrado de la translocación 46,XY,t(5;9)(p15;p23) (figura 13).

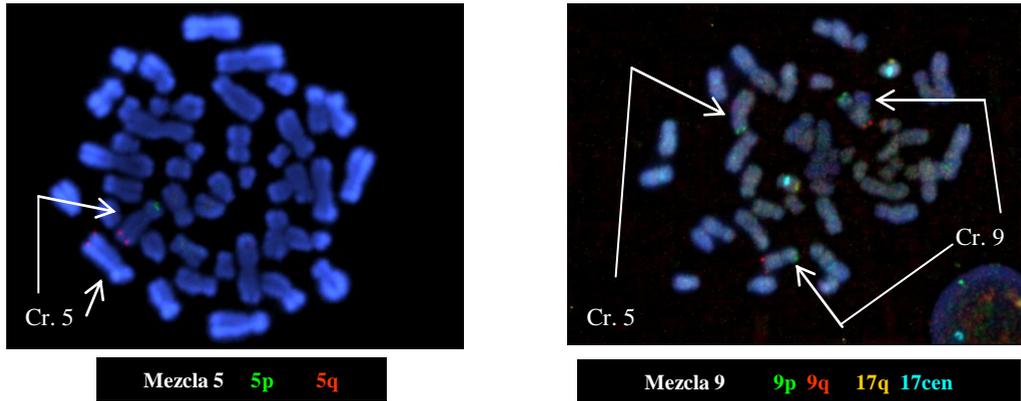


Figura 12: Resultado del FISH subtelomérico en la paciente CGM935.

Con las mezclas 5 y 9 de sondas subteloméricas, podemos observar como la región subtelomérica del brazo corto de un cromosoma 5 no hibrida con la sonda 5p (verde) de la mezcla 5 sino que hibrida con la sonda 9p (verde) de la mezcla 9.

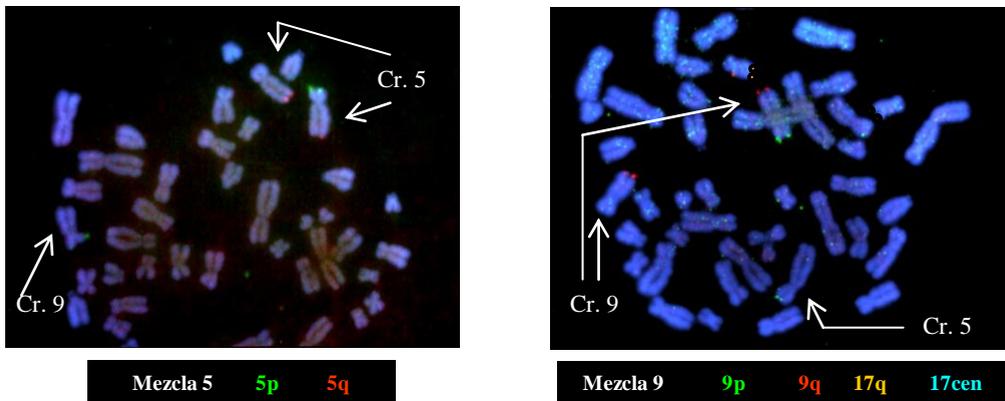


Figura 13: Resultado FISH subtelomérico en el padre de la paciente CGM935.

La sonda 5p (verde) de la mezcla 5 hibrida en el brazo corto de un cromosoma 9 y la sonda 9p (verde) de la mezcla 9 hibrida en el brazo corto de un cromosoma 5.

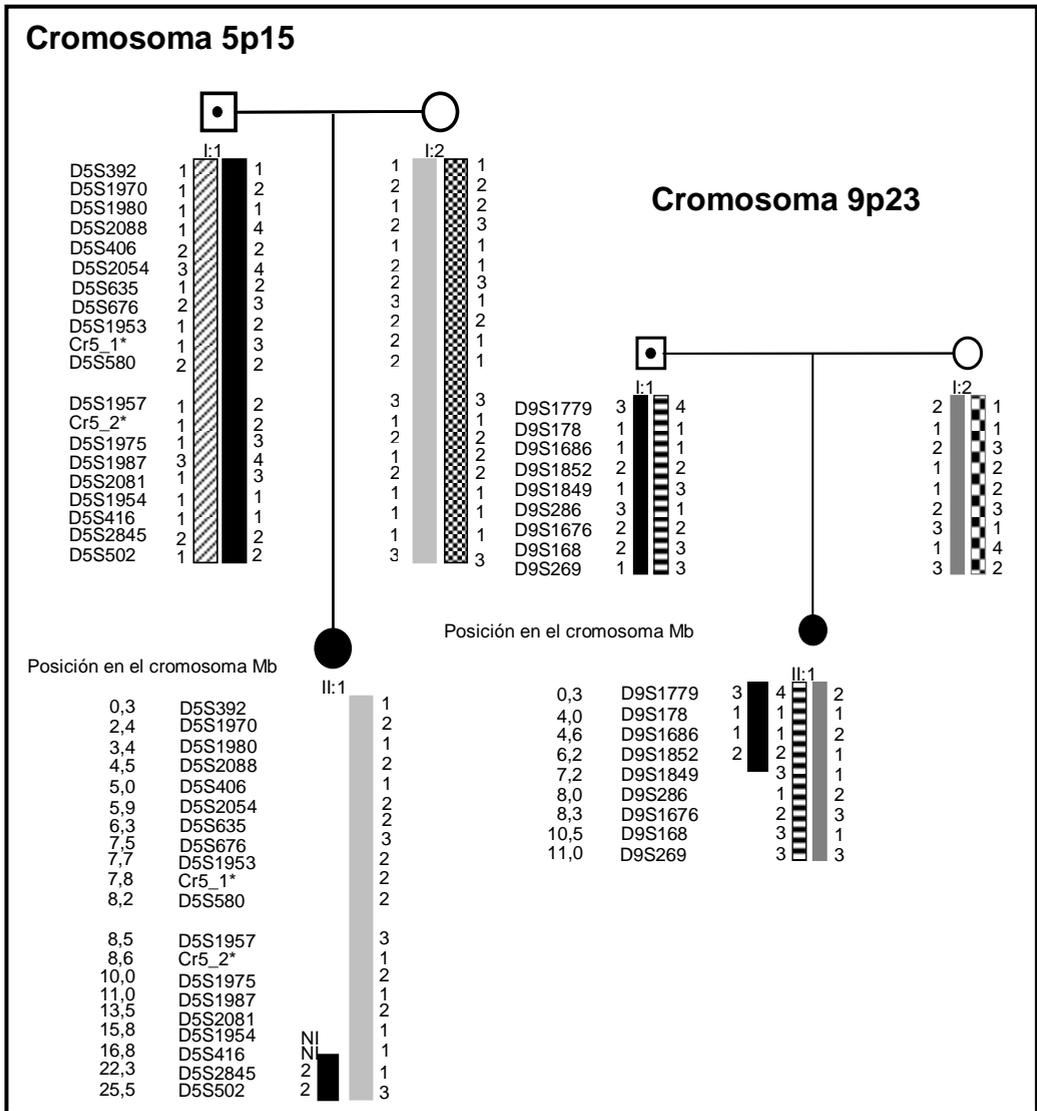


Figura 14: Caracterización de las alteraciones encontradas en la paciente CGM935 mediante marcadores microsatélite. Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados, ordenados desde el más telomérico al más centromérico (hg 16). NI: no informativo

Resultados

1.1.3 Caso CGM1160 ♂: 46,XY.ish der(12)t(12;13)(p13;q34)

Este paciente muestra un cromosoma derivado 12 (figura 15) con una delección de la región distal del brazo corto del cromosoma 12 de entre 4,8 y 5,8 Mb y una duplicación de entre 6 y 7 Mb de la región distal del brazo largo del cromosoma 13 (alteraciones caracterizadas mediante marcadores microsatélite, figura 16). En este caso la translocación fue heredada de la madre, que era portadora equilibrada de la translocación 46,XX,t(12;13)(p13;q34).

Además, gracias a los estudios familiares, se detectó el cromosoma derivado complementario en una prima hermana del caso índice, la cual también presentaba un síndrome polimalformativo y deficiencia intelectual, que se achacaba a un problema en el parto. Esta niña, con fórmula cromosómica 46,XX.ish der(13)t(12;13)(p13;q34), heredó el cromosoma 13 derivado de su padre, tío materno del caso índice, e igualmente portador equilibrado de la translocación.

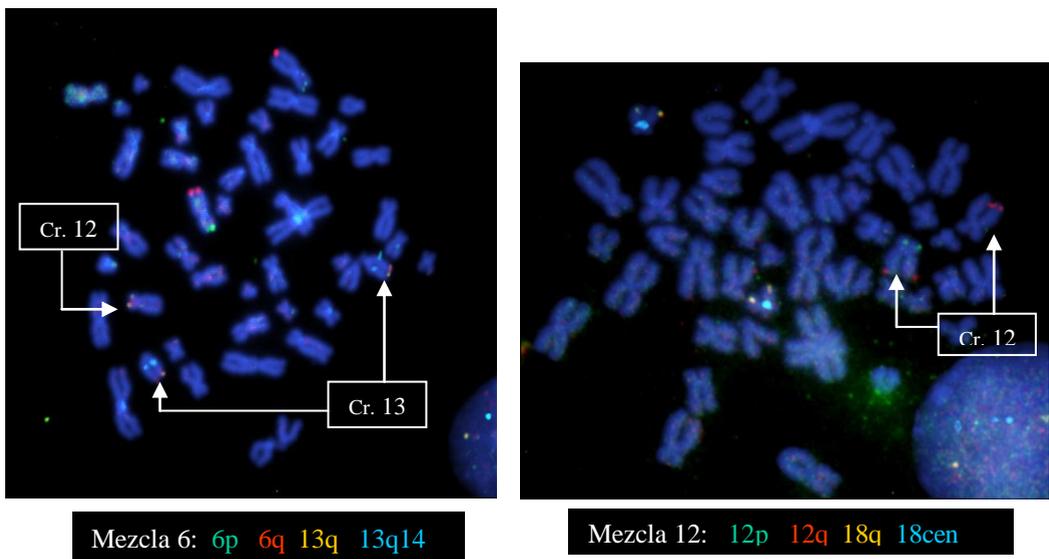


Figura 15: Resultado del FISH subtelomérico en el paciente CGM1160.

Mediante la mezcla 6 podemos observar tres señales naranjas correspondientes a la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma 13, dos situadas en el brazo largo del cromosoma 13 y la otra situada en el brazo corto del cromosoma 12. Mediante la mezcla 12 observamos sólo una de las dos señales verdes esperadas correspondientes a la región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 12.

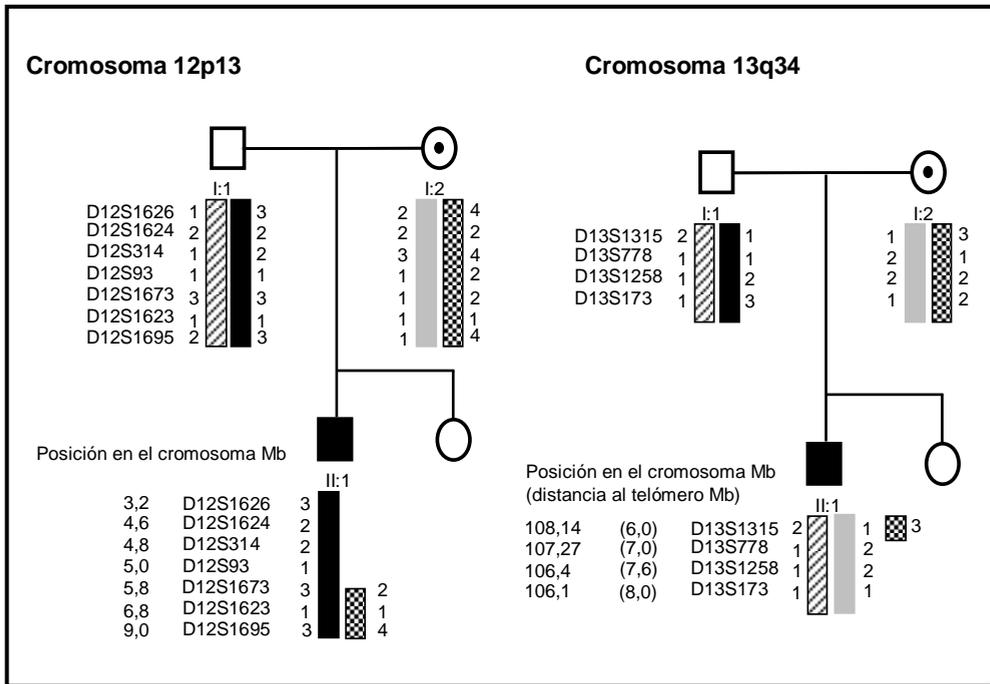


Figura 16: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente CGM1160 mediante marcadores microsatélite. Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados, ordenados desde el más telomérico al más centromérico (hg 16).

Resultados

1.1.4 Caso XF2337 ♂: 46,XY.ish der(2)t(1;2)(q44;q37)

Este caso muestra un cromosoma 2 derivado (figura 17), con delección parcial de entre 11 y 14,3 Mb en la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma 2 y una duplicación parcial de al menos 6 Mb en el brazo largo del cromosoma 1 (figura 18). En este caso, el estudio de FISH a los progenitores no mostró ninguna alteración y dado que el estudio con marcadores microsatélite excluye una posible falsa paternidad, se deduce que la translocación había surgido *de novo* en el paciente. En cuanto al análisis de segregación se pudo comprobar que con los marcadores microsatélite del brazo largo del cromosoma 2 se perdían los alelos de origen paterno, mientras que los marcadores microsatélite del brazo largo del cromosoma 1 mostraban un aumento de dosis de los alelos maternos. Esto nos indica que el reordenamiento tuvo un origen post-cigótico.

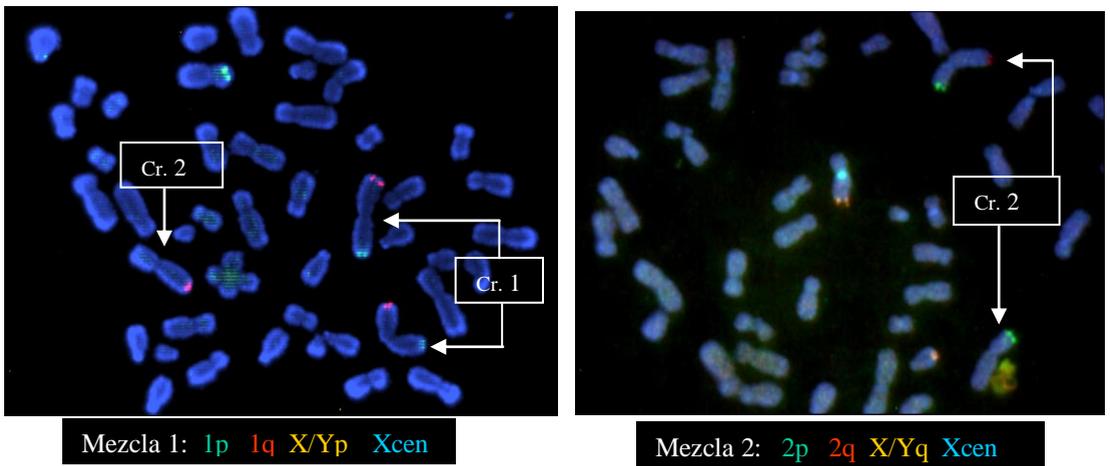


Figura 17: Resultado del FISH subtelomérico en el paciente XF2337.

Con la mezcla 1 podemos observar tres señales rojas correspondientes a la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma 1, dos situadas en dicha localización y la otra situada en el brazo largo del cromosoma 2. Con la mezcla 2 observamos sólo una de las dos señales rojas esperadas correspondientes a la región 2q37.

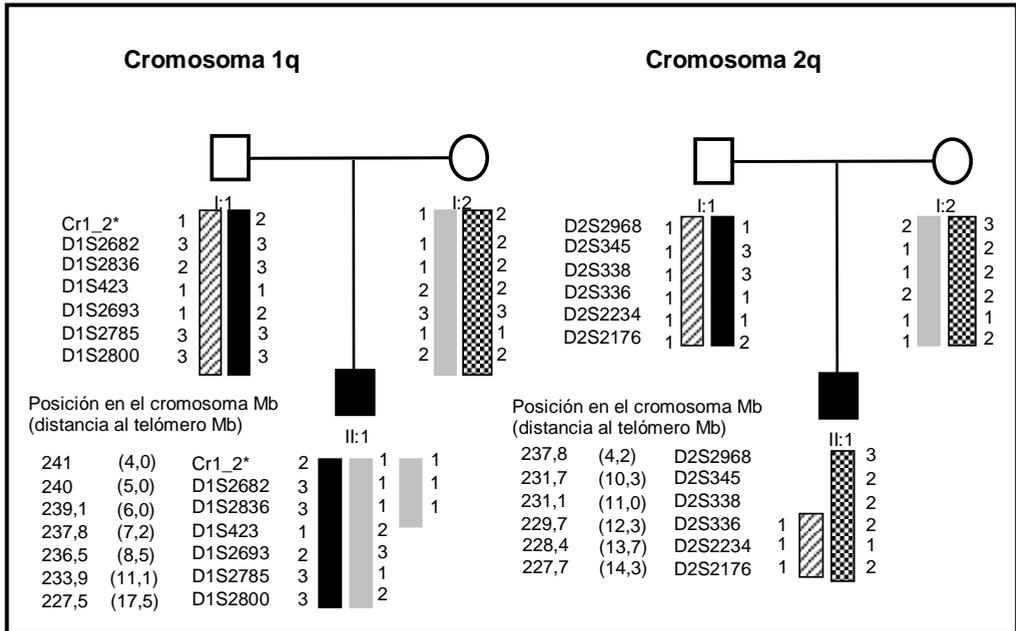


Figura 18: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente XF2337 mediante marcadores microsatélite.

Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados, ordenados desde el más telomérico al más centromérico (hg16).

Resultados

Tabla 5: Resumen de las alteraciones detectadas por FISH subtelomérico

Caso	<u>Alteración</u>	Posición	Tamaño mínimo (Mb)	Herencia	Origen parental
CGM967	Delección	6pter	6,9	*MPTE	Materno
	Duplicación	3qter	3,9		
CGM935	Delección	5pter	13,5	×PPTE	Paterno
	Duplicación	9pter	6,2		
CGM1160	Delección	12pter	5,0	*MPTE	Materno
	Duplicación	13qter	4,9		
XF2337	Duplicación	1qter	11,0	<i>De novo</i>	Duplicación Materna Delección paterna
	Delección	2qter	6,0		

*MPTE: Madre portadora de la translocación en equilibrio.

×PPTE: Padre portador de la translocación en equilibrio.

Nota: el tamaño de las regiones alteradas de estos cuatro casos fue acotado por marcadores microsatélite.

2. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS SUBTELOMÉRICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MLPA

Cuando se empezó a utilizar la técnica de MLPA para la búsqueda de reordenamientos subteloméricos, no había ningún trabajo publicado sobre su utilidad para este tipo de aplicación. Por ello, lo primero que se hizo, fue analizar la fiabilidad y reproducibilidad de la técnica por medio del estudio de 22 controles sanos y 34 pacientes estudiados previamente por FISH. Ambos grupos de controles se estudiaron con las tres *SALSAs* (*SALSA* P036, *SALSA* P019 y *SALSA* P020) que se encontraban en ese momento en el mercado para la detección de desequilibrios subteloméricos. Una vez validada la técnica se procedió a estudiar una primera tanda de 61 pacientes con las tres *SALSAs*. En base a los resultados obtenidos con esta primera tanda de pacientes, se cambió la estrategia de estudio y los 107 pacientes restantes, se estudiaron con una sola *SALSA* (P036), confirmando las variantes encontradas mediante las otras *SALSAs* P019, P020 y por FISH.

2.1 Validación de la técnica MLPA en 22 controles procedentes de individuos sanos

En primer lugar, dado que se trataba de una técnica cuantitativa recién descrita, se analizó la variabilidad intrínseca de los valores normalizados obtenidos para cada una de las sondas en muestras control (figura 19). En general, las sondas mostraron un comportamiento bastante homogéneo y los valores normalizados se disponían alrededor de 1 como cabría esperar. Sin embargo, se observaban diferencias de rango entre ellas. Por ejemplo, en el caso de la *SALSA* P036, el rango de variabilidad de la sonda 21q fue mucho mayor que el rango de la sonda 6q. Por tanto, se consideró que no todas las sondas tenían la misma fiabilidad cuando obteníamos resultados al límite.

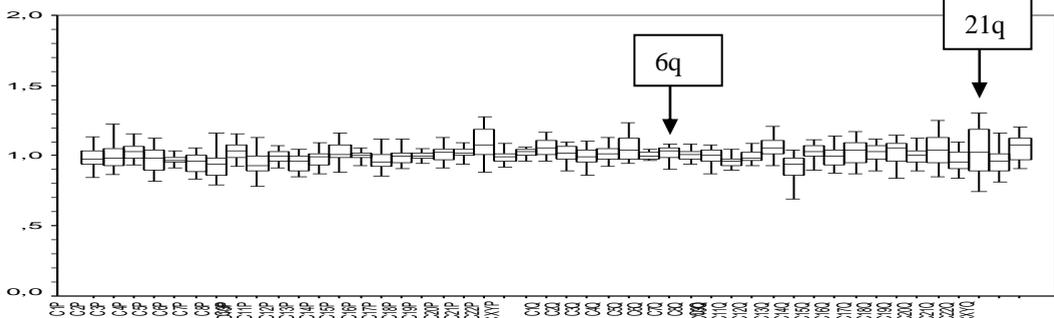


Figura 19: Diagrama de caja (Box-plot) del comportamiento de las sondas de la *SALSA* P036. Cada caja representa la mediana (línea interior de la caja) y los cuartiles 1º y 3º (límite inferior y superior de cada caja) de los valores normalizados para cada sonda.

Resultados

En el análisis de estos 22 controles encontramos cuatro variantes de dosis distintas, tanto de duplicación (valor 1,5) como de delección (valor 0,5). Estas variantes fueron: para la *SALSA* P036 dos controles con duplicación 10q y otro con duplicación “15p”; para la *SALSA* P019 un control con delección 6p y otros dos controles con delección 2q (ver tabla 6).

2.2 Validación de la técnica MLPA con casos previamente estudiados por la técnica de FISH

Los 34 pacientes que previamente se habían estudiado por FISH, se analizaron mediante las *SALSAs* de MLPA subtelomérico. Este estudio demostró que la técnica MLPA era capaz de detectar las mismas alteraciones que se habían visto por FISH. Además, por medio del MLPA se observó un nuevo reordenamiento no detectado por FISH. Este reordenamiento fue una duplicación de la sonda “14p”.

Los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos están formados por secuencias repetitivas. Por ello, los grupos de sondas FISH para reordenamientos subteloméricos no incluyen sondas para los brazos cortos de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. Sin embargo, las *SALSAs* de MLPA, para suplir esta falta, incorporan sondas de estos cromosomas localizadas en la región subcentromérica del brazo largo. Por ello, la duplicación detectada por la sonda “14p”, se encuentra realmente en el brazo largo del cromosoma 14 a nivel subcentromérico, y no pudo ser detectada mediante la técnica de FISH.

2.3 Análisis de la serie de pacientes con las tres *SALSAs* de MLPA subteloméricas P036, P019 y P020

Inicialmente se estableció un protocolo que consistía en estudiar cada caso con todas las *SALSAs* de MLPA disponibles para reordenamientos subteloméricos. Por una parte, la P036 que contiene sondas para todas las secuencias subteloméricas, y por otra las *SALSAs* P019 y P020 que se complementan, y en su conjunto también cubren todas las regiones subteloméricas. Mediante este protocolo se analizaron los primeros 95 pacientes (61 casos nuevos y 34 estudiados previamente por FISH). Se encontraron 18 casos que presentaban una aparente discordancia en los resultados, es decir, cambios de dosis detectados con una sonda de una *SALSA* que no se confirmaron con la sonda correspondiente a esa misma región de la otra *SALSA* (ver tabla 6). Ninguna de estas alteraciones se confirmó mediante la técnica de FISH. Mediante el estudio de los progenitores (en los casos en que se disponía de material), se pudo comprobar que estas alteraciones eran reales y heredadas. A su vez, algunos

de estos cambios se habían detectado también en la serie de controles, por lo que se consideraron como variantes de dosis polimórficas.

A la vista de estos resultados previos, que parecían indicar que los cambios de dosis que se detectaban solo con una de las *SALSAs* eran variantes de dosis polimórficas, en su mayor parte heredadas de uno de los progenitores, se planteó un cambio en la estrategia de utilización de las *SALSAs* de MLPA. Así pues, los 107 pacientes restantes, solo se estudiaron inicialmente con la *SALSA* P036. Si se detectaba alguna variación de dosis, se estudiaba a los padres. Si estos no presentaban la variante de dosis, entonces, además de confirmarla mediante las *SALSAs* P019/P020 (que posteriormente fueron sustituidas por una nueva *SALSA* P070), también se confirmaba por FISH.

Tabla 6: Variantes de dosis subteloméricas identificadas por una sola *SALSA* de MLPA y no confirmadas por FISH.

Sondas MLPA	Pacientes	Progenitores	Controles
<i>SALSA</i> P036			
Duplicación 1q	1	1	
Duplicación 10q	5 *	4	2
Duplicación 13q	1	1	
Deleción 8p	2	1	
Deleción 11p	1 *	1	
Deleción 15p			1
<i>SALSA</i> P019			
Deleción 2q	2		2
Deleción 6p	5	5	1
Duplicación Xp	1	1	
Nº total de casos estudiados	95	19	22

*Un paciente con deleción 11p y duplicación 10q

Nota: A lo largo de este trabajo, la *SALSA* P036 ha sido mejorada repetidas veces y cada vez se utilizó la versión más reciente (*SALSA* P036B/P036C/P036D). Así como las *SALSAs* P019/20 se convirtieron en P070.

Estas mejoras consistían en sustituir las sondas que habían mostrado un alto grado de polimorfismo por otras. Por ejemplo, la sonda 10q de la *SALSA* P036, que hibrida en una región del gen *CYP2E1*, mostró variación de dosis en población general. Por ello, en versiones posteriores, fue sustituida por una sonda que hibrida en el gen *PAO*.

Un ejemplo llamativo de estas variantes de dosis heredadas de los progenitores es el caso CGM1160. Este paciente, como ya hemos comentado

Resultados

anteriormente, es portador de un cromosoma 12 derivado de una translocación críptica entre los cromosomas 12 y 13: 46,XY.ish der(12)t(12,13)(p13.3;q34). Este cromosoma 12 derivado fue heredado de su madre, la cual es portadora de la translocación en equilibrio. Al reanalizar este caso mediante la técnica de MLPA, se confirmó la delección en el brazo corto del cromosoma 12 (12p) y la duplicación en el brazo largo del cromosoma 13 (13q), pero además se detectaron dos variantes de dosis más con la SALSA P036: una duplicación en 10q heredada de su madre que también presentaba su hermana sana, y una delección en 11p heredada de su padre (figura 20). Estas variantes se consideraron como variantes polimórficas.

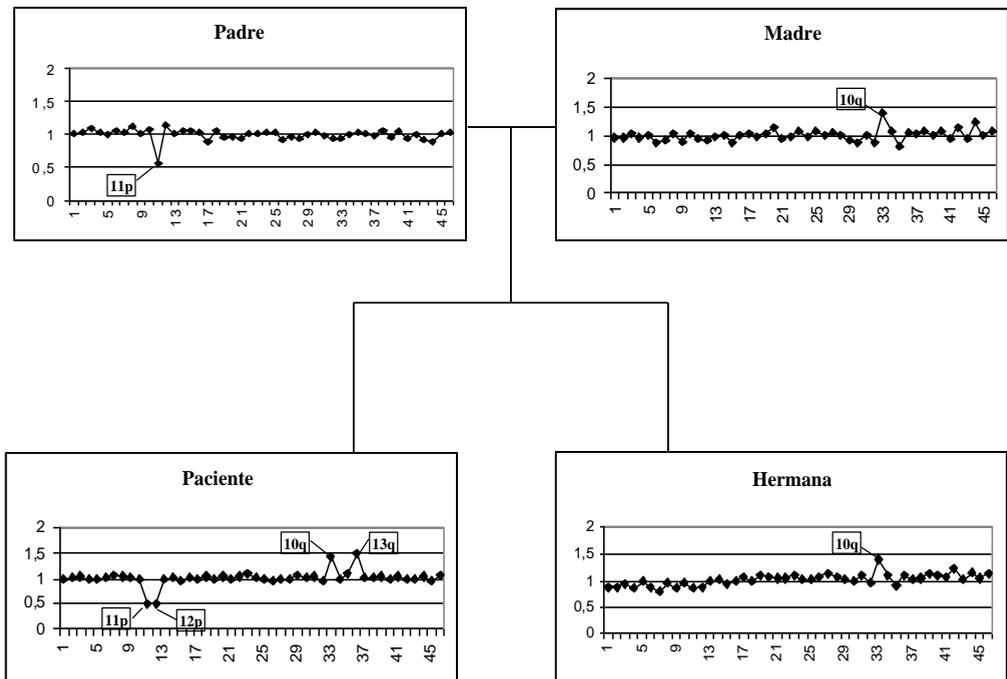


Figura 20: Representación gráfica del resultado de MLPA SALSA P036 en la familia del paciente CGM1160

2.4 Reordenamientos subteloméricos detectados

En el conjunto de los 202 pacientes estudiados con MLPA subtelomérico, se encontraron 20 casos que presentaban variantes de dosis con las dos *SALSAs*:

- 4 casos, mencionados anteriormente, con reordenamientos identificados por FISH.
- 1 caso que había sido estudiado por FISH con resultado normal, también mencionado anteriormente.
- 15 casos que no estaban estudiados por FISH con variantes de dosis nuevas.

En los 16 casos que encontramos variantes de dosis nuevas mediante las dos *SALSAs*, se realizaron estudios complementarios para confirmar y caracterizar las alteraciones:

- Utilización de la técnica MLPA en el ADN de los padres, para comprobar si la variante de dosis había sido heredada de alguno de los progenitores.
- Utilización de la técnica de FISH en metafases procedentes del paciente con sondas subteloméricas de la región implicada en la variante de dosis, para confirmar el resultado obtenido por MLPA, así como para poder ver la localización de aquellas regiones duplicadas.
- Si el paciente presentaba variante de duplicación en una sonda y de delección en otra sonda, se utilizó la técnica de FISH en metafases de los progenitores con sondas subteloméricas de las regiones implicadas, para poder determinar si esas variantes de dosis eran consecuencia de una translocación equilibrada presente en alguno de los progenitores.
- Caracterización de las deleciones o duplicaciones detectadas, mediante diferentes técnicas: análisis de segregación con marcadores microsatélite, MLPA de síndromes concretos o *CGH-array*.

Los resultados obtenidos en estos estudios se resumen en la tabla 7. Los reordenamientos detectados se encuadran en 3 tipos:

- **TIPO I:** Casos que presentan una duplicación y una delección en diferentes regiones.
- **TIPO II:** Casos que presentan una duplicación o una delección pura.
- **TIPO III:** Casos que presentan reordenamientos complejos en una misma región.

Resultados

Tabla 7: Resumen de los reordenamientos detectados por MLPA subtelomérico.

Tipo	Caso	Alteración	Tamaño (Mb) (posición inicial/posición final)(hg18)	Técnicas confirmatorias	Herencia	Origen Parental
I	CGM1387	Del 5p Dup 10q	al menos 11,5 al menos 5,6	MLPA	MPTE	Materno
	XF2463	Del 2p Dup 2q	2,8 (0/2,757) 11,988 (230,702/242,690)	<i>oaCGH</i>	<i>De novo</i>	Paterno
	CGM1819	Del 14q Dup 8q	3,3 (102,993/106,329) 5,5 (140,699/146,250)	<i>oaCGH</i>	PPTE	Paterno
	CGM245	Del 13q Dup 15q	1,2 (112,809/114,077) 17,2 (82,964/100,168)	<i>oaCGH</i>	MPTE	Materna
	CGM897	Del 4p Dup 11p	3,6 (0,062/3,677) 3,1 (0,186/3,338)	<i>oaCGH</i>	PPTE	Paterno
	X3361	Del 17p Dup 21q	4,2 (0/4,167) 1,7 (45,115/46,892)	<i>oaCGH</i>	MPTE	Materna
II	CGM991	Dup 14q	5,4 (18,832/23,660)	<i>oaCGH</i> MM FISH	<i>De novo</i>	Materno
	CGM2067	Del 1p	2,1-2,4	MLPA	<i>De novo</i>	-
	CGM506	Del 1p	2,1-2,4	MLPA	<i>De novo</i>	-
	CGM1388	Del 9q	1,2 (138,913/140,128)	<i>oaCGH</i> MM	<i>De novo</i>	Paterno
	CGM1397	Del 9q	1,0 (139,119/140,128)	<i>oaCGH</i> MM	<i>De novo</i>	Paterno
	X2686	Dup 22q	0,5 (48,996/49,525)	<i>oaCGH</i> MM	<i>De novo</i>	-
	XF1054	Del 22q	1,3 (48,182/49,525)	<i>aCGH (BAC'S)</i> MM	<i>De novo</i>	-
	CGM165	Del 22q	0,001(49,524-49,525)	<i>oaCGH</i> MLPA	<i>De novo</i>	-
III	CGM1313	Del 8p Dup 23	Del 6,7 (0/6,720) Dup 23 (12,772/35,784)	<i>oaCGH</i>	<i>De novo</i>	Materno
	CGM1525	Del 4p	Del 1,3 (0/1,323) Dup 1,1 (1,379/2,474)	<i>oaCGH</i>	<i>De novo</i>	-

Del: delección

Dup: duplicación

oaCGH: *CGH*-array de oligonucleótidos (44K)

aCGH (BAC'S): *CGH*-array de BAC's

MM: marcadores microsatélites.

MPTE: Madre portadora de la translocación en equilibrio.

PPTE: Padre portador de la translocación en equilibrio.

2.4.1 TIPO I: Casos que presentan una duplicación y una deleción en diferentes regiones

Son seis los pacientes incluidos en este grupo.

CGM1387 ♀: Presenta una deleción de la parte terminal del brazo corto del cromosoma 5 (5p) y una duplicación de la parte terminal del brazo largo del cromosoma 10 (10q). Estas alteraciones se confirmaron en la paciente mediante FISH. Esta técnica, mostró que se trataba de un cromosoma derivado con el fragmento duplicado de 10q localizado en el brazo corto del cromosoma 5 (figura 21). El resultado del FISH en metafases de los progenitores indicó que la madre era portadora de una translocación equilibrada entre los cromosomas 5 y 10. Además, con el fin de acotar las regiones alteradas, se analizó el ADN de esta paciente con la SALSA P096 resultando delecionadas, al menos las 11,5 Mb más terminales del cromosoma 5p, lo que incluyen la región crítica del Síndrome Cri du Chat, y con la SALSA P286-A1 resultando duplicadas todas las sondas de la región 10q26.3, con lo que la duplicación es de al menos 5,6 Mb.

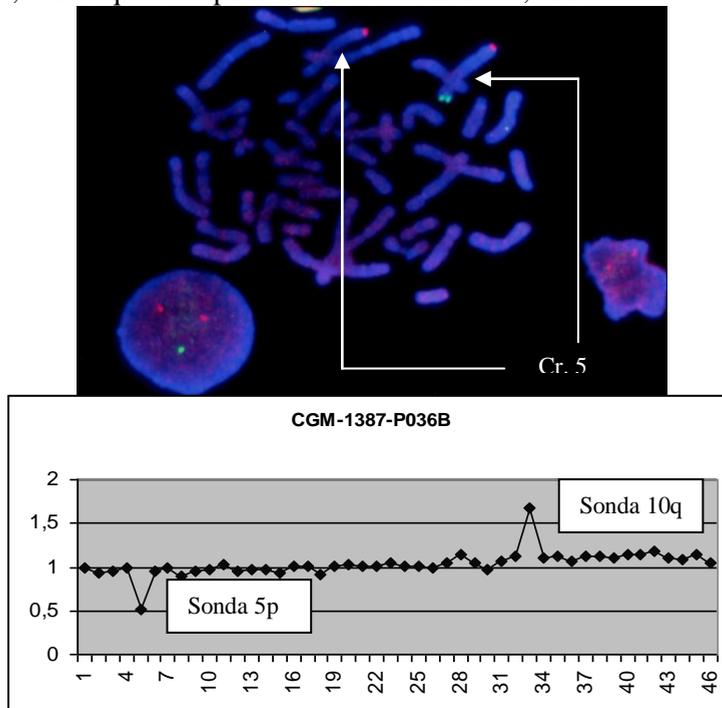


Figura 21: Resultado de FISH y MLPA subtelo mérico de la paciente CGM1387.

En la parte superior: imagen FISH de la mezcla 5 del kit ToTelvisión. En ella se puede observar que la sonda telomérica del brazo corto del cromosoma 5 solo hibrida en uno de los cromosomas 5, indicando la deleción de dicha zona. En la parte inferior: representación gráfica del resultado de MLPA SALSA P036 en la paciente CGM1387. Se puede observar el aumento de dosis de la sonda 10q y disminución de dosis de la sonda 5p.

Resultados

XF2463 ♂: El paciente presenta una delección del extremo del brazo corto del cromosoma 2 (2p) y una duplicación del extremo del brazo largo del cromosoma 2 (2q). La técnica de FISH mostró que se trataba de una translocación desequilibrada que había surgido *de novo* en el paciente. En este caso la caracterización de las alteraciones se realizó tanto por análisis de segregación mediante marcadores microsatélite, como por *CGH-array 44K*. La delección tiene una extensión de 2,7 Mb y la duplicación de 11,9 Mb (figuras 22, 23 y 24).

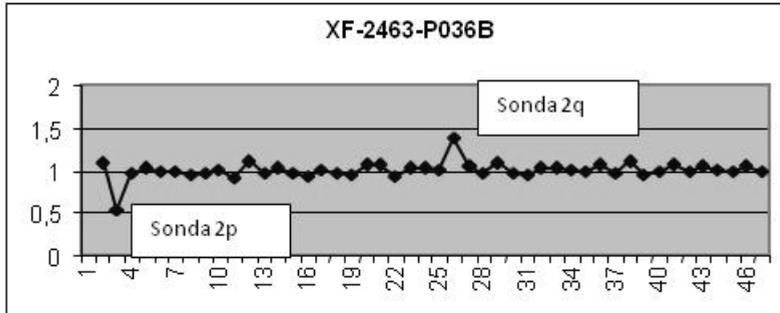


Figura 22: Representación gráfica del resultado de MLPA SALSA P036 en el paciente XF2463.

Se puede observar la disminución de dosis de la sonda 2p y el aumento de dosis de la sonda 2q.

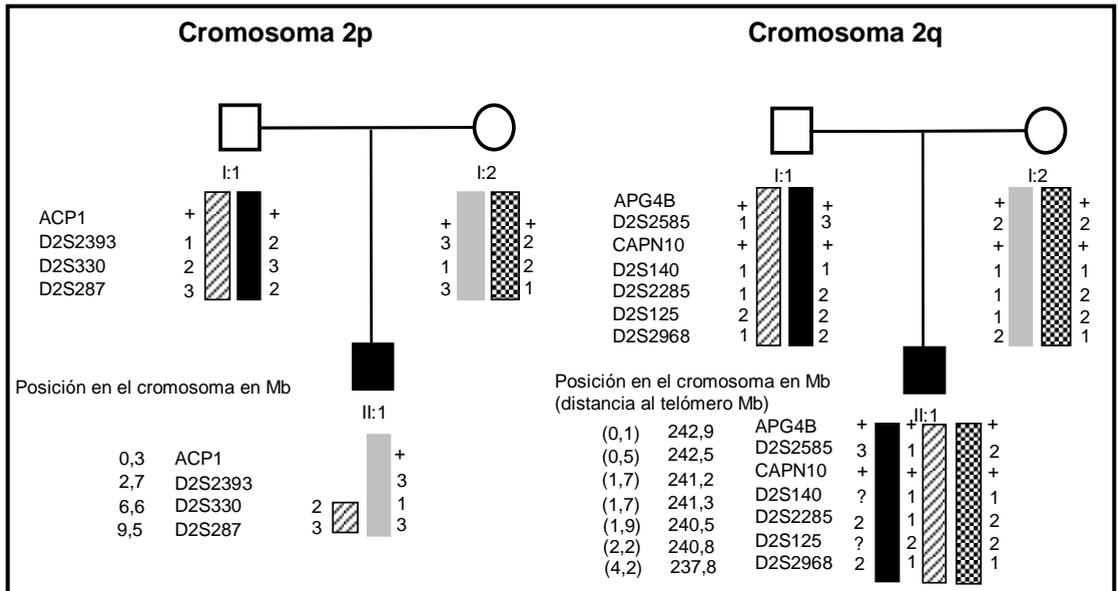


Figura 23: Caracterización de las alteraciones encontradas en el paciente XF2463 mediante marcadores microsatélite.

Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados ordenados desde el más telomérico al más centromérico (hg 16).

Resultados

CGM1819 ♂: Presenta una delección de la parte terminal del brazo largo del cromosoma 14 (14q) y una duplicación de la parte terminal del brazo largo del cromosoma 8 (8q). La técnica de FISH mostró que se trataba de un cromosoma 14 derivado de una translocación subtelomérica 46,XY,ish der(14)t(8;14)(q24.3;q32.32) y que el padre presentaba la translocación en equilibrio. El resultado después de acotar las alteraciones mediante *CGH-array 44K* fue que presentaba una delección en el brazo largo del cromosoma 14 de 3,3 Mb y una duplicación de 6 Mb en el brazo largo del cromosoma 8 (figuras 25, 26, 27).

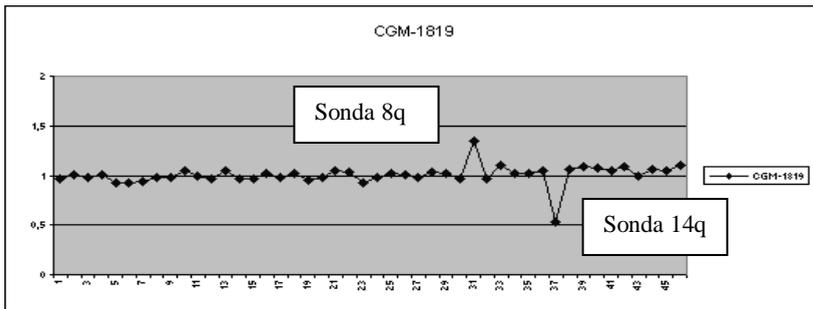


Figura 25: Representación gráfica del resultado de MLPA (*SALSA P036*) en el paciente CGM1819.

Se puede observar el aumento de dosis de la sonda 8q y la disminución de dosis de la sonda 14q.

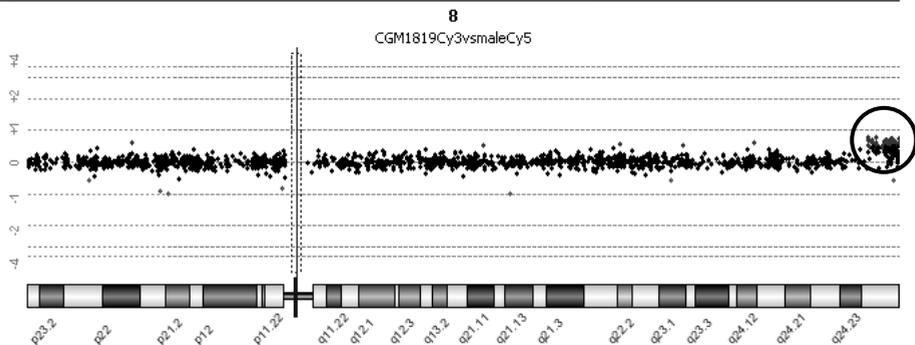


Figura 26: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 8 del paciente CGM1819.

Se puede observar el aumento de dosis de las sondas situadas en la región telomérica del brazo largo.

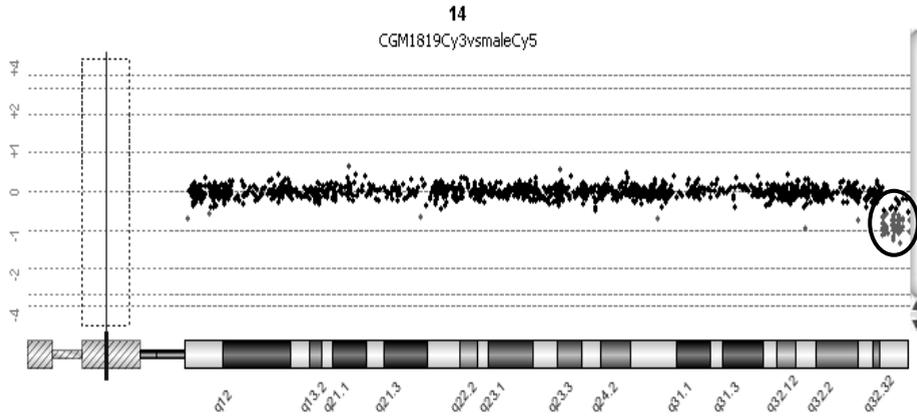


Figura 27: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 14 del paciente CGM1819.

Se puede observar la disminución de dosis de las sondas situadas en la región telomérica del brazo largo.

Resultados

CGM245 ♀: La paciente presenta una delección en el extremo final del brazo largo del cromosoma 13 y una duplicación en el extremo final del brazo largo del cromosoma 15 (figura 28). La técnica de FISH mostró que se trataba de un cromosoma 13 derivado de una translocación 46,XX,ish der(13)t(13;15)(q33.4;q25.2). Su madre presenta la translocación en equilibrio. Mediante *CGH-array 44K* se acotaron las regiones implicadas en la translocación siendo de 1,2 Mb la delección del brazo largo del cromosoma 13 y de 17,2 Mb la duplicación del brazo largo del cromosoma 15 (figura 29 y 30).

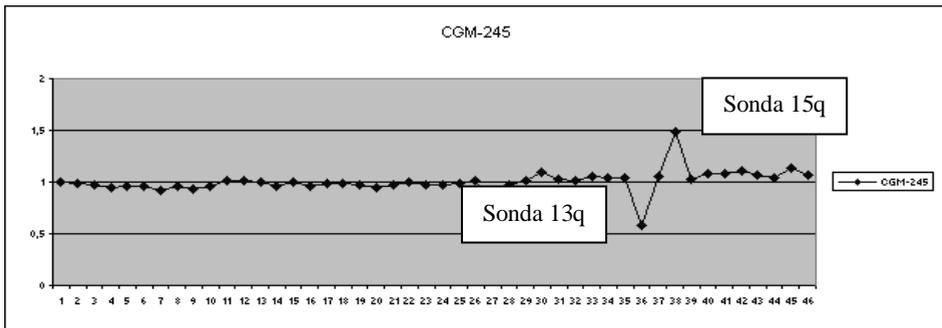


Figura 28: Representación gráfica del resultado de MLPA (SALSA P036D) en la paciente CGM245.

Se puede observar el aumento de dosis de la sonda 15q y la disminución de dosis de la sonda 13q.

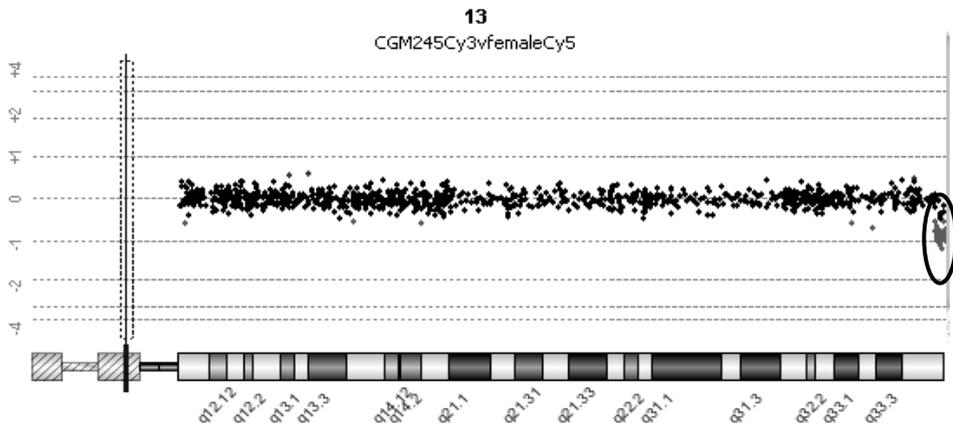


Figura 29: Representación gráfica del resultado del CGH-array 44K en el cromosoma 13 de la paciente CGM245.

Se puede observar la disminución de dosis de los oligonucleótidos situados en la región telomérica del brazo largo.

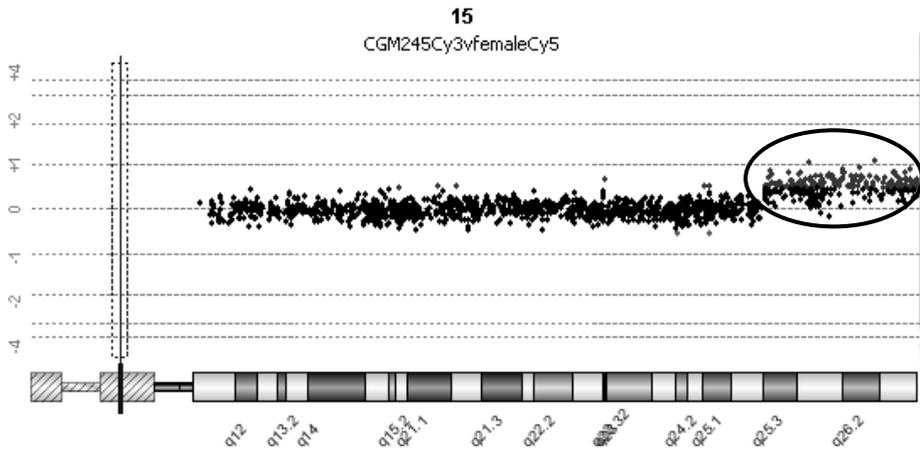


Figura 30: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 15 de la paciente CGM245.

Se puede observar el aumento de dosis de los oligonucleótidos situados en la región telomérica del brazo largo.

Resultados

CGM897 ♀: La paciente presenta una delección en el extremo final del brazo corto del cromosoma 4 (4p) y una duplicación del brazo corto del cromosoma 11 (11p) (figura 31). Los estudios mediante FISH mostraron que se trataba de un cromosoma 4 derivado de una translocación 46,XX,ish der(4)t(4;11)(p16.1;p15.5). Su padre presenta la translocación en equilibrio. El *CGH-array 44K* mostró que la delección de 4p se extendía 3,7 Mb y la duplicación de 11p 3,1 Mb (figuras 32 y 33).

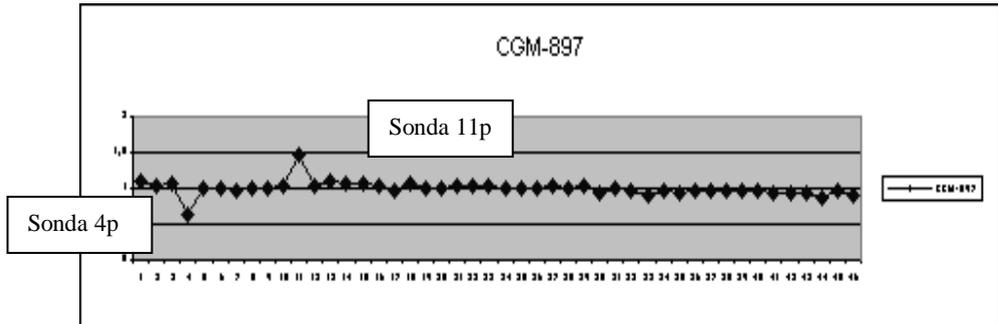


Figura 31: Representación gráfica del resultado de MLPA (SALSA P036D) en la paciente CGM897. Se puede observar el aumento de dosis de la sonda 11p y la disminución de dosis de la sonda 4p.

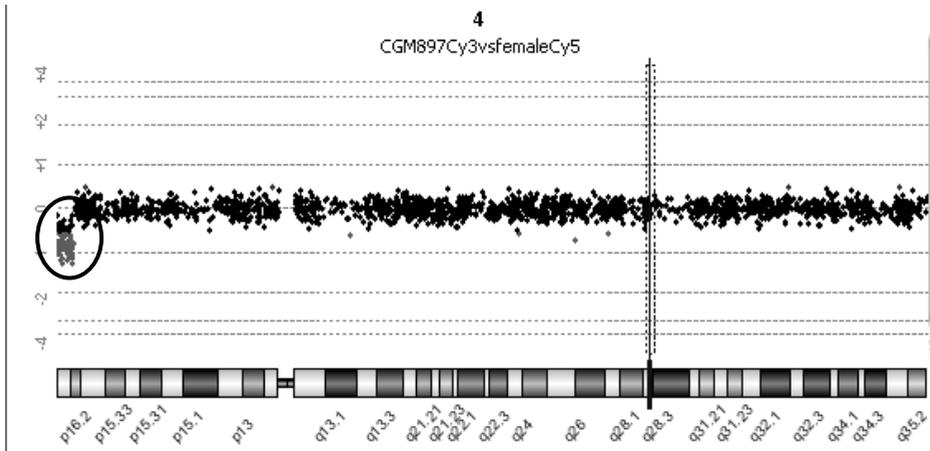


Figura 32: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 4 de la paciente CGM897. Se puede observar la disminución de dosis de los oligonucleótidos situados en la región telomérica del brazo corto.

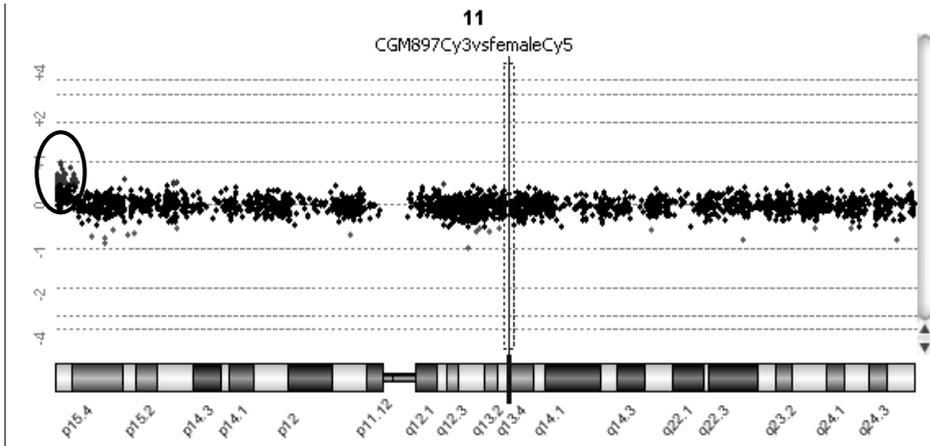


Figura 33: Representación gráfica del resultado del CGH-array 44K en el cromosoma 11 de la paciente CGM897.

Se puede observar el aumento de dosis de los oligonucleótidos situados en la región telomérica del brazo corto.

Resultados

X3361 ♂: El paciente presenta una duplicación del extremo final del brazo corto del cromosoma 17 (17p) y una deleción de la parte final del brazo largo del cromosoma 21 (21q) (figura 34). La técnica de FISH mostró que el paciente presentaba un cromosoma derivado de una translocación 46,XY.ish der(21)t(17;21)(p13.3;q22.3). Su madre presenta la translocación en equilibrio. Mediante la caracterización por *CGH-array 44K* se observó que la duplicación de 17p se extendía 4,1 Mb y la deleción de 21q 1,7 Mb (figuras 35 y 36).

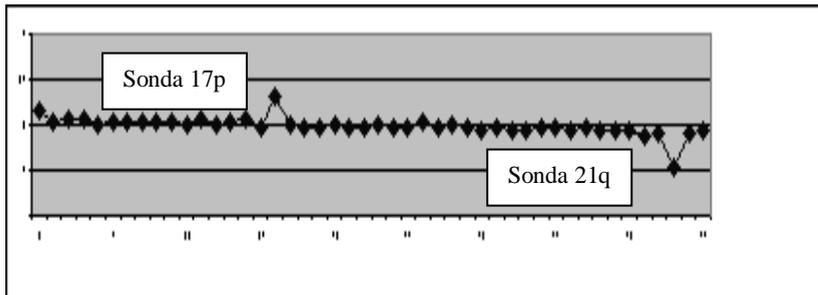


Figura 34: Representación gráfica del resultado de MLPA (SALSA P036D) en el paciente X3361.
Se puede observar el aumento de dosis de la sonda 17p y la disminución de dosis de la sonda 21q.

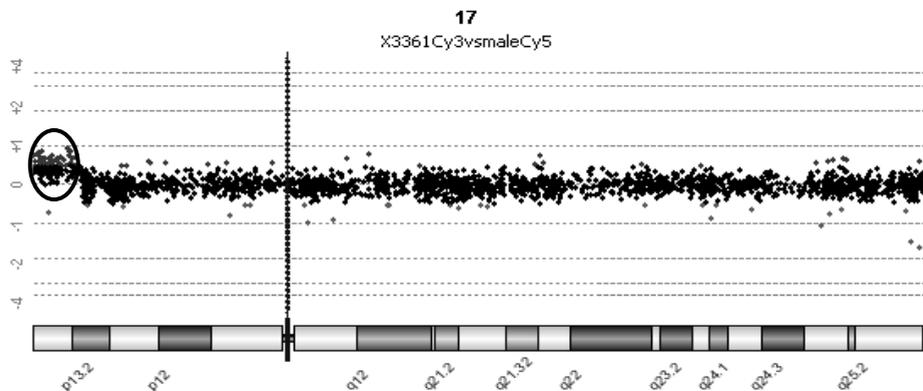


Figura 35: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 17 del paciente X3361.
Se puede observar un aumento de dosis de los oligonucleótidos situados en la región telomérica del brazo corto.

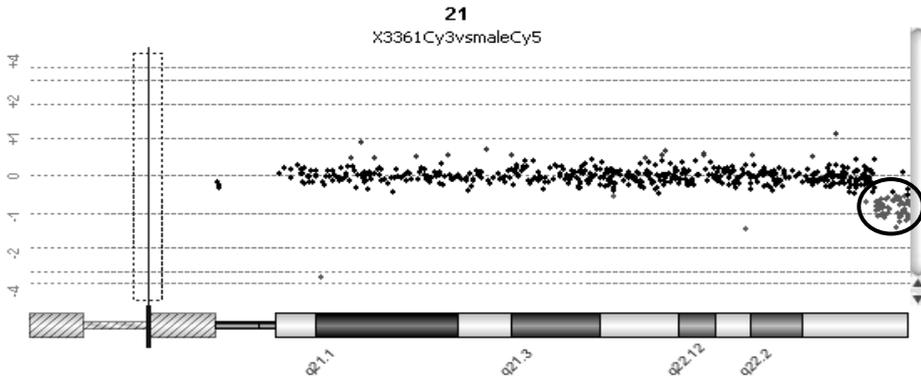


Figura 36: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 21 del paciente X3361. Se puede observar una disminución de dosis de los oligonucleótidos situados en la región telomérica del brazo largo.

2.4.2.TIPO II: Casos que presentan una duplicación o una delección pura En este grupo se engloban siete casos.

CGM991 ♂: El paciente presenta una duplicación subcentromérica en el cromosoma 14 detectada por MLPA (figura 37). Mediante la aplicación de la técnica MLPA en el ADN de los progenitores se observó que la duplicación del paciente era *de novo*. Por medio del análisis de segregación con marcadores microsatélite se confirmó la duplicación y se determinó que el alelo duplicado era de origen materno (figura 38). Para saber si el fragmento duplicado se localizaba en otro cromosoma o si se trataba de una duplicación *en tandem*, se prepararon sondas FISH a partir de clones tipo BAC: RP11-536C10 localizado en la región duplicada y RP11-52O23 localizado en la región 14q28 del brazo largo del cromosoma 14. El resultado mostró que se trataba de una duplicación *en tandem* (figura 39). Por último, mediante *CGH-array 44K* se estableció que la duplicación afectaba a las 5,38 Mb más centroméricas (figura 40).

Resultados

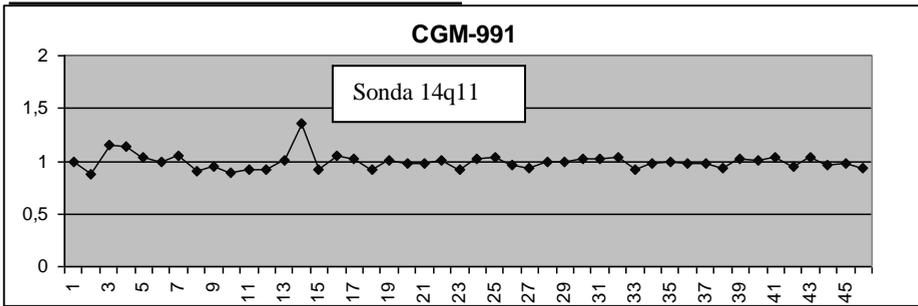


Figura 37: Representación gráfica del resultado de MLPA (SALSA P036) en el paciente CGM991.

Se puede observar el aumento de dosis de la sonda 14q11.

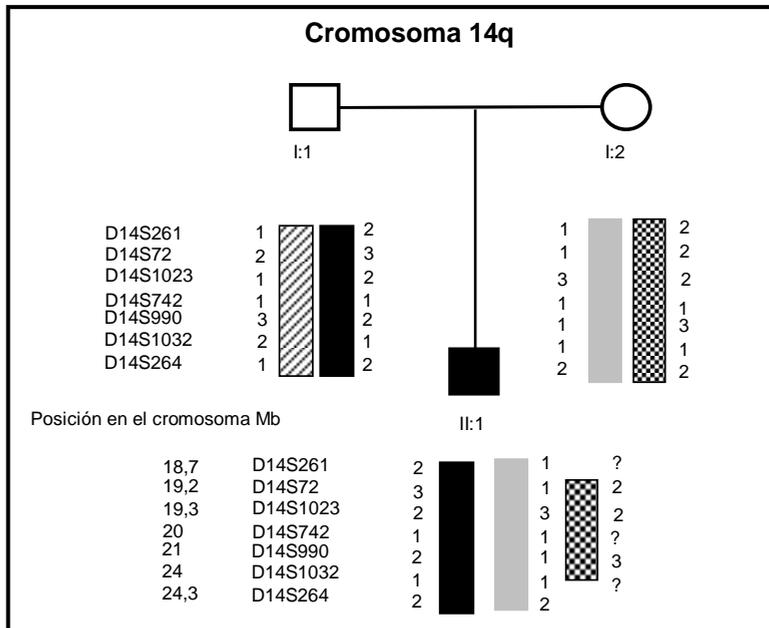


Figura 38: Caracterización y confirmación de la alteración encontrada en el paciente CGM991 mediante marcadores microsatélite.

Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados ordenados desde el más centromérico al más telomérico (hg 16).

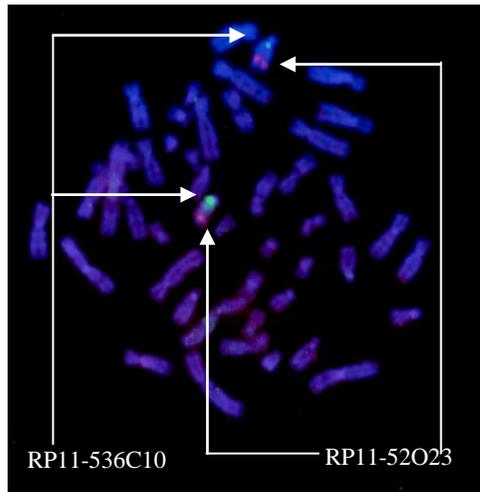


Figura 39: Paciente CGM991 imagen FISH de los clones tipo BACs marcados: RP11-52O23 (rojo) utilizado como sonda control del cromosoma 14 y RP11-53610 (verde) ubicada en la región 14q11 duplicada de este paciente. En ella se puede observar que la sonda RP11-53610 hibrida únicamente en los dos cromosomas 14, indicando que dicha duplicación es *en tandem*.

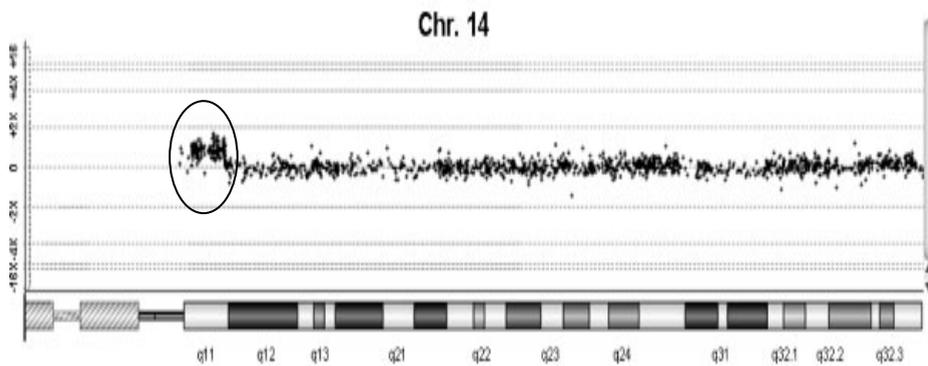


Figura 40: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 14 del paciente CGM991. Se puede observar un aumento de dosis de los oligonucleótidos situados en la parte subcentromérica del cromosoma 14.

Resultados

CGM2067 ♂ y **CGM506** ♀: Ambos pacientes presentan una deleción en el extremo final del brazo corto del cromosoma 1 (1p) (figura 41 parte superior). El estudio mediante la técnica de MLPA con el ADN de los progenitores, mostró que la alteración en ambos casos había surgido *de novo*. Como hay un síndrome descrito causado por la deleción de la región terminal del brazo corto del cromosoma 1, también existe un MLPA diseñado para caracterizar esta región. Por eso, en estos dos casos se utilizó la técnica MLPA con la *SALSA P064* para acotar la región. En ambos casos la región delecionada se extendía entre 2,1 y 2,4 Mb desde el telómero (figura 41 parte inferior).

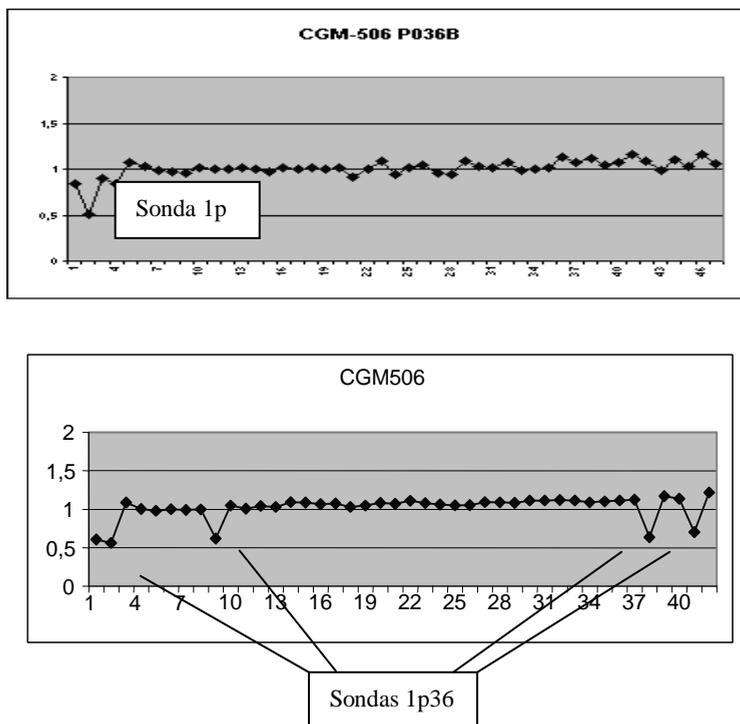


Figura 41: Representación gráfica del resultado de MLPA *SALSA P036B* (parte superior) y *SALSA P064* (parte inferior) en el paciente CGM506. Se puede observar la disminución de dosis de la sonda correspondiente al cromosoma 1.

CGM1388 ♂ y CGM1397 ♀: Ambos pacientes presentan una deleción en el extremo final del brazo largo del cromosoma 9 (9q) (figura 42). El estudio FISH con sondas subtelo méricas en linfocitos de los pacientes confirmó la deleción. El estudio mediante la técnica de MLPA con el ADN de los padres, mostró que la alteración en ambos casos había surgido *de novo*. El análisis de segregación mediante marcadores microsatélite de la región nos indicó que la alteración en ambos pacientes era de origen paterno. Además, por medio de estos marcadores microsatélite pudimos acotar la deleción, en el caso de la paciente CGM1397 entre 0,5 y 1,2 Mb mientras que la deleción del paciente CGM1388 se encontraba entre 0,5 y 2 Mb (figura 43). Posteriormente, estos pacientes fueron estudiados mediante *CGH-array* 44K observándose una deleción de 1,2 Mb en el paciente CGM1388 y una deleción de 1Mb en la paciente CGM1397 (figura 44).

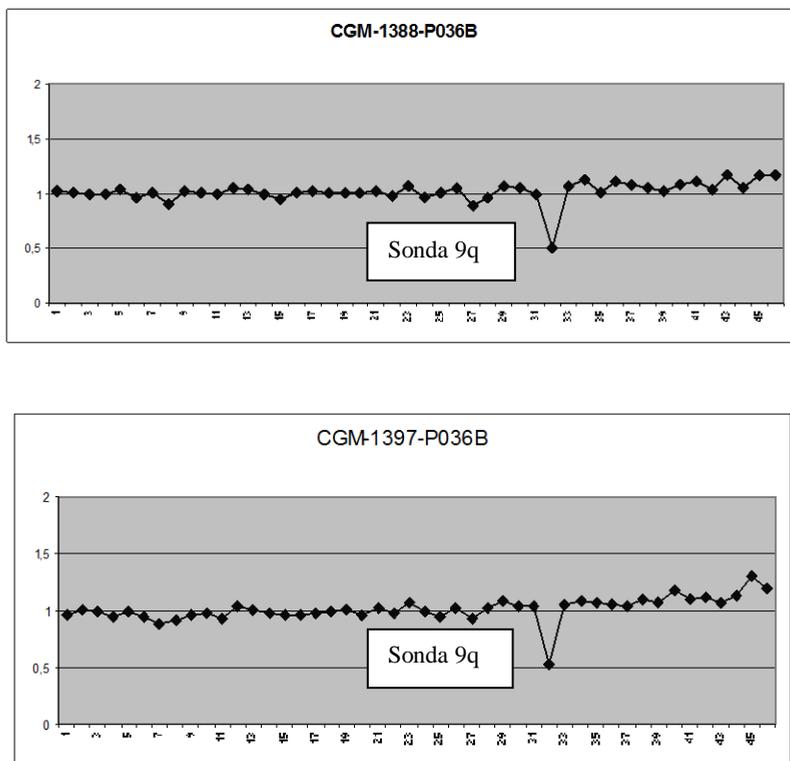


Figura 42: Representación gráfica del resultado de MLPA (*SALSA* P036B) en los pacientes CGM1388 y CGM1397. Se puede observar la disminución de dosis de la sonda correspondiente al brazo largo del cromosoma 9 en ambos pacientes.

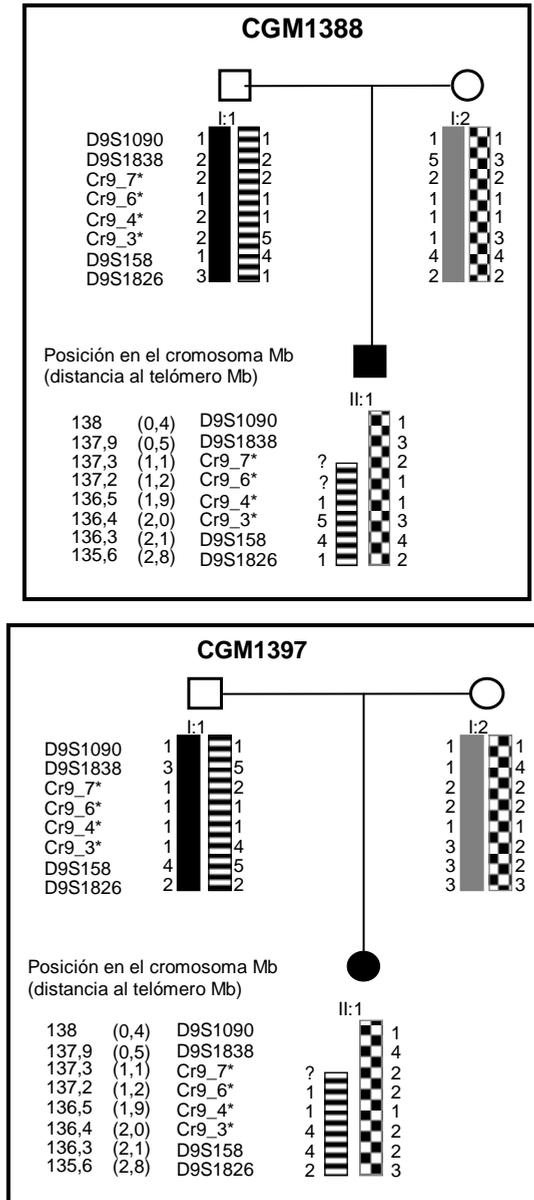


Figura 43: Caracterización de la alteración encontrada en los pacientes CGM1388 y CGM1397. Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados ordenados desde el más telomérico al más centromérico (hg 16).

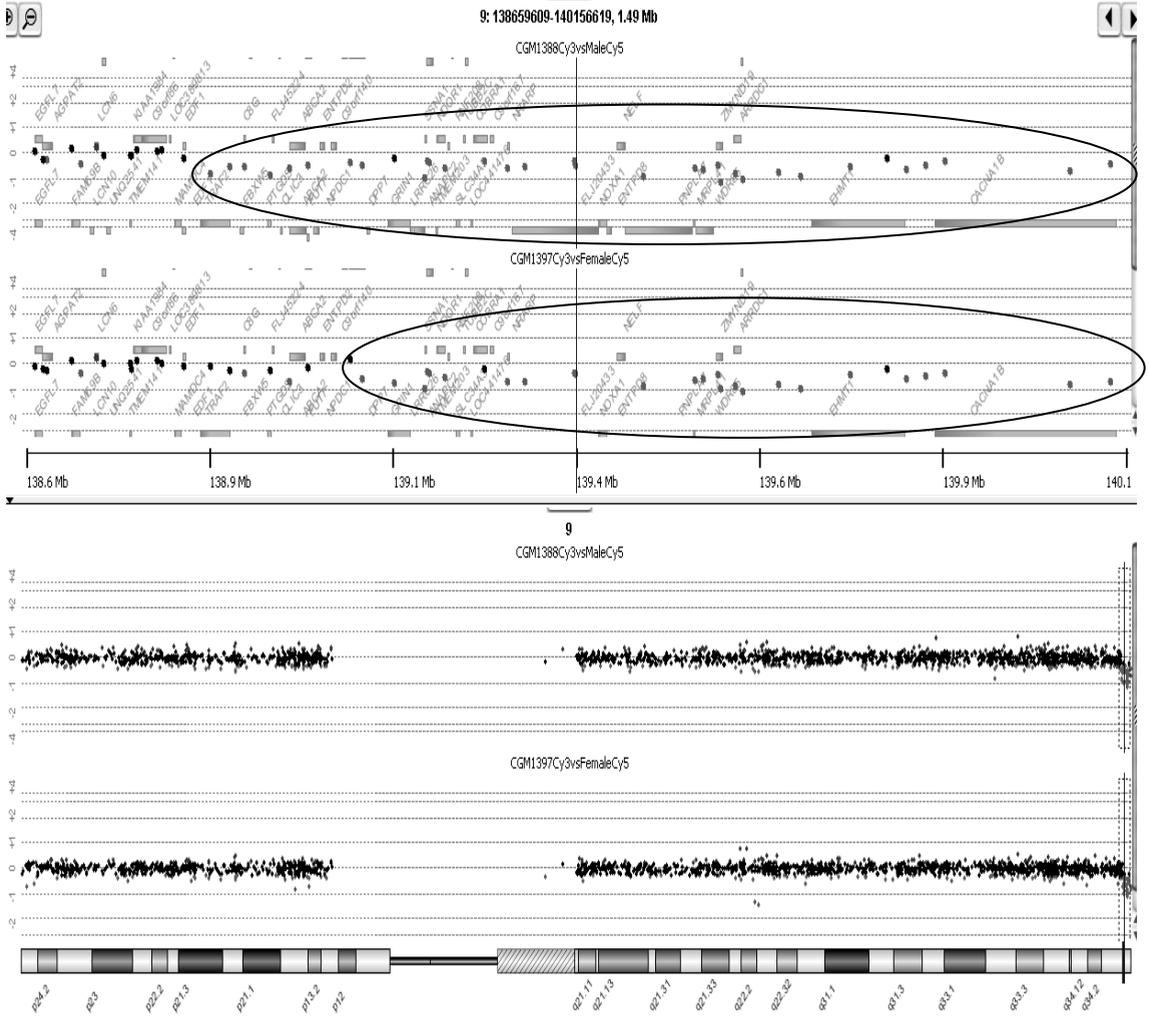


Figura 44: Representación gráfica del resultado del *CGH-array 44K* en el cromosoma 9 de los pacientes CGM1388 y CGM1397.

Se puede observar una disminución de dosis de los oligonucleótidos situados en la región más telomérica del brazo largo del cromosoma 9 en ambos pacientes. En la parte superior de la figura se observa la región delecionada en ambos pacientes de forma ampliada.

Resultados

X2686 ♂: El paciente presenta una duplicación de la región terminal del brazo largo del cromosoma 22 (22q) (figura 45). El estudio de MLPA en el ADN de los progenitores indicó que la duplicación había surgido *de novo* en el paciente. El análisis de segregación mediante marcadores microsatélites nos indicó que la duplicación era menor de 2,3 Mb, puesto que el marcador más telomérico D22S116 situado a 2,3 Mb del telómero del brazo largo presentaba dos alelos (figura 46). El estudio mediante *CGH-array* basado en BACs mostró una tendencia de los clones más teloméricos, pero solo un clon superaba el límite de 0,25 y no confirmaba la duplicación (figura 47). Posteriormente, se realizó un estudio de FISH con una sonda telomérica del cromosoma 22 (gen *ARSA*) en el paciente, para confirmar los hallazgos del MLPA, pero solo observamos dos señales y no apreciamos diferencias entre las dos señales. Así pues, diseñamos una sonda de MLPA muy cercana a la región estudiada por FISH (ver figura 54), y se incluyó en la *SALSA K3*. Se aplicó esta *SALSA* al ADN del paciente junto con el ADN de sus padres y se observó un aumento de dosis en el paciente pero no en sus padres (figura 48). Finalmente, mediante el estudio de *CGH-array 44K* se pudo confirmar la duplicación y delimitar su tamaño a 529 kb (figura 49 y figura 54).

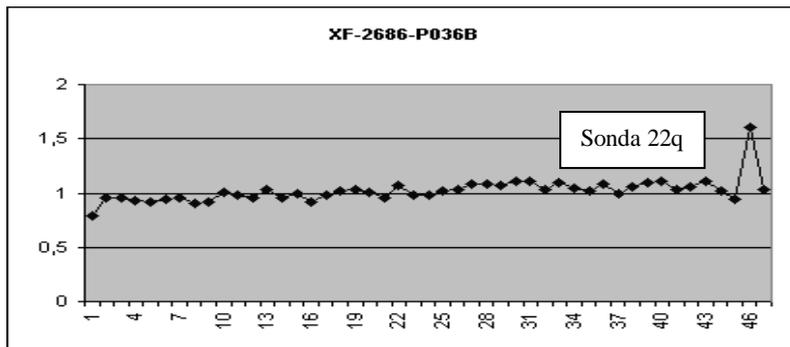


Figura 45: Representación gráfica del resultado de MLPA (*SALSA P036B*) en el paciente X2686.

Se puede observar un aumento de dosis de la sonda correspondiente al brazo largo del cromosoma 22.

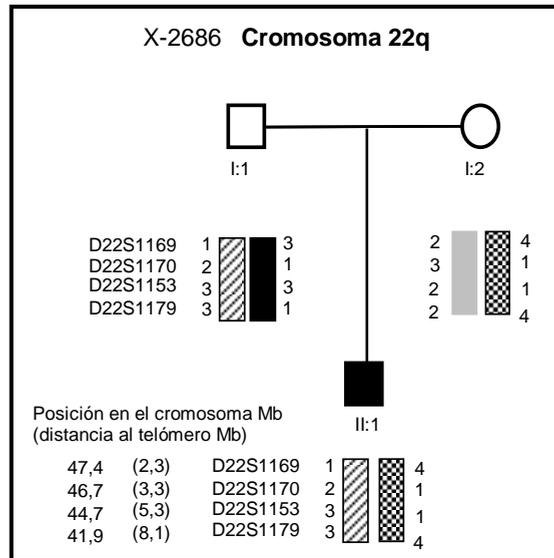


Figura 46: Caracterización de la alteración encontrada en el paciente X2686. Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados ordenados desde el más telomérico al más centromérico.

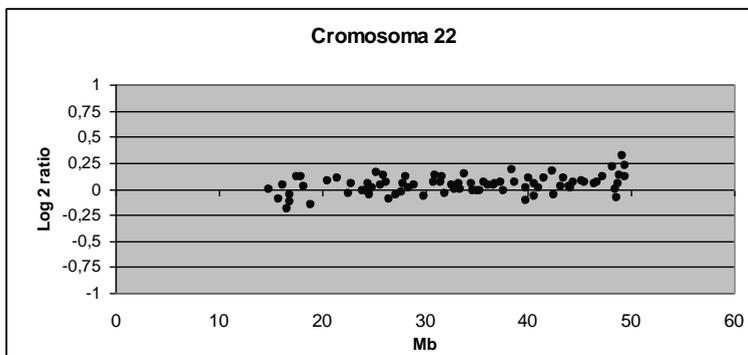


Figura 47: Representación gráfica del resultado del *CGH-array de BACs* en el cromosoma 22 del paciente X2686. Se puede observar que existe una tendencia de aumento de dosis de los *BACs* situados en la parte más telomérica del brazo largo del cromosoma 22.

Resultados

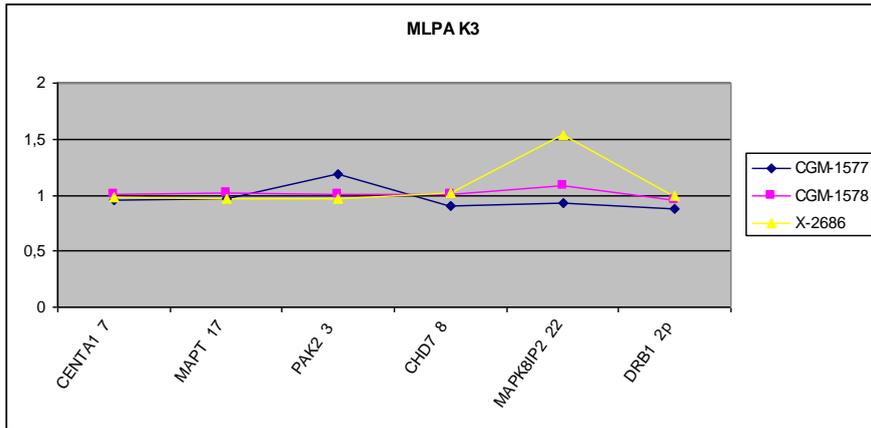


Figura 48: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta *SALSA K3*, que incluye la sonda ubicada en la región delecionada del paciente X2686. Se analizó el ADN del paciente y sus progenitores (CGM 1577, CGM1578). Se puede observar como la sonda del *MAPKBIP2*, situada en la región telomérica del cromosoma 22, se encuentra duplicada en el paciente.

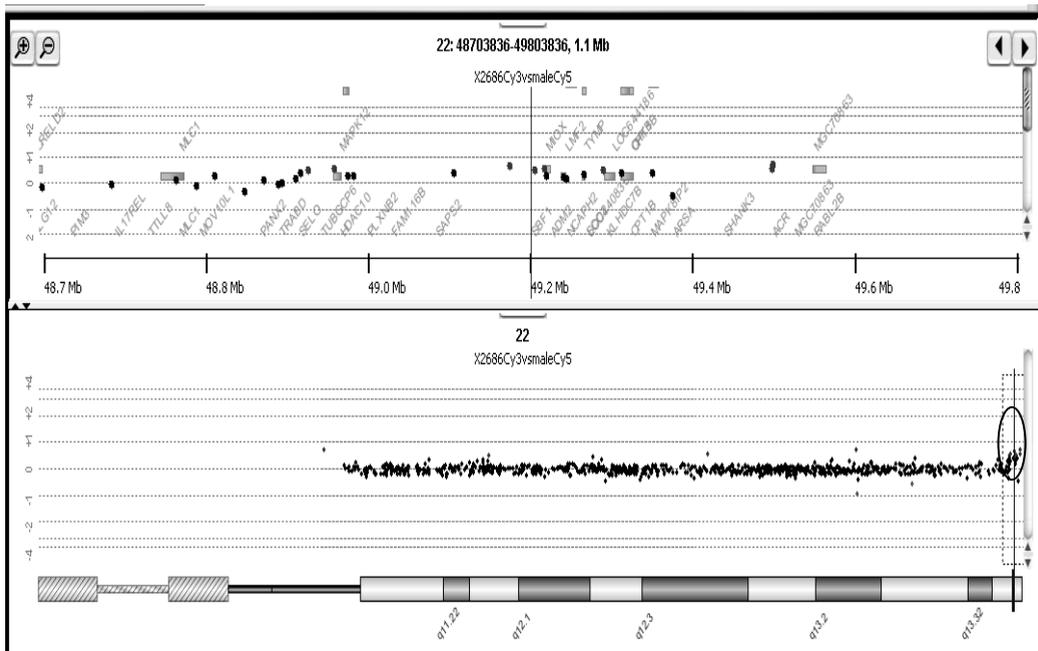


Figura 49: Representación gráfica del resultado del CGH-array 44K en el cromosoma 22 del paciente X2686. Se puede observar un aumento de dosis de los oligonucleótidos situados en la región más telomérica del brazo largo del cromosoma 22. En la parte superior de la figura se observa la región duplicada de forma ampliada.

XF1054 ♀: La paciente presenta una deleción del segmento final del brazo largo del cromosoma 22 (22q) (figura 50 parte superior). El estudio de MLPA en el ADN de los progenitores indicó que la deleción había surgido *de novo* en la paciente. El análisis de segregación mediante marcadores microsatélite nos indicó que la deleción era menor de 2,3 Mb puesto que el marcador más telomérico, D22S116 situado a 2,3 Mb del telómero del brazo largo, resultó heterocigoto. Mediante MLPA con sondas de diseño propio (SALSA K3), se detectó una disminución de dosis en esa región en la paciente pero no en sus padres (figura 50 parte inferior). Finalmente, el estudio mediante *CGH-array* de *BACs* mostró que la deleción presentaba un tamaño de 1,2 Mb (figura 51 y figura 54).

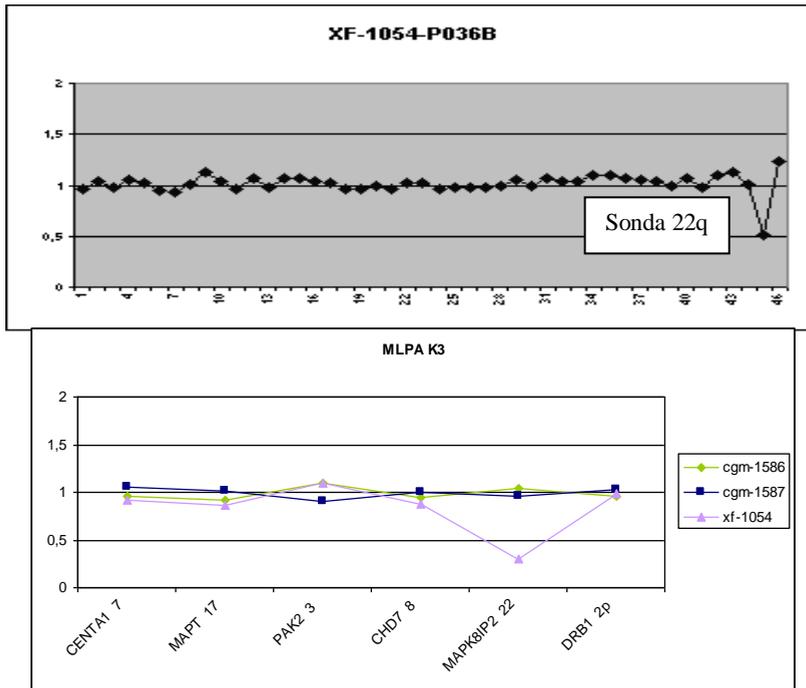


Figura 50: Representación gráfica de los resultados de MLPA en la paciente XF1054.

En la parte superior: representación gráfica del resultado de MLPA SALSA P036B. Se puede observar una disminución de dosis de la sonda correspondiente al brazo largo del cromosoma 22. En la parte inferior: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta SALSA K3 donde se encuentra la sonda ubicada en la región delecionada de la paciente. Se analizó el ADN de la paciente y sus progenitores (CGM1586, CGM1578). Se puede observar como la sonda para el gen *MAPKBIP2*, situada en la región telomérica del cromosoma 22, se encuentra delecionada en el paciente.

Resultados

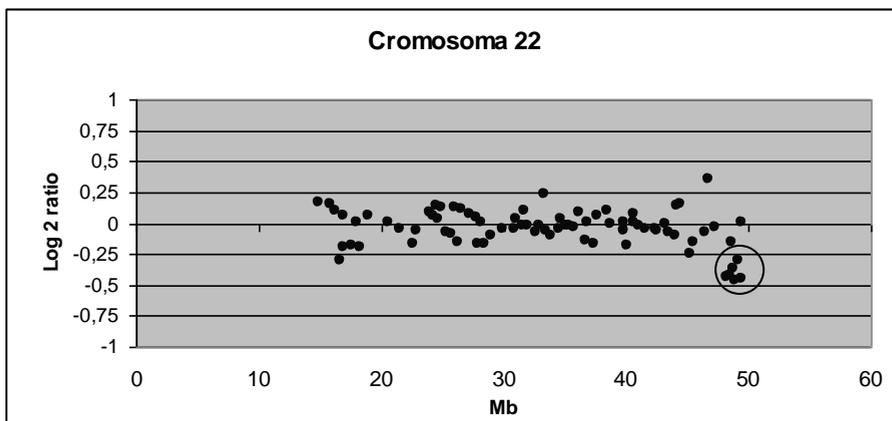
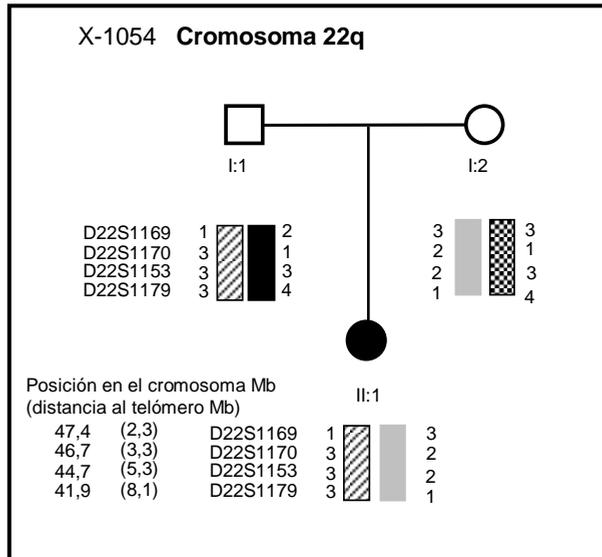


Figura 51: Resultado de los marcadores microsatélite y *CGH-array de BACs* en la paciente X1054.

En la parte superior: genotipos de los marcadores microsatélite empleados.

En la parte inferior: Representación gráfica del resultado del *CGH-array de BACs* en el cromosoma 22. Se puede observar una disminución de dosis de las sondas situadas en la región más telomérica del brazo largo del cromosoma 22.

CGM165 ♀: Mediante el MLPA P036B se observó una deleción en 22q (gen *RABL2B*). Se realizó el estudio a los progenitores mediante esta misma técnica y no presentaron ninguna alteración. Posteriormente, mediante el estudio de FISH con la sonda TUPLE 1 (gen *ARSA*), la paciente resultó ser normal. El estudio de los padres mediante FISH con la sonda Tel 22q (gen *ACR*) también resultó norma (figura 54). Se revisó el cariotipo que había sido realizado en otro centro. El resultado del cariotipo fue 46,XX,t(17;22)(q23;q13)[28]/46,XX[6], es decir, la paciente presentaba una translocación en mosaico, aparentemente equilibrada, que implicaba al brazo largo de los cromosomas 17 y 22. Se decidió realizar un *CGH-array* para aclarar estos resultados. El *CGH-array* de oligonucleótidos, nos mostró una duplicación en el cromosoma 8 de siete genes (143,856-143,990 Mb hg18) heredada de su madre, y una deleción de dos oligonucleótidos en el cromosoma 22q (49,524-49,525 Mb hg18) (figura 53). En el cromosoma 17 no se encontró ninguna variante de dosis. La variante de dosis del cromosoma 22q afecta aparentemente, solo al gen *ACR*, y en esa región se encuentran varias CNV descritas en población general. Posteriormente se realizó un análisis de MLPA con la *SALSA P245A2* que contiene sondas para el gen *SHANK3*, principal responsable del síndrome de Phelan-McDermid, que cursa con DI. El resultado nos indicó que se encontraba delecionado, probablemente en mosaico (Figura 52).

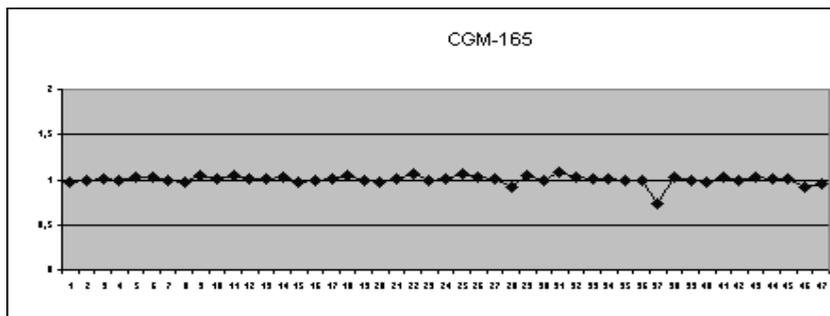


Figura 52: Representación gráfica del resultado de MLPA (SALSA P245) en la paciente CGM165.

Se puede observar una disminución de dosis de la sonda correspondiente al gen *SHANK3*, probablemente en mosaico (valor 0,7).

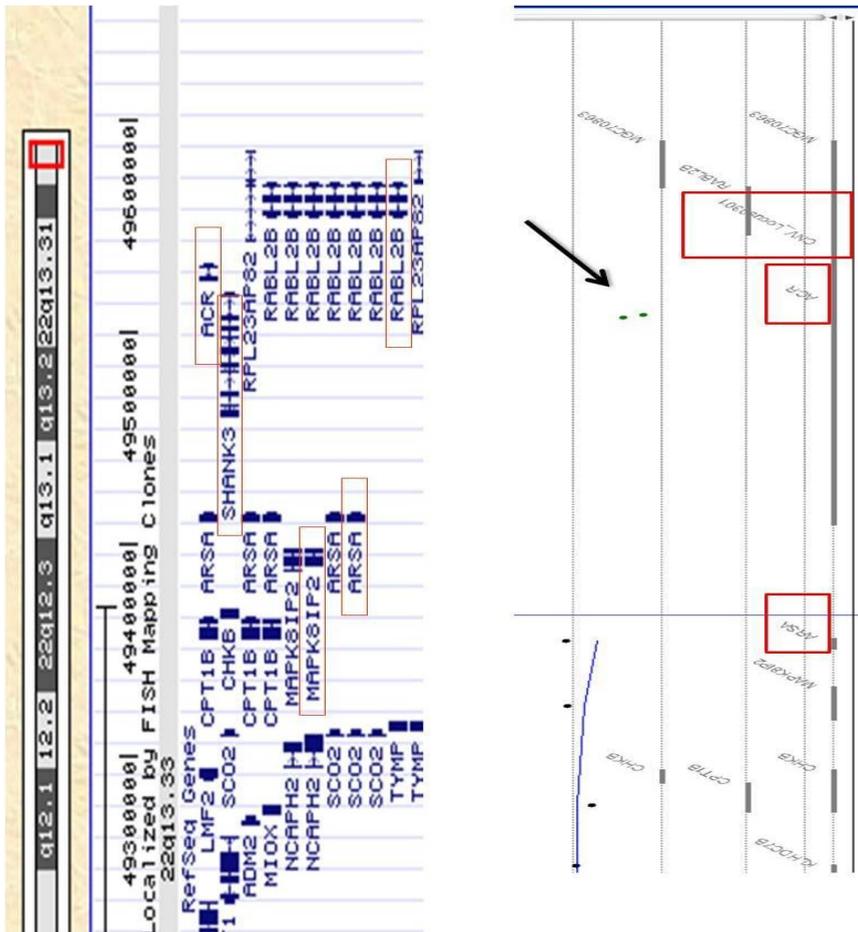


Figura 53: Representación gráfica del resultado del cromosoma 22q del *CGH-array* de oligonucleótidos del paciente CGM165. Enmarcados mediante cuadros, se encuentran los genes implicados en esta alteración. Podemos observar que en este array el gen *SHANK3* no se encuentra representado por ningún oligonucleótido.

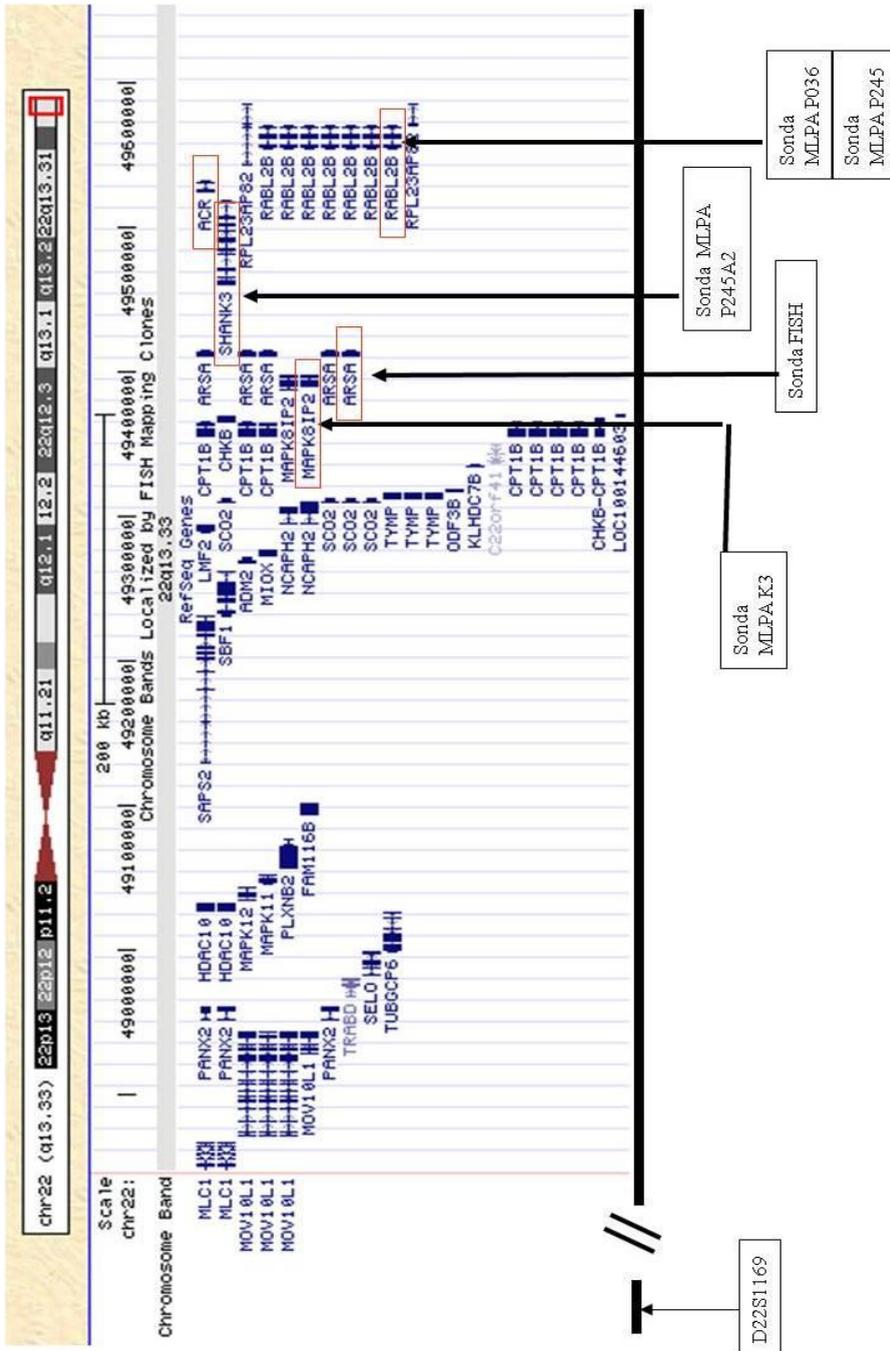


Figura 54: Representación gráfica de la posición de las diferentes sondas utilizadas con cada una de las técnicas, para el estudio de la región 22q13 en los tres pacientes con alteraciones en esta región.

Resultados

2.4.3. TIPO III: Reordenamientos complejos en una misma región cromosómica

Los pacientes que presentan este tipo de alteraciones son dos.

CGM1313 ♂: El paciente presenta una deleción del segmento final del brazo corto del cromosoma 8 (8p) (figura 55). El análisis de segregación mediante marcadores microsatélite nos indicó que la alteración apareció *de novo* en el paciente y era de origen materno. Además, el marcador D8S552 empleado para caracterizar esta deleción, mostró un patrón trialélico con duplicación del alelo materno. Este resultado sugería que podía haber un reordenamiento complejo (figura 56). El resultado de la técnica *CGH* mediante el *array* basado en *BACs* en este paciente mostró que presentaba una deleción terminal de 6,7 Mb y una duplicación próxima de 23 Mb (figura 57).

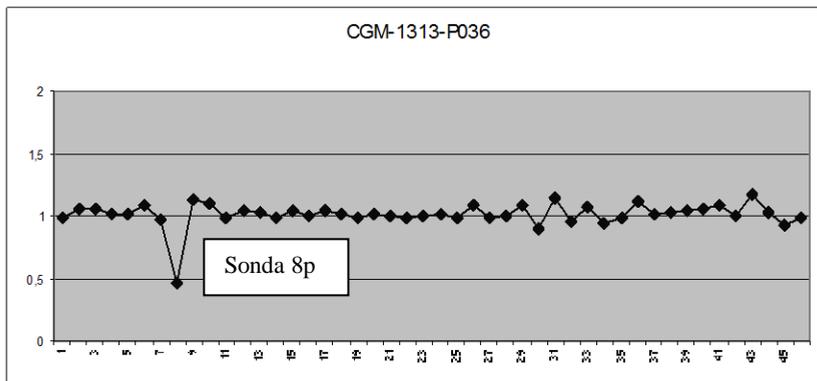


Figura 55: Representación gráfica del resultado de MLPA (SALSA P036) en el paciente CGM1313.

Se puede observar una disminución de dosis de la sonda correspondiente al brazo corto del cromosoma 8.

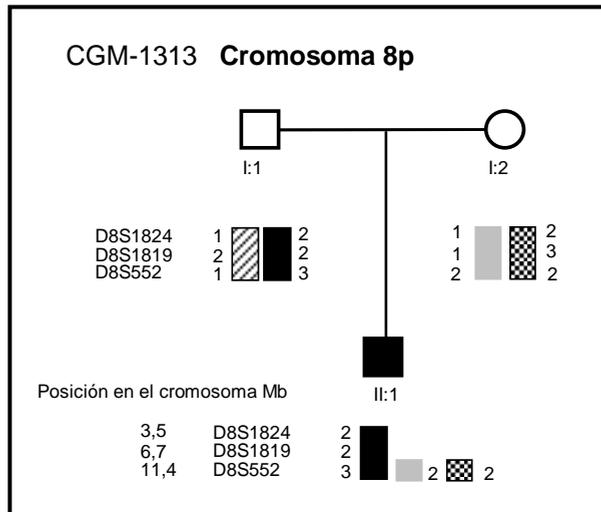


Figura 56: Caracterización de la alteración encontrada en el paciente CGM1313 mediante marcadores microsatélite.

Se muestran todos los marcadores microsatélite utilizados, ordenados desde el más telomérico al más centromérico.

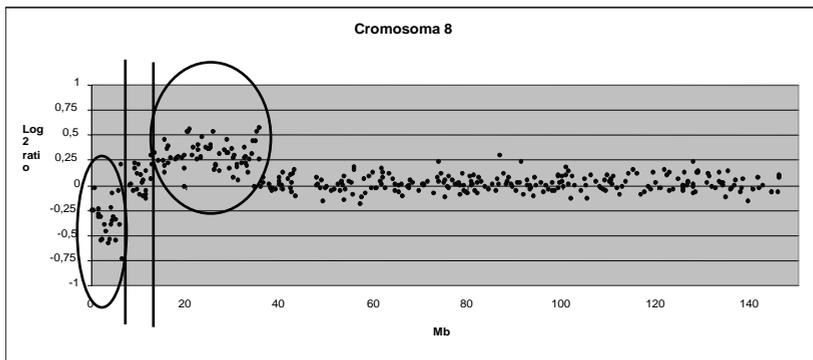


Figura 57: Representación gráfica del resultado del *CGH-array de BACs* en el cromosoma 8 del paciente CGM1313.

Se puede observar una disminución de dosis de aquellas sondas situadas en la región más telomérica del brazo corto, seguido de una región con dosis normal y adyacente a ella, un aumento de dosis de algunos clones.

Resultados

CGM1525 ♂: El paciente presenta una delección del segmento final del brazo corto del cromosoma 4 (4p) (figura 58). El estudio mediante MLPA en el ADN de los progenitores indicó que la delección había surgido *de novo* en el paciente. El resultado de la técnica *CGH-array* 44K en este paciente mostró que presentaba una delección terminal de 1,3 Mb y una duplicación adyacente a la delección de 1,1 Mb (figura 59).

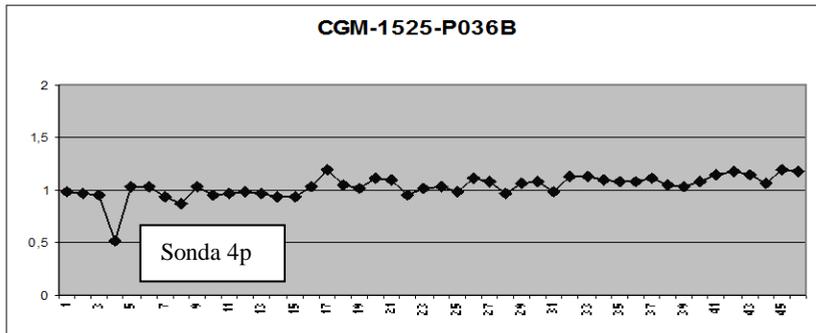


Figura 58: Representación gráfica del resultado de MLPA (*SALSA* P036B) en el paciente CGM1525.

Se puede observar una disminución de dosis de la sonda correspondiente al brazo corto del cromosoma 4.

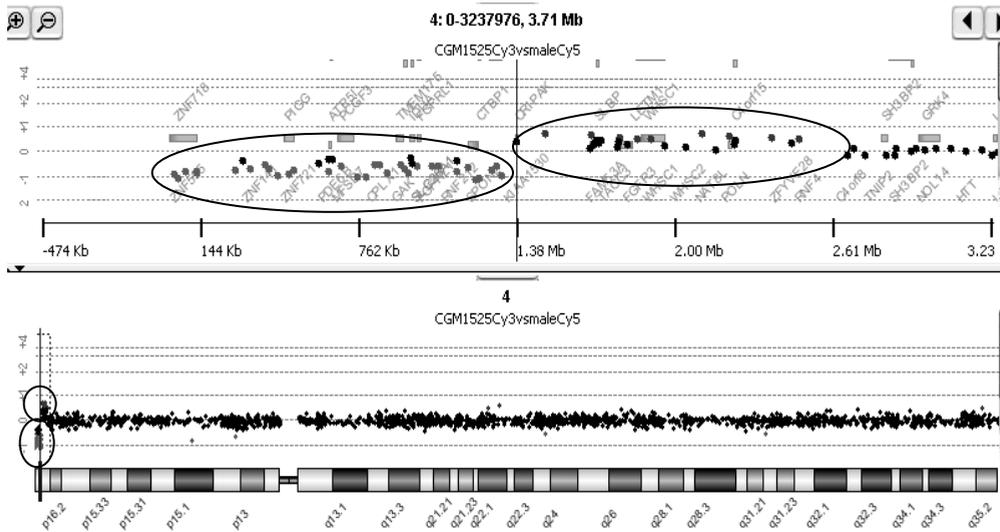


Figura 59: Representación gráfica del resultado del *CGH-array* 44K en el cromosoma 4 del paciente CGM1525.

Se puede observar una disminución de dosis de las sondas situadas en la región más telomérica del brazo corto del cromosoma 4 seguido de un aumento de dosis de las sondas adyacentes. En la parte superior de la figura se puede observar de forma más ampliada la región alterada.

2.5 Interpretación de los resultados según su implicación patológica

Realizados todos estos estudios experimentales, para establecer el carácter patológico de estas variantes se evaluaron caso a caso los siguientes criterios descritos en el apartado 6.5 de material y métodos:

- La herencia
- Casos descritos
- Los genes localizados en la región
- El tamaño

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura de casos publicados que presentaran la misma o similares variantes de dosis, y se revisó la presencia de genes patológicos en las regiones alteradas.

Por un lado, todos los pacientes que presentaban una duplicación y una deleción en diferentes regiones (translocaciones subteloméricas o alteraciones de tipo I), a pesar de proceder mayoritariamente de una translocación equilibrada en un progenitor, en todos los casos las pérdidas y ganancias de material genético fue una condición *de novo*, claramente indicativa de ser patológicas.

Además, en algunos casos el desequilibrio de pérdida implicaba a regiones asociadas a síndromes concretos como:

- Síndrome de Cri du Chat: caso CGM1387 deleción 5p
- Síndrome de Wolf-Hirschhorn: caso CGM897 deleción 4p
- Síndrome de Miller-Dieker: caso X3361 deleción 17p

En otros casos, el desequilibrio de estas regiones no se asociaba con un síndrome concreto, pero dichos desequilibrios presentaban una gran cantidad de genes implicados, como es el caso CGM245 que presentaba 23 genes delecionados y 79 genes duplicados o el caso CGM1819 que presentaba 127 genes duplicados y 250 genes delecionados.

Con respecto a las variantes de dosis que presentaba el paciente XF2463, estas habían surgido *de novo* en el paciente y aunque no existía ningún otro caso descrito con las mismas alteraciones, sí se habían descrito pacientes con retraso del neurodesarrollo y alteraciones similares a las de nuestro paciente, que implicaban a un telómero u otro del cromosoma 2.

Por otra parte, las duplicaciones o las deleciones puras recogidas en los casos tipo II y los reordenamientos complejos en una misma región recogidos en los casos tipo III, habían surgido igualmente *de novo* en los pacientes y ninguna de estas variantes estaba descrita en individuos control.

Algunas de estas variantes estaban asociadas a síndromes concretos como es el Síndrome de Shwartz-Jampel (deleción 1p) o el Síndrome de Phelan-

Resultados

McDermid (delección 22q13). Otras se habían detectado en individuos con una patología similar a nuestros pacientes, como es el caso de la duplicación 22q13 o la delección 9q (las cuales se han asociado posteriormente con síndromes concretos), al igual que las variantes catalogadas como tipo III, las cuales también se habían descrito en individuos con discapacidad intelectual y anomalías congénitas, siendo conocidas con el nombre de inversión-duplicación-delección (invdupdel).

Por último, la variante detectada en el paciente CGM991, no había sido descrita previamente, pero algunos de los más de 200 genes localizados en esta duplicación están relacionados con funciones neuronales como es el caso de *CPE6*, *NEDD8* o *LOC401744*.

Por todo ello, estos reordenamientos detectados mediante MLPA con las dos *SALSAs*, se consideraron todos como patológicos.

3. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS MEDIANTE CGH BASADO EN ARRAY DE BACs

3.1 Puesta a punto de la técnica

Los *arrays* utilizados en esta fase del trabajo fueron *arrays* genómicos de clones BACs no comerciales (ver material y métodos 3.7).

En primer lugar, para poner a punto la técnica y comprobar la sensibilidad del *array*, se empleó ADN de 4 pacientes con alteraciones previamente conocidas y caracterizadas mediante análisis de segregación de marcadores microsatélite, a modo de controles positivos (tabla 8).

Tabla 8: Controles positivos para el *array de BACs*: relación de variantes localizadas en diferentes cromosomas, caracterizadas y acotadas mediante marcadores microsatélite.

	Diagnóstico	Alteraciones	Tamaño alteraciones Mb
CGM1054	46,XX,der(4)t(3;4)(qter;qter)	Duplicación 3qter	7,2
		Delección 4qter	1,2
CGM1209	46,XX,add(10q).ish der(10)t(5;10)(p21;q26)	Duplicación 5pter	22,3
		Delección 10qter	5,8
CGM1313	invdupdel (8pter)	Delección 8pter	6,7
		Duplicación 8p24	11,4
CGM991	Duplicación subcentromérica 14q	Duplicación 14q11	5,6

El ADN de referencia que se utilizó para co-hibridar con nuestros ADNs problema (pacientes y controles positivos) fue una mezcla de ADN genómico de individuos sanos en cantidades equitativas. Se preparó una mezcla con ADN de 10 varones y otra con ADN de 10 mujeres.

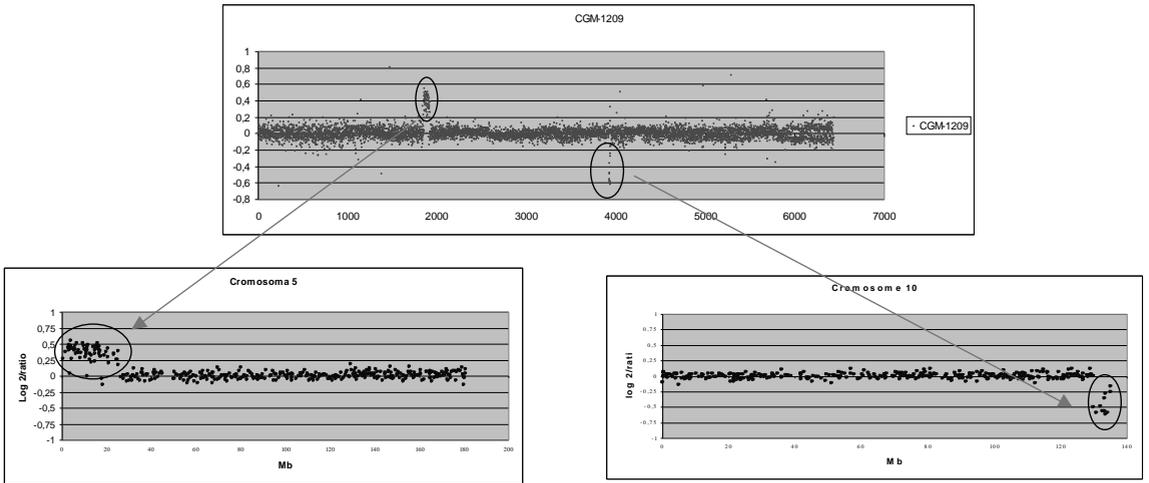
La hibridación de los 4 *arrays* con ADN de controles positivos permitió detectar las variantes de dosis tanto de duplicación como de delección ya conocidas (figura 60). Con los resultados obtenidos y tras la normalización de los datos, se determinaron los valores a partir de los cuales se podía considerar que un clon presentaba una dosis anómala. Se estableció un punto de corte de $\pm 0,25$ como límite para considerar una dosis normal.

Resultados

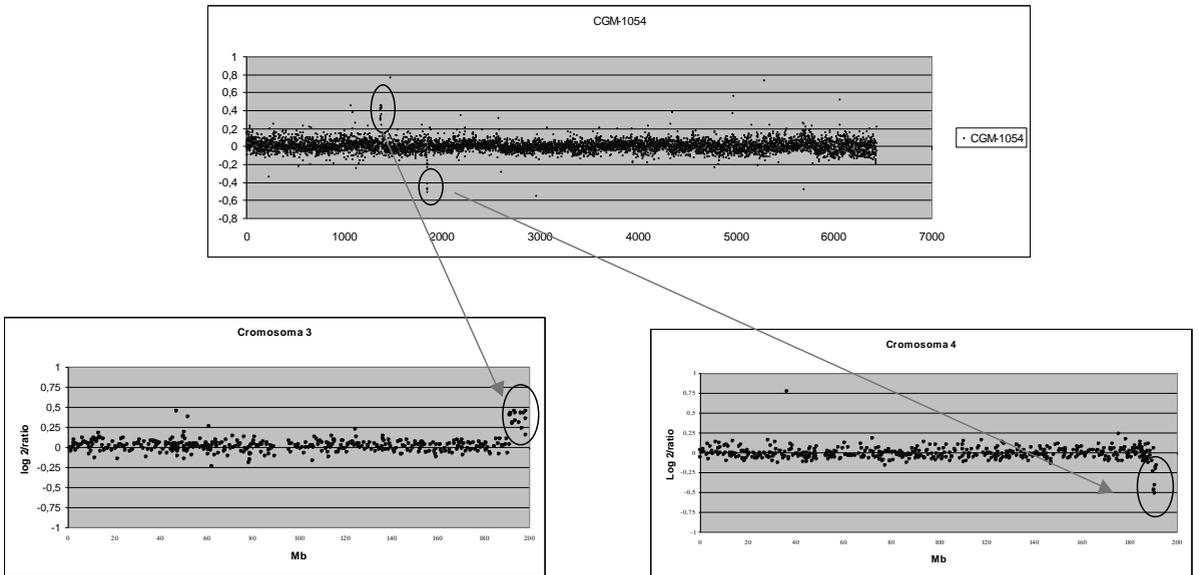
Figura 60: Imágenes de los *arrays* de BACs de los cuatro controles con alteraciones conocidas y caracterizadas.

En la parte superior de cada imagen está representado el *array* de todo el genoma. En la parte inferior de cada imagen se ha representado cada uno de los cromosomas alterados.

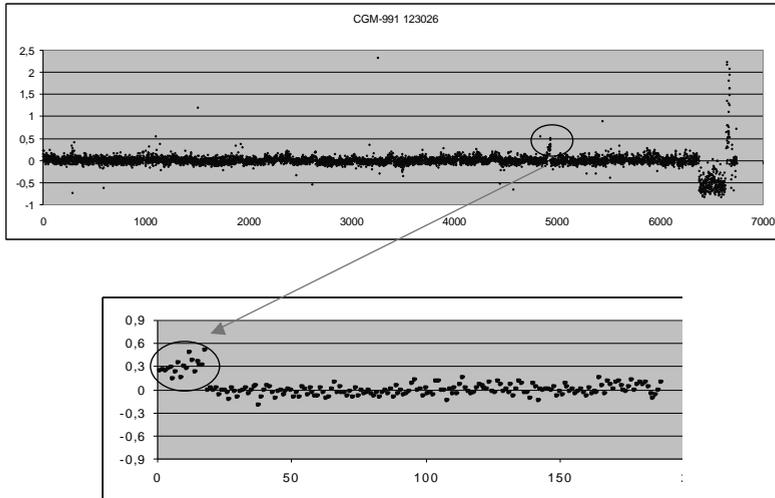
Translocación desequilibrada: 46,XX,add(10q).ish der(10)t(5;10)(p21;q26)



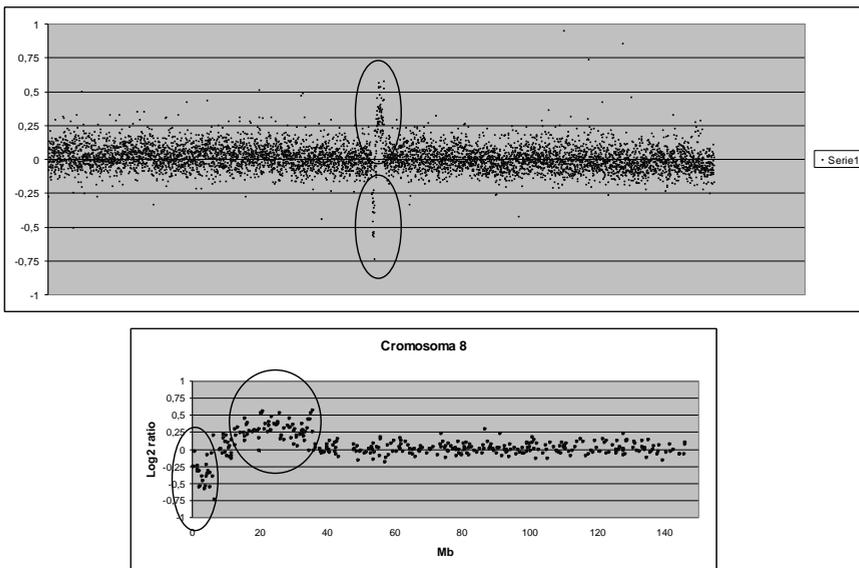
Translocación subtelomérica: 46,XX,der(4)t(3;4)(qter;qter)



Duplicación 14q11.2



Dupdel 8pter



Resultados

3.2 Reordenamientos detectados

Tras haber realizado esta validación, se estudiaron los primeros 46 pacientes a los que **no** se les había detectado variantes de dosis patológicas por medio del rastreo subtelo mérico (tanto por la técnica del FISH como por MLPA).

A la hora de analizar los resultados obtenidos en los *arrays*, dada la disposición de los valores observada y la existencia de muchos clones aislados que sobrepasaban el límite establecido de (+/- 0,25), se decidió no tener en cuenta las alteraciones de clones aislados y solo se consideró una variante de dosis cuando dos o más clones consecutivos estaban alterados. En este caso la resolución era de 0,5-1 Mb.

A lo largo de este trabajo, la forma de anotar el tamaño de las alteraciones encontradas fue registrar siempre el tamaño mínimo, es decir, desde la primera sonda alterada (posición inicial) hasta la última sonda alterada (posición final), por tanto, hay que tener en cuenta que el tamaño real de las alteraciones puede ser ligeramente mayor.

Con la aplicación de este criterio, en la serie de 46 pacientes se observaron:

- 20 pacientes sin ningún cambio de dosis en dos clones consecutivos.
- 26 pacientes con al menos un cambio de dosis en dos o más clones consecutivos. De estos 26 pacientes, 14 presentaban una sola variante de dosis, 8 presentaban dos variantes de dosis y 4 presentaban tres variantes de dosis.

En total se detectaron 32 variantes de dosis diferentes.

Para la interpretación de estas variantes y determinar su posible implicación en la patología de los pacientes, seguimos los criterios establecidos en el apartado 6.5 de Material y Métodos.

Después de aplicar estos criterios para interpretar los resultados obtenidos se pudieron diferenciar tres grupos de alteraciones:

- ⇒ 15 variantes de dosis polimórficas: variantes del número de copias (CNVs) descritos por otros autores en población control (tabla 9).
- ⇒ 13 artefactos técnicos: variantes de dosis consideradas artefactos técnicos, puesto que no se pudieron confirmar mediante otro método alternativo como MLPA a la carta (tabla 10).
- ⇒ 4 variantes de dosis patológicas: dos de ellas descritas previamente por otros autores y dos no descritas (tabla 11).

3.2.1 Variantes de dosis polimórficas

Se encontraron 15 variantes de dosis pertenecientes a este grupo (ver tabla 9). De todas ellas cabe destacar la CNV de duplicación/delección de la región 17q21.31 que se encontró en 10 de los 46 casos estudiados. En 9 casos se observó una disminución de dosis y en un caso se observó un aumento de dosis en la región. Esta CNV fue descrita por Redon detectandola en 207 de 270 controles sanos estudiados (Redon et al., 2006).

El resto de variantes se detectaron en un único paciente a excepción de la variante de dosis observada en el cromosoma 15q11, que se encontraba presente en dos individuos. En uno de ellos se observó la variante de delección y en el otro la de duplicación.

Todas estas variantes fueron consideradas polimórficas puesto que se habían descrito previamente como tales en población control.

Tabla 9: Variantes de dosis polimórficas descritas en individuos sanos.

Región cromosómica	Alteración	Posición hg18	Tamaño (kb)	Nº de casos (Código)	Nº de clones	Referencias
2p25	Dup	393139	277,8	1 (X1578)	2	Redon et al., 2006
5q13	Dup	69336346	936,5	1 (CGM1207)	3	Sebat et al., 2004; Redon et al., 2006
6q11.1	Dup	62539454	203,8	1 (CGM784)	2	Iafrate et al., 2004
6q27	Del	170544579	259,6	1 (CGM962)	2	Redon et al., 2006
7p22.3	Del	1288978	296,7	1(CGM962)	2	Redon et al., 2006; Wong et al., 2007
7q36.3	Dup	157444599	50,2	1 (XF2686)	2	Redon et al., 2006
8p23.1	Del	7242561	861,9	1 (XF977)	2	Redon et al., 2006
9p12	Dup	43419801	1073	1(CGM1349)	2	Sebat et al., 2004
10q11	Del	41847701	933,8	1 (CGM1291)	2	Redon et al., 2006
12q24	Dup	128548338	600,1	1 (CGM1317)	2	Redon et al., 2006
14q32.3	Dup	105561009	603,8	1 (XF1054)	4	Sebat et al., 2004
15q11	Dup/Del	18973764	910,9	2 (XF1054 ; CGM1136)	2	Redon et al., 2006
16p11.2	Del	33095854	634,1	1 (CGM912)	2	Redon et al., 2006
17q21	Dup/del	41503841	662,2	10**	3	Redon et al., 2006
20q11	Del	30020656	409,1	1 (CGM847)	2	Wong et al., 2007

10**: CGM846; CGM1291; CGM1236; CGM1223; CGM1349; CGM784; XF1919; CGM1202; CGM1212; X2686

Del: delección

Dup: duplicación

Resultados

3.2.2 Artefactos técnicos

Se encontraron 13 CNVs que no se pudieron confirmar por métodos alternativos, por lo que se consideraron artefactos técnicos (ver tabla 10).

La forma de confirmar estas CNVs fue mediante la técnica de MLPA a la carta. Para el diseño de las sondas de estos MLPAs se partió de las secuencias de genes seleccionados por los siguientes criterios:

1. Genes que no estuvieran incluidos en CNVs descritas.
2. Que se expresasen preferentemente en sistema nervioso.
3. Que pudieran ser candidatos funcionales para la discapacidad intelectual.

Las sondas se diseñaron tal y como se menciona en el apartado 3.5.3 de material y métodos. Los resultados de estos MLPAs, una vez analizados, se han representado de forma gráfica en la figura 61, donde no se observa ningún cambio de dosis.

Este grupo de variantes, al no confirmarse mediante una técnica alternativa fueron consideradas artefactos técnicos.

Tabla 10: Variantes de dosis no confirmadas con técnicas alternativas, considerados posibles artefactos de la técnica.

Región cromosómica	Alteración	Posición inicio (hg18)	Tamaño (kb)	Casos	Nº de clones	Sonda utilizada para confirmar (Gen)	MLPA a la carta
1p21	Dup	103390633	919,928	CGM872	2	COL11A1 exón_56	K4
4q24	Dup	101786064	549,023	CGM872	2	PPP3CA exón_14	K5
4q34.1	Del	174941417	152,243	CGM493	2	FBXO8 exón_1	K4
6p21.2	Del	39360266	1084,195	CGM1330	3	DAAM2 exón_7	K4
6p21.2	Dup	40603853	402,580	CGM1136	2	LRFN2 exón_1	K4
7p22.3	Del	806880	778,807	CGM962	4	CENTA1 exón_9	K3
7q11.22	Del	68888422	73,629	CGM1212	2	AUTS2 exón_2	K4
9q33.1	Dup	120979373	257,813	CGM493	2	TLR4 exón_1	K5
10q11.1	Dup	31808969	897,573	CGM1308	3	ARHGAP12 exón_1	K4
13q12	Del	27081984	740,848	XF1919	2	RASL11A exón_1	K5
19p13.3	Dup	999063	599,638	CGM1291	2	MBD3 exón_5	K5
20q13.33	Del	30020656	0,17	CGM1236	2	ZBTB46 exón_4	K5
Xp22.12	Dup	19637581	154,521	CGM227	2	CNKS2 exón_2	K5

Del: delección
Dup: duplicación

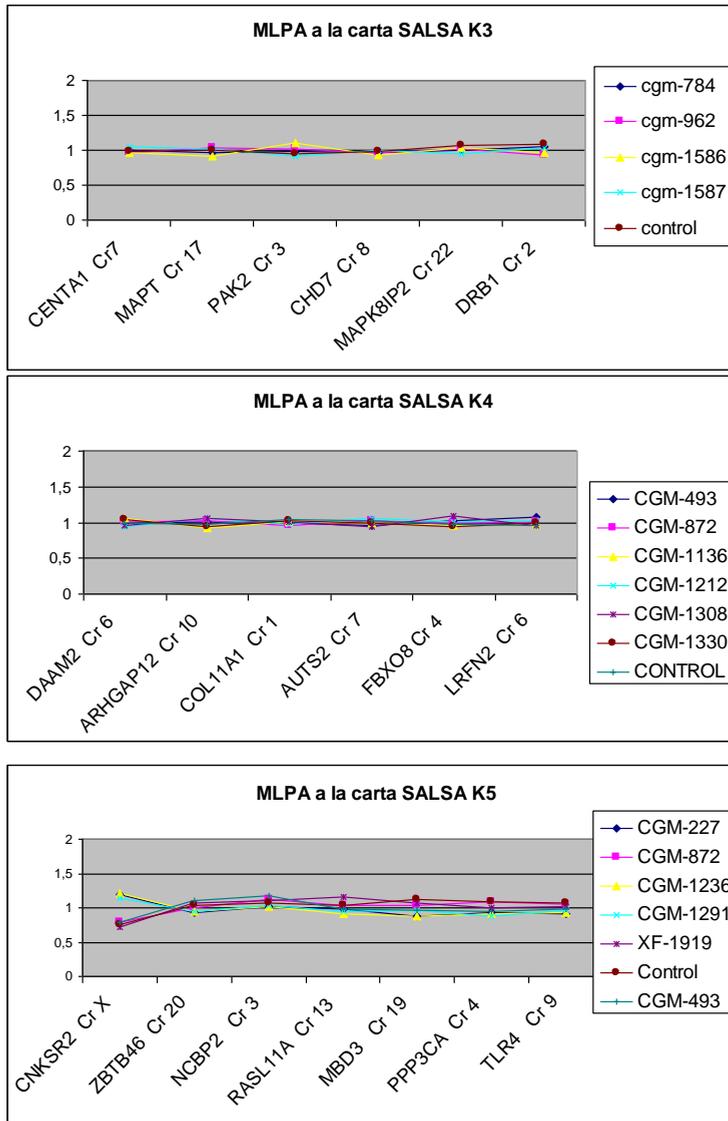


Figura 61: Representación gráfica de los resultados del MLPA a la carta utilizado para confirmar las alteraciones detectadas por la *CGH-array* de *BACs* no descritas previamente en la literatura.

Podemos observar como todos los valores obtenidos con estas sondas en todos los pacientes tienen un valor alrededor de uno (dosis normal), a excepción de la sonda ubicada en el cromosoma X. En este análisis no se tuvo en cuenta que todos los individuos analizados fueran del mismo sexo, por lo que dicha sonda sirvió de control interno de la sensibilidad a dosis de la técnica.

Resultados

3.2.3 Variantes de dosis patológicas

Se encontraron cuatro variantes de dosis que fueron consideradas patológicas en cuatro pacientes diferentes (ver tabla 11)

Tabla 11: Variantes de dosis confirmadas por otras metodologías y consideradas patológicas.

Región Crom.	Alteración	Posición inicio (hg18)	Tamaño (kb)	Caso	Nº de clones	Técnicas confirm.	Genes	Herencia	Origen parental
3q29	Del	197450650	1174,004	CGM784	5	MM MLPA	<i>PAK2</i> <i>NCBP2</i>	Mat.	Materna
2q31	Del	176751760	3277,723	CGM1349	8	MLPA FISH	<i>DRB1</i> <i>ZNF533</i>	<i>De novo</i>	Paterna
8q21	Dup	59648819	2997,328	XF2019	9	MM MLPA	<i>CHD7</i>	<i>De novo</i>	Paterna
7q11.3	Dup	72122934	1662,034	CGM1385	3	MM MLPA FISH	<i>CYLN2</i> <i>FZDP</i> <i>STX1A</i> <i>ELN</i> <i>LIMK1</i> <i>RFC2</i>	<i>De novo</i>	

Del: delección

Dup: duplicación

MM: marcadores microsatélites.

Mat.: Materno

Caso CGM784: El *CGH-array* muestra una deleción de al menos 1,17 Mb en la región 3q29 (figura 62), en la cual están localizados 17 genes (197450650-198624654 hg18). Esta alteración fue confirmada con MLPA a la carta con una sonda situada en el gen *NCBP2* y por medio de la técnica FISH con la sonda subtelomérica 3q (*ToTelVysion TM Multi-Color, VYSIS, Downers Grove, Illinois, USA*). Además, mediante el MLPA a la carta observamos que esta alteración la había heredado de su madre, la cual presentaba una inteligencia limitada (figura 63).

La deleción 3q29 ya había sido descrita como variante de dosis patológica por otros autores con anterioridad (Willatt et al., 2005). Por ello, esta alteración fue considerada como patológica.

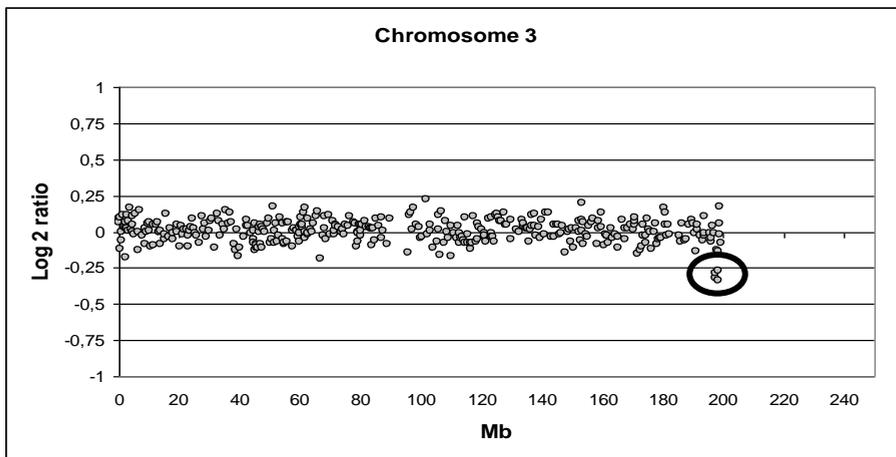


Figura 62: Representación gráfica del resultado del *CGH-array de BACs* en el cromosoma 3 de la paciente CGM784.

Se puede observar una disminución de dosis de clones situados en la parte subtelomérica del brazo largo no terminal.

Resultados

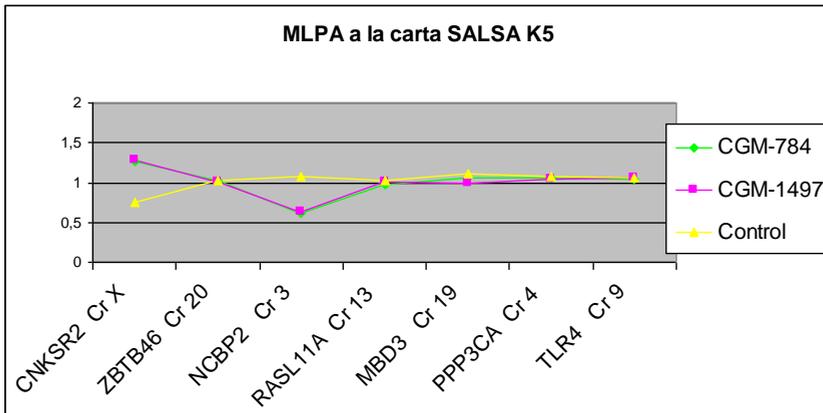


Figura 63: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta en el cual se encuentra la sonda *NCBP2ex_3* ubicada en la región delecionada en la paciente CGM 784.

Se analizó la paciente, su madre (CGM 1497) y un control masculino. Se puede observar como la sonda de 3q29 (*NCBP2ex_3*) se encuentra delecionada tanto en la paciente como en su madre.

Caso CGM1349♂: Mediante el *CGH-array*, se detectó una deleción de 8 sondas consecutivas en 2q31.2 de al menos 3,27 Mb (176751760-180029483 hg18) donde se localizan 16 genes (figura 64). Este resultado fue confirmado por MLPA a la carta con una sonda en el gen *DRB1* y por medio de los siguientes marcadores microsatélite: D2S2314, D2S148, D2S324, D2S2261. El resultado del MLPA del paciente y de sus padres, mostró que la alteración había surgido *de novo* en el paciente (figura 65). Además, por medio de los marcadores microsatélite que fueron informativos (D2S2314, D2S2261) pudimos averiguar que el alelo delecionado era el paterno y pudimos delimitar la región delecionada en 3,94 Mb, puesto que el marcador microsatélite D2S2261 se situaba en la posición 181,2 Mb.

Debido a que la alteración surgió *de novo* en el paciente, a la no existencia de variantes polimórficas descritas en la región, al solapamiento de esta región con otras deleciones descritas que asocian clínica y a la posible implicación en afectación neuronal de algunos genes como es el *ZNF533*, esta alteración fue considerada patológica.

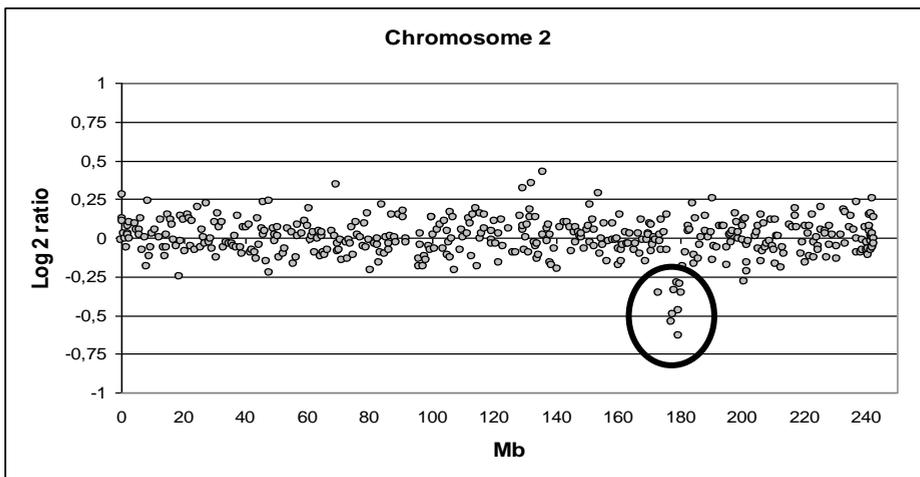


Figura 64: Representación gráfica del resultado del *CGH-array de BACs* en el cromosoma 2 del paciente CGM1349. Se puede observar una disminución de dosis de 8 clones.

Resultados

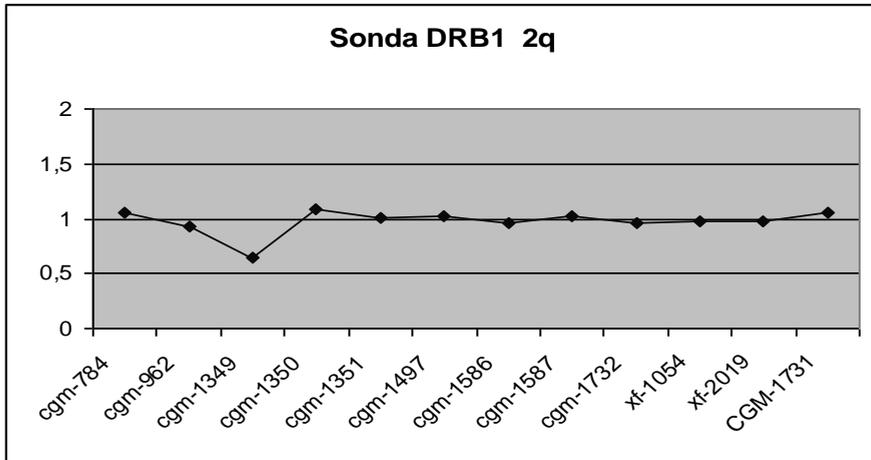


Figura 65: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta con la sonda DRB1 en diversos pacientes.

Se representan los valores obtenidos para la sonda *DRB1* exón1, localizada en la región 2q31, en una serie de casos entre los que se encuentran los progenitores del paciente (CGM1350 y CGM1351). Se puede observar que el único caso que presenta disminución de dosis es el paciente (CGM1349).

Caso XF2019♂: El *CGH-array* mostró una duplicación de 7 clones consecutivos en 8q12 de al menos 2,99 Mb (59648819-62646147 hg8) donde se encuentran localizados 8 genes (figura 66). Esta duplicación fue confirmada por MLPA a la carta con una sonda situada en el gen *CHD7* y con los siguientes marcadores microsatélite: D8S507, D8S1812 D8S260, D8S1843. El estudio de MLPA en los padres nos mostró que no presentaban la duplicación y podíamos concluir que había surgido *de novo* en el paciente (figura 67). Los dos marcadores microsatélite informativos (D8S260 y D8S1843) nos indicaron que el alelo duplicado era de origen paterno. Casualmente, este paciente era portador de una translocación entre los cromosomas 4 y 7 [t(4;7)(q11;q21)] aparentemente equilibrada, heredada de su padre. La revisión de los clones de las regiones implicadas en la translocación nos mostró que todos ellos tenían una dosis normal confirmando así que la translocación de este paciente era equilibrada.

La delección del gen *CHD7* en heterocigosis causa el síndrome de CHARGE (coloboma, enfermedades cardiacas, atresia de coanas, retraso en el crecimiento y en el desarrollo, anomalías genitales y problemas auditivos). Debido a que la alteración surgió *de novo* en el paciente, a la no existencia de variantes polimórficas descritas en la región, y a la existencia en la región de al menos un gen (*CHD7*) sensible a dosis por haploinsuficiencia, esta alteración fue considerada como patológica.

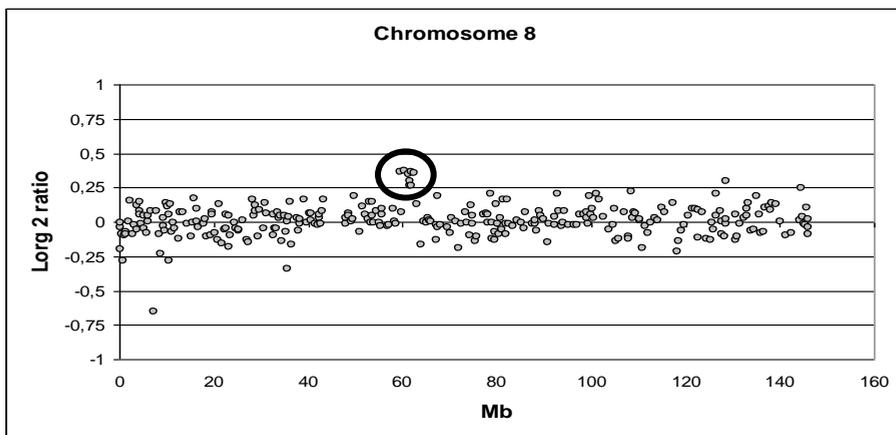


Figura 66: Representación gráfica del resultado del *CGH-array de BACs* en el cromosoma 8 del paciente X2019, donde se aprecia el aumento de dosis para 7 sondas.

Resultados

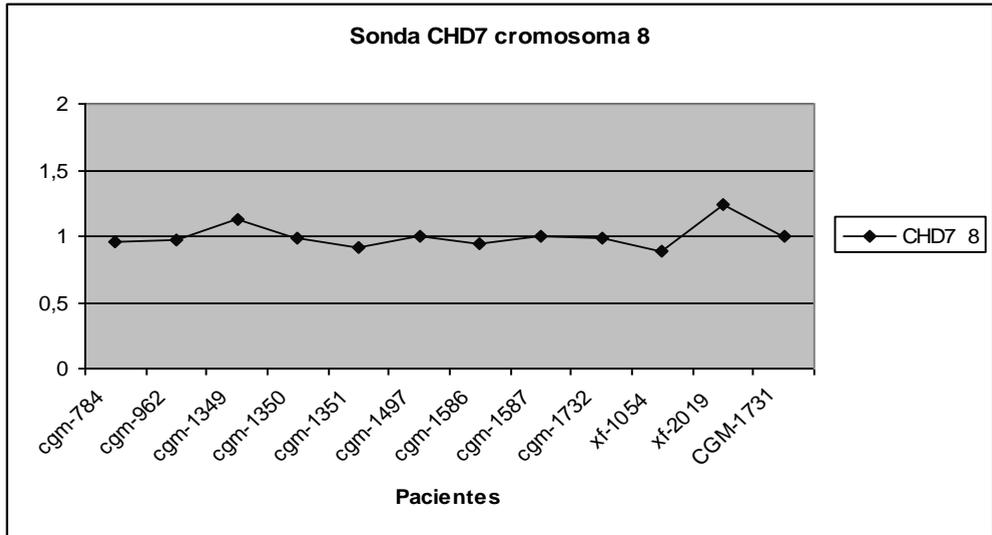


Figura 67: Representación gráfica del resultado del MLPA a la carta con la sonda *CHD7* en varios pacientes.

Se representan los valores obtenidos para la sonda *CHD7* exón_3, localizada en la región 8q12, en una serie de casos entre los que se encuentran los progenitores del paciente (CGM1732 y CGM1731). Se puede observar que el único caso que presenta aumento de dosis es el paciente (XF2019).

Caso CGM1385♂: El *CGH-array* nos indicó que presenta una duplicación de 1,66 Mb (72122934-73784968 hg18) en la región crítica cuya delección causa el Síndrome de Williams-Beuren (7q11.23) (figura 68). Este resultado fue confirmado por MLPA con la *SALSA P064*, por FISH utilizando la sonda que hibrida con el gen de la elastina *ELN* (LSI *ELN*; VYSIS, Downers Grove, Illinois, USA), y por los marcadores microsatélite *HEI*, *ELN*. Mediante la técnica de MLPA (figura 69) pudimos observar que los progenitores no presentaban alteración, comprobando que la duplicación había surgido *de novo* en el paciente. El estudio mediante FISH permitió determinar que se trataba de una duplicación en tandem (figura 70). El análisis de segregación mediante marcadores microsatélite no fue informativo con respecto al origen del alelo duplicado. Sin embargo, mediante el marcador *HEI* observamos en el paciente tres alelos distintos, lo que nos indicó que el origen de esta duplicación era pre-zigótico, probablemente esta duplicación se originó en la meiosis I paterna o materna.

Debido a que la alteración surgió *de novo* en el paciente, a la no existencia de variantes polimórficas descritas en la región, y sobre todo a que se habían publicado otros cuatro casos (Berg et al., 2007) con la misma alteración y patología similar a la de nuestro paciente, ésta fue considerada patológica.

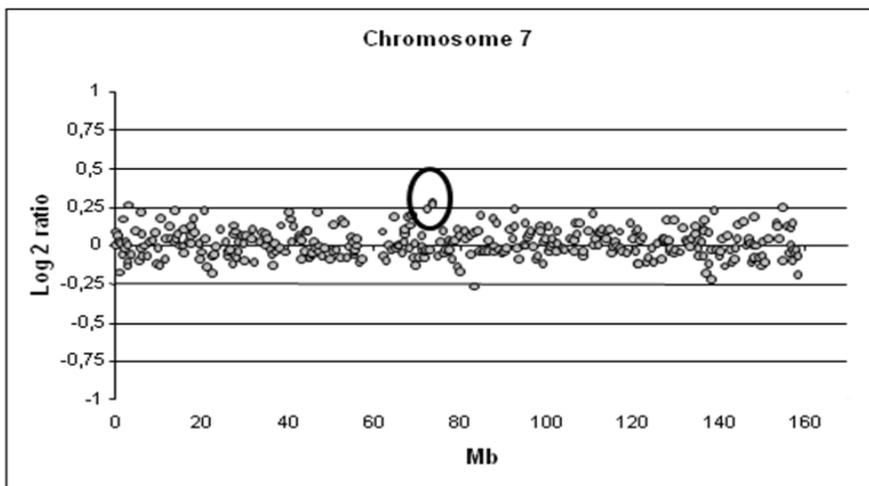


Figura 68: Representación gráfica del resultado del *CGH-array de BACs* en el cromosoma 7 del paciente CGM1385.

Se puede observar un aumento de dosis de 3 clones.

Resultados

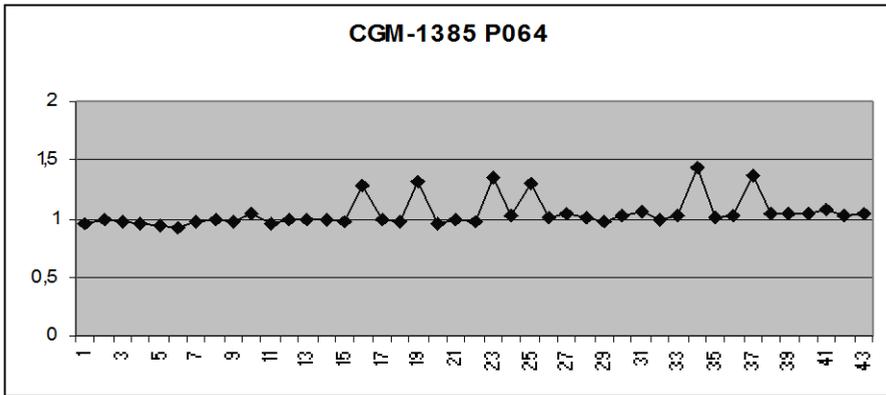


Figura 69: Representación gráfica del resultado de MLPA con la SALSA P064 en el paciente CGM1385.

Se puede observar como todas las sondas ubicadas en la región 7q11.23 correspondientes a la región crítica del síndrome de Williams se encuentran en aumento de dosis.

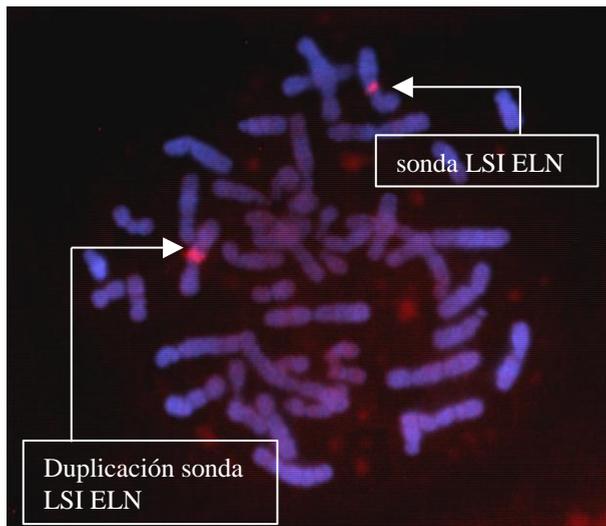


Figura 70: Imagen FISH de la sonda LSI ELN (rojo) en el paciente CGM1385.

Se puede observar como la sonda híbrida en los dos cromosomas 7 y no se ve hibridación en ningún otro cromosoma (duplicación *en tándem*). Una de las señales presenta una intensidad mayor, indicando cual es el cromosoma que presenta la duplicación.

4. BÚSQUEDA DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS MEDIANTE CGH basado en Arrays de oligonucleótidos

4.1 Desequilibrios detectados

El array utilizado fue el array comercial “*Human Genome CGH Microarray 44K (Agilent p/n G4426B-014950)*”. Por medio de esta técnica se estudiaron los 202 pacientes de la serie. En 178 casos no se había detectado ninguna variante de dosis patológica en los estudios previos, en los restantes 24 casos este estudio se realizó para confirmar y delimitar las alteraciones detectadas con las técnicas descritas anteriormente.

Los arrays fueron escaneados mediante el escáner de “Agilent Microarray (Agilent G2565BA)” y los datos se analizaron mediante el software *Agilent Feature Extraction Software 9.5.3.1*. Para el análisis de los resultados se utilizó el algoritmo Z-score y solo se tuvieron en cuenta los cambios de dosis que afectaban a dos o más oligonucleótidos, con lo que se obtenía una resolución de 100-150 kb.

De esta manera, en el análisis de los 202 pacientes, se observaron 161 variantes de dosis en 103 pacientes (ver tabla 12). El tamaño oscila de 0,15 kb hasta 23.012,20 kb. Se observaron 70 variantes de delección, cuyo tamaño promedio fue de 1.759,24 kb (min. 0,15 kb - max. 13.500 kb), y 91 variantes de duplicación, cuyo tamaño promedio fue de 1.766,33 kb (min. 0,5 kb - max. 23.012,00 kb). Entre ellas, 37 variantes de 24 pacientes se conocían con anterioridad y se han detallado en los apartados previos.

Tabla 12: Distribución de variantes de dosis observadas por paciente mediante CGH-array basado en oligonucleótidos.

Nº pacientes	Nº variantes de dosis	Tipo de variantes	Nº Pacientes
99	0		
63	1	Del Dup	28 35
27	2	2 Del 1 Dup + 1Del 2 Dup	3 19 5
11	3	2 Del + 1 Dup 1 Del + 2 Dup 3 Dup	5 4 2
1	5	1 Del + 4 Dup	1
1	6	2 Del + 4 Dup	1

Resultados

Para la interpretación de los resultados obtenidos seguimos los criterios descritos en el apartado 7.5 de Material y Métodos:

- La presencia de CNVs descritos en la región.
- La existencia de otros casos descritos con alteraciones similares.
- La herencia.
- Los genes localizados en la región: función conocida o hipotética y patrón de expresión.

Con todo ello, las variantes encontradas se clasificaron en cuatro grupos:

- Variantes de dosis polimórficas.
- Variantes de dosis patológicas.
- Variantes de dosis patológicas de penetrancia incompleta.
- Variantes de dosis de efecto desconocido.

A continuación se presentan los detalles de las variantes detectadas con el *array* de oligonucleótidos, que no habían sido detectadas con las otras técnicas.

4.1.1 Variantes de dosis consideradas polimórficas

En la tabla 13 se presenta una relación de los 81 cambios de dosis considerados como polimórficos, 33 deleciones y 48 duplicaciones. En total, se encontraron 70 variantes de dosis diferentes, puesto que 8 variantes se encontraron en más de un paciente (tabla 14).

- 36 variantes de dosis estaban descritas en series de población control, por tanto, éstas se consideraron directamente como variantes polimórficas.
- 22 variantes de dosis heredadas de uno de los progenitores. Para clasificar estas variantes como polimórficas, se descartó que los genes contenidos en ellas pudieran tener alguna función conocida o hipotética relacionada con la patología del paciente. Las estrategias utilizadas para determinar el origen de las variantes detectadas fueron varias. En algunos casos, dado que el paciente presentaba más de tres variantes de dosis diferentes, se decidió aplicar la *CGH-array* basada en oligonucleótidos a ambos progenitores. En otros casos, se utilizó un MLPA comercial. Para otros casos se utilizaron marcadores microsatélite. Y para la gran mayoría de casos, se diseñó un *CGH-array* basado en oligonucleótidos dirigido, con nuevas sondas localizadas en esas regiones concretas (ver 3.8.1 de material y métodos).

- 12 variantes de dosis no descritas. Se consideraron polimórficas por contener genes que hoy en día no se relacionan con la patología del paciente. Y para ello, en todos los casos, se realizó una búsqueda exhaustiva de toda la información existente de los genes contenidos en estas variantes de dosis. Llama la atención que al menos 3 CNVs considerados polimórficos han surgido *de novo* en el paciente.

Tabla 13: Relación de todas las variantes de dosis consideradas como polimórficas, ordenadas por cromosoma y posición.

Región Chrom.	Tipo de alteración	Posición inicial (hg18) (kb)	Tamaño (kb)	Caso	Justificación	Técnicas confirm.	Nº de Genes	Herencia parental
1p36	Del	16921	183	CGM2249	CNV descrito		0	
1p34.2	Dup	39979	17	XF1774	CNV heredado	CoaCGH	1	Paterna
1p12.1	Dup	120256	75	CGM781	CNV descrito		2	
1q11	Dup	144124	328	CGM1988	CNV descrito		10	
1q31.3	Del	195012	51	CGM2010	CNV descrito		2	
1q44	Dup	247071	68	CGM912	CNV heredado	MLPA	3	Materna
2q11	Dup	97387	253	CGM1954	CNV descrito		3	
2qter	Del	242579	17	X926	CNV descrito		0	
2qter	Del	242579	17	CGM1043	CNV descrito		0	
3p26.2	Dup	4329	2	XF3064	CNV descrito		1	
3q12.2	Dup	101837	45	CGM1393	CNV descrito		1	
3q13.12	Del	110206	90	X1186	Genes no relacionados		1	<i>De novo</i>
3q25	Del	153014	11	CGM2295	CNV descrito		1	
3q25.2	Del	152851	174	CGM2115	CNV descrito		1	
3q25.2	Del	152851	174	CGM1484	CNV descrito		1	
3q25.2	Del	152851	174	XF2307	CNV descrito		1	
3q26.32	Dup	178221	12	CGM1449	Genes no relacionados		1	
5p13.3	Dup	32146	39	X1237	CNV descrito		2	
5p13.3	Dup	32146	39	XF2307	CNV descrito		2	
5p13.3	Dup	32146	39	CGM2173	CNV descrito		2	
5p13.3	Dup	32146	63	CGM2031	Genes no relacionados		2	
5p13.1	Dup	39099	320	CGM2031	CNV heredado	CoaCGH	4	Materna
6p21.32	Del	31894	0,15	CGM1693	Genes no relacionados		1	
6q27	Dup	168086	130	CGM1603	CNV descrito		3	
6q26	Dup	168114	210	CGM979	CNV descrito		2	
7p21.2	Dup	16969	376	CGM2115	CNV descrito		1	
7p21.2	Dup	16969	376	CGM2254	CNV descrito		1	
7q11.1	Del	64329	173	CGM1208	CNV heredado	OaCGH <i>proge.</i>	1	Paterna

Resultados

Región Crom.	Tipo de alteración	Posición inicial (hg18) (kb)	Tamaño (kb)	Caso	Justificación	Técnicas confirm.	Nº de Genes	Herencia parental
7q22.1	Dup	100753	125	CGM1239	CNV descrito		1	
7q31	Dup	126811	28	XF1774	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	1	Materna
7q34	Del	142544	47	CGM1551	Genes no relacionados		2	
7q34	Del	142544	47	XF2011	Genes no relacionados		2	
7q36.3	Dup	158137	251	CGM1693	Genes no relacionados		3	
8q22.1	Dup	98770	244	CGM2109	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	4	Paterna
8q23.3	Dup	104289	195	XF1587	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	0	Materna
8q23.1	Del	107376	363	CGM1900	Genes no relacionados		0	
8q24.24	Dup	143856	134	CGM165	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	5	Materna
9p13.3	Dup	34007	98	CGM1527	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	2	Paterna
10p12.2	Del	23369	288	CGM872	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	3	Paterna
10q25.3	Dup	115062	369	CGM1428	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	3	Materna
11p15.4	Del	4551	80	XF2184	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	6	Paterna
11p15.4	Del	4551	80	XF2473	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	6	Paterna
11q14	Dup	82288	76	CGM2249	CNV descrito		2	
12p13.3	Dup	7969	10	XF2085	CNV descrito		1	
12p13.3	Del	7894	85	CGM1616	CNV descrito		2	
12p13.3	Del	7894	75	CGM1427	CNV descrito		2	
12p11.22	Del	29366	57	CGM1847	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	3	Materna
12q14.1	Dup	57130	561	CGM1616	Genes no relacionados		1	
13q11	Dup	19317	12	CGM2249	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	1	Materna
14q32.2	Del	98250	3	CGM2249	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	1	Paterna
15q11	Dup	20531	105	CGM1847	Genes no relacionados		3	
15q13.3	Dup	29809	489	CGM1631	CNV descrito		1	
15q13.3	Dup	29809	489	XF2473	CNV descrito	<i>OaCGH proge.</i>	1	Materna
15q13.2	Dup	30035	156	CGM2103	CNV descrito		1	
15q14	Dup	32454	203	CGM2103	CNV descrito		2	
15q15.3	Del	41670	10	CGM1217	CNV descrito		2	
15q25.3	Dup	85921	29	CGM1458	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	0	Paterna

Región Crom.	Tipo de alteración	Posición inicial (hg18) (kb)	Tamaño (kb)	Caso	Justificación	Técnicas confirm.	Nº de Genes	Herencia parental
15q26.1	Dup	89127	20	CGM1690	Genes no relacionados		1	
16p13.11	Del	14956	83	CR218	CNV descrito		1	
16p13.11	Del	14956	62	CGM1416	CNV descrito		1	
16p13.1	Del	14956	63	CGM2295	CNV descrito		1	
16p12.2	Del	21382	363	CGM1236	Genes no relacionados		3	
16p12.2	Del	21744	543	CGM1696	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	6	Paterna
16q22.1	Dup	68609	142	CGM2249	CNV descrito		1	
16qter	Dup	88376	60	CGM1043	CNV descrito		1	
17p13.1	Dup	549	64	XF2085	CNV descrito		4	
17p13.3	Del	295	326	X2629	CNV descrito	<i>CoaCGH</i>	7	<i>De novo</i>
17p11	Del	21195	247	XF1338	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	1	Paterna
17q11	Dup	22651	349	CGM1356	CNV heredado	<i>CoaCGH</i>	1	Materna
17q21.3	Dup	41624	76	CGM1393	Genes no relacionados		0	
18qter	Del	75994	89	CGM1416	CNV descrito	<i>CoaCGH</i>	2	<i>De novo</i>
22q11	Dup	20653	246	CGM2295	CNV descrito		1	
22q11.23	Del	23994	228	CGM1616	CNV descrito		2	
22q11.23	Del	23994	228	CGM1208	CNV descrito	<i>OaCGH proge.</i>	2	Materna
22q11.23	Dup	23994	228	CGM2115	CNV descrito		2	
Xp21.3	Del	26121	447	XF2548	CNV descrito		2	
Xp22.31	Dup	6667	1325	CGM1503	CNV descrito	<i>CoaCGH</i>	5	Materna
Xp22.3	Dup	7766	226	X1145	CNV descrito	<i>CoaCGH</i>	5	Materna
Xq21.1	Dup	78857	532	CGM1372	CNV heredado	MM	1	Materna
Xq27.2	Dup	142174	98	CGM2249	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	0	Materna
Xq28	Dup	148694	241	XF1774	CNV heredado	<i>OaCGH proge.</i>	2	Materna

Del: deleción

Dup: duplicación

OaCGH proge.: *array-CGH* de oligonucleótidos (44K) a los progenitores

CoaCGH: *array-CGH* de oligonucleótidos a la carta

MM: marcadores microsatélites.

Resultados

Tabla 14: Relación de variantes de dosis consideradas polimórficas observadas en más de un paciente de nuestra serie.

Región Crom.	Alt.	Posición inicial (hg18) (kb)	Posición final (hg18) (kb)	Tamaño (kb)	Nº de pacientes
2qter	Del	242579	242596	17	2
3q25.2	Del	152851	153025	174	3
5p13.3	Dup	32146	32185	39	4
7p21.2	Dup	16969	17345	376	2
7q34	Del	142544	142591	47	2
11p15.4	Del	4551	4631	80	2
15q13.3	Dup	29809	30298	489	2
22q11.23	Del/Dup	23994	24222	228	3

4.1.2 Variantes de dosis patológicas

Este grupo de variantes se consideraron como patológicas porque dichas alteraciones se habían descrito en otros pacientes asociadas a patología, y/o por contener genes de función conocida o hipotética que por alteración de dosis pueden causar DI. También se valoró el tamaño de las regiones alteradas y su contenido total en genes. En la tabla 15 se presenta una relación de las 19 variantes de dosis consideradas como patológicas.

Estas variantes las podemos dividir en dos grupos:

➤ Variantes que coinciden con alteraciones descritas previamente como causantes de síndromes de microdelección o microduplicación, o bien alteraciones que afectan a genes cuya presencia o ausencia está asociada a un síndrome concreto:

- Delección 1q44
- Delección 6q16.1-16.3
- Delección 13q32
- Delección 15q22-q23
- Duplicación Xp11.3-11.23
- Duplicación Xp11.22
- Duplicación Xq28

- Delección 1q44 (Paciente CGM1527 ♂): Delección de 5,1 Mb (242638000-243971000 hg18) en la que se encuentran 7 genes (anexo 3). Utilizando el marcador microsatélite D1S423 se pudo confirmar que la alteración había surgido *de novo* por pérdida del alelo materno (anexo 4). Esta alteración ha sido descrita como un nuevo síndrome de microdelección (Boland et al., 2007; Poot et al., 2007), cuyos principales rasgos clínicos son: discapacidad intelectual de moderada a severa, retraso del crecimiento, microcefalia, convulsiones, rasgos dismórficos y anomalías del cuerpo calloso. Nuestro paciente presenta la mayoría de estos rasgos clínicos (discapacidad intelectual moderada, retraso del lenguaje, retraso del desarrollo motor, convulsiones y rasgos dismórficos), aunque la mayoría de los pacientes descritos presentan una delección de mayor tamaño.
- Delección 6q16.1-16.3 (pacientes CGM1414 ♀ y XF1774 ♂): El tamaño de esta alteración varía entre los dos pacientes, siendo de 9,2 Mb y 10,3 Mb (93800000-103000000; 93930000-104244000 hg18) respectivamente, sin embargo, los genes situados en estas delecciones son los mismos, 33 genes (anexo 3). Utilizando los marcadores microsatélite D6S300, D6S1716, D6S468 se confirmó que la delección había surgido *de novo*, por pérdida del alelo paterno en ambos casos

Resultados

(anexo 4). Además dicha alteración ha sido asociada a un nuevo síndrome de microdelección (Varela et al., 2006; Klein et al., 2007). Las principales características de este síndrome son discapacidad intelectual, retraso del desarrollo, hipotonía y rasgos faciales como micrognatia y orejas malformadas y de implantación baja. En algunos casos presentan un fenotipo similar al síndrome de Prader-Willi con obesidad e hipotonía. Ambos pacientes presentan la mayoría de dichos rasgos clínicos. La paciente CGM1414 presenta discapacidad intelectual moderada-grave, retraso del desarrollo psicomotor y otros rasgos clínicos como asma con ataques graves, obesidad mórbida, miopía y rasgos dismórficos (orejas de implantación baja, y hundimiento nasal). El paciente XF1774 presenta discapacidad intelectual leve, hipertonía muscular, retraso del desarrollo psicomotor, retraso del lenguaje, alteraciones esqueléticas y talla baja, y dismorfia facial (orejas de implantación baja, hipertelorismo y cejas finas).

- Delección 13q32 (paciente XF1186 ♂): Se extiende 5,5 Mb (93423000-98967000 hg18) afectando a 20 genes distintos (anexo 3). Mediante los marcadores microsatélite D13S154, D13S1241, D13S1252 se observó que la delección había surgido *de novo* por pérdida del alelo paterno (anexo 4). En la literatura se describe el síndrome de delección 13q, caracterizado por un amplio espectro fenotípico resultado de la delección parcial de diferentes regiones. En general, la presentación clínica típica es discapacidad intelectual, retraso del crecimiento, dismorfia craneofacial y anomalías congénitas (Quelin et al., 2009; Ballarati et al., 2007). Nuestro paciente presenta discapacidad intelectual de moderada a grave, hipotonía, retraso del desarrollo psicomotor, retraso del lenguaje e hipertriosis. Pero no presenta malformaciones congénitas graves, puesto que la delección es de un tamaño menor que los pacientes descritos, y los genes implicados en dichas malformaciones se encuentran en su dosis correcta.
- Delección 15q22-q23 (paciente X2629 ♂): Abarca aproximadamente 1,3 Mb (67829000-69129000 hg18) del genoma. En esta región, se localizan 4 genes (*VACA*, *LARP6*, *THAP10* y *LRRC49*) que se expresan en sistema nervioso, los cuales pueden estar implicados en el desarrollo neuronal o como factores de transcripción que participan en el neurodesarrollo (anexo 3). Los marcadores microsatélite utilizados para determinar el origen de esta alteración no fueron informativos, por ello se utilizó el *CGH-array* basado en oligonucleótidos a la carta. El resultado nos indicó que la alteración había sido heredada de la madre, la cual presentaba una discapacidad intelectual leve. La

paciente también presenta discapacidad intelectual leve como su madre, pero además tiene retraso psicomotor y cierta dismorfia facial como hipertelorismo, telecantus, micrognatia, filtrum largo y paladar ojival. De los cuatro genes delecionados que se expresan en sistema nervioso central, se ha demostrado una asociación entre la pérdida de función del gen *LARP6* con la discapacidad intelectual (Smith et al., 2000).

- Duplicación Xp11.3-11.23 (paciente CGM548 ♀): Se extiende 3,8 Mb (45063000-48922000 hg18) y en ella se encuentran diversos genes asociados a la discapacidad intelectual ligada al cromosoma X (*ZNF674*; *UBE1*, *ZNF41*, *SYN1*, *ZNF81*, *FTSJ1*, *EBP* y *PQBP1*) (anexo 3). Mediante el estudio de marcadores microsatélite (DX1003 y SYN-ARAF) se comprobó que la duplicación se encontraba en el cromosoma de origen paterno, pero no podíamos saber si era o no *de novo*. Para ello se utilizó la técnica MLPA mediante la *SALSA P106* que contenía varias sondas en esta región, confirmando así que la deleción había surgido *de novo* en la paciente. El estudio de inactivación del cromosoma X en la paciente nos indicó que presentaba una inactivación preferencial al 100% del cromosoma X materno, lo que apoya la idea de que la patología de la niña (DI grave, hipotonía, retraso psicomotor y del lenguaje, macrocefalia y dismorfia facial) se debía a esta duplicación. Además las manifestaciones clínicas de la paciente encajan con los casos descritos de duplicación en esta región.
- Duplicación Xp11.22 (Paciente XF2761 ♂): Esta duplicación se extiende aproximadamente 1 Mb (53238000-54239000 hg18) y afecta a 8 genes distintos (anexo 3). Mediante los marcadores microsatélite DXS988 y DXS1204 y el MLPA *SALSA P106B1* se observó que la duplicación fue heredada de su madre, la cual era portadora de la misma. En esta región se encuentra el gen *HUWE1*, cuya duplicación se asocia a discapacidad intelectual (Froyen et al., 2008). Este gen participa en la degradación específica de proteínas mediante ubiquitinación, de forma similar al gen causante del síndrome de Angelman. Las principales características de otros pacientes con esta duplicación varían desde una discapacidad intelectual leve con ausencia de otros rasgos clínicos, a una discapacidad moderada, con especial afectación del habla y leves rasgos dismórficos. En el caso de nuestro paciente, los rasgos clínicos son DI leve, retraso del desarrollo psicomotor y del lenguaje, convulsiones, hiperactividad, alteraciones de la conducta, anomalías congénitas en corazón y riñón y rasgos dismórficos. La madre portadora presentaba una inactivación

Resultados

preferencial de uno de los cromosomas X, de ahí la ausencia de clínica. La hermana y las tías del paciente resultaron no portadoras.

- Duplicación Xq28 (Pacientes X841 ♂, CGM1330 ♂ y CGM2040 ♀): Esta duplicación se ha detectado en tres pacientes (152373000-153433000; 152850000-153062000; 152930000-153230000 hg18 respectivamente) y aunque la duplicación en cada paciente presenta un tamaño diferente (anexo 3), en los tres se encuentra implicado el gen *MECP2* el cual, por pérdida de función ocasiona el síndrome de Rett, y por ganancia también se ha demostrado su carácter patológico en varones (Lugtenberg et al., 2009; Clayton-Smith et al., 2009). Las manifestaciones clínicas descritas en otros casos con duplicación del gen *MECP2* concuerdan con las de nuestros casos (discapacidad intelectual moderada-grave e hipotonía en la infancia, ausencia de lenguaje, desconexión con el medio que les rodea, convulsiones, espasticidad progresiva y frecuentes infecciones de las vías respiratorias). Los estudios complementarios mediante la técnica MLPA SALSA P245 nos indican que en los dos pacientes varones (X841 y CGM1330), la duplicación había sido heredada de la madre portadora asintomática que presentaba una inactivación sesgada del cromosoma X. El caso de la paciente mujer CGM2040, se trata de una triplicación *de novo* y presenta una inactivación al azar de ambos cromosomas X.

- Variantes no descritas con anterioridad, pero que contienen al menos un gen que puede estar implicado en DI/RD por su patrón de expresión y de su función conocida o hipotética, basada en homología con dominios funcionales conocidos. Además, en su gran mayoría (8/9) presentan un tamaño mayor de 3 Mb en las que se encuentran un número de genes muy amplio.

- Deleción 1q24-25
- Duplicación 2p22.2-23.3
- Deleción 3q13.2-31
- Deleción 5q14.3
- Deleción 11q13
- Deleción 12q24.3
- Duplicación 19p13.3
- Duplicación Xq13.2-21.31

- Deleción 1q24-25 (Paciente CGM1353 ♀): Deleción de aproximadamente 5 Mb (167024000-172150000 hg18) que afecta a 42 genes (anexo 3). El estudio con marcadores microsatélite (D1S2851, D1S452, D1S2815) confirmó la alteración y nos indicó que se trata de

una deleción *de novo* con pérdida de los alelos maternos (anexo 4). Los principales rasgos clínicos de la paciente son DI leve, retraso del desarrollo psicomotor y del lenguaje, déficit de atención, talla baja, microcefalia y dismorfia facial (hipertelorismo, orejas dismórficas y de implantación baja y ausencia de dientes). No se ha descrito ningún caso similar en la literatura, sin embargo, dos de los genes contenidos en la región delecionada (*VAMP4* y *DMN3*) codifican para proteínas implicadas en la comunicación sináptica por lo que son buenos candidatos a causar DI.

- Duplicación 2p22.2-23.3 (Paciente CGM2350 ♀): Esta duplicación de al menos 13 Mb (24374000-37745000 hg18) afecta a 145 genes, algunos de ellos relacionado con el neurodesarrollo entre los que podemos destacar, *KIF3C*, *DPYSL5*, *MAPRE3*, *PREB*, *GALNT14*, *BRE* y *FEZ2* (anexo 3). El estudio de marcadores microsatélite (D2S144, D2S2247, D2S367) nos indicó que el alelo duplicado era de origen paterno y que la duplicación había surgido *de novo* en la paciente (anexo 4). Los principales rasgos clínicos que presenta esta paciente son, DI leve-moderada, retraso del desarrollo psicomotor y del lenguaje, talla baja, microcefalia y dismorfia facial. En la literatura se ha descrito un caso similar, pero con una duplicación de mayor tamaño (Lurie et al., 1995).
- Deleción 3q13.2-31 (Paciente XF1701 ♀): Esta deleción de aproximadamente 3 Mb (113681000-116922000 hg18) afecta a 30 genes distintos (anexo 3) de los cuales cabe destacar el gen *BOC* que ha sido propuesto como gen candidato causante de la hipotonía y el gen *DRD3* que es un receptor de dopamina con una función importante en el desarrollo psicomotor (Shimojima et al., 2009). La paciente presenta hipotonía y retraso del desarrollo psicomotor, además de hiperlaxitud articular. El estudio mediante marcadores polimórficos (D3S3675, D3S3665, D3S1610) nos indicó que la alteración había surgido *de novo* en la paciente por pérdida del alelo materno (anexo 4).
- Deleción 5q14.3 (Paciente CGM1526 ♂): Región de aproximadamente 4 Mb (86142000-90112000 hg18) que afecta a 10 genes distintos (anexo 3), de los cuales se pueden destacar dos relacionados con la clínica del paciente (DI moderada-grave, hipotonía, problemas motrices, convulsiones, falta de mielinización y rasgos autistas), el gen *GPR98* relacionado con epilepsia y convulsiones y el gen *RASA1* relacionado con malformaciones capilares arterio-venosas. El estudio de segregación mediante los marcadores D5S2495, D5S2103, D5S618

Resultados

nos indicó que el alelo ausente era el paterno y que la alteración había surgido *de novo* en el paciente (anexo 4).

- Delección 11q13 (Paciente CGM2179 ♂): Región de aproximadamente 8 Mb (75730000-83639000 hg18) que afecta a 25 genes distintos (anexo 3), de los cuales hay dos, *PAK1* y *DLG2* cuyas funciones están relacionadas con el desarrollo y la función neuronal. El estudio de segregación con los marcadores D11S4172, D11S1362, D11S901 mostró la ausencia del alelo paterno y nos indicó que la alteración había surgido *de novo* (anexo 4). Las principales características clínicas que presenta el paciente son: discapacidad intelectual moderada-grave, hipotonía, dificultad motora, microcefalia y dismorfia facial (fenotipo similar al Síndrome de Down, orejas pequeñas y desplegadas, frente y cara plana). En las base de datos de DECIPHER hay un paciente descrito con una región delecionada similar (76376798-85689145 hg19), dicha alteración está considerada como patológica, pero no consta descripción clínica.

- Delección 12q24.3 (Paciente XF2623 ♀): Dicha delección se extiende aproximadamente 1,3 Mb (120700000-121990000 hg18) y afecta a unos 27 genes (anexo 3) de los cuales caben destacar los genes *RHOF*, *ZCCHC8* y *SNTC1* implicados en la regulación dinámica del citoesqueleto y procesado y degradación del ARN, respectivamente. El estudio de segregación con los marcadores microsatélite D12S1349, Cr12_2, Cr12_3 nos indicó que la delección había surgido *de novo*, por la pérdida del alelo paterno (anexo 4). Los principales rasgos clínicos de esta paciente son DI moderada, retraso psicomotor y del lenguaje, convulsiones, hiperactividad, retraso del crecimiento, astigmatismo, hipermetropía y dismorfia facial. En la literatura se ha descrito un caso con una delección que abarca dicha región pero de un tamaño mayor, con muchos más genes afectados y con un fenotipo mucho más acusado que nuestra paciente (Plotner et al., 2003).

- Duplicación 19p13.3 (Paciente XF977 ♂): Duplicación que afecta a casi 5 Mb (1903000-6859000 hg18) con un número de genes muy amplio (anexo 3). El estudio de segregación mediante los marcadores microsatélite D19S247, D19S878, D19S1034 nos indicó que la duplicación había surgido *de novo* en el paciente y que el alelo duplicado era el materno (anexo 4). Posteriormente, se nos informó que el paciente tenía un primo hermano por parte materna con la misma alteración genética. Esto hizo que reevaluáramos nuestro diagnóstico de alteración *de novo*. En primer lugar se realizó un

estudio mediante FISH de pintado cromosómico del cromosoma 19 en metafases procedentes de nuestro paciente, para ver si la duplicación se había insertado en otro cromosoma. Al obtenerse un pintado homogéneo en los dos cromosomas 19 y no observar ninguna región con hibridación en el resto de cromosomas, se realizó el cariotipo de alta resolución tanto en nuestro paciente, como en su madre, y mediante una exhaustiva revisión de los cromosomas 19 se observó en el paciente, que uno de los cromosomas 19 presentaba un brazo largo de mayor tamaño y en la madre parecía que el centrómero de uno de los cromosomas 19 se había desplazado hacia el brazo corto. Así pues, se sospechó que la madre presentaba una transposición intracromosómica en uno de los cromosomas 19 que derivó en la meiosis en un cromosoma 19 recombinante. Este resultado fue confirmado mediante FISH con sondas no comerciales. Para ello se utilizaron dos BACs localizados en la región duplicada (RP11-268O21 y RP11-30F17), y otros dos fuera de la región duplicada (a modo de sondas control), RP11-798B19 en el brazo corto y RP11-384E6 en el brazo largo, todos ellos del cromosoma 19. El resultado del FISH fue:

- En el paciente: con las sondas RP11-268O21 y RP11-30F17 se observa una señal de hibridación en el brazo corto, compatible con la normalidad en uno de los cromosomas 19 y en el otro cromosoma 19 se observan dos señales, una en el brazo corto y otra en el brazo largo, confirmando así la duplicación de dicho fragmento (figura 71).
- En la madre: con las sondas RP11-268O21 y RP11-30F17 se observa una señal en el brazo corto en un cromosoma 19 y una señal en el brazo largo en el otro cromosoma 19, confirmando la transposición intracromosómica. Además mediante la sonda RP11-384E6 situada en el brazo largo del cromosoma 19, utilizada como sonda control, observamos que en el cromosoma translocado, la señal se divide en dos, obteniendo con ello el punto de inserción en el brazo largo (figura 71).

El estudio mediante las sondas FISH no comerciales que caracterizan la transposición realizado a diferentes miembros de la familia, confirmó la presencia de 5 portadores equilibrados de la transposición, todos ellos asintomáticos y 2 portadores desequilibrados de la transposición con presencia de la duplicación de la región 19p13.3 y con rasgos clínicos similares, DI moderada, retraso del lenguaje, hipotonía, talla baja, convulsiones, microcefalia, orejas de duende y fenotipo facial similar.

Resultados

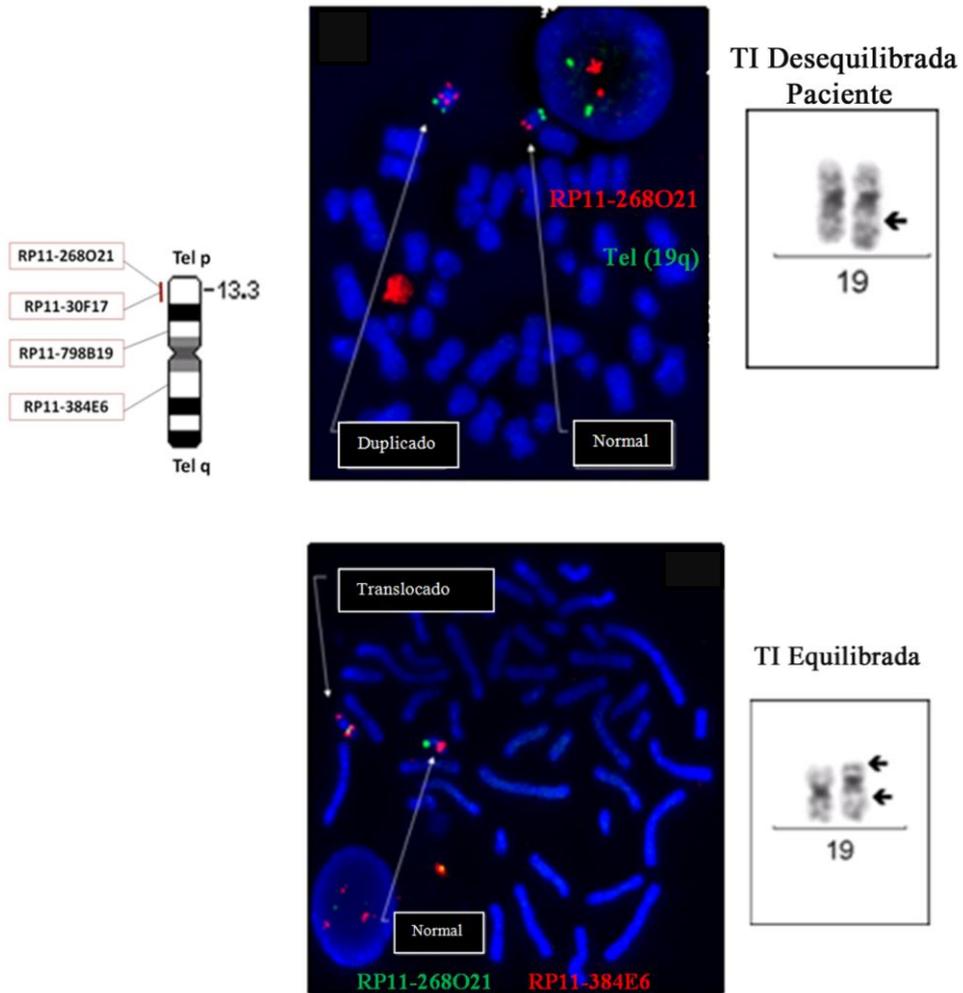


Figura 71: Resultado FISH del BACs RP11-268O21 y la sonda telomérica del brazo largo del cromosoma 19 en el paciente XF1702 (parte superior) y los BACs RP11-268O21 y RP11-384E6 en la madre del paciente (parte inferior).

El BAC RP11-268O21 se encuentra situado dentro de la región duplicada en el paciente. Parte superior: Se observa como el BAC RP11-268O21 (rojo) se encuentra duplicado en el cromosoma 19 alterado del paciente. Una señal se encuentra en el brazo corto y otra en el brazo largo, mientras que la sonda telomérica del brazo largo del cromosoma 19 (verde) se utiliza como control. Parte inferior: En la madre el BAC RP11-268O21 (verde) se sitúa en el brazo corto en el cromosoma 19 normal, mientras que en el cromosoma translocado se sitúa en el brazo largo justo en la región donde hibrida el BAC RP11-384E6 (rojo) utilizado a modo de sonda control. Además, podemos observar como parte del BAC RP11-384E6 se encuentra translocado en el brazo corto.

- Duplicación Xq13.2-21.31 (Paciente XF1702 ♂): Variante que afecta a 18,6 Mb (72349000-91011000 hg18) que incluye a 56 genes (anexo 3). Entre ellos se encuentran varios genes asociados a discapacidad intelectual ligada al cromosoma X (*ZNF711*, *BRWD3*, *ATRX*, *PGK1*, *ZDHHC15*, *ATP7A*, *SLC16A2* y *KIAA2022*). En concreto, se ha demostrado en estudios realizados en modelo de ratón que la duplicación del gen *ATRX* produce defectos del neurodesarrollo. En este caso, como la duplicación sobrepasaba los límites de la citogenética convencional, se decidió revisar el estudio citogenético en linfocitos de sangre periférica del paciente y se observó que el cromosoma X presentaba la banda q21 duplicada. Se realizó este mismo estudio a su madre comprobando que la alteración había sido heredada. Puesto que la madre no presentaba sintomatología, se realizó el estudio de inactivación del cromosoma X. En ella se observó una inactivación preferencial de casi el 100% de un alelo lo que puede explicar la ausencia de clínica en la madre portadora. Los rasgos clínicos más destacados de este paciente son, DI moderada, hipotonía, retraso psicomotor y del lenguaje, hiperactividad, retraso del crecimiento y microcefalia.

Resultados

Tabla 15: Relación de todas las variantes de dosis consideradas como patológicas, ordenadas por cromosoma y posición.

Región Crom.	Tipo de alteración	Posición inicial (hg18) (Kb)	Tamaño (Kb)	Caso	Alteración descrita	Genes candidatos	Origen	Herencia parental
1q24-25	Del	167024	5126	CGM1353 ♀	No		<i>De novo</i>	Mat.
1q44	Del	242638	1153	CGM1527 ♂	Si	<i>FAM152A, FAM36A, KIF26B</i>	<i>De novo</i>	Pat.
2p22.2-23.3	Dup	24374	13371	CGM2350 ♀	No	<i>KIF3C, DPYSL5, MAPRE3, PREB, GALNT14, BRE, FEZ2.</i>	<i>De novo</i>	Mat.
3q13.2-31	Del	113681	3241	XF1701 ♀	No	<i>BOC, DRD3</i>	<i>De novo</i>	Mat.
5q14.3	Del	86142	3970	CGM1526 ♂	No	<i>RASA1</i>	<i>De novo</i>	Pat.
6q16.1-16.3	Del	93800	9200	CGM1414 ♀	Si	<i>SIM1, EPHA7, POUF2, FBXL4</i>	<i>De novo</i>	Pat.
6q16.1-16.3	Del	93930	10314	XF1774 ♂	Si	<i>SIM1, EPHA7, POUF2, FBXL4</i>	<i>De novo</i>	Pat.
11q13.5	Del	77730	5909	CGM2179 ♂	No	<i>PAK, DLG2</i>	<i>De novo</i>	Pat.
12q24.3	Del	120700	1290	XF2623 ♀	No	<i>KNTC1, RHOC</i>	<i>De novo</i>	Pat.
13q32	Del	93423	5544	X1186 ♂	Si		<i>De novo</i>	Pat.
15q23	Del	68050	1079	X2629 ♂	Si	<i>TLE3, VACA, LARP6, THAP10, LRRC49</i>	Materna	Mat
19p13.3	Dup	1903	4956	XF977 ♂	No	<i>JMJD2B, EEF2, MATK, MAP2K, TBXA2</i>	<i>De novo</i>	Mat.
Xp11.3-11.23	Dup	45063	3859	CGM548 ♀	Si	<i>PQBP1, UBE1</i>	<i>De novo</i>	Pat.
Xp11.22	Dup	53238	1001	XF2761 ♂	Si	<i>HUWE1, SMCX, SMC1A(CORNE LIA DE LANGUE), HADH2, PHF8</i>	Materna	Mat.
X q13.2-21.31	Dup	72349	18662	XF1702 ♂	No	<i>ZNF711, BRWD3, ATRX, PGK1, ZDHHC15,</i>	Materna	Mat.
Xq28	Dup	152373	1060	X841 ♂	Si	<i>MeCP2, SLC6A8, L1CAM, AVPR2</i>	Materna	Mat.
Xq28	Dup	152850	212	CGM1330 ♂	Si	<i>MECP2, IRAK1</i>	Materna	Mat.
Xq28	Dup	152930	300	CGM2040 ♀	Si	<i>MECP2</i>	<i>De novo</i>	Des.
Xq28	Dup	153393	138	CGM2040 ♀	No		<i>De novo</i>	Des.

4.1.3 Variantes de dosis consideradas patológicas de penetrancia incompleta
 Encontramos nueve variantes de dosis en cuatro regiones distintas que coinciden con síndromes de penetrancia incompleta o expresión variable descritos por otros autores (tabla 16).

Duplicación 16p13.1

Duplicación/delección 16p11

Duplicación 20q12-13

Duplicación 22q11

Para determinar la herencia y el origen de estas variantes, se utilizaron diferentes métodos:

- Para las variantes 16p11 se utilizó la técnica del *CGH-array* basado en oligonucleótidos en los progenitores.
- Para las variantes 16p13.1 y 20q12-13 se utilizaron marcadores microsatélite incluidos en la región.
- Para la variante 22q11 se utilizó el MLPA con la *SALSA P245*.

Los resultados de estos estudios se encuentran resumidos en la tabla 16.

Tabla 16: Relación de todas las variantes de dosis consideradas como patológicas de penetrancia incompleta, ordenadas por cromosomas y posición.

Región Crom.	Tipo de alteración	Posición inicial (hg18) (kb)	Tamaño (kb)	Caso	Alteración descrita	Origen parental
16p13.1	Dup	14852	1305	XF1338	Si	Paterna
16p13.1	Dup	14956	1257	CGM2182	Si	Paterna
16p11	Del	28450	1654	CGM912	Si	<i>De novo</i>
16p11	Dup	28481	608	CGM1208	Si	Paterna
16p11	Dup	29581	525	XF2184	Si	Materna
16p11	Dup	29581	525	XF2473	Si	Materna
16p11	Dup	29746	360	XF1774	Si	<i>De novo</i>
20q12-13.1	Del	39460	2547	XF1526	No	Paterna
22q11	Dup	17276	1954	CGM2103	Si	Paterna

Resultados

Siete de las nueve variantes fueron heredadas de uno de los progenitores, los cuales no presentaban sintomatología o si la presentaban era poco acusada. Pero todas estas alteraciones han sido descritas recientemente por otros autores como patológicas de penetrancia incompleta (Shinawi et al., 2010; Ullmann et al., 2007; Girirajan et al., 2010; Alberti et al., 2007), a excepción de la variante 20q12-13. Esta última, se incluyó en este grupo por el tamaño de la alteración (2,5 Mb) y porque incluía a una gran cantidad de genes, alguno de ellos relacionados con procesos neurológicos, sin embargo el padre también es portador de la delección y no presentaba clínica alguna.

4.1.4. Variantes de dosis de significado incierto.

Después de realizar la búsqueda de la información acerca de las variantes de dosis encontradas, de realizar una revisión de los genes localizados en estas regiones y hacer estudios complementarios, se desconoce la posible repercusión fenotípica de 16 variantes de dosis diferentes (tabla 17) en 13 pacientes, dado que tres pacientes presentan dos alteraciones.

Tabla 17: Relación de todas las variantes de dosis de efecto desconocido, ordenadas por cromosoma y posición.

Banda	Tipo alter.	Posición inicial (kb)	Tamaño (kb)	Paciente	Herencia
5q13.2	Dup.	73237	723	CGM227	Paterna
6q14	Dup.	80423	385	CGM1427	<i>De novo</i>
7p14.1	Dup.	39814	326	X3159	
7q11.22	Del.	65733	2791	CGM912	<i>De novo</i>
16p13.12	Del.	15399	141	X3159	
17q12	Dup.	34663	88	CGM1427	<i>De novo</i>
19q13.41	Del.	58334	1	CGM1693	Materna
19q13.42	Dup.	61012	269	CGM1513	
19q13.43	Del.	62877	23	CGM659	Paterna
20q11	Dup.	29352	305	XF2711	
20q11	Dup.	29352	305	CGM1532	
Xp11.3	Dup.	42875	605	XF2761	Materna
Xp11.3	Dup.	43244	236	XF2085	
Xp22.2	Dup.	15916	408	CGM1606	Materna
Xq25	Del.	127012	2	X841	
Xq28	Del.	153786	427	CGM1606	<i>De novo</i>

5. RESUMEN DE LOS REORDENAMIENTOS PATOLÓGICOS DETECTADOS EN LA SERIE

Agrupando los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas, hemos detectado un total de 64 alteraciones patológicas en 51 pacientes. Esto supone que un 25,2% de los casos estudiados, siguiendo los criterios de inclusión de este estudio (DI asociada a rasgos dismórficos, anomalías congénitas o antecedentes familiares), presentan desequilibrios genómicos que se pueden considerar causantes de la patología. Además, en 13 casos se ha identificado al menos una variante de dosis no descrita previamente, cuya repercusión sobre el fenotipo se desconoce, por lo que el porcentaje de reordenamientos patológicos podría ser mayor.

Los reordenamientos identificados considerados patológicos, atendiendo a su localización cromosómica se pueden diferenciar en:

- Terminales, 9,9% de pacientes (20/202)
- Intersticiales, 15,3% de pacientes (31/202)

Con respecto a la herencia de estas CNVs patológicas, el 25,5% fueron heredadas de un progenitor, el 58,8% fueron *de novo*, mientras que el 15,7% restante fueron consecuencia de la transmisión desequilibrada de translocaciones equilibradas en los progenitores. Es decir, en un 41,2% de los casos el riesgo de recurrencia es muy alto.

En cuanto al origen de estas alteraciones:

- Alteraciones *de novo* (58,8%):
- 46,7% origen paterno.
 - 20,0% origen materno.
 - 33,3% origen desconocido.

- Alteraciones heredadas (25,5%):
- 38,5% paternas.
 - 61,5% maternas.

- Derivados de una translocación equilibrado en un progenitor (15,7%):
- 37,5% paternas.
 - 62,5% maternas.

Resultados

Tabla 18: Tabla-resumen de los resultados obtenidos del estudio de nuestra serie con las diferentes técnicas utilizadas.

Tabla-resumen de resultados.

Técnica utilizada	Nº Pacientes estudiados		Variantes detectadas (CNVs)				Pacientes con CNVs	
			Patológicas	Polimórficas	Artefactos técnicos	Variantes de efecto desconocido	Patológicos	No patológicos
FISH	34		8				4	0
MLPA	202	34 previamente estudiados por FISH	9	4			5	2
		168 no estudiados por FISH	21	14			15	14
Array-BACs	48 (2 con alteración detectada por MLPA)		6	15	13		6	22
Array-Oligonucl eotidios	202 (24 con alteraciones detectadas por las otras técnicas)		64	81		16	51	52

DISCUSIÓN

En los últimos años, tras la introducción de las técnicas que han permitido analizar pequeños desequilibrios a lo largo de todo el genoma, ha quedado demostrada la gran importancia que tienen estos reordenamientos genómicos en la etiología de la DI y una gran variedad de anomalías congénitas y rasgos dismórficos. Pero no sólo eso, con estos estudios de investigación se ha puesto de manifiesto la gran complejidad del genoma y la abundancia de variantes en número de copias que se encuentran en la población general y que aparentemente no se relacionan directamente con ninguna patología. Esto plantea serios problemas de interpretación en la aplicación de estas tecnologías a la práctica clínica.

1. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LAS VARIANTES DE DOSIS

Los criterios empleados para la interpretación de las variantes de dosis encontradas han sufrido una evolución a lo largo del transcurso de este trabajo, en parte por las evidencias encontradas en nuestra propia serie y por otra parte, por la creciente cantidad de información disponible en las bases de datos públicas.

Inicialmente nuestros criterios de clasificación se basaban en los criterios de la genética clásica argumentando que:

1.- "Una variante de dosis es patológica cuando ha surgido *de novo* en el paciente y polimórfica si ha sido heredada de un progenitor"

2.- "Una variante que presenta un tamaño mayor de 1 Mb es más probable que sea patológica que una variante de menor tamaño".

Posteriormente, cuando en el año 2006 se creó una base de datos en donde se recogían todas las variantes de dosis detectadas en individuos de población general "Database of Genomic Variants" (<http://projects.tcag.ca/variation/>), basamos nuestra interpretación en otro argumento más:

3.-"Una variante es polimórfica cuando se ha descrito en población general".

Con el tiempo y el acúmulo de evidencias experimentales, se ha puesto de manifiesto que ninguno de estos argumentos utilizados inicialmente son ciertos en todos los casos. Existen ejemplos, tanto en la literatura como en nuestra serie de pacientes, que ponen en duda su utilización como criterios únicos o universales.

En primer lugar, no todas las variantes de dosis heredadas de un progenitor sano son polimórficas. En nuestra serie encontramos varios los ejemplos:

Discusión

- Cuatro pacientes varones con variantes de dosis patológicas en el cromosoma X heredado de su madre. En estos casos, la ausencia de clínica en las madres se debe a la inactivación preferencial del cromosoma X alterado, mientras los varones, puesto que sólo poseen un cromosoma X, carecen de cualquier mecanismo de compensación.
- Tres pacientes con duplicación 16p11 y dos pacientes con duplicación 16p13, todas ellas heredadas de un progenitor sano. Las cuales, en un primer momento fueron clasificadas como variantes polimórficas, por ser heredadas y estar descritas en población general en la base de datos de “Duplicaciones Segmentarias”. Posteriormente, tras la publicación de diferentes trabajos en los que relacionaban dichas variantes con discapacidad intelectual y autismo (Ullmann et al., 2007; Bijlsma et al., 2009; Hempel et al., 2009; Girirajan et al., 2010; Tropeano et al., 2013), se reinterpretaron estas variantes comparando la clínica y los antecedentes familiares de nuestros pacientes, con los descritos en dichas publicaciones, llegando a la conclusión que aunque fueran heredadas de un progenitor sano y/o estuvieran descritas en población general, eran variantes patológicas de penetrancia incompleta.
- Un paciente con duplicación 22q11 heredada de un progenitor sano. Dicha duplicación esta descrita como síndrome (OMIM: 608363) con un fenotipo muy variable que abarca desde la normalidad hasta una presentación clínica con múltiples anomalías y DI severa. (Ensenauer et al., 2003).
- Una paciente con delección en 15q23 heredada de su madre. La revisión de la región deleccionada, puso de manifiesto la presencia de un elemento ultraconservado. Los elementos ultraconservados (UCEs) son secuencias de ADN de al menos 200 pb que se muestran idénticas entre ratas, ratones y humanos. Estos UCEs se asocian a regiones altamente conservadas con presencia de genes sensibles a dosis que pueden causar DI (Martinez et al., 2010). Por ello, se realizó una revisión de la historia clínica, detectando que la madre de nuestra paciente presentaba DI leve, por lo que consideramos la delección patológica de expresividad variable.

Concretamente en nuestra serie, de los 51 pacientes con alteraciones consideradas patológicas, en 13 casos se trata de alteraciones que han sido heredadas de un progenitor sano, lo que representa un 25,5%.

Así mismo, no todas las CNVs *de novo* pueden considerarse patológicas. En nuestra serie hemos detectado 10 pacientes con CNVs *de novo* que por la ausencia de genes relacionados con la clínica del paciente, han sido consideradas polimórficas. El porcentaje de variantes detectadas de este tipo es bajo (8% en nuestra serie), aunque dicha cifra se encuentra sesgada, ya que no se ha estudiado la herencia de las CNVs claramente polimórficas descritas en población general. Aun así, la detección de estas variantes *de*

novo polimórficas, apoya el hecho de que una CNV no es patológica simplemente por ser *de novo*. Además, la cifra observada se encuentra dentro de las estimaciones recientes sobre la tasa de CNVs *de novo* en todo el genoma (Itsara et al., 2010).

En segundo lugar, respecto al tamaño de las variantes, se han detectado CNVs polimórficas con un tamaño mayor de 1 Mb y CNVs patológicas menores de 600 kb.

El tamaño promedio de las variantes polimórficas detectadas en nuestra serie es de 178,4 kb (rango 0,149 a 1.325 kb). La mayoría de CNVs polimórficas de mayor tamaño se detectaron mediante el *array* de BACs. Esto se debe al mayor tamaño que presentan las sondas BACs que constituyen este tipo de *array* así como a su menor resolución. Realmente los resultados obtenidos mediante *arrays* basados en BACs están sobredimensionados por la propia naturaleza de las sondas. Este fenómeno también lo observamos en las CNVs polimórficas descritas inicialmente, las cuales fueron detectadas por *arrays* basados en BACs. Muchas de estas CNVs actualmente han desaparecido de las bases de datos, o se describen con un tamaño menor, puesto que mediante *arrays* de oligonucleótidos o de SNPs se ha visto que dichas CNVs presentan un menor tamaño. En cuanto a las CNVs polimórficas detectadas por el *array* de oligonucleótidos, presentan un tamaño menor (rango 149 pb a 600 kb), con la excepción de la CNV de 1,3 Mb en la región Xp22.31 descrita como variante polimórfica (Faletra et al., 2012). Así pues, en nuestra serie encontramos un 2% (2 de 96) de CNVs polimórficas mayores de 1 Mb, una de ellas detectada mediante el *array* de BACs (duplicación de 1,1 Mb en la región 9p12 descrita en población general por Sebat et al., 2004), y la otra comentada anteriormente en la región Xp22.31.

Por otro lado, aunque la mayoría de las variantes patológicas detectadas en nuestra serie presentan un tamaño mayor de 1 Mb, el 14% (9 de 64) presentan un tamaño menor de 600 kb. Por tanto, en base a nuestros resultados, podemos concluir que el criterio de clasificación por tamaños por sí solo, no es suficiente para clasificar las CNVs en polimórficas o patológicas y siempre se debe revisar los genes implicados en cada alteración.

En tercer lugar, no todas las variantes descritas en población general han de considerarse polimórficas. La presencia de variantes de dosis de duplicación en las regiones 16p11.1 y 16p13 en población general no significa que necesariamente sean variantes inocuas. La frecuencia de dichas variantes en población control se encuentra en 0,01% y 0,1% respectivamente (Kumar et al., 2008; Weiss et al., 2008; Shinawi et al., 2010; Ullman et al., 2007;

Discusión

Hannes et al., 2009; Kirov et al., 2009; Williams et al., 2010) mientras que en nuestra serie las hemos encontrado con frecuencias de 2% y 1% respectivamente, frecuencias estadísticamente superiores a las de la población general ($p < 0,006$). Nuestros resultados concuerdan con otras series publicadas de microduplicaciones 16p11.1 y 16p13 (Weiss et al., 2008; Hannes et al., 2009; Mefford et al., 2009) en las que detectan una frecuencia de un 1% y 0,8% en pacientes con DI.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que las primeras CNVs descritas en población general se detectaron mediante *arrays* de BACs. Este tipo de *arrays* está constituido por sondas que presentan un tamaño de hasta 1 Mb, de tal forma que probablemente el tamaño de las variantes detectadas mediante este tipo de *arrays*, como se ha comentado anteriormente, esté sobredimensionado. Ello también ocasionó errores en la interpretación debido a que las CNVs descritas eran muy grandes y abarcaban muchos genes, incluso genes sensibles a dosis implicados en el desarrollo neuronal o descritos como patológicos. Un ejemplo para ilustrar esto es el caso CGM165 que presenta una microdelección en 22q13, la cual, en un primer momento se consideró como una CNV polimórfica, dada la gran cantidad de variantes de dosis descritas en población general (Wong et al., 2007; Redon et al., 2006; Iafrate et al., 2004). Sin embargo, en esta región se encuentra el gen *SHANK3* (también llamado *ProSAP2*). La proteína shank3 juega un papel importante en el funcionamiento de la sinapsis, garantizando que las señales enviadas por una neurona sean recibidas por la otra. Además está involucrada en la formación y maduración de las espinas dendríticas. El gen *SHANK3* localizado en la región delecionada fue descrito como gen responsable del Síndrome de deleción 22q13 (Durand et al., 2007). Así pues, se modificó la interpretación inicial y se consideró que la microdelección era la causante de la patología de la paciente. Actualmente, la región 22q13 sigue presentando este cúmulo de CNVs polimórficas en la base de datos de duplicaciones segmentarias, por lo que debemos tener en cuenta que no podemos dar de variante polimórfica una CNV descrita en población general, sin antes revisar los genes y comprobar que dichos genes no son sensibles a dosis, ni presentan funciones relacionadas con la clínica del paciente.

Por último, también se ha puesto de manifiesto la gran importancia de caracterizar las alteraciones detectadas, para poder dar un diagnóstico correcto y un buen asesoramiento genético a los progenitores. Un ejemplo de ello fueron los pacientes que tenemos clasificados como Tipo III en las alteraciones subteloméricas (CGM1313 y CGM1525). En ambos pacientes detectamos una deleción subtelomérica mediante la técnica de MLPA. Después de la caracterización de estas deleciones, pudimos ver que no eran

deleciones puras, sino que se trataba de reordenamientos más complejos del tipo inversión-delección-duplicación (invdupdel). Este tipo de reordenamientos fue descrito por Floridia y colaboradores en 1996. Estudios realizados para comprender los mecanismos moleculares que causan estos reordenamientos indican que en los puntos de corte, se encuentran dos familias de genes de receptores olfativos. Las madres de los pacientes con este tipo de reordenamientos presentan una inversión polimórfica de esos receptores. Esta inversión, en el caso del cromosoma 8, presenta una prevalencia en mujeres del 26%, pero justamente en las madres de los individuos con invdupdel estudiados, se encuentra con una prevalencia del 100% (Giglio *et al.* 2001, Shimokawa *et al.* 2004). De ahí que se pueda sugerir que la inversión materna predispone al reordenamiento desequilibrado en su descendencia, aunque como indica Giglio (2001) el riesgo de recurrencia para una mujer con la inversión polimórfica no será muy alto puesto que la prevalencia de la inversión en las mujeres es alta y la prevalencia estimada de niños nacidos vivos con invdupdel (8p) es de 1/10.000-30.000. Además, dependiendo del tamaño de ambas alteraciones y de los genes que estén incluidos en ellas, la clínica de los pacientes puede variar considerablemente. En el caso de la invdupdel del cromosoma 4p, la clínica de los pacientes es diferente si los genes *WHSC1*, *WHSC2* y *LETM1* están delecionados (síndrome de Wolf-Hirschhorn), o si estos genes están duplicados (síndrome de duplicación 4p) (Roselló *et al.*, 2009).

Todo ello hizo que elaboráramos un protocolo de revisión de las alteraciones, ampliando los estudios complementarios e incluyendo otros criterios de clasificación para las variantes de número de copias, como la búsqueda en bases de datos o publicaciones de nuevos síndromes descritos con variantes iguales o similares, la recopilación de toda la información posible de los genes incluidos en la región, su función biológica, el patrón de expresión, la presencia de elementos ultraconservados y la búsqueda y comparación de rasgos clínicos de otros casos descritos con la misma alteración (ver en material y métodos 7.5).

Paralelamente, diversos grupos de investigación han llegado a las mismas conclusiones, por lo que actualmente los criterios y el algoritmo utilizando para clasificar las alteraciones encontradas mediante estas técnicas y la interpretación de los resultados (figura 72) son muy similares a los descritos y utilizados por otros grupos independientes (Hanemaaijer *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007).

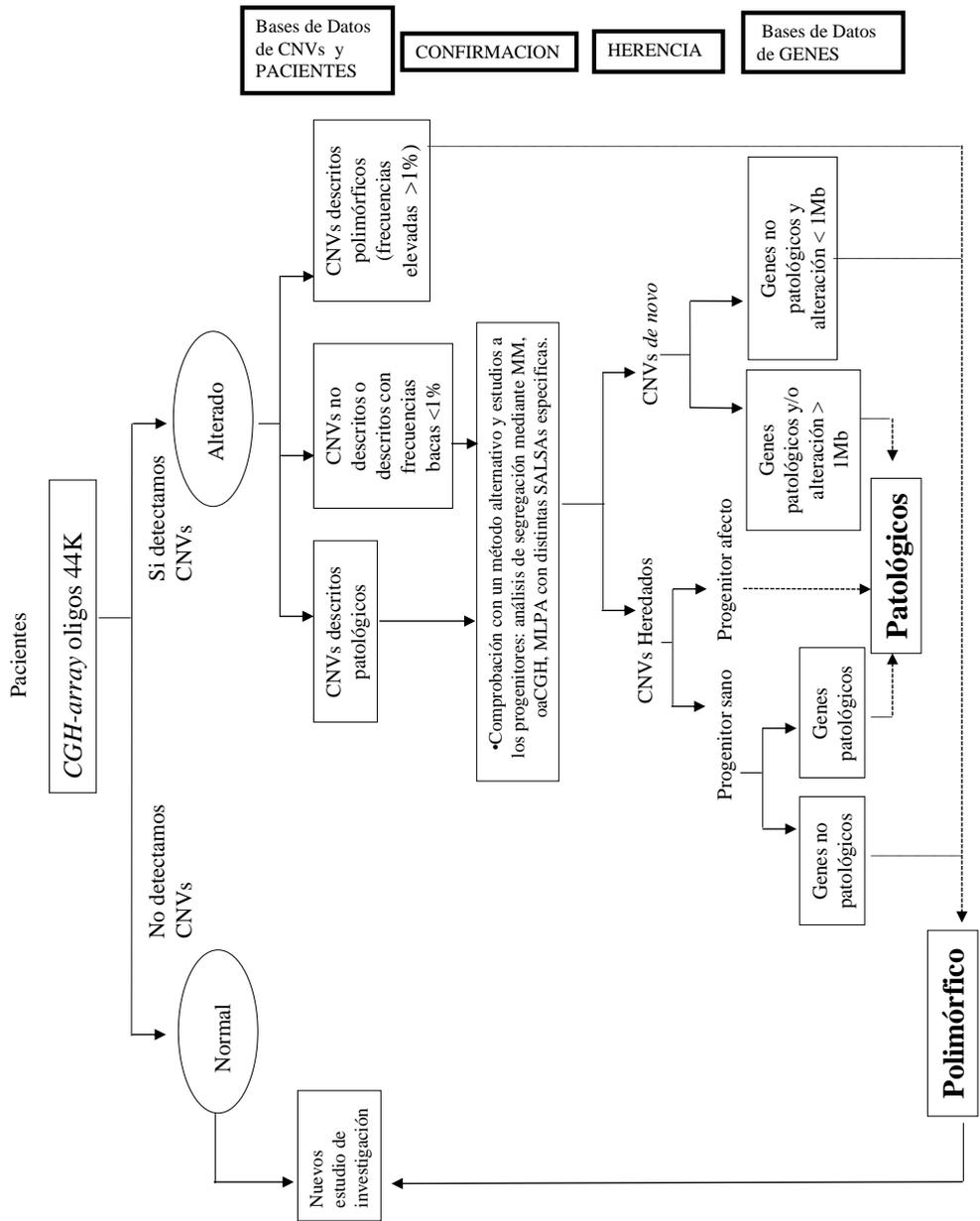


Figura 72: Algoritmo de trabajo diseñado a partir de las conclusiones obtenidas de los criterios de clasificación de este trabajo. Actualmente es utilizado para clasificar las CNVs detectadas mediante estas técnicas.

2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA LA DETECCIÓN DE ALTERACIONES PATOLÓGICAS

Puesto que las diferentes tecnologías empleadas en este trabajo presentan naturaleza y resolución diferentes, la utilidad diagnóstica de cada una de ellas será distinta. Para poder valorar qué técnica puede ser la más idónea para la detección de variantes de dosis patológicas en pacientes con DI, se calculó la sensibilidad y especificidad de cada una de las técnicas utilizadas, basándonos en el conjunto de datos disponibles.

Definimos:

- Casos: Individuos con CNVs patológicas.
 - Verdadero positivo (VP): CNVs detectadas con la técnica en cuestión.
 - Falso negativo (FN): CNVs no detectadas por esta técnica.
- Controles: Individuos sin CNVs patológicas.
 - Falso positivo (FP): CNVs polimórficas detectadas.
 - Verdadero negativo (VN): sin CNVs detectadas.

Nota: En el caso de que un individuo tenga una alteración patológica y una polimórfica o de significado incierto, el individuo se considerará como verdadero positivo (VP) a efectos de estos cálculos. Además las variantes de efecto desconocido, se consideran como falsos positivos (FP) siendo conscientes de que alguna de ellas posteriormente pueda interpretarse como patológica.

Sensibilidad= $VP/(VP+FN)$

Especificidad= $VN/(VN+FP)$

2.1 FISH

En nuestro trabajo, mediante esta técnica se estudiaron los primeros 34 pacientes de la serie. Se encontraron ocho variantes de dosis en cuatro pacientes. Estos cuatro pacientes presentaban un cromosoma derivado con pérdida y ganancia de regiones cromosómicas relativamente grandes. En un caso el cromosoma derivado surgió *de novo* y en los otros tres dicho cromosoma fue heredado de forma desequilibrada de un progenitor portador de translocación equilibrada.

No se encontró ningún paciente con CNVs consideradas polimórficas. Pero entre estos 34 pacientes se encontraban cinco que presentaban variantes de dosis patológicas intersticiales, que no se detectaron, puesto que no implicaban a las regiones subtelo méricas. Por tanto observamos que la sensibilidad de la técnica para la detección de reordenamientos genómicos se

Discusión

encuentra por debajo del 44,4% con un intervalo de confianza muy amplio tabla 19.

Tabla 19: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de FISH.

FISH	Casos (CNVs Patológicas)	Controles (no CNVs patológicas)	Total
Positivo	4	0	4
Negativo	5	25	30
Total	9	25	34

% detección de individuos patológicos: 11,7

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	44,44	6,43	82,46
Especificidad (%)	100,00	98,00	100,00

La alta especificidad (>98%), nos indica que dicha técnica no detecta falsos positivos, es decir, CNVs polimórficas. Pero en la bibliografía se han descrito CNVs polimórficas en las regiones subteloméricas. Estas presentan una frecuencia de alrededor del 1% (Knight y Flint, 2000; Jalal et al., 2003, Adeyinka et al., 2005). La más frecuente es la delección 2pter, detectada en algunos trabajos con una frecuencia del 1,6% (Baker et al., 2002), pero dicha CNV polimórfica no se detecta mediante el kit de sondas Vysis utilizado en este trabajo. Otras variantes polimórficas subteloméricas descritas como deleciones en 3pter, 4qter, 7pter, 10qter y duplicaciones de 8pter y 10qter, presentan frecuencias menores del 0,5% (Ravnan et al., 2006). El hecho de no encontrar en nuestra serie ninguna de estas variantes se puede explicar, por una parte, porque los polimorfismos en estas regiones son poco frecuentes, y por otra parte, por el diseño de las sondas utilizadas, las cuales en el kit de Vysis se sitúan en regiones poco polimórficas.

2.2 MLPA

Mediante esta técnica se estudió el total de pacientes de la serie (202 individuos). Se encontraron 48 CNVs en 36 individuos (9 individuos presentaban 2 variantes, 1 individuo presentaba 4 variantes y 26 individuos presentaban 1 variante). De todas estas CNVs, 18 fueron consideradas polimórficas. Estas variantes polimórficas encontradas en 16 pacientes, fueron encontradas por una SALSA y no fueron confirmadas por la SALSA complementaria. Además la mayoría de estas variantes fueron heredadas de uno de los progenitores sanos. Las 30 variantes restantes pertenecientes a 20

pacientes, se consideraron todas ellas patológicas. El hecho de haber surgido *de novo* en los pacientes y de estar relacionadas con la patología de síndromes concretos o de incluir genes relacionados con el desarrollo neuronal, apoya el carácter patológico de estas variantes. Sin embargo, entre los pacientes considerados normales, se encontraban 32 pacientes que presentaban CNVs intersticiales patológicas. Estas variantes no fueron detectadas por esta técnica puesto que, al igual que el FISH subtelo mérico, sólo detecta alteraciones que implican a las regiones subtelo méricas. La sensibilidad y especificidad se señalan en la tabla 20.

Tabla 20: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de MLPA.

MLPA	Casos (CNVs Patológicas)	Controles (no CNVs patológicas)	Total
Positivo	20	16	36
Negativo	32	134	166
Total	52	150	202

% detección de individuos con alteraciones patológicas: 9,9

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	38,46	24,28	52,65
Especificidad (%)	89,33	84,08	94,61

2.3 Comparación MLPA vs FISH

Podemos observar que los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad del MLPA son muy similares a los obtenidos mediante la técnica de FISH subtelo mérico. Aunque debido al escaso número de pacientes estudiados por FISH, el intervalo de confianza de la sensibilidad es muy amplio.

Por MLPA se detectaron variantes de dosis no detectadas por FISH (tabla 7): del 2q, del 6p y dup Xp (SALSA P019), del 11p, dup 10q, del 8p, dup 1q, dup 13q (SALSA P036), y dup “14p” (SALSA P020 y SALSA P036). Todas estas variantes, excepto la dup “14p”, se observaron sólo con una de las SALSAs de MLPA subtelo mérico empleadas P036 o P070. Esto se puede explicar por la diferencia de tamaño de las sondas FISH con respecto a las sondas de MLPA. Las sondas FISH presentan un tamaño de entre 100 y 300 kb, mientras que las sondas MLPA entre 40 y 60 pb. En este sentido, la técnica de MLPA puede verse más afectada por la presencia de SNPs o pequeñas CNVs en las regiones de hibridación de las sondas por la longitud

Discusión

de la secuencia que hibrida al ADN. De la misma forma, se puede explicar cualquier divergencia entre los dos kits (SALSAs) de sondas de MLPA. Además, todas las alteraciones de dosis detectadas con una sonda MLPA estaban presentes en los padres fenotípicamente normales o fueron observadas en una serie de controles normales. Por todo ello concluimos que las variantes detectadas con una sola sonda eran variantes polimórficas sin repercusión fenotípica.

Por otra parte, la duplicación “14p”, no detectada previamente por FISH, fue detectada con los dos kits (SALSAs) de MLPA en el paciente CGM991 pero no en sus padres (la falsa paternidad fue excluida por el análisis de marcadores microsatélite). Pero hay que recordar que la secuencia de la sonda “14p” se une a una región subcentromérica en el brazo largo del cromosoma 14, región no analizada por FISH subtelomérico.

El hecho de encontrar CNVs consideradas polimórficas con algunas sondas de diferentes SALSAs, ha condicionado a que continuamente se estén mejorando las sondas de las SALSAs para reducir el número de variantes polimórficas detectadas. Por tanto, en este sentido, se puede afirmar que la especificidad de la técnica de MLPA va mejorando gradualmente (www.mrc-holland.com).

Con respecto a la detección de desequilibrios en todo el genoma, observamos que las dos técnicas presentan sensibilidades parecidas (alrededor de 40%). Esta similitud se explica por el tipo de alteraciones que pueden ser detectadas mediante estas dos técnicas, siendo ambas capaces de detectar todas las variantes patológicas que implican a las regiones subteloméricas. Sin embargo, debido a esta focalización en las regiones analizadas, un 60% de las variantes de dosis patológicas en el genoma quedan sin diagnosticar.

Basándonos en nuestros resultados y nuestra experiencia, proponemos la técnica MLPA como técnica de rastreo de reordenamientos subteloméricos ya que es más barata, menos laboriosa y más susceptible de poder ser automatizada en la parte del análisis. A su vez, cuando se hayan detectado desequilibrios patológicos por MLPA será necesario utilizar la técnica de FISH para estudiar a los progenitores puesto que una proporción importante de estos (cercano al 50%) pueden ser portadores de una translocación subtelomérica equilibrada.

Además, la técnica del FISH también es necesaria para poder detectar translocaciones insercionales y posteriormente los portadores equilibrados de este tipo de translocaciones. Las translocaciones insercionales (TIs)

consisten en la inserción de parte de un cromosoma en otro no homólogo si son intercromosómicas, o en otra parte del mismo cromosoma si son intracromosómicas (Van Hemel and Eussen, 2000). En nuestra serie de pacientes hemos detectado dos casos de translocaciones insercionales desequilibradas en pacientes que a priori presentaban una alteración *de novo*, gracias a la aplicación de la técnica de FISH mediante sondas específicas de la región.

El primer caso fue el paciente XF977 ya comentado en el apartado de resultados, el cual presenta una TI desequilibrada. En el estudio familiar se pudo comprobar la existencia de otros seis portadores de la TI equilibrada y otros dos casos con DI que presentaban el cromosoma 19 derivado de la TI con la duplicación (TI desequilibrada). El segundo caso se trata del paciente XF2019 que presenta una duplicación de 3 Mb del cromosoma 8 detectada por el *array* de BACs. Dicha duplicación se había considerado *de novo* puesto que los progenitores no la presentaban. A su vez este paciente era portador de una translocación aparentemente equilibrada entre los cromosomas 4 y 7 heredada de su padre, que inicialmente se pensó que no guardaba relación con la duplicación del cromosoma 8 responsable de la patología que presentaba. El estudio mediante FISH con sondas específicas de la región (RP11-1007I7, RP11-668C3) puso de manifiesto que el fragmento duplicado del cromosoma 8 estaba insertado en el cromosoma derivado de la traslocación 4;7. Se realizó este mismo estudio al padre y se comprobó que la señal del fragmento duplicado en su hijo, estaba presente en uno de los cromosomas 8 y en el cromosoma derivado de la traslocación 4;7. Con todo ello, se llegó a la conclusión de que lo que aparentemente era una translocación equilibrada entre dos cromosomas, se trataba de una traslocación que implicaba a 3 cromosomas: una traslocación recíproca entre los cromosomas 4 y 7 con un segmento del cromosoma 8 insertado en el punto de translocación.

Con estos dos casos observamos que la utilidad de la técnica de FISH no se restringe a los reordenamientos subteloméricos, sino que también es muy útil en la detección de translocaciones insercionales. La proporción de reordenamientos intersticiales que pueden proceder de TI es actualmente desconocida pero este tipo de reordenamientos sólo se pueden detectar mediante la técnica de FISH.

2.4 CGH-array basado en BACs

Mediante este *array* se estudiaron los primeros 48 pacientes. En estos 48 pacientes se encontraron 34 variantes presentes en 28 individuos. De estas 34 CNVs 15 estaban descritas previamente por otros autores en población control, 6 se consideraron patológicas, y 13 fueron artefactos técnicos. Es decir, el 38,2% de las CNVs encontradas (13/34) fueron artefactos. Hay que tener en cuenta que la hibridación de estos *arrays* se realizó en un momento en el que esta tecnología estaba empezando y era un proceso mucho más manual de lo que es en el momento actual. Otro posible factor, pudo ser el criterio con el que definimos las alteraciones (dos clones consecutivos). Si hubiéramos utilizado el criterio de considerar alteración con tres clones consecutivos, el número de variantes detectadas hubiera sido de 20, disminuyendo el porcentaje de artefactos detectados al 15% (3/20), pero disminuyendo también la sensibilidad de detección de individuos con alteraciones patológicas (ver tablas 21 y 22).

Tabla 21: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de *array* basado en BACs considerando alteración a partir de 2 clones consecutivos alterados.

aCGH- BACS	Casos (CNVs Patológicas)	Controles (no CNVs patológicas)	Total
Positivo	6	22	28
Negativo	5	15	20
Total	11	37	48

% detección de individuos con alteraciones patológicas: 12,5

	Valor	IC (95%)	
-----	-----	-----	-----
Sensibilidad (%)	54,55	20,57	88,52
Especificidad (%)	40,54	23,37	57,71

Tabla 22: Alternativa de la tabla 2x2 para el cálculo de sensibilidad y especificidad cuando en la interpretación de los *arrays* basados en BACs se considera alteración si observamos tres clones consecutivos alterados.

aCGH- BACS	Casos (CNVs Patológicas)	Controles (no CNVs patológicas)	Total
Positivo	5	15	20
Negativo	6	22	28
Total	11	37	48

Se podría pensar que los *arrays* con artefactos eran *arrays* de peor calidad. Una forma de evaluar la calidad de la hibridación es mediante el número total de clones con valores alterados, asumiendo que los *arrays* con mayor número de clones alterados presentan una peor calidad de hibridación y un resultado menos fiable. Sin embargo, si observamos el número de clones alterados de los *arrays* con artefactos, no todos ellos son los de peor calidad (figura 73).

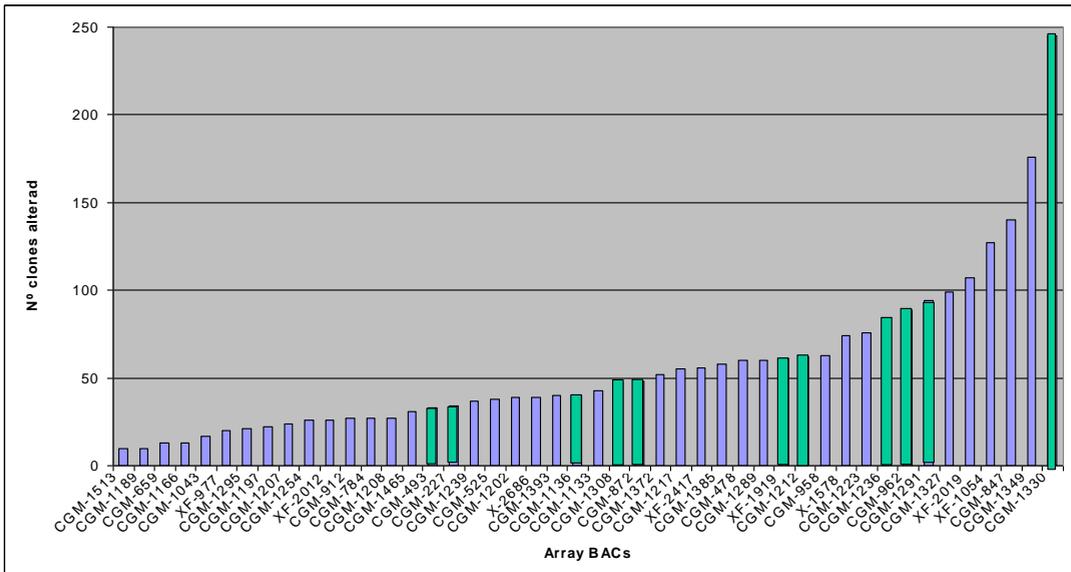


Figura 73: Representación mediante diagrama de barras del número de clones alterados en cada uno de los *array* de BACs estudiados a modo de control de calidad de la hibridación de los *arrays*.

En color verde se representan aquellos *arrays* que presentan una alteración artefactual.

Por otra parte, nos encontramos con que algunos de los cristales utilizados en esta serie, presentaban fallos de impresión de los BACs en algunas áreas del cristal. Aunque cada sonda se encuentra representada en tres réplicas localizadas en áreas distintas del *array*, estos defectos de impresión ocasionaron una cierta pérdida de fiabilidad.

Con todo ello, tanto por los artefactos como por las CNVs polimórficas detectadas, la especificidad del *array* utilizado fue del 40,54% (IC95% 23,37-57,71).

Discusión

En cuanto a la sensibilidad, observamos que se encuentra en el 54,55% (IC95% 20,57-88,52), mayor que las obtenidas por las técnicas anteriores. No obstante, la técnica de CGH-*array* basado en BACs es una técnica de rastreo de CNVs en todo el genoma, por lo que el valor de sensibilidad esperado era a priori mayor que con las técnicas de rastreo restringido a regiones subteloméricas.

2.5 CGH-*array* basado en oligonucleótidos

Mediante este *array* se estudiaron todos los pacientes incluidos en este trabajo (202 pacientes). Se encontraron en total 161 CNVs en 103 pacientes, confirmándose la condición patológica de 64 variantes (39,7%) presentes en 51 pacientes. De las variantes restantes, 81 fueron consideradas polimórficas presentes en 39 pacientes (51,2%), mientras que 16 variantes encontradas en 13 pacientes son de significado incierto (9,1%).

Como hemos comentado anteriormente, los pacientes que presentan variantes de efecto desconocido las consideramos como falsos positivos (FP) a efectos de este cálculo, puesto que no presenta una variante patológica. En este caso el resultado de la sensibilidad es el presentado en la tabla 23. Por otra parte, se calcularon estos mismos parámetros considerando las variantes de efecto desconocido como patológicas. La sensibilidad obtenida es la misma, pero aumenta un poco más la especificidad dado que disminuye el número de falsos positivos (tabla 24).

Tabla 23: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de *array* basado en oligonucleótidos considerando las variantes de efecto desconocido como no patológicas.

aoCGH	Casos (CNVs Patológicas)	Controles (no CNVs patológicas)	Total
Positivo	51	52	103
Negativo	1	98	99
Total	52	150	202

% detección de individuos con alteraciones patológicas: 25,24

	Valor	IC (95%)	
-----	-----	-----	-----
Sensibilidad (%)	98,08	93,38	100,00
Especificidad (%)	65,33	57,38	73,28

Tabla 24: Tabla 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de *array* basado en oligonucleótidos cuando consideramos las variantes de efecto desconocido como patológicas.

aoCGH	Casos (CNVs Patológicas)	Controles (no CNVs patológicas)	Total
Positivo	63	40	103
Negativo	1	98	99
Total	64	138	202

% detección de individuos con alteraciones patológicas: 31,68

	Valor	IC (95%)
Sensibilidad (%)	98,44	94,62 - 100,00
Especificidad (%)	71,02	63,08 - 78,95

Podemos observar que mediante esta técnica, la sensibilidad mejora notablemente hasta el 98% (IC95% 94-100) con respecto a todas las técnicas anteriores, mientras que la especificidad, en ambos calculos, mejora con respeto al *array* basado en BACs (tabla 23 y 24). En este caso, la sensibilidad obtenida no fue del 100% puesto que no se pudo detectar una ganancia de dosis en mosaico, correspondiente a una tetrasomía del brazo corto del cromosoma 12. Con posterioridad a su inclusión en este estudio, éste caso (CGM1236) fue diagnosticado en otro centro como síndrome de Pallister-Killian, mediante cariotipo en biopsia de piel. Debido a un efecto de selección negativa en células sanguíneas, que es el material de partida empleado para la extracción de ADN genómico, dicha tetrasomía no se detectó mediante ninguna de las tres técnicas. No obstante, tras conocer el hallazgo de esta tetrasomía 12p en mosaico en fibroblastos, se reevaluó el resultado obtenido con cada una de estas técnicas, MLPA, *CGH-array* basada en BACs y *CGH-array* basada en oligonucleótidos, para ver si se observaba un aumento de dosis de las sondas incluidas en esa región aunque no fuera significativo. Únicamente mediante la *CGH-array* basada en oligonucleótidos se pudo observar un aumento de dosis significativo para todas las sondas correspondientes al brazo corto del cromosoma 12, tras modificar los parámetros de análisis (algoritmo: ADM-1 threshold 12) detectándose dicha alteración. El algoritmo ADM-1 (Aberration Detection Method Algorithms) identifica los intervalos alterados en una muestra, dando unos log ratios consistentes altos o bajos en función de un umbral estadístico. En contraste con el algoritmo Z-score, el algoritmo de ADM no se basa en un tamaño de ventana, sino que realiza un muestreo de sondas adyacentes para llegar a una estimación robusta del verdadero alcance del segmento alterado.

Discusión

Después de encontrarnos con esta alteración en mosaico, se reanalizaron todos los arrays del mismo tipo mediante el algoritmo ADM-1. Se confirmaron las variantes patológicas detectadas, pero además se observó, en dos individuos, dos alteraciones nuevas, no detectadas con el algoritmo Z-score, puesto que los valores de las sondas no alcanzaban el umbral establecido. En el paciente X2403 se encontró una duplicación en 12p13.33 de 1Mb que fue confirmada mediante MLPA (SALSA P230-B1). Esta CNV fue heredada de un progenitor sano y no era compartida con su hermano que presentaba los mismos rasgos clínicos. Además, ninguno de los genes incluidos tenían relación con la clínica del paciente, por lo que se consideró como una variante polimórfica. En la paciente CGM708 se detectó un aumento de dosis para tres sondas en 18p11.2, que afecta a los genes *ANKRD12* y *RALBP1*. Esta alteración considerada de significado incierto se confirmó mediante un *array* a la carta con una alta densidad de sondas en estos genes.

2.6 Comparación de las técnicas de *array* basadas en BACs y oligonucleótidos

En cuanto a la sensibilidad de los dos *arrays* utilizados, observamos valores muy diferentes y esto se debe en primer lugar a que no presentan la misma resolución. Mediante el *array* de oligonucleótidos podemos detectar CNVs más pequeñas puesto que el nivel de resolución es mayor. Con el *array* basado en clones BACs el reordenamiento más pequeño fue de 300 kb mientras que con el *array* basado en oligonucleótidos se logró detectar CNVs de hasta 2 kb.

Si se comparan los resultados obtenidos en los 48 pacientes estudiados por ambos *arrays*, se observa que estos difieren de un *array* a otro, tanto en las CNVs polimórficas como en las patológicas. Ninguna de las CNVs polimórficas detectadas en el *array* de BACs se detectó en el *array* de oligos. Esto se puede explicar porque dichas regiones no se encuentran representadas en el *array* de oligonucleótidos, es decir, en el diseño del *array* de oligos no se localizan ningún oligonucleótido en estas regiones por su carácter polimórfico. Además encontramos en el *array* de oligonucleótidos 20 CNVs no detectadas por el *array* de BACs. De estas 20 CNVs, 4 son de significado incierto, 12 son CNVs polimórficas y 4 CNVs son patológicas. Las CNVs polimórficas y de significado incierto detectadas por el *array* de oligos son de un tamaño inferior al límite de resolución del *array* de BACs, razón por la cual no se detectaron. Las CNVs patológicas no detectadas por el *array* de BACs son 3 duplicaciones con tamaños de 5 Mb, 200 kb y 600 kb y una delección de 1,6 Mb. Por límite de resolución se hubieran podido detectar la duplicación de 5 Mb y la delección de 1,6 Mb. Al revisar la duplicación de 5 Mb en el *array* de BACs, se aprecia un ligero

aumento del valor en los BACs situados en la región duplicada, pero los valores no alcanzan el límite establecido (ver figura 74). En el caso de la deleción en 16p12.2 de 1,6 Mb del paciente CGM912, en el *array* de BACs la región se encuentra representada por dos BACs, de los cuales uno no presentaba un valor significativo (-0,196), pasando por tanto desapercibida. Además de presentar una menor resolución, otra limitación del *array* de BACs empleado es su diseño, más enfocado a los genes de importancia en oncología que en trastornos del neurodesarrollo. De esta forma se explica, por ejemplo, la ausencia de sondas específicas para el gen MECP2, por lo que pasaron desapercibidas mediante este *array* duplicaciones relativamente pequeñas, de unas 200 kb, que afectan a este gen.

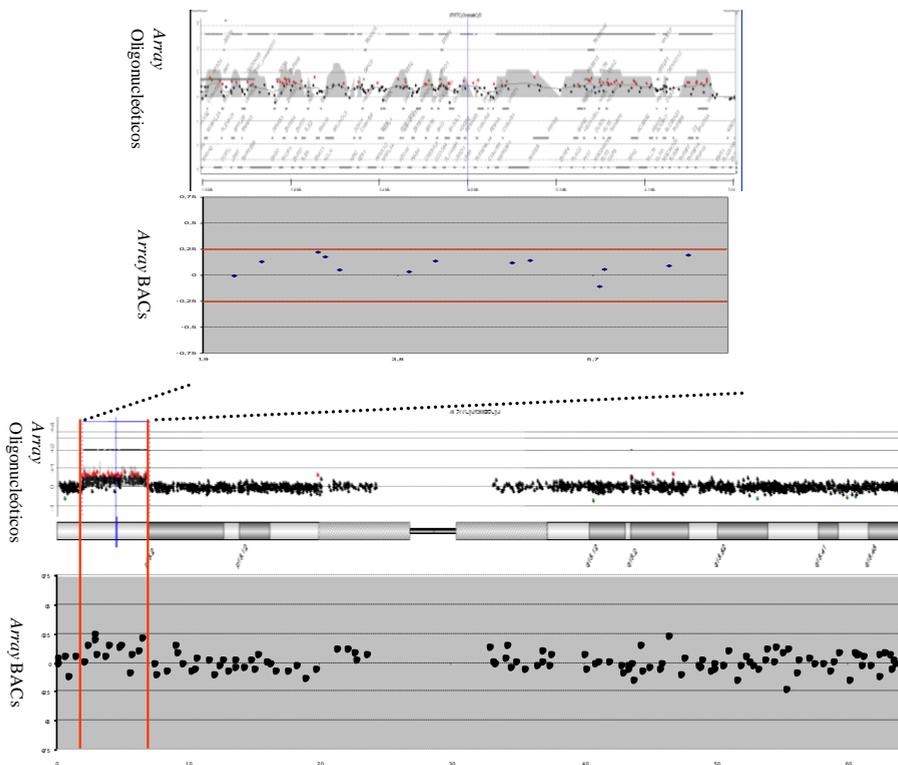


Figura 74: Comparación entre el resultado del *array* basado en BACs y el *array* basado en oligonucleótidos en el paciente XF977.

En la parte inferior de la figura se muestra el resultado obtenido en ambos *arrays* del cromosoma 19 en el paciente XF977. Mediante las barras rojas se acota la región duplicada que presenta el paciente, observándose como los clones del *array* de BACs no llegan al límite establecido para considerarse región duplicada. En la parte superior se presenta una ampliación de la región duplicada en ambos *arrays*.

Discusión

Con todo ello se concluye que la sensibilidad teórica dada por el límite de resolución del *array* de BACs utilizado en este trabajo no es la real, y que se pueden escapar alteraciones de un tamaño mayor de 1 Mb, especialmente las ganancias de dosis. Es por tanto evidente que los umbrales de detección establecidos a partir de las pruebas iniciales, que coinciden con los valores empleados habitualmente por otros grupos, se quedaron cortos. No obstante, hay que considerar que el empleo de valores menos restrictivos hubiera dado lugar por otra parte, a un notable incremento de artefactos y de falsos positivos.

Si nos centramos ahora en la especificidad, también observamos que el *array* de oligonucleótidos presenta una especificidad mayor. Esto se puede explicar en parte porque el *array* de oligonucleótidos es de diseño posterior. Los primeros *arrays* diseñados y utilizados fueron los *arrays* de BACs, y en base a los resultados obtenidos en estos estudios, se definieron aquellas regiones de mayor variabilidad en población general. Esto condicionó que en el diseño de *arrays* posteriores se excluyeran las sondas en regiones altamente polimórficas.

3. COSTE ECONÓMICO

Para poder realizar una valoración del coste económico, se realizó el cálculo del coste por prueba y diagnóstico asociado a cada técnica utilizada incluyendo coste de:

- Trabajo técnico: tiempo de dedicación al trabajo de laboratorio. Este tiempo se puede traducir económicamente como 20€/hora.
- Trabajo de interpretación: tiempo de dedicación a interpretar los resultados obtenidos en bruto. Este tiempo se puede traducir económicamente en 30€/hora.
- Trabajo pruebas complementarias: tiempo ponderado dedicado a realizar estudios de confirmación y estudios a los progenitores (25€/hora).
- Reactivos técnica: coste económico en euros de los reactivos y el material fungible necesarios para poder realizar la técnica.
- Reactivos pruebas complementarias: coste en euros que suponen los reactivos y fungible utilizados para realizar las pruebas complementarias.

El coste de las pruebas complementarias se calculó prorrateando el coste medio de los estudios complementarios por el porcentaje de casos alterados en cada técnica.

El cálculo total de cada una de las técnicas utilizadas en este trabajo para cada muestra se encuentra resumido en la tabla 25.

Tabla 25: Resumen del coste económico de cada una de las técnicas en euros por paciente.

	FISH subtelomérico	MLPA subtelomérico	Array-CGH basado en BACs	Array-CGH basado en oligonucleótidos
Trabajo técnico	100	50	150	100
Trabajo análisis e interpretación	75	12,5	200	100
Pruebas complementarias	8,25	7,5	65	62,5
Reactivos	115	40	350	400
Reactivos pruebas compl.	65,3	70	50	150
Coste económico total €/paciente	380,3	197,5	815	812,5

Calculado el coste por prueba y por paciente observamos que las técnicas de FISH y MLPA resultan mucho más económicas que los *arrays*, pero debemos tener en cuenta que estas técnicas solamente detectan aproximadamente un 40% de las alteraciones patológicas con nuestros criterios de inclusión.

Discusión

Si comparamos el coste de estas dos técnicas (FISH y MLPA) observamos que existe una diferencia de casi el doble, a pesar de que, como se ha comentado en material y métodos, en este trabajo se utilizaron portaobjetos de inmunofluorescencia con 8 pocillos, reduciendo así el volumen de sonda para la hibridación de cada paciente para reducir el coste económico de la técnica del FISH. No obstante, no se pudo reducir el tiempo con respecto al trabajo técnico y de interpretación. Así pues, la técnica de FISH subtelmérica ha dejado de utilizarse como técnica de rastreo, dejando paso a la técnica del MLPA. La diferencia de coste económico, de tiempo de realización y de análisis, que supone realizar la técnica de FISH es muy superior al de la técnica de MLPA.

En cuanto a los dos tipos de *arrays* utilizados, el coste económico total por muestra resultó ser muy similar. Presentando el *array* de BACs un mayor coste de trabajo técnico y de análisis e interpretación. El análisis de los *arrays* de BACs fue muy costoso debido a que el software de análisis era muy limitado, y había que revisar punto por punto la imagen de la hibridación para definir los puntos y eliminar el ruido de fondo. Por el contrario, el software utilizado para el *array* de oligos era mucho más automatizado.

Actualmente los *arrays* que se utilizan habitualmente son comerciales, mucho más automatizados tanto desde el punto de vista técnico como analítico, por lo que disminuye el coste técnico. Además, poco a poco, a la par que se están definiendo continuamente tanto nuevas CNVs patológicas asociadas a síndromes de microdelección o de microduplicación como CNVs polimórficas, se van incorporando estos datos en los distintos software de análisis, disminuyendo así el coste de interpretación de aquellas CNVs descritas.

4. FRECUENCIA DE REORDENAMIENTOS SUBMICROSCÓPICOS DETECTADOS CON CADA UNA DE LAS TÉCNICAS

4.1 FISH versus MLPA subteloméricos

En la detección de reordenamientos subteloméricos patológicos, el porcentaje de detección obtenido por las dos técnicas fue muy similar, 11,7% por FISH y 9,9% por MLPA, aunque el número de pacientes estudiados fuera diferente (34 y 202 individuos respectivamente). Estos porcentajes fueron muy similares a los obtenidos en otras series (Dawson et al., 2002; Wu et al., 2007; Hila et al., 2009; Pohovski et al., 2013) (tabla 26). Sin embargo, realizando una revisión de las diferentes series publicadas, vemos que el porcentaje de detección de individuos con alteraciones subteloméricas mediante una técnica u otra, es muy variable, oscila de 0 a 35,7% (tabla 26). Esta variabilidad entre unas series y otras, está relacionada con los criterios de selección de los pacientes incluidos en cada serie.

Trabajos como el de Joyce (2001) y Van Karnebeek (2002) en los que obtuvieron porcentajes de detección inferiores al 1%, incluyeron para su estudio pacientes con DI leve a los que se les había descartado alteraciones subteloméricas mediante cariotipo de alta resolución (850 bandas). En ambos trabajos, el cariotipo de alta resolución detectó alteraciones subteloméricas no detectadas mediante el cariotipo con nivel de resolución de 450 bandas.

En otros estudios como el de Ravnan (2006), Sismani (2001) o Stegmann (2008) en los que el único criterio de inclusión fue la DI o el retraso del desarrollo, se obtuvieron porcentajes de detección inferiores al 3%.

Ahora bien, en aquellos trabajos en los que además de la DI se tenía en cuenta el fenotipo cromosómico, las anomalías congénitas y los antecedentes familiares (como es nuestro caso), el porcentaje de detección era mucho mayor (entre 4-13%), asociándose los porcentajes más altos a aquellos trabajos que sólo incluían en el estudio pacientes con DI de moderada a severa. Así pues, todos los trabajos con criterios de inclusión comparables a los de nuestra serie, presentan un porcentaje de detección similar, a excepción del porcentaje detectado por Joly (2001) que excede a todos los demás. Esta serie de 17 pacientes pertenecían a 14 familias, además de ser corta, incluyen no sólo casos índice sino también algunos casos emparentados. Es muy probable que en esta serie tan reducida, los pacientes estuvieran muy seleccionados entre los que presentaban una clínica más grave y compleja.

Discusión

Tabla 26: Relación de series publicadas para la detección de reordenamientos subteloméricos en pacientes con DI y criterios de selección empleados.

Referencias	No de paciente estudiados	Porcentaje de detección	RD/MR	cromosómico	Anomalías congénitas Fenotipo	Antecedentes familiares	Técnica		
							Síndrome X-frágil Normal	Cariotipo normal	Antecedentes familiares
(Borgione et al., 2001)	30	6.6%	X	X	X		X		FSH
(Joyce et al., 2001)	200	0.0%	X*						
(Joly et al., 2001)	17	35.7%	X	X		X	X		
(Fan et al., 2001)	150	4.0%	X	X			X		
(Riegel et al., 2001)	254	5.0%	X*	X	X	X	X		
(Rossi et al., 2001)	200	6.0%	X*	X	X				
(Sismani et al., 2001)	70	1.4%	X*				X	X	
(Anderlid et al., 2002)	111	9.0%	X	X		X	X	X	
(Clarkson et al., 2002)	50	4.0%	X	X		X	X		
(Dawson et al., 2002)	40	10.0%	X				X	X	
(Helias-Rodzewicz et al., 2002)	33	9.0%	X*	X	X	X	X	X	
(Popp et al., 2002)	30	13.3%	X	X	X				
(van Karnebeek et al., 2002)	184	0.5%	X*				X		
(Hulley et al., 2003)	13	7.7%	X	X					
(Jalal et al., 2003)	372	6.8%	X	X		X			
(Pickard et al., 2004)	69	1.5%	X**						
(Walter et al., 2004)	50	10.0%	X*	X			X		
(Li et al., 2004)	46	4.4%	X*	X		X	X		
(Baroncini et al., 2005)	219	5.5%	X*			X	X	x	
(Cogulu et al., 2006)	30	3.3%	X			X		X	
(Erjavec-Skerget et al., 2006)	100	6.0%	X					X	
(Ravnan et al., 2006)	11688	2.6%	X*				X		
(Park et al., 2008)	100	1.0%	X*	X	X		X		
(Koolen et al., 2004)	210	6,7%	X*	X		X	X		
(Rooms et al., 2004)	75	5,2%	X*	X		X	X	X	
(Monfort et al., 2006)	95	10,0%	X	X	x	X	X	X	
(Wu et al., 2007)	39	10,0%	X	X		X	X	X	
(Stegmann et al., 2008)	466	3,0%	X*				X		
(Hila et al., 2009)	30	13,0%	X	X		X	X	X	
(Madrigal et al., 2010)	300	5,3%	X				X	X	
(Wu et al., 2010)	451	5,1%	X				X	X	
(Verdú Pérez et al., 2011)	200	4,5%	X	X			X	X	
(Pohovski et al., 2013)	150	7,3%	X	X			X	X	

X**.:DI leve

X*: DI de leve a moderado

X: DI de moderada a severa

Por tanto, el porcentaje de detección de las alteraciones subteloméricas no varía por el tipo de técnica utilizada para su detección, sino que depende de los criterios de inclusión de los pacientes en el estudio, consiguiendo

porcentajes de detección más altos cuando los pacientes presentan DI de moderada a severa, fenotipo cromosómico, anomalías congénitas y antecedentes familiares.

4.2 arrays BACs versus arrays Oligonucleótidos

Una de las diferencias que existen entre los dos *arrays* utilizados en este trabajo es la resolución que puede alcanzar cada uno de ellos. En el caso del *array* de BACs la resolución teórica es de 0,5-1 Mb, mientras que la del *array* de oligonucleótidos es de 50-150 kb. Esto podría explicar las diferencias en los resultados obtenidos en nuestra serie, en cuanto a la detección de alteraciones patológicas, siendo de 12,5% en el *array* basado en BACs y de 25,2% en el *array* basado en oligonucleótidos.

Para comparar nuestros resultados con los obtenidos en otras series publicadas, debemos tener en cuenta el tipo de *array* utilizado y el hecho de haber descartado previamente alteraciones subteloméricas en la serie de pacientes (tablas 27 y 28). En este trabajo hemos considerado únicamente aquellas series publicadas que utilizaban un *array* igual o similar al nuestro (*array* de BACs con resolución 1 Mb y *array* de oligonucleótidos 44k de Agilent)

En las diferentes series de *arrays* de BACs observamos que el porcentaje de detección de pacientes con alteraciones patológicas es muy variable. Y esta variabilidad no se relaciona con los criterios de inclusión de los pacientes, más bien la podemos relacionar con el tamaño muestral. Trabajos con un mayor porcentaje de detección presentan un menor tamaño muestral (Miyake et al., 2006; Aradhya et al., 2007). De nuevo, es muy probable que al tratarse de series muy reducidas exista un sesgo de selección hacia los casos con una presentación clínica más severa.

Discusión

Tabla 27: Relación de series publicadas para la detección de reordenamientos en todo el genoma en pacientes con discapacidad intelectual mediante arrays basados en BACs.

A) Pacientes a los que se les ha descartado previamente alteraciones subteloméricas.

Referencias Arrays BACs	Nº de pacientes estudiados	Pacientes con alteraciones patológicas (%)	Criterios de inclusión de pacientes							
			R/D/M/R	Fenotipo cromosómico	Anomalías congénitas	Antecedentes familiares	Cariotipo normal	Síndrome X-Frágil Normal	Problemas de comportamiento	Subteloméricas descartadas
(Shaw-Smith et al., 2004)	50	7 (14)	X	X		X	X		X	X
(Schoumans et al., 2005)	41	4 (9,8)	X	X	X	X	X			X
(Aradhya et al., 2007)	20	6 (30)	X	X			X	X		X
(Thuresson et al., 2007)	48	3 (6,3)	X		X		X			X
Total	159	20 (12,5)								
Serie propia	46	4 (8,7)	X	X	X	X	X	X		X

B) Pacientes a los que no se les ha descartado variantes de dosis subteloméricas.

Referencias Arrays BACs	Nº de pacientes estudiados	Pacientes con alteraciones patológicas (%)	Criterios de inclusión de pacientes							
			R/D/M/R	Fenotipo cromosómico	Anomalías congénitas	Antecedentes familiares	Cariotipo normal	Síndrome X-Frágil Normal	Problemas de comportamiento	Subteloméricas descartadas
(Vissers et al., 2003)	20	2 (10)	X	X	X		X			
(Menten et al., 2006)	140	19 (13,5)	X	X	X		X			
(Miyake et al., 2006)	30	5 (17)	X	X			X			
(Rosenberg et al., 2006)	81	13 (16)	X	X		X	X	X		
(Baris et al., 2007)	234	13 (5,6)	X	X	X			X		
(Pickering et al., 2008)	1101	85 (7,8)	X	X						
(Hayashi et al., 2011)	349	48 (13,8)	X	X			X			
Total	1955	185 (9,5)								
Serie propia*	48	6 (12,5)	X	X	X	X	X	X		

* La serie propia incluye alteraciones grandes subteloméricas estudiadas con este array.

En cuanto a las publicaciones de arrays de oligonucleótidos, el número de series publicadas mediante el array 44k de Agilent es reducido, pero con la excepción de la serie de Aradhya (2007), el resto de series presentan un

tamaño muestral y unos criterios de inclusión similares. Aun así, en los distintos estudios existen diferencias entre los resultados obtenidos. Si hacemos la media de los porcentajes de detección de las distintas series y la comparamos con el porcentaje de detección de nuestra serie, encontramos una diferencia estadísticamente significativa (Chi-cuadrado=15,73 p-valor=0,00007) cuando previamente no se descartan las alteraciones subteloméricas. Podríamos pensar que dicha diferencia se debe al criterio de inclusión de antecedentes familiares, puesto que únicamente nuestra serie contempla dicha selección y nuestros resultados indican que casi la mitad de los pacientes con alteraciones subteloméricas (40%), son derivados de una translocación en equilibrio en un progenitor sano, presentando todos ellos antecedentes familiares. Pero además, existen otros factores que influyen en la diferencia de detección de unos estudios a otros, y estos son los criterios de interpretación de las CNVs, como el número de sondas alteradas a partir del cual se considera una posible alteración, y la clasificación de las CNVs en patológicas o polimórficas. Cada estudio sigue unos criterios diferentes a la hora de designar qué es una CNV. En el estudio de Fan y colaboradores consideran CNVs cuando se encuentran alterados dos o más oligonucleótidos consecutivos (Fan et al., 2007), al igual que nosotros. Sin embargo, Shen (2007), Manolakos (2010) y Jaillard (2010) consideran CNVs a partir de 3 oligos consecutivos alterados, mientras que Siggber (2010) considera CNV a partir de 4 sondas consecutivas. En cuanto a la clasificación de estas CNVs en patológicas o polimórficas, también encontramos bastantes diferencias. Fan (2007) asume que las CNVs menores de 300 kb son benignas, descartándolas directamente como posibles CNVs patológicas, mientras que Manolakos o Jaillard excluyen automáticamente las CNVs descritas en la base de datos de variantes genómicas (<http://projects.tcag.ca/variation/>), sin ninguna revisión de los genes incluidos en ellas (Jaillard et al., 2010; Manolakos et al., 2010). Siggber (2010) considera CNVs polimórficas el 60% de las alteraciones detectadas por estar descritas previamente como polimórficas en las bases de datos o ser heredadas de un progenitor sano. Y Shen (2007) considera CNVs polimórficas nueve alteraciones detectadas menores de 50-200 kb por no presentar relación con la patología del paciente. En nuestro caso, el alto porcentaje de detección obtenido se puede explicar en parte por haber tenido en consideración todas las alteraciones encontradas que afectan dos oligonucleótidos consecutivos, y por el hecho de haber revisado en profundidad cada variante teniendo en cuenta los genes afectados y, la posible relación de estos con la clínica del paciente, a diferencia de otros trabajos en los que se han clasificado las variantes como polimórficas o benignas exclusivamente por su tamaño.

Discusión

Tabla 28: Relación de series publicadas para la detección de reordenamientos en todo el genoma en pacientes con discapacidad intelectual mediante *array* basado en oligonucleótidos 44K.

A) Pacientes a los que se les ha descartado previamente alteraciones subteloméricas.

Arrays Oligonucleótidos	Nº de pacientes estudiados	Pacientes con alteraciones patológicas (%)	Criterios de inclusión de pacientes							
			RDMR	Fenotipo cromosómico	Anomalías congénitas	Antecedentes familiares	Cariotipo normal	Síndrome X-frágil Normal	Problemas de comportamiento	Subteloméricas descartadas
(Aradhy et al., 2007)	20	7 (35)	X	X	X		X	X		X
(Manolakos et al., 2010)	82	3 (3,6)	X	X	X					X
(Jaillard et al., 2010)	132	19 (14,4)	X	X	X	X	X		X	X
Total	234	29 (12,4)								
Serie propia	178	27 (15,1)	X	X	X	X	X	X		X
Chi-cuadrado = 0,66 P-valor= 0,415										

B) Pacientes a los que no se les ha descartado variantes de dosis subteloméricas.

Arrays Oligonucleótidos	Nº de pacientes estudiados	Pacientes con alteraciones patológicas (%)	Criterios de inclusión de pacientes							
			RDMR	Fenotipo cromosómico	Anomalías congénitas	Antecedentes familiares	Cariotipo normal	Síndrome X-frágil Normal	Problemas de comportamiento	Subteloméricas descartadas
(Fan et al., 2007)	100	15 (15)	X	X	X		X	X	X	
(Shen et al., 2007)	211	16 (7,6)	X	X	X					
(Siggberg et al., 2010)	150	28 (18,6)	X	X	X					
Total	461	59 (12,8)								
Serie propia	202*	51 (25,2)	X	X	X	X	X			
Chi-cuadrado = 15,73 P-valor= 0,00007										

*valor obtenido del análisis de toda la serie mediante *CGH-array*, aunque en 24 casos se les había detectado una alteración subtelomérica.

5. DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES POR CROMOSOMA Y PACIENTE

Se observa que el 21,9% de los reordenamientos patológicos se encuentran en los cromosomas 16 y X, y un 15,4% en los cromosomas 1 y 2. El 62,5% restante se encuentra distribuido por todos los demás cromosomas a excepción del cromosoma 18 y el cromosoma Y, en los que no hemos encontrado en nuestra serie ninguna variante patológica (tabla 29).

Cuando comparamos el número de reordenamientos patológicos por cromosoma con respecto al tamaño de cada uno de ellos en una regresión lineal (figura 75), podemos apreciar un buen ajuste, es decir, que los reordenamientos patológicos en general se distribuyen de forma aleatoria por todo el genoma. En consecuencia, los cromosomas de mayor tamaño como el 1 y el 2 acumulan mayor número de alteraciones. Únicamente los cromosomas 16 y X quedan fuera del intervalo de confianza del 95%. Es decir, no se ajustan a la regresión, probablemente por ser los que contienen mayor número de alteraciones con penetrancia incompleta, facilitando la presencia de portadores sanos en la población.

Excluyendo estos dos cromosomas del análisis de la regresión (figura 76), podemos apreciar que el ajuste es mucho mayor (el R^2 pasa de 0,22 a 0,48) y vemos cómo el cromosoma 22, queda igualmente fuera del rango esperado.

Así pues, el número de CNVs patológicas por cromosoma depende básicamente de su tamaño, salvo en los cromosomas 16, 22 y X. Estas excepciones pudieran estar relacionadas con la frecuencia de portadores asintomáticos y/o con la presencia de duplicaciones segmentarias con una elevada predisposición a reordenamientos.

Discusión

Tabla 29: Relación del número de alteraciones no polimórficas detectadas en cada cromosoma en el total de la serie.

Cromosoma	Nº de alteraciones	Tamaño cromosoma (Mb)
1	5	249,25
2	5	243,2
3	3	198,02
4	3	191,2
5	3	180,9
6	3	171,1
7	1	159,2
8	4	146,3
9	3	141,2
10	1	135,5
11	2	135,0
12	2	133,8
13	3	115,2
14	2	107,3
15	2	102,5
16	7	90,3
17	1	81,2
18	0	78,1
19	1	59,1
20	1	63,0
21	1	48,1
22	4	51,3
X	7	155,3
Y	0	59,4

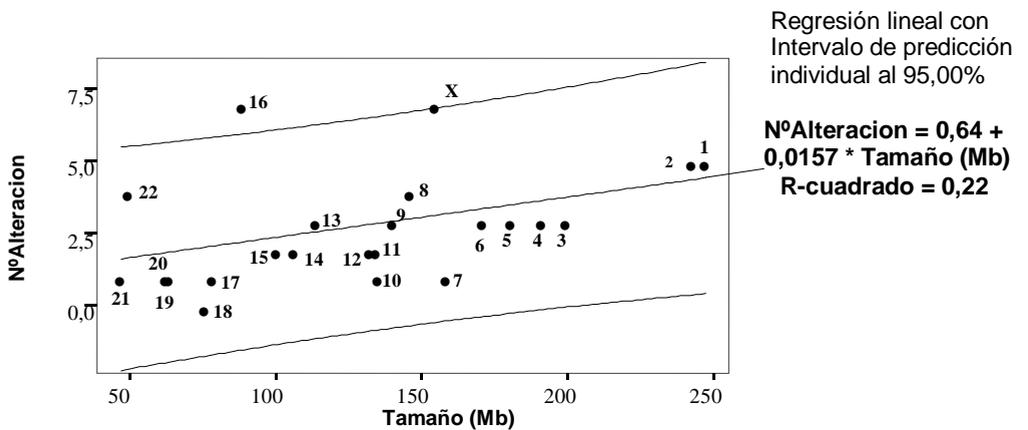


Figura 75: Regresión del número de alteraciones patológicas detectadas frente al tamaño del cromosoma.

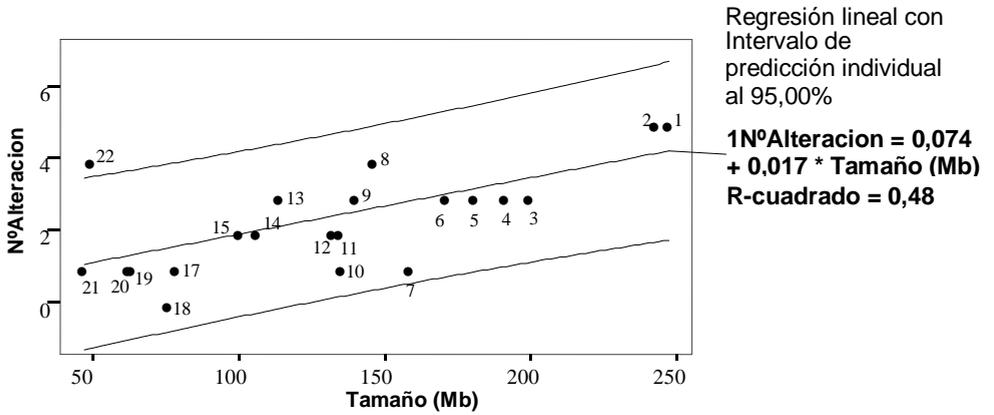


Figura 76: Regresión del número de alteraciones patológicas detectadas frente al tamaño del cromosoma, excluyendo los dos cromosomas con acúmulo de alteraciones patológicas de penetrancia incompleta (cromosoma 16 y X).

Por otra parte, al analizar el número de CNVs, tanto patológicas como polimórficas, detectadas en cada paciente (tabla 12, Resultados), observamos que existe un buen ajuste con el número esperado asumiendo una distribución de Poisson (tabla 30). No se aprecia un exceso significativo de pacientes con 3 o más CNVs ($\chi^2=0,14$; $p=0,29$), lo que se podría interpretar como que las variantes polimórficas, en general, no contribuyen significativamente al fenotipo del paciente. Por otra parte, llama la atención que entre las variantes de significado incierto, tres de los 13 pacientes que las presentan concentran dos variantes diferentes, mientras que un cuarto caso presenta además una CNV de penetrancia incompleta. En estos casos se podría suponer un efecto combinado entre las diferentes alteraciones.

Discusión

Tabla 30: Relación del número de CNVs presentes en los pacientes de nuestra serie y el número de pacientes esperados.

Nº Variantes de dosis	Nº observado pacientes	P (Poisson) *	Nº esperado pacientes
0	99	0.45066	91.03
1	63	0.359194	72.56
2	27	0.143144	28.92
3	11	0.03803	7.68
4	0	0.007578	1.53
5	1	0.001208	0.24
6	1	0.00016	0.03
0	99	0.45066	91.03
	202		202

* $\lambda=161 \text{ CNVs}/202 \text{ casos}=0,797$

6. DE LA INVESTIGACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA

Basándonos en los resultados obtenidos en nuestra serie de 202 pacientes, la técnica que nos permite identificar mayor número de variantes de dosis patológicas y diagnosticar la causa de un mayor número de pacientes con DI es la *CGH-array* basada en oligonucleótidos.

Cada vez está más extendida la idea de que la *CGH-array* debería sustituir al cariotipo a nivel asistencial para el diagnóstico etiológico de la discapacidad intelectual y las anomalías congénitas (Miller et al., 2010). Nosotros estamos básicamente convencidos de ello, pero también somos muy conscientes de la incertidumbre que existe alrededor de muchas regiones del genoma, por lo que la aplicación de estas técnicas, sobre todo su interpretación, no se puede hacer de forma indiscriminada, sin una preparación y experiencia consolidada.

El principal problema de utilizar dicha técnica para el diagnóstico clínico asistencial es la correcta interpretación de las CNVs detectadas. Aunque la información disponible en las bases de datos es cada vez más completa y detallada, todavía existen muchas regiones cuya interpretación es controvertida o desconocida.

A modo de ejemplo, la duplicación de 1,4 Mb en Xp22.31, que nosotros y otros autores (Baris et al., 2007) hemos considerado esta alteración como CNV polimórfica, puesto que se encuentra descrita en población general, es heredada de progenitores sanos y no se ha encontrado una relación entre los genes incluidos en dicha variante y la patología de la paciente, otros autores la consideran patológica (Wagenstaller et al., 2007) por presentarse con mayor frecuencia en población con DI con comportamientos autistas. Aunque dicha frecuencia no ha podido ser confirmada en otros trabajos (Feng et al., 2010).

Por otra parte, hay autores que descartan directamente todas las CNVs menores de 300 kb por considerarlas benignas. Pero este argumento hace que perdamos sensibilidad, pues alteraciones menores de 300 kb pueden contener genes patológicos como en el caso de nuestros pacientes CGM1330 y CGM2040 que presentan una duplicación menor de 300 kb que contiene el gen *MECP2* responsable del Síndrome de Rett, o el caso CGM165 que presenta una deleción en 22qter afectando al gen *SHANK3*. Al menos el 12% de los reordenamientos patológicos detectados en nuestra serie (6/51) presentan un tamaño menor o igual a 300 kb.

El conocimiento exacto de los genes que están delecionados o duplicados nos acerca a la base del problema, siendo un primer paso para plantear medidas terapéuticas o preventivas para algunos de los síntomas asociados. Por ello, para obtener un buen diagnóstico, debemos analizar cada CNV encontrada, realizando una búsqueda en bases de datos de nuevos síndromes

Discusión

descritos, recopilando toda la información de los genes incluidos en la región (función biológica, patrón de expresión, etc...), analizando todos los elementos genómicos existentes en dicha región, realizando una revisión bibliografía. Toda la información recogida se debe analizar en relación a las características clínicas de los pacientes, intentando establecer relaciones fenotipo-genotipo.

Por último, hay que tener siempre presente que el estudio de variantes en número de copias en todo el genoma cuenta con pocos años de historia, y que la interpretación biológica y por tanto la repercusión clínica de algunas variantes puede cambiar con el tiempo, como consecuencia de nuevos avances en el conocimiento del genoma.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. No existen criterios únicos con validez universal para establecer el carácter patológico o polimórfico de las variantes de número de copias (CNVs) que se detectan en los estudios a nivel genómico. No todas las variantes *de novo* son patológicas ni todas las heredadas son inocuas. El tamaño no es un criterio válido para clasificar estas variantes, si no se tienen en cuenta los genes afectados.
2. Es necesario revisar de forma crítica los datos contenidos en las bases de datos, sobre todo en lo relativo a las CNVs benignas descritas en población general.
3. La interpretación de la repercusión clínica de las CNVs es, hoy por hoy, muy dinámica. Esto se debe tener en cuenta a la hora de informar los resultados a la familia, recordando que dicha interpretación está sujeta al conocimiento disponible en cada momento.
4. La técnica MLPA es la técnica más indicada para el rastreo de reordenamientos subteloméricos de forma rápida, económica y sencilla, llegando a establecer un diagnóstico etiológico en hasta un 10% de los pacientes con discapacidad intelectual síndromica. Esto supone cerca del 40% de los reordenamientos genómicos asociados a DI.
5. La técnica de FISH es la única de las empleadas en este estudio, que permite detectar reordenamientos genómicos equilibrados, siendo dicha técnica necesaria para realizar estudios complementarios a los familiares y ofrecerles un asesoramiento genético adecuado.
6. Las duplicaciones y deleciones aparentemente *de novo* presentan un riesgo de recurrencia para los progenitores similar al de la población general. Sin embargo, se debe tener en cuenta la posibilidad de que exista una translocación insercional equilibrada en un progenitor sano, en cuyo caso el riesgo de recurrencia teórico es del 50%. Por ello, para ofrecer un asesoramiento genético adecuado sería recomendable caracterizar mediante técnicas de FISH con sondas específicas de *locus*, las duplicaciones y deleciones detectadas en los pacientes para detectar posibles translocaciones insercionales, especialmente en aquellos casos con antecedentes familiares.

7. La técnica de *CGH-array* es la más apropiada para la detección de reordenamientos genómicos desequilibrados en todo el genoma, siendo el *array* basado en oligonucleótidos el más sensible y específico de los empleados en este trabajo. Mediante esta técnica podemos llegar a identificar la causa de al menos el 25% de los pacientes con discapacidad intelectual asociada a anomalías congénitas.
8. La aplicación de criterios de análisis menos restrictivos, tales como considerar CNVs con 2 o más sondas, o valorar la presencia de mosaicismos, permite aumentar la sensibilidad del *array* de forma significativa. Aunque también disminuye la especificidad, siendo más compleja la interpretación de los resultados.
9. Las CNVs se encuentran uniformemente distribuidas a lo largo de todo el genoma, existiendo una relación directa entre el tamaño del cromosoma y el número de CNVs patológicas. Como excepción, los cromosomas 16, 22 y X presentan un mayor número de alteraciones patológicas de las que cabría esperar por su tamaño. Estas excepciones podrían estar relacionadas con la elevada frecuencia de portadores asintomáticos y/o con la presencia de duplicaciones segmentarias con una elevada predisposición a reordenamientos.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, Van Dyke DL, Jalal SM: Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. *Am J Med Genet A*. 135:28-35 (2005).

Alberti A, Romano C, Falco M, Cali F, Schinocca P, Galesi O, Spalletta A, Di Benedetto D, Fichera M: 1.5 Mb de novo 22q11.21 microduplication in a patient with cognitive deficits and dysmorphic facial features. *Clin Genet* 71:177-182 (2007).

Albertson DG, Pinkel D: Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2:R145-R152 (2003).

Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW: Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51:1229-1239 (1992).

Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M: Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 107:275-284 (2002).

Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM: Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A* 143A:1431-1441 (2007).

Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G: Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 28:605-609 (2000).

Atayar C, Kok K, Kluiver J, Bosga A, van den BE, van d, V, Blokzijl T, Harms G, Davelaar I, Sikkema-Raddatz B, Martin-Subero JJ, Siebert R, Poppema S, van den BA: BCL6 alternative breakpoint region break and homozygous deletion of 17q24 in the nodular lymphocyte predominance type of Hodgkin's lymphoma-derived cell line DEV. *Hum Pathol* 37:675-683 (2006).

Baker E, Hinton L, Callen DF, Atree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E, Haan E: Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet*. 107:285-293 (2002).

Ballarati L, Rossi E, Bonati MT, Gimelli S, Maraschio P, Finelli P, Giglio S, Lapi E, Bedeschi MF, Gueneri S, Arrigo G, Patricelli MG, Mattina T, Guzzardi O, Pecile V, Police A, Scarano G, Larizza L, Zuffardi O, Giardino D: 13q Deletion and central nervous system anomalies: further insights from karyotype-phenotype analyses of 14 patients. *J Med Genet* 44:e60 (2007).

Bibliografía

Baris HN, Tan WH, Kimonis VE, Irons MB: Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization in a clinical setting. *Am J Med Genet A* 143A:2523-2533 (2007).

Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F, Sensi A, Battaglia P, Aiello V, Calzolari E: FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Eur J Med Genet* 48:388-396 (2005).

Berg JS, Brunetti-Pierri N, Peters SU, Kang SH, Fong CT, Salamone J, Freedenberg D, Hannig VL, Prock LA, Miller DT, Raffalli P, Harris DJ, Erickson RP, Cunniff C, Clark GD, Blazo MA, Peiffer DA, Gunderson KL, Sahoo T, Patel A, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW: Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. *Genet Med* 9:427-441 (2007).

Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, Franssen van de Putte DE, Anderlid BM, Lundin J, Lapunzina P, Perez Jurado LA, Delle CB, Loeys B, Menten B, Oostra A, Verhelst H, Amor DJ, Bruno DL, van Essen AJ, Hordijk R, Sikkema-Raddatz B, Verbruggen KT, Jongmans MC, Pfundt R, Reeser HM, Breuning MH, Ruivenkamp CA: Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet* 52:77-87 (2009).

Bocian E, Helias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska-Kazmierczak A, Stankiewicz P, Kostyk E, Mazurczak T: Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. *Med Sci Monit* 10:CR143-CR151 (2004).

Boland E, Clayton-Smith J, Woo VG, McKee S, Manson FD, Medne L, Zackai E, Swanson EA, Fitzpatrick D, Millen KJ, Sherr EH, Dobyns WB, Black GC: Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet* 81:292-303 (2007).

Borgione E, Giudice ML, Galesi O, Castiglia L, Failla P, Romano C, Ragusa A, Fichera M: How microsatellite analysis can be exploited for subtelomeric chromosomal rearrangement analysis in mental retardation. *J Med Genet* 38:E1 (2001).

Brown WR, MacKinnon PJ, Villasante A, Spurr N, Buckle VJ, Dobson MJ: Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 63:119-132 (1990).

Bruder CE, Hirvela C, Tapia-Paez I, Fransson I, Segraves R, Hamilton G, Zhang XX, Evans DG, Wallace AJ, Baser ME, Zucman-Rossi J, Hergersberg M,

Boltshauser E, Papi L, Rouleau GA, Poptodorov G, Jordanova A, Rask-Andersen H, Kluwe L, Mautner V, Sainio M, Hung G, Mathiesen T, Moller C, Pulst SM, Harder H, Heiberg A, Honda M, Niimura M, Sahlen S, Blennow E, Albertson DG, Pinkel D, Dumanski JP: High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum Mol Genet* 10:271-282 (2001).

Buckland PR: Polymorphically duplicated genes: their relevance to phenotypic variation in humans. *Ann Med* 35:308-315 (2003).

Carvalho CM, Zhang F, Lupski JR.: Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genomic disorders: a window into human gene and genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*.107 Suppl 1:1765-1771 (2010).

Chiurazzi P, Hamel BC, Neri G: XLMR genes: update 2000. *Eur J Hum Genet* 9:71-81 (2001).

Clarkson B, Pavenski K, Dupuis L, Kennedy S, Meyn S, Nezarati MM, Nie G, Weksberg R, Withers S, Quercia N, Teebi AS, Teshima I: Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am J Med Genet* 107:267-274 (2002).

Clayton-Smith J, Walters S, Hobson E, Burkitt-Wright E, Smith R, Toutain A, Amiel J, Lyonnet S, Mansour S, Fitzpatrick D, Ciccone R, Ricca I, Zuffardi O, Donnai D: Xq28 duplication presenting with intestinal and bladder dysfunction and a distinctive facial appearance. *Eur J Hum Genet* 17:434-443 (2009).

Cogulu O, Gunduz C, Karaca E, Onay H, Ozkinay C, Ozkinay F: Chromosomal rearrangements in children with idiopathic mental retardation using subtelomeric fluorescent in situ hybridization. *Genet Couns* 17:321-331 (2006).

Colleaux L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C, Gosset P, Raoult O, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Le Merrer M, Picq M, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Cornelis F, Vekemans M, Munnich A: A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet* 9:319-327 (2001).

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* 72:468-477 (1997).

Dawson AJ, Putnam S, Schultz J, Riordan D, Prasad C, Greenberg CR, Chodirker BN, Mhanni AA, Chudley AE: Cryptic chromosome rearrangements detected by

Bibliografía

subtelomere assay in patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 62:488-494 (2002).

Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T: Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39:25-27 (2007).

Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet*. 73:1027-1040 (2003).

Erjavec-Skerget A, Stangler-Herodez S, Zagorac A, Zagradisnik B, Kokalj-Vokac N: Subtelomeric chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation: applicability of three molecular-cytogenetic methods. *Croat Med J* 47:841-850 (2006).

Faletta F, D'Adamo AP, Santa Rocca M, Carrozzini M, Perrone MD, Pecile V, Gasparini P: Does the 1.5 Mb microduplication in chromosome band Xp22.31 have a pathogenetic role? New contribution and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 158:461-464 (2012).

Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, Carver V, Benke P, Mundy P, Elsas LJ: Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat* 28:1124-1132 (2007).

Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM: Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 3:416-421 (2001).

Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE: The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-140 (1995).

Florida G, Piantanida M, Minelli A, Dellavecchia C, Bonaglia C, Rossi E, Gimelli G, Croci G, Franchi F, Gilgenkrantz S, Grammatico P, Dalprá L, Wood S, Danesino C, Zuffardi O: The same molecular mechanism at the maternal meiosis I produces mono- and dicentric 8p duplications. *Am J Hum Genet*. 58:785-796 (1996).

Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, Govaerts K, Vandeleur L, Van Esch H, Chelly J, Sanlaville D, van Bokhoven H, Ropers HH, Laumonnier F, Ranieri E, Schwartz CE, Abidi F, Tarpey PS, Futreal PA, Whibley A, Raymond FL, Stratton MR, Fryns JP, Scott R, Peippo M, Sipponen M, Partington M, Mowat D, Field M, Hackett A, Marynen P, Turner G, Geçz J: Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet* 82:432-443 (2008).

Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O: Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet.* 68:874-883. (2001).

Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC, Kidd JM, Browning SR, Browning BL, Dickel DE, Levy DL, Ballif BC, Platky K, Farber DM, Gowans GC, Wetherbee JJ, Asamoah A, Weaver DD, Mark PR, Dickerson J, Garg BP, Ellingwood SA, Smith R, Banks VC, Smith W, McDonald MT, Hoo JJ, French BN, Hudson C, Johnson JP, Ozmore JR, Moeschler JB, Surti U, Escobar LF, El Khechen D, Gorski JL, Kussmann J, Salbert B, Lacassie Y, Biser A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Deardorff MA, Shaikh TH, Haan E, Friend KL, Fichera M, Romano C, Geçz J, DeLisi LE, Sebat J, King MC, Shaffer LG, Eichler EE: A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* 42:203-209 (2010).

Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, Veenstra-Knol HE, Kerstjens-Frederikse WS, Herkert JC, Gerkes EH, Leegte LK, Kok K, Sinke RJ, van Ravenswaaij-Arts CM. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. *Eur J Hum Genet.* 20:161-165 (2012)

Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A, Stewart H, Hennekam RC, Cooper GM, Regan R, Knight SJ, Eichler EE, Vermeesch JR: Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet.* 46:223-232 (2009).

Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Kondoh T, Ohashi H, Tsukino R, Kondoh Y, Shimokawa O, Ida T, Nagai T, Fukushima Y, Yoshiura K, Niikawa N, Matsumoto N: Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 41:130-136 (2004).

Bibliografía

Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J: Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 56:110-124 (2011).

Heliás-Rodzewicz Z, Bocian E, Stankiewicz P, Obersztyn E, Kostyk E, Jakubow-Durska K, Kutkowska-Kazmierczak A, Mazurczak T: Subtelomeric rearrangements detected by FISH in three of 33 families with idiopathic mental retardation and minor physical anomalies. *J Med Genet* 39:e53 (2002).

Hempel M, Rivera BN, Wagenstaller J, Lederer G, Weitensteiner A, Seidel H, Meitinger T, Strom TM: Microdeletion syndrome 16p11.2-p12.2: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet A* 149A:2106-2112 (2009).

Hila L, Tebourbi H, Abaied L, Rejeb I, Ben Jemaa L, Chaabouni H: MLPA subtelomere analysis in Tunisian mentally retarded patients. *Biochem Genet* 47:727-733 (2009).

Holinski-Feder E, Reyniers E, Uhrig S, Golla A, Wauters J, Kroisel P, Bossuyt P, Rost I, Jedele K, Zierler H, Schwab S, Wildenauer D, Speicher MR, Willems PJ, Meitinger T, Kooy RF: Familial mental retardation syndrome ATR-16 due to an inherited cryptic subtelomeric translocation, t(3;16)(q29;p13.3). *Am J Hum Genet* 66:16-25 (2000).

Hulley BJ, Hummel M, Wenger SL: Screening for cryptic chromosomal abnormalities in patients with mental retardation and dysmorphic facial features using telomere FISH probes. *Am J Med Genet A* 117A:302-303 (2003).

Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C: Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951 (2004).

Itsara A, Wu H, Smith JD, Nickerson DA, Romieu I, London SJ, Eichler EE. De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Res.* 20:1469-1481 (2010).

Jaillard S, Drunat S, Bendavid C, Aboura A, Etcheverry A, Journel H, Delahaye A, Pasquier L, Bonneau D, Toutain A, Burglen L, Guichet A, Pipiras E, Gilbert-Dussardier B, Benzacken B, Martin-Coignard D, Henry C, David A, Lucas J, Mosser J, David V, Odent S, Verloes A, Dubourg C: Identification of gene copy number variations in patients with mental retardation using array-CGH: Novel syndromes in a large French series. *Eur J Med Genet* 53:66-75 (2010).

Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham LC, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenauer R, Anderson MH, Jr., Michels VV: Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 5:28-34 (2003).

Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana S, Vekemans M, Turleau C: Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 60:212-219 (2001).

Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE: Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet* 109:440-451 (2001).

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* 258:818-821 (1992).

Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, Lundsteen C: Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 25:410-413 (1999).

Kirov G, McCarthy SE, Makarov V, Addington AM, McClellan J, Yoon S, Perkins DO, Dickel DE, Kusenda M, Krastoshevsky O, Krause V, Kumar RA, Grozeva D, Malhotra D, Walsh T, Zackai EH, Kaplan P, Ganesh J, Krantz ID, Spinner NB, Rocanova P, Bhandari A, Pavon K, Lakshmi B, Leotta A, Kendall J, Lee YH, Vacic V, Gary S, Iakoucheva LM, Crow TJ, Christian SL, Lieberman JA, Stroup TS, Lehtimäki T, Puura K, Haldeman-Englert C, Pearl J, Goodell M, Willour VL, Derosse P, Steele J, Kassem L, Wolff J, Chitkara N, McMahon FJ, Malhotra AK, Potash JB, Schulze TG, Nöthen MM, Cichon S, Rietschel M, Leibenluft E, Kustanovich V, Lajonchere CM, Sutcliffe JS, Skuse D, Gill M, Gallagher L, Mendell NR; Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC, Shaikh TH, Susser E, Delisi LE, Sullivan PF, Deutsch CK, Rapoport J, Levy DL, King MC, Sebat J: Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet.* 41:1223-1227 (2009).

Kleefstra T, Hamel BC: X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet* 67:451-467 (2005)a.

Kleefstra T, Smidt M, Banning MJ, Oudakker AR, Van Esch H, de Brouwer AP, Nillesen W, Sistermans EA, Hamel BC, de Bruijn D, Fryns JP, Yntema HG, Brunner HG, de Vries BB, van Bokhoven H: Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *J Med Genet* 42:299-306 (2005)b.

Bibliografía

Klein OD, Cotter PD, Moore MW, Zanko A, Gilats M, Epstein CJ, Conte F, Rauen KA: Interstitial deletions of chromosome 6q: genotype-phenotype correlation utilizing array CGH. *Clin Genet* 71:260-266 (2007).

Knight SJ, Flint J: Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37:401-409 (2000)a.

Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DL, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J: An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67:320-332 (2000)b.

Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J: Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354:1676-1681 (1999).

Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merckx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA: Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 41:892-899 (2004).

Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH Jr, Dobyns WB, Christian SL: Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet.* 17:628-638 (2008).

Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 39:S48-S54 (2007).

Li R, Zhao ZY, Pai S: [Chromosome microdeletions detected in mental retardation]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 21:379-381 (2004).

Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journel H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan JM, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Geetz J, Hamel BC, van Bokhoven H, de Brouwer AP: Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 17:444-453 (2009).

Lupski JR: 2002 Curt Stern Award Address. Genomic disorders recombination-based disease resulting from genomic architecture. *Am J Hum Genet* 72:246-252 (2003).

Lurie IW, Ilyina HG, Gurevich DB, Rumyantseva NV, Naumchik IV, Castellan C, Hoeller A, Schinzel A: Trisomy 2p: analysis of unusual phenotypic findings. *Am J Med Genet.* 55:229-236 (1995).

Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Costa L, Xunclà M, Sánchez A, Milà M: A study of subtelomeric rearrangements in 300 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies: their clinical and molecular characterization. *Rev Neurol.* 16;51:465-470 (2010).

Manolakos E, Vetro A, Kefalas K, Rapti SM, Louizou E, Garas A, Kitsos G, Vasileiadis L, Tsoplou P, Eleftheriades M, Peitsidis P, Orru S, Liehr T, Petersen MB, Thomaidis L: The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay. *Mol Cytogenet* 3:22 (2010).

Martínez F, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Blesa D, Quiroga R, Mayo S, Orellana C: Enrichment of ultraconserved elements among genomic imbalances causing mental delay and congenital anomalies. *BMC Med Genomics.* 3:54 (2010).

Mefford HC, Cooper GM, Zerr T, Smith JD, Baker C, Shafer N, Thorland EC, Skinner C, Schwartz CE, Nickerson DA, Eichler EE: A method for rapid, targeted CNV genotyping identifies rare variants associated with neurocognitive disease. *Genome Res.* 19:1579-1585 (2009).

Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesomepele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR: Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 43:625-633 (2006).

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215 (1988).

Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Kurosawa K, Kawame H, Iwakoshi M, Kosho T, Fukushima Y, Makita Y, Yokoyama Y, Yamagata T, Kato M, Hiraki Y, Nomura M, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N: BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet A* 140:205-211 (2006).

Monfort S, Orellana C, Oltra S, Rosello M, Guitart M, Martinez F: Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med* 147:295-300 (2006).

OMS: CIE-10. Trastornos Mentales y del Comportamiento. OMS. Ed. Meditor. Madrid. ((1992).

Bibliografía

OMS: eCIE-10 Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud, Décima Revisión, vols.1,2 y 3. Washington, D.C. 8ª Edición (electrónica) (2009).

OMS: Guía de intervención mhGAP para los trastornos mentales, neurológicos y por uso de sustancias en el nivel de atención de la salud no especializada. ISBN 978 92 4 354806 7 (2011)

Park HK, Kim HJ, Kim HJ, Han SH, Kim YJ, Kim SH: Screening of subtelomeric rearrangements in 100 Korean Pediatric patients with unexplained mental retardation and anomalies using subtelomeric FISH (fluorescence in situ hybridization). *J Korean Med Sci* 23:573-578 (2008).

Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ: Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376:348-351 (1995).

Pickard BS, Hollox EJ, Malloy MP, Porteous DJ, Blackwood DH, Armour JA, Muir WJ: A 4q35.2 subtelomeric deletion identified in a screen of patients with co-morbid psychiatric illness and mental retardation. *BMC Med Genet* 5:21 (2004).

Pickering DL, Eudy JD, Olney AH, Dave BJ, Golden D, Stevens J, Sanger WG: Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. *Genet Med* 10:262-266 (2008).

Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, Barisic I: Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Mol Cytogenet.* 6;6:7 (2013).

Poot M, Kroes HY, Wijst SE VD, Eleveld MJ, Rooms L, Nievelstein RA, Olde WD, Vreuls RC, Hageman G, Kooy F, Hochstenbach R: Dandy-Walker complex in a boy with a 5 Mb deletion of region 1q44 due to a paternal t(1;20)(q44;q13.33). *Am J Med Genet A* 143A:1038-1044 (2007).

Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Brough M, Hager HD, Tariverdian G, Brown J, Kearney L, Jauch A: Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet* 111:31-39 (2002).

Quelin C, Bendavid C, Dubourg C, de la RC, Lucas J, Henry C, Jaillard S, Loget P, Loeuillet L, Lacombe D, Rival JM, David V, Odent S, Pasquier L: Twelve new patients with 13q deletion syndrome: genotype-phenotype analyses in progress. *Eur J Med Genet* 52:41-46 (2009).

Ravnán JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL: Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478-489 (2006).

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, Macdonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurler ME: Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444-454 (2006).

Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A: Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109:286-294 (2001).

Rooms L, Reyniers E, Kooy RF: Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat* 25:513-524 (2005).

Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, Van Den EJ, Van Bever Y, Kooy RF: Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 23:17-21 (2004).

Ropers HH: Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 11:161-187 (2010).

Roselló M, Monfort S, Orellana C, Ferrer-Bolufer I, Quiroga R, Oltra S, Martínez F: Submicroscopic duplication of the Wolf-Hirschhorn critical region with a 4p terminal deletion. *Cytogenet Genome Res*.125:103-108 (2009).

Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ: Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 43:180-186 (2006).

Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carrozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, Di Rocco M, Faravelli F, Dagna BF, Bonaglia M, Bedeschi M, Borgatti R: Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 38:417-420 (2001).

Bibliografía

Saccone S, De Sario A, Della VG, Bernardi G: The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4913-4917 (1992).

Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M: Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 42:699-705 (2005).

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* 30:e57 (2002).

Schrock E, du MS, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497 (1996).

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP: Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 41:241-248 (2004).

Shen Y, Irons M, Miller DT, Cheung SW, Lip V, Sheng X, Tomaszewicz K, Shao H, Fang H, Tang HS, Irons M, Walsh CA, Platt O, Gusella JF, Wu BL: Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance. *Clin Chem* 53:2051-2059 (2007).

Shimokawa O, Kurosawa K, Ida T, Harada N, Kondoh T, Miyake N, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Molecular characterization of inv dup del(8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet A*. 128:133-137 (2004).

Shimajima K, Inoue T, Fujii Y, Ohno K, Yamamoto T: A familial 593-kb microdeletion of 16p11.2 associated with mental retardation and hemivertebrae. *Eur J Med Genet* 52:433-435 (2009).

Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, Pursley A, Clark G, Lee J, Proud M, Stocco A, Rodriguez DL, Kozel BA, Sparagana S, Roeder ER, McGrew SG, Kurczynski TW, Allison LJ, Amato S, Savage S, Patel A, Stankiewicz P, Beaudet AL, Cheung SW, Lupski JR: Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 47:332-341 (2010).

Siggberg L, Ala-Mello S, Jaakkola E, Kuusinen E, Schuit R, Kohlhase J, Bohm D, Ignatius J, Knuutila S: Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation - A study of 150 Finnish patients. *Am J Med Genet A* 152A:1398-1410 (2010).

Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC: Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet* 9:527-532 (2001).

Smith M, Filipek PA, Wu C, Bocian M, Hakim S, Modahl C, Spence MA: Analysis of a 1-megabase deletion in 15q22-q23 in an autistic patient: identification of candidate genes for autism and of homologous DNA segments in 15q22-q23 and 15q11-q13. *Am J Med Genet* 96:765-770 (2000).

Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG: Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29:263-264 (2001).

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P: Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407 (1997).

Speicher MR, Gwyn BS, Ward DC: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12:368-375 (1996).

Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ: Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet* 51:93-105 (2008).

Stevenson RE, Schwartz CE, and Schroer RJ: X-linked Mental retardation. 1992.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Thuresson AC, Bondeson ML, Edeby C, Ellis P, Langford C, Dumanski JP, Anneren G: Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. *Cytogenet Genome Res* 118:1-7 (2007).

Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, Breen G, Rucker J, Dixit A, Pal DK, McGuffin P, Farmer A, White PS, Andrieux J, Vassos E, Ogilvie CM, Curran S, Collier DA.: Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One*.8(4):e61365 (2013).

Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M, Chen W, Tonge B, Rosenberg C, Field M, Vianna-Morgante AM, Christie L, Krepisch-Santos AC, Banna L, Brereton AV,

Bibliografía

Hill A, Bisgaard AM, Muller I, Hultschig C, Erdogan F, Wiczorek G, Ropers HH: Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* 28:674-682 (2007).

Van Hemel JO, Eussen HJ: Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet.* 107:415-432 (2000).

van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM: Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 39:546-553 (2002).

Vaquerizas JM, Dopazo J, Diaz-Uriarte R: DNMAID: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 20:3656-3658 (2004).

Varela MC, Simoes-Sato AY, Kim CA, Bertola DR, De Castro CI, Koiffmann CP: A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader-Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. *Eur J Med Genet* 49:298-305 (2006).

Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN, Waldman FM: Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 63:2872-2880 (2003).

Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG: High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 70:1269-1276 (2002).

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al.: The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351 (2001).

Verdú Pérez A, García Murillo PL, García Campos O, López Grondona F, Arriola Pereda G, Alcaraz Rousselet MA, Vicente Lago Y, Suela J: Subtelomeric rearrangements in cryptogenic mental retardation. *An Pediatr (Barc).* 75(6):365-371 (2011).

Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van d, V, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van dB, I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA: Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73:1261-1270 (2003).

Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, Heye B, Glaser D, Liebscher V, Meitinger T, Strom TM: Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am J Hum Genet* 81:768-779 (2007).

Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, Sitska M, Utermann B, Viertel P, Kalscheuer V, Bartsch O: Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet A* 128A:364-373 (2004).

Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ: Autism Consortium: Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med.* 358:667-675 (2008).

Wilkie AO: Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: a general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 53:688-701 (1993).

Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, Donnai D, FitzPatrick DR, Maher E, Martin H, Parnau J, Pindar L, Ramsay J, Shaw-Smith C, Sistermans EA, Tettenborn M, Trump D, de Vries BB, Walker K, Raymond FL: 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet* 77:154-160 (2005).

Williams NM, Zaharieva I, Martin A, Langley K, Mantripragada K, Fossdal R, Stefansson H, Stefansson K, Magnusson P, Gudmundsson OO, Gustafsson O, Holmans P, Owen MJ, O'Donovan M, Thapar A: Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet.* 376:1401-1408 (2010).

Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL: A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 80:91-104 (2007).

Wu Y, Jiang YW, Wang XZ, Wang HF, Wang JM, Yang YL, Qin J, Zhong N, Wu XR: Detection of subtelomeric rearrangements in patients with idiopathic mental retardation/developmental delay. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 45:906-911 (2007).

Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J, Gao Z, Yang Y, Cai B, Wang L, Zhou Z, Tian L, Wang X, Zhong N, Qin J, Wu X, Jiang Y: Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet.* 11:72 (2010).

Bibliografía

Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG: Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet* 12:2145-2152 (2003).

ANEXO 1

SALSA MLPA P019 Human Telomere probemix

Length (nt)	Chr. position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 34 position
64-70-76-82		DQ Control probes*		
94		Synthetic Control probe		Chr. 2q14
139	Chr. 1p22	F3	1110-L0172	01-094.5
148	Chr. 2q14	ILIRN	1111-L0097	02-114.0
157	Chr. 3q12	CPO	1112-L0549	03-099.6
166	Chr. 4q25	CASP6	1113-10154	04-111.1
175	Chr. 5q12	CCMB1	1114-L0383	05-068.5
184	Chr. 6p21	KIAA0170	0589-10157	06-030.7
193	Chr. 7q21	ABCB1	1115-L0005	07-086.8
202	Chr. 8q21	TPD52	1116-L0620	08-081.1
211	Chr. 9q21	PCSK5	1344-L0555	09-074.1
220	Chr. 10q22	VCL	1119-L0559	10-075.2
229	Chr. 11q13	RELA	1120-L0060	11-065.2
238	Chr. Xq11	AR	1271-L0423	X-065.7
247	Chr. 1p-ter	FLJ10782	1122-L0680	01-002.3 =PANK
256	Chr. 2p-ter	ACP1	1351-L0892	02-000.26
265	Chr. 3p-ter	CHL1	1124-L0682	03-000.32
274	Chr. 4p-ter	GAK	1125-L0683	04-000.88
283	Chr. 5p-ter	CRR9p	1126-L0684	05-001.38
292	Chr. 6p-ter	MKPX	2272-L1651	06-000.27 =DUSP22
301	Chr. 7p-ter	CENTA1	1128-L0686	07-000.71
310	Chr. 8p-ter	FBXO25	1560-L0973	08-000.38
319	Chr. 9p-ter	FLJ00026	1130-L0688	09-000.41
328	Chr. 10p-ter	ADAR3	1131-L0689	10-000.45 =ADARB2
337	Chr. 11p-ter	HRAS	0442-L0380	11-000.52
346	Chr. Xp-ter	CSF2RA (PAR1)	1170-L0710	? (X + Y < 2 Mb from telomere)
355	Chr. 1q-ter	DKFZp434c091	1273-L0822	01-244.9 (1.1 Mb from telomere)=BIA2
364	Chr. 2q-ter	GPC1	1134-L0692	02-241.7 (1.7 Mb from telomere)
373	Chr. 3q-ter	KIAA0226	1135-L0693	03-198.8 (0.5 Mb from telomere)
382	Chr. 4q-ter	KLKB1	1136-L0694	04-187.9 (3.8 Mb from telomere)
391	Chr. 5q-ter	FLT4	1137-L0695	05-180.2 (0.8 Mb from telomere)
400	Chr. 6q-ter	TBP	1138-L0696	06-170.7 (0.2 Mb from telomere)
409	Chr. 7q-ter	KIAA0010	1139-L0697	07-156.4 (2.1 Mb from telomere)
418	Chr. 8q-ter	RECQL4	1140-L0610	08-145.7 (0.5 Mb from telomere)
427	Chr. 9q-ter	TRAF2	1141-L0698	09-135.2 (1.2 Mb from telomere)
436	Chr. 10q-ter	ECHS1	1142-L0699	10-134.7 (0.3 Mb from telomere)
445	Chr. 11q-ter	KIAA1030	1143-L0700	11-133.3 (1.2 Mb from telomere)
454	Chr. Xq-ter	SYBL1(PAR2)	1144-L0701	X-153.6 (0.1 Mb from telomere)

Anexo 1

SALSA MLPA P020 Human Telomere probemix

Length (nt)	Chr. position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 34 position
64-70-76-82		DQ Control probes*		
94		Synthetic Control probe		Chr. 2q14
139	Chr. 12q14	IFNG	1061-L0727	12-066.8
148	Chr. 13q14	DLEU1	1062-L0639	13-048.5
157	Chr. 14q13	NFKBIA	1063-L0061	14-033.8
166	Chr. 15q21	B2M	1064-L0340	15-042.7
175	Chr. 16q12	RBL2	1993-L0754	16-053.3
184	Chr. 17p21	BRCA1	0767-L0272	17-041.6
193	Chr. 18q21	PMAIP1	1066-L0326	18-055.7
202	Chr. 19q13	KLK3	1067-L0620	19-056.1
211	Chr. 20q22	BCL2L1	1068-L0108	20-031.0
220	Chr. 21q21	APP	1069-L0729	21-026.3
229	Chr. 22q11	MIF	1070-L0099	22-022.6
238	Chr. Yq11	UTY	1071-L0464	Y-014.5
247	Chr. 12p-ter	RBBP2	1346-L0890	12-000.32
256	Chr. 13p-ter	ZNF198	1343-L0635	13-018.4
265	Chr. 14p-ter	ADPRTL2	1076-L0732	14-018.8
274	Chr. 15p-ter	MAGEL2	1077-L0650	15-021.4
283	Chr. 16p-ter	DEC2	1078-L0648	16-000.40
292	Chr. 17p-ter	GEMIN4	1079-L0646	17-000.64
301	Chr. 18p-ter	TYMS	0811-L0329	18-000.66
310	Chr. 19p-ter	PPAP2C	1080-L0643	19-000.24
319	Chr. 20p-ter	FLJ22115	1081-L0641	20-000.27 =C20ORF99
328	Chr. 21p-ter	STCH	1072-L0334	21-014.7
337	Chr. 22p-ter	IL17R	1082-L0660	22-016.0
346	Chr. Yp-ter	SRY	1191-L0592	Y-002.3
355	Chr. 12q-ter	CHFR	1083-L0733	12-131.7 (0.3 Mb from telomere)
364	Chr. 13q-ter	CDC16	1194-L0753	13-112.9 (0.1 Mb from telomere)
373	Chr. 14q-ter	JAG2	1085-L0653	14-103.6 (1.7 Mb from telomere)
382	Chr. 15q-ter	BLP2/FLJ22604	1086-L0651	15-099.9 (0.4 Mb from telomere)
391	Chr. 16q-ter	GAS11/ GAS8	1087-L0734	16-089.8 (0.2 Mb from telomere)
400	Chr. 17q-ter	SECTM1	1088-L0647	17-081.0 (0.7 Mb from telomere)
409	Chr. 18q-ter	CTDP1	1196-L0751	18-075.6 (0.5 Mb from telomere)
418	Chr. 19q-ter	BC-2	1195-L0752	19-063.7 (0.1 Mb from telomere)
427	Chr. 20q-ter	URKL1/FLJ20517	1091-L0642	20-063.3 (0.4 Mb from telomere)
436	Chr. 21q-ter	HRMT111	1092-L0658	21-046.9 (0.08 Mb from telomere)
445	Chr. 22q-ter	ARSA	1093-L0661	22-049.2 (0.18 Mb from telomere)
454	Chr. Yq-ter	SYBL1(PAR2)	1094-L0659	X-153.6 (0.1 Mb from telomere)

SALSA MLPA P070 Human Telomere-5 probemix

Length (nt)	Chr. position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 35 position
64-70-76-82		DQ Control probes*		
94	Chr. 2q14	Synthetic Control probe		
106	Chr. Yq11	UTY	NPK001-L0464	
118	Chr. Yq11	DBY (DDX3Y)	NPK003-L0313	
130	1q	KIAA1720	4084-L3605	01-245.3
137	2q	APG4B	2781-L3168	02-242.9
144	3q	KIAA0226	2690-L2842	03-198.8
151	4q	FRG1	2691-L2843	04-191.6
158	5q	GNB2L1	2790-L2232	05-180.8
165	6q	TBP	2694-L2844	06-170.7
172	7q	VIPR2	2793-L3167	07-158.1
179	8q	RECQL4	2695-L0610	08-145.7
186	9q	EU-HMTase1	2792-L2846	09-135.9
194	10q	ECHS1	2696-L2847	10-134.7
202	11q	KIAA1030	2697-L2848	11-133.3
210	12q	ZNF10	2686-L2849	12-132.0
218	13q	CDC16	2698-L0753	13-112.9
226	14q	MTA1	2699-L2850	14-103.9
234	15q	FLJ22604	2701-L2851	15-099.9
242	16q	GAS11	2702-L0734	16-089.8
250	17q	SECTM1	2703-L3169	17-081.0
258*	18q	CTDP1	2704-L3607	18-075.6
266	19q	BC-2	2705-L2853	19-063.7
274	20q	FLJ20517	2706-L0642	20-063.3
282	21q	S100B	2587-L2854	21-046.9
290	22q	ARSA	2707-L0661	22-049.2
298	Xq (PAR2)	SYBL1	2708-L2855	X-153.6
306	1p	TNFRSF18	2270-L1762	01-001.0
314	2p	ACPI	2709-L2856	02-000.3
322	3p	CHL1	2896-L2363	03-000.3
330	4p	ZNF141	2779-L2221	04-000.3
338	5p	LOC133957	2791-L2233	05-000.3
346	6p	IRF4	4077-L3462	06-000.3
354	7p	UNC84A	2780-L2857	07-000.6
362	8p	FBXO25	2715-L0973	08-000.4
370	9p	FLJ00026	2716-L0688	09-000.4
378**	10p	BS69	5180-L2227	10-000.2
386	11p	BET1L	2784-L2226	11-000.2
394	12p	RBBP2	2787-L2229	12-000.3
402	“13p”	PSPC1	2717-L3608	13-018.0
410	“14p”	ADPRTL2	2718-L0732	14-018.8
418	“15p”	NDN	4026-L1542	15-021.5
426	16p	DEC2	2720-L0648	16-000.4
434	17p	RPH3AL	4081-L3465	17-000.2
442	18p	THOC1	2789-L2231	18-000.2
450	19p	PPAP2C	3501-L2880	19-000.2
458	20p	FLJ22115	2723-L0641	20-000.3
466	“21p”	STCH	2724-L0334	21-014.7
474	“22p”	IL17R	2725-L0660	22-016.0
482	Xp (PAR1)	SHOX	3714-L0910 new	X-000.5

Anexo 1

SALSA MLPA P036 Human telomere probemix

Length (nt)	Chr. position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 34 position
64-70-76-82		DQ Control probes*		
94	Chr. 2q14	Synthetic Control probe		
106	Chr. Yq11	UTY	NPK001-L0464	
118	Chr. Yq11	DBY (DDX3Y)	NPK003-L0313	
130	Chr. 1p	CAB45	2271-L1763	01-001.06 (= 1.06 Mb from ter)
137	Chr. 2p	ACPI	2274-L1765	02-000.24
144	Chr. 3p	CHL1	1721-L1329	03-000.30
151	Chr. 4p	FLJ20265	2005-L2047	04-000.45
158	Chr. 5p	PDCD6	1723-L1327	05-000.29
165	Chr. 6p	IRF4	1724-L2048	06-000.32
172	Chr. 7p	CENTA1	2275-L2049	07-000.97
179	Chr. 8p	FBXO25	2397-L1845	08-000.31
186	Chr. 9p	DMRT1	1727-L2050	09-000.74
194	Chr. 10p	KIAA0934	2277-L1768	10-000.12
202	Chr. 11p	MUC2	2206-L1653	11-001.06
210	Chr. 12p	SLC6A12	2276-L1767	12-000.15
218	Chr. "13p"	PSPC1	2399-L1847	13-018.97(Acrocentric)
226	Chr. "14p"	HEI10	1732-L1318	14-018.75 (Acrocentric)
234	Chr. "15p"	CYFIP1	1733-L1317	15-020.36 (Acrocentric)
242	Chr. 16p	POLR3K	1734-L1316	16-000.03
250	Chr. 17p	RPH3AL	1735-L1315	17-000.20
258	Chr. 18p	USP14	1736-L2051	18-000.11
266	Chr. 19p	CDC34	1737-L1313	19-000.47
274	Chr. 20p	SOX12	2396-L1844	20-000.30
282	Chr. "21p"	RBM11	1739-L1311	21-014.50 (Acrocentric)
290	Chr. "22p"	BID	1740-L1310	22-016.56 (Acrocentric)
298	Chr. X/Yp	SHOX	1148-L1331	X/Y-000.50 (PAR region)
306	Chr. 1q	KIAA1720	2392-L2149	01-245.93 (0.1 Mb from telomere)
314	Chr. 2q	CAPN10	1742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	Chr. 3q	BDH	2013-L2052	03-198.53 (0.8 Mb from telomere)
330	Chr. 4q	FAT	1744-L1306	04-188.10 (3.6 Mb from telomere)
338	Chr. 5q	MGC16175(TRIM52)	1745-L1305	05-180.80 (0.2 Mb from telomere)
346	Chr. 6q	PSMB1	1746-L1304	06-170.71 (0.2 Mb from telomere)
354	Chr. 7q	VIPR2	1747-L1303	07-158.15 (0.3 Mb from telomere)
362	Chr. 8q	KIAA0150	1748-L1302	08-144.55 (1.7 Mb from telomere)
370	Chr. 9q	MRPL41	1749-L1301	09-135.55 (0.7 Mb from telomere)
378	Chr. 10q	CYP2E1	2394-L1842	10-134.82 (0.2 Mb from telomere)
386	Chr. 11q	KIAA0056	1751-L1299	11-133.51 (1.0 Mb from telomere)
394	Chr. 12q	KIAA1545	1752-L1298	12-? (<1 Mb from telomere)
402	Chr. 13q	F7	1753-L1297	13-111.70 (1.3 Mb from telomere)
410	Chr. 14q	KIAA0284	1754-L1296	14-103.28 (2.1 Mb from telomere)
418	Chr. 15q	ALDH1A3	1755-L1295	15-099.13 (1.2 Mb from telomere)
426	Chr. 16q	TUBB4	1756-L1294	16-089.72 (0.3 Mb from telomere)
434	Chr. 17q	TBCD	1757-L1293	17-081.24 (0.4 Mb from telomere)
442	Chr. 18q	FLJ21172	1758-L1292	18-075.88 (0.2 Mb from telomere)
450	Chr. 19q	LOC125905(Hs.467404)	1759-L1291	19-063.63 (0.2 Mb from telomere)
458	Chr. 20q	EEF1A2	1760-L1290	20-062.85 (0.8 Mb from telomere)
466	Chr. 21q	S100B	1761-L0332	21-046.87 (0.1 Mb from telomere)
474	Chr. 22q	RABL2B	1762-L1289	22-049.33 (0.1 Mb from telomere)
482	Chr. X/Yq	SYBL1	1763-L2150	X/Y-150.09 (PAR region; 0.1 Mb from ter)

SALSA MLPA P036B Human telomere probemix

Description version 17; 10-09-2009

Length (nt)	Chr. position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 35 position
64-70-76-82		DQ Control probes*		
94	Chr. 2q14	Synthetic Control probe		
106	Chr. Yq11	UTY	NPK001-L0464	Y-013.9
118	Chr. Yq11	DBY (DDX3Y)	NPK003-L0313	Y-013.4
130	1p	CAB45	2271-L1763	01-001.20 (= 1.20 Mb from ter)
137	2p	ACPI**	2274-L1765	02-000.26
144	3p	CHL1	1721-L1329	03-000.32
151	4p	FLJ20265	2005-L2047	04-000.5
158	5p	PDCD6	1723-L1327	05-000.35
165	6p	IRF4	1724-L2048	06-000.34
172	7p	CENTA1	2275-L2049	07-000.74
179	8p	FBXO25	2397-L1845	08-000.35
186	9p	DMRT1	1727-L2050	09-000.9
194	10p	KIAA0934	2277-L1768	10-000.5
202	11p	RIC-8**I*	3315-L2733	11-000.2
210	12p	SLC6A12	2276-L1767	12-000.18
218	"13p"	PSPC1	2399-L1847	13-019.2 (Acrocentric)
226	"14p"	HEI10	1732-L1318	14-019.9 (Acrocentric)
234	"15p"	CYFIP1	1733-L1317	15-020.5 (Acrocentric)
242	16p	POLR3K	1734-L1316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	1735-L1315	17-000.20
258	18p	USP14	1736-L2051	18-000.17
266	19p	CDC34	1737-L1313	19-000.48
274	20p	SOX12	2396-L1844	20-000.25
282	"21p"	RBM11	1739-L1311	21-014.50 (Acrocentric)
290	"22p"	BID	1740-L1310	22-016.61 (Acrocentric)
298	X/Yp	SHOX	1148-L1331	X/Y-000.57 (PAR region)
306	1q	KIAA1720	2392-L2149	01-245.32 (0.1 Mb from telomere)
314	2q	CAPN10	1742-L01308	02-241.26 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH	2013-L2052	03-198.76 (1.7 Mb from telomere)
330	4q	FRG1***	2582-L2055	04-191.24 (0.2 Mb from telomere)
338	5q	GNB2L1***	3319-L2737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	1746-L1304	06-170.76 (0.5 Mb from telomere)
354	7q	VIPR2	1747-L1303	07-158.36 (0.3 Mb from telomere)
362	8q	KIAA0150	1748-L1302	08-144.64 (1.6 Mb from telomere)
370	9q	MRPL41	1749-L1301	09-137.72 (0.7 Mb from telomere)
378	10q	PAO***	2554-L2018	10-135.8 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	KIAA0056	1751-L1299	11-133.57 (1.2 Mb from telomere)
394	12q	ZNF10***	2687-L2154	12-132.33 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	1753-L1297	13-112.81 (1.3 Mb from telomere)
410	14q	MTA1***	2778-L2201	14-104.99 (1.3 Mb from telomere)
418	15q	ALDH1A3	1755-L1295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS11 / GAS8	3201-L2669	16-088.62 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	1757-L1293	17-078.4 (0.5 Mb from telomere)
442	18q	FLJ21172	1758-L1292	18-075.9 (0.2 Mb from telomere)
450	19q	BC-2***	3226-L2938	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458	20q	OPRL1	2688-L2884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	HMT1***	2586-L2059	21-046.9 (0.1 Mb from telomere)
474	22q	RABL2B	1762-L1289	22-049.5 (0.1 Mb from telomere)
482	X/Yq	SYBL1	1763-L2150	X/Y-154.7 (PAR region; 0.1 Mb from ter)

Anexo 1

SALSA MLPA P036-D2 Human telomere-3

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (NEW)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (NEW)			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130*‡	1p	SCNN1D	6778-L08760	01-001.21 (= 1.21 Mb from telomere)
137¥	2p	ACPI	2274-L08758	02-000.25
144	3p	CHL1	1721-L01329	03-000.34
151	4p	FLJ20265	2005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	1723-L01327	05-000.37
165	6p	IRF4	1724-L02048	06-000.34
172	7p	CENTA1	2275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	2397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	1727-L02050	09-000.84
194	10p	KIAA0934	2277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC-8	3315-L02733	11-000.20
208	12p	SLC6A12	2276-L01767	12-000.17
218	“13p”	PSPC1	2399-L01847	13-019.24 (Acrocentric)
226	“14p”	HEI10	1732-L01318	14-019.86 (Acrocentric)
234*	“15p”	MKRN3	7291-L08858	15-021.36 (Acrocentric)
242	16p	POLR3K	1734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	1735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	1736-L02051	18-000.19
266	19p	CDC34	1737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	2396-L01844	20-000.26
282	“21p”	RBM11	1739-L01311	21-014.51 (Acrocentric)
290	“22p”	BID	1740-L01310	22-016.61 (Acrocentric)
298	X/Yp	SHOX	1148-L01331	X/Y-000.52 (PAR region)
306	1q	KIAA1720	2392-L02149	01-247.08 (0.2 Mb from telomere)
314	2q	CAPN10	1742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH	2013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330*†	4q	FRG1	7046-L06655	04-191.10 (0.2 Mb from telomere)
338	5q	GNB2L1	3319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	1746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
354	7q	VIPR2	1747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
362	8q	KIAA0150	1748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
370*	9q	EHMT1	8205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
378 ¥	10q	PAO	9142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	KIAA0056	1751-L01299	11-133.60 (1.2 Mb from telomere)
394	12q	ZNF10	2687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	1753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
410	14q	MTA1	2778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418	15q	ALDH1A3	1755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS11 / GAS8	3201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	1757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
442	18q	FLJ21172	1758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450 ¥	19q	BC-2	9143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458	20q	OPRL1	2688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	HMT1	2586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
474 ¥	22q	RABL2B	1762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
482	X/Yq	SYBL1	1763-L02150	X/Y-154.78 (PAR region; 0.1 Mb from tel.)

SALSA MLPA P064-B2 MR1 probemix

Description version 17; 10-09-2009

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene detected	Chromosomal position	Remarks
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
130	2269-L01761	TNFRSF4	1p36.33	1p subtelomeric region
136	6778-L06730	SCNN1D	1p36.33	1p subtelomeric region
142**	2589-L11228	NSD1	5q35.3	Sotos syndrome
148	1472-L00946	TRPV1	17p13.3	Miller-Dieker region
154	5465-L06731	ARVCF	22q11.21	Digeorge region
160	4620-L00863	UBE3A	15q12	Prader-Willi region
166	1448-L00932	TAC1 (=TNFRSF13B)	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
172	2020-L01539	MKRN3	15q11.2	Prader-Willi region
178**	2890-L07968	GNB1	1p36.33	1p subtelomeric region
184	1435-L00945	HIC1	17p13.3	Miller-Dieker region
190	5462-L05809	CLTCL1	22q11.21	Digeorge region
196	1218-L06270	CLDN5	22q11.21	Digeorge region
202	2146-L01642	TWISTNB	7p21.2	Close to TWIST
211	1303-L00855	NSD1	5q35.3	Sotos syndrome
220	2024-L01542	NDN	15q11.2	Prader-Willi region
229	1561-L01133	CYLN2	7q11.23	Williams syndrome region
238**	1443-L08394	PAFAH1B1	17p13.3	Miller-Dieker region
247	1122-L00680	FLJ10782 (PANK4)	1p36.33	1p subtelomeric region
256	1330-L00881	FZD9	7q11.23	Williams syndr. Region
265**	1325-L07456	ASPA	17p13.3	Canavan disease
274	1452-L00936	LRRC48 (=DKFZ....)	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283	1925-L01477	PAFAH1B1	17p13.3	Miller-Dieker region
292	1332-L00883	STX1A	7q11.23	Williams syndrome region
301	1453-L00937	LLGL1	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
310	1333-L00876	ELN	7q11.23	Williams syndrome region
319	1969-L02364	TWIST	7p21.2	Saethre-Chotzen syndrome
328	1454-L00938	PRPSAP2	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
337	1682-L02331	TP73	1p36	1p subtelomeric region
346	1697-L02329	JAG1	20p12.2	Alagille syndrome
355	1455-L00939	MFAP4	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
364	1444-L02367	HIC1	17p13.3	Miller-Dieker region
373	1235-L00773	SNAP29	22q11.21	Digeorge region
382	3050-L01762	TNFRSF18	1p36	1p subtelomeric region
391	1337-L02333	LIMK1	7q11.23	Williams syndrome region
400*	9669-L00864	UBE3A	15q12	Prader-Willi region
409	2038-L02330	GABRB3	15q12	Prader-Willi region
418	1339-L00885	CYLN2	7q11.23	Williams syndrome region
427**	1924-L08393	METT10D (MGC3329)	17p13.3	Miller-Dieker region
436	2891-L02359	SKI	1p36	1p subtelomeric region
445	2594-L02065	NSD1	5q35.3	Sotos syndrome
454	3069-L05815	FLJ14360 (KLHL22)	22q11.21	Digeorge region
463	5463-L05808	CDC45L	22q11.21	Digeorge region
472	3072-L02472	JAG1	20p12.2	Alagille syndrome

* New in P064-B2 from lot 0208 onwards.

** Small change in length and / or peak height as compared to previous lots. No change in sequence detected.

Anexo 1

SALSA MLPA P245-A2 Microdeletion-1 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Syndrome
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)		
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	TNFRSF4 Probe 2269–L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	GATA3 Probe 7632–L07317	10p	DiGeorge region 2 (10p)
142	PAFAH1B1 Probe 4120–L03532	17p13.3	Miller-Dieker region
148	MECP2 Probe 9310–L09999	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
153	NSD1 Probe 2595–L08077	5q35.3	Sotos syndrome
160	UBE3A Probe 4620–L00863	15q12	Prader-Willi / Angelman
166	GABRD Probe 4690–L07966	1p36.33	1p36 deletion syndrome
172	CREBBP Probe 3087–L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi syndrome
178	GNB1 Probe 2890–L07968	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184	MECP2 Probe 9311–L10002	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
190 *	SEMA7A Probe 8380–L10003	15q24.1	“15q24 deletion syndrome”
196	CLDN5 Probe 1218–L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202	MECP2 Probe 3409–L02797	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
208	GPIBB Probe 5464–L10114	22q11.21	DiGeorge syndrome
214	NDN Probe 6282–L01542	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
220	PAX6 Probe 3253–L02690	11p13	Wagr syndrome
226	MAPT Probe 7856–L08385	17q21.31	“17q21 microdeletion”
232	LETM1 Probe 4190–L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
238	PAFAH1B1 Probe 1443–L08394	17p13.3	Miller-Dieker region
246	SNRPN Probe 2026–L10004	15q12	Prader-Willi / Angelman
254 †	SHANK3 Probe 10181–L11409	22q13.33	22q13 / Phelan-Mcdermid
260	NF1 Probe 3778–L11180	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
267	FANCL Probe 8386–L11411	2p16.1	“2p16.1 deletion syndrome”
274	LRRC48 Probe 1452–L00936	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283 ±	CRR9 Probe 1126–L00684	5p15.3	Cri du Chat syndrome
292	SNRPN Probe 1318–L07970	15q12	Prader-Willi / Angelman
297	DMD Probe 1412–L01059	Xp21.2	Chromosome X control probe
304	LLGL1 Probe 1453–L08499	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
310	ELN Probe 1333–L00876	7q11.23	Williams syndrome
319	TGFBR1 Probe 4652–L04036	9q22.33	“9q22.3 deletion syndrome”
326	CYP11A1 Probe 6811–L06406	15q24.1	“15q24 deletion syndrome”
335	NF1 Probe 2508–L02620	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
341	MAPT Probe 7857–L08501	17q21.31	“17q21 microdeletion”
349	Hs.538604 Probe 1232–L07388	10p15.1	DiGeorge region 2 (10p)
355	DLG1 Probe 8395–L08249	3q29	“3q29 deletion syndrome”
364	ELN Probe 1336–L00878	7q11.23	Williams syndrome
373	SNAP29 Probe 1235–L00773	22q11.21	DiGeorge syndrome
382 †	SHANK3 Probe 10182–L11174	22q13.33	22q13 / Phelan-Mcdermid
391	LIMK1 Probe 1337–L02333	7q11.23	Williams syndrome
401	TRPS1 Probe 3081–L07411	8q24.12	Langer-Giedion syndrome
409	TGFBR1 Probe 4653–L10006	9q22.33	“9q22.3 deletion syndrome”
418	DLG1 Probe 8401–L08255	3q29	“3q29 deletion syndrome”
427	EIF3S3 Probe 1108–L00679	8q24.11	Langer-Giedion syndrome
436	TERT Probe 3761–L02477	5p15.33	Cri du Chat syndrome
445	WHSC1 Probe 6058–L05513	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
454	NSD1 Probe 2600–L02071	5q35.3	Sotos syndrome
466 †	RAI1 Probe 9440–L11412	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
474	CRHR1 Probe 7859–L07620	17q21.31	“17q21 microdeletion”
484	REL Probe 9860–L10628	2p16.1	“2p16.1 deletion syndrome”

* A Spanish lab has reported a deletion of the target sequence of this probe in a healthy individual.

† These probes have been reported to be variable and will be replaced in a future version.

Anexo 1

SALSA MLPA P106-B1 MRX probemix

Description version 11; 18-07-2009

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA	
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	
100	X-fragment: Specific for the X chromosome	
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
130 *	AGTR2 probe 13917-L02320	Xq24
136 ±	GDI1 probe 02916-L04199	Xq28
142	FMR1 probe 02928-L03720	Xq27.3
148	ACSL4 probe 02935-L02326	Xq22.3
154 ±	AFF2 probe 03511-L04202	Xq28
160 ±	TSPAN7 probe 02903-L02297	Xp11.4
166	FMR1 probe 02927-L03721	Xq27.3
172	ARHGEF6 probe 02901-L02295	Xq26.3
178	RPS6KA3 probe 02907-L02301	Xp22.12
184 *	HUWE1 probe 13919-L15456	Xp11.22
190 ¥ ~	ACSL4 probe 02155-L15826	Xq22.3
196 *±	ARX probe 13668-L15819	Xp21.3
202	ARHGEF6 probe 02902-L04460	Xq26.3
208 *	SLC6A8 probe 01871-L15827	Xq28
215 ¥	DCX probe 04123-L15828	Xq23
220	ARX probe 02898-L04200	Xp21.3
229 *	ARX probe 13669-L15822	Xp21.3
234 ¥	IL1RAPL1 probe 02922-L15821	Xp21.3
241 ¥	AFF2 probe 03516-L15823	Xq28
247 ¥	ACSL4 probe 03512-L15824	Xq22.3
254 *	HUWE1 probe 13920-L15825	Xp11.22
261 ¥	AFF2 probe 02933-L14362	Xq28
268 ¥ ~	TSPAN7 probe 02904-L15820	Xp11.4
275	DCX probe 04124-L03481	Xq23
283 ¥	AFF2 probe 00493-L00066	Xq28
292	IL1RAPL1 probe 02920-L02314	Xp21.3
301	SLC6A8 probe 01876-L01445	Xq28
310	PQBPI probe 02918-L02878	Xp11.23
319 ¥	DCX probe 04121-L08390	Xq23
328	IL1RAPL1 probe 02921-L02315	Xp21.3
337	AFF2 probe 02932-L02323	Xq28
346	ARHGEF6 probe 03719-L02293	Xq26.3
355	AGTR2 probe 02925-L02319	Xq24
364	RPS6KA3 probe 02906-L02300	Xp22.12
373	OPHN1 probe 02912-L02306	Xq12
378	GDI1 probe 02917-L02311	Xq28
385	PAK3 probe 02908-L03178	Xq22.3
391	PQBPI probe 03520-L02313	Xp11.23
400	PAK3 probe 03521-L02304	Xq22.3
409	OPHN1 probe 02913-L02307	Xq12
418	PAK3 probe 02909-L02303	Xq22.3
427	IL1RAPL1 probe 02923-L02317	Xp21.3
436 ±	OPHN1 probe 02914-L02308	Xq12
445	ARHGEF6 probe 03720-L02294	Xq26.3
454±	RPS6KA3 probe 03762-L02299	Xp22.12
472	OPHN1 probe 02915-L02309	Xq12
481	PAK3 probe 02911-L02305	Xq22.3

* New in version B1 (from lot 0609 onwards).

¥ Changed in version B1 (from lot 0609 onwards). Small change in length, not in sequence detected.

± These probes are located within, or close to a very strong CpG island. A low signal of these probes indicates that the

sample DNA denaturation was incomplete, e.g. due to the presence of some salt in the sample DNA.

~ More variable. This probe has been reported to be deleted/duplicated in healthy individuals (various reports)

ANEXO 2

Marcadores microsatélite empleados en los estudios de confirmación.

Cromosoma 1

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D1S2851	168,58	TCTTCCCACCACCTGCC	TTTATATTTGTATTCCCTACTGCCCA	Build 36	SYN-ARAF
D1S452	168,79	TAATGGGTTCAGTGGACCTT	TGCAGTCCCATATTCAGGT	Build 36	SYN-ARAF
D1S2815	169,98	CTGACATGGAATACCTCTATGATGC	CTCCAAATCTAGTCACACTGGAAG	Build 36	SYN-ARAF
D1S2800	227,5	AACCTCTCTGGTATGAAGCC	TTGTTCAAGGGTCAAATGC	Build 35	SYN-ARAF
D1S2785	233,9	CGTGAATATCCTCAGGGAAT	ATTGTGGCACCCGTAICTCC	Build 36	SYN-ARAF
D1S2693	236,5	TAGGCAGTGATGAATTGACTCAGAA	GTGGAGATGCAGACTTGATA	Build 35	SYN-ARAF
D1S423	237,8	GGCAACAAGAATGAAACTC	GGCCTAAGATTGCTGTGAAG	Build 35	SYN-ARAF
D1S2836	239,1	TTTAAACCAAGNGGTGAAAG	CTGGAATGAAATCCTCCC	Build 35	SYN-ARAF
Cr1_1*	239,1	GGGATTACATTTCAACATGTG	GACAAAGTGAGATATTGTCTC	Build 35	SYN-ARAF
D1S2682	240	CCTTCTGCACCCGTAACAC	CCCCCTAAAGGAACTTGTC	Build 35	SYN-ARAF
Cr1_2*	241	TCTGCACATTTGAACTTGCC	TATTAGTCAGGATTGTCCAGG	Build 35	SYN-ARAF
D1S423	243,61	GGGCAACAAGAATGAAACTC	GGCCTAAGATTGCTGTGAAG	Build 36	SYN-ARAF

* microsatélites no descritos, de diseño propio

Cromosoma 2

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D2S2393	2,7	TGACCATTAGCCTGAAGGA	GGACTGGGGTAACACCTG	Build 35	SYN-ARAF
D2S330	6,6	TACAGGTGTGAGCCACCA	AGCACCCATTTGATTAAGAGAC	Build 35	SYN-ARAF
D2S287	9,5	TGCTGATCCTTAAAACCACA	AGCTGTCTCTATAAAACAAACGAAT	Build 35	SYN-ARAF
D2S144	25,3	TCTCCCTGACAGACTCTGCG	GCTGCATAGGCCGCTACTGAG	Build 37.1	SYN-ARAF
D2S2247	27,1	TCCATCTTTGCGTGC	CCGTGCTCTATGCCAG	Build 37.1	SYN-ARAF
D2S367	34,29	TTCTTTGGTCTAAGGGTCAC	AGCTTCTTGTTCACAGGTGT	Build 37.1	SYN-ARAF
D2S2314	176,5	GGTGTCAAGTGAGACCCTGT	ATTTCTAGCGGCCCTAAAAAC	Build 36	SYN-ARAF
D2S148	177,9	CTTATGCTAAAGTGAAGGGTATCT	ATGAAGGAATACTGGCTTGT	Build 36	SYN-ARAF
D2S324	179,3	TTACCCACCAGGACAGT	CAGCAAAATGCTTCTAGGTCA	Build 36	SYN-ARAF
D2S2261	181,2	CATATTTGAGAGGACCTTTGT	GTGCAGGATAAGACCACACA	Build 36	SYN-ARAF
D2S2176	227,7	GATGGTGGTTCCCTACTCAG	AGACCCCTGGCCCAATA	Build 35	SYN-ARAF
D2S2234	228,4	TCAGAGACCTGGGATATGG	TGGGTTGAGATCGTGC	Build 35	SYN-ARAF
D2S336	229,7	TTTATTAGTTACAGACTTTGCTTC	GTCACAGGCACCTGG	Build 35	SYN-ARAF
D2S338	231,1	AGAGCCAAAAACAAAACCTTC	TGGAATTTTGATTTTCAGATTTG	Build 35	SYN-ARAF
D2S345	231,7	GGAAGCCACCATGAAT	AGATCAACAGACATAAACC	Build 35	SYN-ARAF
D2S2968	237,8	ATGGGTGGATGTACAAATGG	TCTTAGTTTATGGGCCACCA	Build 35	SYN-ARAF
D2S125	240,8	GCAACAGAGTGAGACCCTGA	TTCTGAGAACCAGATTTGTGATTG	Build 35	SYN-ARAF
D2S140	241,3	GCTACAATGATTTCCAAAAGTC	GTTGTCCCATACTGATCTTACC	Build 35	SYN-ARAF
D2S2585	242,5	AGCCTGGGGTGACAAAATCT	AGACGCTCCAAAAGCCAGTT	Build 35	SYN-ARAF

Cromosóma 3

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D3S1304	6,8	TTGCTCTTTGATAGGC	ATTTCAATTTGTAATTTACTAGCAG	Build 35	SYN-ARAF
D3S1597	9,2	AGTACAAATACACACAAATGTCTC	GCAAATCGTTCATTGCT	Build 35	SYN-ARAF
D3S3613	15,3	CATCTATGTGGCAATCGG	CAGCATTGTGTAGGGACT	Build 35	SYN-ARAF
D3S3675	114,3	CATGCCCCAGGTGCTGA	TCCTTGACTTGCTGAGAGGCC	Build 37.1	SYN-ARAF
D3S3665	115,68	GGGCTCAAAGCACCTTC	CCATCTTCAGGCAGTAAAGC	Build 37.1	SYN-ARAF
D3S1610	114,55	CTTACATACCTAAGTTTGGGAG	AAAGTGGTGAAGAAGTTCCCTC	Build 37.1	SYN-ARAF
D3S3628	189,09	CCATGAAGAAACGGTTCTC	TTACTGGGCAGATTCCCTTG	Build 35	SYN-ARAF
D3S3530	190,47	ACAAACCATTTGCCACAGAC	ACATTGCAGAGACGAAGCAC	Build 35	SYN-ARAF
D3S3054	191,8	TGGTACAGATAGAGGTGACGC	CTCTCTGGGCCCTACTTTCT	Build 35	SYN-ARAF
D3S3557	193,1	TATGCTTTAGTGGGCTCTCT	CTGGTAACTNCAGATGTCA	Build 35	SYN-ARAF
D3S3663	193,2	GCTTCAAGAGCTGAGACC	TGGAACCATGTATATGGC	Build 35	SYN-ARAF
D3S2748	193,7	CAGAGGGTTTCACCTCTATCACA	CATTCTATGTTTCTGTGTGTGC	Build 35	SYN-ARAF
D3S3562	195,1	CCCCACTTCACAGATGAGAAA	TGGTGCCACATGCAA	Build 35	SYN-ARAF
D3S1265	196,9	GAAAGGAGGAATCACGGAG	CGTCTGTGTGTGCTAGTATGTA	Build 35	SYN-ARAF
D3S1311	198,4	GGAAGTTTCAGCCAACG	TTAGTCCCACTGATGTTACATTT	Build 35	SYN-ARAF

Cromosóma 4

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D4S3038	1	GAAGACCAGCATTGG	GGTTTAATACACAGTAATTGTTCA	Build 35	SYN-ARAF
D4S1614	2,6	CATCTAGGAGAATCAGTACTTGG	TTACCATGAGCATATTTCCA	Build 35	SYN-ARAF
D4S2921	18,9	TCCTTCAGGAAGTGGT	TTAAAAATCTACAGACAAGGGC	Build 37.1	SYN-ARAF
D4S3051	18,8	TTTGTTGGTCTATCAAAAGTC	CAAGATGTGCAGTGGG	Build 37.1	SYN-ARAF
D4S1554	185,3	CTTGTTTCCTGTTGAGCACT	GAATGATGTAATGATCACCACAGAT	Build 35	SYN-ARAF
D4S2924	187,1	TATTGCAGTGCTGGG	CCACAGGGGACACATT	Build 35	SYN-ARAF
D4S426	189,8	ATACACTGCATCCATATATACAAGG	ACATTGTGAAATGACCACAG	Build 35	SYN-ARAF
D4S2930	190,7	CCTCATGGTAGGTTAATCCCACG	TATTGAATGCCCGCCCATTTG	Build 35	SYN-ARAF

Cromosoma 5

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo			NCBI, map viewer	Programa
		D	R	R		
D5S392	0,3	GCTATCCCACAAAGGCA	GGCGGATCATTGAGTGC		Build 35	SYN-ARAF
D5S1970	2,4	CTTCAAGAGGGTATTTACAGAGC	TGGTGATGCCAGATTCC		Build 35	SYN-ARAF
D51980	3,4	CATGTTTTGCACCTAGTAAAGACC	ATGAAATGTACCTGCCTTTG		Build 35	SYN-ARAF
D5S676	4,49	ATCTCTACCTGGCCCC	CCATTATTTCCATTTTGTGG		Build 35	SYN-ARAF
D5S2088	4,5	AGCTGGAATCTGTGTAAACA	GCTGACCTTTGCTGTGTG		Build 35	SYN-ARAF
D5S406	5,02	CCTGCCAATACTTCAAGAAA	GGGATGCTAGCTGACTA		Build 35	SYN-ARAF
D5S2054	5,9	TGAGATTTTCAGCCCCACC	AGCCACTTCCCAGATGT		Build 35	SYN-ARAF
D5S635	6,34	TAAACATCCTCCAGGGCCA	GTCCATTACATCACAGTTACTTT		Build 35	SYN-ARAF
D5S1953	7,7	CAGCAGAGTGAGACTCCAT	TTCTCAACTGAAGTTTCTGT		Build 35	SYN-ARAF
Cr5_1*	7	GAGGGAACCTAGAGATAACC	GATTCTACTCCAAAAGCCTCC		Build 35	SYN-ARAF
D5S580	8,19	TAGTCTTTCATGACTTGGTA	CTGCATTCTAGCCTGGGC		Build 35	SYN-ARAF
D5S1957	8,54	GGCTGATTGGTAAGGAC	GGTTTGTAGATCTCCATTCTGT		Build 35	SYN-ARAF
Cr5_2*	8,5	ATAACAACCTACATAGTGTC	TCTTCCCTAGGAATAAATCCC		Build 35	SYN-ARAF
D5S1957	10	AGGCAGGAAACTAAACCA	AGCTAACTTTGAATGTGTGTG		Build 35	SYN-ARAF
D5S1987	11	GATTTGTCACCTGACTAGGAAGG	GAATCACTTGAATCCAGGAGATG		Build 35	SYN-ARAF
D5S2081	13,5	TGATAAACAAAGAACCCAACTC	AGCTTATTTAAGACCACAGAAAAG		Build 35	SYN-ARAF
D5S1954	15,8	GGAGTTTAGTATTAGGAGGCCA	TGAATGTCCCATTATTTCTGT		Build 35	SYN-ARAF
D5S416	16,8	CTGGGGCTGTTTGTCA	AGTGAACCTCGNCCCCTA		Build 35	SYN-ARAF
D5S502	25,5	CACATGCTACAAATCAGGGT	ATGATGTCCACACAATGAAA		Build 35	SYN-ARAF
D5S2495	87,11	TATGAGACTGCAAAATCGTTCC	CTATTTAATCTTAAGTTTCCCTGG		Build 36	SYN-ARAF
D5S2103	88,76	CTTTGTGAAGATGCCCGG	GTTCAGAGCAGGAGCC		Build 36	SYN-ARAF
D5S618	89,80	CTACCTGGGTGGGGAA	AAGGGCTCAGTATGGAAAAC		Build 36	SYN-ARAF

* microsatélites no descritos, de diseño propio

Cromosóma 6

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D6S1600	0,8	AGCTTGTGCATGTGCA	CAAAGTCCCAGCAGGTTT	Build 35	SYN-ARAF
D6S344	1,5	CTCCAGCCTGGTCACTA	CTAATGCATGACAATAATATTTCCA	Build 35	SYN-ARAF
D6S1713	4,3	AATCACTGTTACCCATAGGGTTATC	AGGCCAAGACCTCTGTGC	Build 35	SYN-ARAF
D6S1574	5,9	AAGAACITCCAAAACCAAT	AACCATCCAGGACATCAA	Build 35	SYN-ARAF
D6S1677	6,4	GTTTCCAAGGGCTGGG	GAAATCAAAATAACACATCCTCTG	Build 35	SYN-ARAF
D6S1598	6,93	TCAAGGCTTTCTGAGGC	AGCATGGATTCTGTTGTTTG	Build 35	SYN-ARAF
D6S1640	7,3	AGCCAGGCATGCTAACAT	GGATTACAGGCCACCCAGTA	Build 35	SYN-ARAF
D6S1674	7,99	CCTTAAACAACAATAAGACCACC	CAGCCTAGAAAACAGAGCCCA	Build 35	SYN-ARAF
D6S309	8,16	TTGCAGTGAGCCGAGATTG	CTTGTGCGAATGAACACCCG	Build 35	SYN-ARAF
D6S300	94,82	AGATACATTGACATTCTCCCGC	TCAAAGCCAAAAGCCTACT	Build 36	SYN-ARAF
D6S1716	98,85	CATCACAGAGCAGTTTTTGG	CCTTCACTAGAGAAGCCTCAG	Build 36	SYN-ARAF
D6S468	101,73	GACTATCTCACTTTTATCAGGCAG	ACATCTCTTCAGACCACAGG	Build 36	SYN-ARAF

Cromosoma 7

Nombre	Posición (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
ELN	73.4	GGGATCCCAGGTGCTGCGGTT	AGCTGCTTCTGGTCAGCAAA		SYN-ARAF
HEI					SYN-ARAF

Cromosoma 8

Nombre	Posición (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D8S1824	3.5	AAAGTGCTTCGAGGTCC	TGAAAATTGTATCCTACCTGAG	Build 35	SYN-ARAF
D8S1819	6.7	TCACTGAGGGACTTGGC	CGTGCTGAGAATGAGACC	Build 35	SYN-ARAF
D8S552	11.4	AGGATTGTAATTTCCCTTGC	GGGACTTTTTGAAGGTTTG	Build 35	SYN-ARAF
D8S507	59.3	TTCCCTCAGAGCAGTTCAAAG	TAATCTTGCCCCAGTGAGAG	Build 36	SYN-ARAF
D8S1812	60.8	AGAAAGCACCACATAATCC	TTTGAAGGCCAAAACA	Build 36	SYN-ARAF
D8S260	61.9	AGGTTGCCAGATAAGGTTG	GCTGAAGGCTGTTCTATGGA	Build 36	SYN-ARAF
D8S1843	62.4	AAAACAACCTGAGTAATAGCAACAC	GCAGAAGCAACAATTTAAAAGTC	Build 36	SYN-ARAF

Cromosoma 9

Nombre	Posición en el cr. (Mb)		oligo D		oligo R		NCBI, map viewer		Programa
D9S1779	0		CCCTGCCAGGTGTCATCTG		TCAGGCTCCCTCGTGGCTCT		Build 35		SYN-ARAF
D9S1686	4,63		AAATGCGTAATAGCAGAGATCAG		TTTAGGGTTGTGGCATAGA		Build 35		SYN-ARAF
D9S178	4		GAATAAAACAGGGTTTGGG		TTTCTCTAAGAAGCTTTGGGG		Build 35		SYN-ARAF
D9S1852	6,2		GAATCACAACATACACCCAC		GAACATTCCTTTACAAGTAACATT		Build 35		SYN-ARAF
D9S1849	7,29		ACTTGAGCATCTGTGCATTTTG		GAGAAATTAACACCCGAAATCACACTG		Build 35		SYN-ARAF
D9S286	8,04		TGGAGTGGCTCATAC		CCACCACCTACATGGC		Build 35		SYN-ARAF
D9S1676	8,3		AAAGTTGCCCCAAA		CATGTGTAAGGTTGTCAGAT		Build 35		SYN-ARAF
D9S168	10,5		GGTTTGGTCTTTGTAAGG		TGGTTTGGTGTATAACTATCATTTG		Build 35		SYN-ARAF
D9S269	11		TTCAGAAATAGCCCGC		CTGTAACCCCAAGATAAGAATG		Build 35		SYN-ARAF
D9S1863	130,5		TTGGGCCACCCATAAAAATA		CTAGAGACCCAGGCAATTCCTT		Build 35		SYN-ARAF
D9S1793	133,4		GGTGTGGAACACAGGACTAAC		CAGAGCGAGTGTAATCCG		Build 35		SYN-ARAF
C9_1*	134,55		ACAGTGAGTCGAGATCATGC		CACTCGAACTCCTGACCCTCAG		Build 35		95°C-5' 95°C-30' 58°C 30" 72°C10' 32ci 72°C 5'
D9S1826	135,6		ATGTTGATTGCCGCAAGTG		TGCAGAACCCAGGCTTTATTCCG		Build 35		SYN-ARAF
C9_2*	136,2		CATAAAGTAGGCAAAAGCGG		GGCTATTGGTGTGTCTCACA		Build 35		SYN-ARAF
C9_3*	136,49		AGGAACACATGGCCAAAGCTGG		GGTCCCTGATGGTTCCTGAC		Build 35		SYN-ARAF
C9_4*	136,55		ACAGTCCATGTCCGGGA		GTCACAGCGTCCGGTGG		Build 35		95°C-5' 95°C-30' 55°C 30" 26ci/ci 72°C 5'
D9S158	136,3		TCTCAAGCGACAACAATCAC		GATTTGGCTAAAAATAGGCTCA		Build 35		SYN-ARAF
C9_5*	137,0		GCTGTTTGTGCTTTGAGTGC		GCCACTGCACCTCCAG		Build 35		95°C-5' 95°C-30' 58°C 30" 72°C10' 32ci 72°C 5'
C9_6*	137,2		TGCAATCCCAGCTACTCGG		TCAAGTGGTTGTTAGGAGTCTG		Build 35		95°C-5' 95°C-30' 58°C 30" 72°C10' 32ci 72°C 5'
C9_7*	137,3		ACGCTGCTCACAAAACGTGGC		GGCATCACTGTGCCCATGTG		Build 35		95°C-5' 95°C-30' 58°C 30" 72°C10' 32ci 72°C 5'
D9S1838	137,9		ACCAGCTACTGAGGAGGCTT		GCTTCTGCACCTTTGTAGAACCANAAT		Build 35		95°C-5' 95°C-30' 55°C 30" 26ci/ci 72°C 5'
D9S1090	138,0		ACAAAACCCAAAAACACAGG		AGCGCTTTGTTTGTCTGATG		Build 35		SYN-ARAF

* microsatélites no descritos, de diseño propio

Cromosoma 10

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo			NCBI, map viewer	Programa
		D	R	R		
D10S1723	121,3	GCCTTCATTTGCATAGGG	CATGCTGAGACCCAGTG		Build 35	SYN-ARAF
D10S1676	125,6	CCACCACTCAGAGGTAAG	AATTGTATGATCCCAACTTTGTGTC		Build 35	SYN-ARAF
D10S1727	125	TCATGTGATGACAATCTGACAGT	ACCAAATGTGGCCTGCT		Build 35	SYN-ARAF
D10S1655	126,5	TGCCAGACTCCATGATGGTATGAAC	TAACAAAACATCTGAGCACAGCCCC		Build 35	SYN-ARAF
D10S1248	126,7	GGAATAAGTGCAGTGCTTGG	ACCAATCTGGTCACAACCCAT		Build 35	SYN-ARAF
D10S1651	128,3	TCGATTTGACGCAAGTTT	AGCACCCAGGGCTTCT		Build 35	SYN-ARAF
D10S1651	128	TCGATTTGACGCAAGTTT	AGCACCCAGGGCTTCT		Build 35	SYN-ARAF
D10S590	129,2	GTGGTCTCTGCCACACCTA	GCACAGTCTGCTGCATCTC		Build 35	SYN-ARAF
D10S212	130	GAAGTAAGCAAGTTCTATCCACG	TCTGTGTACGTTGAAAATCCC		Build 35	SYN-ARAF
D10S1770	132,5	CATGAGATTTGAGTGGGG	AACAGGCTGTGGCCTC		Build 35	SYN-ARAF

Cromosoma 11

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo			NCBI, map viewer	Programa
		D	R	R		
D11S4172	78,8	CCAGTCAAATGCTCATCAG	TTATCAGCAACATGAAAATGGAC		Build 37.1	SYN-ARAF
D11S1362	79,8	ACCCCTCAGGATTGACC	CCTACTATGTGCCAGGAATTT		Build 37.1	SYN-ARAF
D11S901	81,8	CCCACATAGATTACTGGCCTC	CCCACATAGATTACTGGCCTC		Build 37.1	SYN-ARAF

Cromosoma 12

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo		oligo R	NCBI, map viewer	Programa
		D	R			
D12S1626	3,16	CTGTGCAAAAACCCCTAATG		GCCAATGTAAGTCTCCAATGTAAG	Build 35	SYN-ARAF
D12S1624	4,6	CCAATTAGGTTCTAAGAGGC		GCTAAAAGATTTACATAAGATTTCC	Build 35	SYN-ARAF
D12S314	4,8	TTTGGAACTGTCACCTCAGAAAAAG		AGCAGACCCTGTCTCTCATAATTG	Build 35	SYN-ARAF
D12S1673	5,8	GAGGTGCATTTTCCAGGG		GGGTCCAGCATGTTTCATC	Build 35	SYN-ARAF
D12S93	5	GCTGGTGGACACTGAGTTTG		CATCACCTCTTTGTGGCTTCT	Build 35	SYN-ARAF
D12S1623	6,78	TGCAGTGAGATCGCACC		TCCAACCTGGGCAACAATAG	Build 35	SYN-ARAF
D12S1695	9	TGTGAGCCACTGCACC		GCCTTCAAAAACCATAGTACAATAAC	Build 35	SYN-ARAF
D12S1349	120,80	CCCAAGAGTGACATTGGC		GCATGGCTGGGCATAAG	Build 36	SYN-ARAF
Cr12_2*	121	TTGCTTACCACCTGGTGGTG		TTCTTACAGACTAACATGGG	Build 36	SYN-ARAF
Cr12_3*	121,28	TCAATGTAATTGTTGACCTGG		CCCACGTATCTCCTTTATTG	Build 36	SYN-ARAF

* microsatélites no descritos, de diseño propio

Cromosoma 13

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo		NCBI, map viewer	Programa
		D	R		
D13S154	95,06	GTGCTATAAAGGCTTGCTGC	CTCTTGCCCTGGTCTTGACT	Build 36	SYN-ARAF
D13S1241	96,34	ATAATTGTAATGGCCTTCC	CTCCAGTTGAGTTTGGACC	Build 36	SYN-ARAF
D13S1252	97,33	CGGCGTGCCTCAAAA	ACTGTGCTGTGAATGCG	Build 36	SYN-ARAF
D13S286	105,1	AAGCTATCAATAAGCCAGAGCA	TAGAGTGCAGTGTCCAAAACG	Build 35	PCR: 3'92° 30Ciclos(1'94°:30'52°) 3'72°
D13S173	106,1	CCCTGTTCCAGTAATGATGACC	GTCTCTGGCTGCTCTCAAGACTAT	Build 35	SYN-ARAF
D13S1258	106,4	TAGGTTTTTATCTGANCCAT	TGTTCAACACTGATAACATAGATTT	Build 35	SYN-ARAF
D13S1315	108,14	TACACGATAAGTAAGCCAAAGCA	AACTCAACAGTCACAAGAGCAAT	Build 35	SYN-ARAF
D13S1311	124,1	TGATGACCTTCTGTGAGTCTCT	GAACCTCCGAATTTCCAACAG	Build 35	SYN-ARAF

Cromosoma 14

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo		NCBI, map viewer	Programa
		D	R		
D14S261	18,7	GGCAGTATGACCCAGTTACAGAT	ATTTTGAAGCCCCCAGGAA	Build 35	SYN-ARAF
D14S72	19,2	TGTAAGTTTTGTACATGGTGAAT	TCCTAACATCTGCTACCCA	Build 35	SYN-ARAF
D14S1023	19,3	TGCATTTCCCGTAGACATT	GACTCTTGTAGTTCTTTGAAGCC	Build 35	SYN-ARAF
D14S742	20	GGCGTGGTTTTCTTTCATAA	CCTGCCCTCTAACATCAGTG	Build 35	SYN-ARAF
D14S990	21,4	GTCCACTTGGTCATGGAAC	AAGTTGCACGTGACTGGG	Build 35	SYN-ARAF
D14S1032	24	TGGGFACTAGGCTTAATACCTGG	TGCTAGAGAGGTTGCATACG	Build 35	SYN-ARAF

Cromosoma 15

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D15S967	68,47	ACCTGGGTGAGTTACTGTG	TGGGAACATAGCCCTG	Build 36	SYN-ARAF
D15S145	68,64	TTTAGAGGCCCTGCATATC	CTAAGTGTGAGGCAGCCAT	Build 36	SYN-ARAF
D15S893	68,937	TGATTTTAAATTTACAATGGAGCA	TTGGGCTCACAGATAAAACTAGG	Build 36	SYN-ARAF
D15S914	69	TAGGGTTTTCATGAATGACTCATT	AATTTCAAAAACAAGATTGGTAAA	Build 36	SYN-ARAF

Cromosoma 16

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
Cr16_EEF2K*	22,2	AGATCACATCACTGCACTCC	ATTCAGGTTGGCTAACATTTCC	Build 36	SYN-ARAF
Cr16_OTOA*	21,6	CTCTGTGTTAA TGGTATATGG	TTGGGCAACAGAGTGAGAC	Build 36	SYN-ARAF
D16S405	15,790	AGTTCTCTGCTGCACCTGGC	TGAAATGGGGACCATTGAAGG	Build 36	SYN-ARAF
D16S3060	15,7	TGAGCCGAGATTGCACCAA	TGCCACAGGGGATATAAGCC	Build 36	SYN-ARAF

* microsateélites no descritos, de diseño propio

Cromosoma 17

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D17S849	0,379	CAATTCGTGTTCTAAGATTATTTGG	CTCTGGCTGAGGAGGC	Build 36	SYN-ARAF
D17S1308	0,569	TGTAAACITTTGCATCACATATACC	TTGGTGACAAAAGAAGTCTCC	Build 36	SYN-ARAF
D17S926	0,577	GCAGTGGGCCATCATCA	CCGCAGAAGGCTGTTGT	Build 36	SYN-ARAF
Cr17_1*	21,420	CAGAAATCAAATCAG TGTGTCC	GTACACCTGGAGTTCAGTG	Build 36	SYN-ARAF
Cr17_2*	21,420	ATGAAGCCAGCATCATCTCTG	GTGCATCGATGTTTCATCAGG	Build 36	SYN-ARAF

* microsateélites no descritos, de diseño propio

Cromosoma 19

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D19S247	3,1	TCAAAACCCACACAAGAAGA	GATCACACCCACTGAACCTCCA	Build 37.1	SYN-ARAF
D19S878	2,3	GCCTGGGCGACAGAGAAT	GGTTGCCCGCAGAGTG	Build 37.1	SYN-ARAF
D19S1034	6,1	AGGCTGTGGTGAGCTATGAC	GTGTCCTAGCACCTAGCAA	Build 37.1	SYN-ARAF

Cromosoma 20

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D20S108	40,26	AAGACACTGTCCANACATACA	CAACAAGTCAGAAGTGGCAA	Build 36	SYN-ARAF
D20S899	41,15	AGAAATGCTTTCAGAGCC	GTCAACATGAATAATACCATCTTAG	Build 36	SYN-ARAF
D20S96	41,52	CACTGCAACTCTAACCTGGG	CCTGTATGCTGCATTTCCCTG	Build 36	SYN-ARAF

Cromosoma 22

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
D22S1179	41,9	AGCTGTGGGCCATATTCC	TTGACACTGGGGCTTTAATC	Build 35	SYN-ARAF
D22S1153	44,7	TGAGCCATGATCGACCAC	CCAAGTTTGGATTCCAGAAACACC	Build 35	SYN-ARAF
D22S1170	46,7	ACCGTTGCCTATATCCA	AGCCCACTCCACAATTT	Build 35	SYN-ARAF
D22S1169	47,4	GCACACACATGCACATAATC	AAACAATCCAGCAGACG	Build 35	SYN-ARAF

Cromosoma X

Nombre	Posición en el cr. (Mb)	oligo D	oligo R	NCBI, map viewer	Programa
DXS1197	72.7	GCATGTTTATATCAGCAGAAATTTG	TCCAACCTCCATCTAGTTTGC	Buid 37.1	SYN-ARAF
DXS986	79.3	CCTAAGTGCTCATCATCCCA	AGCTCAATCCAAGTTGCTGA	Buid 37.1	SYN-ARAF
DXS1003	44.2	TTCACCCATAGAAAGCCGT	CCATTCCTCACTGGCAAG	Buid 37.1	SYN-ARAF
DXS988	53.3	GGCTCTTGAACAGAAAACAG	GCTATCATAGTGGATGTGAAGTAGT	Buid 37.1	SYN-ARAF
DXS1204	54.1	ATGAACCCCTTAACTCATTTAGCAGG	AGCNTGCACC AACATGCC	Buid 37.1	SYN-ARAF
MAO-A(INTRA.) DXS7156	41,3	CAAACAAAACAGTACCATACAGGC	AACTTGGTGCCTAATGTTCCA	Buid 37.1	SYN-ARAF
ATP7A DXS6743	65.1	GGAACAGCATCATCAAAGG	GGAACAGCATCATCAAAGG	Buid 37.1	SYN-ARAF

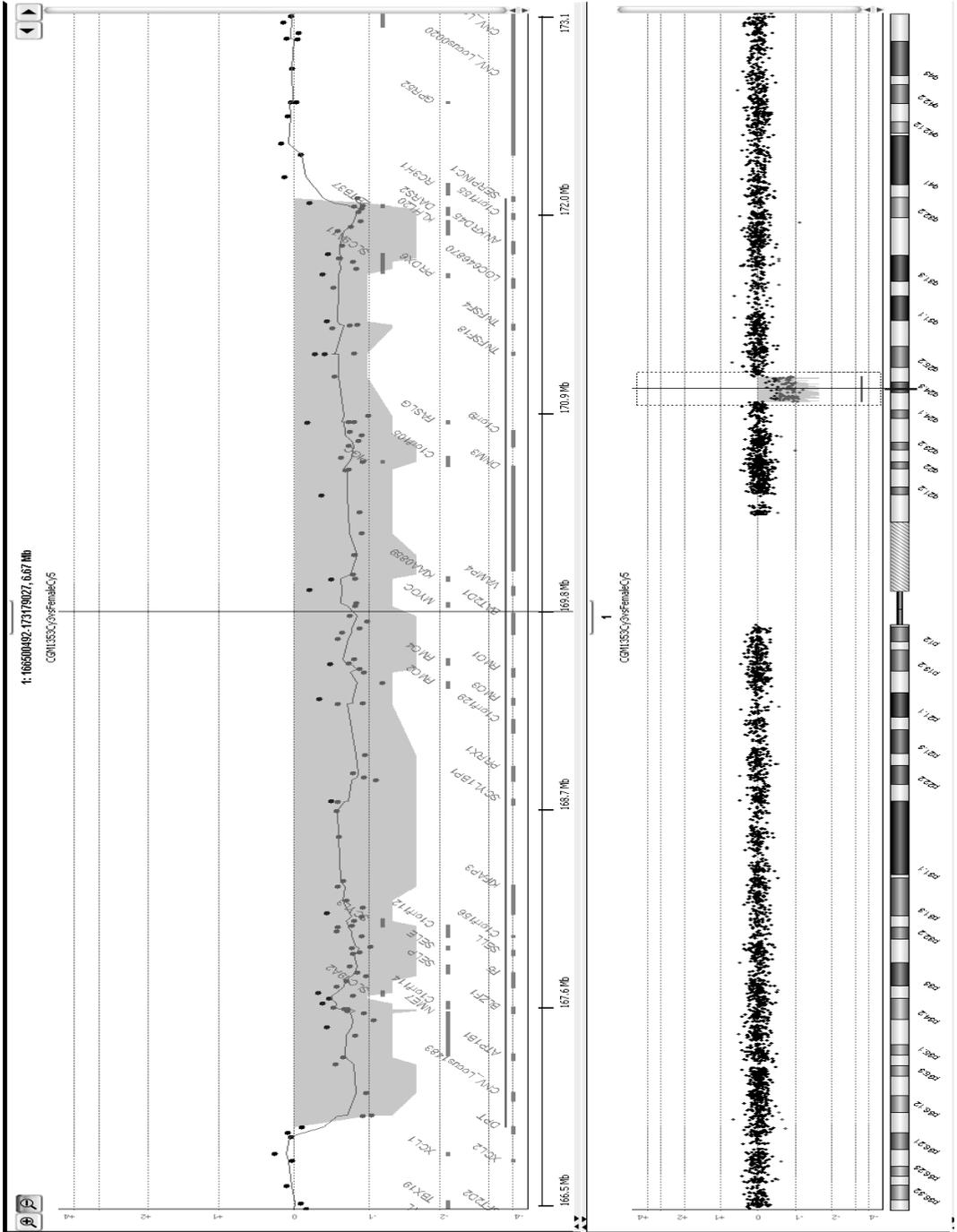
ANEXO 3

Representación gráfica de las alteraciones patológicas detectadas en distintos pacientes.

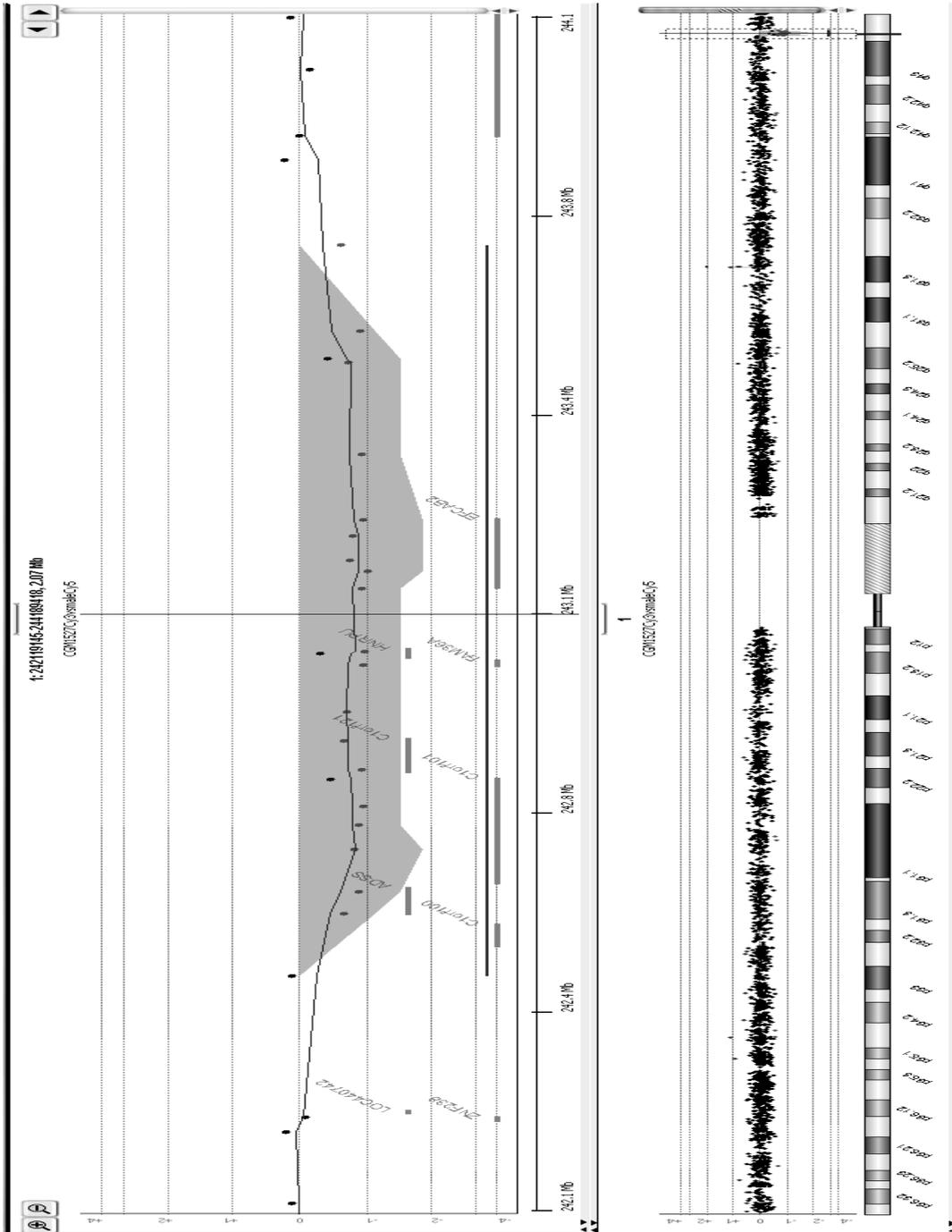
En la parte inferior de las figuras se encuentran representados todos los oligonucleótidos del cromosoma afectado junto con el ideograma de dicho cromosoma. Podemos observar la disminución o el aumento de dosis de los oligonucleótidos de la región afectada.

En la parte superior se presenta una ampliación de la región alterada junto con los genes que se encuentran en la región.

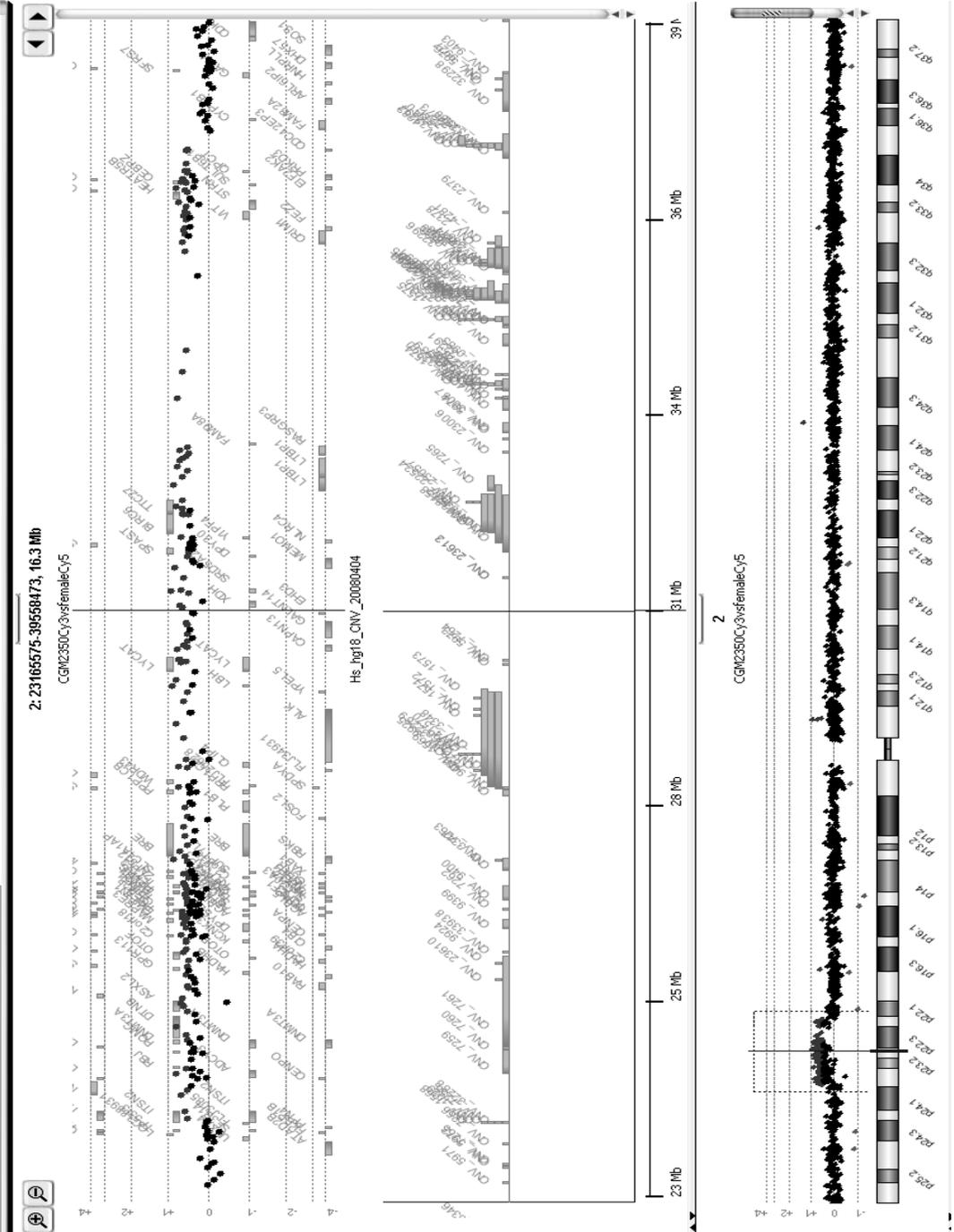
Región cromosómica 1q24-25. Paciente CGM1353



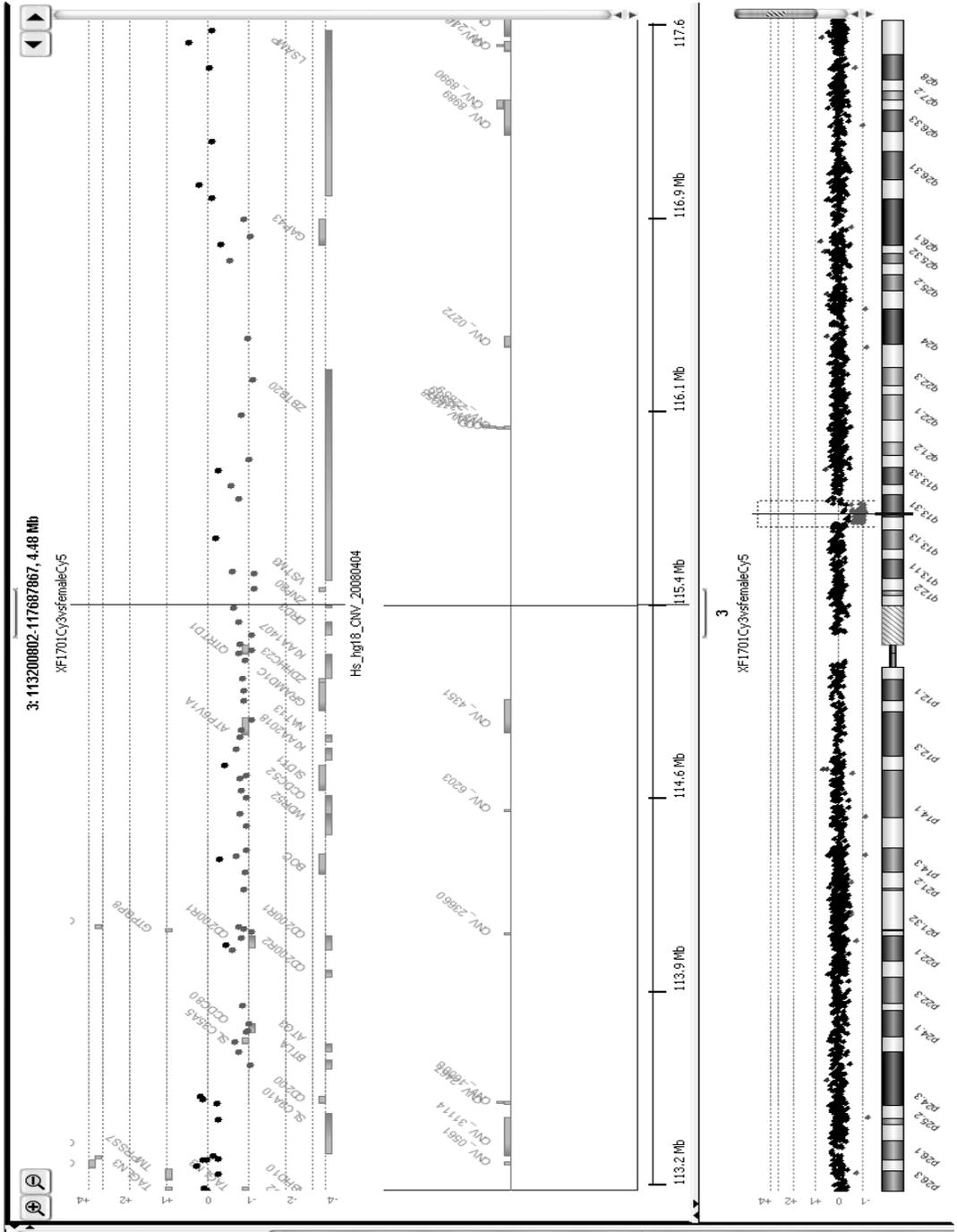
Región cromosómica 1q44. Paciente CGM1527



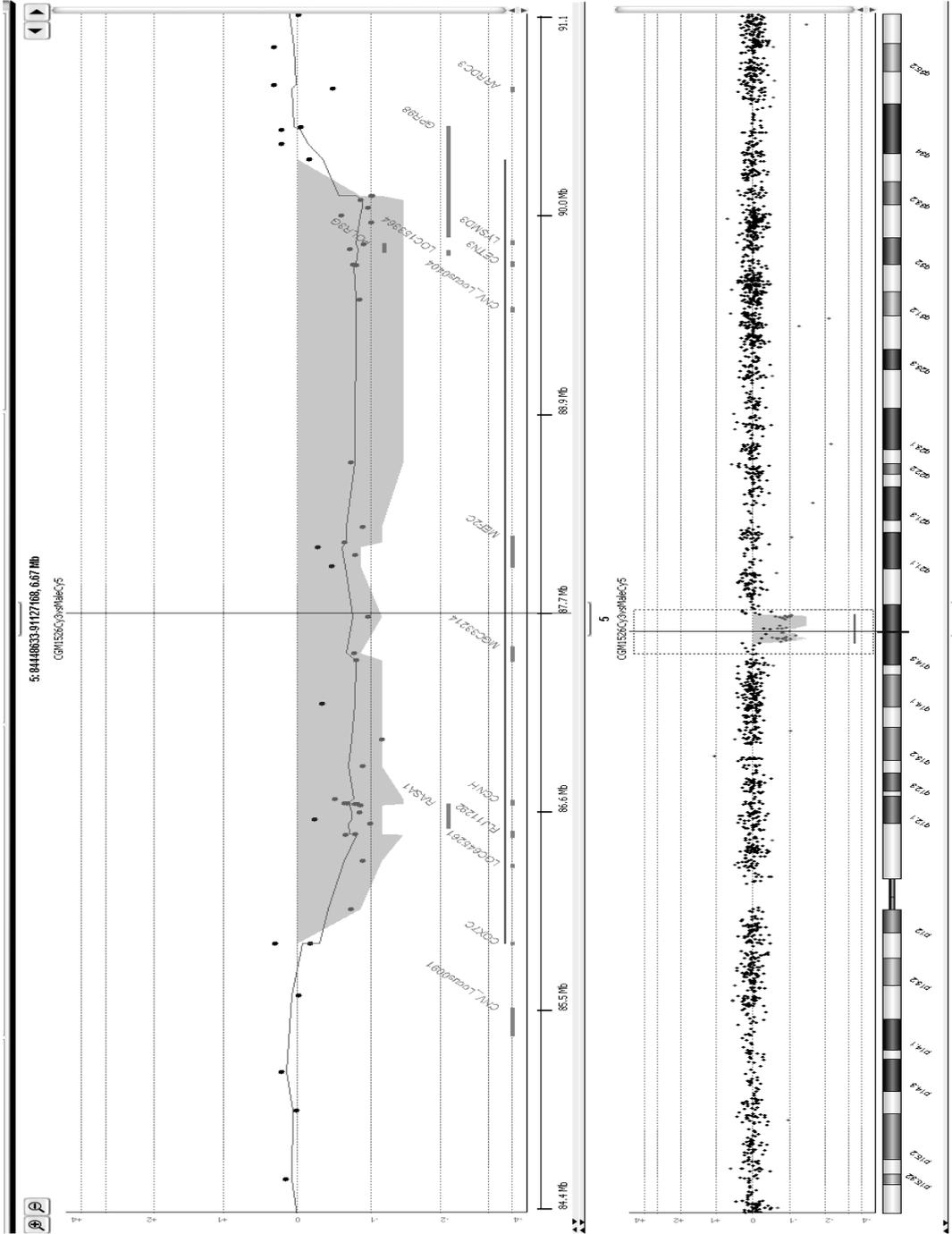
Región cromosómica 2p22.2-23.3. Paciente CGM2350



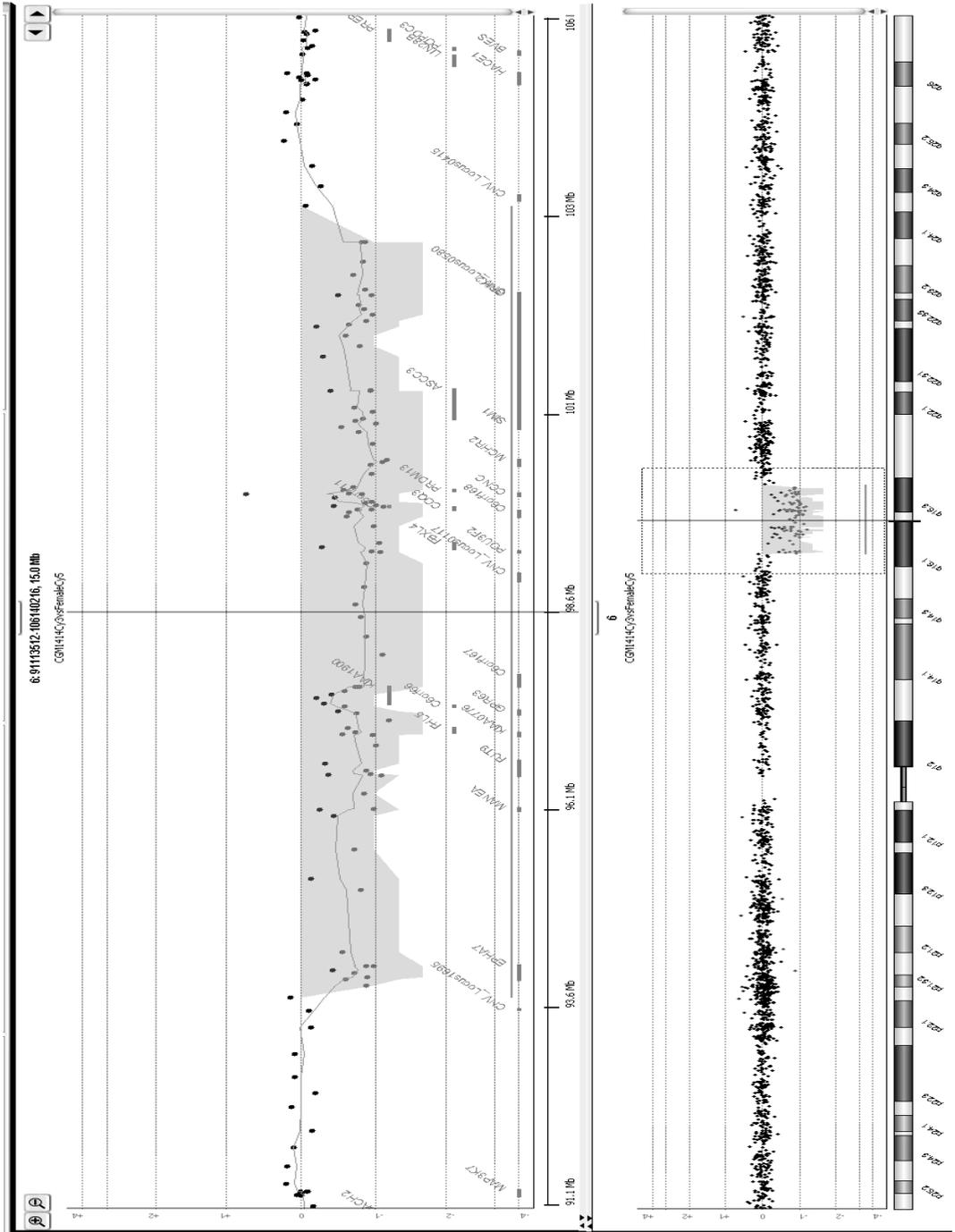
Región cromosómica 3q13.2-31. Paciente XF1701



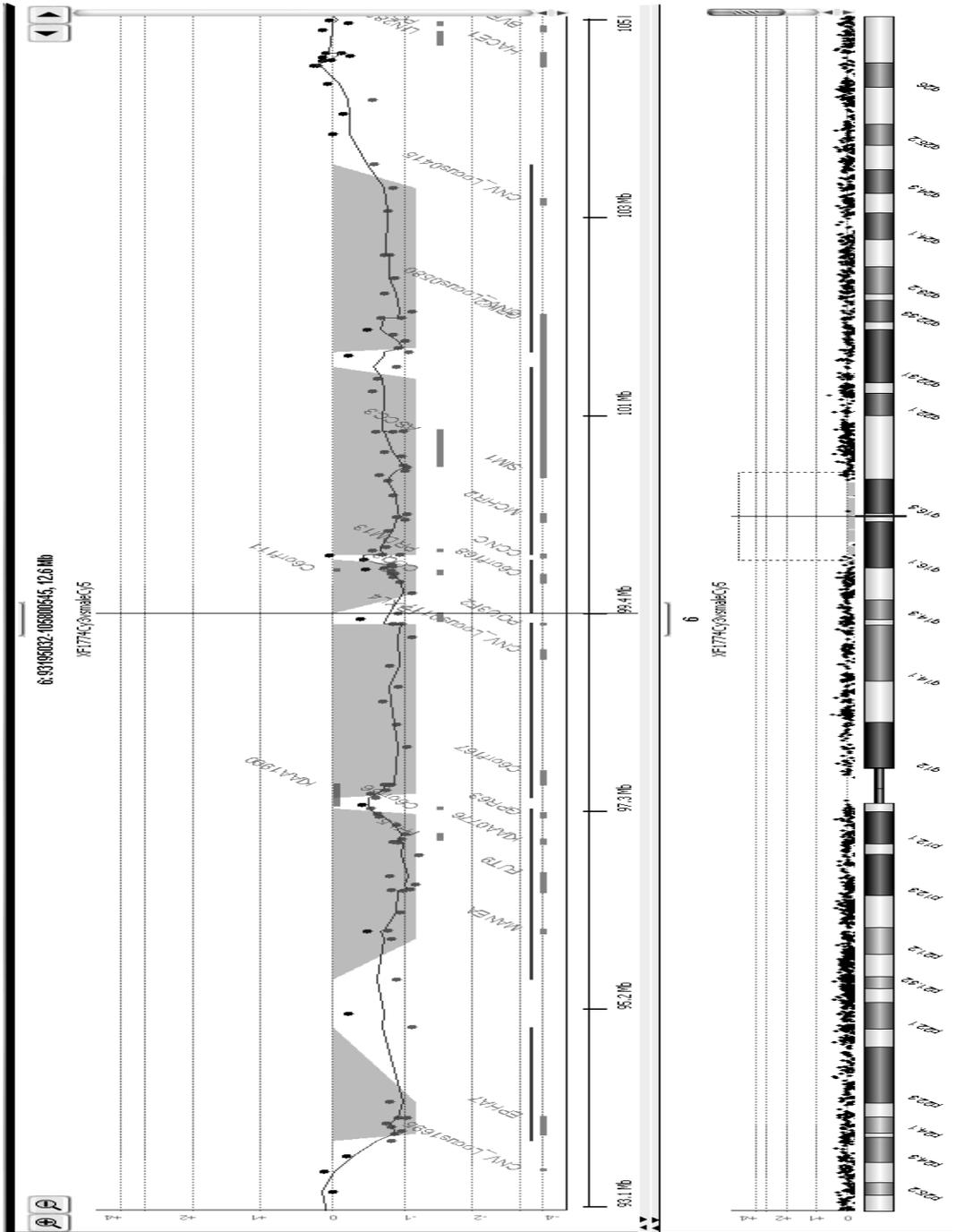
Región cromosómica 5q14.3. Paciente CGM1526



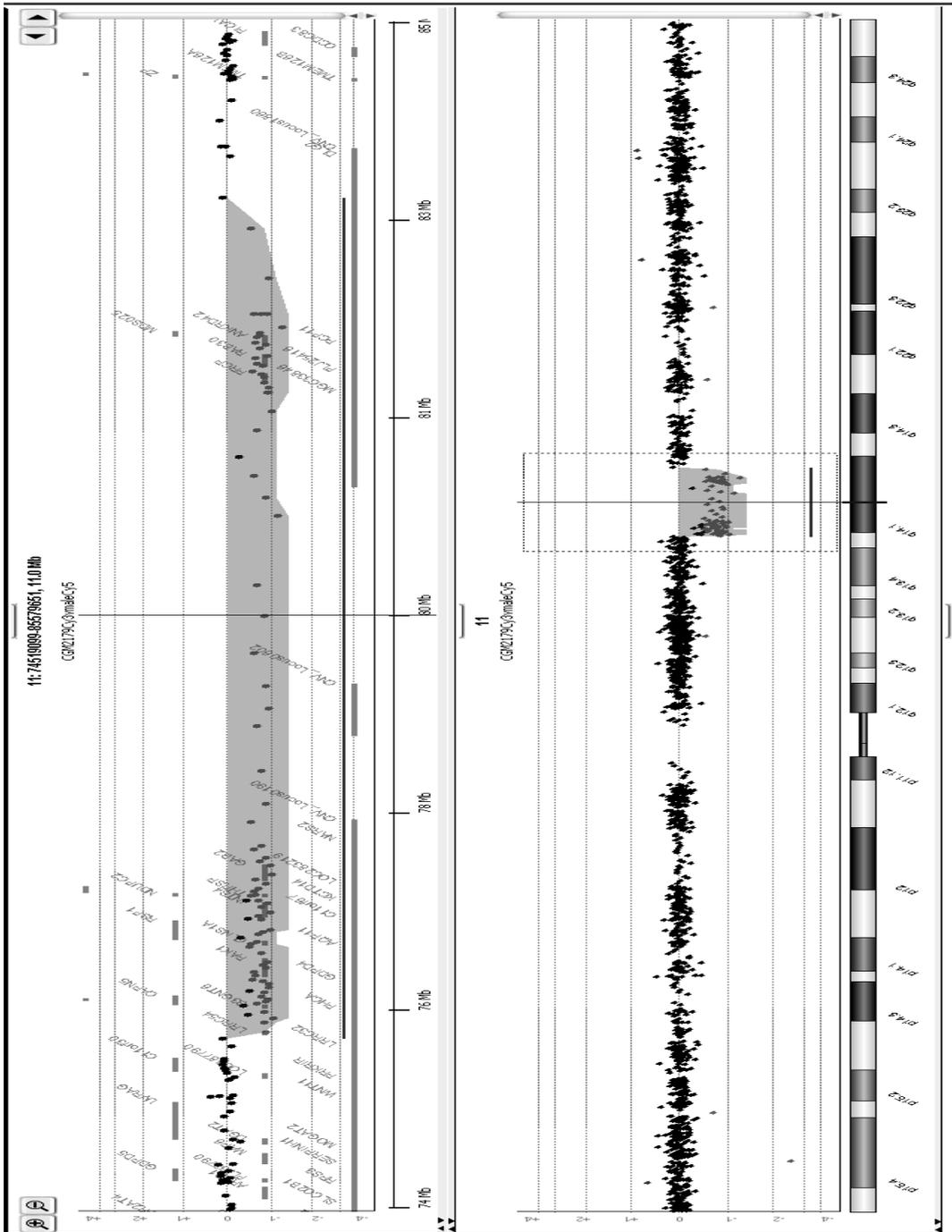
Región cromosómica 6q16.1-16.3. Paciente CGM1414



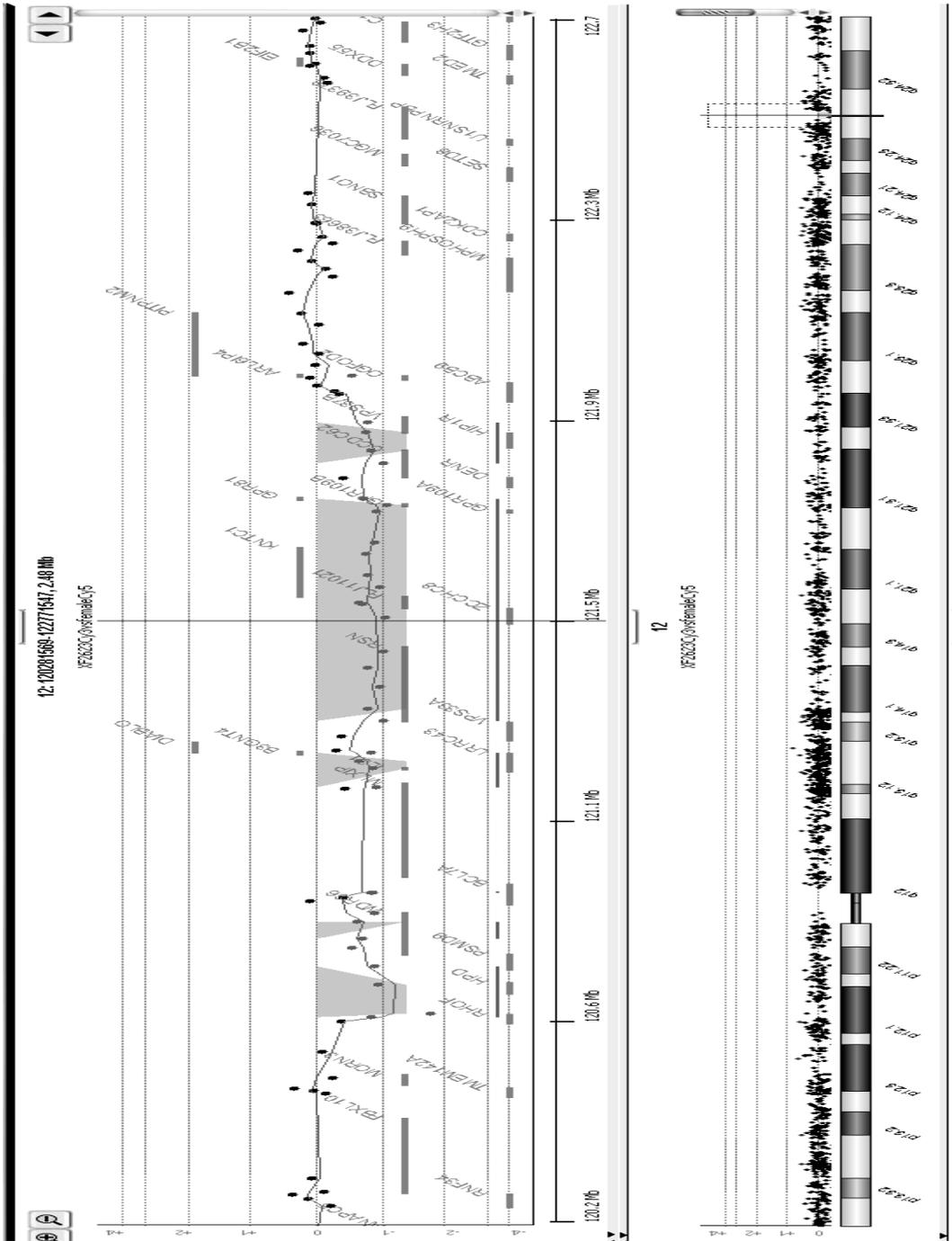
Región cromosómica 6q16.1-16.3. Paciente XF1774



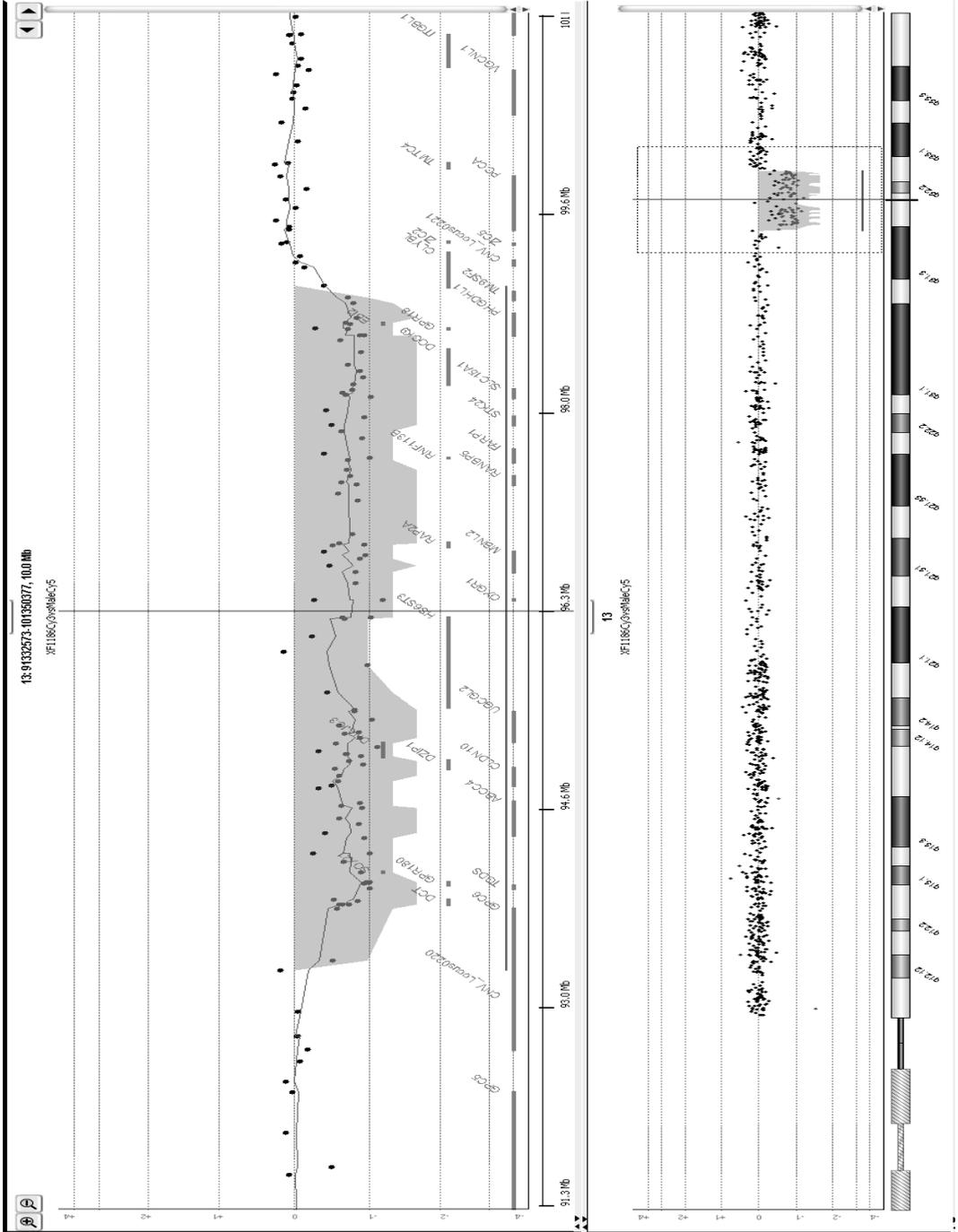
Región cromosómica 11q13.5. Paciente CGM2179



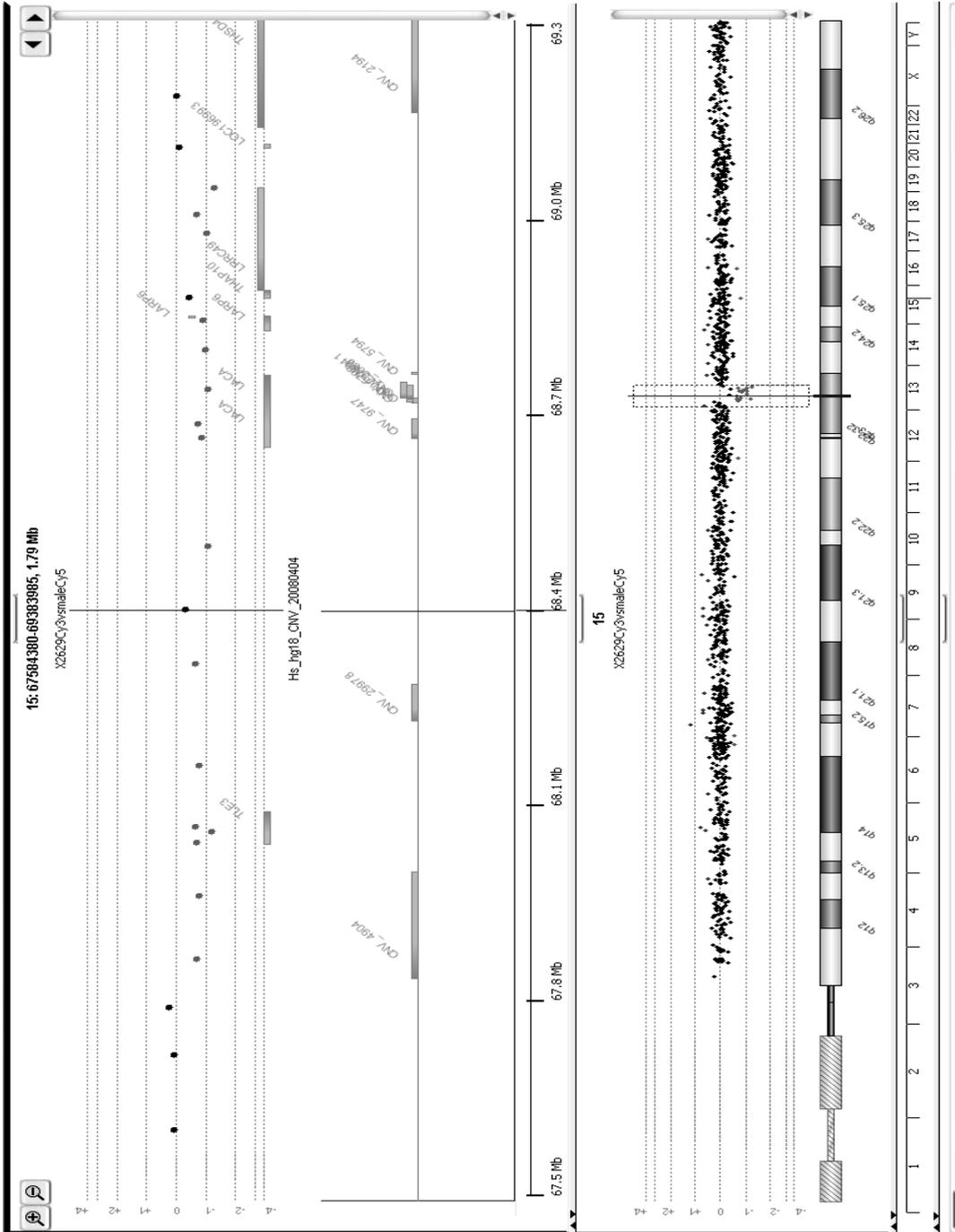
Región cromosómica 12q24.3. Paciente XF2623



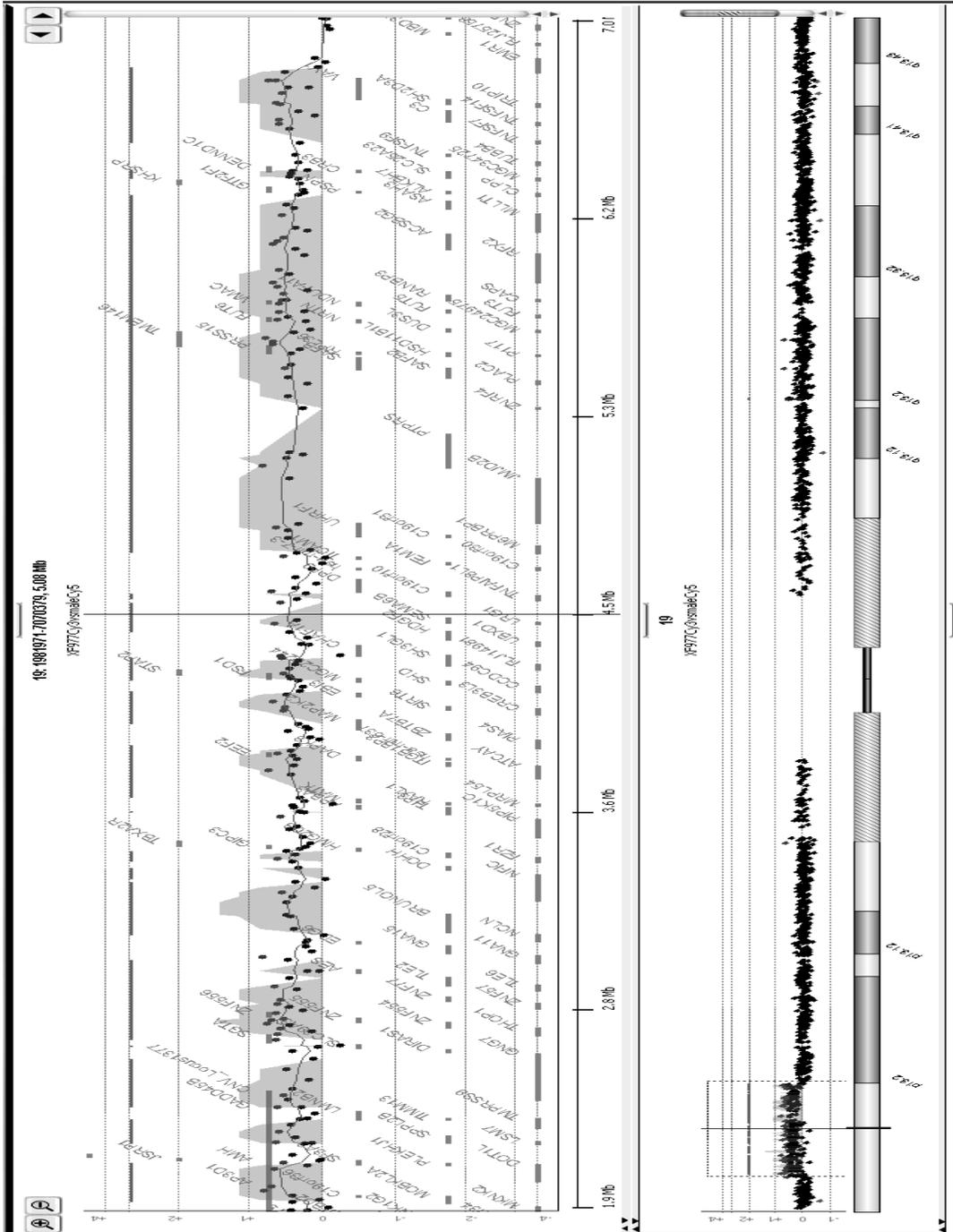
Región cromosómica 13q32. Paciente X1186



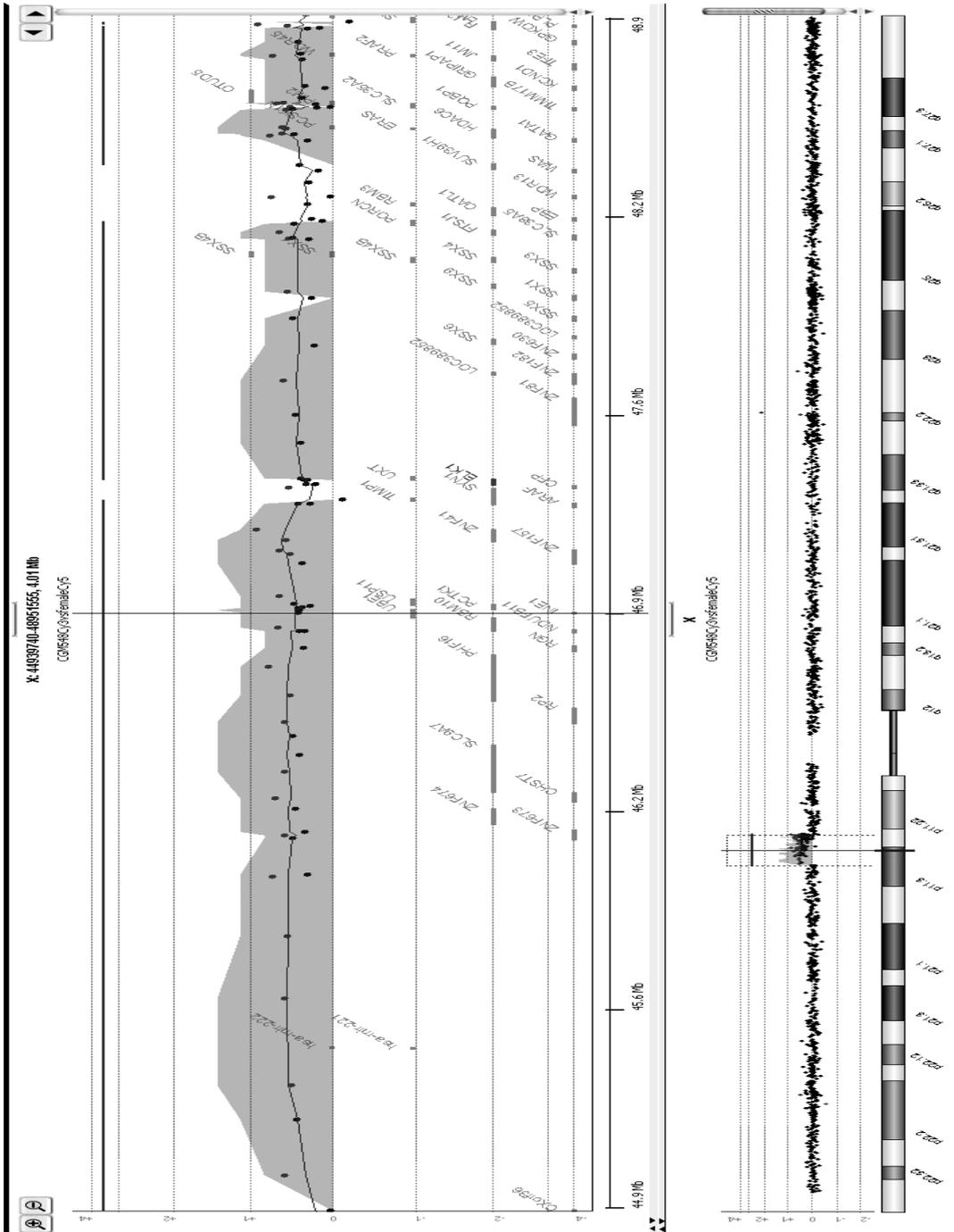
Región cromosómica 15q23. Paciente X2629



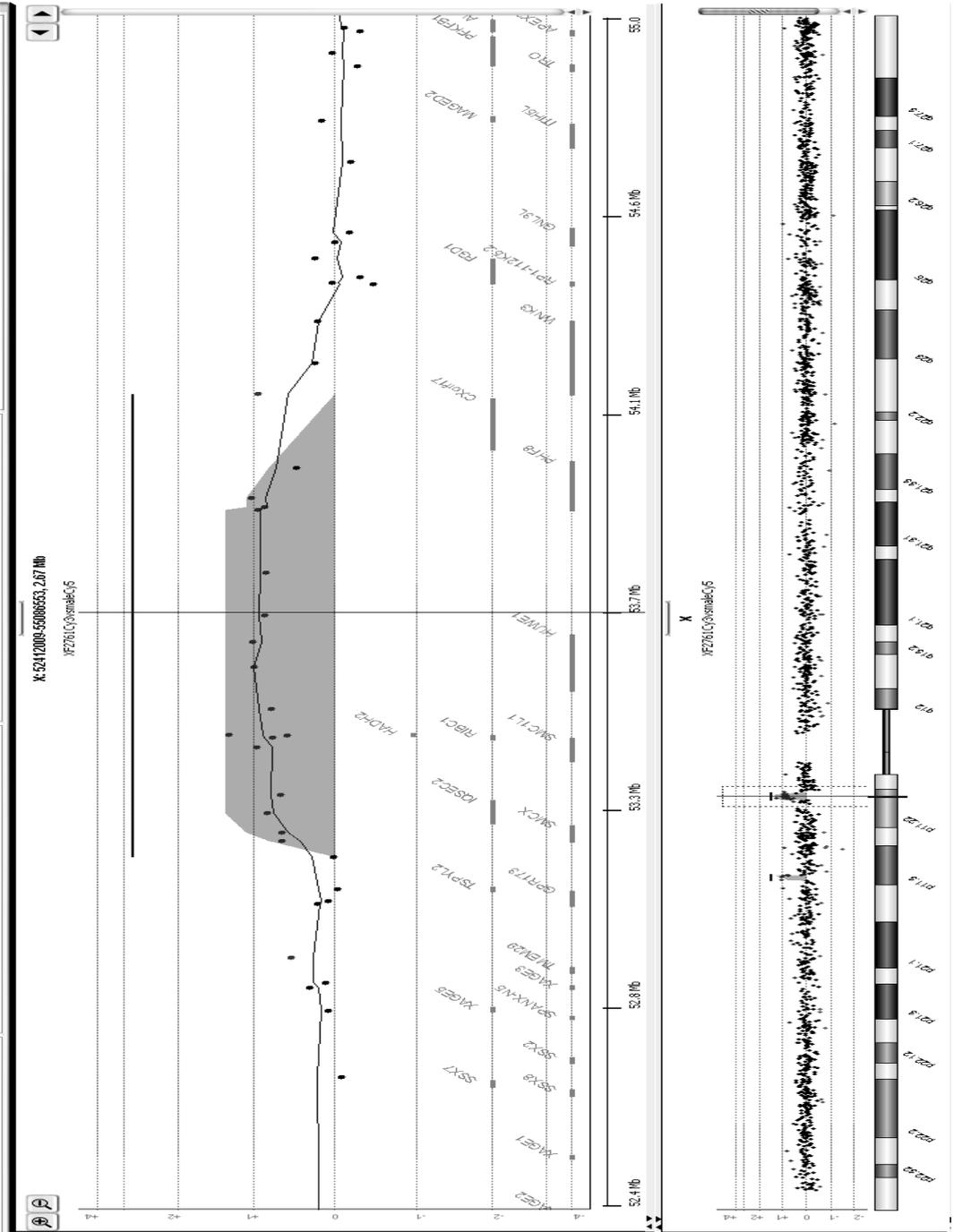
Región cromosómica 19p13.3. Paciente XF977



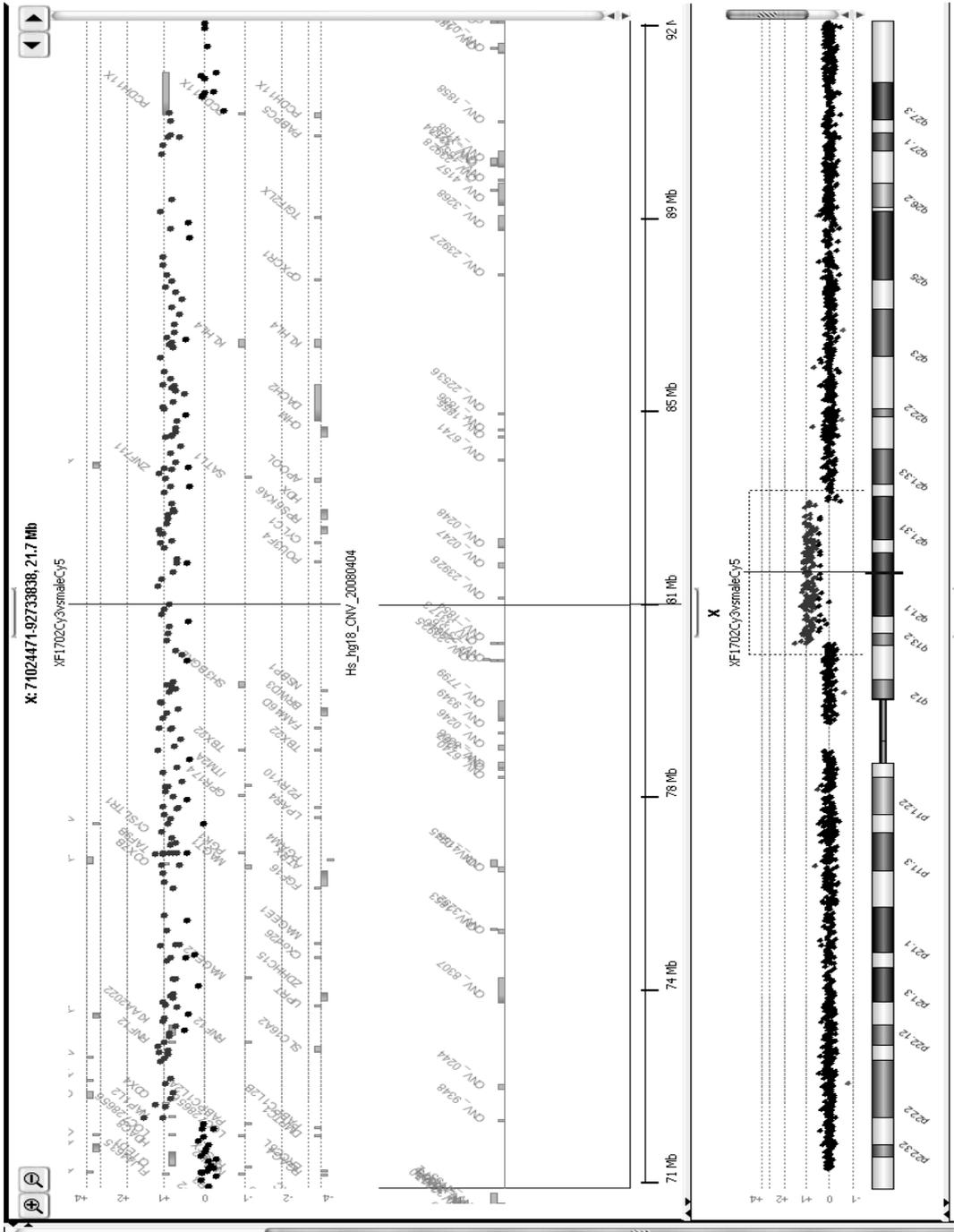
Región cromosómica Xp11.3-1123. Paciente CGM548



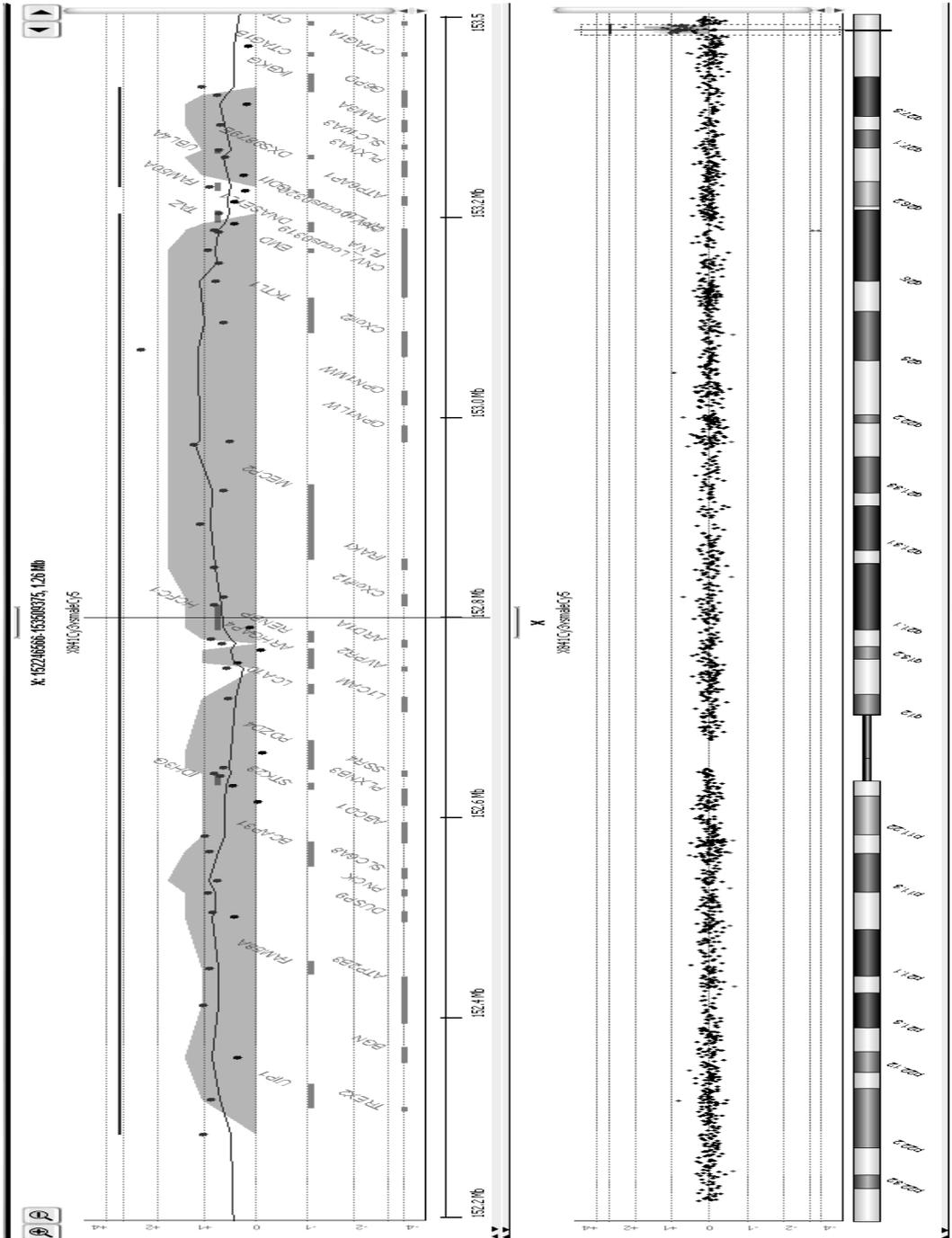
Región cromosómica Xp11.22. Paciente XF2761



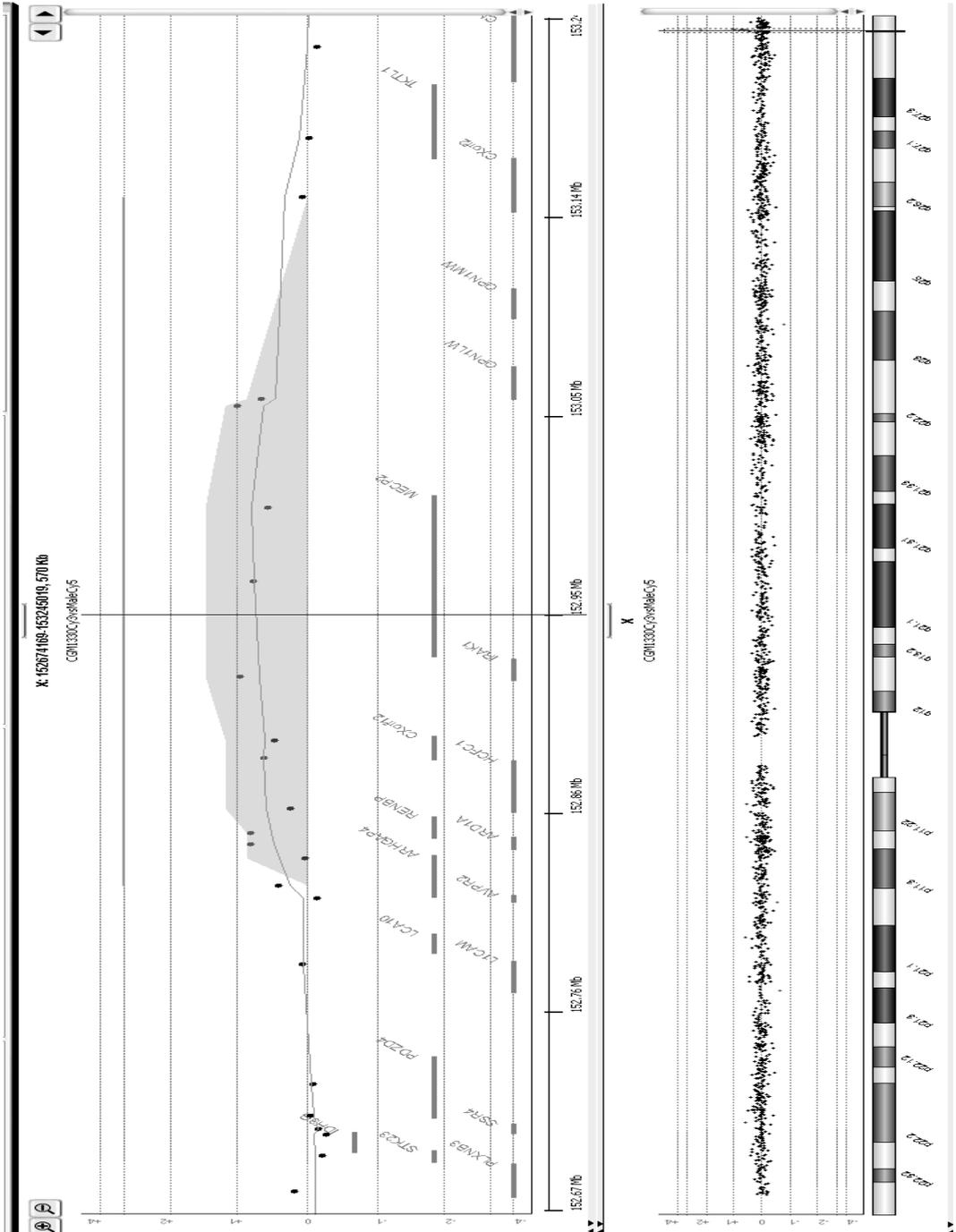
Región cromosómica Xq13.2-21.31. Paciente XF1702



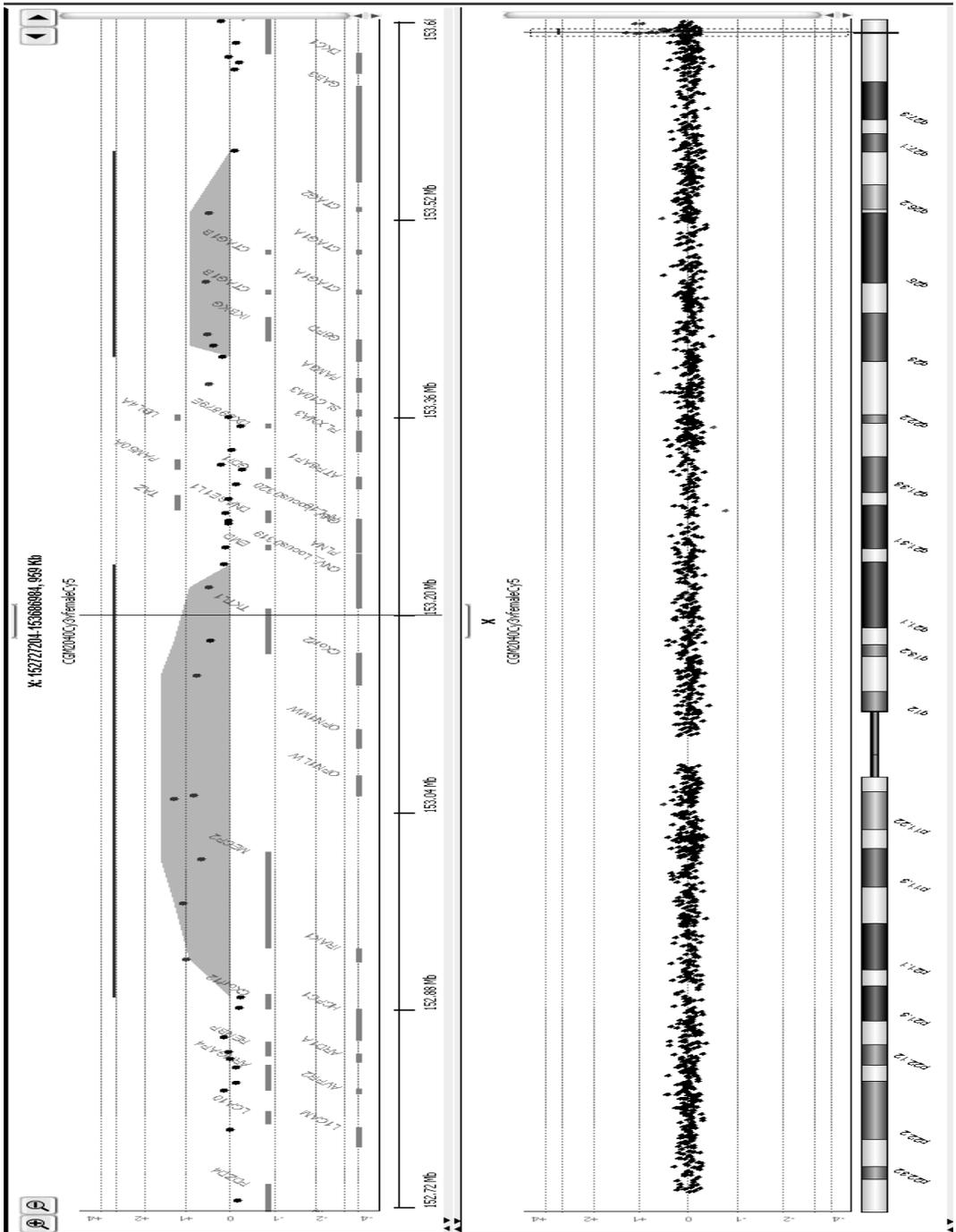
Región cromosómica Xq28. Paciente X841



Región cromosómica Xq28. Paciente CGM1330



Región cromosómica Xq28. Paciente CGM2040



ANEXO 4

Estudios de segregación familiar mediante marcadores microsatélite en diferentes pacientes.

