

TESI DOCTORAL

---

**Array CGH  
com a primera  
opció en el  
diagnòstic  
genètic postnatal**

---

NEUS CASTELLS SARRET



# Array CGH com a primera opció en el diagnòstic genètic postnatal

---

**Neus Castells Sarret**

**Tesi doctoral**

**Bellaterra, setembre 2015**





# Array CGH com a primera opció en el diagnòstic genètic post-natal

Memòria presentada per

**Neus Castells Sarret**

Per optar al títol de Doctora

**Programa de Biologia Cel·lular**

**Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia**

**Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona**

Tesi dirigida per

**Dr. Alberto Plaja Rustein**

Àrea de Genètica Clínica i Molecular.

Hospital Universitari Vall d'Hebron

**Dra. Rosa Miró Ametller**

Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona

Directors

Doctoranda

Dr. Alberto Plaja

Dra. Rosa Miró

Neus Castells Sarret

Bellaterra, setembre 2015

Amb el suport econòmic del "Fondo de investigaciones sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (PS09/00632)".

*A l'Enric  
a l'Eduard  
a la meva mare  
Al meu pare*



# Agraïments

Aquesta tesi hauria estat impossible sense el treball, generositat i l'esforç de molts companys als quals estic profundament agraïda.

. Vull agrair de manera molt especial als meus dos directors de tesi la Dra. Rosa Miró i el Dr. Alberto Plaja, la seva inestimable dedicació, paciència i generositat en temps i ensenyança. Sense aquestes dues persones, extraordinàries, és clar, no hauria arribat fins aquí.

- Gracias Alberto, han pasado casi cinco años, y mis ganas de saber han crecido con las tuyas. Tu mente privilegiada, y tu generosidad en compartir todo y con todos tus conocimientos sin censuras, te hacen único.

- Gràcies Rosa, per ser com ets, per estar en els moments precisos, per fer de manera subtil que tot comenci i acabi; hem considero molt afortunada d'haber-te conegut.

. També vull agrair a l'Asunción Fernández els bons moments aprenent i posant en marxa la tècnica, les seves ganes de saber i conèixer més, feien que tot anés a un ritme que t'omplia de ganes de continuar.

- Gracias Asun.

. Gràcies a en Gabriel Sanjuan per el seu bon tarannà, i saber fer

- Gabi, ha passat el temps suficient per saber que ets un dels millors companys de feina i amic què hom pot desitjar.

. Gràcies a l'Encarnación Oliveros de més recent incorporació al equip, per la seva cordialitat.

. Gràcies a la Teresa Vendrell, Anna Ma Cueto, Mar Borregan, Miguel del Campo, Irene Valenzuela i Eduardo Tizzano de Genètica clínica per la seva bona acollida i el seu saber del que he après moltíssim.

- Gràcies a tots

. Gràcies a Manel Garcia, Benja Rodríguez i Olaya Villa (BACs) de qGenomics per les seves aclaracions i ajuda.

. Gràcies a Clara Serra per les seves ensenyances en el disseny de sondes de MLPA i l'ús de bases de dades.

. Gràcies a Lilibeth Arias, alegre i treballadora, per la seva inestimable feina en l'elaboració del llistat de síndromes genòmiques.

- Gràcies Lili21, ah! i recorda: s 😊 s 😊



. Gràcies a Ivana Canonero de l'Argentina, que en la seva curta estada amb nosaltres va deixar petjada. Encantadora, intel·ligent i lluitadora; l'aprendre és el seu motiu.

. Gràcies a la Judith Serrano, amiga, qui en mig de l'estiu em va donar l'empenta i delit que necessitava.

- Moltíssimes gràcies Judith, per ser-hi.

. Gràcies a la família de l'Alberto.

- Gràcies Miryam i Guillem per la vostra generositat sense condicions en aquests darrers dies.

... i molt molt especialment, gràcies a la meva família, l'Enric i l'Eduard, que ja fa dies em diuen que tenen ganes de recuperar-me. -

-Gràcies per tot, i per ser com sou, a tots dos!!

I com no, gràcies a tots qui llegiu aquest treball, va dedicat també a vosaltres.

Després d'aquests anys, estic molt agraïda, he fet bons amics.

# Índex

<b>1.</b>	<b>Introducció</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Variants estructurals del genoma.</b>	<b>3</b>
1.1.1	Reordenaments genòmics.	3
1.1.2	Mecanismes d'origen	5
<b>1.2</b>	<b>Tècniques i estratègies en el diagnòstic genètic postnatal</b>	<b>9</b>
1.2.1	Tècniques i estratègies en el diagnòstic genètic postnatal prèvies als array-CGH	9
1.2.2	Desenvolupament dels arrays d'hibridació genòmica comparada (array-CGH)	13
1.2.3	Resolució i tipus d'arrays-CGH	15
1.2.4	Estratègies d'hibridació amb els array-CGH	17
1.2.5	Els arrays d'SNPs	18
<b>1.3</b>	<b>Aplicacions de la tècnica d'array-cgh en el diagnòstic genètic postnatal</b>	<b>19</b>
1.3.1	Diagnòstic genètic postnatal de pacients amb retard global del desenvolupament / discapacitat intel·lectual (RGD / DI)	19
1.3.2	Diagnòstic genètic postnatal de pacients amb malformacions congènites	23
1.3.3	Diagnòstic genètic postnatal de pacients amb trastorns de l'espectre autista (TEA)	24
1.3.4	Diagnòstic genètic postnatal de pacients amb altres motius de derivació	26
1.3.5	Diagnòstic genètic postnatal en series de pacients	28
<b>2.</b>	<b>Premissa i objectius</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Premissa</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Objectius</b>	<b>37</b>

<b>3.</b>	<b>Pacients, material i mètode</b>	39
<b>3.1</b>	<b>Pacients estudiats</b>	41
<b>3.2</b>	<b>Disseny de la investigació</b>	41
<b>3.3</b>	<b>Tècniques d'ús en el laboratori d'arrayCGH postnatal.</b>	43
3.3.1	Cariotip	43
3.3.2	FISH	46
3.3.3	L'ADN. Extracció de sang perifèrica. Conservació, Quantificació de la concentració i qualitat. Extracció de sang perifèrica	48
3.3.4	MLPA	54
3.3.5	Hibridació genòmica comparada en array d'oligonucleòtids (array-CGH)	58
<b>3.4</b>	<b>Metodologia de la investigació amb array-CGH</b>	62
3.4.1	Estratègia d'hibridació. pacient vs pacient	62
3.4.2	Gestió de casos. Tècnica d'array-CGH. Full de treball	63
3.4.3	Interpretació de dades	65
<b>4.</b>	<b>Resultats</b>	71
<b>4.1.</b>	<b>Posada al punt i validació de la tècnica d'array-CGH</b>	73
4.1.1	Elecció de l'estratègia d'hibridació	73
4.1.2.	Elecció d'una plataforma d'hibridació	75
4.1.3.	Assaig per esbrinar la capacitat de detecció de mosaics	78
<b>4.2.</b>	<b>Recerca diagnòstica amb la tècnica d'arrayCGH com a tècnica de primera opció (<i>array first</i>)</b>	79
4.2.1.	Interpretació de resultats. Programari "EasyArray" i recursos disponibles a la web	80
4.2.2.	Capacitat diagnòstica	84
4.2.2.1.	CNVs patogèniques i de significat incert	85
4.2.2.2.	Descripció dels resultats per fenotíps	111

<b>4.3</b>	<b>Eficiència de l'array-CGH com a tècnica de primera opció diagnòstica. Anàlisi de costos segons protocols i estratègies d'hibridació</b>	<b>135</b>
<b>5.</b>	<b>Discussió</b>	<b>141</b>
<b>5.1</b>	<b>Posada al punt de l'array-cgh com a tècnica diagnòstica de rutina</b>	<b>143</b>
5.1.1	Problemes tècnics en la fase de posada al punt i validació	143
<b>5.2</b>	<b>La tècnica d'arrayCGH com a primera opció.Capacitat diagnòstica</b>	<b>149</b>
5.2.1	Capacitat diagnòstica segons indicació	149
5.2.2	Contribució a la caracterització de les anomalies	152
5.2.3	Detecció de nous punts de trencament	153
5.2.4	Detecció de noves variants patogèniques	155
5.2.6	Detecció de mosaics	157
<b>5.3</b>	<b>Comparació amb el rendiment diagnòstic i l'eficiència d'altres tècniques</b>	<b>159</b>
<b>5.4</b>	<b>Punts forts i febles de la tècnica d'arrayCGH en el diagnòstic genètic.</b>	<b>162</b>
5.4.1	Avantatges de la tècnica d'array-cgh en el diagnòstic genètic postnatal	162
5.4.2	Inconvenients de la tècnica d'array-cgh en el diagnòstic genètic postnatal	163
5.4.3	Recomanacions per l'us de la tècnica d'array-cgh en el diagnòstic genètic postnatal	163
<b>6.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>167</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>171</b>
<b>8.</b>	<b>Annexes</b>	<b>193</b>
8.1.	Full de treball MLPA	
8.2.	Full de treball array CGH	



## Llistat d'abreviatures

ADN	Àcid DesoxirriboNucleic
arrayCGH	Array d'hibridació genòmica comparada ( <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i> )
ARRAY-CGH	
BAC	Cromosomes artificials bacterians ( <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> ).
CC	Cardiopatia congènita
CI	Coefficient d'intel·ligència
CMA	Anàlisi de microarray ( <i>Chromosomal Microarray Analysis</i> )
CHD	Cardiopatia congènita
CNV	Variació en nombre de còpia ( <i>Copy Number Variation</i> )
CNP	Sonda centromèrica (CeNtromeric Probe)
DGP	Diagnòstic Genètic Preimplantacional
DGV	<i>Base de dades de variants genòmiques(Database of Genomic Variants)</i>
DI	Discapacitat Intel·lectual
EGG	Epilèpsia Generalitzada d'origen Genètic
FE	Programari Feature Extraction desenvolupat per l'empresa Agilent ( <i>Feature Extraction</i> )
FISH	Hibridació in situ fluorescent (Fluorescent In Situ Hybridization)
FoSTeS	Col·lapse de la forqueta de replicació i canvi de model de còpia ( <i>Fork STalling and TEmplate Switching</i> )
Gb	Gigabase
GDD	Retard del global del desenvolupament ( <i>Global Developmental Delay</i> )
GH	Hormona de creixement ( <i>Growth Hormone</i> )
kb	Kilobases
LCRs	Duplicacions segmentàries ( <i>Low Copy Repeats</i> )
LSI	Sonda locus específica(Locus-specific Identifier probe)
Mb	Megabases
MC	Malformació congènita

MLPA	Amplificació múltiple de sondes depenent de lligació ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )
NAHR	Recombinació homòloga no al·lèlica ( <i>Non Allelic Homologous Recombination</i> )
NHEJ	Unió dels extrems no homòloga ( <i>Non Homologous End Joining</i> )
OMIM	Herència mendeliana en l'home en línia ( <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> )
pb	Parell de Bases
PS	Psiquiàtric
QMPSF	PCR quantitativa multiplex de fluorescència curta ( <i>Quantitative multiplex PCR of short fluorescent</i> )
RGD	Retard Global en el Desenvolupament
SNP	Polimorfisme d'un sol nucleòtid ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SRO	Regió comuna de superposició ( <i>Smallest Region of Overlap</i> )
TB	Talla Baixa
TBI	Talla Baixa Idiopàtica
TDAH	Trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat
TEA	Trastorn de l'Espectre Autista
TGR	Trastorns Genòmics Recurrents
VOUS	Variable de significat incert ( <i>Variable of Uncertain Significance</i> )

# **Introducció**





En el present capítol, s'exposen els fonaments teòrics de la investigació.

A la primera part, es fa un breu resum i s'hi descriuen els mecanismes pels quals es poden produir reordenaments genòmics que donarien pas a variacions estructurals cromosòmiques, entre elles les CNVs (copy number variations) o variació en nombre de còpies, desequilibris detectables amb la tècnica d'arrayCGH.

A la segona part, s'hi troba una exposició general de les tècniques i estratègies existents en l'àmbit del diagnòstic genètic postnatal prèvies a la tecnologia d'arrays. Es descriu la tècnica d'arrayCGH i s'hi inclou l'estratègia pacient *versus* pacient, metodologia que va més enllà de l'estratègia estàndard pacient versus control.

La tercera part està dedicada a les aplicacions de la tècnica d'arrayCGH en el diagnòstic genètic postnatal.

## **1.1. VARIANTS ESTRUCTURALS DEL GENOMA.**

### **1.1.1 REORDENAMENTS GENÒMICS.**

Les reorganitzacions genòmiques o canvis estructurals del genoma fan referència a duplicacions, delecions, insercions, inversions i translocacions (Lupski i Stankiewicz, 2005).

Aquestes reorganitzacions genòmiques corresponen a canvis estructurals del genoma amb una mida que va des de més de 50 parells de bases (pb) fins a megabases (Mb) (Zarrei et al. 2015).

Poden representar polimorfismes que són neutres en la seva funció, o poden donar lloc a fenotips patològics per diferents vies incloent-hi el canvi en el nombre de còpies (CNV) de gens sensibles a dosi, interrupció de gens, creació de gens de fusió o altres mecanismes (Lupski and Stankiewicz, 2005; Watson et al. 2014). Les patologies humanes que resulten d'aquestes reorganitzacions s'han anomenat desordres genòmics.

LesCNV es defineixen com un guany o pèrdua d'un segment d'ADN de més de 50 pb quan es compara amb el genoma humà de referència. Les insercions i delecions (indels) estan en el rang inferior. Dins lesCNV podem trobar múltiples, un o cap gen.

La variació del nombre de còpies d'ADN (CNV) és una font de variació genòmica molt freqüent en la població general (Freeman et al. 2006), però també contribueixen a

l'aparició de molts trastorns del desenvolupament, incloent-hi el retard global del desenvolupament / discapacitat intel·lectual (RGD / DI), malformacions congènites (MC) i malalties mentals comuns, com ara l'esquizofrènia i els trastorns de l'espectre autista (TEA) (Miller et al. 2010). Les microdeleccions i microduplicacions cromosòmiques són una fracció de lesCNV.

Les microdeleccions i microduplicacions s'han associat a formes sindròmiques de RGD/DI des de 1980. Els exemples clàssics inclouen la deleció 15q11-q13 associada a les síndromes de Prader Willi i Angelman (Butler et al. 1986) la deleció 7q11 associada a la síndrome de Williams-Beuren (Pérez Jurado et al. 1996) i les deleccions 22q11 en la síndrome velocardiofacial (Edelman et al. 1999), entre d'altres. Cada una d'aquestes síndromes es reconeixia i descrivia d'acord amb una sèrie de pacients que compartien una sèrie de característiques clíniques i fenotípiques. Posteriorment es descobrien les bases moleculars o genètiques; és el que es coneix com *phenotype first*, és a dir: la descripció clínica de cada síndrome precedia al descobriment de la base genètica responsable (Watson et al. 2014).

En els últims 10 anys s'han produït grans avenços en la tecnologia genòmica i actualment es disposa de diferents tècniques que fan possible interrogar el genoma complet per detectar lesCNV proporcionant mètodes de *screening* molt superiors als que es disposava fa 10 anys per detectar microdeleccions i microduplicacions.

La tecnologia d'arrays: arrayCGH i array-SNP, i més recentment les tècniques de seqüenciació de nova generació utilitzant MPS (*massively parallel sequencing*), ha incrementat molt significativament el nombre de diagnòstics i ha permès el descobriment de nous trastorns genòmics (Watson et al. 2014).

La utilització d'aquestes tecnologies ha tingut un gran impacte en el camp de la genètica humana, ja que moltes síndromes que són difícils de reconèixer únicament per les seves característiques clíniques s'han pogut identificar i definir pel fet de compartir la mateixa regió genòmica afectada. És conegut que algunes CNV presenten variabilitat en la seva expressió i penetrància incompleta la qual cosa complica la caracterització de la seva manifestació clínica. Actualment la delimitació de noves síndromes pot començar amb la identificació de genotips superposats, en els quals els pacients es caracteritzen per una alteració genòmica similar abans que es defineixi una manifestació clínica comuna (Watson et al. 2014). Aquesta aproximació

que es coneix com *genotype first approach* ha demostrat ser molt útil si tenim en compte el considerable creixement que està tenint en els últims anys la llista de microdeleccions i/o microduplicacions patològiques

Les reorganitzacions genòmiques que donen lloc a patologies poden ser recurrents amb una mida equivalent i punts de trencament fixes (*cluster* o agrupament de punts de trencament) o no recurrents amb diferents mides i diferents punts de trencament en cada una d'elles. Les reorganitzacions no recurrents comparteixen una regió comuna de superposició (*smallest region of overlap*, SRO) que abasta un locus que seria responsable de la patologia.

Les CNV recurrents es formen generalment durant la meiosi pel mecanisme de NAHR (*non allelic homologous recombination*) amb punts de trencament en les duplicacions segmentàries que flanquegen la CNV. Donat que els punts de trencament s'agrupen en regions definides, la mida dels CNV recurrents es quasi idèntica en pacients no relacionats. Al contrari, les CNV no recurrents presenten punts de trencament diversos i poden originar-se per diferents mecanismes. Com a resultat, encara que dos individus no relacionats poden tenir CNV superposades, és poc probable que comparteixin els mateixos punts de trencament (Lupski and Stankiewicz, 2005).

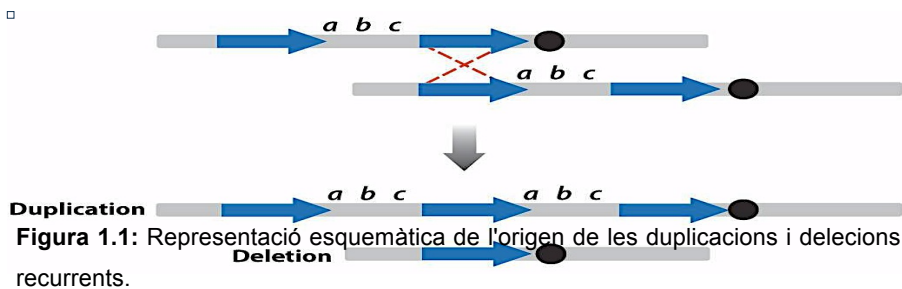
Aproximadament la meitat dels gens que superposen amb CNV és troben representats a la base de dades OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), que recull el coneixement actual sobre gens associats amb malalties mendelianes, malalties genòmiques i malalties complexes. Les primeres evidències que les alteracions en nombre de còpia podien influir en el fenotip provenen de malalties esporàdiques originades per variants majoritàriament *de novo* els quals s'anomenen estructurals, col·lectivament malalties genòmiques, en contraposició a les malalties genètiques clàssiques en què el fenotip anormal és atribuïble a mutacions puntuals (Lupski and Stankiewicz, 2005).

### 1.1.2 MECANISMES D'ORIGEN

Per explicar la formació de les variants estructurals del genoma humà, s'han proposat tres mecanismes

RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA NO AL·LÈLICA (NAHR, *non allelic homologous recombination*)

És el principal mecanisme per a la formació de CNV recurrents (Fig. 1.1). La base està en duplicacions segmentàries, també denominades *Low Copy Repeats* (LCRs), que són blocs de seqüències d'ADN majors d'1 Kb representades més d'una vegada per genoma haploide i que tenen una similitud superior al 90%. S'estima que aproximadament el 5% de la seqüència del genoma humà són LCRs. El fet que aproximadament un 50% de les CNV descrites en el genoma superposin LCRs, indueix a relacionar-les (Cooper et al. 2007).

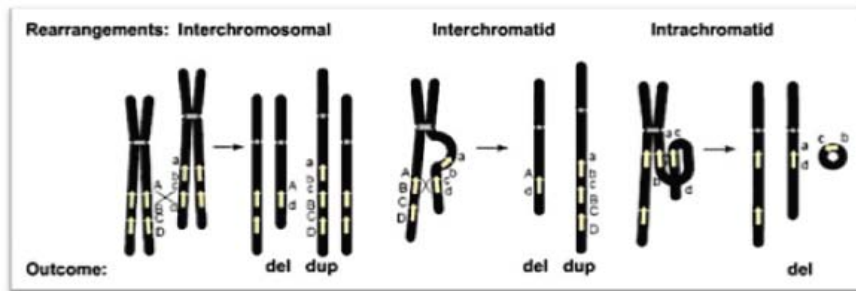


En aquest esquema, dues duplicacions segmentàries grans o LCRs (fletxes blaves) amb alta similitud de seqüència flanquegen una regió que conté els gens a, b, i c. Després de la desalineació dels homòlegs, aquestes duplicacions faciliten la NAHR durant la meiosi. Això dona com a resultat dos productes: un cromosoma que porta una duplicació de la regió intermèdia amb una còpia addicional de gens a, b, i c i un segon cromosoma que porta una deleción d'aquesta mateixa regió. Aquests reordenaments són causes comunes de molts trastorns genòmics recurrents caracteritzats per reordenaments de regions cromosòmiques específiques. Imatge extreta de Watson et al. (2014).

Els mecanismes de la NAHR, poden implicar els dos cromosomes homòlegs (intercromosòmic), les dues cromàtides d'un mateix cromosoma (intracromosòmic), i fins i tot LCRs d'una mateixa cromàtide (Fig. 1.2)

La majoria de NAHR, es creu que es produeixen de manera esporàdica en la població general. Un major coneixement del mecanisme de les NAHR, combinat amb un acurat mapatge de les duplicacions segmentàries o LCRs en el genoma humà pot contribuir

a predir les regions més inestables i susceptibles de generar reordenaments cromosòmics, que podrien encobrir malalties genòmiques (Sharp et al. 2005; Sharp et al. 2006)



**Figura 1.2:** Representació esquemàtica de les duplicacions i delecions. Els cromosomes es mostren en negre. Les regions grogues representen LCRs. En els reordenaments NAHR intercromosòmic i intercromàtide, els resultats en són pèrdues (delecions) i guanys (duplicacions), mentre que en el cas de recombinació intracromàtide el resultat és tan sols delecció. Imatge extreta de Gu et al. (2008).

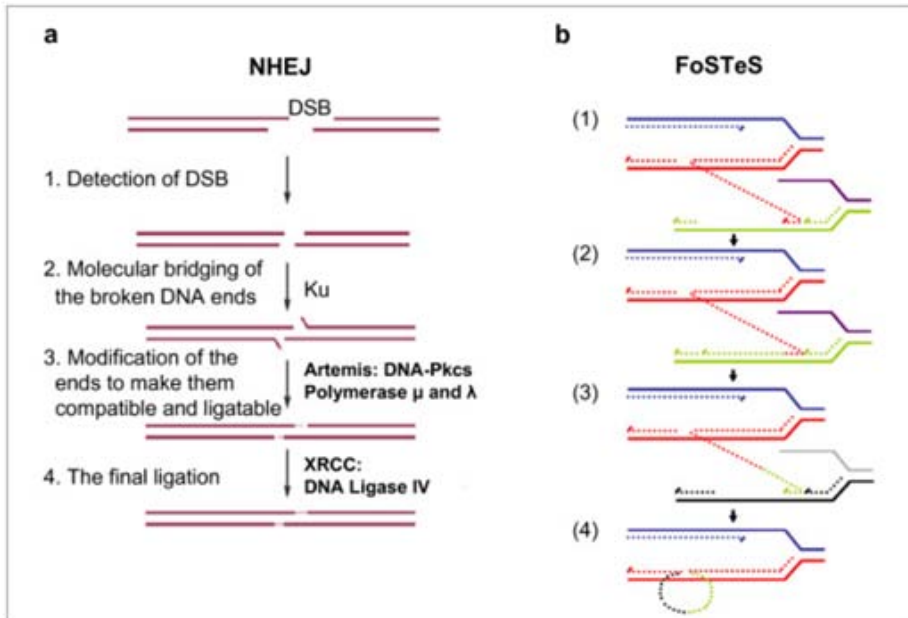
#### UNIÓ DELS EXTREMS NO HOMÒLOGA (NHEJ, *non homologous end joining*)

Un segon mecanisme que pot originar reordenaments genòmics és la NHEJ. És un dels mecanismes principals de reparació de trencaments de doble cadena de l'ADN, emprat per les cèl·lules eucariotes (Fig. 1.3)

S'ha observat que les anomalies resultants de la NHEJ, són responsables del 15% de les immunodeficiències humanes severes (Schwarz et al. 2003), i també de la fusió de cromosomes translocats en el càncer (Lieber, 2008).

#### COL·LAPSE DE LA FORQUETA DE REPLICACIÓ I CANVI DE MODEL DE CÒPIA (FoSTeS, *Fork stalling and template switching*)

Un tercer mecanisme originari de variants estructurals és el denominat FoSTeS, que pot tenir lloc en la replicació de l'ADN (Fig. 1.3). Es creu que aquest mecanisme originaria reordenaments amb duplicacions i delecions complexes, com els observats en el locus de la distròfia muscular de Duchenne (Zang et al. 2008) en aquells casos en que la generació deCNV no es podria explicar per mecanismes de NAHR o NHEJ.



**Figura 1.3:** Mecanismes de reordenaments genòmics. **A) NHEJ:** quan es produeix un trencament de doble cadena (DSB), pot ser reparat pel mecanisme NHEJ. Es produeix en quatre fases (adaptat de Lieber et al. 2003). Es generen un pont molecular entre ambdós extrems trencats i les modificacions necessàries en els extrems (addició o deleció d'algunes bases) per fer-los compatibles i poder procedir finalment a la lligació. **B) FoSTeS:** (Esquema adaptat de Lee et al. 2007) Després d'iniciat el procés de replicació la cadena retardada (línia puntejada) s'allibera i s'uneix a una segona forqueta per la via de la microhomologia, seguida de l'extensió amb la síntesi d'ADN d'aquesta segona forqueta que passa a ser la principal i pot envair una tercera forqueta (les línees puntejades representen la nova cadena d'ADN sintetitzada). Finalment es recupera la replicació original. Imatge extreta de Gu et al. (2008).

## 1.2. TÈCNiques I ESTRATÈGIES EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL

### 1.2.1 TÈCNiques I ESTRATÈGIES EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL PRÈVIES ALS ARRAY-CGH.

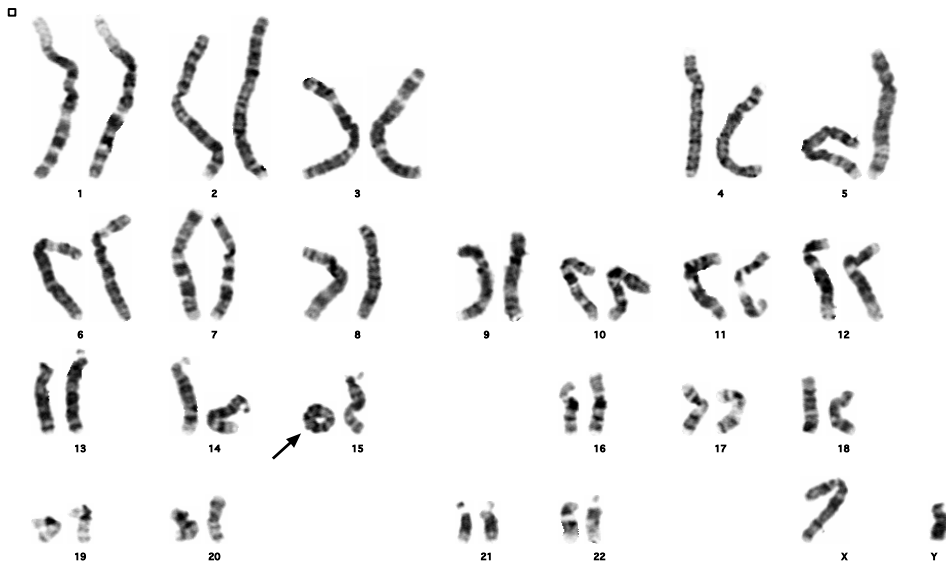
Les tècniques citogenètiques de diagnòstic es poden classificar en tres categories:

- Tècniques convencionals:
  - Cariotip amb bandes G
- Tècniques basades en la hibridació d'ADN :
  - FISH: Hibridació in situ fluorescent (*Fluorescent in situ hybridization*)
  - CGH: Hibridació genòmica comparada (*Comparative genome hybridization*)
- Tècniques moleculars basades en PCR:
  - MLPA: Amplificació de sondes dependent de lligament múltiple (*Multiplex ligation-dependent probe Amplification*)
  - QMPSF: PCR quantitativa multiplex de fluorescència curta (*Quantitative multiplex PCR of short fluorescent*)

El cariotip és el patró cromosòmic d'una espècie expressat a través d'un codi establert per conveni que descriu les característiques dels seus cromosomes. Donat que a l'àmbit clínic sol funcionar, el concepte de cariotip s'usa amb freqüència per referir-se a un cariograma, el que és un esquema, foto o dibuix dels cromosomes d'una cèl·lula metafàsica ordenats d'acord a la seva morfologia i mida, que són característics i representen a tots els individus d'una espècie. El braç de cada cromosoma ha estat dividit gràcies a les tècniques de bandeig en zones, cada zona en bandes i fins i tot les bandes en sot-bandes (Shaffer et al. 2013).

L'anàlisi del cariotip dels cromosomes amb bandes-G o R, és la tècnica citogenètica estàndard per a la detecció de desequilibris en el nombre de còpies en el genoma i dels reordenaments cromosòmics, equilibrats o no, en pacients amb característiques com el retard global en el desenvolupament/ discapacitat intel·lectual (RGD/DI) o anomalies congènites. (Fig.1.4.)





**Figura 1.4:** Cariotip amb bandes G , es mostra un cromosoma 15 en anell.

El cariotip convencional és una tècnica de diagnòstic genètic de baix rendiment individual i resposta lenta en el context prenatal ja que es tarden dues o tres setmanes en obtenir un resultat a partir de cultius de líquid amniòtic o biòpsia corial. En els estudis postnatsals a partir de sang perifèrica el temps de resposta és millor (a partir de 3-4 dies). Segons la regió genòmica, el cariotip amb bandes sol ser útil únicament per detectar els desequilibris genòmics de més de 5-10 Mb (Vermeesch et al. 2007).

L'inconvenient més gran de l'anàlisi cromosòmica convencional, o cariotip, és que només pot detectar grans pèrdues o guanys de material genètic i reorganitzacions estructurals en un 3-5% dels pacients amb RGD/DI i/o MC (Karnebeek et al. 2005; Miller et al. 2010; Shaffer et al. 2005). És a dir, no pot detectar moltes de les microdeleccions i microduplicacions associades a síndromes genètiques postnatsals amb RGD/DI i/o MC.

Per millorar aquest rendiment diagnòstic, es va complementar la citogenètica convencional amb les tècniques de FISH i MLPA. Ambdues són proves de major resolució que el cariotip i que s'han anat afegint al repertori de proves per tal

d'augmentar el rendiment diagnòstic (Ahn et al. 2010). Si al cariotip se li suma la FISH, per a identificar delecions submicroscòpiques i duplicacions de regions subtelomèriques, el rendiment diagnòstic es duplica (Cigudosa et al. 2012).

La FISH, és una tècnica citogenètica de marcatge de cromosomes mitjançant la qual aquests són hibridats amb sondes que emeten fluorescència. Aquesta tècnica permet la ràpida determinació d'aneuploïdies, microdelecions, translocacions, insercions, inversions, així com l'adjudicació d'un marcador genètic a un cromosoma (cartografia genètica). Aquesta tècnica ha resultat ser molt útil en el camp de la medicina reproductiva, amb aplicació en el diagnòstic genètic preimplantacional (DGP). A més, la FISH té aplicació en medicina per a detectar i determinar el pronòstic d'algunes malalties, així com per avaluar l'evolució i/o remissió del càncer.

La tècnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) és una tècnica similar a la PCR quantitativa múltiple que, fent servir un únic parell d'encebadors, permet dur a terme l'amplificació d'una cinquantena de seqüències diana d'ADN (Schouten et al. 2002). Es tracta d'un mètode fiable, efectiu i de baix cost, amb aplicacions a diferents àmbits, com ara la Genètica o la Medicina. A més, és una tècnica de resposta ràpida, ja que s'obté un resultat en menys de 5 dies. La baixa quantitat d'ADN necessària per dur a terme la MLPA (20 ng d'ADN humà, l'equivalent a 3.000 cèl·lules) fa que es pugui dur a terme en un considerable nombre d'ocasions.

Les principals aplicacions de la MLPA són la detecció de microdelecions i microduplicacions associades a síndromes conegudes, com per exemple, les síndromes de Williams, Prader-Willi-Angelman, Cri-du-chat, DiGeorge, Miller-Dieker, Langer-Giedion, Smith-Magenis i Sotos entre d'altres; l'estudi de regions subtelomèriques, la detecció d'aneuploïdies en els cromosomes sexuals (incloent-hi monosomies i trisomies) i en alguns autosomes (en concret, en els cromosomes 13, 18 i 21), la detecció de microduplicacions o microdelecions en els diferents exons de gens clarament relacionats amb patologia, o de les seves zones reguladores (el gen *SHOX*, entre d'altres). També la detecció d'alteracions en la metilació, com en alguns casos de la síndrome d'Angelman i la síndrome de Prader-Willi, ambdues lligades a la mateixa regió q11-12 del cromosoma 15, o la síndrome de Beckwith-Wiedemann i Silver-Rusell, que afecten la regió p15 del cromosoma 11.

Gràcies a aquestes tècniques, en pacients amb RGD/DI associat a malformacions congènites (MC) amb un resultat previ de cariotip aparentment normal, amb l'estudi de les regions subteloèmriques es van aconseguir un 2,4-3,7% de diagnòstics addicionals (Ravnan et al. 2006; Mundhofir et al. 2013). Amb l'anàlisi de les principals síndromes de microdeleció o microduplicació, es va diagnosticar un 5,8% més de pacients (Kirchhoff et al. 2007).

Encara que es realitzin rutinàriament, tant el cariotip, com la MLPA i FISH són tècniques de laboratori de baix rendiment individual. Les limitacions que presenten són:

- el límit de resolució del cariotip convencional no permet detectar moltes de les aberracions genòmiques que ocasionen RGD/DI i/o dismòrfia;
- la caracterització d'algunes anomalies com els cromosomes marcadors pot ser impossible amb un cariotip i requereix tècniques més específiques com la FISH, MLPA o array-CGH.
- l'inconvenient més gran de la MLPA és que en cada assaig només és capaç de detectar un petit grup d'anomalies, és a dir, que només és útil en les síndromes conegudes i alteracions subteloèmriques i és poc sensible a la detecció de mosaics.

Per a superar algunes d'aquestes limitacions, es van desenvolupar noves tecnologies a finals del segle XX. La CGH convencional, que consisteix en la hibridació competitiva de dues mostres d'ADN, marcat amb un fluorocrom, tradicionalment blau/verd, i un ADN normal o control amb un fluorocrom diferent, tradicionalment vermell. Tots dos ADN es barregen en quantitats equimolars. A continuació, es realitza una hibridació in situ sobre cromosomes metafàsics normals. Tots dos ADN competeixen per hibridar en els mateixos llocs cromosòmics. Si la mostra a estudiar conté algun guany cromosòmic, la quantitat d'ADN del pacient disponible per hibridar és més gran. Aleshores, la hibridació d'aquesta zona resultarà en una major proporció de fluorocrom de l'ADN problema (verd). En el cas contrari, si el cas problema conté una deleció (pèrdua), la regió delecionada apareixerà en vermell, ja que hi haurà més quantitat d'ADN normal (vermell) per hibridar en aquesta regió cromosòmica. La CGH permet, per tant, la detecció de guanys i pèrdues de regions cromosòmiques en tot el

genoma del cas problema per la comparació de les intensitats dels senyals d'hibridació (Kallioniemi et al. 1992).

Aquest tipus de CGH sobre cromosomes metafàsics té una resolució a partir de 3 Mb, de manera que tampoc permet detectar la majoria de les alteracions genòmiques que ocasionen RGD/DI i/o dismòrfia;

### 1.2.2 DESENVOLUPAMENT DELS ARRAYS D'HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA (ARRAY-CGH)

La solució al problema de la baixa resolució de la CGH cromosòmica va arribar amb la incorporació de la tecnologia genòmica als laboratoris de citogenètica (Veltman et al. 2002; Schoumans et al. 2004; Cigudosa et al. 2012). Mitjançant els microarrays, la hibridació competitiva dels ADN de la mostra problema més el control va passar de realitzar-se sobre cromosomes a realitzar-se sobre segments d'ADN de mida molt menor que un cromosoma immobilitzats sobre un suport de vidre. Aquests fragments (als quals s'anomena sondes) tenen coordenades precises (és a dir, se sap en quin lloc del genoma són complementaris). Aquests fets permeten augmentar la resolució de la tecnologia fins a milers de vegades la corresponent a la d'un cariotip convencional.

Inicialment, les plataformes d'array estaven dissenyades i manufacturades en els mateixos laboratoris. Per a això, utilitzaven sondes basades en cromosomes artificials bacterians (*bacterial artificial chromosome*, BAC). La primera descripció de la tècnica la van fer Solinas-Toldo i els seus col·laboradors l'any 1997. Els autors la van denominar "CGH basada en array". Pinkel i els seus col·laboradors, l'any 1998, la van rebatejar amb el nom de "array-CGH".

Tot i tractar-se d'una tecnologia desenvolupada de manera no industrial, de seguida van aparèixer escrits científics sobre la seva utilitat clínica. L'any 2002 va aparèixer la primera publicació sobre la utilitat clínica dels array-CGH, feta per Veltman i els seus col·laboradors (2002). En l'article, els autors descriuen la utilització de l'array-CGH en regions subtelomèriques. Emfatitzen els grans avantatges de la tècnica: en una sola reacció, analitzen 77 sondes subtelomèriques, i a més a més, partir de només 500 ng d'ADN genòmic del pacient. En aquesta primera publicació, els autors van preveure que l'array-CGH subtelomèric causaria un profund impacte en el diagnòstic i el consell

genètic de pacients amb retard mental. Fins i tot, van arribar a aventurar que, en un futur, amb aquesta tècnica es podria dur a terme una anàlisi genòmica de nombre de còpies, en una sola reacció i amb una resolució sense precedents, per a la identificació de gens causants de malaltia.

Un parell d'anys més tard, Schoumans i els seus col·laboradors (Schoumans et al. 2004) van utilitzar la tècnica de l'array-CGH en 10 casos d'alteracions cromosòmiques críptiques ja diagnosticats amb FISH, amb l'objectiu de confirmar la robustesa de la tècnica. Per a la seva investigació, els autors van fer servir arrays de BAC amb resolució d'1 Mb. Van concloure que, quan s'introduís aquesta tècnica en els laboratoris clínics, es podrien diagnosticar nous desequilibris i es descriurien noves síndromes. A més, apunten en el seu article que per a detectar alteracions més petites, caldria millorar els arrays. Aquest tipus d'arrays de BAC de resolució d'1 Mb ha estat, i segueix sent emprat amb profusió en el diagnòstic genètic (Cigudosa et al. 2012).

L'any 2005 va aparèixer el primer array-CGH comercial d'oligonucleòtids, desenvolupat per la companyia Agilent. Aquell array-CGH realitzava una cobertura completa del genoma amb 44.000 punts, amb una resolució mitjana de 45 Kb, aproximadament. L'array va suposar un canvi global en el treball en la genòmica amb arrays. Es passava d'una tècnica casolana, amb protocols poc definits i vidres impresos en escàs nombre, a una producció altament tecnològica de milers de vidres per any, i a més, amb un protocol senzill i estandarditzat, amb criteris de qualitat validats internacionalment (Cigudosa et al. 2012).

El desenvolupament de la tècnica d' array-CGH com a eina de diagnòstic integral més eficient va millorar notablement la detecció deCNV, tot i que presenten limitacions en la detecció de poliploïdia i translocacions equilibrades. La tècnica array-CGH ha revolucionat l'estudi diagnòstic dels pacients amb RGD/DI, anomalies congènites múltiples, l'autisme i la dismòrfia. Els arrays dirigits tenen el potencial de detectar la majoria dels desequilibris genòmics clínicament rellevants. Tot i que presenten limitacions en la detecció de poliploïdia i translocacions equilibrades. S'està convertint en una prova molt útil en el descobriment de gens associats a trastorns i en el desxiframent de la base genòmica de moltes síndromes nous amb microdeleccions i microduplicacions. A més, la tècnica array-CGH està servint per a avançar en el significat de l'enorme quantitat deCNV desconegudes que es troben disperses per tot

el genoma humà, encara que es necessita molta més investigació per arribar a comprendre la seva implicació en malalties humanes (Sharp et al. 2005).

### 1.2.3 RESOLUCIÓ I TIPUS D'ARRAYS-CGH

Els array-CGH permeten explorar de manera simultània la dosi d'ADN en múltiples loci del genoma en comparar les quantitats relatives d'ADN de dos genomes (control i pacient), marcats amb fluorocroms diferents, que s'uneixen amb fragments d'ADN de seqüència coneguda o "sondes" que estan fixats a un portaobjectes o suport de vidre.

La resolució genòmica de les diferents plataformes d' array-CGH es determina segons l'espaiament i la longitud de les sondes d'ADN (Shinawi i Cheung 2008). Una sonda d'hibridació és un fragment d'ADN de longitud variable (normalment 60-1000 bases), que s'utilitza per detectar la presència, absència, o augment de regions de l'ADN estudiat que són complementaris a la seqüència de la sonda. La sonda a la que s'hibrida és una sola cadena d'àcids nucleics. La seqüència de bases permet que els fragments d'ADN s'hibridin a causa de la complementarietat de bases entre la sonda i l'ADN estudiat.

Hi ha un gran nombre de plataformes de array-CGH, amb diferències notables en el seu rendiment diagnòstic. En termes generals, amb suficient cobertura de sondes, totes les plataformes actuals d'arrays són capaces de proporcionar una sensibilitat suficient per a les proves clíniques de arrays-CGH (Cidugosa et al. 2012).

Aquesta pluralitat de plataformes d'array es pot agrupar en dos tipus: les d'array BAC (*bacterial artificial chromosomes*) i les d'arrays d'oligonucleòtids (arrayCGH i SNPs) (Ahn et al. 2010).

En general, els arrays BAC tenen una alta especificitat, ja que solen ser fragments genòmics de 100-150 Kb. L'alteració d'un sol BAC pot ja suggerir un canvi patogènic. Per contra, l'alteració d'una sola sonda d'oligonucleòtids, en general, implica un artifici tècnic, i no una alteració veritable de la mostra del pacient. Depenent de la densitat de l'array, es requereixen múltiples sondes consecutives indicant el mateix canvi de número de còpia per a la determinació precisa d'un guany o pèrdua.

Els avantatges dels arrays-CGH d'oligonucleòtids inclouen una major densitat de sondes. Encara que es necessita un major nombre de sondes per fer un diagnòstic

fiable, la seva densitat és tan gran que la resolució final és molt més gran que la dels arrays de BACs. Addicionalment, els arrays d'oligos en tenen una gran flexibilitat en termes de selecció de la sonda, la qual cosa facilita una major densitat i personalització del contingut de l'array-CGH. Els arrays d'oligos dissenyats específicament per analitzar el nombre de còpies tendeixen a l'ús de sondes llargues d'oligonucleòtids (d'uns 60-mer), que presenten menys soroll de fons que els oligonucleòtids de sondes curtes (d'uns 22-mer) utilitzades en algunes plataformes d'arrays per la detecció de SNP (Cigudosa et al. 2012). A més, algunes plataformes actuals combinen la detecció de SNP i de sondes per al nombre de còpies que ajuden a disminuir el fons d'algunes plataformes.

La majoria de les plataformes array-CGH clínicament disponibles treballen amb microarrays que han estat dissenyats per detectar aneuploidies, síndromes ben caracteritzades de microdeleccions o microduplicacions, i/o reordenaments cromosòmics desequilibrats, siguin subtelomèrics o d'algun altre tipus. Les sondes poden investigar zones localitzades a intervals regulars del genoma humà (esquelet o *backbone*) o regions de les quals se sap estan relacionades amb patologia, o ser una barreja de les dues (Baldwin et al. 2008). El consorci ISCA (*International Standard Cytogenetic Array*) proporciona recomanacions que han estat adoptades per la majoria dels fabricants d'arrays.

També hi ha plataformes array-CGH de tot el genoma. En aquestes plataformes, els microarrays estan espaiats de la mateixa manera, amb una cobertura que va d'entre un clon per megabase a un clon per cada 100 kb, aproximadament (Veltman and Vries 2006). Els arrays d'alta densitat de tot el genoma augmenten significativament la sensibilitat del mètode, alhora que són rellevants per al descobriment de noves síndromes genòmiques, però compliquen la interpretació clínica de les variants de nombre de còpies de significació desconeguda (Shinawi i Cheung 2008).

El desenvolupament dels arrays de dosis per a la detecció d'anomalies de còpia, de polimorfismes d'un sol nucleòtid o SNP-arrays i arrays-CGH ha incrementat molt significativament el nombre de diagnòstics, permetent el diagnòstic d'un 15-20% dels pacients amb retard global del desenvolupament / discapacitat intel·lectual, malformacions congènites o trastorns de l'espectre autista (Miller et al. 2010). Els arrays-CGH detecten reordenaments patogènics amb un rendiment diagnòstic mitjà del 12,2%, en la població de pacients que se sol derivar a les unitats de genètica,

cosa que suposa aproximadament un 10% més que el cariotip sol (Cigudosa et al. 2012).

La majoria dels laboratoris comercials i centres de recerca s'han decantat per l'ús d'arrays-CGH i de SNPs en els estudis postnatsals. Alguns laboratoris clínics utilitzen arrays d'oligonucleòtids basats en els seus dissenys previs realitzats i assajats en versions anteriors d'arrays de BAC, ja que aquests últims tendeixen a desaparèixer en els formats comercials. De tota manera, els arrays de BAC encara són molt utilitzats en els estudis prenatals per la seva major tolerància a la menor quantitat i qualitat de l'ADN.

#### 1.2.4 ESTRATÈGIES D'HIBRIDACIÓ AMB ELS ARRAY-CGH

Existeixen quatre tipus d'estratègies d'hibridació (Ahn et al. 2010):

1- Hibridació "pacient vs. control". Es tracta d'hibridar l'ADN del pacient amb un ADN de control. Normalment, aquesta és l'estratègia d'hibridació que es fa servir.

2- Hibridació "pacient vs. control amb *dye swap*": Es tracta d'hibridar l'ADN del pacient amb un ADN de control, amb un assaig de repetició però amb etiquetatge en colors oposats. Cal dos arrays per a cada mostra, però aquesta estratègia assegura que els resultats de l'array no són artefactes

3- Hibridació en "bucle" (loop): En aquest cas, es realitza el marcatge de dues mostres de cada pacient (mínim tres pacients per assaig), cadascuna en un color diferent. A continuació, cada mostra s'hibrida contra mostres d'altres dos pacients. Per a aquesta tècnica, només cal un array per cada pacient, que és analitzat dues vegades amb *dye swap*. Aquesta estratègia assegura que els resultats de la prova d'array no són artefactes, a més de controlar la possibilitat de biaix en la reacció de marcatge.

4- Hibridació "pacient vs pacient", o bé "pacient / pacient": Aquesta estratègia (Ahn et al. 2013) consisteix en hibridar l'una contra l'altra les mostres de dos pacients diferents. Els pacients han de ser fenotípicament no coincidents, per reduir el risc que no es detectés un desequilibri que compartissin tots dos pacients (els arrays tan sols detecten diferències de còpia entre dos DNAs). Les ratios de colorants Cy informen



del tipus d'anomalia i permeten intuir a qui "pertany" qualsevol desequilibri detectat (log<sub>2</sub> ratios de -1 i de 0,6 indiquen delecions i duplicacions, respectivament). Qualsevol desequilibri es confirma amb un segon array o mitjançant un MLPA. La segona prova de confirmació també assegura la identitat del pacient a qui pertany la mostra. Per tant, per a la primera ronda de proves d'array es necessita mig array, mentre que per a cada desequilibri detectat (cosa que succeeix en el 15-20% dels pacients, aproximadament), cal un altre mig array. Tot plegat, això es tradueix en una despesa mitjana de 0.5/0.8 arrays per pacient, el que es tradueix en un estalvi substancial de costos en comparació amb altres estratègies.

### 1.2.5 ELS ARRAYS D'SNP

Els arrays d'SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) inicialment dissenyats per interrogar milers de polimorfismes d'un nucleòtid al llarg del genoma, també permeten avaluar el nombre de còpies d'ADN mesurant la intensitat de la hibridació de l'ADN del pacient amb les sondes immobilitzades en l'array o matriu de punts (LaFramboise, 2009).

En el context del diagnòstic genètic postnatal el rendiment diagnòstic dels estudis amb els array-CGH i els array d'SNPs són similars (Schaaf et al. 2011). Els arrays d'SNP tenen l'avantatge addicional de detectar també grans fragments d'homozigosi, el que pot representar disomia uniparental (UPD) o consanguinitat. No obstant això, l'anàlisi de rutina dels arrays amb plataformes basades en SNP detectarà UPD només en aquells casos en què hi hagi regions genòmiques procedents del mateix cromosoma (isodisomia) i no en els casos que les regions genòmiques procedeixen de cromosomes diferents procedents del mateix progenitor (heterodisomia). Les UPD es produeixen en general per rescat d'una trisomia, essent més freqüent la heterodisomia que la isodisomia. Aquestes poden contenir blocs de heterodisomia i isodisomia o tenir una heterodisomia completa (Kotzot, 2008)

### 1.3 APLICACIONS DE LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL

La tècnica d'array-CGH és una prova potent i innovadora per a la detecció de diferents patologies en un ampli rang d'àrees clíniques, especialment en l'àmbit del diagnòstic prenatal i en el diagnòstic i investigació de la discapacitat intel·lectual. La plataforma del genoma postnatal complet permet detectar:

- Aneuploïdies
- Més de dues-centes síndromes de microdelecció / microduplicació
- Delecions i duplicacions en gens associats amb els RGD/DI i / o l'autisme
- Síndromes associades a alteracions de les regions subtelomèriques
- Noves síndromes i anomalies no descrites.
- Caracterització d'anomalies poc caracteritzades per cariotip, com ara cromosomes derivatius o marcadors accessoris de naturalesa desconeguda
- Portadors d'anomalies cromosòmiques aparentment balancejades amb fenotip anormal i petits desequilibris críptics.

La utilitat de determinar si les discapacitats d'un pacient s'associen amb malformacions o anomalies congènites múltiples i / o trets dismòrfics radica en el fet que de vegades pot suggerir un diagnòstic clínic sindròmic a un metge expert (Stankiewicz i Beaudet 2007). El diagnòstic genètic d'aquests pacients és de gran utilitat en el seu maneig clínic, permet un pronòstic precís i, sobretot, és fonamental per a la prevenció de l'aparició de nous casos (consell genètic familiar). Tal com han assenyalat Saam i els seus col·laboradors (2008), un diagnòstic precís dels pacients proporcionarà al clínic l'oportunitat de determinar les millors opcions de tractament, pronòstic i riscos de recurrència, així com d'evitar proves innecessàries en el futur.

#### 1.3.1 DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL DE PACIENTS AMB RETARD GLOBAL DEL DESENVOLUPAMENT / DISCAPACITAT INTEL·LECTUAL (RGD / DI)

A les societats occidentals, el RGD/DI és la discapacitat més freqüent. Històricament i a escala internacional, aquesta afecció és coneguda per molts termes, entre ells

retard o retard mental, discapacitat, retard intel·lectual, dèficit intel·lectual, problemes d'aprenentatge, dificultat d'aprenentatge i discapacitat mental o intel·lectual. Generalment, s'utilitza el terme ampli de retard global del desenvolupament / discapacitat intel·lectual (RGD/DI) per referir-se a aquest grup heterogeni i complex de pacients (Cigudosa et al. 2012).

El RGD/DI es defineix com una discapacitat que limita significativament tant el funcionament intel·lectual (coeficient d'intel·ligència [CI] <70) com la conducta adaptativa, abans dels 18 anys, i que s'expressa per mitjà de restriccions de les habilitats pràctiques, socials i conceptuals (Tejada 2006)

Tant la terminologia com la definició i els criteris diagnòstics de RGD / DI varien depenent de la literatura consultada. Mentre que als Estats Units s'utilitzen majoritàriament la definició i criteris proposats per *l'American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (Luckasson et al. 1992) i el *Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders (DSM-IV-TR)* de l'Acadèmia Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association. 2000), a Europa se sol fer servir amb més freqüència la definició i els criteris proposats per la *Classificació Estadística Internacional de Malalties i Problemes Relacionats amb la Salut, International Classification of Diseases, 10th Revision (CIE-10)* (Rodríguez-Andrés et al. 2006).

L'aplicació dels criteris diagnòstics requereix prèviament la realització de test de mesura del CI estandarditzats, realitzats i interpretats de forma segura i vàlida. Atès que aquestes proves no es poden dur a terme en nens menors de cinc anys, ha estat necessari crear la definició retard global del desenvolupament (RGD) per referir-se als nens que presenten retards significatius en l'adquisició d'habilitats corresponents a cada edat, tant en l'aprenentatge com en l'adaptació (Shevell et al. 2003). Aquesta definició planteja problemes d'inclusió. Per aquest motiu, en edats primerenques, sota el terme RGD s'hi solen incloure altres entitats, com els problemes d'aprenentatge, el retard escolar, i fins i tot també els trastorns de l'espectre autista (TEA).

Entre els casos de retard escolar i problemes d'aprenentatge també solen classificar-s'hi les situacions de coeficient d'intel·ligència límit (CIL). El concepte d'intel·ligència límit fa referència als casos en què, un cop passats els cinc anys de vida, el valor del CI supera lleugerament el límit estipulat de 70. En els casos de CIL, hi ha una alta taxa de troballes genètiques diverses (Artigas-Pallarés 2003).

A la llarga, la majoria dels nens que neixen amb anomalies congènites múltiples (MC) presentaran també RGD. En cas de sobreviure, se'ls diagnosticarà de RGD / DI. Així mateix, dins de l'ampli espectre de malalties rares, la majoria de base genètica, moltes incorporen de manera associada RGD / DI (Cigudosa et al. 2012).

La majoria dels estudis assumeixen que un 3% dels nens en edat escolar tenen un retard mental entre lleu i moderat en els països industrialitzats (WHO 1989). Una revisió de la literatura relativa a estudis de prevalença estableix que entre un 0,3% i un 0,5% de la població té una discapacitat intel·lectual greu. Altres revisions informen del mateix rang de freqüència de coeficient d'intel·ligència (CI) inferior a 50, en totes les franges d'edat (Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine concerning Genetic Testing for Health Purposes 2008; Tejada 2006).

El RGD/DI, discapacitat intel·lectual i/o trastorn de l'aprenentatge és una afecció greu. Representa un repte important per a la salut pública. A més, és un dels trastorns de major importància clínica amb una etiologia que segueix sent desconeguda en una gran proporció de casos (Cigudosa et al. 2012).

Tant els factors genètics com els ambientals, que inclouen els infecciosos i els perinatal, influeixen en l'etiologia del RGD/ DI. L'exposició a neurotoxines ambientals, com ara els metalls pesants, la talidomida, les drogues, l'àcid valproic i l'alcohol, pot estar present en fins al 13% dels casos de RGD / DI (Cigudosa et al. 2012).

Tot i que les comparacions dels resultats dels estudis clínics han de ser tractades amb cautela, els resultats de diversos estudis han demostrat que fins al 40% dels casos de RGD / DI pot tenir una base genètica (Rodríguez-Andrés et al. 2006; Stankiewicz i Beudet 2007). S'estima que els factors genètics són la principal causa de RGD / DI en gairebé la meitat dels DI greu i en al voltant del 15% dels pacients amb DI lleu o moderada (Shevell et al. 2003). Una revisió de 16 estudis procedents de tot el món va concloure que les alteracions cromosòmiques són les responsables, de mitjana, en el 16% de les persones amb RGD / DI (rang 4% - 34%) (Rodríguez-Andrés et al. 2006). La discapacitat d'aprenentatge també pot ser causada per defectes en gens específics, com la síndrome del X fràgil o la síndrome de Rett (Cigudosa et al. 2012).

El rendiment diagnòstic d'anàlisi de cromosomes amb bandes en nens amb RGD és d'un 3,7% aproximadament (Shevell et al. 2003). La identificació de desequilibris subtelomèrics submicroscòpics mitjançant l'ús de l'anàlisi FISH es calcula entre un

2,5% i un 7% dels pacients amb DI idiopàtica (Flint i Caballero 2003; Ravnan et al. 2006) la qual cosa va suggerir als investigadors que, fent servir una resolució més gran, augmentaria potencialment el rendiment diagnòstic de les tècniques de detecció del genoma complet en una proporció significativa dels casos.

Els primers estudis que van utilitzar un array-CGH de genoma complet per a investigar pacients citogenèticament normals amb DI idiopàtica associada amb dismòrfia van mostrar un potencial de rendiment diagnòstic del 15% (Vissers et al. 2003; Shaw-Smith et al. 2004). Més endavant, es van dur a terme més estudis amb un major nombre de pacients amb RGD/DI. Llavors, es van trobar unes taxes de detecció d'alteracions *de novo* clínicament significatives d'entre el 10% i el 16% (Friedman et al. 2006; Engels et al. 2007).

Una meta-anàlisi de les recerques fetes amb array-CGH, juntament amb l'anàlisi de les dades de 140 pacients més amb DI (un total de 432 pacients), va mostrar que el 20% dels pacients tenien desequilibris genòmics i l'11%, reordenaments subtelomèrics (Menten et al. 2006). Curiosament, en aquests estudis que emfatitzen l'heterogeneïtat genètica i genòmica de RGD/DI, la taxa de recurrència de delecions o duplicacions va ser molt baixa, cosa que només es pot assegurar mitjançant l'aplicació de tècniques d'anàlisi de tot el genoma, com ara l'array-CGH. El rendiment diagnòstic de l'array-CGH depèn de la seva capacitat de coberta genòmica. Per tant, se suposa que la pròxima generació de tecnologia array-CGH sigui capaç d'augmentar significativament les taxes de detecció (Shinawi i Cheung 2008).

La proporció de casos en què s'identifica una causa genètica definitiva també varia d'acord amb la gravetat del RGD / DI. Un 30% aproximadament dels DI greu i un 70% dels DI lleus o moderats queden sense un diagnòstic etiològic (*American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders* 2000). La freqüència amb què es detecten anomalies cromosòmiques i / o reordenaments genòmics en pacients amb retard en el desenvolupament o DI és més alta quan s'associa amb la presència de malformacions o trets dismòrfics, i en el cas de retard més greu (Stankiewicz i Beaudet 2007).

El treball de D'Amours i els seus col·laboradors (2014) és un exemple de la utilitat clínica dels arrays-SNP en nens amb discapacitat intel·lectual. Els arrays-SNP detecten amb èxit CNV patològics i identifiquen LOHs informatius que poden conduir al

diagnòstic d'un trastorn recessiu. Aquest estudi també posa en relleu alguns dels reptes associats a l'ús d'arrays-SNP en un laboratori clínic.

Els avanços en les tècniques citogenètiques i moleculars estan permetent la identificació de cada vegada més alteracions genètiques associades a discapacitat de l'aprenentatge i RGD / DI. Cal tenir en compte que, quan s'aplica la tècnica d'array-CGH de manera àmplia en individus amb fenotips inespecífics, com ara RGD, l'array-CGH és capaç d'identificar un cert nombre de microduplicacions associades a algun fenotip recognoscible (Shinawi i Cheung 2008).

A partir d'una anàlisi feta amb 36.325 pacients que patien RGD/DI, Hochstenbach i els seus col·laboradors (2009) recomanen que l'anàlisi cromosòmica per microarray sigui considerada una prova de primer nivell en aquest grup d'individus. En la seva recerca, es va trobar almenys una anomalia patològica en el 19% dels pacients

### 1.3.2 DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL DE PACIENTS AMB MALFORMACIONS CONGÈNITES.

Les malformacions congènites es defineixen com alteracions anatòmiques que ocorren en l'etapa intrauterina i que poden ser alteracions d'òrgans, extremitats o sistemes, a causa de factors mediambientals, genètics, deficiències en la captació de nutrients, o bé consum de substàncies nocives.

S'entén per anomalia congènita qualsevol trastorn del desenvolupament morfològic, estructural o funcional d'un òrgan o sistema present en néixer. Les anomalies congènites poden ocasionar discapacitats cròniques amb gran impacte en els afectats, les seves famílies, els sistemes de salut i la societat.

Segons l'estudi EUROCAT, la prevalença total dels defectes congènits majors a Europa va ser de 23,9 per 1.000 nascuts en el període de 2003-2007. Un 5% dels nascuts vius amb una anomalia congènita van morir en la primera setmana de vida, un 2,0% eren mortinats o morts fetals a partir de les 20 setmanes de gestació i un 17.6% del total de gestacions anòmales van ser interrompudes després d'un diagnòstic prenatal. La prevalença d'anomalies cromosòmiques va ser de 3,6 per cada 1.000 naixements, el que contribueix el 28% mortinats / morts fetals de 20 setmanes de gestació amb anomalia congènita, i el 48% de totes les gestacions interrompudes

per defectes congènits. En la resta de gestacions interrompudes, el subgrup més comú són els defectes congènits del cor (CHD), en el 6,5 per cada 1.000 naixements. A continuació s'observen els defectes en les extremitats (3,8 per 1.000), les anomalies del sistema urinari (3,1 per 1.000) i els defectes del sistema nerviós (2,3 per 1.000). La prevenció primària de les anomalies congènites en la població basada en el control dels factors de risc ambientals és una prioritat política fonamental, inclosa l'atenció preconcepcional i enfocaments de població sencers (Dolk et al. 2010).

L'etiologia de les malformacions congènites és genètica en un 30-40% dels pacients i ambiental en un 5- 10%). Dins de l'etiologia genètica, les anomalies cromosòmiques constitueixen el 6%, els trastorns de gens individuals 25% i els trastorns multifactorials 20- 30%. Gairebé en el 50% dels de les malformacions congènites, la causa encara no és coneguda (Rajangam et al. 2007). En un 6% adicional, amb tècniques de citogenètica molecular, es troben microanomalies per sota la resolució del cariotip convencional (Miller et al. 2010; Bachman et al. 2013).

### 1.3.3 DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL DE PACIENTS AMB TRASTORNS DE L'ESPECTRE AUTISTA (TEA)

La definició TEA agrupa diverses afeccions que tenen en comú les anomalies de la socialització i de la comunicació, com ara l'autisme pur, el trastorn generalitzat del desenvolupament, la síndrome d'Asperger, els trastorns desintegratius de la infància i la síndrome de Rett (Baird et al. 2006). Aquesta diversitat de fenotips fa que les prevalences publicades variïn segons l'espectre analitzat (Cigudosa et al. 2012).

En els últims anys, però, s'observa una clara tendència a l'increment de la prevalença de l'autisme en diversos grups poblacionals. Probablement, aquest fet sigui degut a un major coneixement clínic de les microdeleccions / microduplicacions que provoquen l'autisme, així com a una millor caracterització en què l'array-CGH ha tingut un paper diagnòstic fonamental (Sandin et al. 2014). Per exemple, als Estats Units, la prevalença d'autisme (incloent-hi l'autisme pur, el trastorn generalitzat del desenvolupament i la síndrome d'Asperger) va augmentar entre 2002 i 2006 en un 57% (Charman et al. 2011).

Cal tenir en compte que no es pot afegir la prevalença de TEA amb la de RGD / DI, ja que no tots els casos de TEA cursen amb RGD / DI. Atès que els estudis revisats no discriminen si el RGD / DI es presenta sol o acompanyat de trastorns com el TEA, no és adequat sumar ambdues taxes de prevalença. En un estudi britànic, es va comprovar que el 70% dels nens amb TEA tenien un CI <70 i, d'ells, un 16% RGD / DI sever (Charman et al. 2011). Dins de la prevalença global del TEA (d'1 a 1,57%), queden englobats el 0,7-1% dels nens en edats de 8-10 anys que pateixen conjuntament TEA i RGD / DI.

Vorstman i els seus col·laboradors (2006) van publicar una revisió sobre les regions cromosòmiques associades amb el fenotip autista. Els autors van concloure que les anomalies més comunes són les delecions de 2qter, les delecions de 22qter i les duplicacions de la regió PWS / AS a 15q11-q13. Dos altres grups d'investigadors, utilitzant CGH array, van corroborar les troballes de Vorstman i els seus col·laboradors (Jacquemont et al. 2006; Sebat et al. 2007).

Respecte a l'etiologia de l'autisme, s'ha demostrat que delecions i duplicacions de novo hi tenen un paper significatiu. Jacquemont i els seus col·laboradors (2006) van aplicar array-CGH amb una resolució d' 1 Mb, aproximadament. D'aquesta manera, van identificar reordenaments clínicament rellevants en 8 de 27 pacients amb autisme 'sindròmic'. Els autors de l'estudi van concloure que la array-CGH podria ser especialment eficaç en el diagnòstic d'autisme associat amb dismorfies (DF). Però fins i tot després d'excloure els casos d'autisme sindròmic, un array de disseny personalitzat amb 35 kb de resolució és capaç de detectar CNV de novo en el 10% dels individus amb autisme (Sebat et al. 2007).

En la mateixa línia, una anàlisi de 427 pacients amb TEA va descobrir noves CNV en el 7% dels pacients amb autisme idiopàtic (Marshall et al. 2008). En una altra investigació, es van detectar microdelecions recurrents de 593 kb de novo o microduplicacions recíproques en 16p11.2, fossin espontànies o heretades, en l'1% dels pacients amb autisme i en l'1,5% dels pacients amb retard del desenvolupament (Weiss et al. 2008). L'aplicació generalitzada d'array-CGH millorarà el rendiment de la detecció d'anomalies genètiques en pacients amb TEA i facilitarà el camí per a la identificació de nous gens de l'autisme (Shinawi i Cheung 2008).



Shen i els seus col·laboradors (2010) van investigar específicament la utilitat de la array-CGH en la investigació dels nens amb TEA. També van donar arguments perquè l'array-CGH fós la prova de primera elecció per als nens amb autisme. D'entrada, els autors van trobar un 2,23% d'anomalies en el cariotip i/o un 0,46% de pacients amb cromosoma X fràgil. En el mateix grup de pacients (N = 848), amb una tècnica de microarray van identificar anormalitats evidents en un 7% de les mostres, i delecions o duplicacions en un 18,2%.

### 1.3.4 DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL DE PACIENTS AMB ALTRES MOTIUS DE DERIVACIÓ

Algunes síndromes conegudes que s'associen a discapacitat intel·lectual, com la síndrome de Down, es deuen a anomalies de cromosomes complets, que són visibles amb un microscopi òptic de forma relativament senzilla (Cigudosa et al., 2012). Altres síndromes es deuen a la supressió de la funció o la deleción d'un gen o un grup de gens que estan disposats contiguament al llarg d'un cromosoma (síndromes de microdeleción o síndromes de gens contigus). La síndrome del "cri du chat" (deleción 5p) i la de Wolf-Hirschhorn (deleción 4p) són exemples d'aquests fets. Aquestes patologies van ser identificades a partir de la constatació de la deleción de part d'un dels cromosomes. Un cop més, aquestes patologies es poden identificar senzillament amb un cariotip mitjançant el microscopi.

Més recentment s'han observat algunes delecions més petites en diverses síndromes que no s'havien associat prèviament amb anomalies cromosòmiques (Cigudosa et al., 2012). Aquest és el cas, per exemple, les síndromes de Prader-Willi i de Williams. La mida de les delecions d'alguna d'aquestes síndromes pot variar d'un individu a un altre. En molts casos, la deleción no és visible en l'anàlisi cromosòmica de rutina. La capacitat per a detectar aquestes delecions depèn de la resolució del bandeig dels cromosomes. Encara que la resolució ha millorat en els últims trenta anys, les delecions que involucren fins a diverses desenes de gens poden no ser detectades pels mètodes de rutina. Les tècniques de FISH i de MLPA ajuden a visualitzar delecions cromosòmiques submicroscòpiques i, fins i tot, delecions de gens únics en cromosomes específics.

L'aplicació d'arrays-CGH està servint per allargar contínuament la llista de noves síndromes (Ballif et al. 2007; Sharp et al. 2007; Sharp et al. 2008).

La talla baixa idiopàtica (TBI) és una descripció clínica més que una malaltia. Dins de la categoria de talla baixa idiopàtica, s'agrupen una sèrie d'entitats clíniques d'etiologia desconeguda que tenen en comú un retard crònic de creixement, en els quals no s'hagi pogut demostrar cap malaltia general, endocrina o metabòlica.

Les alteracions del creixement d'origen genètic poden associar-se amb anomalies cromosòmiques, malalties monogèniques o amb síndromes d'etiologia desconeguda. El retard del creixement s'ha observat en alteracions cromosòmiques numèriques (trisomia del cromosoma 13, trisomia del cromosoma 21, síndrome de Turner), estructurals (síndrome de Williams, translocacions no equilibrades), mosaïcismes (síndrome de Turner) i en els casos de disomia uniparental (síndrome de Silver-Russell) (Cigudosa et al. 2012)

Les mutacions o delecions en heterozigosi del gen *SHOX* o de la seva regió reguladora són la causa genètica coneguda més freqüent de talla baixa (1: 1.000-2.000), i són responsables de la majoria de casos de la discondrosteosis de Lery- Weil (60-80%), així com de percentatges variables (entre el 2 i el 22%, segons els diferents criteris de selecció) dels pacients amb TBI (Jorge et al. 2007).

El gen *SHOX* està localitzat a la regió pseudoautosòmica anomenada PAR1 present en l'extrem distal del braç curt dels cromosomes X i Y. La incidència de mutacions o delecions en heterozigosi en *SHOX* / PAR1 sembla ser molt superior a la d'altres formes de hipocreixement molt millor conegudes, com la deficiència de GH (1: 3.500) o la mateixa síndrome de Turner (1: 2.500 nenes), la qual suposa la causa monogènica més freqüent de talla baixa en l'home. Les alteracions del gen *SHOX* poden estar presents en el 2-12% dels nens amb talla baixa idiopàtica, encara que la seva incidència pot elevar fins al 22% en els nens amb talla baixa disharmònica (Rappold et al. 2007; Jorge et al. 2007). Comença a haver-hi evidència que altresCNV també són causa de talla baixa (Zahnleiter et al. 2013)

Les epilèpsies comprenen un grup heterogeni de trastorns neurològics clínicament definits per convulsions espontànies recurrents a causa d'una activitat paroxística neuronal excessiva i sincrònica en el cervell (Berg et al. 2010). Al voltant del 40% de totes les epilèpsies tenen una forta contribució genètica. Les epilèpsies generalitzades

genètiques (EGG) representen el grup més comú d'epilèpsies amb etiologia genètica predominant, representant el 20% de totes les epilèpsies (Jallon et al. 2001). Les seves característiques clíniques es caracteritzen per convulsions generalitzades no provocades amb aparició relacionada amb l'edat (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1989; Nordli 2005). Malgrat la seva forta agregació familiar i l'heretabilitat, sols una petita fracció dels pacients (1-2%) segueix l'herència monogènica i la majoria presenten una predisposició poligènica amb una àmplia heterogeneïtat genètica (Dibbens et al. 2010). Tot i que mutacions causants de l'epilèpsia amb herència monogènica han estat identificats en gens que afecten principalment a l'excitabilitat neuronal, la transmissió sinàptica, i els processos de desenvolupament neurològic (Poduri et al. 2011) (Pandolfo 2013) la base genètica de la majoria dels pacients es encara desconeguda.

L'Epilèpsia generalitzada Genètica (EGG) és la forma més comuna d'epilèpsia genètica. En un estudi recent s'ha confirmat que microdelecions recurrents en 15q11.2, 15q13.3 i 16p13.11 poden ser factors importants de risc genètic en les síndromes d'epilèpsia genètica comuna (Lal et al. 2015)

### 1.3.5 DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL EN SÈRIES DE PACIENTS.

En l'estudi més ampli que s'hagi publicat utilitzant FISH subtelomèriques, es van trobar canvis patogènics en el 2,6% dels casos (Ravnan et al. 2006). La mostra era d'11.688 pacients no seleccionats. En una revisió posterior, amb uns altres 7.000 casos, es van detectar reordenaments subtelomèrics en el 2,4% dels pacients estudiats (Ballif et al. 2007).

A partir dels coneixements sobre l'arquitectura del genoma humà, Sharp i els seus col·laboradors (2005; 2006) van utilitzar una anàlisi bioinformàtica de duplicacions segmentàries en el genoma per a dissenyar un microarray amb 2007 clons BAC específic per a 130 regions genòmiques. Amb aquest microarray, els autors van estudiar 290 individus amb discapacitat intel·lectual i/o dismorfies i/o anomalies congènites múltiples. L'anàlisi va identificar 16 reordenacions patològiques, incloent-hi cinc nous desequilibris en els cromosomes 1q21.1, 15q13, 15q24, 17q12 i 17q21.31 (Sharp et al. 2006; Sharp et al. 2007)

La publicació de Lu i els seus col·laboradors (2007) recull la seva experiència en l'aplicació clínica de l'anàlisi de microarrays cromosòmic (array-CGH). Els autors van realitzar clínicament una anàlisi array-CGH en 2513 mostres postnatales de pacients remesos amb una varietat de fenotips, majoritàriament retard del desenvolupament i/o retard mental. A partir dels resultats obtinguts, els autors van concloure que havien demostrat la gran sensibilitat de l'array-CGH per a la detecció de desequilibris genòmics clínicament rellevants. També van destacar la necessitat que tenen les famílies dels afectats de rebre un consell genètic integral per tal de facilitar la correlació clínica precisa i la interpretació dels resultats.

S'ha demostrat que la sensibilitat de l'array-CGH clínica és més alta en els pacients amb dismòrfia (DF), anomalies congènites múltiples o una combinació d'ambdós.

Lee i els seus col·laboradors (2007) van trobar que 25 de 299 pacients amb anomalies congènites múltiples / DF (un 8,4%) tenien desequilibris cromosòmics clínicament rellevants en comparació, per exemple, amb el 3,9% dels pacients amb RGD / DI (Lu et al. 2007).

Així mateix, l'aplicació d'arrayCGH en pacients amb defectes congènits del cor i DF proporciona un diagnòstic etiològic en una gran proporció dels pacients. En un altre estudi, un 30% dels pacients amb cardiopaties congènites associades a altres malformacions, RGD/DI en els que l'anàlisi de cariotip havia estat normal, presentaven, de fet, desequilibris genòmics patogenèticament significatius (Thienpont et al. 2007).

A partir d'una anàlisi feta amb 36.325 pacients que patien RGD / DI (Hochstenbach i els seus col·laboradors (2009) recomanen que la CMA (Anàlisi Cromosòmica per Microarray) sigui considerada una prova de primer nivell en aquest grup d'individus, ja que troben una anomalia patològica en el 19% dels pacients.

Miller i els seus col·laboradors (2010) van revisar l'evidència d'utilització de array-CGH com a prova de primer nivell per a la investigació de RGD/DI, múltiples anomalies congènites i / o trastorns de l'espectre autista (TEA). La recomanació dels autors de l'ús de la CMA com a prova de primer nivell es va basar en l'anàlisi de 33 estudis que incloïen 21,698 pacients derivats per les indicacions abans esmentades, analitzats amb arrays-CGH. L'estudi va demostrar que el rendiment diagnòstic de l'array-CGH havia estat un 12,2%; superior a la d'un cariotip de bandes-G. Els autors van

confirmar que el rendiment diagnòstic dels arrays-CGH és més gran que el del cariotip amb bandes G.

Ahn i els seus col·laboradors (2010) van realitzar un primer estudi per a demostrar la viabilitat d'utilitzar la tècnica array CGH com a prova diagnòstica de primera elecció en lloc de l'anàlisi dels cromosomes amb bandes-G, és a dir, el cariotip. L'estudi va incloure un total de 2.414 pacients. Per a 1245 dels pacients, l'array CGH va ser la segona la prova, un cop se'ls havia comprovat que presentaven un cariotip normal. Per als altres 1.169 pacients, l'array CGH va ser la prova diagnòstica de primera elecció. Els autors van constatar que almenys el 89% de les anomalies detectades en el grup de primera comprovació diagnòstica, no haurien estat detectades per l'anàlisi de cariotip.

Uns anys més tard, Ahn i els seus col·laboradors (2013) van publicar l'estudi amb la sèrie més gran de pacients a qui s'ha aplicat un array-CGH en primera elecció diagnòstica. El seu informe descriu 8,794 proves array-CGH realitzades com a primera opció, fetes en un laboratori de diagnòstic clínic. Els pacients van ser referits per motius diversos, com ara retard en el desenvolupament, neurodiscapacitat més específica (autisme, TDAH, etc.), anomalies congènites, dismòrfia, o altres fenotips específics. Els resultats de la investigació demostren que array-CGH és una alternativa sòlida i rendible a l'anàlisi de cariotip de bandes-G perquè proporciona una major taxa de detecció de diagnòstic.

Bartnik i els seus col·laboradors (2014a) han utilitzat array CGH en una cohort de 256 pacients amb RGD / DI amb trets dismòrfics o sense , anomalies del desenvolupament neurològic addicionals i/o malformacions congènites. En 69 dels pacients, van identificar 84 variants no polimòrfiques del nombre de còpies, de les quals 41 són coneguts per ser clínicament rellevants, incloent-hi dues delecions descrites recentment: 4q21.21q21.22 i 17q24.2. L'anàlisi amb microarrays també va descobrir 15 alteracions potencialment patològiques, entre elles, tres delecions rares, la 5q35.3, la 10q21.3 i la 13q12.11. A més, es van trobar 28 variants del nombre de còpies de significat clínic desconegut.

Els autors conclouen que els seus resultats donen suport encara més a la idea que les variants del nombre de còpies contribueixen significativament a l'etiologia genètica de

RGD / DI. També emfatitzen l'eficàcia del l'array CGH en la detecció de nous gens candidats a explicar els trastorns del desenvolupament.

Un estudi de revisió i metanàlisi incloent 13.926 pacients afectats de discapacitat intel·lectual i/o malformacions congènites ha proporcionat noves evidències que donen suport a la utilització d' array-CGH com a eina diagnòstica (Sagoo et al. 2009).

Al nostre país, fins al moment, només s'han publicat sèries que hagin utilitzat els array-CGH com a tècnica de tercera línia, en pacients amb resultat normal en altres tècniques de diagnòstic genètic, com ara el cariotip i la MLPA (Rodríguez-Revenga et al. 2013).

El present estudi analitza una sèrie de 1000 pacients amb l'array-CGH com a tècnica de primera línia diagnòstica.



**Premissa i objectius**





## 2.1 PREMISA

S'estima que la prevalença en la població general del retard global del desenvolupament / discapacitat intel·lectual (RGD / DI) és d'un 1-3%; la dels trastorns de l'espectre autista (TEA) d'un 0,7%; i la de les malformacions congènites (MC) d'un 2-3%. Aquestes dades indiquen l'existència d'un greu problema sanitari i social.

Els estudis dels quals disposem en la literatura, indiquen que la tècnica d'arrayCGH és l'eina de més rendiment en el diagnòstic etiològic de la discapacitat intel·lectual, malformacions i trastorns de l'espectre autista (TEA). La tècnica d'array-CGH triplica el nombre de diagnòstics dels obtinguts amb la tècnica estàndard de l'estudi cromosòmic convencional, el cariotip.

Els resultats obtinguts amb la tècnica d'arrayCGH donen suport a la idea que les variants en nombre de còpies (CNVs) contribueixen significativament a l'etiologia genètica d'un nombre cada cop més elevat, de trastorns del desenvolupament. També emfatitzen l'eficàcia de l'array-CGH en la detecció de nous gens candidats a explicar aquestes patologies.



## 2.2 OBJECTIUS

L'objectiu general de la investigació és implementar la tècnica d'array-CGH com a primera opció diagnòstica en pacients afectes de retard global del desenvolupament/discapacitat Intel·lectual (RGD/DI), malformacions congènites (MC), trastorns psiquiàtrics que inclouen els trastorns de l'espectre autista (TEA), epilèpsia, talla baixa (TB), i altres alteracions fenotípiques.

Els objectius específics que s'estableixen són:

1. Posada al punt i validació de la tècnica d'array-CGH com a eina de rutina diagnòstica en un servei de Genètica Hospitalari.
2. Desenvolupar estratègies d'anàlisi que es corresponguin amb una major eficiència i que permetin maximitzar la certesa diagnòstica de l'array-CGH.
3. Desenvolupar un programari que permeti la classificació de les CNV en funció de la repercussió clínica, i que a més faciliti l'accés als recursos de la xarxa.
4. Demostrar la capacitat diagnòstica de la tècnica d'arrayCGH realitzant un estudi prospectiu d'una sèrie de 1000 pacients afectats de RGD/DI, malformacions congènites, TEA, altres patologies psiquiàtriques, epilèpsia, talla baixa i altres alteracions fenotípiques
5. Avaluat els resultats obtinguts, en termes d'eficàcia, efectivitat, eficiència i rendiment diagnòstic.



## **Pacients, material i mètode**



### 3.1. PACIENTS ESTUDIATS

En el període de gener de 2012 a gener de 2015 s'han realitzat 1222 estudis amb la tècnica d'arrayCGH a l'Àrea de Genètica Clínica i Molecular de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Els pacients han estat derivats per les Unitats de Genètica Clínica; Neurologia i Endocrinologia de l'Hospital Vall d'Hebron i provenen majoritàriament de la regió metropolitana de Barcelona i del territori català, i en alguns casos d'altres zones de l'estat espanyol.

En tots els casos, abans i després de l'estudi s'ha realitzat una visita clínica amb assessorament genètic. La 1a visita incloïa l'obtenció d'informació clínica del pacient i la seva família, l'explicació de les proves a realitzar i les seves implicacions clíniques, l'obtenció de mostres i l'obtenció d'un consentiment informat.

Per a assolir l'objectiu de la investigació, s'han analitzat 1222 mostres d'ADN, obtingudes a partir de sang amb EDTA., de les quals 1000 corresponen a pacients afectats amb una o més de les següents patologies: RGD/DI, MC, trastorns psiquiàtrics (TEA, TDAH, esquizofrènia, trastorn bipolar, trastorn de comportament), epilèpsia, talla baixa, i altres (dismòrfies, fenotip peculiar, miopaties, hipercreixement, etc.). La resta dels estudis corresponen a quatre grups: 1) estudis familiars (n= 167), 2) fetus amb anomalies ecogràfiques (n = 41), 3) caracterització d'anomalies prèviament diagnosticades amb altres tècniques, principalment el cariotip (n = 4), i 4) pacients (n= 10) amb antecedent d'altres estudis genètics previs.

Es van excloure del grup d'estudi els pacients amb estudis genètics previs coneguts i els estudis de familiars. En resum, el present treball es basa en l'estudi dels 1000 pacients mitjançant la tècnica d'arrayCGH com a primera opció diagnòstica.

### 3.2 DISSENY DE LA INVESTIGACIÓ

L'objectiu de la investigació és relacionar el diagnòstic clínic del pacient i el resultat obtingut amb la tècnica d'arrayCGH, és a dir, la correlació genotip-fenotip. La finalitat és aconseguir la correcta interpretació dels estudis d'arrayCGH.

Per tal de conèixer la taxa diagnòstica en relació a les alteracions fenotípiques, i permetre la correcta interpretació dels estudis de arrayCGH, es va efectuar una revisió



exhaustiva de les històries clíniques de tots els pacients. Això va permetre establir una classificació de les anomalies fenotípiques, i comptabilitzar els casos que corresponien a cadascuna d'elles.

**Taula 3.1:** Distribució de taxa d'anomalies fenotípiques dels pacients analitzats.

	Total pacients analitzats (n=1.000)
* RGD/DI	406
* MALFORMACIONS	394
CC	188
SNC	107
* TRASTORNS PSIQUIÀTRICS	164
TEA	134
* EPILÈPSIA	57
* TALLA BAIXA	105
* ALTRES	298



Descongelar i repartir en alíquotes de 5 ml en tubs de centrifuga estèrils tancats amb tap de rosca.

- Colcemid 10 mg / ml.

Guardar en contenidor tancat a la nevera. Veure caducitat a l'envàs.

- Xoc hipotònic CLK 0.075 M

1.1 g CLK + 200 mL H<sub>2</sub>O

Guardar en contenidor tancat a l'estufa a 37°C màxim tres mesos.

- Fixador Carnoy

3 parts de metanol i 1 d'acètic (exemple: 30 ml metanol + 10 ml acètic).

No guardar més de 6 hores.

- Tampó fosfat (Sørensen):

1.1 pH 6.8: 508 ml A + 492 ml B

**Solució A:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1/15 M: 9.1 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 ml H<sub>2</sub>O

**Solució B:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1/15 M: 11.9 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O + 1000 ml H<sub>2</sub>O

- Colorant de WRIGHT

Dissoldre amb agitador 2.5 gr. de Wright en un litre de metanol com a mínim 2 hores. Filtrar amb paper Whatman 1 i envellir en contenidor tancat tres dies a 37°C.

Conservar 20 dies en contenidor tancat a temperatura ambient.

- 2xSSC

17.5 gr CINA + 8.8 gr Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O i enrasar a 1000 ml H<sub>2</sub>O

Conservar un any en contenidor tancat a la nevera.

### Procediment

- Realitzar un inòcul de 400 µL de sang total (unes 22 gotes de sang total) en 5 ml de medi de cultiu de Sangers i incubar de 72 h a 96 h a 37 °C, emprant un prestatge o cubeta diferent per a cada tanda de cultiu.

- El dia del sacrifici, afegir 50 µL de colcemid (concentració final de 0.1 mg / ml), barrejar invertint el tub diverses vegades i reincubar una hora i mitja a 37 °C.

- Centrifugar 10' a uns 2685 rpm (1500xG), Decantar i afegir 9 ml de xoc hipotònic CIK 0,075M 37 °C en vòrtex.

- Incubar 20' a 37 °C i afegir 6 gotes de fixador en el vòrtex

- Centrifugar 10' a uns 2685 rpm (1500xG), decantar i afegir 9 ml de fixador fred (congelador), primer gota a gota (les primeres 40 gotes) i després més ràpidament.

- Centrifugar 10' a uns 2685 rpm (1500xG), decantar i afegir 9 ml de fixador en el vortex. Repetir dues vegades més.

- Centrifugar 10' a uns 2685 rpm (1500 G), decantar i resuspendre amb pipeta Pasteur.

- Realitzar les extensions deixant caure una gota de suspensió cel·lular sobre el portaobjectes horitzontal des d'una alçada de 2 cm.

- Deixar assecar sense tocar i comprovar la qualitat al microscopi de contrast de fases i envellir 24 hores a 65 °C.

- Fer un pretractament de 3 'a 2xSSC a 66°C i una tinció de 3' de solució de Wright a Buffer pH 7 (1: 3).

### 3.3.2 FISH

Les sondes (petits fragments d'ADN marcats amb una molècula fluorescent) s'hibriden directament sobre cromosomes i nuclis que no han perdut la seva morfologia a causa d'un tractament de desnaturalització que pot ser molt suau gràcies a la presència de formamida, un reactiu que baixa la temperatura de desnaturalització de l'ADN fins a 74-75°C. Sonda i mostra es desnaturalitzen conjuntament sobre el mateix porta (codesnaturalització), d'aquesta manera s'evita la utilització de grans quantitats de formamida i simplifica molt el protocol.

La tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH) amb sondes de còpia única (LSI) és una tècnica que permet la detecció de microdeleccions, i insercions, amb sondes centromèriques analitzar aneuploïdies, i amb sondes subtelomèriques deleccions i reorganitzacions implicant els telòmers: També existeixen llibreries molt extenses de bacteris amb BACs perfectament caracteritzats que permeten l'elaboració de sondes de FISH específiques que permeten l'estudi de la majoria de les troballes de significat patogènic de l'array. La seva principal utilitat és confirmar troballes i descartar reorganitzacions equilibrades en els familiars dels pacients que poden donar un risc de recurrència.

- Sonda LSI/BACs: Si hi ha una delecció, la sonda no trobarà ADN on unir-se i no s'observarà senyal. Una altra sonda de control en el mateix cromosoma amb un color diferent evita comptabilitzar com deleccions aquells casos en què s'ha produït una pèrdua artefactual de tot el cromosoma.

- Sonda centromèriques (CEP): s'observa un senyal intens per cada centròmer marcat present (en nuclis i metafases). Els cromosomes 13/21 i 14/22 comparteixen seqüència centromèrica i, per tant, senyal de FISH.

- Sondes subtelomèriques/BACS: Si hi ha una delecció subtelomèrica concreta, la sonda no trobarà ADN on unir-se i no s'observarà senyal. Una sonda en el subtelòmer d'altre cromosoma indica una translocació.

Les mostres poden ser extensions cromosòmiques o cel·lulars fixades en un portaobjectes. La tècnica es pot aplicar a mostres de sang en Heparina o EDTA, líquid amniòtic, frotis bucal conservat en sèrum fisiològic i a cultius cel·lulars tripsinitzats.

## Reactius

Sonda LSI / CNP Vysis/Roche amb tampó

- Solució DAPI Vysis/Roche

- 0.4X SSC / 0.3% Igepal:

2 ml de 20X SSC (pH 5.3) + 98 ml d'aigua desionitzada + 100 µl de Igepal CA-630 (substitut NP-40) i barrejar en agitador molt suau fins que l'Igepal estigui totalment dissolt.

- 2X SSC / 0.1% Igepal:

10 ml de 20X SSC (pH 5.3) + 90 ml d'aigua desionitzada + 300 µl de Igepal CA-630 (substitut NP-40) i barrejar en agitador molt suau fins que l' Igepal estigui totalment dissolt.

## Procediment

### **1. Hibridació**

Les sondes LSI i centromèriques de Vysis es subministren amb el tampó adequat:

7 µl de tampó d'hibridació + 1 µl de sonda + 2 µl d'aigua desionitzada

Les sondes centromèriques ja venen prebarrejades amb el tampó.

En ambdós casos:

- Col·locar els 10 µl de mix d'hibridació sobre un cobreobjectes (20x 32mm).

- Col·locar el portaobjectes cap per avall sobre el cobreobjectes permetent que la sonda es reparteixi per capil·laritat. És important que no quedin bombolles d'aire.

- Segellar amb una tira de parafilm (el tancament del parafilm ha de quedar a la part superior del portaobjectes) i col·locar en l'aparell Termobryte:

- Col·locar els portaobjectes i posar en marxa el programa adequat:

Sondes LSI/ centromèriques: 4 minuts a 74 °C, 48 h a 37 °C

Sondes subtelomèriques: 2' a 72 °C, 48 h a 37 °C

## 2. Rentat

- Treure el Parafilm i el cobreobjectes i submergir el porta en la solució 0.4X SSC / 0.3 % IGEPAL a uns 72- 73 °C i deixar a la gerra Coplin durant 1'.
- Rentar en la solució 2X SSC / 0.1% IGEPAL a temperatura ambient movent un parell de cops el porta i deixar sense agitar durant 10 segons.
- Assecar a temperatura ambient en foscor (procurar evitar un asseccament excessiu).
- Aplicar 10 µl de contrast DAPI sobre un cobreobjectes (20x 32 mm). Col·locar el portaobjectes cap per avall sobre el cobreobjectes permetent que el DAPI es reparteixi per capil·laritat. És important que no quedin bombolles d'aire.
- Abans de visualitzar congelar a -20 °C almenys 10 minuts (es pot guardar dies).
- Realitzar la lectura al microscopi de fluorescència amb els filtres adequats.

## 3. Anàlisi

- Els resultats es donen en valors absoluts i en percentatges. Cal comptabilitzar el nombre de nuclis i metafases amb zero, una, dues o tres senyals i la localització en el cromosoma esperat o no.

### 3.3.3 L'ADN :EXTRACCIÓ DE SANG PERIFÈRICA. CONSERVACIÓ, QUANTIFICACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ I QUALITAT.

Per estudiar els pacients i familiars, es va obtenir 3 ml de sang perifèrica per venopunció, i ja en el laboratori es va purificar l'ADN de forma manual. En uns pocs casos, l'ADN havia estat extret per diversos mètodes en altres centres o laboratoris hospitalaris.

### Reactius

Existeixen nombrosos mètodes d'extracció d'ADN automàtica i manual amb rendiments de qualitat i quantitat molt diferents, però el kit manual d'extracció d'ADN de *Genra Systems (Qiagen, USA n. Cat 158422)* permet l'obtenció ràpida d'ADN en gran quantitat i qualitat a partir de sang conservada en EDTA.

### Procediment:

#### - CONSERVACIÓ DE LA SANG PERIFÈRICA

S'han estudiat mostres d'ADN, obtingudes de sang dels pacients i dels seus familiars preservada en EDTA com anticoagulant.

Per a l'emmagatzematge a llarg termini, la sang es conserva a 4 °C (6 dies) -20°C (un mes) o -80 °C (un any).

És necessari recollir la mostra de sang en tubs amb EDTA per reduir l'activitat ADNasa. L'heparina no és adequada com a conservant, ja que pot unir-se a l'ADN durant la purificació i interfereix o impossibilita moltes tècniques de biologia molecular.

Per a l'emmagatzematge a llarg termini, a -80 °C, és recomanable congelar el *Buffy Coat* en comptes de sang sencera. Això suposa centrifugar el tub amb 3 ml de sang durant 8 minuts a 1500 xg, i aspirar el sobrenedant ("buffy coat") amb una punta de pipeta estèril i congelar-lo en un eppendorf també estèril i correctament etiquetat, fins a ser utilitzat. No es recomana l'emmagatzematge a llarg termini -20 °C, ja que això pot donar lloc a rendiments més baixos.

La temperatura de descongelació també pot tenir un efecte sobre la qualitat de l'ADN i es recomana que les mostres de sang es descongelin ràpidament a 37 °C, millor que lentament a temperatura ambient.

#### - EXTRACCIÓ DE L'ADN

En resum es tracta de lisar les cèl·lules (primer els eritròcits i després els leucòcits). A continuació les proteïnes són eliminades per precipitació i, finalment,



l'ADN és aïllat també per precipitació amb isopropanol. Finalment l'ADN és rentat i assecat amb etanol 70% i és resuspès en una solució d'hidratació.

Passos per a dur a terme la lisi cel·lular:

1 - Preparar per a cada mostra 2 tubs estèrils de 15 ml amb la correcta identificació

2 - Posar 9 ml de **RBC Lysis Solution** en un tub estèril de 15 ml.

3 - Afegir-hi 3 ml de sang total. Tapar i barrejar per inversió. Deixar reposar a temperatura ambient durant 5 minuts (mai més de 30 minuts). Cal invertir el tub almenys una vegada més durant aquest temps.

4 - Centrifugar a 2000 *xg*, 5 minuts. Decantar el sobrenedant, deixant el pellet i uns 200µl de líquid residual.

5 - Resuspendre vigorosament les cèl·lules mitjançant vortex i afegir 3 ml de **Cell Lysis Solution**. Cal seguir vortejant per facilitar la lisi.

Normalment no es requereix incubació. De tota manera, si s'hi veuen restes cel·lulars es pot incubar a 37 ° C fins que la solució sigui homogènia.

(Possible punt de parada. Es poden conservar les mostres durant un mes a temperatura ambient)

Per a la precipitació de proteïnes:

6 - Afegir 1 ml de **Protein Precipitation Solution** al lisat cel·lular que ha d'estar a temperatura ambient.

7 - Cal barrejar amb vòrtex durant 20 segons i centrifugar a 2000 *xg* durant 5 minuts.

En aquest punt el precipitat de proteïnes hauria de tenir un aspecte compacte. Si no fos així, caldria barrejar la solució de nou amb el vòrtex i incubar-la en fred (gel) durant 5 minuts abans de tornar a centrifugar-la a 2000 *xg* durant 5 minuts més.

Per a la precipitació de l'ADN:

8 - Passar el sobrenedant que conté l'ADN en un nou tub cònic estèril de 15 ml, correctament identificat, al qual s'hi haurà posat prèviament 3 ml d'**Isopropanol 100%**.

9 - Tapar i barrejar per inversió suaument unes 50 vegades, fins veure que l'ADN forma una medusa blanca. Si és marronosa, cal rentar eliminant l'isopropanol tenint cura de no tocar la medusa. Caldrà posar isopropanol nou i barrejar unes quantes vegades suaument per inversió.

10 - Centrifugar a 2000 xg, 2 minuts. El DNA serà visible com un petit pellet de color blanc.

11 - Decantar tot el sobrenedant amb compte de no perdre el pellet, i invertir el tub sobre paper absorbent per assecar el màxim possible. Afegir 3 ml d'**etanol 70%** fred, colpejar el fons del tub per desprendre el pellet i invertir el tub tapat diverses vegades per rentar l'ADN.

12 - Comprovar que el pellet està surant en l'etanol 70%. Centrifugar a 2000 xg, 2 minuts. Decantar amb cura l'etanol i invertir de nou sobre paper absorbent. Deixar assecar a l'aire amb el tub invertit. Es pot deixar tota una nit. És molt important que no quedin restes d'etanol, ja que interfereixen amb la qualitat de l'ADN. El procés es pot accelerar amb estufa seca a 37 °C (cal vigilar que no s'assequi excessivament)

Finalment, per a la hidratació de l'ADN:

13 - En funció de la mida de la medusa d'ADN, afegir 50µl-250 µl de buffer "**DNA Hydration Solution**" (suposem un dissolvent de baixa salinitat donada l'alta reproductibilitat de la quantificació i mesura de la ràtio 260/280)

14 - Incubar a 65 °C durant 1 hora (mai més de 2h) o fins a l'endemà a temperatura ambient. Pipetejar repetidament i amb cura el tub després de la incubació per aconseguir una millor resuspensió del ADN.

15 - Centrifugar 2 minuts a 2000 xg i transferir a un tub eppendorf (1,5 ml) correctament identificat.

**Taula 3.2:** Quantitats dels diferents reactius en funció del volum inicial de sang en EDTA. A la columna sombrejada s'indiquen les quantitats més freqüentment utilitzades en el present estudi.

Volum de sang en ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº cèl·lules ( $\times 10^6$ )	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
RBC Lysis Solution (ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Cell Lysis Solution (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RNasa A ( $\mu$ l).opcional	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Protein Precipitation Solution (ml)	0,33	0,66	1	1,33	1,67	2	2,33	2,67	3	3,33
Isopropanol 100% (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Etanol 70% (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DNA Hydrationsolution ( $\mu$ l)**	100	100	250	333	417	500	583	667	750	833
Rendiment teòric ( $\mu$ gr)***	33	66	101	134	168	202	235	269	302	336

\* S'assumeix una mitjana de  $7 \times 10^6$  leucòcits per ml de sang total

\*\* El volum proposat de DNA *Hydration Solution* dona una concentració mitjana d'aproximadament 500 micrograms / ml

\*\*\* El rendiment teòric s'ha calculat assumint 6 pg de DNA per nucli diploide i un índex de recuperació del 80%.

#### - CONSERVACIÓ DE L'ADN

L'ADN es pot guardar a la nevera (setmanes) o congelar a  $-20$  °C o  $-80$  °C, en funció del temps que es vulgui emmagatzemar.

Es recomana emmagatzemar l'ADN en al·lquotes per minimitzar els cicles repetits de congelació-descongelació, de manera preventiva.

#### - QUANTIFICACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ I QUALITAT DE L'ADN

Un cop obtingudes les mostres d'ADN, és important determinar amb precisió la seva concentració, ja que les diferències entre les mostres confrontades (pacients i/o referències) poden afectar molt negativament el resultat de l'estudi d'array CGH.

La qualitat de l'ADN és un punt crític per obtenir uns resultats correctes. El grau de fragmentació de les mostres també és determinant, ja que és important comparar mostres amb fragmentació similar i que aquesta sigui el més reduïda possible.

Caldrà mesurar la concentració, i la puresa de tots els ADN de les mostres per espectrofotometria (Nanodrop ND-1000), mesurant l'absorbància de la mostra a diferents longituds d'ona i fem servir com a blanc el buffer en què està rehidratat l'ADN (*DNA Hydration Solution*).

- L'absorbància a 260 nm s'utilitza per calcular la concentració d'àcids nucleics.

Els àcids nucleics absorbeixen la llum ultraviolada (UV), a causa dels anells heterocíclics dels nucleòtids. La longitud d'ona d'absorció màxima per l'ADN (i també per l'ARN) és 260 nm ( $\lambda_{max} = 260 \text{ nm}$ ).

- En condicions òptimes a partir de 3 ml de sang total s'haurien d'obtenir uns 250µl de solució d'ADN amb una mida mitjana >50Kb (de 100-200 Kb) i una concentració de més de 100 ng/µl.

$$\mu\text{g DNA} = ([\text{DNA ng}/\mu\text{l}] * \text{volum elució}) / 1000$$

$$\mu\text{g DNA} = ([\text{DNA ng}/\text{ml}] * 250) / 1000$$

La contaminació per proteïnes pot ser estimada mitjançant la determinació de la relació d'absorbància a 260 nm i 280 nm.

El quocient **A260/A280** ha de ser > 1.8 ( < 1.8 indica contaminació amb proteïnes).

La determinació de la relació d'absorbància a 260 nm i 230 nm pot ajudar a avaluar el nivell d'arrossegament de sals en l'ADN purificat. Urea, EDTA, carbohidrats i ions fenolats tots tenen absorbàncies prop de 230 nm.

Com a pauta, la relació **A260/A230** ha de ser més gran que 1,5, idealment prop de 1,8. Com més baixa sigui la relació, més gran és la quantitat de sal present.

L'electroforesi en gel d'agarosa ens accedeix al grau de fragmentació de l'ADN. En un gel d'agarosa a l'1-1,5%, l'ADN genòmic intacte ha d'aparèixer com una banda

compacta, d'alt pes molecular, sense "smear" de baix pes molecular. Amb un protocol adequat d'extracció d'ADN, la fragmentació no és generalment un problema.

Diversos factors poden influir en la precisió de les mesures de l'ADN:

És important assegurar-se que l'ADN es dilueix uniformement/ pipetejant amunt i avall. Si cal, s'incuba a 37 °C durant 30 minuts.

Per garantir que la lectura de concentració és exacta, la lectura de l'absorbància ha d'estar dins de l'interval lineal de l'espectrofotòmetre: 2-3700 ng/ul segons el fabricant, 20-900 en la nostra experiència.

En les lectures de mostres molt diluïdes tindran molt poca diferència entre l'absorbància a 260 i 280 nm i proporcionaran ràtios inexactes.

En les lectures de mostres molt concentrades el valor d'absorbància i per tant la concentració tendeixen a ser inexactes. La llei de Lambert-Beer estableix que hi ha una dependència logarítmica entre la transmissió de llum a través d'una substància i el producte del coeficient d'absorció de la substància i la distància que la llum viatja a través del material. La llei ja no es compleix en concentracions molt altes, especialment si el material és poc homogeni

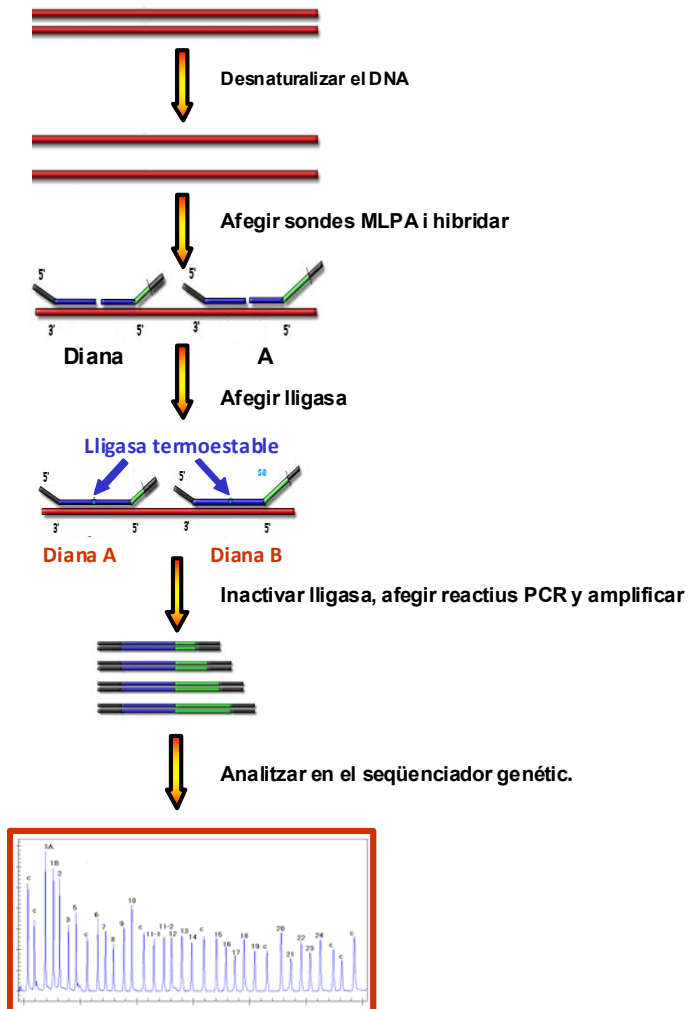
El pH de la solució és important: en condicions àcides (a l'igual que en temperatures extremadament altes) els àcids nucleics són completament hidrolitzats i en condicions bàsiques, si el pH augmenta per sobre de pH 7.8 l'estat tautomèric de les bases es veu afectada. Això és quan alguns dels àtoms d'hidrogen associats dins d'una base canvien la seva ubicació per produir un tautòmer. Aquests tautòmers canvien els enllaços d'hidrogen específics entre parells de bases i desestabilitzen l'estructura de l'ADN de doble cadena. Aquest canvi en l'estructura resulta en un canvi de l'absorció a 260 nm.

L'absorció dels àcids nucleics també depèn del dissolvent utilitzat per dissoldre'ls. Un tampó de baixa salinitat (TRIS o TE), ens donarà lectures molt reproduïbles.

### 3.3.4 MLPA

La tècnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) consisteix en el cribratge del nombre de còpies (duplicacions, delecions, etc.) de determinades regions

d'ADN mitjançant l'estudi d'unes 50 sondes que s'hibridaran per parelles en diferents punts de L'ADN i posteriorment s'amplificaran utilitzant el mateix parell de primers.



**Figura 3.2:** Tècnica MLPA. Es basa en l'amplificació de sondes dependents de lligació, per investigar guanys i pèrdues de zones diana del genoma.

Mitjançant una anàlisi de fragments i aprofitant la diferència de mida de cadascuna de les sondes a causa d'un fragment encebador de grandària variable, es podran

identificar pèrdues o guanys de material genètic, atenent a la normalització de les àrees de cada pic respecte a un control sa.

### Reactius

- Kits comercials MRC Holland

Reactius inclosos en el KIT (Probemix MLPA amb buffer MLPA, Lligase-65 buffer A 2 x 1 mL, Lligasa-65 buffer B 2 x 1 mL, Lligasa-65 salsa, Salsa PCR, Enzime Dilution buffer amb dNTPs, Sonda MLPA-FAM I Salsa polimerasa)

Reactius NO inclosos en el Kit comercial: ROX-500 (GENESCAN, ABI401734), Formamida

- Kits a MIDA

Reactius inclosos en el Kit comercial MRC Holland: *Ligase-65 buffer A* 2 x 1 mL, *Ligase-65 buffer B* 2 x 1 mL, *Lligase-65 salsa*, Salsa PCR

Reactius NO inclosos en el Kit comercial MRC Holland: Probemix MLPA, EcoTaq polimerasa (5 U / ml) amb buffer sense Mg, sondes MLPA-FAM, sondes MLPA-Hexx, dNTP 100 mM, ROX-500 (GENESCAN, ABI401734), Formamida

Tots aquests productes són estables fins a la data de caducitat a -20 °C.

Es recomana aliquidar el buffer Ligase-65 A, ja que la descongelació-congelació repetida destrueix el cofactor NAD. El nombre màxim de cicles descongelació-congelació que resisteix és de 15.

Es recomana utilitzar aproximadament 100 ng d'ADN humà i mai menys de 20 ng. L'ADN s'ha de disoldre TE (10 mM Tris-HCL pH 8,2; 1 mM EDTA). És essencial l'ús d'un termociclador amb la tapa calenta (105 °C).

La concentració d'EDTA en la mostra d'ADN no ha d'excedir 1 mM i el volum no ha d'excedir 5 ml. El volum de la reacció és important per a la velocitat d'hibridació que és dependent de la sonda i la concentració de sal. A més, la T<sub>m</sub> d'hibridació de la sonda amb la seva diana, també depèn de la concentració salina.

El nombre de cicles de PCR sovint pot ser reduït a 30. Això tindrà com a resultat una petita millora en la linealitat del senyal relativa de la sonda respecte al nombre de còpies de la seqüència diana. Quan només disposem de 10-20 ng de DNA humà, es pot requerir un augment a 36 en el nombre de cicles de PCR.

#### Procediment

El procediment detallat s'especifica en l'Annex 1: "MLPA: Full de treball utilitzat en l'Hospital Vall d'Hebron

#### INTERPRETACIÓ DE DADES:

L'anàlisi d'un nombre limitat de mostres pot ser efectuat fàcilment per examen visual del perfil de pics obtinguts amb l'electroforesi capil·lar. De tota manera, és molt recomanable fer sempre un anàlisi numèrica, menys subjectiu i menys propens a errors.

A causa que els kits propis de vegades tenen lleugers superposicions entre pics és millor utilitzar en els càlculs l'altura dels pics. En els comercials és indiferent. Per qüestió d'uniformitat, sempre realitzem l'anàlisi basant-nos en l'altura.

Primer es normalitza la quantitat inicial de DNA dividint l'alçada de cada pic per la suma de l'altura de tots els pics del pacient. Després es compara cada pic entre tots els pacients.

Els productes no específics de l'amplificació, els pics deguts a dímers dels primers i els pics generats per la MLPA *control mix* es poden eliminar generalment causa de la baixa àrea del pic i / o una mida fora del rang esperat dels pics de la reacció de MLPA.

Per corregir les diferències degudes a la variabilitat en les quantitats inicials de DNA, els valors obtinguts són normalitzats dividint el valor de cada pic pel valor de la suma de tots els pics de mostra.

Després es comparen els valors normalitzats de cada pic amb la mitjana en totes les mostres: els valors de cada pic són dividits per la mitjana dels valors del pic en totes les mostres.



Tots els resultats que difereixin més del 20% ( $<0,8$  o  $> 1,2$ ) s'han de revisar i a criteri del facultatiu es procedirà o no a la seva repetició.

La deleció d'una còpia de la seqüència diana d'una sonda, generalment es farà aparent per una reducció en el valor relatiu del pic associat al producte amplificat d'aquesta sonda en un 35-55%. Un guany en el nombre de còpies de la seqüència diana de dues a tres còpies / genoma diploide serà generalment aparent per un augment del pic associat a aquesta sonda entre 30 i 55%. La desviació estàndard de les àrees dels pics idealment ha d'estar per sota del 10%.

Tots els resultats patològics han de ser tornats a confirmar per descartar canvis de tubs o falsos positius.

En el cas de les delecions han de ser confirmats amb una altra sonda a fi de demostrar que el resultat no es deu a una mutació que interfereix amb la hibridació de la sonda

### 3.3.5 HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA EN ARRAY D'OLIGONUCLEÒTIDS (array-CGH)

Per a la realització de l'estudi s'han utilitzat la plataforma desenvolupada per l'empresa Agilent:

#### Equipament i Reactius

1 - Forn rotatori d'hibridació dissenyat per a la hibridació de sondes d'ADN sobre microarrays (Agilent G2545A), amb temperatures i velocitat de rotació variables i ajustables. El forn admet fins a 24 càmeres d'hibridació d'acer inoxidable que proporcionen un tancat segellat dels arrays durant la hibridació. Les seves característiques inclouen velocitat de rotació, i temperatures variables i ajustables. El Rotator rack Agilent admet fins a 24 càmeres d'hibridació.

2 - Càmeres d'hibridació per a microarrays Agilent. Són càmeres d'acer inoxidable que proporcionen un tancat segellat dels arrays durant la hibridació



3 - El cobreobjectes és d'un sol ús, amb juntes de silicona dissenyades per a retenir les mostres durant la hibridació. G2534-60015 20 *Backing Slides* (x8) G4126A *e-array* SurePrint G3 *Custom* CGH (Fig. 3.3).

□



**Figura 3.3:** Imatge de dos cobreobjectes amb formats (x4) i (x8), caracteritzats per les juntes de silicona dissenyades per a retenir les mostres d'ADN durant la hibridació

4 - "Portaobjectes" o suport de vidre: array o microarray d'oligonucleòtids Agilent producte n° G4827A. Microarray Format 8x60K. Arrays/Slide 8. amb una distància mitjana general entre sondes de 60Kb (major en regions ISCA). Agilent 60-mer SurePrint technology.

5 - Escàner DNA Microarray Scanner with Surescan High Resolution

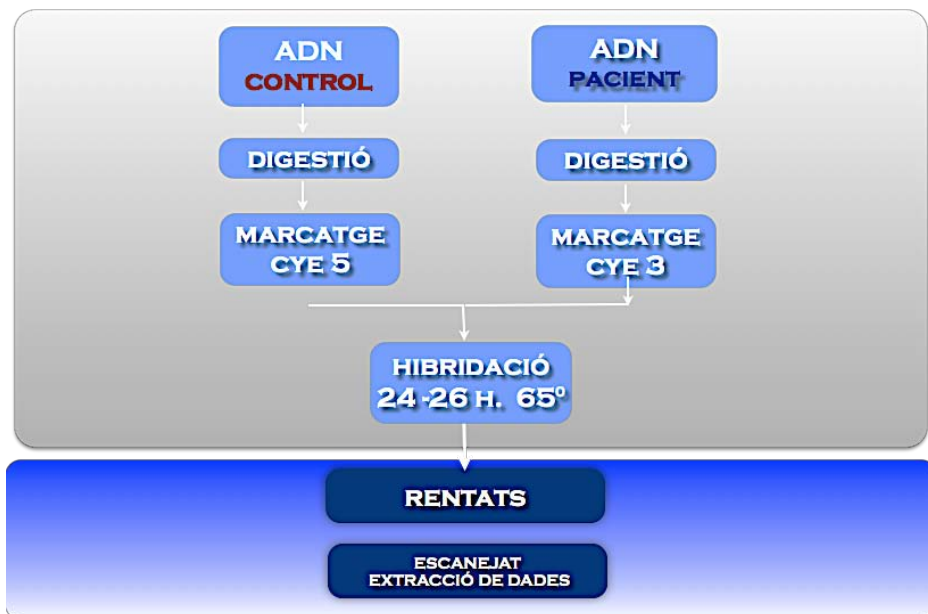
6 - Programaris Feature Extraction (FE) i Cytogenomics d'Agilent. Programaris encarregats de l'extracció de dades, i l'Anàlisi de les dades extretes respectivament.

7 - Altres equips propis d'un laboratori de Biologia Molecular:

- Nanodrop (ND-1000)
- Termociclador (peqSTAR 96 Universal)
- Concentrador SpeedVac (DNA 120)
- Enzims de restricció, per a la digestió de l'ADN : Alu I (10U/mL) Promega R6281 i Rsa I(10U/mL) Promega R6371
- E5190-0449 Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (50 DNAs)
- Human Cot-1 DNA (1 mg/mL) Invitrogen part numbers 15279-011 (500 µg)
- Agilent Oligo arrayCGH Hybridization Kit Agilent p/n 5188-5220
- Columna purificació 24708980 Amicon ultra 0,5 ml.
- Tampons de rentatge 1 i 2 (Agilent 5188-5221 i 5188-5222).

### Procediment

L'array CGH proporciona una manera d'interrogar molts llocs en el genoma en un únic assaig. Independentment del contingut interrogat, les plataformes d'array CGH es basen en els següents principis generals: (1) marcatge fluorescent de la mostra i de l'ADN de referència, (2) hibridació de l'ADN marcat en una matriu (array) de sondes disposades en un suport de vidre, (3) escanejat de la matriu hibridada per detectar la intensitat de fluorescència en tots els llocs d'hibridació, i (4) anàlisi de dades (Fig 3.4). Aquest protocol és específic de l'array-CGH d'Agilent utilitzant un sistema de dos colors per comparar la mostra i un ADN de referència.



**Figura 3.4:** Protocol de la tècnica d'arrayCGH estàndard.

Passos bàsics:

**Primer dia:**

- 1- Mesurar Qualitat ADNs (ADN pacient i ADN control)
- 2- Passar ADNs a concentració equimolar
- 3- Digestió ADNs (\*)
- 4- Marcatge ADNs amb fluorocroms (Cy3 i Cy5) (\*)
- 5- Purificació per separat dels ADNs marcats (\*)
- 6- Concentració en el speed vac (\*)
- 7- Hibridació a 65 °C (24-26h)

**Segon dia:**

- 8- Rentats
- 9- Escanejat
- 10- Extracció de dades (*Feature Extraction*-FE) i Anàlisi de les dades (Cytogenomics)

(\*) NOTA: la tècnica permet congelar els ADNs després de la digestió, després del marcatge, després de la purificació, i després de la concentració en el *SpeedVac.*, i posposar la tècnica

El procediment detallat s'especifica en l'Annex 2: "array-CGH: Full de treball utilitzat en l'Hospital Vall d'Hebron

### 3.4 METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓ AMB ARRAY-CGH

#### 3.4.1 ESTRATÈGIA D'HIBRIDACIÓ PACIENT VS PACIENT

Per tal de millorar l'eficiència (relació cost/benefici) de la tècnica, minimitzant costos, ens vàrem plantejar una alternativa a l'estratègia d'hibridació estàndard pacient *versus* control, per la de hibridació pacient *versus* pacient. L'estudi ha estat realitzat en la seva totalitat amb aquesta estratègia.

El perill potencial d'aquesta estratègia és que el risc d'un desequilibri coincideixi en els dos pacients contraposats. Al tractar-se d'una tècnica comparativa, l'anomalia genètica no es detectaria.

S'ha proposat cohibridar pacients amb fenotip discordant (Ahn et al. 2010). Donada la variabilitat fenotípica de les síndromes recurrents i la similitud de fenotips. Vàrem creure que aquesta estratègia era molt arriscada.

La nostra proposta (Fig. 3.5) és descartar que els dos pacients cohibridats tinguin la mateixa micro-anomalia estructural. La tècnica MLPA de trastorns genòmics recurrents (TRG)\*, ens informarà d'aquesta coincidència, en les principals síndromes (síndromes de Williams-Beuren, DiGeorge, Sotos, Prader Willi per deleció, Smith-Magenis, Rett i altres 20 desequilibris relacionats en la bibliografia amb Retard Mental i/o Autisme). Així doncs, s'aplicarà l'estudi a un dels pacients de cada parella cohibridada. En aquestes condicions el risc d'error és inferior a l'error d'identificació de mostra reconegut en els laboratoris clínics (Wiwanitkit 2001).

En el cas que es detecti un desequilibri per array, i resultat de MLPA TRG negatiu, es confirmarà aquest, amb un nou estudi d'array. Aquest array de confirmació es realitzarà, en primer lloc, a la mostra a qui havia estat assignat el desequilibri. En cas de no confirmació s'estudiarà l'altra mostra cohibridada. L'assignació la determina el programari d'interpretació "EasyArray", de disseny propi, específic per a l'opció d'hibridació pacient *versus* pacient. (veure apartat 4.2.1).



**Figura 3.5:** Protocol de la tècnica d'arrayCGH utilitzat en l'estratègia d'hibridació pacient *versus* pacient.

### 3.4.2 GESTIÓ DE CASOS. TÈCNICA D'ARRAY-CGH. FULL DE TREBALL

Per tal de gestionar cada assaig, s'ha elaborat un full de treball (Annexe 2). Aquest constitueix una plantilla en format excel on s'especifica en detall els pacients inclosos en l'assaig i el procediment a seguir. El full facilita el càlcul de les dilucions d'ADN per a cada assaig, i la identificació de les mostres processades en cada array.

Seguint el protocol de la tècnica d'arrayCGH, el full de treball consta de diferents apartats:

1 - Taula de casos a estudiar, on s'indica la concentració de les mostres d'ADN, sexe, motiu de l'estudi i localització en el suport de vidre, de 4 o 8 arrays, depenent del format emprat.

2 - Quantificació i control de qualitat de l'ADN, prèvia extracció manual de l'ADN utilitzant l'equip de Qiagen. Es mesuren la concentració i la puresa, de tots els ADNs

de les mostres per espectrofotometria (Nanodrop).

3 - Digestió que es realitza amb enzims de restricció Alu I / RSA I.

4 - Marcatge fluorescent de l'ADN genòmic de les mostres amb diferents fluorocroms (Cy5 i Cy3). Cal minimitzar l'exposició a fonts de llum en tot el procediment de marcatge. Aquests colorants són també sensibles a múltiples cicles de congelació-descongelació. Generalment, l'etapa de marcatge és sòlida, si bé poden sorgir dificultats quan la qualitat de les mostres d'ADN no és l'adequada.

5 - Purificació de l'ADN marcat utilitzant les columnes de purificació ultra 0,5 µl (Amicon 24708980).

6 - Quantificació i control de qualitat de l'ADN marcat: es mesura la concentració (ng/µl), intensitat de marcatge (pmol/µl) i s'avalua el rendiment del marcatge per espectrofotometria (Nanodrop).

7 - Hibridació en condicions òptimes (càmera que proporciona una disminució dels nivells d'ozó ambiental). Ambdós ADNs marcats es cohibriden en una relació equimolar a una matriu de sondes d'ADN (l'array) que corresponen a regions del genoma perfectament identificades. Durant la hibridació, seqüències d'ambdues mostres d'ADN competeixen per la unió a les sondes immobilitzades en el suport de vidre. Qualsevol diferència en la ratio de la intensitat del senyal fosforescent ens mostra les diferències en el nombre de còpies d'ADN entre les dues mostres.

8 - Rentats post-hibridació, en condicions de baixos nivells d'ozó (<5 ppb), per eliminar la hibridació inespecífica.

9 - Escaneig, la intensitat relativa de cada fluoròfor és llegit per l'escàner (*DNA microarray scanner, Agilent Technologies, USA G2505C*) que utilitza dos làsers: el SHG-YAG làser (532 nm) i el helium-neon làser (633 nm) que exciten els fluorocroms Cyanine-3 (Cy-3) i Cyanine-5 (Cy-5) respectivament, i que permet la mesura de les respectives fluorescències. S'obtenen imatges en arxius d'imatge Tiff amb una resolució de 3 µm.

### 3.4.3 INTERPRETACIÓ DE DADES

Es distingeixen dues fases, la primera automatitzada, i recollida en la part final del full de treball, que consta de dos passos:

**1 - Extracció de dades:** A partir de la imatge obtinguda duem a terme l'extracció de dades amb el programari, que inclou un component per a imatges (*Feature Extraction* (FE) d'Agilent). El FE extrau informació a partir de la imatge i la codifica de forma numèrica. El programari FE ens ofereix les mesures de control de qualitat (Microarray QC Metrics) que són la primera etapa de l'anàlisi de les dades CGH (Figura 3.6).

Evaluation Metrics for CytoCGH_QCMT_May11 : Excellent (5) ; Good (4) ; Evaluate (3)				
Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00	>1	NA	<1
AnyColorPrcntFeatNonUn...	0.02	<1	1 to 5	>5
DerivativeLR_Spread	0.15	<0.20	0.20 to 0.30	>0.30
gRepro	-0.01	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
g_BGNoise	6.81	<5	5 to 15	>15
g_Signal2Noise	60.00	>100	30 to 100	<30
g_SignalIntensity	408.84	>150	50 to 150	<50
rRepro	-0.01	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
r_BGNoise	5.49	<5	5 to 15	>15
r_Signal2Noise	57.18	>100	30 to 100	<30
r_SignalIntensity	313.86	>150	50 to 150	<50
RestrictionControl	-1.00		0.80 to 1	<0.80 or >1

**Figura 3.6:** Exemple de mesures de control de qualitat, proporcionades pel programari *Feature Extraction* (FE).

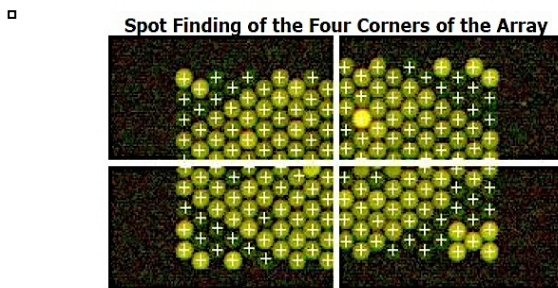
#### Mesures de control de qualitat (Microarray QC Metrics):

(1) **Grid:** Avalua si el programa disposa del "grid" o xarxa adequada i si la imatge està correctament alineada. El "grid" és un fitxer que descriu la posició de cada punt a l'array. La imatge de les quatre cantonades de l'array en què les creuetes queden perfectament alineades amb els cercles, ens informen que el "grid" és correcte. (fig 3.7)

Si no és així, el valor és <1, i ens indica que s'ha utilitzat un fitxer de dades "grid" equivocat o la imatge no està correctament alineada. Cal revisar si l'assignació del



fitxer ".xmls" amb el "grid" és l'adequat. En cas contrari, descarregarem els arxius de xarxa i protocols de la web d'Agilent.



**Figura 3.7:** Les quatre cantonades d'un array.

(2) **AnyColorPrctFeatNonUn:** Calcula el percentatge de punts que són valors extrems no-uniformes en qualsevol dels dos canals de lectura (per a Cy5 i Cy3). Valors per sobre de 5 no són acceptables.

(3) **Derivative LR\_Spread:** És el principal índex de qualitat. Afecta directament a la capacitat de detecció. Avalua la variabilitat en la intensitat del senyal entre els diferents punts de l'array. Segons la nostra experiència ha de ser  $<0,20$ , per garantir una detecció precisa i fiable dels desequilibris genòmics. A major *Derivative LR\_Spread*, menor la sensibilitat per detectar tant els guanys com les pèrdues.

(4) **r/g\_gRepro:** Reproductibilitat. Avalua el coeficient de variació (%CV) entre les intensitats d'algunes sondes de control de senyals replicades a l'array (s'exclouen els valors extrems no uniformes i saturats). Els càlculs es realitzen amb els valors d'intensitat un cop restat el soroll de fons.

Si no hi han suficients sondes replicades ( $<10$  sondes o  $<10\%$  de las sondes), el valor pot arribar a -1. No hi son presents en format 8x60 disseny ISCA.

(5) **r/g\_BGNoise:** Soroll de fons. Avalua la desviació estàndard de les sondes de control negatives, on no s'hauria de detectar cap fluorescència, després de descartar els valors extrems, no-uniformes i saturats.

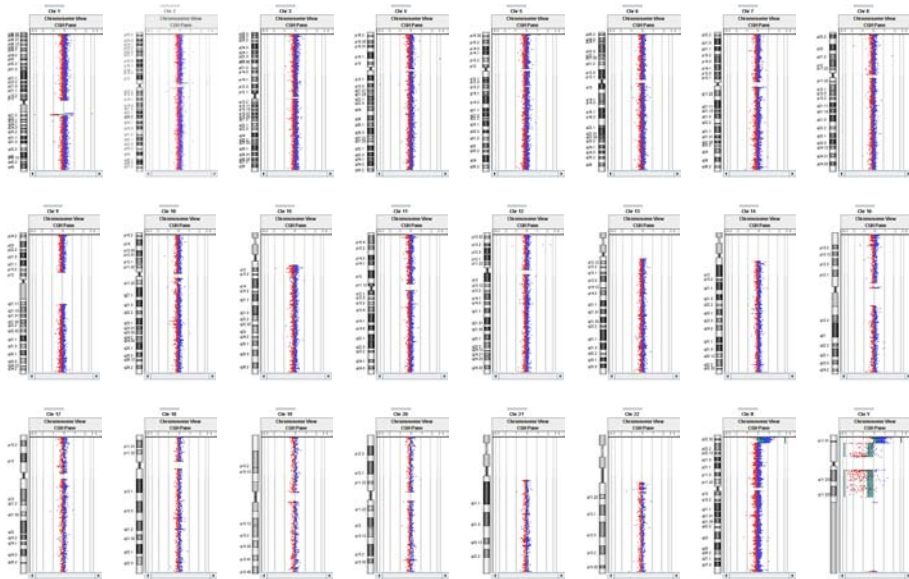
(6) **r/g\_Signal2Noise:** Ratio senyal/soroll. Avalua el quocient: Intensitat del senyal/

soroll de fons. Ens orienta sobre la qualitat de l'ADN, hibridació, rentat i escaneig.

(7) **r/g\_SignalIntensity**: Intensitat de senyal. Avalua la mitjana de la intensitat del senyal prèvia sostracció del soroll de fons, i descarta els valors extrems no uniformes així com els valors saturats.

(8) **RestrictionControl**: Comproven diversos llocs de restricció que no varien de mostra a mostra. El valor és el mínim obtingut entre les diverses sondes. Si l'array no té sondes de control de restricció el valor és igual a -1 (com en el cas de l'array ISCA 8x60Kb i de l'array 4x180Kb que són els que hem utilitzat).

**2.- Anàlisi i interpretació de les dades/Detecció deCNV**: Importar el fitxer de dades de Feature Extraction (.txt) i el programari amb component analític (CytoGenomics d'Agilent) que quantifica la relació de color (Cy5/Cy3). Aquest índex reflecteix el nombre relatiu de còpies d'ADN corresponent entre les dues mostres de pacients.



**Figura 3.8:** Cariotip molecular. Imatges proporcionades pel programari CytoGenòmic.

L'extracció de dades i l'Anàlisi i interpretació de les dades/Detecció deCNV es troben integrats en versions més actualitzades del programari CytoGenòmic, on a l'ordre de: -"Analitzar" es posen en marxa, primer l'extracció de dades (FE), i en segon lloc el seu anàlisi, proporcionant els resultats. Dels resultats s'obtenen gràfics, que

representen el cariotip molecular (Fig. 3.8) i l'informe o *Cyto Report* (pdf), on es descriuen els desequilibris detectats.

A partir de la imatge obtinguda portem a terme l'extracció de dades amb el programari que inclou un component per a imatges, *Feature Extraction* (FE) d'Agilent. El FE extrau informació a partir de la imatge i la codifica de forma numèrica. El programari FE ens ofereix les mesures de control de qualitat (*Microarray QC Metrics*) que són la primera etapa d'anàlisi de les dades CGH (Fig. 3.6)..

La segona fase és manual: S'inspecciona visualment els possibles desequilibris detectats a partir de l'Anàlisi fet pel programari Cytogenomics. Posteriorment s'ha de dur a terme la interpretació definitiva dels resultats, per la qual cosa cal fer, per cada una de les CNV detectades, una valoració de la seva possible correlació amb el fenotip del pacient.

Finalment atorgar a cada una d'elles un significat sigui: patogènic, benigne o de caràcter incert; seguint l'algorisme de classificació de les CNV (Fig. 3.9) i les guies de l'*American College of Medical Genetics*, per a la interpretació de lesCNV en el diagnòstic postnatal (Kearney et al. 2011)

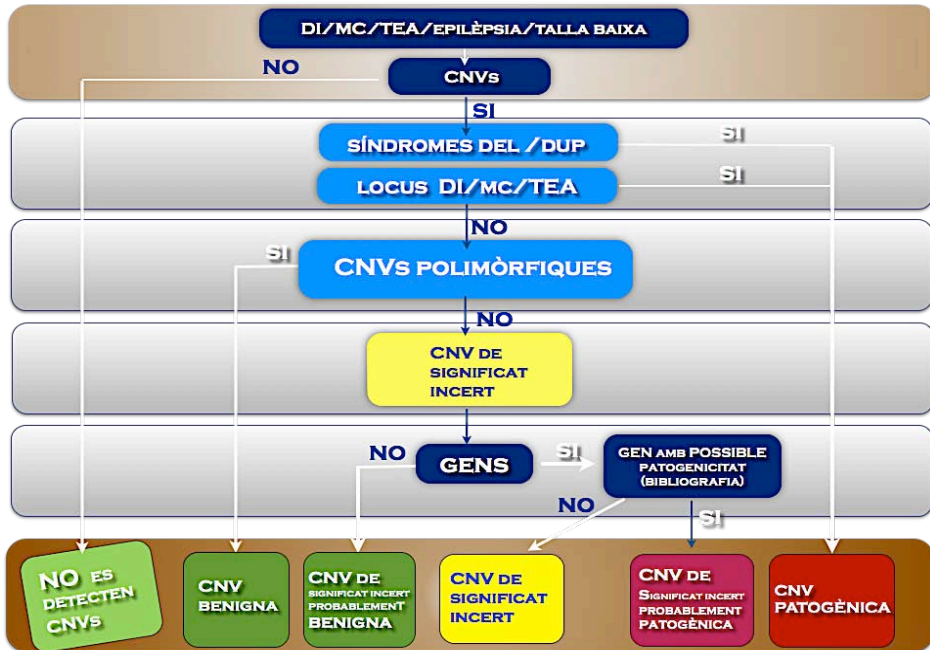
Es comença per un pacient amb RGD/DI, i/o malformacions congènites, i/o epilèpsia, i/o talla baixa, i fins i tot, alguna altra patologia susceptible de presentar un desequilibri genòmic.

- Aquest pacient se li fa un estudi d'arrayCGH, on pot no detectar-se cap CNV. Es conclou així que té un resultat d'arrayCGH normal.

- En el cas que es detectin desequilibris genòmics o CNV, es passa a estudiar cadascuna de les CNV trobades. Una a una.

- Si es confirma que la CNV trobada, es correspon a alguna síndrome de microdeleció o microduplicació reconeguda en la clínica i literatura mèdica, es classifica com a CNV patogènica. Si no és així, s'investiga la coincidència o superposició amb algun locus cromosòmic, identificat com susceptible d'estar relacionat amb patologia de DI, malformacions congènites i/o autisme. En aquest cas la CNV també serà classificada

com a patològica.



**Figura 3.9:** Algorisme de classificació de lesCNV Seguint l'algorisme de classificació,

- Si no es dóna cap dels dos supòsits anteriors, passem a comparar la CNV trobada amb les CNV polimòrfiques registrades en la base de dades *Data Genomic Variants*. Aquesta base de dades recull una llarga llista de CNV en continua actualització, procedents d'un gran nombre d'estudis realitzats a milers de persones aparentment sanes (controls). En aquest cas la coincidència de la CV estudiada amb alguna de les CNV control, sempre que pertanyin a tres o més estudis diferents; o amb una prevalença > 1% (polimorfisme) es classifica com a benigna.

- Quan res de l'anterior no es confirma, la CNV passa a classificar-se dins el grup de les CNV de significat incert. En aquest cas s'estudia el contingut gènic de la CNV:

- En el cas de no afectar a cap gen, la CNV es classifica com a CNV de significat

incert probablement benigne.

- En cas de trobar afectació de gens, el següent pas seria consultar amb l'ajut de recursos en xarxa (www: genecards, OMIM, Polysearch,...) la relació de cada un dels gens amb possible patologia. Si es troba informació que relacioni el fenotip del pacient amb el genotip (duplicació o deleció del gen), es confirma la classificació de CNV de significat probablement patogènic. Si aquest darrer punt tampoc no es confirma la CNV restaria definitivament com CNV de significat incert. Aquest procés es repeteix amb cadascun del gens inclosos en la CNV estudiada.

Finalment farem el mateix amb cadascuna de les CNV detectades.

Per implementar aquest algoritme s'ha desenvolupat un programari de producció pròpia escrit en llenguatges de programació *Phyton* i *VisualBasic* al que hem denominat "EasyArray".

L'EasyArray contribueix a proporcionar seguretat en la gestió de les mostres i les anomalies detectades. Facilita l'accés a la informació existent a la xarxa. Suggereix una primera classificació de les anomalies i genera part de l'informe clínic.

## **Resultats**



Per tal d'aconseguir l'objectiu general d'implementar la tècnica d'array-CGH com a primera opció es van dissenyar dues fases: la primera fa referència a la posada al punt i validació de la tècnica d'arrayCGH; i la segona a la recerca diagnòstica amb la tècnica d'array-CGH, com a tècnica de primer nivell (*array first*).

#### 4.1 POSADA AL PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH

En la posada al punt i validació, es va pensar en una estratègia d'hibridació alternativa a l'estàndard, que millorés l'eficiència rebaixant costos i mantenint la fiabilitat diagnòstica amb l'objectiu de fer econòmicament viable la proposta.

Per la validació es va optar per una doble l'estratègia de pacient *versus* pacient, que es detallen tot seguit.

##### 4.1.1 ELECCIÓ DE L'ESTRATÈGIA D'HIRIDACIÓ

Per escollir l'estratègia d'hibridació es van estudiar per arrayCGH desequilibris coneguts, emprant dues metodologies:

- HIBRIDACIÓ "PACIENT VS PACIENT" i
- HIBRIDACIÓ "PACIENT VS PACIENT" AMB DOBLE MARCATGE EN "BUCLE"

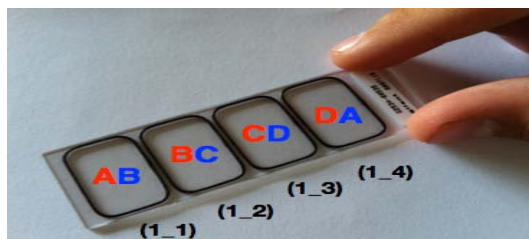
Pacient vs pacient: Es canvien les mostres de referència o controls, per mostres de pacients (Ahn et al. 2010; Ahn et al. 2013). És doncs, una hibridació on es compara ADN d'un pacient amb ADN d'un altre pacient. Aquesta estratègia d'hibridació és la que s'ha utilitzat en els mil pacients de l'estudi.

Pacient vs pacient amb doble marcatge en bucle o *loop design* (Allemeersch et al.; 2009): Consisteix en el marcatge de la mateixa mostra amb dos fluorocroms diferents (**AA, BB, CC, DD**). És a dir, en el cas d'utilització de la plataforma Agilent **4x**, s'haurien d'utilitzar una alíquota d'ADN de cada pacient (total 4) marcada amb Cy5 (blau/verd) i una alíquota (total 4) marcada amb Cy3 (vermell).

Cada mostra marcada, doncs, s'hibrida dues vegades contra mostres de dos pacients diferents, en bucle (**AB, BC, CD, DA**) (Fig..4.1)



□



**Figura 4.1:** Hibridació en bucle o "loop"

Aquesta segona estratègia, hibridació en bucle, va ser utilitzada només en la primera fase de validació. El fet que totes les mostres fossin analitzades dues vegades i en el mateix assaig, ens oferia la confirmació de totes les troballes i confirmava el bon funcionament dels algorismes informàtics que assignen automàticament quina anomalia (guany o pèrdua) i quin membre de cada parella és portador de l'anomalia. Això donava seguretat diagnòstica, un dels objectius plantejats. Tot i això, no estava en la línia d'aconseguir el repte de reduir costos.

Per tal de portar a terme la validació de la tècnica, es van emprar 10 mostres d'ADN obtingudes de sang amb EDTA de pacients amb reorganitzacions genòmiques desequilibrades (delecions i duplicacions) ja conegudes i detectades amb anterioritat per altres tècniques (anàlisi cromosòmic amb bandes G (Cariotip), FISH, MLPA, i també arrayCGH realitzat per un laboratori extern). Aleshores es va procedir a la seva detecció i caracterització per arrayCGH.

En 6 casos es va emprar l'estratègia "pacient vs pacient" + doble marcatge en "bucle" i en els altres 4 casos "pacient vs pacient".

Es va utilitzar la plataforma d'array d'oligonucleotids sondes distribuïdes de manera equidistant o *backbone* no dirigida **4x180K** (Agilent G4449A). Els resultats obtinguts s'indiquen en la taula 4.1

Es va considerar validada la tècnica al confirmar-se totes les CNV diagnosticades anteriorment per altres tècniques, o per arrayCGH en altres laboratoris.

**Taula 4.1:** Confirmació i caracterització de desequilibris diagnosticats amb anterioritat per altres tècniques o arrays.

Array	Disseny	Desequilibri, confirmat i caracteritzat per array	Detecció prèvia per...
1 (1_1)* (1_4)*	4x180	47,XX,+mar(18p) arr[hg19]18p11.32-p11.2(118760-14101582)x3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citogenètica</li> <li>• FISH</li> <li>• MLPA subtelomèrica</li> <li>• MLPA pericentromèrica</li> </ul>
1 (1_2)* (1_1)*	4x180	Deleció15q26 arr[hg19]15q26.2-q26.3(94966356-102465355)x1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MLPA subtelomèrica</li> </ul>
1 (1_3)* (1_2)*	4x180	47,XX+mar(11q) arr[hg19]11p11.12-11q12.1(49002438-59710907)x3-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citogenètica</li> <li>• MLPA pericentromèrica</li> </ul>
1 (1_4)* (1_3)*	4x180	Duplicació Xq28 (MECP2) arr[hg19]Xq28(153068282-153373473)x3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Array CGH laboratori extern</li> </ul>
3 (1_1)* (1_2)*	8x60	Duplicació 22q11.21 arr[hg19]22q11.21-q12.2(20719112-30892470)x3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citogenètica</li> <li>• MLPA</li> </ul>
5 (1_1)* (1_4)*	8x60	Deleció19p13 arr[hg19]19p13.12(14141495-16283956)x1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• array CGH laboratori extern</li> </ul>
7 (1_2)	8x60	Deleció 6q arr[hg19]6q22.1-q23.2(115853923-131321366)x1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Array CGH laboratori extern</li> </ul>
7 (1_3)	8x60	Deleció 22q11 (S. DiGeorge): arr[hg19]22q11.21(18706001-21505417)x1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MLPA TGR</li> </ul>
8 (2_2) 11(1_3)	8x60	Duplicació Xq28 (IDS) arr[hg19]arrXq28(148250026-148613783)x3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Array CGH laboratori extern</li> </ul>
9 (1_4)	8x60	Triplicació MYH1(S. dup16p13) arr[hg19]arr16p13.11(14910205-16041598)x4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MLPA TGR</li> </ul>

Notes per a la interpretació: l'asterisc (\*,\*) fa referència a hibridació pacient/pacient + bucle. Per exemple 3 (1\_1)\* (1\_2)\* fa referència al tercer assaig i (1\_2)\* localitzacions dins del suport de vidre marcada la mostra del pacient amb color vermell i (1\_1) marcada amb fcolor blau). (\*) vol dir hibridació en bucle.

#### 4.1.2 ELECCIÓ D'UNA PLATAFORMA D'HIBRIDACIÓ

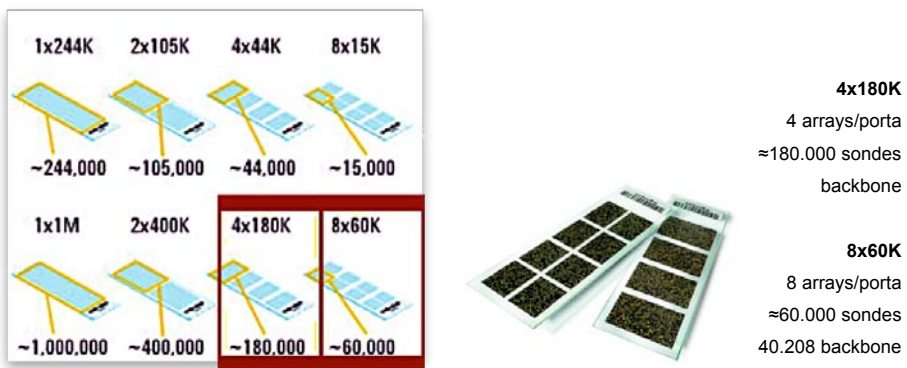
Les diferents plataformes poden contenir un nombre variable de sondes fins a un màxim d'un milió. El suport de vidre pot estar dividit en una, dues, quatre i vuit àrees

(fig. 4.2).

- Inicialment i en la fase de validació, es va utilitzar l'array d'oligonucleotids **4x180K** (Agilent nº G4449A) amb aproximadament 180.000 sondes distribuïdes de manera equidistant o *backbone*, i una distància mitjana general entre sondes de 13 Kb (11 Kb en els gens RefSeq).

- Molt poc temps després de l'inici de la posada en marxa de la validació i investigació es va tenir accés a una segona plataforma ja recomanada per a diagnòstic, l'array d'oligonucleòtids **8x60K** (Agilent G4827A) que combina sondes equidistants *backbone* i sondes dirigides a regions específiques, determinades pel consorci ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays*) amb una distància mitjana entre sondes de 60Kb (menor en regions ISCA). En aquest darrer format, acabat de sortir al mercat, es van hibridar mostres amb anomalies detectades en l'array 4x180, i totes van ser confirmades per l'array 8x60 obtenint, per tant, una validació d'aquest segon format o plataforma.

□



Imatges extretes d'Agilent Technologies. 18.851 regions ISCA

**Figura 4.2:** Característiques de les dues plataformes utilitzades.

El suport de vidre 8x60K admet el doble de pacients a estudiar amb el mateix cost que el de 4x180K. Amb l'estratègia "pacient vs pacient" doncs, es passava de vuit a setze pacients en un sol suport, abaratint sensiblement els costos de la tècnica.

Endemés del preu calia comparar el rendiment diagnòstic de les dues plataformes. Es van hibridar en la plataforma 8x60K, 6 mostres d'ADN de pacients amb diagnòstic molecular ja conegut (identificat amb la plataforma 4x180), confirmant-se els resultats.

Es van utilitzar les dues plataformes per estudiar 24 mostres d'ADN, procedents de pacients afectes de cardiopatia congènita dins el context d'un projecte de recerca (FIS PS09/00632). En aquest cas, l'estratègia d'hibridació utilitzada va ser pacient vs pacient + doble marcatge en bucle. Això comportava confirmar tots els desequilibris detectats, ja que s'observaven tots en dos arrays diferents. Igualment, al estar marcada cada mostra amb els dos colors de fluorocroms (*'dye-swap' method*), permetia veure si diferien en el seu comportament. El resultat d'aquesta doble hibridació, per mostra i plataforma, va ser determinant. Explicació:

L'anàlisi dels resultats obtinguts amb les dues plataformes diferia en nombre de desequilibris detectats. S'avaluà un mostreig de 12 resultats d'array amb paràmetres de qualitat òptims, realitzats en paral·lel amb les plataformes 4x180k i 8x60k. La mitjana de desequilibris detectats (que incloïen totes les CNV, benignes, incertes probablement benignes, incertes, incertes probablement patogèniques i patogèniques) en la plataforma 4x180K va ser de 20,75 i en la plataforma 8x60K va ser de 7,12. No obstant el rendiment diagnòstic de les 24 mostres estudiades (detecció de desequilibris patogènics i de significat incert probablement patogènic) va ser exactament el mateix en les dues plataformes.

Per altra banda, els resultats de la comparativa entre les dues plataformes de arrayCGH (4x180K i 8x60K ISCA v2, ambdues de Agilent Technologies) van mostrar clarament una major especificitat de la plataforma 8x60K ISCA v2 en la detecció de CNV patogèniques. Explicació:

Es va observar que la plataforma 8x60K ISCA v2 donava més seguretat diagnòstica pel fet de tenir un major nombre de sondes dirigides a les regions de l'ADN relacionades amb patogenicitat.

Així mateix, en un dels resultats era una deleció patogènica de 0,043 Mb que va ser detectada per 4 sondes de la plataforma de 4x180K i per 11 sondes a la plataforma 8x60K ISCA v2. En un altre cas, la duplicació patogènica afectant la totalitat del gen *RAF1* es va detectar per 10 sondes a la plataforma 4x180K i per 18 sondes a la 8x60K ISCA v2 (taula 4.2). Com a conseqüència d'aquests resultats, es va decidir utilitzar la plataforma 8x60K ISCA v2.

**Taula 4.2:** Casos 1 i 2: pacients amb característiques clíniques de la Síndrome de Rubinstein-Taybi i Síndrome de Noonan respectivament. Es detecta una deleció i una duplicació susceptibles de ser la causa de les alteracions fenotípiques. En cada cas s'observa la diferència en el nombre de sondes segons la plataforma utilitzada (4x o 8x).

Cas	Array	Chr	Banda	Mida	Tipus de CNV	Síndrome	Gens	Sondes
1	4x	chr16	p13.3	0,0432	deleció	Rubinstein-Taybi	<i>TRAP1, CREBBP</i>	4
1	8x	chr16	p13.3	0,0432	deleció	Rubinstein-Taybi	<i>TRAP1, CREBBP</i>	11
2	4x	ch3	p25.2	0,15161	duplicació	Noonan	<i>RAF1</i>	10
2	8x	ch3	p25.2	0,07175	duplicació	Noonan	<i>RAF1</i>	18

#### 4.1.3 ASSAIG PER ESBRINAR LA CAPACITAT DE DETECCIÓ DE MOSAICS

Es va dissenyar un assaig a partir de dilucions d'ADN de mostres amb alteracions de còpia, per a obtenir mosaics artificials, per tal de valorar la capacitat de detecció de la tècnica d'arrayCGH.

Amb aquest assaig es plantegen quatre escenaris: en tres d'ells es va investigar la capacitat per detectar mosaics d'aneuploïdia, i en el quart mosaics de microdeleccions i microduplicacions. Tots quatre escenaris es repeteixen alternant els colors dels fluorocroms.

Procediment: En les aneuploïdies es va barrejar una mostra d'ADN extreta de sang amb EDTA, que procedia d'una pacient amb la síndrome de Turner, amb una mostra d'ADN extreta d'un cultiu cel·lular de vellositat corial, en que el resultat del cariotip i QF-PCR, havia estat trisomia 18 i sexe femení. Ambdues mostres es van barrejar a diferents percentatges d'ADN: 80/20; 50/50 i 20/80. Aquests tres mosaïcismes obtinguts artificialment van ser hibridats contra un ADN control.

En les microdeleccions i microduplicacions, es van utilitzar dues mostres, una amb una microdeleció 7q11.2 (Síndrome de Williams-Beuren) i l'altra amb una microduplicació 1q21, diluïdes cadascuna al 50%, les dues mostres diluïdes es van cohibridar. Els resultats s'indiquen en la taula 4.3

**Taula 4.3:** Assaig per determinar el llindar de detecció de mosaïcismes

Array 8 x 60	Mos aic	Descripció i marcatge dels mosaics	Resultats
7 (1_1) (2_1)	1	X0 (50%) +18 (50%) / control X0 (50%) +18 (50%) / control	Detecta monosomia X no detecta trisomia18
7 (1_2) (2_2)	2	X0 (20%) +18 (80%) / control X0 (20%) +18 (80%) / control	Detecta monosomia X i detecta trisomia18
7 (1_3) (2_3)	3	X0 (80%) +18 (20%) / control X0 (80%) +18 (20%) / control	Detecta monosomia X i no detecta trisomia18
7 (1-4) (2_4)	4	W-B(50%) / dup1q21 (50%) W-B(50%) / dup1q21 (50%)	Detecta la deleció 7q11.2 Williams-Beuren i la duplicació 1q21

Notes per a la interpretació: Els percentatges indiquen les dilucions de les mostres, i els colors, els fluorocroms Cy5 (blau) i Cy3 (vermell) amb què han estat marcades.: Per exemple 7 (1\_1) (2\_1) fa referència al setè assaig, (1\_1) localitzacions dins del suport de vidre marcada la mostra del pacient amb color blau i (2\_1) la localització i marcada amb color vermell. (\*) vol dir hibridació en bucle.

#### Breu descripció i interpretació dels resultats:

La monosomia del cromosoma X es va detectar en les tres proves. Per tant es pot afirmar que la tècnica és capaç de detectar un mosaic del 20% o més, en cas de pèrdua de tot un cromosoma.

En el cas de la trisomia del cromosoma 18 diagnosticada per QF-PCR i Cariotip, sols es va detectar el mosaic del 80%. Molt probablement, perquè el teixit de vellositat corial del què s'havia extret l'ADN, incloïa ADN d'origen matern.

En el cas de la microdeleció 7q11 i microduplicació 1q21, van ser detectades per igual amb els dos marcatges. Per tant, es pot afirmar que la tècnica és capaç de detectar tant microdeleccions com microduplicacions en mosaics d'un 50% o superior.

## **4.2 RECERCA DIAGNÒSTICA AMB LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH COM A TÈCNICA DE PRIMERA OPCIÓ (ARRAY FIRST)**

La segona fase consisteix en la recerca diagnòstica amb la tècnica d'arrayCGH. Un dels objectius principals de l'estudi.

Emprant la tècnica d'array-CGH s'han estudiat 1000 mostres d'ADN de pacients afectats de RGD/DI, malformacions congènites i TEA. Posteriorment es van ampliar les indicacions a altres patologies: psiquiàtriques, epilèpsia, talla baixa i altres.

També s'han estudiat algunes mostres d'ADN de familiars, per investigar si les reestructuracions desequilibrades de significat patogènic i incert detectades, havien estat heretades. Aquests estudis han estat realitzats per diferents tècniques, array-CGH, MLPA, cariotip o FISH comercial i a mida, depenent de les característiques de la CNV estudiada.

### 4.2.1 INTERPRETACIÓ DE RESULTATS. PROGRAMARI EASYARRAY I RECURSOS DISPONIBLES A LA WEB

Les noves generacions de microarray s'integren de centenars de milers a milions de sondes, i poden evidenciar desenes de centenars de CNV en un sol individu. Amb una grandària que va d'1kb a diverses megabases (Conrad 2010). En un 10-20% dels pacients amb RGD/DI, malformacions congènites, epilèpsia i TEA és possible identificar CNV clínicament rellevants (Miller et al, 2010). I entre el 4,8 al 9,5% del genoma, incloent uns 100 gens, es pot perdre o duplicar sense produir conseqüències fenotípiques (Zarrei et al., 2015)

La interpretació de patogenicitat o normalitat de les CNV segueix sent difícil i depèn en gran mesura de la comparació amb cohorts de controls sans, bases de dades amb informació sobre CNV clínicament rellevants, i la recerca bibliogràfica (Hehir-Kwa et al., 2013). Una tasca gens menyspreable.

Hem realitzat una recerca extensa dels recursos més útils disponibles de forma lliure a la WEB (Taula 4.4); per tal de facilitar l'avaluació del significat benigne, incert o patogènic de les CNV detectades i el seu contingut gènic. Per aquest motiu hem desenvolupat un programari escrit en els llenguatges de programació Phyton i VisualBasic, que hem denominat "EasyArray".

L'EasyArray contribueix a proporcionar seguretat en la gestió de les mostres i les anomalies detectades. Facilita l'accés a la informació existent a la xarxa. Suggereix una primera classificació de les anomalies i genera part de l'informe clínic.

**Taula 4.4:** Recursos públics disponibles per ajudar a la interpretació de CNV.

Recurs	Enllaç	Valoració
<b>VARIACIÓ NORMAL</b>		
DGV	<a href="http://projects.tcag.ca/variation">http://projects.tcag.ca/variation</a>	Recurs absolutament indispensable. Base de dades que recull els resultats d'un gran nombre d'estudis de individus aparentment normals (controls) en un format normalitzat.
<b>VARIACIÓ PATOGENÈICA</b>		
CAGdb	<a href="http://www.cagdb.org">http://www.cagdb.org</a>	Recurs útil, que acumula un nombre moderat estudis d'array CGH.
Desórdenes genómicos	<a href="https://sites.google.com/site/desordenesgenomicos/">https://sites.google.com/site/desordenesgenomicos/</a>	Molt útil. Recurs que inclou el llistat de síndromes genòmics més extens i detallat disponible actualment de forma lliure.
ECARUCA	<a href="http://www.ecaruca.net">http://www.ecaruca.net</a>	Recurs relativament útil ja que posseeix principalment estudis citogenètics, sent menor el nombre d'estudis d'arrayCGH.
<b>COMBINACIÓ DE VARIACIÓ NORMAL I PATOGENÈICA</b>		
dbVAR	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar</a>	Recurs d'utilitat limitada. Acumula dades de variació amb un contingut adaptat a les mutacions gèniques però poc adaptat a les variacions de còpia.
DECIPHER	<a href="http://decipher.sanger.ac.uk">http://decipher.sanger.ac.uk</a>	Recurs útil. Acumula un gran nombre d'estudis d'arrayCGH, però no tots amb dades fenotípiques. També conté un llistat limitat de síndromes genòmiques.
ISCA CNV	<a href="https://www.iscaconsortium.org">https://www.iscaconsortium.org</a>	Recurs útil. Inclou una valoració manual de la patogenicitat de moltes CNV i gens. El llistat és encara força incomplet
<b>PATOLOGIA GÈNICA</b>		
Gene Distiller	<a href="http://www.genedistiller.org/">http://www.genedistiller.org/</a>	Molt útil. Recurs que recull de forma automàtica gran quantitat d'informació sobre cada gen. Permet la consulta de grups de gens.



La lectura i interpretació dels resultats dels estudis d'array descansen necessàriament en l'ús de programes informàtics especialitzats. Atès l'elevada quantitat de dades obtingudes a partir de l'escanejat d'un array, es fa impossible la detecció manual d'anomalies. Tanmateix la consulta manual de les bases de dades descrites a la taula 4.4 no és senzilla; la qual cosa fa difícil aprofitar tot el seu potencial.

S'han desenvolupat programaris especialitzats comercials i lliures. Per a la interpretació dels arrays de dosi hi han diferents programaris resumits a la taula 4.5.

**Taula 4.5:** Programaris disponibles per la detecció i interpretació de CNV

NOM	UTILITAT	ENLLAÇ
<b>PROGRAMARI COMERCIAL</b>		
Bluefuse (Bluegenome/Illumina)	Detecció i interpretació CNV	<a href="http://www.illumina.com">www.illumina.com</a>
Nexus Copy Number (BioDiscovery/Illumina)	Detecció CNV	<a href="http://www.illumina.com">www.illumina.com</a>
Agilent Genomic Workbench and Cytogenomics (Agilent)	Detecció CNV	<a href="http://www.genomics.agilent.com/">www.genomics.agilent.com/</a>
Cartagenia (Cartagenia /Agilent)	Interpretació CNV	<a href="http://www.cartagenia.com/">www.cartagenia.com/</a>
<b>PROGRAMARI LLIURE</b>		
WaviCGH (CNIO)	Detecció CNV	<a href="http://bioinfo.cnio.es/index.php/services/bioinfotools/21-wavicgh-server-application-for-the-analysis-and-visualization-of-array-cgh-data">http://bioinfo.cnio.es/index.php/services/bioinfotools/21-wavicgh-server-application-for-the-analysis-and-visualization-of-array-cgh-data</a>
Genomic Classification ofCNV Objectively (GeCCO)	Classificació CNV	<a href="http://sourceforge.net/projects/genomeg ecco/files/">http://sourceforge.net/projects/genomeg ecco/files/</a>
CNV-WebStore v2.0	Detecció CNV	<a href="http://cnv-webstore.ua.ac.be/cnv-webstore/">http://cnv-webstore.ua.ac.be/cnv-webstore/</a>

En aquests moments es pot afirmar que la detecció de CNV a partir de les dades crues d'escaneig d'un array està raonablement resolta, i es realitza de forma totalment automàtica, ja sigui pels programaris comercials que acompanyen als lectors d'arrays, com pels recursos accessibles a la xarxa de forma lliure.

La segona part del procés, la interpretació del significat patogènic o de variant de la normalitat de les CNV detectades, és encara un desafiament. S'han realitzat intents de desenvolupar programes de classificació automàtica com GECCO o mètodes de valorar la patogenicitat dels diversos gens (Huang et al., 2010), però la seva fiabilitat és molt limitada. La interpretació de la patogenicitat de les CNV, doncs, es realitza de forma essencialment manual i depèn de la consulta d'un gran nombre de dades i recursos a la WEB. En el nostre cas, l'aplicació de l'estratègia pacient *versus* pacient comporta la complicació addicional d'assignar cada CNV a un dels pacients cohibridats i deduir de quin tipus d'anomalia es tracta.

Hem desenvolupat un conjunt d'utilitats agrupades en el programari anomenat EasyArray que assigna de forma automàtica cadascuna de les CNV detectades en l'estudi d'arrayCGH a un dels pacients de la parella pacient vs pacient cohibridada. Avui per avui les compara amb 41.982,00 duplicacions i 133.386,00 delecions descrites en els estudis de controls (individus aparentment normals, sense patologia) inclosos en *Database of genome variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). El programari EasyArray també compara cadascuna de les CNV amb una base de dades d'elaboració pròpia, amb quasi 200 síndromes de microdeleció / microduplicació (<https://sites.google.com/site/desordenesgenomicos>) i la base de dades de malalties gèniques de UniProt (<http://www.uniprot.org/>). El programari també descriu el contingut gènic i exons afectats per cada CNV amb dades extretes de UCSC *Genome Browser* (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) i facilita la consulta de les bases de dades del consorci ISCA (<https://www.iscaconsortium.org>), *GeneCards* (<http://www.genecards.org>) i *Decipher* (<https://decipher.sanger.ac.uk>).

Finalment, el programa EasyArray facilita la redacció dels informes d'acord amb les recomanacions de l'American College of Medical Genetics (Kearney et al. 2011). Les dades demogràfiques del pacient, fórmula ISCN, classificació manual i contingut gènic de les CNV, paràmetres de qualitat i altres dades són incloses en l'informe de forma totalment automàtica reduint al mínim les possibilitats d'un error de transcripció. El programa genera un informe en format WORD a partir d'una plantilla fàcilment modificable para adaptar l'estètica i distribució a les necessitats de l'usuari.

### 4.2.2 CAPACITAT DIAGNÒSTICA

Emprant la tècnica d'arrayCGH s'han estudiat 1000 mostres d'ADN de pacients afectats de RGD/DI, malformacions congènites MC, trastorns de l'espectre autista TEA. Posteriorment es va ampliar les indicacions a altres patologies psiquiàtriques, epilèpsia, talla baixa i altres alteracions fenotípiques.

S'ha utilitzat la plataforma 8x60K ISCA v2 i emprant l'estratègia d'hibridació pacient vs pacient dissenyada en el laboratori (veure apartat 3.7.3).

S'han detectat desequilibris d'efecte patogènic en un 14% dels pacients (140 / 1.000), en 17 casos s'ha detectat més d'una CNV patogènica. Endemés, s'han detectat desequilibris de significat incert de més de 400Kb (VOUS, de l'anglès *variants of uncertain significance*) en un 6.1% dels pacients (61 / 1.000).

Es va detectar anomalies de còpia patogèniques en un 18,9% dels pacients afectats de RGD / DI (77/406), un 13,7% de les malformacions congènites (54/394), un 9,75% de les patologies psiquiàtriques (16/164), un 7,01% dels casos amb epilèpsia (4/57) i un 13,3% dels casos remesos per talla baixa (14/105). El rendiment diagnòstic va ser del 12,08% (36/298) per a les diverses patologies classificades en la categoria "altres" (incloent-hi dismorfies, fenotips peculiars, miopaties, parèsia, hipercreixement). Dins de les malformacions congènites destaquen les anomalies del sistema nerviós central amb un 14,9% de diagnòstics (16/107) i les cardiopaties congènites amb un 10,6% de diagnòstics (20/188). En el grup de les patologies psiquiàtriques, destaquen els pacients amb TEA, amb un 8.9% (12/134) de diagnòstics (taula 4.6).

**Taula 4.6:** Taxa diagnòstica resultant amb la tècnica d'arrayCGH en relació als diferents fenotips estudiats.

	Total pacients analitzats (n=1.000)	Pacients amb resultat patològic (n=140)	Diagnòstics (%)
* RGD/DI	<b>406</b>	77	18,97
* MALFORMACIONS	<b>394</b>	54	13,71
· CC	188	20	10,64
· SNC	107	16	14,95
*TRASTORNS PSIQUIÀTRICS	<b>164</b>	16	9,76
· TEA	134	12	8,96
* EPILÈPSIA	<b>57</b>	4	7,02
* TALLA BAIXA	<b>105</b>	14	13,33
* ALTRES	<b>298</b>	36	12,08

#### 4.2.2.1 CNV PATOGENIQUES i DE SIGNIFICAT INCERT

De 140 pacients diagnosticats, 121 presentaven una sola CNV de significat patològic (taula 4.7). En 14 casos la CNV patològica anava acompanyada d'una o més CNV de significat incert o VOUS. En 17 casos es va trobar més d'una CNV de significat patològic (taula 4.8). La descripció de les variacions en nombre de còpies (CNV) de significat patològic detectades s'indica a les taules de la 4.7.i 4.8.

En aquestes taules es descriuen les diferents patologies que presentaven els pacients, les CNV detectades, la seva mida, la localització, i en els casos que s'han

pogut fer estudis familiars, si eren heretades o de novo. També s'indiquen amb un asterisc (\*) aquelles CNV que estaven en mosaic. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a : [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

De les 176 CNV incloses a les taules 4.7. i 4.8, 159 eren de significat patogènic, i 17 van ser classificades com a variants de significat incert (VOUS).

### **Detecció d'aneuploïdies**

Es van detectar tres casos d'aneuploïdia (taula 4.9): Trisomia 13 en el pacient número139; trisomia 18 en el pacient 140 (taula 4.8) i una aneuploïdia XXY en el pacient 138, acompanyada d'una deleció en la banda p11.3 d'un dels cromosomes X. Atès que la responsabilitat dels trets fenotípics que presentava el pacient 138 s'atribueixen a la microdeleció i no a la aneuploidia, aquest ha estat inclòs a la taula 4.8.

### **CNV de significat incert (VOUS).**

En 61 pacients s'han detectat CNV de mida  $\geq 400\text{Kb}$  que han estat classificades com a significat incert i, per tant, no ha estat possible diagnosticar-los. A les taules 4.10 es descriuen les diferents patologies que presentaven aquests pacients, les VOUS detectades, la seva mida i localització. En tots ells s'han trobat un total de 68 VOUS, de les quals 49 corresponen a duplicacions i 19 a delecions.

**Taula 4.7:** Casos diagnosticats, als quals se'ls ha detectat **una CNV de significat patogènic (hg19)**. Es senyala amb fons groc les CNV de significat incert. Les CNV en mosaic s'assenyalen amb \*. S'indiquen les diferents patologies que presenten i la tècnica amb la qual s'ha investigat l'herència. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Inici	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
1	H	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del*	1p36.32 - p36.13	5159991	17753699	12,594	de novo	FISH
2	D	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	del	1p31.3	61861221	61870755	0,01	P	aCGH
3	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	dup	1p12	118276487	120520278	2,244	M	cariotip +mar
4	H	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	M	aCGH
5	D	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	dup	1q21.1 - q21.2	145415190	147380935	1,966	M	aCGH
6	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	1q21.1 - q21.2	145799543	147824207	2,025	P	MLPA
7	H	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	dup*	1q21.1 - q32.1	145415190	206794531	61,379	de novo	aCGH
7												del*	5q12.1	60963037	61822100	0,859	de novo	
8	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	1q21.1 - q21.2	146507518	148545520	2,038	P	MLPA
9	H	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	del	1q44	243840526	246992726	3,152	P	FISH
10	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	1q44	244527815	246655416	2,128	de novo	FISH

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
11	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	2p23.1	31750429	31804492	0,054	de novo	aCGH
12	H	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	del	2p16.3	50943382	51251557	0,308	P	aCGH
13	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	2q13	111442130	113065779	1,624	P	FISH
14	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	2q36.3	227985887	228293679	0,308	P	aCGH
15	H	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del	3p26.3 - p25.3	93949	11207135	11,113	de novo	FISH
16	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	3p26.3	232270	2026269	1,794		
17	D	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	del	3p26.3	270649	283052	0,012	P	aCGH
18	H	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	del	3p26.3	286300	312097	0,026	de novo	aCGH
19	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	3p25.2	12633308	12705058	0,072		
20	D	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	del	3p14.2	60331268	62939276	2,608	de novo	FISH
21	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	3q21.3 - q25.32	127982496	158594718	30,612		
22	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	3q29	195682582	197317103	1,635		

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD /DI	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
23	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	3q29	195740357	197317103	1,577		
24	D	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	del	4q28.3 - q31.1	134685014	140498659	5,814	de novo	FISH
25	D	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	del*	5q14.3 - q 21.1	84907187	99715229	14,808	de novo	aCGH
26	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	6p25.3 - p25.2	1529484	2613944	1,084	de novo	aCGH
27	H	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	del	6p24.3 - p22.3	9796651	19501625	9,705		
28	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	6q11.1 - q12	61971892	68656014	6,684	M	aCGH
29	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	6q15 - q21	90341181	113579063	23,238		
30	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	6q16.3 - q21	100755121	108941289	8,186		
31	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	7p21.2 - p21.1	15614415	19870349	4,256	de novo	FISH
32	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	7p21.1 - p15.3	17666324	22006091	4,34	de novo	FISH
33	D	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	7p21.1 - p15.2	20308338	27746299	7,438	de novo	FISH
34	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del	7q11.21 - q11.23	66937687	73533167	6,595	de novo	FISH



Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
35	H	-	+	-	+		+	+	-	-	+	del	7q11.22	68518856	69520566	1,002		
36	H	+	-	-	-		-	-	-	-	-	del	7q11.22	69130237	69433076	0,303	P	aCGH
37	H	-	-	-	-		+	+	-	-	-	dup	7q11.22 - q11.23	72041404	73592052	1,551		
38	D	+	-	-	-		-	-	-	-	+	del	7q11.22 - q11.23	71300290	73283679	1,983	de novo	aCGH
38												del	5q21.1 - q21.2	102693360	104389763	1,696	de novo	FISH
39	H	+	+	-	-		-	-	-	-	+	del	7q36.1 - q36.3	149364045	158110290	8,746	de novo	aCGH
40	D	-	+	+	-		-	-	-	-	-	del	8p23.1	11536598	11805960	0,269	de novo	aCGH
41	D	+	-	-	-		-	-	-	-	-	del	8q23.1 - q24.12	110168284	122271062	12,103		
41												dup	15q11.2 - q12	25623922	26557916	0,934		
42	D	-	-	-	-		-	+	-	-	-	dup	10q22.3 - q23.2	81641918	88940429	7,299	de novo	aCGH
43	H	-	+	-	+		-	-	-	-	-	del	10q26.13 - q26.3	126987600	135434178	8,447	de novo	FISH
44	D	-	-	-	-		-	-	-	-	+	del	11p15.4	9721737	10114144	0,392		

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
44												dup	6q11.1	61971892	62877253	0,905		
45	D	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	del	11p11.2	44301552	44303057	0,002	P	aCGH
46	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	11q24.1	121679782	122984773	1,305	de novo	FISH
47	H	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	dup	12q13.11 - q13.12	48750463	50754724	2,004	de novo	FISH
47												dup	4q23	99086260	99533658	0,447	de novo	FISH
48	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	12q14.3 - q15	65557000	68405256	2,848	de novo	FISH
49	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	12q24.21	116466743	116591442	0,125	de novo	aCGH
49												dup	1q44	248635738	249197762	0,562	M	aCGH
50	D	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	del	13q21.32	67396520	67410693	0,014	M	aCGH
51	D	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	del	13q22.2 - q31.1	76844352	85236228	8,392	de novo	FISH
52	H	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	del	14q21.1q21.2	40733870	43788932	3,055	M	FISH
53	H	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	del	14q22.3	56036325	57701845	1,666	M	FISH

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
54	H	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	del	15q11.2	22765628	23217514	0,452	P	aCGH
55	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	dup	15q11.2 - q13.3	22765628	32195607	9,43	de novo	cariotip
55												dup	9q22.31	95290097	96011338	0,721		
55												dup	14q13.2 - q13.3	36473822	37553115	1,079		
56	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	15q11.2 - q13.1	23656936	28520313	4,863		
57	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	15q11.2 - q13.1	23707452	28520313	4,813		
58	H	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	dup	15q11.2 - q13.1	23707452	28520313	4,813	de novo	FISH
59	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	15q11.2	25360008	25404415	0,044	M	aCGH
60	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	15q21.1 - q22.2	49195141	59898291	10,703		
61	D	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	del	15q25.2 - q25.3	83283503	85728844	2,445		
62	H	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	16p13.3	2953899	5600098	2,646		
62												dup	16p11.2 - p11.1	33773075	35149147	1,376		

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
63	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	16p13.3	3760450	3803649	0,043		
64	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	16p13.3	6087983	6123674	0,036		
65	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	16p13.12 - p13.11	14762239	16525348	1,763		
66	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	dup	16p13.12 - p13.11	14762239	16674321	1,912		
67	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	16p13.11	14910205	16525348	1,615	de novo	
68	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	16p13.11 - p12.3	15404452	18306854	2,902		
69	H	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	dup	16p13.11	15551302	16194578	0,643		
70	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	16p13.11 - p12.3	15551302	18306854	2,756		
71	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	16p11.2	29592783	30190568	0,598	M	aCGH
72	H	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	dup	16p11.2	29592783	30332581	0,74	M	aCGH
73	H	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	del	16p11.2	29673954	30190568	0,517		
74	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	16p11.2	29673954	30190568	0,517		

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
75	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	16p11.2	29673954	30190568	0,517		
75												dup	10q25.1	106776786	107570220	0,793		
75												dup	Xp22.33	187113	750807	0,564		
76	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	16q12.2 - q21	55922943	60313560	4,391	de novo	FISH
77	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	17p12	14111772	15442066	1,33		
78	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	17p11.2	16720871	20294038	3,573	de novo	FISH
79	D	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	del	17q12	34856055	36248918	1,393		
80	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	17q12	34856055	36593257	1,737	de novo	aCGH
81	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	17q21.31	43706886	44138572	0,432	de novo	FISH
82	D	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	dup	17q23.1 - q23.2	58172700	60315303	2,143		
83	H	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	del	18p11.32 - p11.31	2425506	6606548	4,181		
83												del	6q26	163883407	164049532	0,166		

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
84	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del*	18q21.2 - q22.3	51034013	71812396	20,778	de novo	aCGH
84												dup	16p12.1	27194652	27600124	0,405	P	aCGH
85	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	18q21.31 - q22.2	54370433	68956470	14,586		
86	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	del	18q22.3 - q23	70049344	78012829	7,963	de novo	FISH
87	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	18q22.3 - q23	72738259	78012829	5,275	de novo	FISH
87												del	14q12	31911716	32117666	0,206		
88	D	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	del	20q13.12 - q13.13	44833804	48563833	3,73	de novo	FISH
89	D	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	dup(x4)	22q11.1 - q11.21	17397498	18984519	1,587		
90	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18661724	21440514	2,779	P	FISH
90												dup	3q25.1	149861383	151034285	1,173	P	aCGH
91	H	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	del	22q11.21	18894835	21286962	2,392		

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
92	D	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	de novo	FISH
93	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	de novo	FISH
94	H	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	P	FISH
95	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	del	22q11.21	18894835	21464119	2,569	P	MLPA
96	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611		
97	H	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	del*	22q11.21	18894835	21505417	2,611		
98	H	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo	FISH
99	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo	FISH
100	H	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo	FISH
101	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo	MLPA
102	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	del	22q11.21	20754422	21561514	0,807	P	aCGH
103	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21q11.22	21505358	22905068	1,4		

Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
104	H	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	22q11.21q11.22	21505358	22905068	1,4	de novo	FISH
105	D	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	dup	22q11.22q11.23	23012013	23654222	0,642		
106	H	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	dup	22q11.22q11.23	23012013	24959827	1,948		
107	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q12.1q12.2	27802388	30450127	2,648	de novo	FISH
108	D	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	del	22q13.2	42125854	43862086	1,736	de novo	aCGH
108												del	1q42.13	227108696	227859471	0,751	de novo	aCGH
109	D	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	del	22q13.31 - q13.33	48202588	51178264	2,976	de novo	FISH
110	D	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	del	22q13.33	49711443	51178264	1,467	de novo	FISH
111	D	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	Xp22.33 - p22.31	60701	6807794	6,747		
112	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	Xp22.33 - p22.31	60701	8698299	8,638	M	aCGH
113	D	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	Xp22.33	60701	2358165	2,297		



Taula 4.7: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJ	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Inici	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
114	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	Xp22.33	219609	3911921	3,692		
115	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del(nul is)	Xp21.1p11.4x0	36780790	38122588	1,342		
116	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	Xp11.22 - p11.21	51776771	58081470	6,305		
117	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	Xq22.1 - q28	98844705	155197079	56,352		
118	D	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	Xq25 - q26.1	121718742	130280357	8,562	de novo	FISH
119	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	Xq28	149116213	150180007	1,064		
120	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	Xp22.33 or Yp11.32	291285 or 241285	851883 or 801883	0,561		
121	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	Yp11.32	727.799	772429	0,045	P	MLPA

**Taula 4.8** Casos diagnosticats, als quals se'ls ha detectat **més d'una CNV de significat patogènic (hg19)**. Es senyala amb fons groc les CNV de significat incert. amb fons verd una aneuploidia detectada acompanyada d'una CNV de significat patogènic a la que s'atribueix les característiques clíniques diferenciades de les de la síndrome XXY que presentava el pacient. S'indiquen les diferents patologies que presenten. El contingut gènic de les CNV, pot trobar-se a : [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	RGD / DI	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Tipus CNV	Ubicació / Banda	Inici	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
122	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	1p36.32	2694731	3697118	1,002		
122												dup	22q11.21	21081260	21561514	0,48		
122												del	22q11 - q11.22	21957411	22905068	0,948		
123	H	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384		
123												del	1q21.1q21.2	146507518	149232481	2,725		
124	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384		
124												del	1q21.1 - q21.2	146507518	147381411	0,874		
125	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384		
125												del	1q21.1 - q21.2	146507518	147381411	0,874		
125												dup	1q21.2	148867551	149275124	0,408		

Taula 4.8: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DI	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
126	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384		
126												del	2p24.2 - p23.3	18359851	26013473	7,654	de novo	FISH
127	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	dup	1q21.1 - q21.2	145799543	149768855	3,969		
127												del	9q22.32 - q22.33	98233641	101461789	3,228		
127												del	15q11.2	22765628	23082821	0,317		
128	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	2q37.3	241687451	243007359	1,32	P transloc	FISH
128												dup	14q32.33	104913869	107287505	2,374	P transloc	FISH
129	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	2q37.3	241687451	243007359	1,32	P transloc	FISH
129												dup	14q32.33	104913869	107287505	2,374	P transloc	FISH
130	H	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	dup	3q28 - q29	190445912	197837049	7,391		
130												del	11q24.2 - q25	124540224	134868407	10,328	de novo	FISH

Taula 4.8: Continuació

Cas	Sexe	RGD / DI	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Típus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
131	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	dup	6p21.2 - q13	39602129	71377089	31,775		
131												dup	19p13.11 - q13.2	18715895	36185719	17,47		
132	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	del	7p22.3	54185	2361751	2,308	M transloc	FISH
132												dup	21q22.3	43014314	48090317	5,076	M transloc	FISH
133	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	6q22.33 - q23.1	129474013	131172051	1,698		
133												del	7q31.1 - q31.31	108324916	117946257	9,621		
134	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	dup	19p13.3	259395	4334388	4,075		
134												del	21q22.3	45202853	48090317	2,887		
135	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup*	19p12	20760439	24378493	3,618		
135												dup*	19q11 - q13.12	27853207	37274975	9,422		
136	D	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	dup	16q22.1 - q24.3	70188386	90148393	19,96	M transloc	FISH
136												del	Xp22.33 - p22.13	60701	19076560	19,016	M transloc	FISH

**Taula 4.8:** Continuació

Cas	Sexe	RGD / DJI	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Tipus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
137	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	Xq28	149116213	154929279	5,813	de novo	FISH
137												del(nul is)	Yq11.222 - q11.23x0	20826207	28629893	7,804	de novo	FISH
138	H	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	dup XXY amb del	(X)x2.(Y)x1 (Sexe cromosòmic masculí)	Xx2.Y	Sexe cromosòmic masculí	aneuploi dia	de novo	FISH
138												del	Xp11.3	41548417	44961813	3,413	de novo	FISH

**Taula 4.9:** Resultats obtinguts en la fase de recerca diagnòstica. Es detallen casos diagnosticats que presenten aneuploidia

Cas	Sexe	RGD / DJI	MC	CC	Malf. SNC	Altres MC	PSQ	TE A	EPS	TB	Altres	Tipus CNV	Ubicació / Banda	Iníci	FI	Mida (Mb)	Herència	Tècnica
139	H	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Dup (tris)	(13)x3	(chr13)x3	(13)x3	aneuploi dia		
140	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	dup	18p11.32p11.21-18q11.1q23	(chr 18)x3		aneuploi dia		

**De les taules 4.7 a la 4.9 es desprèn :**

- La majoria de les CNV patogèniques detectades són delecions (106/156), la resta (50/156) corresponen a duplicacions.

Pel que fa a les variants de significat incert (VOUS) acompanyants la relació s'inverteix, ja que el nombre de duplicacions (12/17) és el doble que el de delecions (6/17).

- Pel que fa a la mida de les CNV patogèniques oscil·la des de 0,002 Mb a 61,3 Mb.

La de menor grandària correspon a una delecio de la regió 11p11.2 en un pacient amb autisme i discapacitat intel·lectual.

La CNV de més grandària correspon a un pacient amb encefalopatia epilèptica, es tracta d'una duplicació de la regió 1q21.1 a 1q32.1 en mosaic. Mitjançant les tècniques de cariotip i FISH, es va confirmar el mosaic en 1,3 % de limfòcits cultivats.

En general, la mida de les anomalies genètiques amb significació clínica potencial correlaciona bé amb la gravetat del fenotip. Tot i això, hi han excepcions. Ahn i els seus col·laboradors (2013) destaquen exemples que demostren els perills potencials de la utilització de talls arbitraris en el continuïtat-normalitat-patologia. Els autors assenyalen la necessitat de considerar acuradament el contingut genètic de les regions desequilibrades a l'hora d'interpretar els resultats de l'arrayCGH.

En el nostre estudi s'han identificat, el contingut genètic de la regió i les funcions dels gens afectats i la seva possible relació amb la patologia, per tal de arribar a un diagnòstic acurat. Utilitzant les dades de la *Data Genome Browser*, el programa EasyArray, dissenyat en el present estudi, informa automàticament dels gens i exons afectats.

- Pel que fa a recurrència de CNV patogèniques, l'alteració més freqüent va ser la delecio 22q11.21, trobada en 15 casos, dels quals 12 eren proximals, una central i dos distals (22q11.21-q11.22)

La segona CNV patogènica més freqüent la trobem en set casos, amb delecio 1q21.1-q21. En tres dels quals anava acompanyada per la duplicació de la zona TAR (1q21.1)

En tercer lloc les delecions i duplicacions que afecten la regió 16p13.11, trobades en 6 casos, i la regió 15q11.2 trobades en 6 casos més.

Altres alteracions freqüents han estat les delecions i duplicacions de la regió 7q11.22,

16p11.2 i regió pseudoautosòmica PAR1 en 5 casos cadascuna

Cal destacar que les CNV més freqüentment detectades en el nostre estudi coincideixen amb les dades de la literatura (Stankiewicz and Beaudet, 2007; Miller et al. 2010; Weiss et al. 2013; Ahn et al. 2013; Shen et al. 2013; Beaudet 2013; Watson et al. 2014)

### **Estudis familiars**

En els casos de desequilibris cromosòmics identificats per arrayCGH, es recomana un seguiment adequat que pot incloure: estudis citogenètics o un FISH del pacient; estudi dels progenitors; l'avaluació genètica clínica de pacients i progenitors, i l'assessorament genètic.

Atès que moltes CNV patogèniques presenten una expressivitat variable i una penetrància incompleta, és molt important fer un estudi dels progenitors per determinar si la variant és *de novo* o ha estat heretada.

En el present treball s'ha fet l'estudi familiar en 84 CNV patogèniques; 53 eren de novo i 27 heretades (11 d'herència materna i 16 d'herència paterna), generalment d'un progenitor amb menor o nul·la afectació. Depenent de la variant detectada es va aplicar la tècnica de cariotip, FISH, MLPA o arrayCGH.

D'entre les CNV patogèniques heretades que s'han trobat en el present estudi, caldria destacar la deleció 1q21, 15q11.2, i 22q11.2; delecions i duplicacions de 1q21.1q21.2 i 16p11.2. Totes elles alteracions recurrents, que presenten una penetrància incompleta.

La penetrància de la deleció 1q21.1 distal és d'un 36,9%. La de la deleció 15q11.2 és baixa 10,4%. La de les delecions i duplicacions 16p11.2 proximals és 46,8% i 27,2% respectivament (Rosenfeld et al. 2013). En el present estudi, almenys una d'aquestes variants ha estat heretada d'un progenitor no afectat.

Dins les variants patogèniques que poden ser heretades es considera les que afecten a 1q21.1, 1q41.42, 3q29, 15q11.2, 15q13.2q13.3, 16p11.2, 16p13.11 i 22q11.2 (Miller et al. 2010). La majoria dels casos afectant la regió 22q11.21 detectats en la nostra sèrie eren delecions i en aquells casos que havia estat heretada sempre va ser per transmissió paterna (Taules 4.7 i 4.8).

En un cas 90, la pacient presentava una variant patogènica i una de significat incert, ambdues heretades del pare. En el cas 84 es va detectar una variant de significat

incert heretada del pare i una variant de significat patogènic en mosaic no heretada. Altres casos presentaven una variant de significat patogènic de *novo* acompanyada de variant de significat incert heretada d'un progenitor .

Cal destacar tres casos en els que l'estudi dels progenitors va permetre detectar que aquests eren portadors de translocacions recíproques equilibrades:

- Els casos 128 i 129 (taula 4.8) eren germans portadors d'una deleció 2q37.3 i una duplicació 14q32.33. Al fer l'estudi familiar es va descobrir que el pare era portador d'una translocació equilibrada t (2;14).
- El cas 132 (taula 4.8) era portador d'una duplicació 21q22.3 i una deleció 7p22.3. Al fer l'estudi familiar es va descobrir que la mare era portadora d'una translocació equilibrada t (7;21).
- El cas 136 (taula 4.8) que era portador d'una duplicació 16q22.1-q24.3 i una deleció Xp22.33-p22.13. Al fer l'estudi familiar es va descobrir que la mare era portadora d'una translocació equilibrada t (X;16).

Aquests últims resultats reforcen la importància d'ampliar l'estudi als progenitors i especialment en aquells casos portadors d'una deleció i una duplicació ja que poden ser producte de la segregació meiótica d'una translocació equilibrada. L'estudi dels progenitors, no solament permet definir si la CNV és de *novo* o heretada, sinó que també, tal i com s'ha demostrat en el present estudi, permet detectar portadors de translocacions equilibrades, la qual cosa té molta importància per a l'assessorament genètic de la parella i altres familiars, possibles portadors de la translocació.

#### **Detecció de mosaics**

En la nostra sèrie s'ha detectat un total de 7 CNV patogèniques en mosaic (assenyalats amb asterisc a les taules 4.7 i 4.8). Com exemples, podem destacar:

1. una deleció 1p36 de 12.6 Mb en un pacient afectat de cardiopatia congènita. Confirmada mitjançant tècniques de FISH en un 9,8% de les cèl·lules d'un cultiu de sang.
2. una duplicació 1q21.1 - q32.1 de 61.38 Mb en un pacient amb epilèpsia confirmada per cariotip i FISH en un 1,2% de les metafases i
3. una deleció intersticial 18q21.31 - q22.2 de 14,6 Mb en un pacient amb RGD, no detectada pel programa Cytogenomics, però sí present en el gràfic que proporciona el mateix programa, i que es va comptabilitzar en un 43,3% de les metafases analitzades.



En alguns casos es va detectar dues variants de significat patogènic en mosaic (cas 135); o una variant patogènica i una de significat incert, ambdues en mosaic (cas 7).

### **Variants de significat incert (VOUS) en casos no diagnosticats**

A la taula 4.10 s'indiquen els casos en els què s'han detectat únicament variants de significat incert i que, per tant, no han pogut estar diagnosticats.

De les 68 variants detectades la majoria corresponen a duplicacions,

Les variants de significat incert representen un dels majors reptes en el camp dels microarrays. Cada vegada hi ha un nombre més gran de CNV dels que se sospita puguin estar implicats en susceptibilitat a malalties i pels qual es necessita de més dades a nivell poblacional (Zarrei et al. 2015).

**Taula 4.10:** Casos no diagnosticats, en els quals s'ha detectat una CNV de significat incert. S'indiquen les diferents patologies que presenten. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a : [www.genetifiller.org](http://www.genetifiller.org)

Cas	RGD / DI	MC	CC	Malif. SNC	Altres MC	PSQ	TEA	EPS	TB	Altres	TipusCNV	Ubicació / Banda	Inici	Fi	Mida (Mb)
I_1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	1p36.22	10162949	10490014	0,327
I_2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	dup	2p25.3	330817	938774	0,608
I_3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	del	2p25.3	1155607	1577665	0,422
I_4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	del	2p22.3	32677714	33257514	0,580
I_5	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	del	2p16.3	50947670	50999825	0,052
I_6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	del	2p16.3	50870005	51013685	0,144
I_7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	del	2q12.2q12.3	106878050	108403252	1,525
I_8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	2q13	110862477	111328847	0,466
I_9	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	dup	2q21.2	133432043	133924973	0,493
I_10	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	del	2q33.2	203301560	203309912	0,008
I_11	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	dup	3p26.3	232270	1133628	0,901
I_12	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	dup	3p14.1	65657597	66369624	0,712
I_13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	3q26.31q26.32	175105979	175719895	0,614
I_14	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	dup	4q35.2	188908816	190079297	1,170
I_15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	5q13.3q14.1	76807621	77991721	1,184
I_16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	5q12.1	58962510	60108288	1,146
I_17	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	dup	5q22.1	110288558	110742560	0,454

Taula 4.10: Continuació

Cas	RGD / DI	MC	CC	Malif. SNC	Altres MC	PSQ	TEA	EPS	TB	Altres	TipusCNV	Ubicació / Banda	Inici	FI	Mida (Mb)
i_18	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	dup	5q31.1	134875994	135317712	0,442
i_19	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	dup	5q34q35.1	166775563	169001789	2,226
i_20	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	dup	6p25.1p24.3	6913265	7379209	0,466
i_21	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	dup	6q24.3	146934107	147333829	0,400
i_22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	6p12.3	46332172	46708590	0,376
i_23	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	6q11.1	61971892	62877253	0,905
i_24	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	dup	6q27	169281562	169739666	0,458
i_25	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	dup	7p21.1	16877677	17373727	0,496
i_26	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	dup	7p14.1	37343082	38005855	0,663
i_27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	7q32.1	127193664	127632748	0,439
i_28	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	8p23.3	360369	1224927	0,865
i_29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	9p21.2	25902524	26993735	1,091
i_30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	9q31.1	104904147	106381600	1,477
i_31	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	dup	10q22.3	78224874	78878453	0,654
i_32	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	dup	12p12.3	18254240	18913029	0,659
i_33	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	dup	12p12.1	24489327	24937081	0,448
i_34	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	del	12p11.23	27306320	27760152	0,454
i_35	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	dup	12q12	39554802	40009033	0,454
i_36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	12q13.13	52832460	53896357	1,064

Taula 4.10: Continuació

Cas	RGD / DI	MC	CC	Malif. SNC	Altres MC	PSQ	TEA	EPS	TB	Altres	TipusCNV	Ubicació / Banda	Inici	FI	Mida (Mb)
i_37	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	dup	13q34	114550959	115092648	0,542
i_38	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	del	15q22.2 16p13.13 - p13.12	62517156	63004654	0,487
i_39	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	dup		12571576	13142071	0,570
i_40	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	dup	17p13.3	1887379	2548152	0,661
i_41	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	dup	17p11.2 -p11.1	21195549	22205821	1,010
i_42	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	dup	17q21.31	41822815	42363256	0,540
i_43	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	dup	18q21.2	50857607	51285446	0,428
i_44	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	dup	18q21.31	54339868	54816643	0,477
i_45	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	dup	20p12.1	12621277	13936678	1,315
i_46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	22q13.31	45037070	45472837	0,436
i_47	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	dup	Xp22.33	330851	792186	
i_48	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	dup	Xp22.31	7532546	8097511	0,565
i_49	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	dup	Xp22.31	7532546	8097511	0,565
i_50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	Xp22.2	10737858	11141138	0,403
i_51	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	dup	Xp22.13	18609619	19030114	0,420
i_52	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	dup	Xq26.3	136553613	137165435	0,612
i_53	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	dup	Xq28	148770810	149692995	0,922
i_54	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	del	Yq11.223	24371478	25767784	1,396

Taula 4.10: Continuació

Cas	RGD / DI	MC	CC	Malif. SNC	Altres MC	PSQ	TEA	EPS	TB	Altres	TipusCNV	Ubicació / Banda	Inici	FI	Mida (Mb)
i_55	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	1q21.3	153403931	153809551	0,406
i_56	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	6q14.1	76441731	77263110	0,821
i_57	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	del	2p16.1p14	60676037	66448035	5,772
i_58	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	5q14.3	90248898	91477551	1,229
i_59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	3p26.3	1301800	2087270	0,785
i_60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	6q26	162584300	163129723	0,545
i_61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	3q29(	194246923	195160838	0,914
i_62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	Yq11.223	24371478	25383954	1,012
i_63	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	dup	4p16.1	9705669	10252290	0,547
i_64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	16q23.3	82206755	83258139	1,051
i_65	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	dup	5p12p11	45566963	46115086	0,548
i_66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	dup	6p25.1	4745114	5165480	0,420
i_67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	15q26.3	101151174	102383473	1,232
i_68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	del	Xq27.1	138780768	139283477	0,503

#### 4.2.2.2 DESCRIPCIÓ DELS RESULTATS PER FENOTÍPS

Per determinar la distribució de les CNV detectades segons la patologia, hem agrupat les CNV patogèniques en 6 grups: 1. RGD/DI; 2. malformacions congènites; 3. malalties psiquiàtriques; 4. epilèpsia; 5. talla baixa i 6. altres.

Cal destacar que en molts casos una mateixa CNV patogènica estava implicada en diferents manifestacions fenotípiques i/o clíniques.

1. En el **RGD/DI**, s'han detectat 90 CNV patogèniques (taula 4.11), en la majoria dels casos corresponen a les síndromes de microdeleció i microduplicació descrits (Stankiewicz i Beaudet, 2007; Watson et al. 2014; Bartnik et al. 2014).

D'entre les CNV més freqüents en aquest grup es troben les delecions de 22q11.2, 16p11.2 i 16p13.3; duplicacions / delecions 15q11.2-q13.1, 16p13.11. Les delecions 16p11.2 i 16p13.3 han estat associades al trastorn generalitzat del desenvolupament no especificat (*pervasive developmental disorder not otherwise specified*), inclosos dins dels trastorns del espectre autista (Shen et al. 2010)

Destaquem dos casos amb microdeleció 3p26.3 en què es troba implicat el gen *CHL1*, en ambdues de manera parcial i afectant zones exòniques. Els pacients presentaven endemés del RGD malformacions del sistema nerviós central .

En 50 CNV trobades en pacients amb RGD/DI es va poder determinar que 33 eren *de novo* i 11 van ser heretades d'un progenitor. La relació paterna/materna va ser 8:3. En un estudi realitzat per Roselló i col·laboradors (2014) en pacients afectes de RGD/DI. van trobar una proporció 3:1 amb una desviació a favor de la transmissió paterna; els nostres resultats estarien en la mateixa línia.

2. En el grup de **malformacions congènites**, es van detectar 60 CNV patogèniques (taula 4.12.). S'observa un predomini de delecions 22q11.21 que correspon a la síndrome de DiGeorge/ Velocardiofacial. S'explica pel fet que quasi el 50% de les malformacions congènites del nostre estudi eren cardiopaties.

La majoria de CNV detectades associades a malformacions congènites cardiovasculars coincideixen amb les descrites en la revisió de Lalani i col·laboradors (2014).

Les delecions/duplicacions que afecten la regió 1q21.1 han estat relacionades amb cardiopaties congènites, RGD/DI i altres alteracions fenotípiques (Lalani et al. 2014; Bartnik et al. 2014; Nevado et al. 2014). En el nostre estudi s'han detectat 4 duplicacions 1q21.1-q21.2 de les quals dues estaven associades a cardiopatia congènita.

Cal també destacar que les dues CNV que afecten les regions 1q21.1 o 1q21.1-q21.2, a qui se'ls va poder fer l'estudi familiar, procedien d'un o altre progenitor. Aquest fet confirma la baixa penetrància d'aquestes anomalies (Rosenfeld et al. 2013).

En 36 CNV en que es va poder fer l'estudi familiar es va determinar que 22 eren *de novo* i 14 heretades d'un progenitor, la relació paterna/materna va ser 8:6.

3. En el grup de **trastorns psiquiàtrics** diagnosticats, cal destacar que un 80% dels casos corresponien a **TEA**.

S'han detectat 16 CNV patogèniques (taula 4.13), de les quals 12 estaven relacionades amb autisme.

Els resultats es corresponen amb la bibliografia, ja que les anomalies detectades en aquest grup són la delecíó 16p13.3, la duplicació 16p11.2 proximal, que inclou el gen *TBX6* (revisat per Shen et al. 2013). En el nostre cas ha estat heretada de la mare, la qual cosa reforça la baixa penetrància d'aquesta variant (Stefanson et al. 2014).

S'han detectat delecions 22q11.21 proximals, en dos pacients amb trastorns de l'espectre autista. Vortsman i col·laboradors (2006) han proposat que els TEA i altres trastorns psicòtics poden considerar-se com a elements importants en el comportament dels nens afectats per la delecíó 22q11.2.

En un altre cas, s'ha detectat una delecíó 14q21.1 q21.2 de 3 Mb que inclou un únic gen, el gen *LRFN5*, que participa en les sinapsis neuronals.

En 12 CNV a qui es va poder fer l'estudi familiar es va determinar que 5 eren *de novo*, i 7 heretades d'un progenitor. La relació paterna/materna va ser 3:4.

4. **Epilèpsia**. S'han trobat 5 CNV patogèniques (taula 4.14), dos en mosaic i dos són producte de la segregació meiòtica d'una translocació equilibrada present en la mare.

Un dels casos presentava una duplicació en mosaic de 61,379Mb, de la regió 1q21.1q32.1. Dins aquesta regió es troba el gen *CHRNA2*. Mutacions i delecions d'aquest gen s'han trobat associades a un tipus d'epilèpsia (OMIM: 603575); en

alguns casos s'ha descrit duplicacions del gen també amb epilèpsia (Muhle et al. 2010).

Altres alteracions trobades en el present treball també han estat associades amb l'epilèpsia. Així és el cas de la deleció 5q14.3-q15 i la duplicació 16q22.1 (revisat per Nevado et al. 2014). Els nostres resultats confirmen l'impacte de les CNV en l'epilèpsia i aconsellem el seu estudi per arrayCGH pel diagnòstic d'aquesta patologia. En tots els casos diagnosticats es va poder fer l'estudi familiar i es va determinar que totes eren *de novo* excepte les derivades de la segregació meiótica de la translocació materna t(X;16).

**5. Talla baixa.** S'ha pogut diagnosticar un 21,42 % dels casos, trobant-se 14 CNV patogèniques de les quals només 3 afecten el gen *SHOX* (taula 4.15)

Els desequilibris més freqüents relacionats amb talla baixa corresponen a delecions Xp22.3. També hem trobat delecions en autosomes, específicament les delecions 3p26.3, 7p21.1p15.2, 22q11.22q11.23 en pacients que presentaven altres alteracions fenotípiques endemés de talla baixa.

La deleció 12q14.3-q15 es va detectar en una nen (cas 48) que presentava talla baixa i fenotip suggerent de la síndrome de Silver Russell. Una deleció 3p26.3 de 1.794 Mb també es va detectar en un nen amb talla baixa com a única anomalia fenotípica.

En 7 CNV en que es va poder fer l'estudi familiar va determinar que 5 d'elles eren *de novo* i 2 heretades d'un o altre progenitor.

## **6. Altres**

S'ha pogut diagnosticar un 12% dels pacients afectats de diverses patologies classificades en la categoria "altres" (incloent-hi dismòrfies, fenotips peculiars, miopaties, parèsia, hipotonia, hipercreixement). S'ha detectat un total de 55 variants patogèniques (taula 4.16). Les variants patogèniques d'aquest grup es distribueixen de forma similar al total de casos descrits, si tenim en compte que en la majoria dels casos presentaven altres alteracions fenotípiques a més de la que va ser motiu d'estudi d'arrays.

Únicament vuit casos presentaven en el moment de l'estudi una única afectació. En destaquem:

Casos 22 i 23 afectats de dismòrfia facial, presentaven la mateixa deleció 3q29. Delecions i duplicacions d'aquesta regió han estat relacionats amb dismòrfia facial i trastorns psiquiàtrics (revisat per Nevado i col·laboradors, 2014).



El cas 44 amb sospita clínica de la malaltia de Charcot-Marie-Tooth presentava una deleció 11p15.4 de 0.39Mb, que implica els gens *SWAP70* (OMIM 604762), *SBF2* (607697). Defectes en el gen *SBF2* s'associen a la forma recessiva de la malaltia de Charcot-Marie-Tooth 4B2 (OMIM 604563). Es va recomanar seqüenciar el gen *SBF2* a fi de tractar de trobar una probable mutació que en combinació a la deleció trobada justifiquin el fenotip del pacient.

El cas 119, una nena amb diagnòstic clínic de distrofia muscular congènita, presentava una deleció Xq28 de 1.06 Mb. La deleció implica 7 gens, entre ells el gen *MTM1* (OMIM 300415). Mutacions en el gen *MTM1* s'associen a la miopatia centronuclear (miotubular) d'herència recessiva lligada al X (Jungbluth H Orphanet Journal of Rare Diseases 2008, 3:26). Les troballes d'aquest estudi poden explicar el fenotip de la pacient, si s'assumeix una mutació en l'altra còpia del mateix gen, o una inactivació no al atzar del cromosoma X.

El cas 137, un lactant que presentava hipotonia se li va detectar una duplicació d'aproximadament 5.8Mb en Xq28 i una nul·lisomia d'aproximadament 7.8Mb en Yq11.222 - q11.23, classificades com de significat patogènic; ambdues resultats d'una translocació t(X;Y) desequilibrada de novo. La duplicació inclou 113 gens entre els quals destaquen *MECP2* (OMIM 300.005), *GDI1* (OMIM 300.104) i *RAB39B* (OMIM 300.774). Les duplicacions distals de Xq28 incloent el gen *MECP2* en els homes són causa de la síndrome síndrome de Lubs (OMIM 300.260) que sovint s'acompanya de discapacitat intel·lectual severa, retard o absència de la parla, hipotonia, dificultats d'alimentació, predisposició a infeccions, crisis epilèptiques, característiques dins de l'espectre autista, disfunció gastrointestinal i dismorfies facials. Ambdues reestructuracions molt probablement impliquen també la zona pseudoautosòmica (PAR2) però, pel fet que és una regió comuna als cromosomes X i Y, no es registren variacions en el nombre de còpies d'aquesta regió

**Taula 4.11:** Casos diagnosticats en el grup de pacients afectats de RGD/DI. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a : [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	RGD / DI	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
2	D	+	del	1p31.3	61861221	61870755	0,01	P
6	H	+	del	1q21.1 - q21.2	145799543	147824207	2,025	P
9	H	+	del	1q44	243840526	246992726	3,152	P
10	D	+	del	1q44	244527815	246655416	2,128	de novo
11	H	+	del	2p23.1	31750429	31804492	0,054	de novo
13	D	+	del	2q13	111442130	113065779	1,624	P
15	H	+	del	3p26.3 - p25.3	93949	11207135	11,113	de novo
17	D	+	del	3p26.3	270649	283052	0,012	P
18	H	+	del	3p26.3	286300	312097	0,026	de novo
20	D	+	del	3p14.2	60331268	62939276	2,608	de novo
21	H	+	dup	3q21.3 - q25.32	127982496	158594718	30,612	
24	D	+	del	4q28.3 - q31.1	134685014	140498659	5,814	de novo
25	D	+	del*	5q14.3 - q 21.1	84907187	99715229	14,808	de novo
26	D	+	del	6p25.3 - p25.2	1529484	2613944	1,084	de novo
28	D	+	del	6q11.1 - q12	61971892	68656014	6,684	M
29	H	+	del	6q15 - q21	90341181	113579063	23,238	
30	H	+	del	6q16.3 - q21	100755121	108941289	8,186	
31	H	+	dup	7p21.2 - p21.1	15614415	19870349	4,256	de novo
32	D	+	del	7p21.1 - p15.3	17666324	22006091	4,34	de novo

Taula 4.11: Continuació.

Cas	Sexe	RGD / DI	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
33	D	+	del	7p21.1 - p15.2	20308338	27746299	7,438	de novo
34	D	+	del	7q11.21 - q11.23	66937687	73533167	6,595	de novo
36	H	+	del	7q11.22	69130237	69433076	0,303	P
38	D	+	del	7q11.22 - q11.23	71300290	73283679	1,983	de novo
38			del	5q21.1 - q21.2	102693360	104389763	1,696	de novo
39	H	+	del	7q36.1 - q36.3	149364045	158110290	8,746	de novo
41	D	+	del	8q23.1 - q24.12	110168284	122271062	12,103	
41			dup	15q11.2 - q12	25623922	26557916	0,934	
44			dup	6q11.1	61971892	62877253	0,905	
45	D		del	11p11.2	44301552	44303057	0,002	P
46	H	+	del	11q24.1	121679782	122984773	1,305	de novo
47	H	+	dup	12q13.11 - q13.12	48750463	50754724	2,004	de novo
47			dup	4q23	99086260	99533658	0,447	de novo
49	D	+	del	12q24.21	116466743	116591442	0,125	de novo
49			dup	1q44	248635738	249197762	0,562	M
55	D	+	dup	15q11.2 - q13.3	22765628	32195607	9,43	de novo
55			dup	9q22.31	95290097	96011338	0,721	
55			dup	14q13.2 - q13.3	36473822	37553115	1,079	
56	H	+	dup	15q11.2 - q13.1	23656936	28520313	4,863	

Taula 4.11: Continuació.

Cas	Sexe	RGD / DI	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
57	D	+	del	15q11.2 - q13.1	23707452	28520313	4,813	
58	H	+	dup	15q11.2 - q13.1	23707452	28520313	4,813	de novo
59	H	+	dup	15q11.2	25360008	25404415	0,044	M
60	D	+	del	15q21.1 - q22.2	49195141	59898291	10,703	
61	D	+	del	15q25.2 - q25.3	83283503	85728844	2,445	
63	H	+	del	16p13.3	3760450	3803649	0,043	
64	H	+	del	16p13.3	6087983	6123674	0,036	
65	D	+	dup	16p13.12 - p13.11	14762239	16525348	1,763	
67	H	+	del	16p13.11	14910205	16525348	1,615	de novo
68	D	+	dup	16p13.11 - p12.3	15404452	18306854	2,902	
70	H	+	dup	16p13.11 - p12.3	15551302	18306854	2,756	
71	H	+	del	16p11.2	29592783	30190568	0,598	M
74	H	+	dup	16p11.2	29673954	30190568	0,517	
75	D	+	dup	16p11.2	29673954	30190568	0,517	
75			dup	10q25.1	106776786	107570220	0,793	
75			dup	Xp22.33	187113	750807	0,564	
76	D	+	del	16q12.2 - q21	55922943	60313560	4,391	de novo
77	H	+	dup	17p12	14111772	15442066	1,33	
78	D	+	dup	17p11.2	16720871	20294038	3,573	de novo

Taula 4.11: Continuació.

Cas	Sexe	RGD / DI	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
79	D	+	del	17q12	34856055	36248918	1,393	
80	H	+	dup	17q12	34856055	36593257	1,737	de novo
81	H	+	del	17q21.31	43706886	44138572	0,432	de novo
82	D	+	dup	17q23.1 - q23.2	58172700	60315303	2,143	
83	H	+	del	18p11.32 - p11.31	2425506	6606548	4,181	
83			del	6q26	163883407	164049532	0,166	
84	D	+	del*	18q21.2 - q22.3	51034013	71812396	20,778	de novo
84			dup	16p12.1	27194652	27600124	0,405	P
85	H	+	del	18q21.31 - q22.2	54370433	68956470	14,586	
87	D	+	del	18q22.3 - q23	72738259	78012829	5,275	de novo
87			del	14q12	31911716	32117666	0,206	
88	D	+	del	20q13.12 - q13.13	44833804	48563833	3,73	de novo
90	D	+	del	22q11.21	18661724	21440514	2,779	P
90			dup	3q25.1	149861383	151034285	1,173	P
92	D	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	de novo
96	H	+	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	
101	H	+	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo
103	H	+	del	22q11.21q11.22	21505358	22905068	1,4	
104	H	+	del	22q11.21q11.22	21505358	22905068	1,4	de novo

Taula 4.11: Continuació.

Cas	Sexe	RGD / DI	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
105	D	+	dup	22q11.22q11.23	23012013	23654222	0,642	
106	H	+	dup	22q11.22q11.23	23012013	24959827	1,948	
107	D	+	del	22q12.1q12.2	27802388	30450127	2,648	de novo
114	D	+	del	Xp22.33	219609	3911921	3,692	
122	H	+	del	1p36.32	2694731	3697118	1,002	
122			dup	22q11.21	21081260	21561514	0,48	
122			del	22q11 - q11.22	21957411	22905068	0,948	
125	H	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	
125			del	1q21.1 - q21.2	146507518	147381411	0,874	
125			dup	1q21.2	148867551	149275124	0,408	
126	D	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	
126			del	2p24.2 - p23.3	18359851	26013473	7,654	de novo
127	D	+	dup	1q21.1 - q21.2	145799543	149768855	3,969	
127			del	9q22.32 - q22.33	98233641	101461789	3,228	
127			del	15q11.2	22765628	23082821	0,317	
128	D	+	del	2q37.3	241687451	243007359	1,32	P transloc
128			dup	14q32.33	104913869	107287505	2,374	P transloc

Taula 4.11: Continuació.

Cas	Sexe	RGD / DI	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
129	D	+	del	2q37.3	241687451	243007359	1,32	P transloc
129			dup	14q32.33	104913869	107287505	2,374	P transloc
130	H	+	dup	3q28 - q29	190445912	197837049	7,391	
130			del	11q24.2 - q25	124540224	134868407	10,328	de novo
133	D	+	dup	6q22.33 - q23.1	129474013	131172051	1,698	
133			del	7q31.1 - q31.31	108324916	117946257	9,621	
134	D	+	dup	19p13.3	259395	4334388	4,075	
134			del	21q22.3	45202853	48090317	2,887	
135	H	+	dup*	19p12	20760439	24378493	3,618	
135			dup*	19q11 - q13.12	27853207	37274975	9,422	
136	D	+	dup	16q22.1 - q24.3	70188386	90148393	19,96	M transloc
136			del	Xp22.33 - p22.13	60701	19076560	19,016	M transloc

**Taula 4.12:** Casos diagnosticats en el grup de pacients amb afectats de malformacions congènites, es detallen en subgrups de cardiopatia congènita, malformacions del sistema nerviós central i d'altres malformacions. El contingut gènic de les CNV es pot trobar a : [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	MC	CC	Malf SNC	Altres MC	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
1	H	+	+	-	-	del*	1p36.32 - p36.13	5159991	17753699	12,594	de novo
2	D	+	-	+	-	del	1p31.3	61861221	61870755	0,01	P
3	D	+	-	-	+	dup	1p12	118276487	120520278	2,244	M
4	H	+	-	+	-	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	M
5	D	+	-	+	-	dup	1q21.1 - q21.2	145415190	147380935	1,966	M
7	H	+	-	+	-	dup*	1q21.1 - q32.1	145415190	206794531	61,379	de novo
7						del *	5q12.1	60963037	61822100	0,859	de novo
8	D	+	+	-	-	dup	1q21.1 - q21.2	146507518	148545520	2,038	P
9	H	+	-	-	+	del	1q44	243840526	246992726	3,152	P
15	H	+	+	-	-	del	3p26.3 - p25.3	93949	11207135	11,113	de novo
17	D	+	-	+	-	del	3p26.3	270649	283052	0,012	P
18	H	+	-	+	-	del	3p26.3	286300	312097	0,026	de novo
19	D	+	+	-	-	dup	3p25.2	12633308	12705058	0,072	
24	D	+	-	+	-	del	4q28.3 - q31.1	134685014	140498659	5,814	de novo
27	H	+	-	-	+	del	6p24.3 - p22.3	9796651	19501625	9,705	
34	D	+	+	-	-	del	7q11.21 - q11.23	66937687	73533167	6,595	
35	H	+	-	+		del	7q11.22	68518856	69520566	1,002	de novo
39	H	+	-	-	+	del	7q36.1 - q36.3	149364045	158110290	8,746	de novo
40	D	+	+	-	-	del	8p23.1	11536598	11805960	0,269	de novo
43	H	+	-	+	-	del	10q26.13 - q26.3	126987600	135434178	8,447	de novo



Taula 4.12: Continuació

Cas	Sexe	MC	CC	Malf SNC	Altres MC	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
47	H	+	+	-	-	dup	12q13.11 - q13.12	48750463	50754724	2,004	de novo
51	D	+	-	+	+	del	13q22.2 - q31.1	76844352	85236228	8,392	de novo
53	H	+	-	-	+	del	14q22.3	56036325	57701845	1,666	M
55	D	+	+	-	-	dup	15q11.2 - q13.3	22765628	32195607	9,43	de novo
55						dup	9q22.31	95290097	96011338	0,721	
55						dup	14q13.2 - q13.3	36473822	37553115	1,079	
61	D	+	-	-	+	del	15q25.2 - q25.3	83283503	85728844	2,445	
62	H	+	+	-	-	dup	16p13.3	2953899	5600098	2,646	
62						dup	16p11.2 - p11.1	33773075	35149147	1,376	
66	D	+	-	-	+	dup	16p13.12 - p13.11	14762239	16674321	1,912	
73	H	+	-	+	-	del	16p11.2	29673954	30190568	0,517	
79	D	+	-	-	+	del	17q12	34856055	36248918	1,393	
82	D	+	-	+	-	dup	17q23.1 - q23.2	58172700	60315303	2,143	
83	H	+	-	+	-	del	18p11.32 - p11.31	2425506	6606548	4,181	
83						del	6q26	163883407	164049532	0,166	
84						dup	16p12.1	27194652	27600124	0,405	P
86	D	+	-	-	+	del	18q22.3 - q23	70049344	78012829	7,963	de novo
88	D	+		-	+	del	20q13.12 - q13.13	44833804	48563833	3,73	de novo
89	D	+	+	-	+	dup(x4)	22q11.1 - q11.21	17397498	18984519	1,587	
90	D	+	+	-	-	del	22q11.21	18661724	21440514	2,779	P
90						dup	3q25.1	149861383	151034285	1,173	P

Taula 4.12: Continuació

Cas	Sexe	MC	CC	Malf SNC	Altres MC	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
91	H	+	+	-		del	22q11.21	18894835	21286962	2,392	
92	D	+	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	de novo
94	H	+	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	P
95	D	+	+	-	-	del	22q11.21	18894835	21464119	2,569	P
98	H	+	+	-	-	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo
99	D	+	-	-	-	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo
100	H	+	+	-	-	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo
102	D	+	+	-	-	del	22q11.21	20754422	21561514	0,807	P
105	D	+	-	-	+	dup	22q11.22q11.23	23012013	23654222	0,642	
108	D	+	-	+	-	del	22q13.2	42125854	43862086	1,736	de novo
108						del	1q42.13	227108696	227859471	0,751	de novo
116	D	+	+	-	-	dup	Xp11.22 - p11.21	51776771	58081470	6,305	
123	H	+	-	-	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	
123						del	1q21.1q21.2	146507518	149232481	2,725	
127	D	+	+	-	-	dup	1q21.1 - q21.2	145799543	149768855	3,969	
127						del	9q22.32 - q22.33	98233641	101461789	3,228	
127						del	15q11.2	22765628	23082821	0,317	
130	H	+	+	-	-	dup	3q28 - q29	190445912	197837049	7,391	
130						del	11q24.2 - q25	124540224	134868407	10,328	de novo

**Taula 4.12:** Continuació

Cas	Sexe	MC	CC	Malf SNC	Altres MC	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
131	D	+	-	-	+	dup	6p21.2 - q13	39602129	71377089	31,775	
131						dup	19p13.11 - q13.2	18715895	36185719	17,47	
132	D	+	-	-	+	del	7p22.3	54185	2361751	2,308	M
132						dup	21q22.3	43014314	48090317	5,076	M
134	D	+	+	-	-	dup	19p13.3	259395	4334388	4,075	
134						del	21q22.3	45202853	48090317	2,887	
138	H	+	-	+	-	dup XXY amb del	(X)x2.(Y)x1	Xx2.Y	X x 2Y	aneuploidi a	de novo
138						del	Xp11.3	41548417	44961813	3,413	de novo
139	H	+	-	-	+	dup(tris)	(13)x3	(chr13)x3	(13)x3	aneuploidi a	
140	D	+	-	-	+	dup	18p11.32p11.21-18q11.1q23	(chr 18)x3		aneuploidi a	

**Taula 4.13:** Casos diagnosticats en el grup de pacients afectats de trastorns psiquiàtics. Es detalla el subgrup de trastorns de l'espectre autista. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a: [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	PSQ	TEA	TipusCNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
4	H	+	-	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	M
12	H	+	+	del	2p16.3	50943382	51251557	0,308	P
20	D	+	-	del	3p14.2	60331268	62939276	2,608	de novo
35	H	+	+	del	7q11.22	68518856	69520566	1,002	
37	H	+	+	dup	7q11.22 - q11.23	72041404	73592052	1,551	
42	D	+	+	dup	10q22.3 - q23.2	81641918	88940429	7,299	de novo
45	D	+	+	del	11p11.2	44301552	44303057	0,002	P
50	D	+	+	del	13q21.32	67396520	67410693	0,014	M
52	H	+	-	del	14q21.1q21.2	40733870	43788932	3,055	M
58	H	+	+	dup	15q11.2 - q13.1	23707452	28520313	4,813	de novo
69	H	+	+	dup	16p13.11	15551302	16194578	0,643	
72	H	+	+	dup	16p11.2	29592783	30332581	0,74	M
94	H	+	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	P
97	H	+	+	del*	22q11.21	18894835	21505417	2,611	
109	D	+	-	del	22q13.31 - q13.33	48202588	51178264	2,976	de novo
110	D	+	+	del	22q13.33	49711443	51178264	1,467	de novo

**Taula 4.14:** Casos diagnosticats en el grup de pacients afectats d'epilèpsia. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a : [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	EPS	TipusCNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
7	H	+	dup*	1q21.1 - q32.1	145415190	206794531	61.379	de novo
7			del *	5q12.1	60963037	61822100	0.859	de novo
24	D	+	del	4q28.3 - q31.1	134685014	140498659	5.814	de novo
25	D	+	del*	5q14.3 - q21.1	84907187	99715229	14.808	de novo
136	D	+	dup	16q22.1 - q24.3	70188386	90148393	19.96	M transloc
136			del	Xp22.33 - p22.13	60701	19076560	19.016	M transloc

**Taula 4.15:** Es detallen els casos diagnosticats en el grup de pacients afectats de talla baixa. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a : [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	TB	TipusCNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
16	H	+	del	3p26.3	232270	2026269	1.794	
33	D	+	del	7p21.1 - p15.2	20308338	27746299	7.438	de novo
48	H	+	del	12q14.3 - q15	65557000	68405256	2.848	de novo
104	H	+	del	22q11.21q11.22	21505358	22905068	1.4	de novo
106	H	+	dup	22q11.22q11.23	23012013	24959827	1.948	
110	D	+	del	22q13.33	49711443	51178264	1.467	de novo
111	D	+	del	Xp22.33 - p22.31	60701	6807794	6.747	
112	H	+	del	Xp22.33 - p22.31	60701	8698299	8.638	M
113	D	+	del	Xp22.33	60701	2358165	2.297	
115	H	+	del(nulis)	Xp21.1p11.4x0	36780790	38122588	1.342	
118	D	+	del	Xq25 - q26.1	121718742	130280357	8.562	de novo
120	H	+	del	Xp22.33 or	291285	851883	0.561	
121	H	+	del	Xp22.33	777799	822429	0.045	P
124	H	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0.384	
124			del	1q21.1 - q21.2	146507518	147381411	0.874	

**Taula 4.16:** Casos diagnosticats en el grup de pacients afectats d'altres patologies. Es detallen les demés manifestacions clíniques acompanyants. El contingut gènic de les CNV, es pot trobar a : [www.genetistiller.org](http://www.genetistiller.org)

Cas	Sexe	RGD/DI	MC	CC	Malif SNC	Altres MC	EP	TEA	EPILE PSIA	TB	ALTRES	Típus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
1	H	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del*	1p36.32 - p36.13	5159991	17753699	12,594	de novo
3	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	dup	1p12	118276487	120520278	2,244	M
4	H	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	M
5	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	1q21.1 - q21.2	145415190	147380935	1,966	M
8	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	1q21.1 - q21.2	146507518	148545520	2,038	P
9	H	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	del	1q44	243840526	246992726	3,152	P
11	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	2p23.1	31750429	31804492	0,054	de novo
13	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	2q13	111442130	113065779	1,624	P
14	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	2q36.3	227985887	228293679	0,308	P
15	H	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del	3p26.3 - p25.3	93949	11207135	11,113	de novo
17	D	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	del	3p26.3	270649	283052	0,012	P

**Taula 4.16:** Continuació

## Resultats

Cas	Sexe	RGD/DI	MC	CC	Malif SNC	Altres MC	EP	TEA	EPILE PSIA	TB	ALTRES	Típus CNV	Ubicació	Inici	FI	Mida (Mb)	Herència
18	H	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	del	3p26.3	286300	312097	0,026	de novo
19	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	3p25.2	12633308	12705058	0,072	
21	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	3q21.3 - q25.32	127982496	158594718	30,612	
22	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	3q29	195682582	197317103	1,635	
23	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	3q29	195740357	197317103	1,577	
26	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	6p25.3 - p25.2	1529484	2613944	1,084	de novo
27	H	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	del	6p24.3 - p22.3	9796651	19501625	9,705	
28	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	6q11.1 - q12	61971892	68656014	6,684	M
30	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	6q16.3 - q21	100755121	108941289	8,186	
31	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	7p21.2 - p21.1	15614415	19870349	4,256	de novo
34	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del	7q11.21 - q11.23	66937687	73533167	6,595	de novo
35	H	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	del	7q11.22	68518856	69520566	1,002	



## Resultats

**Taula 4.16:** Continuació

Cas	Sexe	RGD/DI	MC	CC	Malif SNC	Altres MC	EP	TEA	EPILE PSIA	TB	ALTRES	Tipus CNV	Ubicació	Inici	FI	Mida (Mb)	Herència
38	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	7q11.22 - q11.23	71300290	73283679	1,983	de novo
38												del	5q21.1 - q21.2	102693360	104389763	1,696	de novo
39	H	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	del	7q36.1 - q36.3	149364045	158110290	8,746	de novo
44	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	11p15.4	9721737	10114144	0,392	
44												dup	6q11.1	61971892	62877253	0,905	
50	D	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	del	13q21.32	67396520	67410693	0,014	M
51	D	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	del	13q22.2 - q31.1	76844352	85236228	8,392	de novo
54	H	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	del	15q11.2	22765628	23217514	0,452	P
56	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	15q11.2 - q13.1	23656936	28520313	4,863	
60	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	15q21.1 - q22.2	49195141	59898291	10,703	
62	H	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	16p13.3	2953899	5600098	2,646	
66	D	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	dup	16p13.12 - p13.11	14762239	16674321	1,912	

Taula 4.16: Continuació

Cas	Sexe	RGD/DI	MC	CC	Malif SNC	Altres MC	EP	TEA	EPILE PSIA	TB	ALTRES	Tipus CNV	Ubicació	Inici	FI	Mida (Mb)	Herència
71	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	16p11.2	29592783	30190568	0,598	M
77	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	17p12	14111772	15442066	1,33	
81	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	17q21.31	43706886	44138572	0,432	de novo
82	D	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	dup	17q23.1 - q23.2	58172700	60315303	2,143	
87	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	18q22.3 - q23	72738259	78012829	5,275	de novo
87												del	14q12	31911716	32117666	0,206	
90	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18661724	21440514	2,779	P
92	D	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	de novo
93	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21440514	2,546	de novo
97	H	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	del*	22q11.21	18894835	21505417	2,611	
99	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo
101	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21	18894835	21505417	2,611	de novo
103	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q11.21q11.22	21505358	22905068	1,4	

Taula 4.16: Continuació

Cas	Sexe	RGD/DI	MC	CC	Malif SNC	Altres MC	EP	TEA	EPILE PSIA	TB	ALTRES	Tipus CNV	Ubicació	Inici	FI	Mida (Mb)	Herència
107	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	22q12.1q12.2	27802388	30450127	2,648	de novo
109	D	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	del	22q13.31 - q13.33	48202588	51178264	2,976	de novo
114	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	Xp22.33	219609	3911921	3,692	
116	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	dup	Xp11.22 - p11.21	51776771	58081470	6,305	
117	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	Xq22.1 - q28	98844705	155197079	56,352	
119	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	del	Xq28	149116213	150180007	1,064	
123	H	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	
123												del	1q21.1q21.2	146507518	149232481	2,725	
124	H	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	
124												del	1q21.1 - q21.2	146507518	147381411	0,874	
125	H	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	dup	1q21.1	145415190	145799602	0,384	
125												del	1q21.1 - q21.2	146507518	147381411	0,874	
125												dup	1q21.2	148867551	149275124	0,408	

Taula 4.16: Continuació

Cas	Sexe	RGD/DI	MC	CC	Malif SNC	Altres MC	EP	TEA	EPILE PSIA	TB	ALTRES	Tipus CNV	Ubicació	Inici	Fi	Mida (Mb)	Herència
135	H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup*	19p12	20760439	24378493	3,618	
135												dup*	19q11 - q13.12	27853207	37274975	9,422	
137	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	dup	Xq28	149116213	154929279	5,813	de novo
137												del(nul is)	Yq11.222 - q11.23x0	20826207	28629893	7,804	de novo



### **4.3 EFICIÈNCIA DE L'ARRAY-CGH COM A TÈCNICA DE PRIMERA OPCIO DIAGNÒSTICA. ANÀLISI DE COSTOS SEGONS PROTOCOLS I ESTRATÈGIES D'HIBRIDACIÓ**

El cost d'un arrayCGH supera al del cariotip. Segons Cigudosa i els seus col·laboradors el cost de l'array és de 355,39€ en vers 121,55€ del cariotip (2012). Malgrat tot, l'arrayCGH és més eficient en el diagnòstic de discapacitats de l'aprenentatge o intel·lectuals i o malformacions congènites, atès el seu major rendiment diagnòstic. Així doncs, si els arrays s'apliquessin en primera opció evitaria l'ús d'un nombre significatiu d'altres tècniques diagnòstiques actuals, la qual cosa milloraria la seva rendibilitat. Després d'estudiar mil pacients on s'assumeix que l'arrayCGH ha detectat la totalitat de les anomalies desequilibrades (CNV) clínicament rellevants, l'estudi vol fer palesa que el seu cost és competitiu si el comparem amb les tècniques habituals.

Per tal de comparar la taxa diagnòstica i el cost de les diferents tècniques en la població estudiada, varem fer el que segueix: en primer lloc un citogenetista expert va revisar totes les anomalies detectades amb la tècnica d'arrayCGH, a fi de determinar quines d'aquestes hauria diagnosticat amb la tècnica de cariotip convencional; anomalies de més de 6Mb (Vermeesch et al. 2007) i amb un patró de bandes jutjat com a suficient per a ser detectades per microscòpia òptica. De la resta, i en segon lloc es va estudiar quines anomalies haurien estat detectades per MLPA subtelomèriques (P070 , MRC Holland, Països Baixos), i MLPA de síndromes recurrents (P245 i P297, MRC Holland, Països Baixos). Per a l'anàlisi de costos s'han utilitzat els descrits per prova del concens espanyol per a la implementació dels arrays en la genètica clínica (Cigudosa et al. 2012), on inclouen costos de personal i amortització d'equipaments a set anys.

Els estudis de cariotip, i l'MLPA (dos kits de trastorns genòmics recurrents i un d'anomalies subtelomèriques) per al diagnòstic de RGD/DI i/o malformacions congènites per una banda, i la tècnica de l'array per l'altra assenyalen, en aquest ordre, les tres opcions diagnòstiques que són d'aplicació segons el protocol actual i que donarien el següent resultat i cost associat:

- 12 pacients diagnosticats amb la tècnica de cariotip (primera línia o opció diagnòstica), i

- 31 pacients més, diagnosticats amb la tècnica de MLPA (segona línia o opció diagnòstica)

Fins aquí, s'haurien diagnosticat 43 dels 140 pacients (30,7% dels diagnosticats amb arrayCGH) acumularien un cost de aproximat de 362.000€ (1.000 cariotips + 988 MLPA).

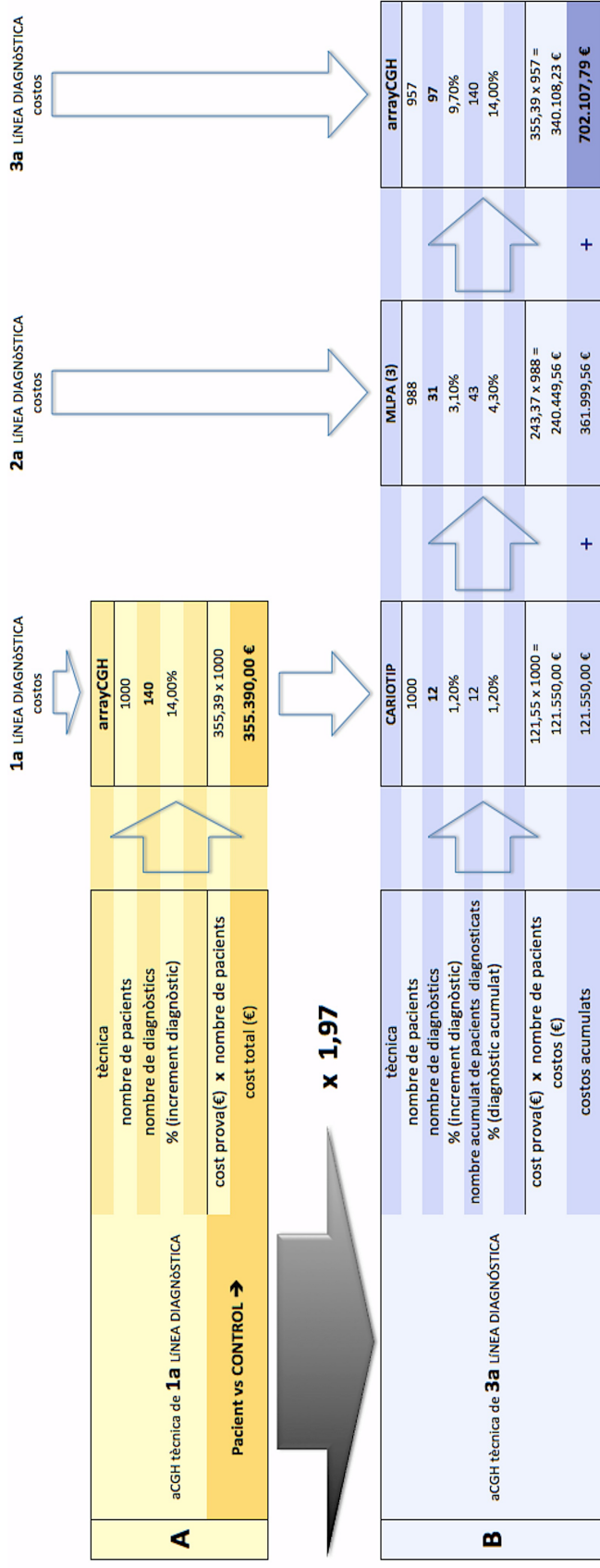
- Quedaria per afegir 340.108,23€ corresponents al cost dels estudis d'array (3a línia o opció diagnòstica) que s'aplicarien als 957 pacients pendents de diagnosticar per arribar a 140 pacients diagnosticats.

El cost acumulat d'aplicar successivament les tres tècniques seguint el protocol actual seria de 702.107 € (fig.4.3).

L'estudi dels mateixos pacients utilitzant l'arrayCGH com a primera i única opció seria de 355.390 €.

Queda provat que l'ús del cariotip i l'MLPA només aconseguiria un 30,71% (43/140) dels diagnòstics aconseguits amb l'estudi d'arrayCGH. Així doncs, aplicar les tres tècniques quasi duplica (x1,97) el cost d'emprar la tècnica d'array com a primera i única opció (fig.4.3).

Fins aquí, i pel que fa la tècnica dels arrays, els càlculs són el resultat d'aplicar una estratègia d'hibridació **pacient versus control** (fig 4.3).



**Figura 4.3: En groc (A):** Càlcul del cost de l'ús de l'arrayCGH com a primera opció, utilitzant l'estratègia d'hibridació estàndard pacient vs control. **En blau (B):** L'ús de l'array com a tercera opció, després del cariotip i l'MLPA. L'enfocament tradicional de cariotip i MLPA hagués aconseguit menys d'un terç dels diagnòstics en la nostra població (43/140). Implementar l'array per aconseguir el 100% dels desequilibris multiplica per 1,97 el cost que suposaria aplicar l'array com a primera i única opció (en groc).



4.2.3.1 CÀLCULS DE COSTOS SEGONS PROTOCOL UTILITZANT L'ESTRATÈGIA D'HIBRIDACIÓ **PACIENT VERSUS PACIENT + MLPA TGR**

En cas d'aplicar el'estratègia d'hibridació proposada: **pacient versus pacient + MLPA de transtorns genòmics recurrents** (en la meitat dels pacients), l'eficiència s'incrementa.

En aquest cas, aplicar les tres tècniques seguint el protocol tradicional o estàndard (en blau en les fig de 4.3, 4.5 i 4.6) multiplica x 2,76 els costos en el nostre cas, en que hem utilitzat un sol kit de MLPA de TGR, de disseny particular (fig 4.4 i 4.5).

El punt clau en la reducció de costos és la utilització de l'estratègia pacient vs pacient, en que el cost passa a reduir-se aproximadament a la meitat. Amb el mateix temps de treball dels professionals, i mateix material fungible (suport de vidre amb 8 arrays, i reactius per 16 mostres: 8 pacients i 8 controls) es passa d'estudiar 8 pacients a poder estudiar-ne 16.

Els costos reals de l'estudi dels 1000 pacients, realitzat en el laboratori de l'Àrea de Genètica clínica i Medicina molecular de l'Hospital de la Vall d'Hebron ha estat de 253.971,69€. (fig.4.4)

Es a dir, hem realitzat l'estudi de 1000 pacients rebaixant els costos 2,76 vegades. (fig.4.5)

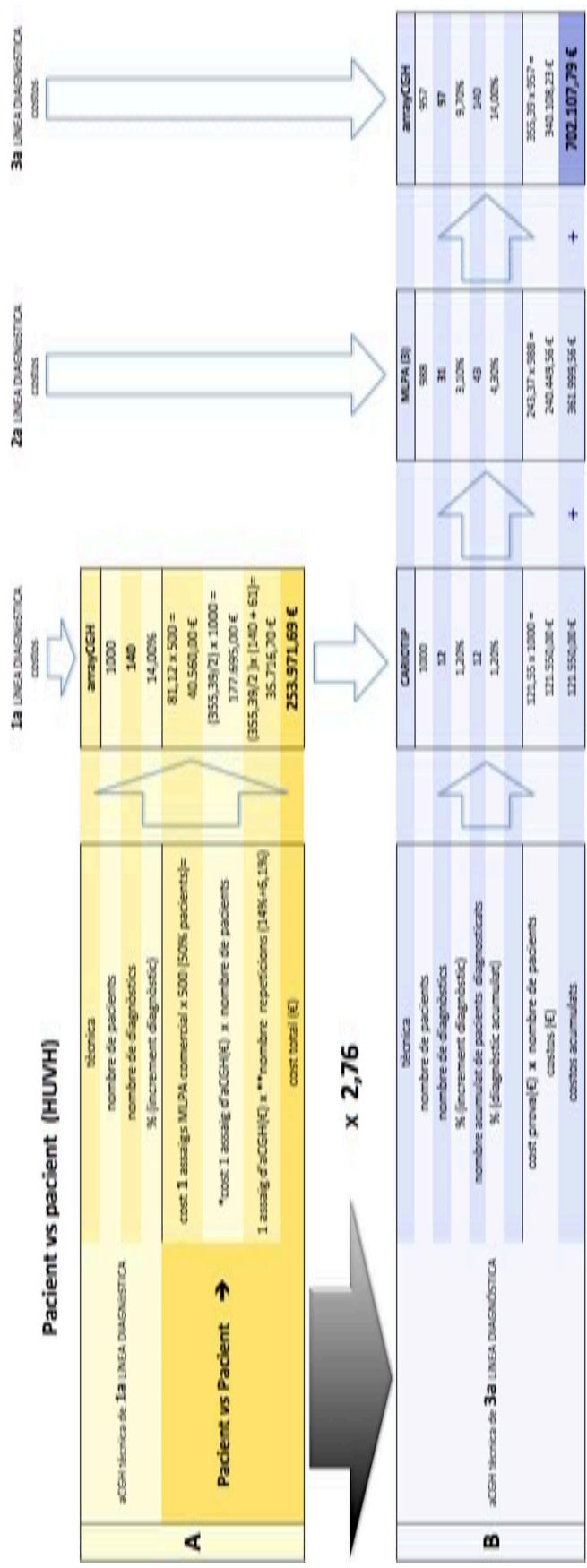
En el cas d'utilitzar dos kits de MLPA comercial, els costos es reduïrien 2,38 vegades (fig 4.6)

Pacient vs pacient (HUVH)		1a LINEA DIAGNÒSTICA costos
A	aCGH tècnica de 1a LINEA DIAGNÒSTICA	tècnica
		nombre de pacients
		nombre de diagnòstics
		% (increment diagnòstic)
	<b>Pacient vs Pacient →</b>	cost 1 assaigs MLPA comercial x 500 (50% pacients)=
		*cost 1 assaig d'aCGH(€) x nombre de pacients
		1 assaig d'aCGH(€) x **nombre repeticions (14%+6,1%)
	cost total (€)	arrayCGH
		1000
		140
		14,00%
		81,12 x 500 =
		40.560,00 €
		(355,39/2) x 1000 =
		177.695,00 €
		(355,39/2) x (140 + 61)=
		35.716,70 €
		<b>253.971,69 €</b>

**Figura 4.4:** Càlcul de costos del estudi d'arrayCGH realitzat a 1000 pacients en el laboratori de l'Àrea de Genètica clínica i Medicina molecular de l'Hospital de la Vall d'Hebron.

\*el cost d'un assaig d'aCGH per pacient en l'estratègia pacient versus pacient passa a reduir-se a la meitat, o sigui 177,695 €

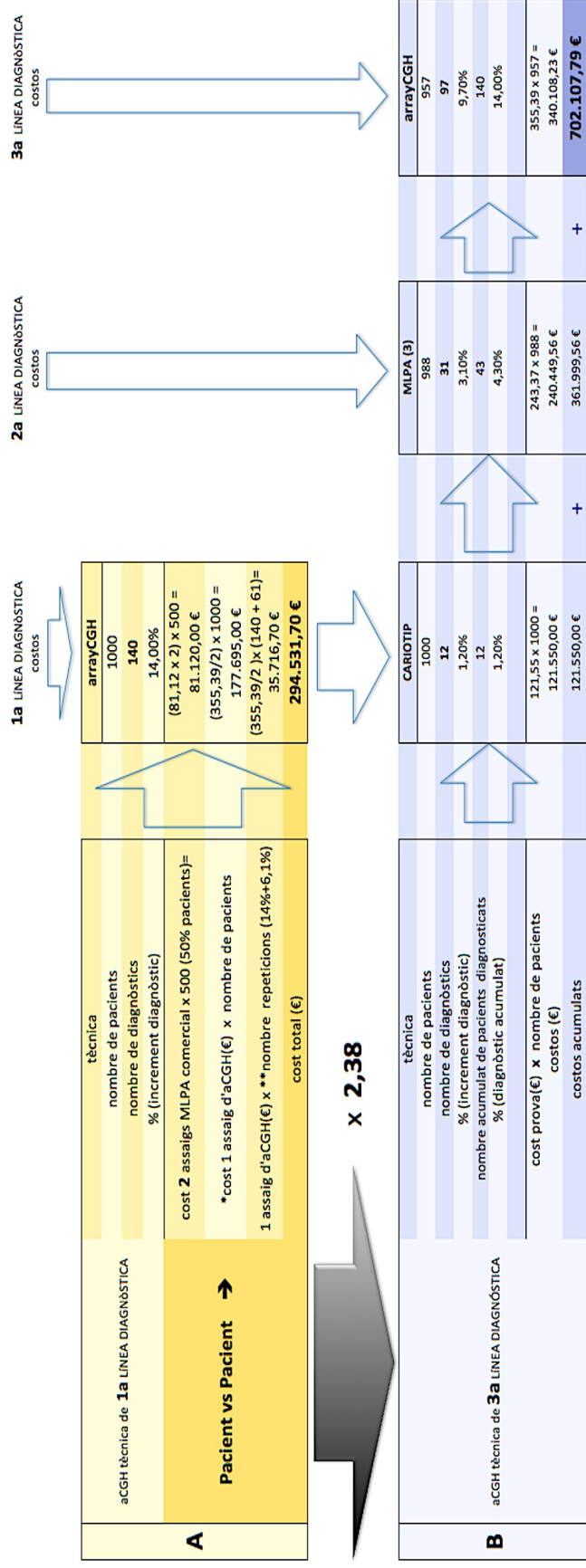
\*\* Protocol A no en tots els casos es repetirà un array, donat que hi han casos que s'hauran diagnosticat per MLPA. Aquí aquest abaratiment no l'hem comptabilitzat.



**Figura 4.5: : En groc (A):** Càlcul del cost de l'ús de l'arrayCGH com a primera opció, utilitzant l'estratègia d'hibridació pacient vs pacient. + MLPA TGR de disseny propi. **En blau (B):** L'ús de l'array com a tercera opció, després del cariotip i l'MLPA. L'enfocament tradicional de cariotip i MLPA hagués aconseguit menys d'un terç dels diagnòstics en la nostra població (43/140). Implementar l'array per aconseguir el 100% dels desequilibris multiplica per 2,76 el cost que suposaria aplicar l'array com a primera i única opció (en groc).

\*el cost d'un assaig d'aCGH per pacient en l'estratègia pacient versus pacient passa a reduir-se a la meitat, o sigui 177.695 €

\*\* Protocol A no en tots els casos es repetirà un array, donat que hi han casos que s'hauran diagnosticat per MLPA. Aquí aquest abaratiment no l'hem comptabilitzat.



**Figura 4.6: En groc (A):** Càlcul del cost de l'ús de l'arrayCGH com a primera opció, utilitzant l'estratègia d'hibridació estàndard pacient vs pacient. + MLPA TGR comercial. **En blau (B):** L'ús de l'array com a tercera opció, després del cariotip i l'MLPA. L'enfocament tradicional de cariotip i MLPA hagués aconseguit menys d'un terç dels diagnòstics en la nostra població (43/140). Implementar l'array per aconseguir el 100% dels desequilibris multiplica per 2,38 el cost que suposaria aplicar l'array com a primera i única opció (en groc).

\*el cost d'un assaig d'aCGH per pacient en l'estratègia pacient versus pacient passa a reduir-se a la meitat, o sigui 177.695 €

\*\* Protocol **A** no en tots els casos es repetirà un array, donat que hi han casos que s'hauran diagnosticat per MLPA. Aquí aquest abaratiment no l'hem comptabilitzat.

## **Discussió**



## **5.1 POSADA AL PUNT DE L'ARRAY-CGH COM A TÈCNICA DIAGNÒSTICA DE RUTINA**

Un dels aspectes fonamentals de la recerca translacional en Ciències de la Salut, és la seva repercussió en la clínica. En aquest sentit, els nostres resultats demostren que la tècnica d'arrayCGH té la capacitat diagnòstica i l'eficiència per a ser implementada com a eina diagnòstica de rutina en un servei de laboratori hospitalari.

Si bé s'ha establert un consens en què els microarrays han de ser introduïts com a eina diagnòstica, els laboratoris s'enfronten a una sèrie de problemes pràctics que han de resoldre per tal d'implementar-los. Cada laboratori és responsable d'assegurar la validesa analítica de la tècnica abans d'introduir-la en un servei de rutina diagnòstica.

### **5.1.1 PROBLEMES TÈCNICS EN LA FASE DE POSADA AL PUNT I VALIDACIÓ**

La tècnica d'array CGH és delicada i ocupa un temps llarg.

En el transcurs del període de validació i la posada en marxa de la tècnica d'arrayCGH, varen sorgir una sèrie de problemes tècnics, la solució dels quals ha comportat una millora en l'optimització de la tècnica.

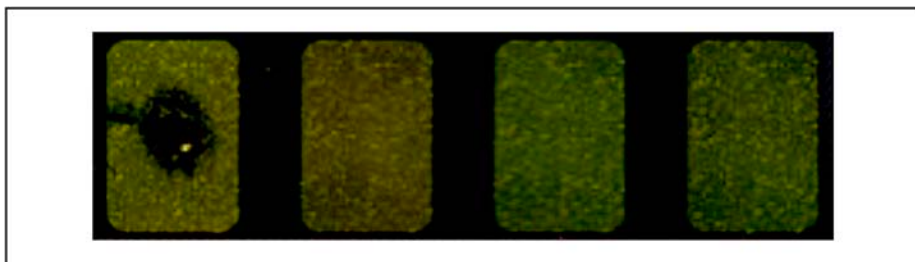
Hi ha moltes variables que poden afectar els resultats de l'arrayCGH incloent la qualitat de la mostra, incidències tècniques i elements ambientals.

Si els resultats d'un assaig d'arrayCGH són subòptims o fallits, l'acurada anàlisi dels paràmetres de qualitat subministrats pel programari Feature Extraction/Cytogenomics i la inspecció visual de la imatge escanejada dels arrays aporta informació clau per localitzar la font del problema i poder realitzar les adequades accions correctives.

A continuació revisem les principals incidències derivades de la pèrdua de solució d'hibridació, problemes mecànics i problemes en el moment del rentatge.

1.- Visualització en la imatge escanejada de l'array d'una zona central fosca més o menys oval.

Això ens indicaria un nivell de solució d'hibridació insuficient per cobrir la totalitat de l'array durant la hibridació. A causa del moviment rotatori del forn d'hibridació, la barreja cobreix correctament els extrems de l'array però mai la part central. La quantitat de solució d'hibridació pot resultar insuficient a causa d'un volum escàs, des de l'inici o per pèrdua de líquid durant la hibridació (fig.5.1)



**Figura 5.1:** Imatge escanejada. Plataforma 4x180. 4 arrays, un dels quals presenta una zona central fosca, on no hi ha hibridació, si més no, la hibridació és molt inferior al reste de l'array. Aquest array, i per tant els resultats es desestimarien, i caldria repetir.

Aquest problema es corregeix ajustant la quantitat de solució d'hibridació amb aigua destilada immediatament abans de la hibridació, incrementant lleugerament el volum inicial de la solució d'hibridació, o distribuint les diferents solucions d'hibridació sobre el cobreobjectes a temperatura ambient (les indicacions del fabricant recomanen fer-ho a 37 °C. Aquestes condicions de T<sup>a</sup> faciliten l'evaporació). També existeix la possibilitat d'una ocasional pèrdua de líquid durant el muntatge de l'array sobre el portaobjectes, un inadequat muntatge de la càmera d'hibridació i, finalment l'existència de discontinuïtats en la silicona del cobreobjectes.

## 2.- Una baixa intensitat del senyal

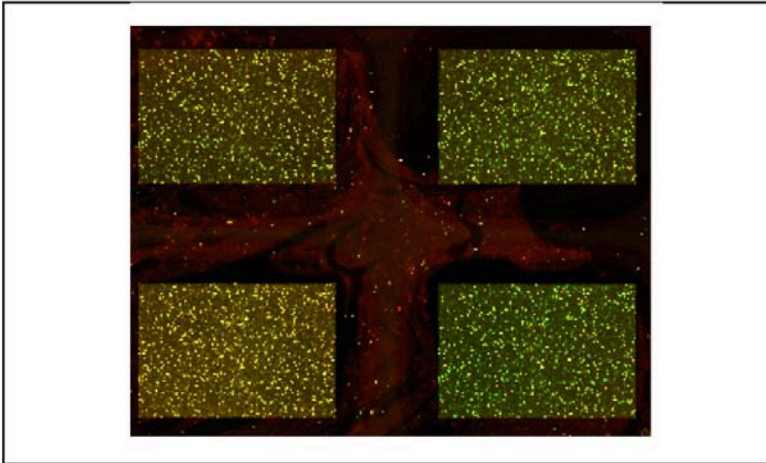
Una intensitat del senyal baixa pot ser deguda a un rentatge excessiu, (fig 5.6-B) un baix marcatge de les mostres o en els escàners Agilent, la interposició de material fluorescent.

Aquest problema es corregeix revisant la duració del rentatge, velocitat de l'imant, la temperatura, l'ordre dels tampons, així com les condicions de la reacció de marcatge. La degradació dels fluorocroms del marcatge, especialment del Cy5 per l'ozó o un ADN de baixa qualitat (especialment si està molt fragmentat) també poden ser la causa d'una intensitat del senyal baixa.

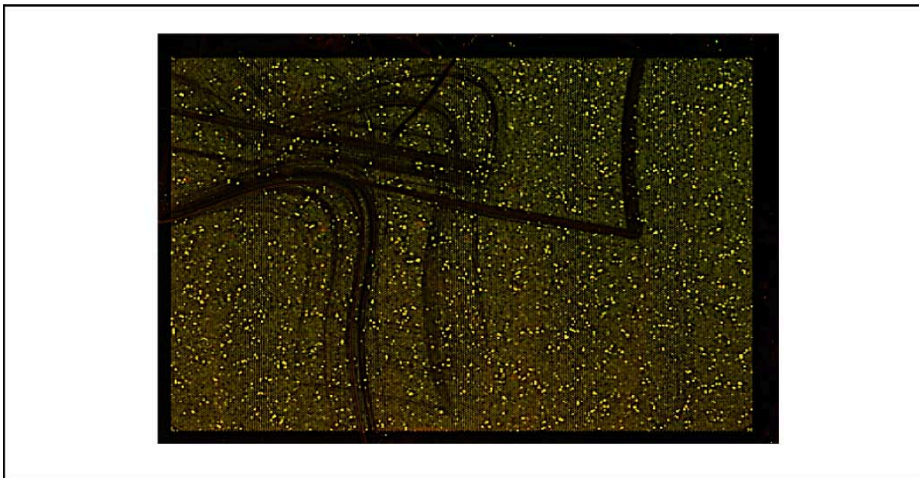
Finalment, si part de la solució d'hibridació d'un array ha sortit a l'exterior, pot dipositar-se en la part de darrere del suport de vidre (Figura 5.2.). En l'escàner d'Agilent la llum làser travessa el vidre i qualsevol material dipositat en la part posterior esmorteirà el senyal. (fig 5.2)

### 3- Ratlles fosques a la imatge de l'array.

Aquesta imatge indica un array malmès per unes pinces o l'iman agitador utilitzat durant el rentatge final. Depenent del nombre de punts afectats (paràmetre *AnyColorPrcntFeatNonUn*) es desestimaria l'array.



**Figura 5.2** Dipòsit del reactiu d'hibridació fora de l'array



**Figura 5.3:** Array malmès mecànicament



#### 4- Aparició d'un patró fluorescent d'aigües

Els reactius de rentatge elaborats per Agilent permeten obtenir un array absolutament sec i sense aigües. Aquesta propietat es perd totalment amb la presència de substàncies tensioactives com el sabó. Per tant, les cubetes i, en general, tot el material utilitzat en els rentatges es neteja únicament amb aigua destilada. Quantitats mínimes de sabó produeixen l'aparició d'una imatge d'aigües fluorescent que pot afectar molt negativament a la qualitat de l'array. (Figura 5.4)

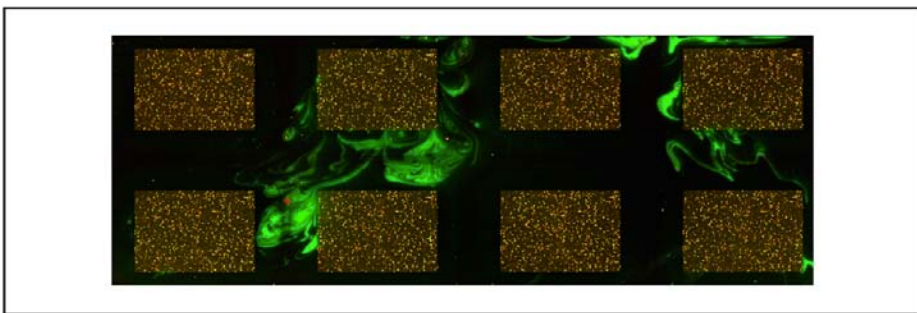


Figura 5.4: Patró fluorescent d'aigües produït pel ús de sabó.

#### 5- Empitjorament progressiu del paràmetre de qualitat *Derivative LR Spread*, atribuïble a problemes mecànics durant la hibridació. (figura 5.5.)

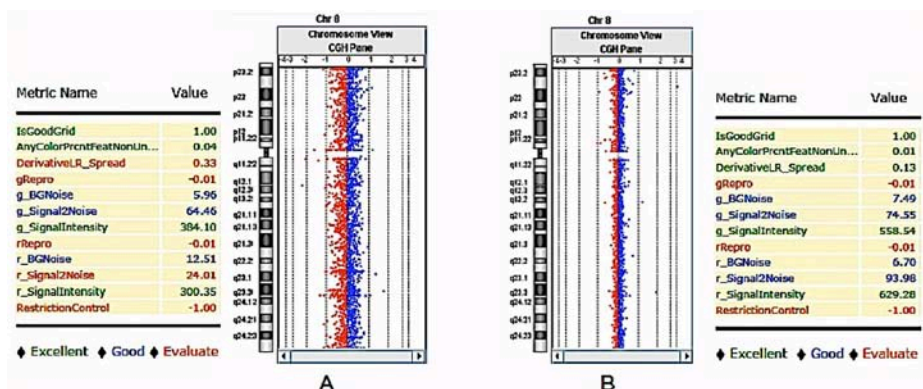


Figura 5.5: (A) Efecte de la vibració causada per la manca de lubricació del mecanisme de rotació del forn d'hibridació, sobre el *Derivative LR Spread* (0,33) i (B) el mateix parell de mostres sense vibracions, *DerivativeLR\_Spread* (0,13).

6- Una Intensitat del senyal massa baixa, amb la ràtio intensitat del senyal/soroll correcta

pot ser deguda a

- baixa qualitat de l'ADN (es recomana repurificar la mostra),
- problemes de marcatge mostra (es recomana comprovar que el nivell de l'ozó sigui <5 ppb)
- problemes d'hibridació (comprovar la temperatura del forn).

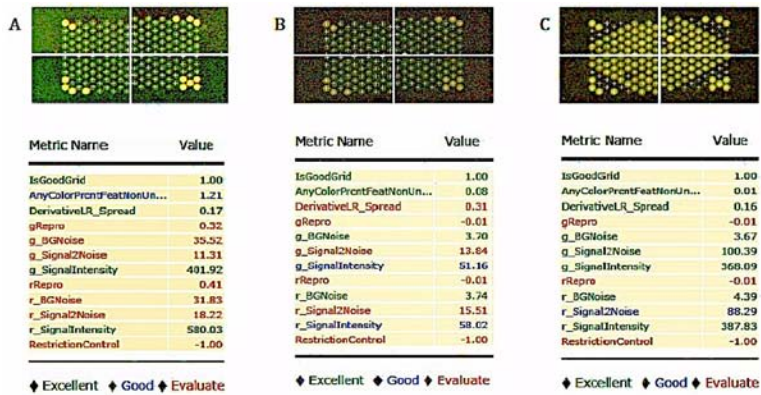
7.- Valors elevats del paràmetre de qualitat *Derivative LogRatio-Spread*

El *Derivative LR-Spread* és el principal índex de qualitat, ja que afecta directament a la capacitat de detecció. Avalua si la variació en la intensitat del senyal dels dos fluorocroms entre els diferents punts de l'array és similar. Amb valors alts del *Derivative LR\_Spread* menor serà la probabilitat per detectar guanys i pèrdues (menor sensibilitat). El fabricant accepta valors <0,30, però en la nostra experiència, a l'igual que la de Ahn i col·laboradors (2010), l'ideal és un valor per sota de 0,20, ja que valors superiors augmenten la freqüència de falsos positius i negatius, especialment en el cas de les anomalies de petita grandària.

L'augment del *Derivative LR\_Spread* es pot produir quan tenim un ADN de deficient qualitat (especialment si està molt fragmentat) o bé davant d'interferències en la hibridació.

8.- Molt soroll de fons i la intensitat del senyal alta (fig. 5.6 - A)

Normalment es tracta d'un rentat insuficient. Aquest problema es corregeix revisant la duració del rentat, velocitat de l'imant, la temperatura, l'ordre dels tampons (fig.5.6)

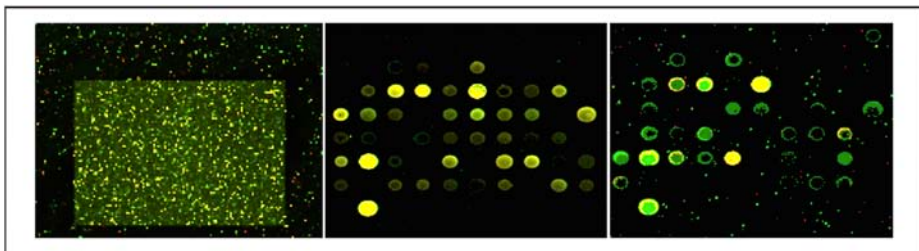


**Figura 5.6:** (A) insufient rentat. (B) excessius rentats. (C) pràctica de rentats correcta.

A la figura 5.6 - A es mostra un exemple de rentats insuficients amb elevada intensitat del senyal, i del soroll de fons. En la figura 5.6 -B, succeeix tot al contrari, baixa intensitat del senyal i del soroll de fons, indica un rentatge excessiu. La figura 5.6 - C és un exemple de paràmetres de qualitat correctes.

9- Valors elevats dels paràmetre de qualitat combinats amb una baixa intensitat del senyal, sobre tot de Cy5 i l'aparició de dipòsits fluorescents puntiformes en la imatge de l'array

S'ha comprovat que l'ozó ambiental degrada el fluorcrom Cy5, fins i tot a nivells considerats acceptables pels estàndards de les agències de protecció ambiental. La imatge d'un array danyat per l'exposició a l'ozó és de múltiples precipitats repartits aleatòriament (Figura 5.7 a) i l'aparició de cercles brillants amb la regió central fosca en les sondes (Figura 5.7 c).



**Figura 5.7:** Imatge d'un array amb exposició a nivells elevats d'ozó(a) i comparació del mateix array sense (b) i amb intensa exposició a l'ozó (c) (Imatges b i c: Maitreya Dunham's lab, Department of Genome Sciences at University of Washington (<http://dunham.gs.washington.edu/ozone.html>))

L'ozó es forma quan els òxids de nitrogen i compostos orgànics volàtils (COV) reaccionen en presència de la llum solar. Aquests són emesos per la fuita dels vehicles de motor, les emissions industrials, els vapors de benzina, solvents químics i fonts naturals. En conseqüència, els nivells d'ozó són més alts a les zones urbanes i industrials, especialment durant els mesos d'estiu i en zones de tràfic intens. L'ozó afecta els fluorocroms de Cianina, que s'utilitzen en la tècnica d'arrayCGH per a marcar els ADN. La degradació és més important sobre el colorant Cy5, i, en menor mesura sobre Cy3. S'aconsella l'escaneig immediat després dels rentats i un ambient molt pobre en ozó (existeixen dispositius amb filtres que redueixen el nivell d'ozó de l'aire). També es comercialitzen reactius que redueixen el problema (*Agilent Stabilization and Drying Solution*), encara que són tòxics i requereixen un ús en condicions ambientals especials (campana de gasos).

10- Valors del paràmetre de qualitat *Derivative LR Spread* > 0,20 i els demés paràmetres de qualitat d'acceptable a correctes.

Davant una situació així hem de pensar en la possible fragmentació de l'ADN. Aquesta, és invisible amb els mètodes habituals de lectura de la concentració i qualitat de l'ADN com ara amb el Nanodrop. Molts cops es pot esperar una situació com la descrita quan la mostra no reuneix les condicions idònies (sang coagulada, no correcta conservació de la mostra, mostres de teixits en no idònies condicions) La fragmentació es pot verificar amb una electroforesi en agarosa a l'1.2%.S'ha suggerit en la literatura (Graig et al; 2012) que cohibridant mostres d'ADN de fragmentació semblant, ens permetria obtenir uns resultats més satisfactoris. Això ens va succeir en mostres d'ADN no incloses en l'estudi procedents de mostres fetals degradades. També és molt important realitzar la hibridació competitiva amb mostres d'ADN el més semblants possible, és a dir, del mateix tipus de teixit i amb la mateixa tècnica d'extracció de l'ADN.

## **5.2. LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH COM A PRIMERA OPCIÓ EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL.**

### **5.2.1. CAPACITAT DIAGNÒSTICA SEGONS INDICACIÓ**

En la població general, s'estima que la prevalença del retard global del desenvolupament / discapacitat intel·lectual (RGD / DI) és d'un 1-3% (Shevell et al.,

2003), dels trastorns de l'espectre autista (TEA) d'un 0,7% (Newschaffer et al., 2007), i de les malformacions congènites (MC) d'un 2-3% (Shevell et al 2003; Corsello i Giuffrè, 2012). Aquestes dades indiquen l'existència d'un greu problema sanitari i social.

Segons la nostra experiència, el motiu de derivació més freqüent a l'Àrea de Genètica Clínica i Molecular de l'Hospital Universitari "Vall d'Hebron", de Barcelona, és el retard global del desenvolupament / discapacitat intel·lectual (RGD / DI). Altres motius de derivació habituals són les malformacions congènites, els trastorns psiquiàtrics, la talla baixa, i l'epilèpsia. Dins de les malformacions congènites, les més nombroses són les cardiopaties congènites (CC) i les malformacions del sistema nerviós central (SNC). Els trastorns psiquiàtrics inclouen els trastorns de l'espectre autista (TEA), el trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat (TDAH), la psicosi esquizofrènica, i el trastorn bipolar. Hi ha altres motius de derivació, com ara dismorfies, fenotips peculiars, miopaties, hipotonia, parèsia, hipercreixement, etc. Cal tenir present que molts pacients presenten més d'un dels fenotips descrits.

El present treball presenta la sèrie més gran descrita a l'estat espanyol d'estudis de arrayCGH com a primera opció diagnòstica. Fins ara s'havien publicat sèries de menor grandària o utilitzant els arrayCGH com a tècnica de tercera línia, en pacients amb resultat normal en altres tècniques de diagnòstic genètic com ara el cariotip i la MLPA (Rodríguez-Revenge et al., 2013), (Roselló et al., 2014)

Amb un 14% de pacients amb anomalies detectades (taula 5.1), els nostres resultats confirmen que actualment l'arrayCGH és la tècnica individual amb un major rendiment diagnòstic en els pacients amb RGD / DI, malformacions congènites i TEA (Miller et al., 2010). El rendiment diagnòstic no és uniforme i varia molt en funció del tipus i nombre d'anomalies fenotípiques que s'observen en els pacients, coincidint els nostres resultats amb els estudis publicats per altres autors (veure referències en taula 5.1). Les indicacions clàssiques de l'estudi de aCGH inclouen RGD / DI, TEA i MC TEA (Miller et al., 2010) amb unes taxes diagnòstiques del 18.9%, 14.8% i 13.7% respectivament. Els nostres resultats i els d'altres autors (Zahnleiter et al., 2013) suggereixen la conveniència d'incloure la talla baixa com a nova indicació de l'estudi amb arrayCGH, ja que s'ha detectat aproximadament un 13,3% (14/105) d'anomalies de les quals només un 21,42% (3/14) afecten el gen *SHOX*. Els nostres resultats també suggereixen la conveniència d'incloure com a indicació de l'estudi d'arrayCGH les epilèpsies amb un 7% de diagnòstics.

Taula 5.1: Comparació de les taxes diagnòstiques d'aquest estudi amb altres estudis

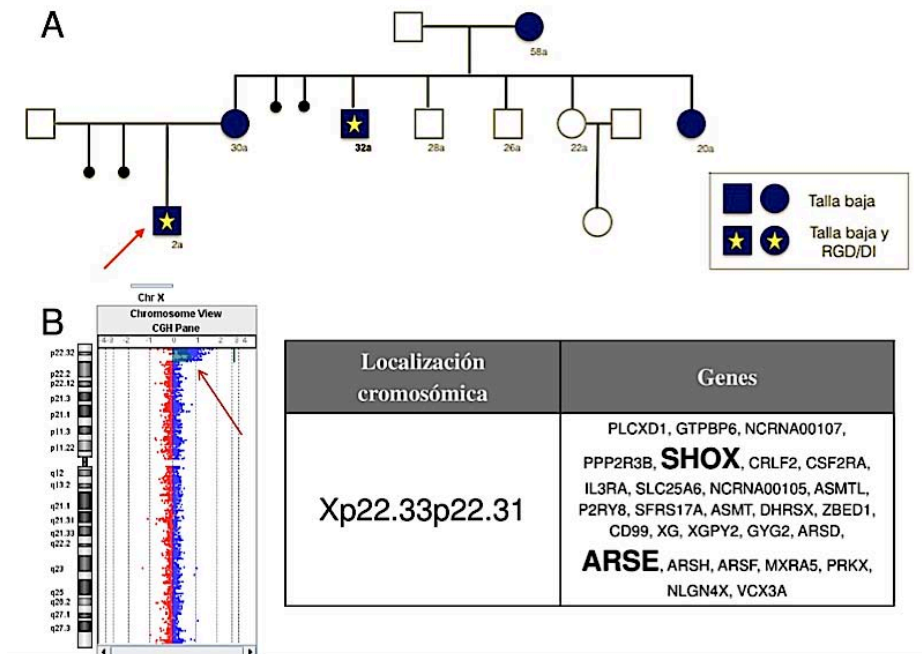
	Total pacients analitzats (n=1.000)	Pacients amb resultat patològic (n=140)	Diagnòstics (%)	% a la literatura	
<b>* RGD/DI</b>	406	77	18,97	10- 19 % <sup>1-4</sup>	Friedman et al. 2006; Miller et al. 2010; Sigberg et al. 2010; Sagoo et al. 2009
<b>* MALFORMACIONS</b>	394	54	13,71	10 - 12 % <sup>2,4</sup>	Miller et al. 2010; Sagoo et al. 2009
· CC	188	20	10,64	3,6 - 29 % <sup>5-6</sup>	Bachman et al., 2013; Brechtot et al., 2013
· SNC	107	16	14,95	14,5 - 22,5 % <sup>7-8</sup>	Karimnejad et al.; 2011; Baldwin et al. 2008
<b>* TRASTORNS PSIQUIÀTRICS</b>	164	16	9,76		
· TEA	134	12	8,96	7 % <sup>9</sup>	Shenet al. 2010
<b>* EPILÈPSIA</b>	57	4	7,02	7,3 - 20% <sup>10-12</sup>	Galizia et al. 2012; Wincent et al. 2015; Lal et al. 2015
<b>* TALLA BAIXA</b>	105	14	13,33	10% <sup>13</sup>	Zahnleiter et al. 2013
<b>* ALTRES</b>	298	36	12,08		

La diferència en la taxa diagnòstica en funció de les diverses indicacions pot justificar la disparitat dels resultats publicats, els rangs van del 7.6% de Shen et al. (2007) fins al 35% de Aradhya et al. (2007). Tots dos estudis analitzen el genoma amb una resolució similar (35 Kb) però difereixen en la població analitzada: poc definida fenotípicament en el primer estudi, i pacients seleccionats per presentar un fenotip considerat molt suggestiu de tenir una anomalia de còpia en el segon. Les grans sèries publicades que utilitzen la tècnica de arrayCGH com a primera opció diagnòstica, (Ahn et al. (2013) amb 8.300 pacients i Shaffer et al.(2007) amb 8.789 pacients), aporten la detecció d'un gran nombre de CNV patogèniques però detallen poc el fenotip dels mateixos. D'altra banda, les sèries de pacients ben caracteritzades fenotípicament sovint són de mida petita i focalitzades en un tipus concret de patologia com ara la de Roselló et al. (2014) amb 246 pacients amb discapacitat intel·lectual.

La nostra sèrie aporta els resultats de l'estudi de arrayCGH com a primera opció diagnòstica en 1.000 pacients amb una completa classificació fenotípica. En conseqüència, el present estudi permet contrastar amb fiabilitat en termes d'efectivitat a més de l'eficiència l'estratègia del arrayCGH com a primera opció diagnòstica en la detecció de desequilibris genòmics enfront de l'estratègia estàndard de cariotip, estudi de MLPA i l'addició de l'estudi de arrayCGH com a opció de tercera línia.

#### 5.2.2 CONTRIBUTIÓ A LA CARACTERITZACIÓ DE LES ANOMALIES

Com a benefici addicional, els estudis d'arrayCGH permeten una caracterització de les anomalies més precisa que la FISH o la MLPA comercial. De vegades amb implicacions d'assessorament reproductiu importants, per exemple la Figura 5.8 mostra una deleció del gen *SHOX* en el cas 112 que també inclou altres gens no pseudoautosòmics com l'*ARSE*. Mentre que les delecions aïllades del gen *SHOX* produeixen un fenotip de talla baixa semblant en ambdós sexes (Rappold et al., 2002; 2007), la pèrdua de gens addicional, produeix en els homes un fenotip molt més greu que inclou talla baixa, condrodilàsia punctata i RGD / DI (Boycott et al., 2003).



**Figura 5.8:** a) Genealogia d'una família portadora d'una deleció Xp22.33-p22.31. b) Resultat de l'anàlisi mitjançant array CGH, que implica la pèrdua dels gens *SHOX* i *ARSE* principals responsables de les alteracions fenotípiques.

### 5.2.3 DETECCIÓ DE NOUS PUNTS DE TRECAMENT

Els arrayCGH permeten la identificació de nous punts de trencament atípics generadors de síndromes de microdeleció i microduplicació. Aquests nous punts de trencament a vegades poden ser font de falsos negatius en les proves de FISH, fins ara el mètode diagnòstic més estès. Un exemple d'aquesta afirmació és un pacient (cas 1, Fig. 5.9) amb característiques clíniques de la síndrome de Williams- Beuren (WBS), que va resultar tenir fet amb anterioritat un estudi de FISH amb resultat negatiu per a la síndrome. Mitjançant la prova d'arrayCGH es va diagnosticar una microdeleció de la regió de la síndrome de Williams. L'explicació a aquests resultats contradictoris, és senzillament que en la prova de FISH comercial es produïa una hibridació parcial (concretament dues de les tres sondes que la formen, si hibridaven), produint falsos negatius en deleccions atípiques. (Fig.5.9 i 5.10). En casos posteriors de microdeleció i microduplicació amb el mateix punt de trencament que en el cas descrit, han permès reconèixer un nou punt de trencament recurrent en la regió crítica





Els nostres resultats ens duen a considerar de nou l'arrayCGH com la primera prova diagnòstica en sospita de la Síndrome de Williams, la qual cosa entra en contradicció amb Manning i Hudgins (2010) quan afirmen que la FISH amb una única sonda seria la opció més rendible per confirmar un diagnòstic de sospita d'una síndrome ben descrita, com ara la síndrome de Williams.

Probablement podríem fer extensible considerar l'arrayCGH la primera prova diagnòstica en sospita clínica d'altres síndromes.

#### 5.2.4 DETECCIÓ DE NOVES VARIANTS PATOGENÈTIQUES

Dins la nostra casuística, destaca una alta prevalença de trastorns psiquiàtrics en una família amb una deleció del gen *LRFN5*.

La deleció es va detectar per primera vegada en un nen de 8 anys d'edat (cas 52) que va arribar a la consulta de genètica clínica per presentar alteració de conducta. Un discret retard del llenguatge, dificultats en les habilitats motores fines i dificultats de representació visual-espacials. L'estudi amb arrayCGH va mostrar una deleció de 3 Mb (arr[hg19]14q21.1q21.2(40,733,870-43,788,932) x1). La deleció inclou un sol gen, l'anomenat *LRFN5* o *SALM5* (Figura 5.11).

El gen *LRFN5* és membre de la família de proteïnes d'adhesió cel·lular SALM o LRFN, amb patró d'expressió específic al cervell i implicades en la regulació del creixement de les neurites i la ramificació, formació i maduració de les sinapsis. El gen *LRFN5* pot jugar un paper important en el desenvolupament neuronal sinàptic.

Estudis recents suggereixen que les variacions del nombre de còpies (CNV), que inclouen diversos gens implicats en les vies de desenvolupament neurològic, poden estar associats amb fenotips neuropsiquiàtrics. (Mikhail et al., 2011; Perlis et al., 2012; Xu et al., 2009). En aquest sentit, el gen *LRFN5* podria estar implicat en l'autisme progressiu greu, retard mental i l'esquizofrènia familiar.

En realitzar l'estudi familiar amb la tècnica de FISH a mida amb la sonda RP11-189h22, es va trobar que la deleció segregava en 9 membres de la família (Fig. 5.12). Alguns estan afectats de trastorns psiquiàtrics ben identificats (II-1, III-1) i la resta han estat tractats per episodis d'ansietat i depressió. Així mateix, la transmissió d'aquesta

rara deleció en tots els membres de la família, podria ser indicatiu d'una selecció favorable durant la meiosi.

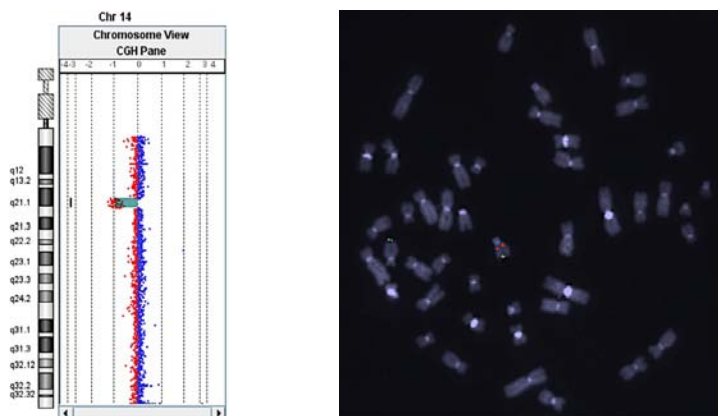
En aquest estudi familiar es pot observar una àmplia variabilitat d'expressió fenotípica en l'àrea dels trastorns d'ansietat.

Alteracions de *LRFN5* s'han associat amb l'autisme sever, discapacitat intel·lectual i l'esquizofrènia (de Bruijn et al. 2010 ; Mikhail et al 2011; Xu et al. 2009). Només en el nostre estudi i en el de Xu i col·laboradors, la pèrdua del gen *LRFN5* es troba aïllada i no hi ha altres alteracions genètiques acompanyants com seria en els casos descrits per de Bruijn i col·laboradors i Mikhail i col·laboradors.

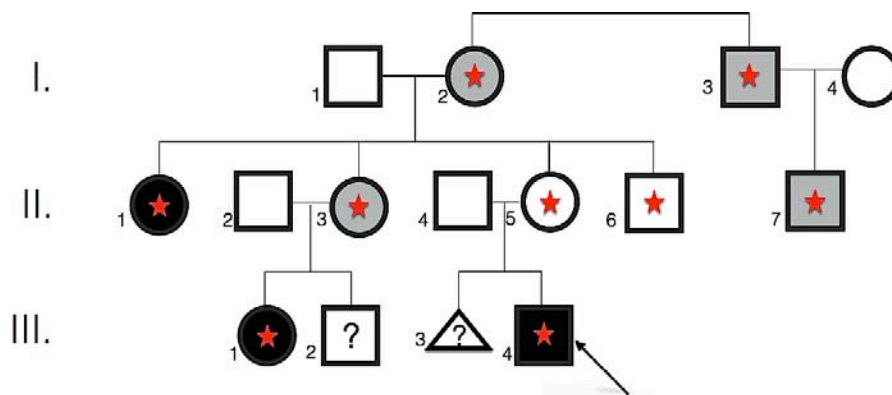
El estudi familiar mostra un ampli espectre fenotípic que va de la normalitat al trastorn obsessiu-compulsiu, i dóna suport a la idea que la mateixa mutació pot augmentar el risc d'una àmplia gamma de manifestacions clíniques.




La deleció del gen *LRFN5* que es manifesta amb una expressivitat variable i penetrància incompleta, podria ser considerada com una mutació causal primària amb efectes modificats per la presència de variants addicionals en el genoma.

Les nostres dades confirmen, igual que en la literatura, que l'haploinsuficiència del gen *LRFN5* constitueix un important factor de risc per a un ampli espectre de trastorns psiquiàtrics.



**Figura 5.11** : Deleció 14q21.1q21.2(40,733,870-43,788,932) , per array, i FISH a mida amb una sonda que hibrida amb la seqüència del gen *LRFN5* .



**Figura 5.12:** Estudi familiar de la delecció 14q21.1 q21.2 .  Portadors de la delecció.  Portadors afectes de trastorns psiquiàtrics identificats.  Portadors amb antecedents d'episodis d'ansietat i depressius.

### 5.2.5. DETECCIÓ DE MOSAICS

Els estudis d'arrayCGH suggereixen la presència d'un mosaïcisme quan s'observen valors intermedis entre el rang normal i el patològic de fluorescència. Malgrat tot, és difícil deduir el grau de mosaïcisme i, encara avui ningú pot dir amb fiabilitat quin és el mínim grau de mosaïcisme detectable en situacions reals.

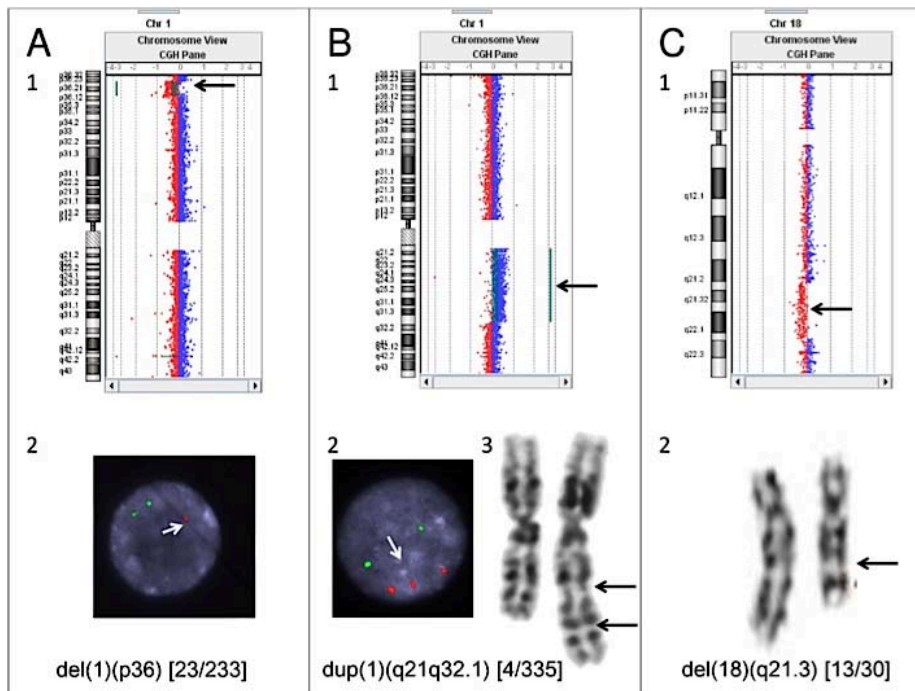
La capacitat de detecció depèn del tipus de desequilibri (pèrdua o guany) i de la mida de l'anomalia de còpia. Les deleccions autosòmiques suposen un canvi de fluorescència major que les duplicacions i, per tant, és de preveure una major capacitat de detecció dels mosaics de deleccions que no de duplicacions (el canvi de dues còpies a una -en deleccions- produeix una reducció de fluorescència del 50%; i el canvi de dues còpies a tres -en duplicacions- produeix un augment del 30%)

Canvis molt petits de fluorescència es poden confondre amb soroll de fons i amb anomalies de poca grandària, amb poques sondes implicades.

Generalment, els estudis de validació es realitzen simulant diferents graus de mosaïcisme amb dilucions seriades d'un ADN amb anomalia mesclat amb un altre sense l'anomalia. Amb aquesta metodologia hem estat capaços de detectar la pèrdua

d'un cromosoma complet (monosomia del cromosoma X) fins una dilució equivalent a un mosaic del 20%. Probablement encara serien detectables dilucions majors, però no es van fer més experiments. Els resultats amb una trisomia del cromosoma 18 van ser decebedors, en el sentit que va ser impossible detectar-la amb una dilució del 50%. Un estudi paral·lel amb una microduplicació 1q21 i una microdeleció 7q11.23, ambdues per sota la resolució del cariotip convencional, va permetre detectar sense problemes una simulació d'un mosaic del 50%. Per tant, la menor detecció en un guany de tot un cromosoma, tan sols pot explicar-se per la presència d'un mosaic críptic en la mostra d'ADN original. Aquesta interpretació és probable donat que es tractava d'un ADN procedent d'una biòpsia corial, teixits amb molta probabilitat de presència de mosaïcismes i contaminacions amb cèl·lules d'origen matern.

Amb mostres reals, els nostres resultats han estat dispars. Mentre que per una banda es va diagnosticar fàcilment anomalies confirmades posteriorment per FISH i només observades en un 9,8 i 1,3% de les metafases analitzades (Fig.5.13. A i B), per l'altra banda un mosaic observat en un 43% de les metafases en el cariotip van provocar canvis de fluorescència tan subtils que no van ser detectats pel programa d'anàlisi Cytogenomics, encara que si es visualitzaven en el gràfic proporcionat pel mateix (Fig.5.13. C). (aquest va ser un cas deivat al nostre laboratori per a caracterització d'una pèrdua de material en el cromosoma 18, vista per cariotip). Una possible explicació és que les diverses tècniques analitzen poblacions cel·lulars distintes: limfòcits T procedents de cultius cel·lulars estimulats amb fitohemaglutinina (PHA) en els estudis de cariotip / FISH i totes les cèl·lules sanguínies nucleades en els arrayCGH. (Stankiewicz y Beaudet 2007)



**Figura 5.13:** Casos de mosaïcismes detectats per hibridació genòmica comparada: A) deleció 1p36 en mosaic en un pacient amb cardiopatia: (1) detectada mitjançant aCGH i (2) confirmada en un 9,8% de les cèl·lules analitzades per FISH. B) Duplicació 1q21.1-q32.1 en un pacient amb epilèpsia: (1) detectada mitjançant arrayCGH, (2) confirmada en un 1,2% de les cèl·lules analitzades per FISH i (3) cariotip. C) deleció 18q21.31-q22.2 en un pacient amb RGD: (1) detectada en part per arrayCGH és a dir el programari Citogenòmic no la reporta però sí que és visible en la gràfic cromosòmic que ofereix, i (2) confirmada en un 43,3% de les cèl·lules analitzades per cariotip.

### 5.3 COMPARACIÓ AMB EL RENDIMENT DIAGNÒSTIC I L'EFICIÈNCIA D'ALTRES TÈCNiques.

Tot i les avantatges d'objectivitat i d'alt rendiment de l'arrayCGH, la introducció d'aquesta prova en els serveis de citogenètica clínica ha estat lenta, degut principalment a dos factors (Ahn et al 2010): d'una banda el cost dels consumibles, de l'altra la inèrcia deguda a l'àmplia difusió i l'acceptació generalitzada de l'anàlisi de cariotip, com a prova de primera elecció en cas de sospita d'anomalies genètiques.

Per a contribuir a la reducció de costos i l'augment de l'eficiència de les proves d'array CGH, Ahn i els seus col·laboradors (2010) van elaborar les següents propostes:

a) utilitzar la tècnica d'hibridació pacient vs pacient., b) utilitzar recursos informàtics específics

a) Utilitzar l'estratègia d'hibridació pacient vs. pacient: aquesta estratègia redueix a quasi la meitat els costos de consumibles i personal, i augmenta l'eficiència d'anàlisi. Per dos pacients amb resultats normals, només cal un estudi d'array CGH. El gran perill d'aquesta estratègia deriva de l'existència de reorganitzacions recurrents i, per tant, existeix la possibilitat d'un fals negatiu si es dona la coincidència que dos pacients amb el mateix desequilibri s'hibridessin l'un contra l'altre. El protocol dels autors inclou utilitzar en el mateix assaig pacients amb fenotips diferents, amb l'objectiu de reduir la possibilitat d'aparellar dues anomalies iguals. Aquesta estratègia és, en la nostra opinió, poc viable, ja que moltes anomalies recurrents donen fenotips molt inespecífics i semblants. Per aquesta raó, en la pràctica la classificació per fenotips pràcticament es redueix a no analitzar conjuntament dos pacients amb cardiopatia (de vegades associades a delecions en el cromosoma 22). Els mateixos autors indiquen que la probabilitat de no detectar una de les síndromes més freqüents, la deleció 16p11.2, és inferior a 1 sobre 25.000. De tota manera, per establir un risc d'error acurat és necessari comptabilitzar totes, o almenys les més freqüents, les síndromes de microdeleció/microduplicació recurrents i, per tant, el risc és molt més alt que'l indicat per Ahn i col·laboradors (2010).

Per aprofitar les avantatges econòmiques de l'estratègia d'hibridació pacient vs. pacient amb una adequada seguretat diagnòstica nosaltres proposem realitzar un estudi de MLPA en paral·lel a un sol dels pacients inclosos en cada parella de cada assaig d'arrayCGH. És a dir es faria un estudi de MLPA de síndromes recurrents en el 50% dels pacients. En cas de resultat positiu en la MLPA, aquest ens serviria de prova de confirmació del resultat de l'array, evitant la repetició d'aquest.

En aquestes condicions el risc d'error ( $0,2 \text{ } ^{0/00}$ ) és inferior a l'error d'identificació de mostra ( $0,3 \text{ } ^{0/00}$ ) reconegut en els laboratoris clínics (Wiwanitkit, 2001) (Taula 5.2).

**Taula 5.2:** Estimació del risc d'error diagnòstic basat en la freqüència de diferents desequilibris recorrents en població de pacients (Kaminsky et al. 2011 ; Shaffer et al. 2007)

tant per 1000 (‰)	x2 pac/pac (‰)	errors calculats
1.327	2,6	error arrayCGH pacient/pacient
1.063	1,1	error arrayCGH pacient/pacient no cohibridant cardiopaties (fenotip "NO" coincident ("?"))
0.130	0,2 ‰	error arrayCGH pacient/pacient amb MLPA de trastorns genòmics recorrents al 1 de cada 2 pacients cohibridats ( <b>la nostra proposta</b> )
0,300	0,3 ‰	error reconegut en els laboratoris clínics com a conseqüència de la identificació errònia dels tubs

b) Utilitzar recursos informàtics específics per facilitar el seguiment de les mostres i la construcció de fulls de treball, amb enllaços a recursos d'Internet, en particular la base de dades DGV, per a agilitzar el diagnòstic i la interpretació dels resultats i l'elaboració d'informes.

La lectura i interpretació dels estudis d'arrayCGH descansa necessàriament en l'ús de programes informàtics especialitzats. D'una banda, la detecció manual d'anomalies a partir de les dades crues obtingudes a partir d'un array és impossible a causa de l'elevat nombre de dades. D'altra, la consulta de forma manual de la majoria de bases de dades accessibles a internet és generalment molt tediosa i, per tant, és difícil aprofitar tot el seu potencial.

En aquest sentit hem desenvolupat un programari especialitzat, EasyArray descrit a l'apartat 4.2.1. del capítol de Resultats.

El present estudi permet contrastar amb fiabilitat en termes d'eficàcia, efectivitat i eficiència l'estratègia del aCGH com a primera opció diagnòstica en la detecció de desequilibris genòmics enfront de l'estratègia estàndard de cariotip, estudi de MLPA i l'addició de l'estudi de aCGH com a opció de tercera línia (Figs. 4.3, 4.5 i 4.6).



La comparació de les sèries publicades de pacients estudiats amb cariotip, FISH, MLPA o aCGH és complicada ja que també analitzen poblacions diferents. Aquest estudi permet una aproximació basada en una població relativament gran, 1000 pacients, assumint que el aCGH detecta la quasi totalitat de les anomalies clínicament rellevants. L'estratègia tradicional d'estudi de cariotip i MLPA disponibles per a aquestes patologies (2 kits de trastorns genòmics recurrents i un d'anomalies subtelomèriques), hauria diagnosticat només 43 (30,7%) dels 140 pacients diagnosticats per aCGH a un cost aproximat de 362.000€ (1.000 cariotips + 988 MLPAs) al qual caldria afegir el cost de 957 aCGH per arribar a diagnosticar els 140 pacients, amb un cost global de 702.107€ (Fig.4.6). L'estudi dels mateixos pacients únicament per aCGH seria d'uns 355.390€. En resum l'enfocament tradicional de MLPA i cariotip hagués aconseguit menys d'un terç dels diagnòstics en la nostra població, i s'aconseguiria la detecció del 100% dels desequilibris detectables per aCGH com a tercera opció diagnòstica multiplicant la despesa per 1,97.

Els nostres resultats il·lustren l'efectivitat i eficiència de la utilització dels aCGH com a primera opció en el diagnòstic genètic dels pacients amb RGD / DI, MC, TEA, talla baixa i epilèpsia. Aquests resultats i l'anàlisi cost-benefici avalen la seva inclusió dins del Sistema Nacional de Salut en complementació i / o substitució de les tècniques de cariotip, MLPA i FISH.

## **5.4 PUNTS FORTS I FEBLES DE LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC.**

### **5.4.1 AVANTATGES DE LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL**

En comparació amb l'anàlisi cromosòmica de bandes-G, l'array CGH ofereix els avantatges de l'objectivitat i de l'alt rendiment diagnòstic. La tècnica d'array-CGH triplica el nombre de diagnòstics obtinguts amb la tècnica estàndard de l'estudi cromosòmic convencional, és a dir, el cariotip. La tècnica d'array-CGH proporciona el diagnòstic del 13-18% dels pacients, mentre que amb el cariotip només se'n pot obtenir el 3-5%, en individus amb retard intel·lectual o del desenvolupament, alteracions de l'espectre autista i múltiples anomalies congènites, excloent la síndrome de Down i altres alteracions cromosòmiques ben conegudes. Aquesta

diferència és atribuïble a la seva alta sensibilitat per detectar delecions o duplicacions cromosòmiques submicroscòpiques (Miller, et al 2010).

#### 5.4.2 INCONVENIENTS DE LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL

Encara que els microarrays siguin una eina de diagnòstic poderosa per a l'avaluació dels canvis de nombre cromosòmics, el seu ús com a prova de primera elecció no sempre és apropiat. Igual que amb altres mètodes de diagnòstic clínic, en la tecnologia aCGH també hi ha limitacions (Shinawi & Cheung 2008). Potser l'inconvenient més important és que l'aCGH no és capaç d'identificar reordenaments equilibrats, com ara translocacions i inversions.

L'aCGH només és capaç de detectar desequilibris en el nombre de còpia en relació a altres regions d'ADN dins de la mateixa mostra. Per tant, l'arrayCGH tampoc pot detectar la poliploïdia.

Finalment, l'arrayCGH tampoc dóna informació sobre la ubicació en el genoma de, per exemple, regions duplicades, o en l'estructura dels cromosomes. No obstant això, alguns especialistes creuen que, en alguns casos, els patrons de desequilibri es poden utilitzar per a deduir aquesta informació (Ahn et al 2013).

Schluth-Bolard i els seus col·laboradors (2013), per exemple, estan investigant sobre el potencial de la ultraseqüenciació (NGS) en el diagnòstic de pacients amb reorganitzacions aparentment equilibrades i fenotip a qui s'ha exclòs un desequilibri genòmic mitjançant un array CGH. Els autors troben tres de cada quatre pacients una alteració genètica que pot explicar el seu fenotip i que permet el consell genètic adequat i aturar les investigacions innecessàries

#### 5.5 RECOMANACIONS PER L'US DE LA TÈCNICA D'ARRAY-CGH EN EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC POSTNATAL

A l'estat espanyol, el nostre grup ha col·laborat en l'elaboració de les següents recomanacions generals incloses en relació amb les aplicacions clíniques dels arrays-CGH :

- per als pacients amb RGD / DI, TEA i / o MC cap plataforma és millor que una altra. Si la densitat els cobreix adequadament, es poden utilitzar arrays-CGH de BAC, oligonucleòtids o SNP amb bon grau de resolució.
- amb l'objectiu de cobrir, com a mínim, la mateixa resolució que el cariotip, els arrays-CGH han de tenir una cobertura uniforme de tot el genoma per a detectar àrees de desequilibri en qualsevol localització d'almenys 5 Mb, però es recomana que es puguin analitzar regions de, almenys, 400 Kb. Els arrays han de ser dissenyats de manera que es puguin veure delecionades o duplicades múltiples sondes o SNP en un segment específic per a produir una marca reconeixible per al genetista molecular.

Com que el rendiment diagnòstic dels arrays-CGH és més gran que el del cariotip amb bandes G, cal considerar els arrays-CGH com a primera opció sistemàtica del laboratori per a l'avaluació diagnòstica dels pacients amb RGD / DI, TEA i MC (Miller et al., 2010; Shevell et al., 2008). Els casos es remetran per a que se'ls realitzi un array-CGH després de l'avaluació per part d'un especialista apropiat segons la seva patologia, l'avaluació del genetista clínic i l'aplicació de criteris de selecció adequats per a cada patologia. Degut a que el cost dels arrays-CGH està disminuint progressivament, cal considerar als arrays-CGH com a proves de primera elecció en l'avaluació sistemàtica en aquest grup de pacients, ja que complementarà o anticiparà al cariotip amb el fi de minimitzar la pèrdua d'oportunitats d'arribar al diagnòstic del pacient.

Els arrays-CGH orientats a regions conegudes de patologies ben descrites comporten al diagnòstic prenatal. Les dades actuals suggereixen que l'aplicació dels arrays-CGH en el diagnòstic prenatal incrementa la detecció de reordenaments genòmics fetals i són cost efectius i ben acceptats per les parelles. Les parelles o gestants que se sotmetin a un estudi d'arrays-CGH deuen, prèviament a la realització de l'estudi, ser assessorades sobre l'abast, limitacions, beneficis i utilitats dels estudis d'arrays-CGH en medicina prenatal. Es recomana que els laboratoris que apliquin els arrays-CGH al diagnòstic prenatal tinguin una comunicació fluida amb els professionals sol·licitants, siguin capaços de coordinar amb aquests consultes d'assessorament genètic prèvies i posteriors a la sol·licitud de l'estudi, si cal puguin corroborar amb altres tècniques genòmiques (FISH , MLPA, qPCR, etc.) les troballes eventuais, i puguin en un termini

raonable de temps analitzar les mostres parentals per poder complementar l'informe de l'estudi fetal.

Els arrays-CGH haurien de ser sol·licitats i interpretats per professionals de la salut capaços de transmetre la informació al pacient i/o la seva família, i de completar un assessorament genètic. Els genetistes clínics i/o assessors genètics són els que han d'estar familiaritzats, entrenats i tenir idoneïtat suficient per explicar l'abast, limitacions, beneficis i utilitats dels estudis d'arrays-CGH.

Els arrays-CGH haurien de ser informats per citogenetistes, genetistes moleculars o genetistes clínics amb entrenament suficient en genètica humana i amb experiència demostrada en citogenètica o genètica molecular humana. Els arrays-CGH han de ser informats seguint les recomanacions internacionals (ISCN, 2013) i han de complir els mínims estàndards de qualitat requerits per a cada plataforma utilitzada. En els informes haurà de constar la plataforma i el format d'arrays-CGH utilitzats, la densitat dels arrays-CGH utilitzada i la forma en què ha estat analitzada (programari aplicat, etc.). Es convenient registrar els resultats dels arrays-CGH (en termes de genotip i fenotip) en una base de dades adequada per facilitar l'intercanvi d'informació. En el registre d'aquests pacients en les bases de dades nacionals o internacionals haurà d'atendre la legislació vigent sobre protecció de dades personals i qualsevol normativa nacional o internacional al respecte.

Els informes dels arraysCGH haurien de contenir una interpretació clínica dels resultats relativa al "estat de l'art", informació referida a les dades poblacionals relatives a la troballa (DGV), els gens eventualment afectats i les bases de dades de patologies existents (com ara Decipher, OMIM, etc.).

La informació relativa als arrays-CGH de pacients amb fenotips específics hauria de recollir en una base de dades nacional i/o abocar-se a les bases disponibles internacionalment, a fi d'ampliar la informació requerida a l'hora d'elaborar un informe clínic assistencial i de participar en la descripció de noves patologies de reordenament genòmic, incrementar la informació disponible per a la investigació i incrementar el coneixement genòmic en general. Aquesta informació ha de recollir-se salvaguardant tots els criteris ètics, legals i administratius vigents i que marquin les comissions o comitès específics de cada institució o administració.

Tot i les recomanacions dels especialistes, cal tenir present que existeix una experiència limitada en la interpretació dels resultats obtinguts amb la tècnica d'array-CGH. Encara s'estan desenvolupant els criteris de diferenciació entre anomalies patogèniques i variants de la normalitat, i s'està precisant la correlació genotip/fenotip. El nombre de recursos accessibles a la xarxa Internet s'amplia constantment, donat el continu increment del coneixement científic.

## **Conclusions**



1. L'arrayCGH és la tècnica de diagnòstic genètic amb un major rendiment en els pacients amb retard global del desenvolupament/discapacitat intel·lectual, malformacions congènites i /o trastorns de l'espectre autista.
2. Un 70% dels pacients diagnosticats en el present estudi no s'haurien diagnosticat utilitzant únicament les tècniques de cariotip + MLPA. Aquest resultat implica la necessitat d'implementar la tècnica d'arrayCGH en el diagnòstic.
3. Els resultats en la nostra sèrie i d'altres autors avalen la utilització de la tècnica de l'arrayCGH com a primera opció diagnòstica en lloc de les tècniques de cariotip, MLPA i FISH. Podem afirmar que els arrays com a primera opció diagnòstica són clarament rendibles perquè eviten la realització d'un significatiu nombre d'altres tècniques diagnòstiques
4. El rendiment diagnòstic dels arrayCGH en els pacients amb talla baixa i l'epilèpsia avalen la seva inclusió com a noves indicacions per a l'estudi d'array CGH
5. Els arrays CGH d'oligonucleòtids amb disseny ISCA i format 8x60K són els que proporcionen un millor balanç cost / benefici.
6. L'estratègia d'hibridació pacient versus pacient amb el suport de l'anàlisi de MLPA permet un gran estalvi econòmic, millora la seguretat diagnòstica i facilita la seva aplicació en un entorn clínic.
7. La utilització d'un programari especialitzat és indispensable per l'eficient interpretació dels resultats de arrayCGH.
8. Els estudis d'array CGH detecten mosaics. La distribució desigual en els diversos teixits pot provocar resultats aparentment contradictoris.
9. En la nostra sèrie l'alteració detectada més freqüent va ser la deleció 22q11.21. Altres variants patogèniques freqüents a la nostra sèrie han estat la deleció 1q21.1-q21.2, delecions i duplicacions afectant la regió 16p13.11, 15q11.2, delecions i duplicacions de la regió 7q11.22, 16p11.2 i regió pseudoautosòmica PAR1
10. Es confirma que moltes CNVs patogèniques presenten una penetrància incompleta i expressivitat variable.



11. Els nostres resultats demostren l'efectivitat i eficiència de la utilització de l'arrayCGH com a primera opció en el diagnòstic genètic dels pacients amb sospita de desequilibris genòmics. Tot això avala la seva inclusió dins del Sistema Nacional de Salut.

## **Bibliografia**



- Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine, concerning Genetic Testing for Health Purposes: Council of Europe, 2008. Council of Europe Treaty Series - No. 203. Accessed 2015 July 4. Available from:<https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=0900001680084824>.
- Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogenet. Mol Cytogenet.* 2013; 6:16.
- Ahn JW, Mann K, Walsh S, Shehab M, Hoang S, Docherty Z, Mohammed S, Mackie Ogilvie CCP. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Mol Cytogenet.* 2010;3:9
- Allemeersch J, Van Vooren S, Hannes F, De Moor B, Vermeesch JR, Moreau Y An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:380
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., text revision). Washington: American Psychiatric Association 2000; 41-49.
- 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.* 2007;143A:1431-41.
- Artigas-Pallarés J. Perfiles cognitivos de la inteligencia límite. *Fronteras del Retraso Mental. Rev Neurol* 2003; 36 (Supl 1): S161-S167.
- Bachman K, DeWard S, Chrysostomou C, Munoz R, Madan-Khetarpal S. Array CGH as a first tier test for neonates with congenital heart disease. 2013; *Cardiol Young* 6:1-8.

- Baird G, Simonoff E, Pickles A et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Lancet* 2006; 368: 210-5.
- Baldwin EL, Lee JY, Blake DM, Bunke BP, Alexander CR, Kogan AL, Ledbetter DH, Martin CL. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med*. 2008; 10:415-29.
- Ballif BC, Hornor SA, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Rorem EA, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG. Development of a high-density pericentromeric region BAC clon set for the detection and characterization of small supernumerary marked chromosomes by array CGH. *Genet Med* 2007; 9: 150-62.
- Ballif BC, Theisen A, Rosenfeld JA, Traylor RN, Gastier-Foster J, Thrush DL, Astbury C, Bartholomew D, McBride KL, Pyatt RE, Shane K, Smith WE, Banks V, Gallentine WB, Brock P, Rudd MK, Adam MP, Keene JA, Phillips JA 3rd, Pfothauer JP, Gowans GC, Stankiewicz P, Bejjani BA, Shaffer LG. Identification of a Recurrent Microdeletion at 17q23.1q23.2 Flanked by Segmental Duplications Associated with Heart Defects and Limb Abnormalities. *Am J Hum Genet*. 2010; 86: 454–61.
- Bartnik M, Nowakowska B, Derwińska K, Wiśniowiecka-Kowalik B, Kędzior M, Bernaciak J, Ziemkiewicz K, Gambin T, Sykulski M, Beznikow N, Korniszewski L, Kutkowska-Kaźmierczak A, Klapecki J, Szczaluba K, Shaw CA, Mazurczak T, Gambin A, Obersztyn E, Bocian E, Stankiewicz P. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. 2014. *J Appl Genet*; 55:125-44.
- Bartnik M, Wiśniowiecka-Kowalik B, Nowakowska B, Smyk M, Kędzior M, Sobecka K, Kutkowska-Kaźmierczak A, Klapecki J, et al. The usefulness of array comparative genomic hybridization in clinical diagnostics of intellectual disability in children. *Dev Period Med*. 2014; 18: 307-17.

- Battaglia A et al. Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, Filippi T, Carey JC. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013; 17: 589-99.
- Beaudet AL. The utility of chromosomal microarray analysis in developmental and behavioral pediatrics. *Child development* 2013; 84 (1): 121-132
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE.. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010; 51:676-85.
- Boycott KM, Parslow MI, Ross JL, Miller IP, Bech-Hansen NT, MacLeod PM. A familial contiguous gene deletion syndrome at Xp22.3 characterized by severe learning disabilities and ADHD. *Am J Med Genet A*. 2003 ;122A:139-47.
- Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC Vermeesch JR, Moreau Y, et al. Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res*. 2011; 35:251–9.
- Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG. Clinical and cytogenetics survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet*. 1986; 23: 793-809.
- Charman T, Pickles A, Simonoff E, Chandler S, Loucas T, Baird G. IQ in children with autism spectrum disorders: data from the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Psychol Med* 2011; 619-27.
- Cigudosa JC, Lapunzina P (ed). *Consenso para la implementación de los arrays [CGH y SNP-arrays] en la genética clínica*. 2012. Roche. Madrid (Spain)
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 1989;30: 389–99.

- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J; Wellcome Trust Case Control Consortium, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 2010; 464: 704–712.
- Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7 Suppl):S22-9
- Corsello G, Giuffrè M. Congenital malformations. *J Matern Neonatal Med.* 2012; 25(S1): 25–9.
- Craig JM, Vena N, Ramkissoon S, et al. DNA Fragmentation Simulation Method (FSM) and Fragment Size Matching Improve arrayCGH Performance of FFPE Tissues *PLoS One.* 2012;7(6):e38881
- D'Amours G, Langlois M, Mathonnet G, Fetni R, Nizard S, Srour M, Tihy F, Phillips MS, Michaud JL, Lemyre E. SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. *BMC Medical Genomics* 2014; 7:70.
- de Bruijn DR, van Dijk AH, Pfundt R, Hoischen A, Merckx GF, Gradek GA, Lybæk H, Stray-Pedersen A, Brunner HG, Houge G. Severe Progressive Autism Associated with Two de novo Changes: A 2.6-Mb 2q31.1 Deletion and a Balanced t(14;21)(q21.1;p11.2) Translocation with Long-Range Epigenetic Silencing of LRFN5 Expression. *Mol Syndromol* 2010;1:46–5
- Dibbens LM, Heron SE, Mulley JC (2007) A polygenic heterogeneity model for common epilepsies with complex genetics. *Genes Brain Behav* 6: 593–597.
- Dolk H, Loane M, Garne E. 2010. The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:349-64.
- Dyban AP and Baranov VS (1990). *Cytogenetics of mammalian embryonic development.* Clarendon Press, Oxford, UK.

- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis or rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet.* 1999; 8: 1157-67.
- Engels H, Brockschmidt A, Hoischen A, Landwehr C, Bosse K, Walldorf C, Toedt G, Radlwimmer B, Propping P, Lichter P, Weber RG. DNA microarray analysis identifies candidate regions and genes in unexplained mental retardation. *Neurology* 2007; 68: 743–750.
- Flint J, Caballero S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13, 310-316.
- Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. 2006. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 8: 949-961
- Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, Brown-John M, Cao M, Chan S, Charest DL, Farnoud N, Fernandes N, Flibotte S, Go A, Gibson WT, Holt RA, Jones SJ, Kennedy GC, Krzywinski M, Langlois S, Li HI, McGillivray BC, Nayar T, Pugh TJ, Rajcan-Separovic E, Schein JE, Schnerch A, Siddiqui A, Van Allen MI, Wilson G, Yong SL, Zahir F, Eydoux P, Marra MA. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 500-13.
- Galizia EC, Srikantha M, Palmer R, Waters JJ, Lench N, Ogilvie CM, Kasperavičiūtė D, Nashef L, Sisodiya SM. Array comparative genomic hybridization: results from an adult population with drug-resistant epilepsy and co-morbidities. *Eur J Med Genet.* 2012;55: 342-8.
- Gandomi SK, Parra M, Reeves D, Yap V, Gau CL. Array-CGH is an effective first-tier diagnostic test for EFTUD2-associated congenital mandibulofacial dysostosis



- with microcephaly. *Clinical Genetics* 2015; 87: 80-84.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 2008; 1:4.
- Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U, Cavani S. Specific Constitutional Cytogenetic Guidelines. *Eur Cytogenet Guidel*. 2012;(30):11–9.
- Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet* 2013; 84: 415–421.
- Hills A1, Ahn JW, Donaghue C, Thomas H, Mann K, Ogilvie CM. MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. *Mol Cytogenet* 2010; 3:19.
- Hoang S, Ahn J, Mann K, Bint S, Mansour S, Homfray T, Mohammed S, Ogilvie CM. Detection of mosaicism for genome imbalance in a cohort of 3,042 clinical cases using an oligonucleotide array CGH platform. *Eur J Med Genet* 2011; 54: 121–29.
- Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet*. 2009 ;52:161-9
- Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME. 2010. Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genet*. 6(10):e1001154
- ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds), (S Karger, Basel 2013).
- Jacobs PA, Melville M, Ratcliffe S, Keay AJ Syme J. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann Hum Genet* 1974; 37: 359-76.
- Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC, Prieur M, Vekemans M, Carter NP,

- Munnich A, Colleaux L, Philippe A. A based comparative genomic hybridization identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J. Med. Genet.* 2006; 43, 843–49.
- Jallon P, Loiseau P, Loiseau J. Newly diagnosed unprovoked epileptic seizures: presentation at diagnosis in CAROLE study. *Coordination Active du Réseau Observatoire Longitudinal de l'Epilepsie.Epilepsia.* 2001;42:464-75
- Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Libório DC, Kim CA, Arnhold IJ, Mendonca BB.. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol* 2007;66:130-5
- Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis.* 2008 Sep 25;3:26.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid Tumors. *Science.* 1992;258:818-21.
- Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mülle JG, Warren ST, Richard G, Compton JG, Fuller AE, Gliem TJ, Huang S, Collinson MN, Beal SJ, Ackley T, Pickering DL, Golden DM, Aston E, Whitby H, Shetty S, Rossi MR, Rudd MK, South ST, Brothman AR, Sanger WG, Iyer RK, Crolla JA, Thorland EC, Aradhya S, Ledbetter DH, Martin CL. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med.* 2011 Sep;13(9):777-84.
- Kariminejad R, Lind-Thomsen A, Tümer Z, Erdogan F, Ropers HH, Tommerup N, Ullmann R, Møller RS. High frequency of rare copy number variants affecting functionally related genes in patients with structural brain malformations. *Human Mutation.* 2011; 32, 1427–35.

- Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JM, Koevoets C, Wanders RJ, Hennekam RC. Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study. *Am J Ment Retard*. 2005; 110: 253-67.
- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011;13: 680–5.
- Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet*. 2007; 50: 33-42.
- Koolen DA, Vissers LELM, Pfundt R, de LN, Knight SJL, Regan R, Kooy RF, Reyniers E, Romano C, Fichera M: A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 2006, 38: 999-1001.
- Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet*. 2008; 45:545-56
- LaFramboise. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*, 2009; 37: 4181–93
- Lal D, Ruppert AK, Trucks H, Schulz H, de Kovel CG, Kasteleijn-Nolst Trenité D, Sonsma AC, Koeleman BP, Lindhout D, Weber YG, Lerche H, Kapser C, Schankin CJ, Kunz WS, Surges R, Elger CE, Gaus V, Schmitz B, Helbig I, Muhle H, Stephani U, Klein KM, Rosenow F, Neubauer BA, Reinthaler EM, Zimprich F, Feucht M, Møller RS, Hjalgrim H, De Jonghe P, Suls A, Lieb W, Franke A, Strauch K, Gieger C, Schurmann C, Schminke U, Nürnberg P; EPICURE Consortium, Sander T. Burden analysis of rare microdeletion

- suggests a strong impact of neurodevelopmental genes in genetic generalised epilepsies. *PLoS Genet.* 2015.
- Lalani, S. R., Zhang, J., Schaaf, C. P., Brown, C. W., Magoulas, P., Tsai, A. C.-H., El-Gharbawy, A., Wierenga, K. J., Bartholomew, D., Fong, C.-T., Barbaro-Dieber, T., Kukulich, M. K., and 26 others. Mutations in *PURA* cause profound neonatal hypotonia, seizures, and encephalopathy in 5q31.3 microdeletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 95: 579-583, 2014.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat. Genet.* 2007; 39, S48–54.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003. 4(9):712-20
- Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 2008 Jan 4;283(1):1-5
- Linderman MD, Brandt T, Edelmann L, Jabado O, Kasai Y, Kornreich R, Mahajan M, Shah H, Kasarskis A, Schadt EE. Analytical validation of whole exome and whole genome sequencing for clinical applications. *BCM Med Genomics.* 2014; Apr 23; 7:20.
- López-Expósito I, Ballesta-Martinez MJ, Bafalliu JA, Vera-Carbonell A, Domingo-Jiménez R, López-González V, Fernández A, Guillén-Navarro. Array CGH detection of a novel cryptic deletion at 3q13 in a complex chromosome rearrangement. *Genomics.* 2014; 103(4): 288-91.
- Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, Sullivan CM, Sahoo T, Yatsenko SA, Bacino CA, Stankiewicz P, Ou Z, Chinault AC, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW, Ward PA. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. 2007; *PLoS ONE* 2, e327.
- Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntix WHE. *Mental retardation: definition, classification and systems of supports* (10th ed). Washington DC: AAMR 1992.
- Lupski J and Stankiewicz P. *Genomic disorders: Molecular mechanism for*

- rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genetics* 2005; 1:e-49
- Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 2010; 12:742–5.
- Manning M, Hudgins L. Use of array-based technology in the practice of medical genetics. *Genet Med* 2007; 9:650–3.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapuram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 82, 477–88.
- Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele 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 imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of the literature. *J. Med. Genet.* 2006; 43: 625–33.
- Mikhail FM, Lose EJ, Robin NH, Descartes MD, Rutledge KD, Rutledge SL, Korf BR, Carroll AJ: Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *Am J Med Genet A.* 2011 Oct;155A(10):2386-96.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter

- DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86(5):749–64.
- Muhle H, Steinich I, von Spiczak S, Franke A, Weber Y, Lerche H, Wittig M, Heidemann S, Suls A, de Jonghe P, Marini C, Guerrini R, Scheffer IE, Berkovic SF, Stephani U, Siebert R, Sander T, Helbig I, Tönnies H. A duplication in 1q21.3 in a family with early onset and childhood absence epilepsy. *Epilepsia.* 2010. 51: 2453-6
- Mundhofir FE, Nillesen WM, Van Bon BW, Smeets D, Pfundt R, van de Ven-Schoobers G, Ruitkamp-Versteeg M, Winarni TI, Hamel BC, Yntema HG, Faradz SM. Subtelomeric chromosomal rearrangements in a large cohort of unexplained intellectually disabled individuals in Indonesia: A clinical and molecular study. *Indian J Hum Genet.* 2013;19: 171–8.
- National Genetics Reference Laboratory (Wessex). Comparison for cytogenetics array platforms hardware and software for use in identifying copy number aberrations in constitutional disorders. 2010; 1–18.
- Nevado J1, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, Martínez-Glez V, Mori MÁ, Santos F, García-Miñaur S, García-Santiago F, Mansilla E, Fernández L, de Torres ML, Riegel M, Lapunzina P. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. 2014.. *Genet Mol Biol.* 2014 Mar;37(1 Suppl):210-9
- Newman S, Hermetz KE, Weckselblatt B, Rudd MK. 2015. Next-generation sequencing of duplicationCNV reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. *Am J Hum Genet.* 96: 208-20.
- Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, Giarelli E, Grether JK, Levy SE, Mandell DS, Miller LA, Pinto-Martin J, Reaven J, Reynolds AM, Rice CE, Schendel D, Windham GC. The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Health.* 2007;28: 235-58.

- Nordli DR Jr. Idiopathic generalized epilepsies recognized by the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46 Suppl 9: 48–56.
- Pandolfo M. Pediatric epilepsy genetics. *Curr Opin Neurol*. 2013; 26:137-45.
- Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Ko JM, Kim HJ, Cheon CK, Hwang SH, Kang HY. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Mol Cytogenet*. 2011;4:12.
- Pérez Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, Francke U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am J Hum Genet*. 1996; 59: 781-92
- Perlis RH, Ruderfer D, Maussion G, Chambert K, Gallagher P, Turecki G, et al. Bipolar disorder and a history of suicide attempts with a duplication in 5HTR1A. *Am J Psychiatry*. 2012;169:1213–4).
- Pinkel D, Seagraves R, Suar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai I, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of ADN copy number variation using comparative genomic Hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-11.
- Plaja A, Castells N, Cueto A, del Campo M, Vendrell T, Lloveras E, Plaja A, Izquierdo L, Borregan M, Rodríguez-Santiago B, Carrió A, Miró R, Tizzano E. A novel recurrent breakpoint responsible for rearrangements in the Williams-Beuren region”. *Cytogenetic and Genome Research* (Ms No.: 201504007).
- Poduri A, Lowenstein D. Epilepsy genetics—past, present, and future. 2011; *Curr Opin Genet Dev* 21: 325–32.
- Rajangam S, Devi R. Consanguinity and chromosomal abnormality in mental retardation and or multiple congenital anomaly. *Journal of the Anatomical Society of India* 2007;56:30

- Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet.* 2007;44:306-13.
- Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadopoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1402-6.
- Ravnan 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* 2006; 43:478–89.
- Rodríguez-Andrés C, Delgado-Naranjo J, Bellón-Vázquez A. Epidemiología del retraso mental de origen genético. Análisis de la necesidad, importancia, objetivos, características, utilidad y limitaciones de un registro de casos de retraso mental de origen Genético. *Rev Neurol* 2006; 42 (Supl 1): S7-S13.
- Rodríguez-Revenga L, Vallespín E, Madrigal I, Palomares M, Mur A, García-Miñaur S, Santos F, Mori MÁ, Lapunzina P, Mila M, Nevado J. A parallel study of different array-CGH platforms in a set of Spanish patients with developmental delay and intellectual disability. *Gene.* 2013;521:82–6.
- Roselló M, Martínez F, Monfort S, Mayo S, Oltra S, Orellana C. Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014;8:1–9.
- Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med.* 2013;15:478–81
- Saam J, Gudgeon J, Aston E, Brothman AR. How physicians use array comparative genomic hybridization results to guide patient management in children with developmental delay. *Genet Med.* 2008;10:181-6



- Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genetics in Medicine*. 2009; 11, 140-6.
- Sandin S, Reichenberg A. Recurrence rates in autism spectrum disorders--reply. *JAMA*. 2014; 312: 1155.
- Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2011;12:25-51
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S, Dubourg C, Henry C, Lucas J, Odent S, Pasquier L, Copin H, Latour P, Cordier MP, Nadeau G, Till M, Edery P, Andrieux J. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases *Eur J Med Genet*. 2009, 52:291-6.
- Schluth-Bolard C, Labalme A, Cordier MP, Till M, Nadeau G, Tevissen H, Lesca G, Boutry-Kryza N, Rossignol S, Rocas D, Dubruc E, Edery P, Sanlaville D. Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. *J Med Genet*. 2013; 50: 144-50.
- Schoumans J, Anderlid BM, Blennow I, Teh BT, Nordenskjold M. The performance of CGH array for the detection of Cryptic constitutional chromosome imbalances. *J Med Genet* 2004; 41: 198-202.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57.

- Schwarz K, Ma Y, Pannicke U, Lieber MR. Human severe combined immune deficiency and DNA repair. *Bioessays*. 2003 Nov;25(11):1061-70.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 2007; 316, 445–49.
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet*. 2007; 145C: 335-45.
- Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds). *ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. S Karger, Basel 2013
- Shaffer LG: American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med* 2005; 7: 650-54.
- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC, Fitzpatrick CA, Segraves R, Richmond TA, Guiver C, Albertson DG, Pinkel D, Eis PS, Schwartz S, Knight SJ, Eichler EE. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 2006, 38: 1038-1042.
- Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005, 77: 78-88.
- Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broomer A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R,

- Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJ, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat. Genet.* 2008; 40: 322–28.
- Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S, Gimelli G, Striano P, Coppola A, Regan R, Price SM, Knoers NV, Eis PS, Brunner HG, Hennekam RC, Knight SJ, de Vries BB, Zuffardi O, Eichler EE. Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16, 567–572.
- 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 (arrayCGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J. Med. Genet.* 2004; 41: 241–248.
- Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB, Miller KJ, Frazier JA, Silverstein I, Picker J, Weissman L, Raffalli P, Jeste S, Demmer LA, Peters HK, Brewster SJ, Kowalczyk SJ, Rosen-Sheidley B, McGowan C, Duda AW 3rd, Lincoln SA, Lowe KR, Schonwald A, Robbins M, Hisama F, Wolff R, Becker R, Nasir R, Urion DK, Milunsky JM, Rappaport L, Gusella JF, Walsh CA, Wu BL, Miller DT; Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2010; 25:e727-35.
- 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. *Clinical Chemistry.* 2007;52(12): 2051–9.
- Shevell M, Ashwal S, Donley D. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2003; 60: 367–80.

- Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*. 2008; 13:760-70
- Siggberg L, Ala-Mello S, Jaakkola E, Kuusinen E, Schuit R, Kohlhase J, Böhm D, Ignatius J, Knuutila S. Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation - A study of 150 Finnish patients. *Am J Med Genet A*. 2010;152(6): 1398-410.
- 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* 1997; 20: 399-407.
- Srebniak MI, Van Opstal D, Joosten M, Diderich KE, de Vries FA, Riedijk S, Knapen MF, Go AT, Govaerts LC, Galjaard RJ. Whole-genome array as a first-line cytogenetic test in prenatal diagnosis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2015; 45: 363-372.
- Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 182-192.
- Stefansson H, Meyer-Lindenberg A, Steinberg S, Magnusdottir B, Morgen K, Arnarsdottir S, Bjornsdottir G, Walters GB, Jonsdottir GA, Doyle OM, Tost H, et al. CNV conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature*. 2014;505:361-6
- Tejada MI. Retraso Mental de Origen Genético. Presentación de la Red GIRMOGEN. *Rev Neurol* 2006; 42: S1-S6.
- Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, Fryns JP, Gewillig M, Vermeesch JR, Devriendt K. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur. Heart J*. 2007; 28, 2778-84.
- Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 769-778.

- Veltman JA and de Vries BB. Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? *J. Mol. Diagn* 2006; 8, 534–7.
- Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen BH, Janssen I, Merx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunsar HG, Smeets D, van Kessel AG. High-throughput analysis of subtelomeric chromosomes rearrangements by use of array-based comparative genomic Hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1269-76.
- Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15:1105–14.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. A based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 73: 1261–1270.
- Vorstman JAS, Staal WG, van DE, van EH, Hochstenbach PFR, Franke L: Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 2006, 11:18-28.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am. J. Hum. Genet.* 1991;49: 99S-1013.
- Watson CT, Marques-Bonet T, Sharp AJ, Mefford HC. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annu. Rev. Genomics Hum Genet.* 2014; 15: 215-44
- 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. Autism Consortium. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358, 667–675.
- WHO. Mental Retardation: Meeting the Challenge. Joint Commission on International Aspects of Mental Retardation 1989.
- Wincent J, Kolbjørn S, Martin D, Luthman A, Åmark P, Dahlin M, Anderlid BM. Copy number variations in children with brain malformations and refractory epilepsy. *Am J Med Genet A.* 2015; 167: 512-23.
- Wiwanitkit V. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6 month monitoring. *BMC Clin Pathol.* 2001; 2.001; 1: 5.
- Xu B, Woodroffe A, Rodriguez Murillo L, Roos JL, van Rensburg EJ, Abecasis GR, Gogos JA, Karayiorgou M: Elucidating the genetic architecture of familial schizophrenia using rare copy number variant and linkage scans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:16746-16751
- Zahnleiter D, Uebe S, Ekici AB, Hoyer J, Wiesener A, Wieczorek D, Kunstmann E, Reis A, Doerr HG, Rauch A, Thiel CT. Rare copy number variants are a common cause of short stature. *PLoS Genet.* 2013;9:1–11.
- Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16:172-83.
- Zhang Z, Takeshima Y, Awano H, Nishiyama A, Okizuka Y, Yagi M, Matsuo M. Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet.* 2008;53(3):215-9



# **Annexes**





## **[FULL DE TREBALL MLPA]**

Redacció

Revisió

Aprovació

Revisió

Data

Apartat

Breu descripció de la modificació

01-12-2014

Creació de la Untat d' Arrays

**FULL DE TREBALL****213**Data: **18/05/15****Dia 1 : PRE- PCR****Desnaturalización del DNA**

- Marcar els eppendorf amb els números de DNA i un adicional de control per a cada MIX
- Afegir 3'5 ml d'H<sub>2</sub>O als eppendorf amb mostres i 5 ml als control.
- Afegir 1'5 ml de DNA a cada eppendorf excepte els controls.

**- Iniciar el programa "Hibril·ligació MLPA.cyc**

- 10 minuts a 98°C i parat a 25 °C.

**Elaboració de MIX PROBEMIX (VIGILAR !!: utilitzar probemix diluït 1/10 en la MLPA de**

Total mostres MLPA comercials=	0
Total mostres MLPA Pròpia=	16
Total mostres =	16

obrats placa seqü	
	0

		Sindroms		
	mostres	16	0	0
	x1 (µl)	18	0	0
Negro	Probemix	27	0	0
Amarillo	MLPA buffer	27	0	0

Pipetejar el MLPA buffer poc a poc (és molt viscos) i no centrifugar ni vortejar el probemix.

**Hibridació de les SONDAS**

- Afegim 3 mL de PROBEMIX a cada mostra:
  - Pipeta vertical
  - Barrejar 8 o 9 veges
  - Incubar 1 minut a 95°C
  - **18 hores** a 60°C

**Dia 2 : PRE- PCR**

**Preparació de MIX lligasa:**

- preparar-la al menys 1 hora abans del seu ús y mantenir-la en gel
- tots los reactius i els productess tenen que estar en gel

		x1 (µl)	18
Transparent	LIGASE-65: BUFFER A	3	54
Blanc	LIGASE-65: BUFFER B	3	54
	H2O	25	450
Verd	LIGASE-65: SALSA	1	18

- Un cop preparada la MIX lligasa, òrtex, centrifuga i gel (vigilar que no es congeli)

**Reacció de lligació**

- El programa del termociclador és per a 54°C
- Afegir 32 µL de MIX lligasa-65 a cada mostra y barrejar pipetejant 8 - 9 veces amb cura

**-Iniciem el programa "MLPA lligació" .**

- Incubar 18' a 54°C per a fer la lligació.
- Incubar 5' a 98°C per inactivar la lligasa.
- Acabar a 4°C infinit.
- Aquí tenim els tubs amb la reacció de lligació feta. Marcar-los amb una ratlla lateral .
- Guardar congelats els eppendorf amb la lligació fins al seu ús

**NOTA:** hacer la reacción de PCR separada para los kits comerciales y propios (UPF) **NOTA:**

NOTA:

**Reacció de PCR (MLPA COMERCIAL)**

MLPAs: - \_\_\_\_\_

- Descongelar a la nevera els eppendorf amb el producte de lligació.
- Descongelar a la nevera tots els reactius excepte la **Salsa Polimerasa**.
- Marcar nous eppendorf amb el número de cas i els posar-los en l'última fila del rack.

**Preparació de la BUFFER MIX**

	x1 (µl)	0
<b>H2O</b>	21	0
<b>Salsa PCR bufer</b> (vortex suave y spin)	4	0

Vermell

- Vortejar el **BUFFER MIX** y centrifugar

**Preparació de la MIX POLYMERASA:**

	x1 (µl)
<b>H2O</b>	5,3
<b>Salsa Enzyme dilution buffer</b> (vortex suave y spin)	2
<b>Salsa FAM PCR primers</b> (no vortex). !!!!!!!Ver nota!!!!!!!	2
<b>Salsa Polymerasa</b> (3 U, no vortex)	0,7

Blau

Marró

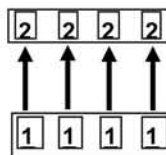
- **Fam** y **MIX** tapats con paper d'alimini
- Un cop preparat el mix, vortex suau i gel.

**Atenció: NOMES UTILITZAR VIALS de "Salsa FAM PCR primers" SENSE LOGO MRC HOLLAND A L'ETIQUETA (protocol antic)**

- - Preparam la **BUFFER MIX** i posem 25 µl en cada eppendorf nou (última fila).
- Posar en un rack nou els eppendorf amb producte de lligació (marcat amb ratlla lateral)

- Afegim 15 µmL de producte de lligació [1] als tubs que contenen **BUFFER MIX** [2]

- Passem els eppendorf al termociclador.

**BUFFER MIX****Prd lligació (****- Posem en marxa el programa PCR MRC HOLLAND.cyc**

- Es per al programa en el 1r pas (temperatura 60°)..
- Afegim 10 µl de 'MIX POLIMERASA a cada eppendorf (barrejar pipetejant).
- (30 segons a 95°C + 30 segons a 60°C + 60 segons a 72°C) x 35 CICLES
- Acabar amb 20 minuts d'incubació a 72°C (es guarda al congelador)
- Preparar la placa para el analizador genético o guardar en el congelador a -20°C

**Reacció de PCR (MLPA PROPIA: UPF)****MLPAs:** Síndroms

- Descongelamos en nevera los eppendorf con el producto de lligació.
- Descongelamos en nevera todos los reactivos **excepto la Salsa Polimerasa**.
- Marquem nous eppendorf amb el número de cas i els posem a l'última fila del rack.

**Preparació del BUFFER MIX**

	x1 (µl)	18
H <sub>2</sub> O	21	378
Vermell Buffer salsa PCR (vortex suave y spin)	4	72

- Vortejar el **BUFFER MIX** i centrifugar

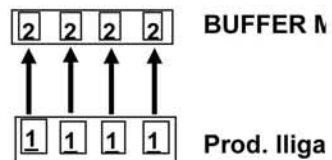
**Preparació de la MIX POLYMERASA:**

	x1 (µl)
H <sub>2</sub> O	3,4
Tampn 10x sin Mg (vortex suave i spin)	2
PCR primers MLP-FAM (no vortex)	1,8
PCR primers MLP-HEX (no vortex)	1,5
DNTPs (100mM) (vortex suave i spin)	0,5
EcoTac Polymerasa (3 U, no vortex)	0,8

- **Fam, Hexx y MIX** tapats amb paper d'alur
- Un cop preparat el mix, vortex suave i gel.

- Preparem la BUFFER MIX i posem 25 µl en cada eppendorf nou (última fila).
- Posar en un rack nou els eppendorf amb producte de lligació (marcat amb ratlla lateral)

- Afegim 15µl de producte de lligació [1]  
als tubs amb BUFFER MIX [2]



- Passem els eppendorf al termociclador.

**- Posem en marxa el programa PCR MLPA UPF.cyc**

Posem en marxa el programa PCR MLPA UPF.cyc

- Afegim 10 ml de d'MIX POLIMERASA a cada eppendorf i reiniciem el programa.
- (30 segundos a 95°C + 30 segundos a 60°C + 60 segundos a 72°C) x 30 CICLOS
- Acabar amb 20 minuts d'incubació a 72°C (es guarda al congelador)

**Preparació del mix pe ra seqüenciación:**

	x1 (µl)	18
ROX-500 (marcador estàndard)	0,4	7,2
FORMAMIDA (desionitzada)	14	252

**Muntatge de la placa per seqüenciació**

- - Marquem amb retolador els gerres de la placa de seqüenciació que utilitzarem.  
(Cal usar pouets en múltiples de 16, sempre primer fila imparell i després parell)
- Posem 14'4 µl del mix de seqüenciació en tots els vasos.
- Posem 0,9 µl (µIPA UPF) o 1,5 µl (µIPA comercial) de cada producte de PCR cada vaset.
- Omplir amb H<sub>2</sub>O els vasos buits que falten per Omplir les columnes.
- Un cop muntada la placa desnaturalitzar-3 minuts a 96°C (en el termociclador).

**(VIGILAR!!! material post PCR: evitar el contacte de la placa amb el taulell)**

- Cobrir la placa amb paper de plata i guardar congelada fins al seu ús (no mes de 15 dies).
- Omplir la planilla del seqüenciador.
- Pasar la placa per el seqüenciador segons programa.

## RESPONSABILITATS

Procés	Codi del lloc de treball
MLPA	GE-AR-FAC-01
MLPA	GE-AR-TEC-01

## DOCUMENTACIÓ ASSOCIADA

LLI-AR-2	Registre de DNAs
GE-AR-M-03, GE-AR-M-04	Extracció d'ADN
GE-AR-M-07	MLPA



UPF

**Síndroms****(N= 16)**

Posició	DNA	μL DNA	Comentarios		
1	4827		del 22 A133.		
2	4716		dup 16. MLPA no lo confirmo bien. ¿Mosaico?		
3	4792		dup 16p11.2 A137		
4	4853		dup 1q21 A137		
5	4763		A129		
6	4778		A129		
7	4768		A129		
8	4766		A129		
9	4793		A130		
10	4635		A130		
11	4781		A130		
12	4780		A130		
13	4772		A131		
14	4686		A131		
15	4762		A131		
16	CS-				
17					
18					
19					
20					
21					
22					

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

**Redacció**

**Revisió**

**Aprovació**

Facultatiu Responsable de la  
Unitat d' Arrays

Responsable de la tècnica  
Unitat d' Arrays

Facultatiu Responsable de la  
Unitat d' Arrays

## 1 OBJECTE I CAMP D'APLICACIÓ

Descripció i protocol tècnic detallat de la tècnica d'Array CGH per a la detecció d'anomalies de còpia en el material genètic. El full Excel calcula automàticament els volums de reactiu necessaris en funció del nombre de mostres.

## 2 DESCRIPCIÓ DE LA TÈCNICA

**1.1** La tècnica d'Array CGH (Competitive Genomic Hybridization) consisteix en la detecció d'anomalies de còpia del DNA (guanys o pèrdues) mitjançant la hibridació competitiva d'un DNA control i un ADN problema marcats amb fluorocroms de color diferent (**vermell i blau/verd**) sobre una matriu amb milers de punts contenint còpies d'uns determinats oligonucleòtids immobilitzades a la plataforma. El color de la fluorescència indica la proporció entre el DNA control i del pacient: si el control és de color **vermell** i el pacient **blau/verd** una fluorescència groga indica la mateixa quantitat de DNA en pacient i control, verdosa indica més quantitat de DNA del pacient i color vermellós indica menys quantitat de DNA del pacient.

## 3 REACTIUS I MATERIAL

### • Reactius

- Alu 1 (10 U/ $\mu$ l)
- Rsa (10 U/ $\mu$ l)
- KITS MARCATGE/HIBRIDACIÓ distribuït per Genycell o Agilent
- Buffer de rentat 1 (Agilent 5188-5221)
- Buffer de ltatren 2 (Agilent 5188-5222)
- Aigua destilada
- Columnes Amnicon per a purificació DNA marcat
- Buffer TE 1x

### • Material

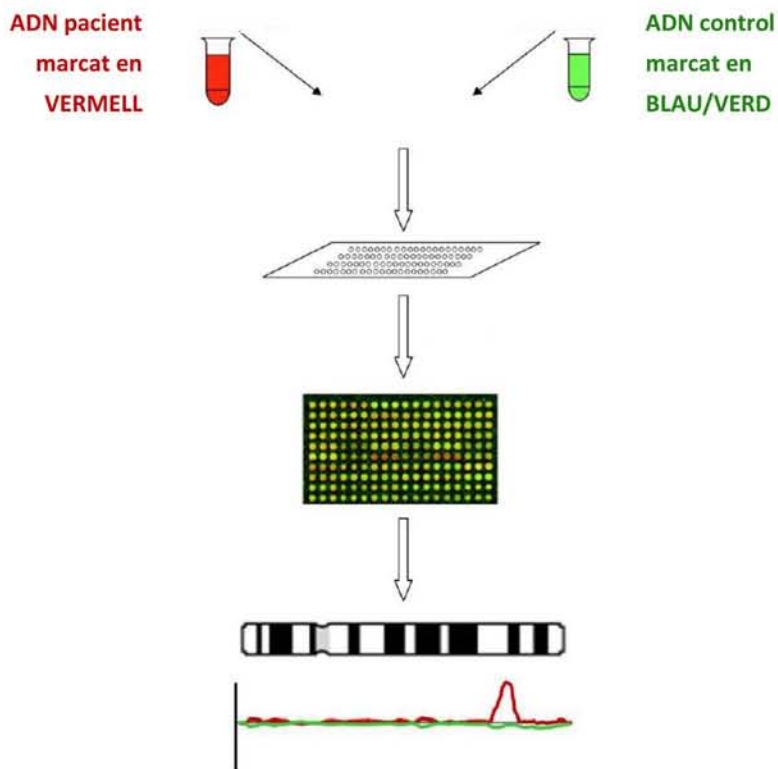
- Termociclador (PCR-AR-02)
- Scanner d'arrays (HYB-AR-02) i ordinador (PC-AR-06)
- Campana d'ozó (COZ-AR-01)
- Forn d'Hibridació (HY-AR-01)
- Micròfuga (CEN-AR-06)
- Eppendorf 0,2 ml
- Eppendorf 1,5 ml
- Pipetes automàtiques 0-10, 10-100, 1000-1000  $\mu$ l
- Speed Vac (SV-AR-01)
- Nanodrop (Unitat de Biologia Molecular)
- Bany maria (BM-AR-01)
- Vortex (MIX-AR-01)
- Suport metàl·lic per a hibridar arrays
- Suport plàstic per a hibridar arrays
- Timer
- Imans per agitació
- Pinces

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

- 3 Coplins amb cistell
- Bany sec 37°C y 95°C (BS-AR-01 y BS-AR-02)
- Pipetes automàtiques 0-10, 10-100, 100-1000 µl, amb les respectives puntes sol ús.
- Gradeta de fred o cubeta de gel aptes para Eppendorffs de 0.2 y 1,5 µl

Procediment operatiu:



**NOTA:** Les quantitats en les diverses taules estan ajustades per a un uns valors determinats de reactius en excés.

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

### DIA 1

#### Control de la concentració i qualitat de l'ADN (Nanodrop)

És extremadament important la qualitat de l'ADN: ha de tenir una alta puresa i NO HA D'ESTAR FRAGMENTAT o degradat. Els ADNs procedents de material parafinat i extracció amb la majoria dels robots (especialment de boles magnètiques i resines) no són adequats.

- Es Necessiten 300- 500 ng de DNA, amb una concentració aproximada de 150 ng / ml.
- El Quocient A260 / A280 ha d'estar entre 1,8 i 2,0 (contaminació per proteïnes)
- El Quocient A260 / A230 ha de ser major de 2,0 (contaminació per alcohol, fenol, etc.)

Introduir en la Taula I (dades de les mostres analitzades) la identificació (núm. De DNA) de les 16 mostres a analitzar, la raó d'anàlisi i el sexe.

Data: 25-08-15

Array "8x8" n°

158

Comentaris:

TAULA I

#### Treure les comes

	N. serie array 254138210088-A158	ADN	[ADN] ng/ µL	AVISOS	COMENTARIS	SEXE	MLPA?
A	2.1	5104	105,58	OK	Incerta 10q A156. Eill no es	Home	NO
B	2.2	5116	147,99	OK	dup 1q A156. VIGILAR!! anc	Dona	NO
C	2.3	5107	166,12	OK	del incerta chr10 A156	Home	NO
D	2.4	5068	109,08	OK	Mare dup 7q37	Dona	NO
E	1.1	5069	168,18	OK	Llavi fes	Dona	SI
F	1.2	4994	108,98	OK	DiGeorge?	Home	SI
G	1.3	5072	133,47	OK	CC	Home	SI
H	1.4	5114	163,77	OK	TEA Urgent. Mare embarça	Home	SI
A	2.1	5114	116,13	OK	TEA Urgent. Mare embarça	Home	SI
B	2.2	5180	142,88	OK	Neonat.dismòrfa fenotip pe	Dona	NO
C	2.3	5179	149,63	OK	Talla baixa	Home	NO
D	2.4	5079	147,34	OK	RGD, dismòrfiali agenèsia r	Dona	SI
E	1.1	5143	170,01	OK	Epilèpsia	Dona	NO
F	1.2	5144	141,85	OK	Di. TEA.	Home	NO
G	1.3	5146	136,37	OK	Neonat. Hipotonia.RessoM	Home	NO
H	1.4	5080	132,53	OK	A156 posible artefacto 2p23	Home	NO

- Retolar 8 Eppendorfs de 0,5 ml en **vermell** i 8 en **blau/verd** amb les lletres A a l' H.
- Assignar a cada lletra un nombre de DNA. A partir d'ara només s'utilitzaran les lletres A a l'H (en **vermell** i **blau/verd**)
- Mesurar tots els ADNs i preparar una dilució per aconseguir una concentració aproximada de 150 ng / ml.
- Mesurar tots els ADNs diluïts i copiar les mesures a la Taula I (dades de les mostres analitzades).
- Omplir cada Eppendorf, retolats amb lletres en color, amb aigua i DNA per obtenir 10.10 µl de DNA a una concentració de 500 ng / ml. A la Taula II es realitza el càlcul automàticament.

# [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

<b>CY3</b>	<b>EPPENDORF</b>	<b>ADN</b>	<b>µL H2O</b>	<b>µL ADN</b>	<b>Vol, total</b>
	<b>A</b>	5104	5,4	4,7	10,10
	<b>B</b>	5116	6,7	3,4	10,10
	<b>C</b>	5107	7,1	3,0	10,10
	<b>D</b>	5068	5,5	4,6	10,10
	<b>E</b>	5069	7,1	3,0	10,10
	<b>F</b>	4994	5,5	4,6	10,10
	<b>G</b>	5072	6,4	3,7	10,10
	<b>H</b>	5114	7,0	3,1	10,10

<b>CY5</b>	<b>EPPENDORF</b>	<b>ADN</b>	<b>µL H2O</b>	<b>µL ADN</b>	<b>Vol, total</b>
	<b>A</b>	5114	5,8	4,3	10,10
	<b>B</b>	5180	6,6	3,5	10,10
	<b>C</b>	5179	6,8	3,3	10,10
	<b>D</b>	5079	6,7	3,4	10,10
	<b>E</b>	5143	7,2	2,9	10,10
	<b>F</b>	5144	6,6	3,5	10,10
	<b>G</b>	5146	6,4	3,7	10,10
	<b>H</b>	5080	6,3	3,8	10,10

A	A (5104, Cy3) + A (5114, Cy5)
B	B (5116, Cy3) + B (5180, Cy5)
C	C (5107, Cy3) + C (5179, Cy5)
D	D (5068, Cy3) + D (5079, Cy5)
E	E (5069, Cy3) + E (5143, Cy5)
F	F (4994, Cy3) + F (5144, Cy5)
G	G (5072, Cy3) + G (5146, Cy5)
H	H (5114, Cy3) + H (5080, Cy5)

D	C	B	A	Agilent	Nº. Serie 254138210088-A158
H	G	F	E		

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

### DIA 2

#### Digestió de l' ADN

- Descongelar el BSA acetilat i el Buffer C 10x. Vòrtex suau.
- Preparar el MASTER MIX DIGESTIÓ, afegint els enzims en l'últim moment (mantenir fred fins al seu ús):

#### MASTER MIX DIGESTIÓ

Reactius (en µL )	x1	1 array	2 arrays
H2O	1	18	36
10x buffer C	1.3	23.4	46.8
BSA acetilat(10 µg/µL)	0.1	1.8	3.6
Alu I (10 U/µL)	0.25	4.5	9
Rsa I (10 U/ µL)	0.25	4.5	9
<b>Volum final</b>	<b>2.9</b>	<b>52.2</b>	<b>104.4</b>

- • Afegir a cada Eppendorf amb ADN 2,9 µl de Màster Mix pipetejant repetidament.
- • Posar al termociclador amb el programari "DIGESTIÓ" (2h 37°C, 20 '65°C, ∞ 4°C)  
(Es pot guardar a -20°C, però és millor seguir el protocol).

#### A partir d'aquí treballar dins la CAMPANA D' OZÓ

- • Preescalfar (s'usessin al hibridar)
- • 2 termoblocs a 95°C i 37°C.
- • el forn d'hibridació a 65°C amb la campana encesa una hora abans.
- 
- 

#### Marcatge fluorescent de l'ADN

- Afegir 2,5 ml de *Random primer* a cada tub de DNA digerit (volum final de 15,5 ml), pipetejant suaument per barrejar.
- Posar al termociclador amb el programari "desnaturalització" (3 '95°C, ∞ 4°C).
- Fer un pols de centrifuga a 6000 g
- Preparar dos Eppendorf (Cy3 i Cy5) amb els MASTER MIX MARCATGE.

Nota: Protegir el buffer 5x de la llum: es torna groga, però no afecta l'activitat

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

<b>CY3</b>	<b>Preparació MASTER MIX MARCATGE Cy3</b>		
------------	---	--	--

Reactius (en µl)	x1	1 array	2 arrays
5x buffer	5	45	90
10x dNTPs	2.5	22.5	45
Cyanine 3-dUTP (1 mM)	1.5	13.5	27
Exo-Klenow	0.5	4.5	9

<b>Volum final</b>	<b>9.5</b>	<b>85.5</b>	<b>171</b>
--------------------	------------	-------------	------------

<b>CY5</b>	<b>Preparació MASTER MIX MARCATGE Cy5</b>		
------------	---	--	--

Reactius (en µl)	x1	1 array	2 arrays
5x buffer	5	45	90
10x dNTPs	2.5	22.5	45
Cyanine 5-dUTP (1 mM)	1.5	13.5	27
Exo-Klenow	0.5	4.5	9

<b>Volum final</b>	<b>9.5</b>	<b>85.5</b>	<b>171</b>
--------------------	------------	-------------	------------

- Afegir 9,5 ml de màster mix Cy3 als Eppendorf VERMELLS i 9,5 ml de Cy5 als BLAUS (vol final 25 ml) i barrejar pipetejant suaument
- Posar al termociclador amb el programari "MARCAT". (2h 37°C, 10' 65°C, ∞ 4°C).



## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

### Purificació de l'ADN marcat

- Disposar en un rack:
- Primera fila: 16 Eppendorf de 1.5 ml amb 455 ml 1x TE (pH 8)
- Segona fila: 16 contenidors Amicon marcats a la tapa (lletres A-H en **vermell** i A-H en **blau / verd**) amb una columna Amicon 30kDa.
- Tercera fila: 8 contenidors Amicon marcats a la tapa (lletres AH en negre).
- Disposar els Eppendorf amb DNA davant de la primera fila, mirant que es corresponguin les lletres
- Per a cada mostra:
- Afegir 50 ml de 1x TE (pH 8) procedent del Eppendorf de la primera fila al Eppendorf de 0,5 ml amb el DNA marcat
- Pipetejar suaument per barrejar
- Passar els 75 ml a Eppendorff amb 405 ml de 1xTE
- Pipetejar suaument per barrejar i passar els 480 ml a la columna Amicon de la primera fila.
- Microfugar 14 'a 8000G i descartar l'eluent del contenidor amb un cop sec.
- Afegir 480 ml de 1x TE (pH 8) a tots les columnes Amicon.
- Microfugar 14 'a 8000G i descartar els contenidors amb eluent.
- Posar les columnes invertides de mostres **Cy3** en els 8 contenidors nous de l'última fila.
- Microfugar 1 'a 8000G. S'obtenen aproximadament 21 ml d'eluent per mostra.
- Substituir els filtres invertits Cy3 pels filtres invertits **Cy5** amb la mateixa lletra.
- Destinar a "speed vac" (40-41°C, 20 ") per aconseguir volum final de 16 ml. Mesurar amb una pipeta i afegir aigua destil·lada si cal.

### Hibridació de l'Array

Preparar el MASTER MIX HIBRIDACIÓ

#### Preparació MASTER MIX HIBRIDACIÓ

Reactius (en µL)	1 x	1 array	2 arrays
Cot-1 DNA (1 mg/mL)	2	20	34
Agent de bloqueig 10x (*)	4.5	45	76.5
Buffer Hi-RPM 2x	22.5	225	382.5

Volum final	29	290	493
-------------	----	-----	-----

- **NOTA:** el buffer Hi-RPM produeix molta escuma. Posar en últim lloc i pipetejar molt lentament.
- **NOTA:** Si cal, preparar Agent de bloqueig 10x:
- Afegir 1350 ml d'aigua sense nucleases al vial amb agent de bloqueig 10x liofil·litat.
- Deixar 60 'a T ambient i vortex per dissoldre
- al·lotjar 50 ml en Eppendorffs i guardar congelat a -20°C fins al seu ús
- Posar 29 ml de Màster Mix en els contenidors Amicon amb DNA marcat (volum final 45 ml).

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

Pipetejar molt lentament per barrejar. 3' a 95°C en calor sec en el termobloc (PERILL DE CREMADA!!: fer servir pinces). VIGILAR!! !!: segellar les tapes dels eppendorf amb parafilm i posar un pes a sobre dels contenidors Amicon, ja que amb la calor tenen tendència a destapar.

- Passar els contenidors Amicon a un bany sec a 37°C i incubar 30 '.
- Treure el suport metàl·lic del bany sec i mantenir els contenidors Amicon dins el màxim temps possible per evitar que es refredin.
- Centrifugar 1 'a 6000 r.p.m. (IMPORTANT: evita bombolles) i retornar els contenidors Amicon al suport metàl·lic del bany sec.
- Posar en el suport del muntatge metàl·lic per al forn una cobreobjectes net (amb gomes) (etiqueta Agilent dalt)
- Posar 42 ml de DNA marcat (afegir aigua tèbia si cal) en els 8 vasets del cobreix d'acord al següent esquema:



- Treure el vector de envàs (no tocar la cara "Agilent") i anotar el núm. De SÈRIE al full de treball.
- Col·locar l'array amb la paraula "Agilent" baix ("Agilent" contra "Agilent") formant un muntatge array / cobreix.
- Col·locar la tapa del muntatge metàl·lic, córrer el tancament i fixar estrenyent el cargol.
- Girar la càmera per mullar les gomes i confirmar que les bombolles es mouen
- (si cal colpejar contra la taula el muntatge metàl·lic per mobilitzar les bombolles).
- Col·locar el muntatge metàl·lic al forn d'hibridació a 20 rpm i 65 °C (equilibrar pesos) i deixar hibridant 24-26 hores.
- Preparació dels rentats d'hibridació: Posar a l'estufa a 37°C 250 ml de buffer 2 (ampolla tancada) i deixar fins al dia següent. Ull !!: el buffer 2 és inflamable.

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

### DIA 3

### CAMPANA D'OZÓ

### Rentat de l' Array

- Preparació dels rentats d'hibridació:
  - Submergir 1 ampolles amb 250 ml de Buffer 1 NOU al Bany Maria amb aigua d'aixeta a 40-45°C i deixar fins que refredi.
  - Encendre la campana d'ozó.
  - Encendre el bany Maria a 37°C i preescalfar un *tupper* amb aigua i la cubeta C amb un imant i l'elevador de tefló (bany M.. Dins de bany M<sup>a</sup>).
- Preparar una cubeta de vidre (A) amb 250 ml d'buffer 1 reciclat
- Preparar una cubeta de vidre (B) amb buffer 1 nou, un imant, l'elevador de tefló i una cistella de vidre. Posar-ho en l'agitador a temperatura ambient.
- - Quan el bany Maria estigui a 37 °C, afegir 250 ml del buffer 2, que està pre-escalfat a l'estufa. Encendre l'ordinador i després l'escàner. Quan s'il·luminin els pilots verd i marró obrir el programari d'escaneig per permetre que els làsers es vagin escalfant.
- Treure el muntatge metàl·lic del forn i comprovar que les bombolles es mouen.
- Afluixar el cargol del muntatge, obrir i treure la tapa metàl·lica.
- Treure el muntatge array / cobreix l'armadura metàl·lica tenint cura que no es separi (usar suport separador).
- Submergir el muntatge (codi de barres numèric dalt) a la cubeta amb buffer 1reciclat.
- Obrir el muntatge introduint una pinça de plàstic entre l'array i cobreobjectes (extrem amb etiquetes). El cobreobjectes amb gomes caurà al fons.
- Agitar breument l'array en el buffer 1 reciclat i passar-lo amb rapidesa al cistell de la cubeta B (Buffer 1 nou, T ambient). Disposar l'array amb la cara "Agilent" mirant al centre de la cubeta (No tocar la cara "Agilent" i no processar més d'un array en paral·lel)
- Connectar l'agitador i deixar 6 'a 900 rpm a la cubeta B. És important aconseguir una agitació vigorosa. Moure l'array per ajudar a desprendre bombolles (l'imat ha de causar una petita depressió a la superfície del líquid).
- Quan faltin 15 " per acabar, posar el tupper amb la cubeta C amb Buffer 2 a 37°C en l'agitador.
- Passar la cistella amb arrays de la cubeta B a la cubeta C i rentar 1 'en Buffer 2 en agitació a 900 rpm ia 37°C.
- Treure l'array molt lentament evitant la formació de gotes a la superfície. (si queda alguna gota, colpejar la vora de l'array contra un filtre per expulsar-)
- Col·locar l'array en un dels suports de plàstic del lector d'arrays (cara "Agilent" dalt), tancar i posar en la posició 1 del carrusel de l'aparell (deixar lliure la 0 que coincideix amb el braç retràctil). Escanejar immediatament

**Nota:** El detergent i retolador deixa residus fluorescents. Rentar i aclarir només amb aigua.

**Nota:** Llençar tots els reactius excepte el contingut de la cubeta B (Buffer 1 nou) que es guarda per a la cubeta A del següent dia.

Nota: els marcadors fluorescents utilitzats són sensibles a la llum, els productes de marcat s'han d'emmagatzemar en una caixa fosca o embolicats en paper d'alumini.

## [FULL DE TREBALL ARRAY-CGH]

LABORATORIS CLÍNICS VALL D'HEBRON

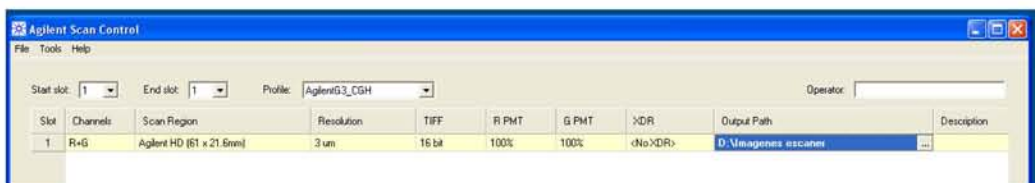
Nota: el fluorocrom Cy5 és sensible a l'ozó. La seva concentració ambiental és molt variable i depèn de factors com la proximitat al mar, les hores de llum solar, etc. Per tant, des del moment que es comença a fer servir fluorocroms (pas següent a la digestió del DNA) fins a la seva lectura en l'escàner es necessita un ambient baix en ozó (campana d'ozó).

### OBTENCIÓ i ANÀLISI DE DADES

- Un cop hibridat l'array, es fotografia a l'escàner SCN-AR-01. La imatge s'analitza amb el programari "Agilent Feature Extraction" que realitza una sèrie de correccions de la imatge, elabora una sèrie de paràmetres que permeten avaluar la qualitat de l'array i transforma a valor numèric la fluorescència de cada punt de fallida. Les dades elaborades per "Feature Extraction" són analitzats pel programari "Cytogenomics", que detecta les regions amb guanys i delecions. Finalment, s'utilitza el programari "EasyArray" per avaluar la rellevància clínica de les anomalies de còpia detectades i emetre els informes
- **S'assumeix que s'ha col·locat l'array en el seu suport de plàstic a la segona ranura del carrusel de l'escàner.**
- **Obrir l'ordinador (PC-AR-03): connectat al escanner (SCN-AR-01)**  
**User name: XXXXXXXX**  
**Password: XXXXXXXX**
- Al centre de la pantalla apareixen en ordre d'ús dels accessos directes dels programes d'escaneig de l'array (Agilent Scan Control), per visualitzar la imatge escanejada (Feature Extraction), la carpeta on se sol gravar la imatge escanejada (Imatges escàner ), el programari d'anàlisi del Array (Agilent cytogenomics) i la carpeta on queden gravats els resultats de l'anàlisi (resultats cytogenomics).
- Quan s'hagi inicialitzat PC-AR-03, connectar el lector de arrays SCN-AR-01, i esperar que s'inicialitzi. (pilot frontal verd d'escàner il·luminat fix.
- NOTA: la connexió és fluixa i cal empènyer suaument el USB blanc que hi ha a la part posterior de l'ordinador cap a l'esquerra per aconseguir que es connecti (se sent un senyal acústic)
- Quan el lector d'arrays SCN-AR-01 s'hagi inicialitzat obrir el programari Agilent Scan Control i esperar que els làsers de l'escàner s'escalfin.

### ADQUISICIÓ DE LA IMATGE

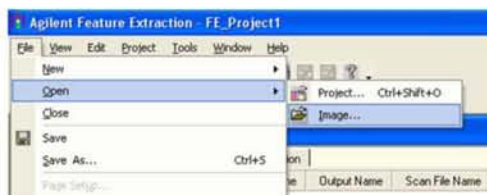
- Esperar fins que a la finestra inferior del programari Agilent Scan Control posi "Lasers Ready"
- Confirmar que les opcions del programari són correctes (sobretot el "Start slot", "End slot" i el "Output Path")



- Clicar la tecla inferior dreta "Scan"



- El programari triga uns 10 minuts. Al final surt una finestra informativa que cal tancar. Tancar també el programari Agilent Scan Control.
- Lectura de la imatge escanejada: Es compta amb una còpia del programari Feature extraction per permetre obrir les imatges escanejades i realitzar una inspecció visual.



- És útil consultar l'opció Color / Color Display Range per veure la fluorescència general. L'ideal és que la fluorescència en els dos canals sigui similar.



Si la imatge és correcta tancar l'escàner, el programari "Agilent Scan Control" i la campana d'ozó.

- Obrir el programari CytoGenomics



- Surt la finestra "Error in fetching logged-in DNS Domain". No fer cas i oprimir OK. El mateix amb la finestra "You do not have permission ..."
  - Anar a la pestanya "Analysis", oprimir la tecla inferior dreta "Add TIFF image (s)". Cercar la imatge i seleccionar-la.
  - Clicar les tecles "Next" i "Run" segons vagin apareixent.
- 
- Es poden revisar els resultats a la pestanya "Sample review". Cal seleccionar les mostres a analitzar i oprimir la tecla inferior "Triage View"

## ANÀLISI DE LES DADES OBTINGUDES

- Els resultats de cytogenomics (IntervalBasedReport, FE report, Cyto report, etc) es troben a la carpeta accessible amb l'accés directe: interessa sobretot revisar el FE report (qualitat) i el cytoreport (resum troballes)

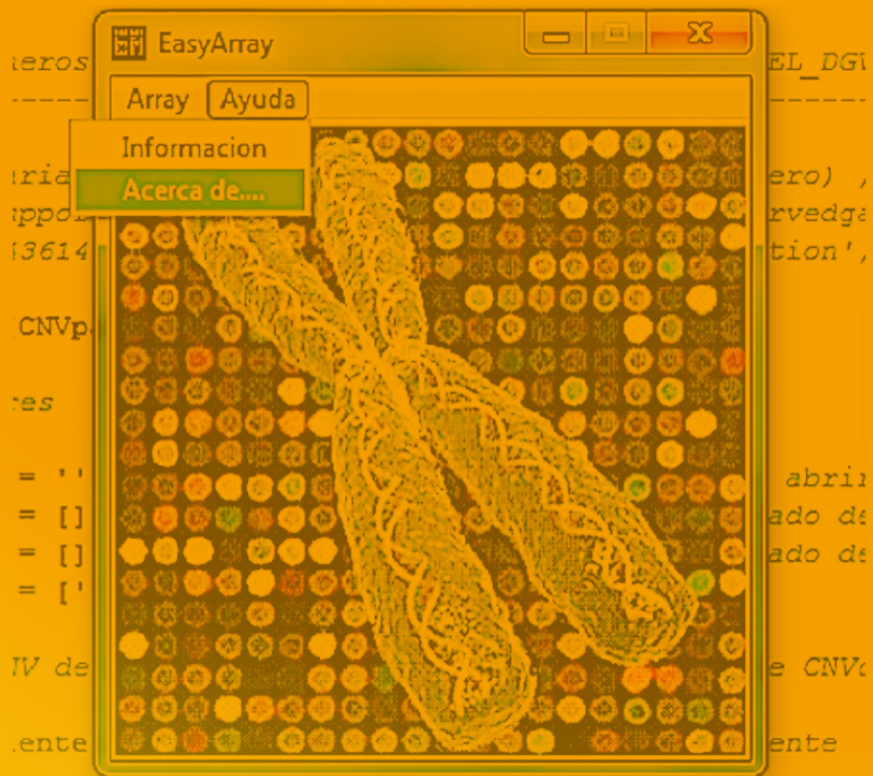


- A partir d'aquests fitxers el programari "Easy Array" realitza la comparació amb controls normals, base de dades de gens i síndromes i permet l'anàlisi completa

## BIBLIOGRAFÍA

Insert de los fabricantes ([http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4410-90010\\_CGH\\_Enzymatic\\_7.3.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4410-90010_CGH_Enzymatic_7.3.pdf))





**UAB**  
Universitat Autònoma  
de Barcelona

  
Vall d'Hebron  
Hospital