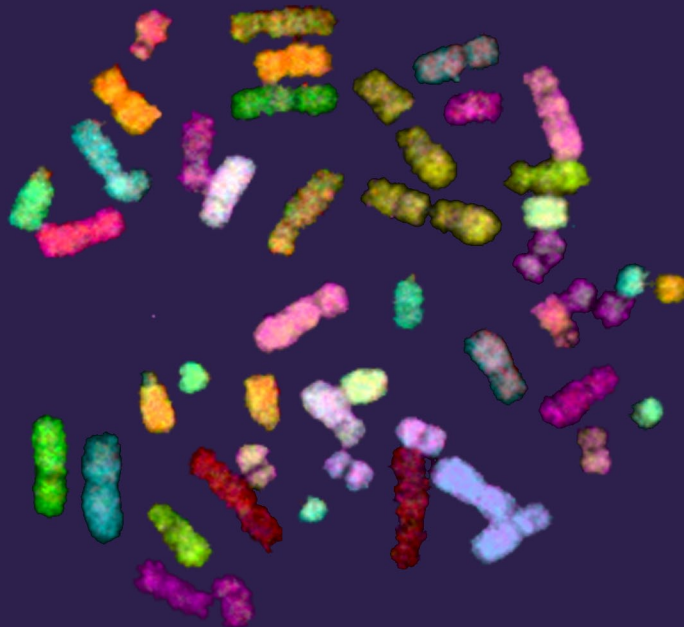


Aplicació de la citogenètica molecular a la genètica mèdica: malformacions congènites i infertilitat



Mònica Santos Verdaguer
Tesi doctoral, 2007

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

**Aplicació de la citogenètica molecular a la
genètica mèdica:
malformacions congènites i infertilitat**

Memòria presentada per
Mònica Santos Verdaguer

Per optar al títol de
Doctor en Biologia

Tesi dirigida per
Dra. Carme Fuster Marqués

*Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona*

Directora

Doctoranda

Carme Fuster

Mònica Santos

Amb el suport econòmic:

Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2003-03894), CIRIT (SGR05-00495)

Generalitat de Catalunya (Beques 2002FI00281 i 2005BE00172)

Als meus pares, Joan i Magdalena,

a la Sílvia,

a l'Albert,

Agraïments:

Encara que sembli mentida aquesta també és una part difícil de la Tesi. És complicat resumir totes les ajudes que s'han rebut sense deixar-se a ningú. Per això, primer de tot, demano perdó si m'oblido d'algú que m'hagi ajudat en algun moment d'aquest llarg trajecte.

Començaré doncs, per agrair a la Carme l'oportunitat que m'ha donat de fer una Tesi sobre un tema que trobo fascinant i per confiar en mi en tot moment. I també a en Jordi, la Quima, la Montse, la Rosa i la Cristina per acollir-me amb els braços oberts durant tots aquests anys. Vull agrair i recordar especialment a l'Egozcue que va ser qui amb les seves lliçons de citogenètica (per dir-ho d'alguna manera ja que en les seves classes s'aprenia de tot) em va fer admirar, estimar i despertar inquietuds en temes de ciència fins al punt d'acabar fent una Tesi doctoral.

A les institucions que han donat suport econòmic per aquest projecte (Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2003-03894), CIRIT (SGR05-00495), Generalitat de Catalunya (Beca 2002FI00281 i 2005BE00172). Als centres privats i públics que han col·laborat en l'estudi, incloent clínics com en German Rodríguez-Criado, l'Antonio González-Meneses, la Teresa Vendrell, l'Esther Gean...i citogenetistes com la Luz Míguez, l'Isabel López, l'Alberto Plaja, la M^aRosa Martorell, la Pilar Grao, la M^a del Mar Pérez, la Marta Carrera, la Roser Pujol...a la Míriam Guitart, la M^aDolors Coll i l'Emma Triviño per proporcionar-me les mostres de retinoblastoma i també a les famílies, en especial als nens que hi han participat ja que sense ells aquest treball no hagués estat possible.

Vull donar les gràcies també a altres departaments com el de Microbiologia de l'IBB per deixar-me disposar en tot moment de les seves instal·lacions per cultivar BACs i també al de Biofísica per l'espectrofotòmetre.

A l'Àngels per saber com mantenir un laboratori ordenat, pels cultius i també per alguna que altra conversa i també a l'Anna, la secre, que sempre et rep amb un somriure.

A en Jordi, l'Ignasi i en Pere (el trio), a l'Ester, la Maria i l'Imma (l'altre trio) pels consells i paraules d'ànim.

A la Bea, la Montse, la Núria, la Meri, l'Elsa, en Pedro i en Miguel per ser tan bons companys de despatx, compartir converses, preocupacions, congressos...

A l'Anna, la mossa, a l'Ari (la meva "pupila"), la Cristina, en Jorge, la Gemma, la Yolanda, la Laia, la Raquel, a l'Albert (de les terres del Nord com jo) per les xerrades, farres...i més farres i també a en Javi que m'ha escoltat i ajudat en tot moment tant entre pipetes, ordinadors com copes.

Agrair especialment el recolzament que m'han donat i tot el que m'han ensenyat a la Cristina (la meva mentora), la M^aÀngels (endavant les atxes) i la Rosana ja que sense elles no hagués estat possible arribar fins al final.

També vull agrair als "alemanys" que m'acollissin al seu centre i em tractessin tan bé. L'estada a Alemanya em va permetre aprendre molt sobre ciència i també conèixer gent molt maca com en Thomas, l'Anita, l'Ivan, la Kristin, la Constanza, l'Ana mexicana, l'Anna de Bielorrússia, la Julia, la Karolina, en Fran, la Xiaoyi i en Carlos als quals els hi vull agrair el seu suport.

Als del Clínic, la Montse, la Cèlia, la Reme, la Zighe, en Joan Anton, la Irene, la Laia, en Jordi, la Carme, la Loli, l'Alba, l'altra Montse, en Pedro...entre d'altres per acollir una "citogenetista" i fer-me sentir com a casa.

Als meus amics: la Tura, la Irene, la Rosa, la Raquel, en Domingo (el padrino), l'Alba, la Marta, l'altra Rosa, l'Anna i l'Ester ...que m'han escoltat les penes i les alegries del doctorat sense queixar-se en cap moment i m'han donat forces per continuar fins el final.

En especial aquesta Tesi la dedico als meus pares, pel recolzament incondicional que m'han donat en tot moment i per cuidar-me, estimar-me i ajudar-me. A la Sílvia, la meva germaneta i amiga, que sempre ha estat al meu costat, donant-me els ànims i l'energia necessària per continuar i també per la comprensió i paciència sobretot en els últims moments de (com dic jo) estat histèric-depressiu.

Vull agrair i recordar molt especialment a la meva iaia que, entre gallines, em va ensenyar a estimar la natura i em va fer despertar l'interès en la Biologia. I també a la resta de família que sense entendre ben bé què estava fent m'han recolzat.

A en Jaume i la Trini, els meus sogres, per cuidar-me i donar-me molt ànims.

I com no a l'Albert per la paciència interminable que ha tingut amb mi, pels ànims, per l'ajuda en temes informàtics, pel que no es pot descriure amb paraules, per tot...

Ahh, no puc deixar-me en Shiro, el meu gat, que ha passat les mateixes hores que jo mateixa davant de l'ordinador fent-me suport a la seva manera (dormint).

En general, moltes gràcies a tothom!

1. INTRODUCCIÓ	3
1.1. EL PROJECTE GENOMA HUMÀ	3
1.2. DEFECTES CONGÈNITS	4
1.2.1. Factors de risc dels defectes congènits	6
1.3. TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA MOLECULAR EMPRADES PER LA CARACTERITZACIÓ D'ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES	7
1.3.1. Hibridació genòmica compartida convencional, d'alta resolució i <i>microarray</i> de CGH	7
1.3.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent multicolor	10
1.3.2.1. Multipintat o <i>Multiplex FISH</i> (M-FISH)	10
1.3.2.2. Bandeig multicolor (MCB)	12
1.3.2.3. Centromèrica (cenM-FISH)	13
1.3.2.4. Subcentromèrica (subcenM-FISH)	14
1.3.2.5. Subtelomèrica (stM-FISH)	14
1.3.3. Cromosomes artificials de bacterïes (BACs)	15
1.3.4. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	17
1.3.5. PCR quantitativa fluorescent (QF-PCR)	19
1.4. ANOMALIES CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS	20
1.4.1. Trisomies i monosomies parcials	21
1.4.1.1. Delecions i microdelecions	21
1.4.1.2. Duplicacions i microduplicacions	24
1.4.2. Translocacions	25
1.4.3. Inversions	26
1.4.4. Insercions	27
1.4.5. Cromosomes en anell	28
1.4.6. Isocromosomes	29
1.4.7. Reorganitzacions subtelomèriques	30
1.4.8. Reorganitzacions cromosòmiques complexes	31
1.4.9. Cromosomes marcadors supernumeraris	33
1.4.10. Cromosomes neocèntrics	36
2. OBJECTIUS	41

3. MATERIAL I MÈTODES	45
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC	45
3.1.1. Característiques dels pacients estudiats	45
3.1.2. Descripció clínica més detallada dels pacients amb quadre clínic	52
3.1.2.1. Pacients afectes de retinoblastoma	52
3.1.2.2. Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials autosòmiques	54
3.1.2.3. Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials en els cromosomes sexuals	57
3.1.2.4. Pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques: inversions i translocacions	58
3.1.2.5. Pacients amb cromosomes marcadors supernumeraris	59
3.1.2.6. Descripció clínica dels pacients amb cariotip normal	60
3.2. MÈTODES DE CULTIU CEL·LULAR PER L'OBTENCIÓ DE CÈL·LULES EN L'ESTADI DE METAFASE	65
3.2.1. Cultiu cel·lular a partir de sang perifèrica	65
3.2.1.1. Cultiu estàndard	66
3.2.1.2. Cultiu d'alta resolució	66
3.2.2. Cultiu cel·lular a partir de líquid amniòtic	67
3.2.3. Cultiu cel·lular a partir de vellositats corials	68
3.2.3.1. Cultiu curt	68
3.2.3.2. Cultiu llarg	68
3.3. MÈTODES D'EXTRACCIÓ D'ADN A PARTIR DE DIFERENTS TIPUS DE MOSTRA	69
3.3.1. Sang perifèrica	69
3.3.2. Líquid amniòtic	69
3.3.3. Altres teixits sense cultivar	70
3.4. QUANTIFICACIÓ DE L'ADN I DETERMINACIÓ DE LA PURESA	71
3.5. TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA CLÀSSICA	72
3.5.1. Bandes G	72
3.5.2. Bandes C	73

3.6. TÈCNIQUES D'HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> FLUORESCENT (FISH)	73
3.6.1. Hibridació Genòmica Comparada (CGH)	73
3.6.1.1. CGH convencional	73
3.6.1.2. CGH d'alta resolució	76
3.6.2. FISH convencional	77
3.6.2.1. Sondes <i>loci</i> específiques (LSI), centromèriques i subtelomèriques	77
3.6.2.2. Tècnica de pintat cromosòmic (WCP)	78
3.6.3. Tècnica d'hibridació <i>in situ</i> fluorescent multicolor (M-FISH)	80
3.6.4. FISH multicolor específica de centròmer (cenM-FISH)	82
3.6.5. Cromosomes artificials de bactèries (BACs)	84
3.7. TÈCNICA DE MLPA ESPECÍFICA PER L'ANÀLISI DE REGIONS SUBTELOMÈRIQUES	87
3.8. NOMENCLATURA	88
4. RESULTATS	91
4.1. Retinoblastoma	93
4.2. Cariotip "aparentment" equilibrat	97
4.3. Monosomies i trisomies parcials autosòmiques	99
4.4. Monosomies i trisomies parcials gonosòmiques	107
4.5. Reorganitzacions cromosòmiques "aparentment" equilibrades	109
4.6. Cromosomes marcadors supernumeraris	111
5. DISCUSSIÓ	119
5.1. AVANTATGES I LIMITACIONS DE LES DIFERENTS TÈCNIQUES CITOGENÈTIQUES UTILITZADES	119
5.1.1. CGH vs. HR-CGH	119
5.1.1.1. Estudi en mostres de retinoblastoma	121
5.1.1.2. Estudi en anomalies cromosòmiques constitucionals	125
5.1.2. Array-CGH vs. CGH	127
5.1.3. HR-CGH vs. MLPA	127
5.1.4. M-FISH vs. cenM-FISH	130
5.2. RETINOBLASTOMA	131

5.3. TRISOMIES I MONOSOMIES AUTOSÒMIQUES: CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP	133
5.3.1. Monosomies parcials del cromosoma 1	135
5.3.2. Trisomies parcials del cromosoma 1q	137
5.3.3. Monosomies parcials del cromosoma 2q	137
5.3.4. Monosomies parcials del cromosoma 3p	139
5.3.5. Monosomies parcials del cromosoma 4q	139
5.3.6. Trisomies parcials del cromosoma 5	140
5.3.7. Trisomies parcials del cromosoma 6p	141
5.3.8. Monosomies parcials del cromosoma 6q	142
5.3.9. Monosomies parcials del cromosoma 7p	143
5.3.10. Trisomies parcials del cromosoma 7p	143
5.3.11. Monosomies parcials del cromosoma 8	145
5.3.12. Trisomies parcials del cromosoma 8p	146
5.3.13. Trisomies parcials del cromosoma 9p	147
5.3.14. Monosomies parcials del cromosoma 10q	149
5.3.15. Trisomies parcials del cromosoma 10q	150
5.3.16. Monosomies parcials del cromosoma 11q	150
5.3.17. Trisomies parcials del cromosoma 12p	151
5.3.18. Monosomies parcials del cromosoma 13q	152
5.3.19. Trisomies parcials del cromosoma 13q	153
5.3.20. Monosomies parcials del cromosoma 15q	153
5.3.21. Trisomies parcials del cromosoma 15q	154
5.3.22. Monosomies parcials del cromosoma 17p	154
5.3.23. Monosomies parcials del cromosoma 18	155
5.3.24. Trisomies parcials del cromosoma 19p	156
5.3.25. Trisomies parcials del cromosoma 20	157
5.3.26. Trisomies parcials del cromosoma 21q	158
5.4. TRISOMIES I MONOSOMIES GONOSÒMIQUES:CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP	158
5.4.1. Alteracions estructurals del cromosoma X	159
5.4.1.1. Monosomies/Trisomies parcials del cromosoma X	160
5.4.1.2. Translocacions cromosoma X-autosoma	161
5.4.2. Alteracions cromosòmiques estructurals del cromosoma Y	161
5.4.2.1. Monosomies parcials del cromosoma Y	162
5.4.2.2. Cromosomes Y isodicèntrics	162
5.4.2.3. Translocació cromosoma Y-autosoma	163
5.4.2.4. Inserció X:Y	164
5.4.2.5. Home XX	164

5.5. CROMOSOMES EN ANELL	165
5.5.1. Anells del cromosoma 13	166
5.5.2. Anells del cromosoma 15	166
5.6. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES CRÍPTIQUES	167
5.6.1. Microdeleccions/Microduplicacions	167
5.6.2. Translocacions subtelomèriques críptiques familiars	168
5.6.3. Reorganitzacions cromosòmiques "aparentment" equilibrades	169
5.7. REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES COMPLEXES	169
5.8. CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS (sSMC)	171
5.8.1. sSMC acrocèntrics	173
5.8.1.1. sSMC derivats del cromosoma 15	173
5.8.1.2. sSMC derivats dels cromosomes 13/21	174
5.8.1.3. sSMC derivats del cromosoma 14	175
5.8.1.4. sSMC derivats dels cromosomes 22/11	176
5.8.2. sSMC no acrocèntrics	176
5.8.2.1. sSMC derivats del cromosoma 2	176
5.8.2.2. sSMC derivats del cromosoma 9	178
5.8.2.3. sSMC derivats del cromosoma X	179
5.9. sSMC I NEOCENTRÒMERS	180
5.10. ANÀLISI DELS PUNTS DE TRENCAMENT	183
6. CONCLUSIONS	193
7. BIBLIOGRAFIA	197
8. ANNEX	229
8.1. SUMARI DELS RESULTATS CITOGENÈTICS	
8.2. DESCRIPCIÓ DETALLADA DELS RESULTATS	
8.2.1. Resultats dels casos amb monosomies i/o trisomies parcials autosòmiques	

- 8.2.2. Composició de les imatges dels resultats dels casos amb monosomies i/o trisomies parcials que impliquen cromosomes sexuals
- 8.2.3. Composició dels resultats obtinguts en els casos amb reorganitzacions cromosòmiques "aparentement" equilibrades
- 8.2.4. Composició dels resultats obtinguts en els casos amb cromosomes marcadors supernumeraris

8.3. COINCIDÈNCIES I DISCREPÀNCIES DE LES BANDES IMPLICADES EN DESEQUILIBRIS DEL GENOMA EN TUMORS DE RETINOBLASTOMA

- 8.4. ***Identification of a "cryptic mosaicism" involving at least four different small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 9 in a woman without reproductive success***
M. Santos, K. Mrasek, M. A. Rigola, H. Starke, T. Liehr, and C. Fuster
Fertil Steril 2007 (in press)

1. INTRODUCCIÓ

1- INTRODUCCIÓ

Des de que Mendel va fer les primeres observacions sobre l'herència genètica de trets morfològics en els pèsols a finals del segle XIX, han sorgit molts estudis genètics portats a terme per in comptables grups d'investigadors.

S'han pogut establir les bases cel·lulars de l'herència genètica amb la descripció dels cromosomes i les bases moleculars dels elements que hi intervenen (ADN, ARNs i proteïnes).

Ja a finals del segle XIX es van començar els primers estudis citogenètics en l'espècie humana per tal de poder determinar el número de cromosomes en humans. Però no va ser fins a l'any 1956 quan Tijo i Levan (Tijo i Levan, 1956) van poder fer observacions cromosòmiques més acurades al microscopi i es va definir que l'espècie humana tenia una dotació de 46 cromosomes. Aquest fet va permetre conèixer que varies alteracions fenotípiques descrites amb anterioritat eren degudes a una alteració de la dotació cromosòmica. En un període de tres anys es van establir les causes de les síndromes de Down, Klinefelter i Turner. Poc després es van reconèixer noves síndromes de trisomies autosòmiques i posteriorment altres síndromes de malformacions múltiples causades per pèrdues o guanys de material cromosòmic.

La primera tècnica de bandeig cromosòmic (bandes Q) va ser desenvolupada per Caspersson i col. (1970). A partir d'aquesta es van desenvolupar altres tècniques de bandeig cromosòmic com les bandes G i R entre d'altres que van permetre caracteritzar alteracions cromosòmiques que passaven desapercibudes amb la tinció uniforme de cromosomes. Posteriorment, es van desenvolupar tècniques de citogenètica molecular basades en la hibridació *in situ* fluorescent que van suposar un gran avanç en la determinació d'alteracions cromosòmiques i noves tecnologies de biologia molecular com el clonatge i la seqüenciació.

1.1- EL PROJECTE GENOMA HUMÀ

Al any 1990 es va iniciar el projecte "genoma humà". Amb aquest projecte es pretenia seqüenciar tot l'ADN genòmic humà, com s'havia fet amb altres organismes (ex. *Drosophila melanogaster*) i caracteritzar els gens. Aquest projecte el van portar a terme un conjunt de centres públics i privats que van treballar conjuntament.

Per realitzar aquest estudi es van utilitzar dues estratègies. Una de les estratègies es va anomenar *top down* i la van portar a terme diferents centres acadèmics mentre que l'altre es va anomenar *bottom up* i la va portar a terme l'entitat privada anomenada Celera. En la primera, cada cromosoma es va fragmentar (aproximadament 100.000 parelles de bases) i es van clonar utilitzant com vectors cromosomes artificials de bactèries (BACs). L'ordre dels BACs (superposant seqüències) va permetre descriure el mapa físic del genoma humà. La segona estratègia va consistir en fraccionar el genoma sencer en fragments d'unes 500 parelles de bases i procedir a la seva seqüenciació. Mitjançant ordinadors es va establir l'ordre de les seqüències per superposició. Les dues aproximacions es van poder desenvolupar satisfactòriament. Amb aquest projecte es va arribar a seqüenciar el 94% del genoma humà (Venter i col. 2001; Lander i col. 2001).

Durant molts anys s'havia estimat que el genoma estaria format per tres bilions de parelles de bases nitrogenades i que hi hauria aproximadament 100.000 gens. Però,

sorprenentment, es va trobar que només hi havia uns 25.000-30.000 gens que codificaven proteïnes, encara que amb l'*splicing* alternatiu a partir de cada gen es podia arribar a diferents productes gènics.

Les aplicacions del projecte genoma humà es troben bàsicament en la recerca biomèdica i farmacèutica. La seqüència del genoma humà (en bases de dades públiques) permet la identificació ràpida dels gens candidats, el cribratge de mutacions i la informació de l'estructura del gen. El disseny de buscadors genòmics com l'*Ensembl* proporciona informació del genoma des dels cromosomes als nucleòtids. Es poden seleccionar els cromosomes a gran escala i arribar als nucleòtids, identificant gens, els exons associats, ARNs i proteïnes (<http://www.ensembl.org/>). El projecte del genoma humà també ha permès conèixer els mecanismes implicats en l'aparició de delecions del genoma relacionades amb síndromes cromosòmiques. S'ha vist que algunes delecions s'han produït per recombinació homòloga i entrecreuant desigual entre regions intracromosòmiques duplicades com el que dona lloc al síndrome de diGeorge/velocardiofacial al cromosoma 22 o al síndrome de Williams-Beuren al cromosoma 7. L'aplicació en el camp farmacèutic es basa fonamentalment en la síntesi de fàrmacs específics per gens i proteïnes diana coneguts gràcies a aquest projecte.

1.2- DEFECTES CONGÈNITS

El retard mental afecta aproximadament a un 2-3% de la població. Malgrat tots els estudis realitzats en un 50% dels casos no se'n pot arribar a conèixer l'etiologia. Segons la severitat del retard mental es divideix en: greu quan el coeficient intel·lectual (CI) és 20-35, moderat quan CI és 35-50 i lleu si el CI és de 50-70 (Battaglia i col. 1999). El retard mental moltes vegades va associat a altres defectes congènits com les anomalies fenotípiques.

Les anomalies fenotípiques s'han classificat en dos grans grups: variants menors i anormalitats (Aase, 1990).

Les variants menors a la vegada es subdivideixen en "variants comunes" i "anomalies menors". La diferència entre elles es troba en la seva prevalença a la població i la implicació fenotípica. Les "anomalies menors" tenen una prevalença del 4%, com a màxim, en la població i les "variants" apareixen en més del 4% de la població (s'anomenen variants fenotípiques normals). La presència de múltiples "anomalies menors" fa que hi hagi més prevalença de malformacions majors (19,6%-90%).

Dins les anormalitats es pot diferenciar entre malformacions, deformacions, disrupcions i displàsies (Spranger i col. 1982). En la Taula 1 es mostra la freqüència en nounats d'algunes anomalies congènites.

Una malformació es defineix com una alteració del procés d'embriogènesi normal (Opitz, 1985). I es classifica de lleu si té poc efecte en el funcionament normal de l'individu i de malformació major si té molt efecte. Exemples típics de malformacions són les que donen lloc a les anomalies congènites del cor com els defectes ventriculars o atrial-septals, llavi o paladar leporí.

Les malformacions són el resultat d'accions primerenques que sovint són oligogèniques encara que també poden ser poligèniques.

Les deformacions són produïdes per forces mecàniques aberrants que distorsionen les estructures normals, per factors materns o fetals, i pot passar en qualsevol moment de la gestació. Un exemple típic de deformacions són la dislocació de maluc i peu equí que poden estar produïts per la falta de líquid amniòtic (oligohidramni), una aglomeració intrauterina degut a la presència de bessons o a un úter estructuralment anormal.

Les disrupcions són defectes estructurals d'un òrgan o teixit com resultat de l'acció de factors externs que alteren el procés normal del desenvolupament. Entre els factors extrínsecs que poden causar les disrupcions es troben les isquèmies, infeccions i els traumatismes. Un exemple típic de disrupció és el desenvolupament anormal de les extremitats degut a que el cordó umbilical envolta l'extremitat i impedeix el seu desenvolupament normal.

I finalment la displàsia és el resultat de la histogènesi anormal que pot ser focal o distribuïda pel cos. Els canvis estructurals que produeix són clínicament aparents i cursen contínuament. El teixit és anormal l'efecte en els símptomes clínics poden persistir o empitjorar a mida que el teixit continua creixent o funcionant. Les displàsies es diferencien de les altres tres categories en el fet que les accions causants d'aquestes són relativament breus en durada.

Taula 1- Anormalitats estructurals congènites més importants (Mueller i Young, 2001)

Sistema i anormalitat	Incidència per cada 1000 naixements
<i>Cardiovascular</i>	10
Defecte septal ventricular	2,5
Defecte septal atrial	1
<i>Ductus arterial</i>	1
Tetralogia de Fallot	1
<i>Sistema nerviós central</i>	10
Anencefàlia	1
Hidrocefàlia	1
Microcefàlia	1
Espina bífida lumbar-sacre	2
<i>Gastrointestinal</i>	4
Llavi/paladar leporí	1,5
Hèrnia diafragmàtica	0,5
Atrèsia esofàgica	0,3
Anus imperforat	0,2
<i>Extremitats</i>	2
Amputació transversal	0,2
<i>Urogenital</i>	4
Agenèsia renal bilateral	2
Ronyons poliquístics (infantil)	0,02
Exstrosia de bufeta	0,03

1.2.1- FACTORS DE RISC DELS DEFECTES CONGÈNITS

S'ha estimat que del total de concepcions humanes, el 50% s'interrompen espontàniament en l'estadi preimplantacional (4-5 dies després de la concepció) o poc temps després, abans que la mare sigui conscient de l'embaràs. Entre els embarassos reconeguts s'ha calculat que el 15% acaben en avortament dins el primer trimestre de l'embaràs (Mueller i Young, 2001).

En un 80%-85% dels avortaments espontanis s'han observat importants anormalitats estructurals com l'absència de l'embrió, presència d'una estructura completament alterada (mola) o malformacions d'algun òrgan concret (Mueller i Young, 2001).

Hi ha diversos factors que poden influir en l'aparició de defectes congènits. Entre les causes de l'aparició dels defectes congènits hi trobem les d'origen genètic i els agents ambientals (teratògens). També hi ha un grup de malformacions congènites de les quals no se'n sap l'origen.

Les anomalies cromosòmiques causen aproximadament el 6% de totes les anomalies congènites. Les conseqüències fenotípiques de l'alteració cromosòmica dependran de la grandària del fragment cromosòmic i dels gens implicats però, majoritàriament, les alteracions cromosòmiques impliquen anomalies en el desenvolupament. Des de que es va introduir la tècnica de bandeig de cromosomes (Caspersson i col. 1970) s'ha pogut avançar molt en aquest camp ampliant el coneixement de la relació fenotip-genotip en certes anomalies cromosòmiques.

Dins les causes genètiques dels defectes congènits també hi trobem les anomalies gèniques. Aquestes poden causar des d'anomalies en un únic òrgan a síndromes amb múltiples anomalies congènites. Aproximadament el 7,5% de totes les anomalies congènites es deuen a la disfunció d'únic gen (Mueller i Young, 2001).

Un teratogen és un agent ambiental que interromp el desenvolupament normal de l'embrió o fetus. Entre els agents ambientals s'hi poden trobar fàrmacs o productes químics (alcohol, cloroquina, dietilestilbestrol, liti, fenitoïna, retinoides, estreptomina, tetraciclina, àcid valproic i la warfarina). Aquestes substàncies són responsables del 2% de totes les anomalies congènites (Hanson, 1997).

Un altre factor ambiental molt important correspon a algunes infeccions maternes ja que diversos agents infecciosos poden interferir en el desenvolupament embrionari i fetal. Entre les infeccions maternes més perilloses pel fetus trobem la rubèola, el citomegalovirus i la toxoplasmosi (Hanson, 1997).

També comporta un risc elevat pel fetus la presència d'algunes malalties maternes com la diabetis mellitus, fenilcetonúria i epilèpsia.

Els agents físics són un altre tipus d'agents teratògens com per exemple les radiacions ionitzants i la hipertèrmia prolongada (De Santis i col. 2005).

Per últim, en el 50% dels casos no és possible establir una causa concreta de la malformació (Mueller i Young, 2001). Això passa principalment en els casos d'hèrnia aïllada del diafragma, fístula traqueoesofàgica, atrèsia anal i defectes que afecten a una única extremitat.

1.3- TÈCNiques DE CITOGENÈTICA MOLECULAR EMPRADES PER A LA CARACTERITZACIÓ D'ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES

La metodologia d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) va suposar un avanç important en la caracterització d'alteracions cromosòmiques. Existeixen principalment quatre tècniques de FISH "clàssiques" que es resumeixen en la Taula 2.

Taula 2- Característiques de les tècniques de FISH "clàssiques"

Tipus de sonda	Nomenclatura	Regions d'estudi	Utilitat principal
Sondes específiques de <i>locus</i>	LSI (<i>locus specific identifier</i>)	Gens específics	Detecció de síndromes concrets
Sondes centromèriques	CEP (<i>chromosome enumeration probe</i>)	Centròmers	Detecció d'aneuploidies
Sondes subtelomèriques	subtel	Regions subtelomèriques	Detecció de reordenaments subtelomèrics equilibrats i desequilibrats
Sondes de pintat cromosòmic	WCP	Cromosomes sencers	Detecció de reorganitzacions intercromosòmiques

En els últims anys han aparegut un seguit de tècniques derivades de la FISH que han permès millorar la caracterització de les alteracions cromosòmiques. Entre elles s'hi troben la hibridació genòmica comparada (CGH), la CGH d'alta resolució (HR-CGH), els microarrays de CGH, FISH multicolor (M-FISH), FISH específica per centròmers (cenM-FISH) i FISH específica per subtelòmers (stM-FISH) entre d'altres.

1.3.1- HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA (CGH) CONVENCIONAL, D'ALTA RESOLUCIÓ I MICROARRAY DE CGH

La tècnica d'hibridació genòmica comparada (CGH) va ser descrita per primera vegada per Kallioniemi i col. (1992). La primera aplicació va estar dirigida a l'estudi de tumors i més tard es va estendre a l'estudi d'anomalies constitucionals.

La CGH és una tècnica amb la qual s'estudien els desequilibris de tot el genoma, en un sol experiment, detectant variacions en el nombre de còpies de regions del genoma en la mostra estudiada respecte una mostra control. Es basa en la hibridació simultània de l'ADN control i ADN del pacient sobre metafases d'un individu control. Els dos ADNs prèviament han estat marcats amb fluorocroms diferents. En la hibridació, els dos ADNs entren en competició per hibridar sobre les metafases de l'individu control. El software específic per la CGH determinarà les senyals dels dos fluorocroms al llarg de tot el genoma. S'estipula que per sobre del valor de 1,25 (senyal ADN pacient/senyal ADN control) existeix un guany de material genètic en el pacient respecte el control i contràriament, per valors inferiors a 0,75 existirà una pèrdua.

Aquesta tècnica presenta diverses avantatges: no requereix el cultiu cel·lular, no necessita informació prèvia de la regió genòmica que s'ha d'estudiar (ja que s'analitza tot el genoma),

només es requereix de 200ng-1µg d'ADN, permet l'anàlisi a partir d'una única cèl·lula després d'una amplificació mitjançant DOP-PCR i l'estudi de mostres fresques i parafinades.

Però també presenta certes desavantatges: no permet detectar alteracions cromosòmiques equilibrades ni els nivells de ploïdia, no permet detectar alteracions cromosòmiques en el cas que es presentin en un mosaïcisme inferior al 30%, la resolució es limita a 10-20 Mb (Kallioniemi i col. 1994; Bentz i col. 1998), certes regions del genoma són susceptibles de donar falsos positius (regions centromèriques, telomèriques, blocs d'heterocromatina dels cromosomes 1, 9, 16 i els cromosomes 19 i 22), i la localització exacta de l'anomalia no és sempre possible degut a la limitació de resolució en l'espai (longitud variable i estirament no linear dels cromosomes).

S'han publicat diferents treballs on s'ha utilitzat aquesta tècnica per estudis de tumors (Kallioniemi i col. 1994; Rigola i col. 2002a; Camps i col. 2006) i també de pacients amb retard mental i/o malformacions congènites (Breen i col. 1999; Daniely i col. 1999; Rigola i col. 2001; Hernando i col. 2002a; Bellosso i col. 2005).

Una tècnica derivada de la CGH anomenada CGH d'alta resolució (HR-CGH) (Kirchhoff i col. 1998) ha intentat millorar algunes d'aquestes limitacions de la CGH convencional. En l'anàlisi, la HR-CGH aplica intervals dinàmics de referència estàndards substituint els intervals fixos que s'utilitzen en la CGH convencional (valors de 1,25 i 0,75 per determinar guanys i pèrdues respectivament). L'interval dinàmic de referència estàndard es basa en la mitjana de l'anàlisi de CGHs de 17 mostres control. Els perfils d'una mostra sense desequilibris del genoma depenent de la regió del genoma es desvien de "1" sense que això impliqui que existeix un desequilibri. Amb aquest mètode s'obté un interval de normalitat determinat per a cada cromosoma (Fig.1). En aquest cas es considera que una regió està en desequilibri si l'interval de la mitjana dels perfils obtinguts en la mostra estudiada a un nivell de confiança del 99,5% no es sobreposa amb l'interval dinàmic de referència estàndard al 99,5% de confiança (Kirchhoff i col. 1998).

Amb aquest canvi es va aconseguir millorar la resolució de la CGH a 3Mb (Kirchhoff i col. 1999) malgrat que s'espera que en certes regions del genoma, com per exemple en les regions telomèriques, la resolució sigui més baixa (Schoumans i col. 2004; Kirchhoff i col. 2004). En la HR-CGH els falsos positius són molt estranys i cap regió del genoma s'ha d'excloure de l'anàlisi (Kirchhoff i col. 1998).

S'han publicat diferents treballs on s'ha utilitzat aquesta tècnica per estudis de tumors (Kristensen i col. 2003; Zahn i col. 2006; Vranova i col. 2007) i també de pacients amb anomalies congènites (Kirchhoff i col. 2001a; Ness i col. 2003; Kirchhoff i col. 2004; Huang i col. 2005; Wyandt i col. 2006).

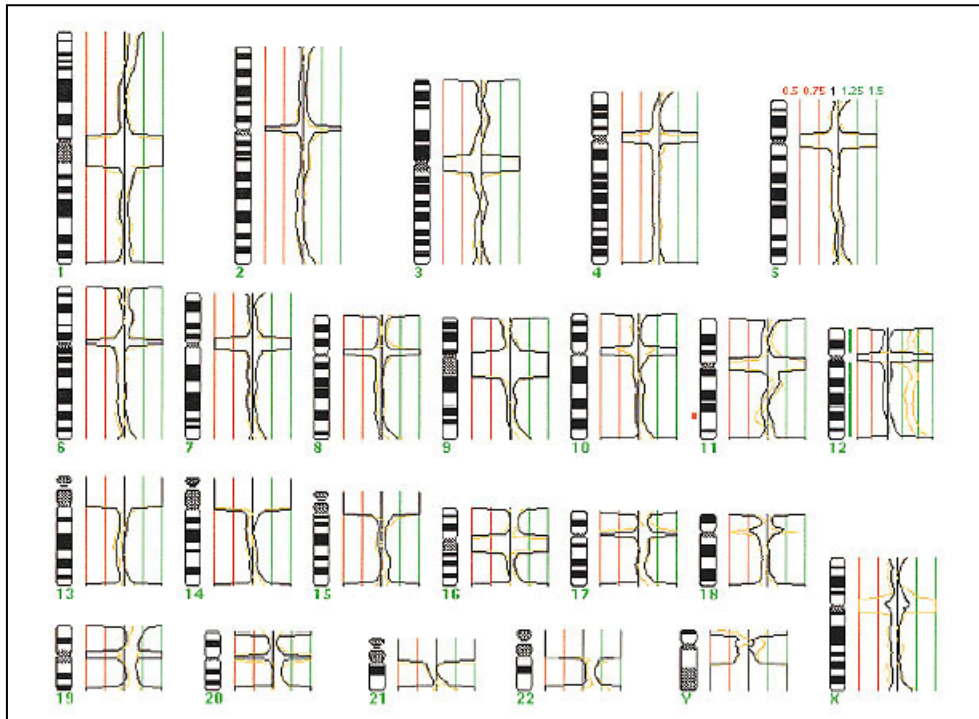


Fig.1- Perfils de HR-CGH mostrant el guany del cromosoma 12 i una delecció en la regió 11q (Kirchhoff i col. 1999).

En els últims anys la base teòrica de la CGH s'ha aplicat sobre els microarrays (Fig.2). La tècnica d'array-CGH es basa en substituir les metafases diana d'hibridació que s'utilitzaven en la CGH convencional per una matriu construïda per representants de regions específiques del genoma com BACs (Snijders i col. 2001; Weiss i col. 2003; Schoumans i col. 2005; Erdogan i col. 2007) o oligonucleòtids (Carvalho i col. 2004; van den Ijssel i col 2005; Komura i col. 2006). Amb aquesta tècnica s'aconsegueix una millora molt important de la resolució (45Kb-1Mb) que dependrà de la densitat de la matriu.

S'han fet construccions de diferent tipus de matrius: específiques per a un cromosoma concret (Bauters i col. 2005; Benetkiewicz i col. 2006) o per a regions específiques del genoma (Kok i col. 2005; de Bustos i col. 2006) i per a tot el genoma (Snijders i col. 2001; Vissers i col. 2003; Erdogan i col. 2007).

S'han publicat diferents treballs on s'ha utilitzat aquesta tècnica per estudis relacionats amb el càncer (Albertson i Pinkel, 2003; van Beers i Nederlof, 2006) però també per determinar alteracions cromosòmiques implicades en malformacions congènites, dismorfies i retard mental (Shaw-Smith i col. 2004; de Vries i col. 2005). A més, la tècnica d'array-CGH ha estat útil per determinar variacions del número de còpies de seqüències d'ADN (LCVs) en individus sans (de Bustos i col. 2006) ja que així es poden determinar variacions no patològiques.

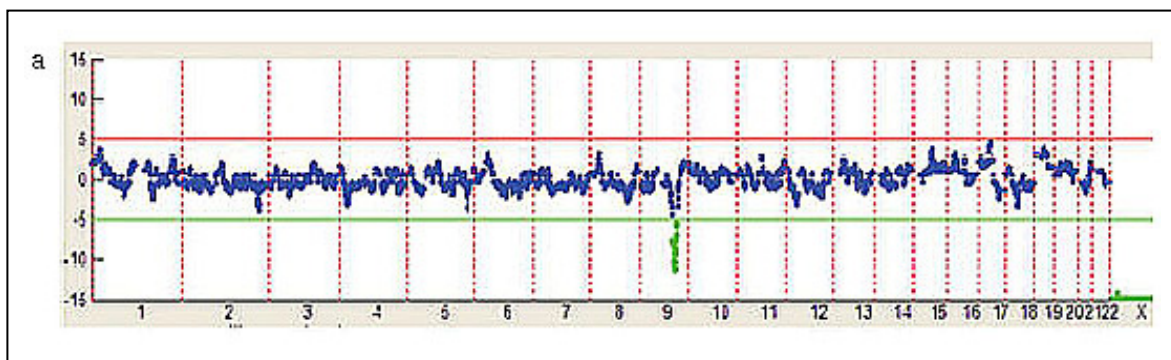


Fig.2- Anàlisi per array-CGH de tot el genoma on es detecta una delecó intersticial al cromosoma 9 (Chen i col. 2006a).

1.3.2- HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT MULTICOLOR

1.3.2.1- Multipintat o *Multiplex FISH (M-FISH)*

Un dels grans avanços en la tècnica de FISH es va donar quan es van desenvolupar assaigs on s'utilitzaven de manera simultània diverses sondes de pintat cromosòmic que, al estar marcades amb fluorocroms diferents, permetien l'estudi de diferents regions del genoma a la vegada. La tècnica, anomenada *multiplex-fluorescence in situ hybridization (M-FISH)*, desenvolupada per Speicher i col. (1996), permet visualitzar el cariotip en colors (Fig.3); cada parella de cromosomes s'observa d'un color característic.

Per preparar la barreja de sondes es marca de manera diferencial cada una de les parelles de cromosomes. L'ADN aïllat de cada un dels cromosomes d'un individu control s'amplifica i es marca amb una combinació de fluorocroms característica i diferent a la resta de cromosomes. Per tal d'obtenir un marcatge diferencial de cada una de les parelles de cromosomes s'utilitzen cinc fluorocroms diferents (FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5 i Cy7) els quals no es sobreposen ni en l'espectre d'emissió ni en el d'absorció. Amb la combinació d'aquests fluorocroms es poden obtenir fins a 31 combinacions diferents, per tant és suficient per diferenciar tots els cromosomes (els 24 colors marquen les 22 parelles de cromosomes autosòmics i els cromosomes X i Y). Finalment, quan s'ha marcat cada una de les parelles dels cromosomes es barregen els ADNs marcats i s'utilitza com una única sonda (barreja de sondes). Actualment la barreja de sonda que s'utilitza per fer els assaigs de M-FISH és comercial (Vysis).

La tècnica de M-FISH va permetre un gran avanç en la caracterització de cariotips impossibles o molt difícils de caracteritzar mitjançant la tècnica de bandes G. I també supera la tècnica de *multiprobe*, en la qual cada parella de cromosomes s'ha d'estudiar individualment en metafases diferents.

Les imatges obtingudes per la tècnica de M-FISH permeten caracteritzar ràpidament alteracions numèriques i estructurals intercromosòmiques. Permet identificar cromosomes marcador i anells, millorar l'anàlisi de translocacions indefinides en les que el patró de bandes no és suficientment informatiu, detectar i analitzar translocacions cromosòmiques complexes, insercions cromosòmiques que impliquin més d'un cromosoma i translocacions críptiques.

La M-FISH presenta l'avantatge de no requerir un coneixement previ de l'anomalia ja que s'analitza tot el genoma. Té molta utilitat en caracteritzar cariotips complexes i reorganitzacions críptiques. Però també mostra desavantatges importants com la necessitat de cèl·lules en divisió (metafase) per a l'anàlisi, no detectar alteracions intracromosòmiques estructurals, ni tampoc pot determinar les bandes cromosòmiques exactes implicades en l'alteració, mostra poca resolució en les zones pericentromèriques i telomèriques, té una resolució limitada a 1-1,5Mb i el cost de la sonda és molt elevat.

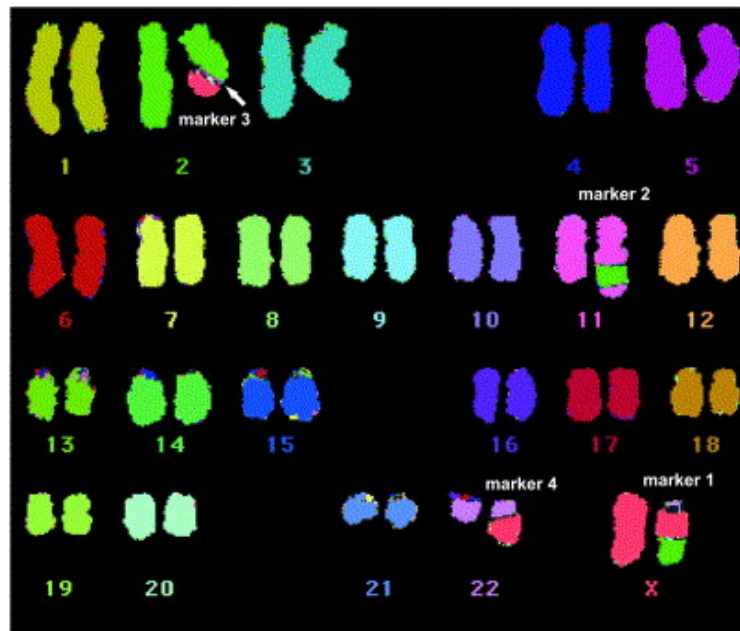


Fig.3 – Cariotip multicolor obtingut per M-FISH mostrant un cromosoma $der(X)t(22;X;2)$, $der(11)ins(11;2)$, $der(2)t(2;X)$ i un $der(22)t(X;22)$ (Hernando i col. 2004).

Paral·lelament al desenvolupament de la tècnica de M-FISH també es va desenvolupar la tècnica de *Spectral Karyotyping* (SKY) (Schröck i col. 1996). La tècnica de M-FISH i la SKY són molt semblants. La diferència entre les dues tècniques es troba a nivell de captació d'imatges i anàlisi. La tècnica de SKY combina l'espectroscòpia de Fourier, una càmera CCD i el microscopi òptic per mesurar simultàniament en tots els punts de la mostra l'espectre d'emissió en el camp visible i l'infraroig proper generant un interferograma per cada píxel que és específic per a cada fluorocrom o combinació de fluorocroms. El software aplica una classificació algorítmica i com resultat s'obté una imatge dels cromosomes en 24 pseudocolors. La tècnica de SKY té una resolució semblant a la M-FISH (1-1,5Mb) (Schröck i col. 1996). Per contra, en la M-FISH s'utilitzen diferents filtres òptics específics per a la captura de cada un dels fluorocroms i l'anàlisi es realitza separatament amb cada una de les cinc imatges obtingudes (cinc fluorocroms). També utilitza una càmera CCD (*charge couple device*). Les imatges són analitzades pel software generant una imatge composta en la qual a cada cromosoma se li assigna un pseudocolor segons la composició de fluorocroms. L'avantatge de la M-FISH respecte l'SKY és que al capturar separatament cadascun dels fluorocroms es poden ajustar els paràmetres per a cada un d'ells, com per exemple el temps d'exposició. Aquest fet és impossible amb la tècnica de SKY ja que es capturen tots a la vegada.

Aquesta tècnica s'ha utilitzat en diferents camps com en l'estudi de tumors sòlids (Williams i col. 2005) i càncers hematològics (Shali i col. 2006), en diagnòstic prenatal i postnatal (Uhrig i col. 1999; Vermeulen i col. 2004; Cetin i col. 2005), i també en l'estudi de corpuscles polars en l'àmbit de la genètica preimplantacional (Munné i col. 1998; Clyde i col. 2001; Stumm i col. 2006).

1.3.2.2- Bandeig multicolor (MCB)

La tècnica de bandeig cromosòmic multicolor (MCB) es va descriure per primera vegada per Chudoba i col. (1999). Aquests autors van procedir a la microdissecció de regions parcials d'un cromosoma i després a la seva amplificació per DOP-PCR. Cada regió cromosòmica microdisseccionada es marcava amb una combinació específica de fluorocroms. Es van utilitzar cinc fluorocroms: *SpectrumGreen*, *SpectrumOrange*, *Texas Red*, *Biotina* detectada amb un sistema Digoxigenina-Cy5.5 i Avidina-Cy5. Cada regió microdisseccionada tenia la característica que es sobreposava parcialment amb la regió adjacent. En cada assaig s'analitzava una parella de cromosomes homòlegs que quedaven marcats amb un patró de bandes de colors específic (Fig.4). Actualment la barreja de sondes que s'utilitza per fer els assaigs de MCB és comercial (*Metasystems*).

La tècnica de MCB resulta molt útil en l'anàlisi de reorganitzacions i inversions intracromosòmiques. Pot contribuir a una millor definició dels punts de trencament implicats en alteracions i a caracteritzar inversions que podrien passar desapercebudes utilitzant la tècnica de pintat cromosòmic (WCP). Es va comprovar que el patró de bandes de colors pel cromosoma 5 era el mateix independentment de la condensació o de la resolució dels cromosomes (Chudoba i col. 1999), evidenciant la gran utilitat d'aquesta tècnica per a diferents tipus d'estudis citogenètics en especial de tumors. Posteriorment s'ha aplicat la tècnica de MCB en la caracterització d'alteracions en altres cromosomes (Weise i col. 2002; Chudoba i col. 2004), i s'han dissenyat sondes pels 24 cromosomes humans (Liehr i col. 2002).



Fig.4- Patró de MCB en pseudocolors del cromosoma 2 definit per 26 bandes. Cada color s'ha assignat a la corresponent banda G (Weise i col. 2002).

1.3.2.3- FISH multicolor específica de centròmers (cenM-FISH)

La tècnica de FISH específica per centròmers (cenM-FISH) es va descriure per Nietzel i col. (2001) i permet la identificació, sense ambigüitats, de totes les regions centromèriques en humans, exceptuant el centròmer del cromosoma 13 i 21.

Amb aquesta tècnica s'obté una imatge del cariotip amb un color específic pels centròmers de cada una de les parelles dels cromosomes. La cenM-FISH està basada en totes les sondes específiques de centròmer disponibles (Willard i Waye, 1987) que són marcades amb combinacions de cinc fluorocroms diferents, es barregen i s'hibriden simultàniament (Fig. 5).

Amb aquesta tècnica s'estudien els centròmers, regions que quedaven fora de l'anàlisi amb tècniques com la M-FISH i SKY ja que en aquestes es bloquejaven les regions repetitives, entre les quals es trobaven els centròmers, mitjançant la prehibridació amb ADN COT1.

Aquesta tècnica omple un buit en el cariotipat mitjançant colors i ha estat aplicada amb èxit en la citogenètica constitucional (Nietzel i col. 2001, Liehr i col. 2005; Mrasek i col. 2005), en la citogenètica del càncer (Camps i col. 2004a) i també s'ha aplicat en estudis meiòtics (Oliver-Bonet i col. 2003; Gutiérrez-Mateo i col. 2005; Sun i col. 2006).

L'aplicació més útil d'aquesta tècnica és la caracterització de petits cromosomes marcadors supernumeraris, que tenen poca (o inexistent) eucromatina. Aquests cromosomes marcadors són molt difícils de caracteritzar per M-FISH o SKY ja que en aquestes tècniques les regions centromèriques són bloquejades per l'ADN COT1 i és difícil que es distingeixi hibridació sobre aquests cromosomes marcadors pel poc contingut d'eucromatina que poden tenir.

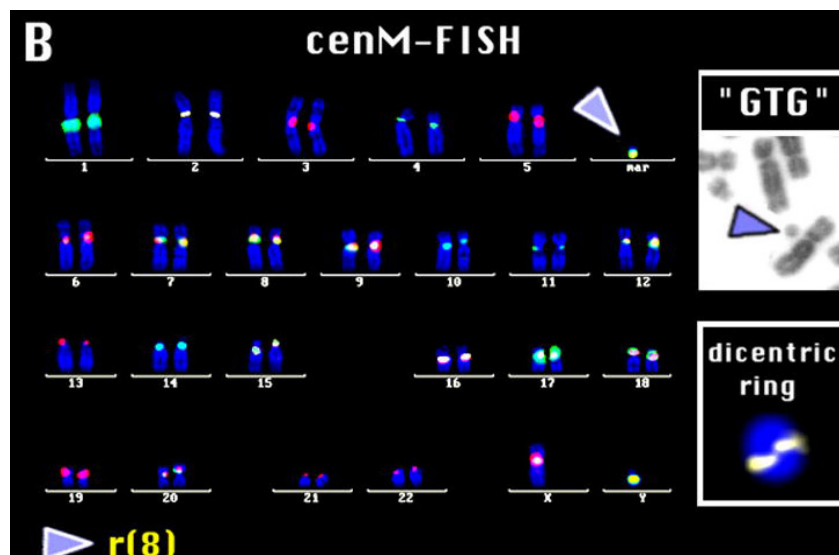


Fig.5- Cariotip obtingut per la cenM-FISH mostrant un petit cromosoma en anell derivat del cromosoma 18 (Nietzel i col. 2001).

L'aplicació de la cenM-FISH es pot realitzar sobre cromosomes bandejats. Aquest fet representa una gran avantatge ja que es poden reutilitzar les preparacions utilitzades per l'estudi previ de citogenètica convencional. Per contra, la cenM-FISH presenta una gran desavantatge en el cas que els cromosomes marcadors presentin neocentròmers, ja que només és capaç d'identificar cromosomes amb centròmers "convencionals".

1.3.2.4- FISH multicolor subcentromèrica (subcenM-FISH)

Tal com hem comentat, la cenM-FISH permet la caracterització de totes les regions centromèriques en humans sense ambigüitats excepte el centròmer del cromosoma 13 i 21. Aquest mètode és molt útil en la caracterització de cromosomes marcadors però no permet definir si el petit cromosoma marcador conté també material eucromàtic. Amb el desenvolupament de la tècnica de subcenM-FISH (subcenM-FISH)(Starke i col. 2003) es pot complementar aquesta informació (Fig.6).

La subcenM-FISH inclou 43 sondes de cromosomes artificials de bactèria o llevat (BACs o YACs) localitzats en les regions proximals de cada un dels centròmers humans. Les sondes proximals incloses en la subcenM-FISH es van seleccionar amb el requisit que fossin les sondes localitzades més proximalment al centròmer en la base de dades *Ensembl*.

La sonda BAC o YAC s'amplifica per DOP PCR i es marca amb una DOP PCR secundària (Nietzel i col. 2001). Les sondes procedeixen dels recursos C.H.O.R.I. BACPAC (Oakland, USA), Dr. M.Rocchi (Bari, Italy) i del Dr. N.Carter (Cambridge, UK). Per a cada cromosoma es prepara un conjunt de sondes (subcenM-FISH específica per cada cromosoma) compostat per les sondes més proximals als centròmers de còpia única, sondes de pintat cromosòmic parcial derivades de microdissecció específiques pels braços llarg i curt del cromosoma (Liehr i Claussen, 2002) i una sonda específica pel centròmer (Nietzel i col. 2001). En el cas dels cromosomes acrocèntrics no es disposava de cap sonda de còpia única del braç curt proximal al centròmer ni tampoc de sondes de pintat cromosòmic parcial del braç curt del cromosoma. Per contra s'hi inclou la sonda MD54 que és específica de tots els braços p dels cromosomes acrocèntrics. (Mrasek i col. 2001).

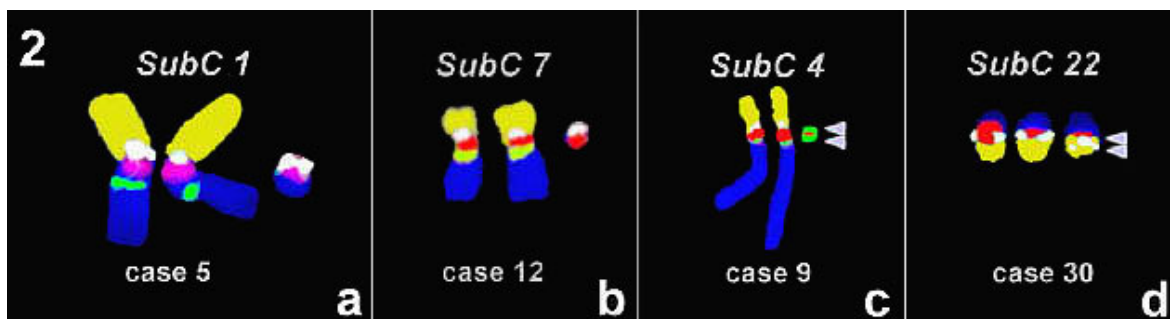


Fig.6- Resultats de subcenM-FISH en quatre casos de cromosomes marcadors supernumeraris derivats del cromosoma 1, 7, 4 i 22 respectivament (Starke i col. 2003).

1.3.2.5- FISH multicolor específica de subtelòmers (stM-FISH)

Knight i col. (1997) van descriure una tècnica que permetia l'estudi dels telòmers de tots els cromosomes. Consistia en dividir un portaobjectes en 24 camps d'hibridació, en cada un s'analitzaven els telòmers d'un cromosoma en concret. Aquesta tècnica ha tingut molta aplicació en el camp del diagnòstic en pacients amb defectes congènits (Dawson i col. 2002; Palomares i col. 2006). Les sondes per aquest assaig actualment són comercials.

Una altra varietat de FISH multicolor és l'anomenada FISH multicolor específica de subtelòmers (stM-FISH). Aquesta va ser descrita per Fauth i col. (2001). La tècnica de stM-FISH permet visualitzar tots els subtelòmers d'un color diferent (Fig 7).

S'utilitzen dos grups de sondes per realitzar l'experiment de stM-FISH. El primer grup es compon de sondes específiques de subtelòmers generades per microdissecció amb una mida aproximada de 5-10 Mb marcades amb combinacions de set fluorocroms (DEAC, FluoroGreen, Cy3, TexasRed, Cy5, biotina (avidin-Cy5.5), digoxigenina (anti-digoxigenin-Cy7). Amb això s'aconsegueix la visualització de 24 colors. El segon grup es basa en sondes caracteritzades molecularment situades a poca distància de les regions subtelomèriques repetitives i consisteixen en clons PAC-, P1- i BAC- que es marquen amb dos fluorocroms per tal de permetre distingir entre el subtelòmer del braç p i q de cada cromosoma. Les sondes específiques de tots els braços p es marquen en verd i les sondes pels braços q es marquen en vermell.

Una aplicació molt important és l'estudi de pacients que presenten retard mental i cariotip normal ja que s'ha descrit que una causa significant d'aquesta clínica són les reorganitzacions subtelomèriques críptiques (Flint i col 1995; Knight i col. 1997). Recentment, aquesta tècnica ha estat emprada amb èxit sobre complexes sinaptonemals en estudis meiótics (Codina-Pascual i col. 2004, 2006).

Una de les limitacions de la M-FISH era l'anàlisi de regions subtelomèriques ja que aquestes estan poc representades a nivell de les sondes. Per aquesta raó la tècnica stM-FISH té gran utilitat en aquest tipus d'estudis.

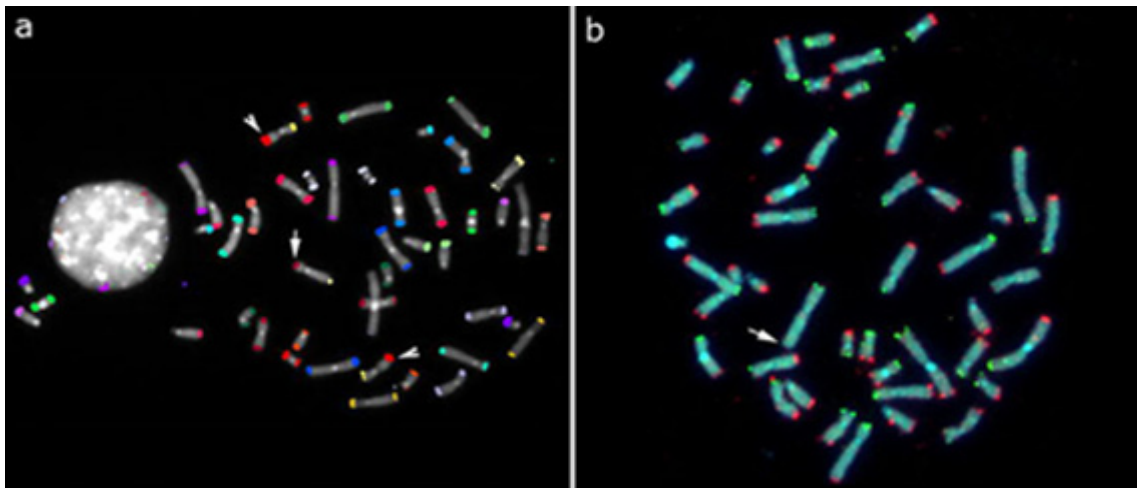


Fig.7- Metafases obtingudes per stM-FISH (Fauth i col. 2001): a) primer grup de sondes que marca d'un color característic el subtelòmer de cada un de la parella de cromosomes on s'observa una translocació equilibrada en una dona (fletxa), b) segon grup de sondes que diferencien entre el braç p i q de cada un dels cromosomes en un home normal on s'observa la deleció del subtelòmer 2q (fletxa).

1.3.3- CROMOSOMES ARTIFICIALS DE BACTERIS (BACs)

La tecnologia de la clonació de l'ADN ha suposat una revolució en la genètica. En la clonació s'amplifica de forma selectiva la seqüència o el fragment d'ADN escollit per a l'estudi i es purifica aquest fragment per a la seva posterior utilització o estudi d'aquest mateix fragment.

La clonació basada en cèl·lules es va desenvolupar per primera vegada a l'inici de la dècada del 1970. En aquesta tecnologia es fixa el fragment d'ADN que es vol estudiar a una molècula d'ADN que és capaç de replicar-se de manera independent dins de la cèl·lula hoste (vector).

Després, es transfereix l'ADN recombinant a la cèl·lula hoste apropiada que proliferarà per divisió cel·lular. El resultat d'aquestes divisions és l'amplificació de l'ADN d'interès.

Un vector ha de contenir elements o gens essencials per tal que es pugui utilitzar per la clonació: un gen de resistència a antibiòtics per seleccionar les cèl·lules que contenen el vector i un gen marcador que inclou al seu interior un lloc múltiple de clonació per seleccionar els recombinants (Fig.8). D'aquesta manera els vectors que tinguin un insert no podran mostrar activitat β -galactosidasa encara que s'hagin transformat correctament al interior cel·lular.

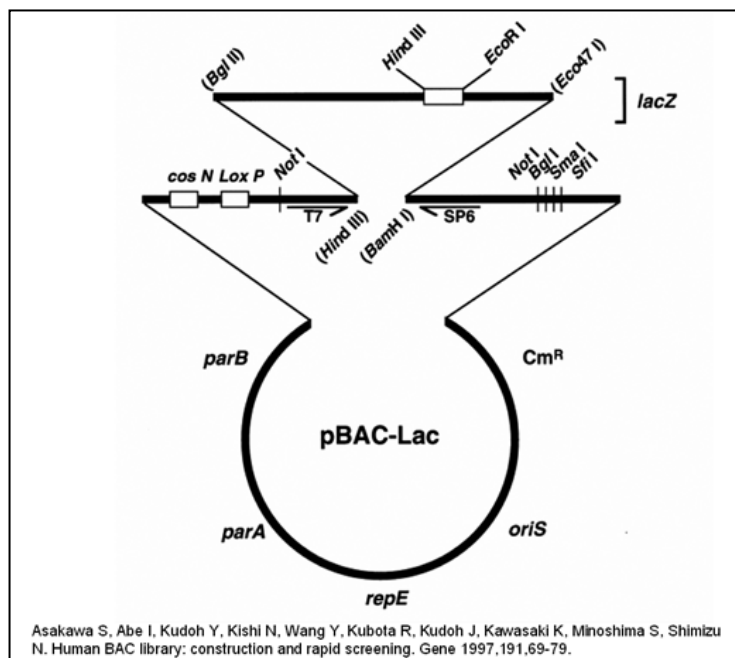


Fig.8- Esquema d'un vector típic (BAC). El vector conté un gen de resistència a cloramfenicol (Cm^R) un origen de replicació (*oriS*), gens essencials per la replicació del vector (*repE*, *parA*, *parB*), un lloc múltiple de clonació amb diferents dianes d'enzims de restricció (MCS) i un gen marcador (*lacZ*).

Existeixen diferents tipus de vectors de clonació: plàsmids, bacteriòfags λ , còsmids, cromosomes artificials de bacteries (BACs), cromosomes artificials derivats de P1 (PACs), cromosomes artificials de llevats (YACs) i cromosomes artificials d'humans (HAC). Les característiques principals de cadascun es detallen a la Taula 3.

Taula 3. Característiques de diferents vectors de clonació

Vector	Origen	Mida ADN insertat	Número de còpies/cèl·lula
Plàsmid	bacterià	0-5Kb	Alt
Bacteriòfac λ	viral	0-23Kb	Alt
Còsmid	viral+bacterià	30-44Kb	Alt
BAC	bacterià	<300Kb	Baix (1-2)
PAC	viral+bacterià	130-150Kb	Alt
YAC	llevat	0.2-2 Mb	Baix (1)
HAC	humà+bacterià	200Kb	Baix

En especial els vectors que s'han utilitzat més àmpliament en estudis de citogenètica molecular són els BACs. La raó és la següent: quan en un vector s'insereixen fragments d'ADN genòmic eucariota d'una mida considerable hi ha el risc que si existeixen diferents vectors dins la mateixa cèl·lula aparegui una inestabilitat estructural dels inserts ja que l'ADN eucariota pot contenir seqüències repetides. Això pot causar la deleció o el reordenament de l'ADN clonat. L'avantatge dels BACs és que per cèl·lula existeixen un o, com a màxim, dos vectors. El sistema de BACs es basa en el plasmidi de fecunditat d'*E.coli*, el factor F. Aquest plasmidi té dos gens, *parA* i *parB*, que conserven el nombre de còpies del factor F en una o dos per cèl·lula. El fet de tenir un nombre tan baix de còpies de cèl·lules presenta una desavantatge ja que la producció d'ADN recombinant serà baixa comparat amb els sistemes que contenen gran número d'ADN recombinant per cèl·lula (Strachan i Read, 2004).

Els sistemes de BACs han estat àmpliament utilitzats en els darrers anys per tal de caracteritzar més acuradament alteracions cromosòmiques (Borg i col. 2005; Piovani i col. 2006; Pazooki i col. 2007). Recentment, s'han publicat diversos estudis en els que s'aplicaven construccions de microarrays basats en BACs que bé comprenen tot el genoma (Albertson i col. 2003; Rickman i col. 2006) o regions específiques (Kok i col. 2005).

1.3.4- MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

La tècnica de MLPA va ser descrita per Schouten i col. (2002). Aquesta tècnica es basa en l'amplificació per PCR de sondes lligades que han hibridat en regions específiques del genoma. Cada sonda de MLPA consisteix en dos oligonucleòtids (un oligonucleòtid curt i sintètic: A i un oligonucleòtid llarg derivat del fag M13:B).

L'oligonucleòtid A consisteix en una seqüència de 21-30 nucleòtids específica de la regió del genoma a estudiar a l'extrem 3' i una seqüència de 19 nucleòtids comuna a tots els oligonucleòtids A (seqüència Y) que es correspon a la seqüència que reconeixerà l'encebador marcat que s'utilitzarà per amplificar la sonda (Fig.9).

L'oligonucleòtid B consisteix en 25-43 nucleòtids corresponents a una regió específica del genoma adjacent a la regió específica per la sonda A, a l'extrem 5', seguida d'una seqüència anomenada *stuffer* de diferent mida en tots els oligonucleòtids B i a l'extrem 3' una seqüència específica que reconeix l'encebador no marcat que s'utilitzarà per amplificar la sonda (seqüència Y). Les dues parts de la sonda (oligonucleòtid A i B) hibriden en zones adjacents de la seqüència diana i són lligades per l'enzim lligasa. Totes les sondes que s'han lligat poden ser amplificades per PCR utilitzant només una parella d'encebadors. El producte de cada amplificació té una mida específica, per això després de l'amplificació els productes es poden separar per electroforesi i procedir a la quantificació relativa. La quantitat relativa del producte reflexa la quantitat de les seqüències diana (Fig.9). En el cas que existeixi una deleció en la seqüència diana, les dues parts de les sondes no hibridaran o no ho faran correctament. Aquest fet comportarà que les dues parts de la sonda no puguin ser lligades i per tant no s'amplifiquin en la PCR.

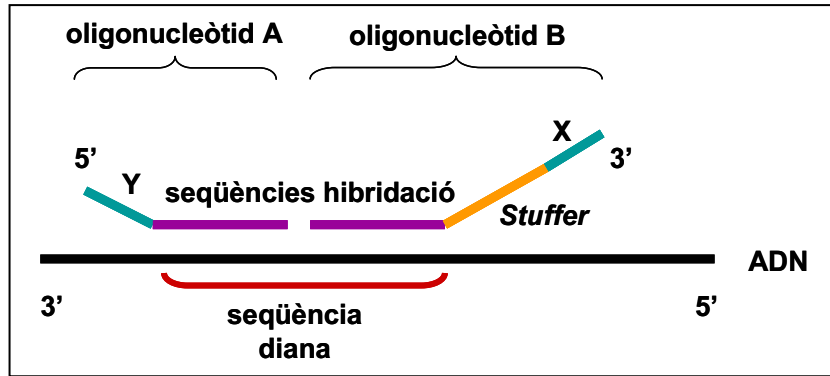


Fig.9- Esquema de la tècnica de MLPA.

Aquesta tècnica presenta moltes avantatges: permet l'anàlisi de moltes mostres en el mateix experiment, té molta sensibilitat (es requereixen només 20 ng d'ADN) i presenta molta especificitat ja que diferencia entre seqüències que varien només en 1 nucleòtid (Fig.10), l'anàlisi és relativament senzill, altament reproducible, de baix cost i els resultats s'obtenen en 24 hores.

Però la MLPA també presenta alguns desavantatges: no detecta reorganitzacions equilibrades i l'anàlisi va dirigit a regions concretes del genoma. Per tant no s'estudia tot el genoma.

Existeixen diferents assaigs de MLPA comercialitzats per tal de realitzar diferents estudis: anàlisi prenatal i postnatal, síndromes, càncer, caracterització tumoral, farmacogenètica, detecció de metilació, anàlisi d'ARN missatger entre d'altres (MRC-Holland).

Fins ara s'ha emprat la tècnica de MLPA en molts estudis de càncer estudiant gens específics (de la Hoya M i col. 2006) i per detectar anomalies cromosòmiques relacionades amb una determinada síndrome (Bartholdi i col. 2006) o també per l'estudi de pacients amb retard mental lligat al cromosoma X (Madrigal i col. 2007). Recentment s'han descrit sèries on s'estudiaven zones subtelomèriques amb aquesta tècnica en pacients amb cariotip normal i que presentaven retard mental i/o malformacions congènites (Koolen i col. 2004; Rooms i col. 2005; Lam i col. 2006; Palomares i col. 2006; Madrigal i col. 2007).

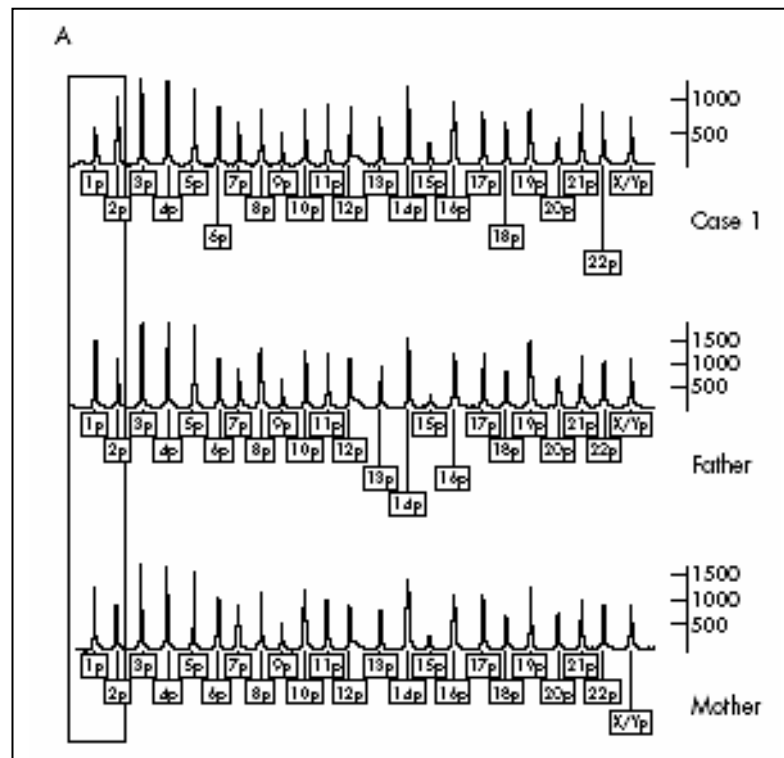


Fig.10- Detecció de la deleció subtelmèrica 1pter (requadre) per la tècnica de *multiplex ligation dependent probe* (MLPA) (Koolen i col. 2004).

1.3.5. PCR QUANTITATIVA FLUORESCENT (QF-PCR)

Per últim, cal esmentar la tècnica PCR quantitativa fluorescent (QF-PCR), aplicada majoritàriament al diagnòstic prenatal, que permet una ràpida detecció de les aneuploidies més freqüents.

Aquest mètode es basa en l'amplificació per PCR de seqüències específiques d'ADN anomenades *Short Tandem Repeats* (STRs). Els STRs específics són seqüències de nucleòtids molt petites (3-5 nucleòtids) que es repeteixen varies vegades essent altament polimòrfiques en la població i molt estables durant la vida de l'individu. El principi de la tècnica de QF-PCR es basa en què en la fase exponencial de l'amplificació la quantitat de producte generat és proporcional al producte inicial. Amb la incorporació d'una molècula fluorescent en la reacció de PCR és possible quantificar el material obtingut en la reacció analitzant el producte en un seqüenciador automàtic d'ADN. Els resultats obtinguts es poden correlacionar amb el número de cromosomes concrets presents en les cèl·lules de la mostra analitzada (Mansfield, 1993; Pertl i col. 1994; Adinolfi i col.1995; Sherlock i col. 1998; Verma i col 1998; Cirigliano i col. 1999).

Aquesta tècnica majoritàriament s'ha aplicat per detectar les alteracions numèriques dels cromosomes X, Y, 21, 18 i 13 i també d'algunes trisomies parcials degudes a translocacions desequilibrades o duplicacions d'aquests cromosomes.

Com tots els altres mètodes, aquesta tècnica també té limitacions: no detecta mosaïcismes menors al 30%, hi ha problemes en la interpretació dels resultats si existeix contaminació materna i només obtindrem informació de regions específiques del genoma. Les

seves avantatges són que és un mètode de diagnòstic ràpid (24 hores), de baix cost i que permet analitzar gran nombre de mostres (Cirigliano i col. 2004; 2006).

1.4- ANOMALIES CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS

Les anomalies cromosòmiques són una causa molt important de retard mental, malformacions congènites i/o dismorfies.

Les anomalies cromosòmiques es divideixen principalment en dos grans grups: anomalies numèriques i anomalies estructurals.

Les anomalies numèriques més freqüents són les trisomies del cromosoma 13, 18 i 21 juntament amb les trisomies que impliquen els cromosomes sexuals X i Y. Moltes altres trisomies són incompatibles amb la vida, un exemple típic és la trisomia del cromosoma 16 que és una troballa freqüent en avortaments espontanis dins el primer trimestre d'embaràs. La única monosomia viable, sovint en mosaic, és la 45,X que dona lloc a l'aparició de la síndrome de Turner i constitueix l'anomalia cromosòmica més freqüent en avortaments espontanis.

Dins les anomalies estructurals podem trobar les translocacions recíproques i Robertsonianes, delecions, duplicacions, insercions, inversions pericèntriques i paracèntriques, cromosomes en anell i les reorganitzacions cromosòmiques complexes. Les freqüències de les diferents alteracions cromosòmiques detectades en nounats es resumeixen a la Taula 4.

Taula 4- Freqüència d'anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals en nounats

Anomalia cromosòmica	Freqüència en nounats
Numèrica	
Cromosomes sexuals	
47,XXY	1/1000
47,XYY	1/1000
47,XXX	1/1000
45,X	1/5000
Cromosomes autòsòmics	
Trisomia 21	1/700
Trisomia 18	1/3000
Trisomia 13	1/5000
Estructural	
Translocació	
Recíproca equilibrada	1/500
Robertsoniana	1/1000
Desequilibrada	-
Inversions	
Pericèntrica	0,12-0,7/1000
Paracèntrica	0,1-0,5/1000
Cromosomes en anell	0,03-0,016/1000
Reorganitzacions cromosòmiques complexes	Molt poc freqüent
Delecions	1/7000
Duplicacions	1/7000
Insercions	1/5000
Cromosomes marcador	0,043/100

*Les freqüències estan basades en les publicacions de (Chudley i col. 1974; Jacobs i col. 1974, 1992; Gardner i Sutherland, 1996; Liehr i col. 2004)

1.4.1- MONOSOMIES I TRISOMIES PARCIALES

Les delecions sovint són molt més freqüents que les duplicacions. En general les delecions sempre són menys tolerades que les duplicacions i, com regla general, es creu que qualsevol delecio de més del 2% del genoma total haploide és letal.

Una banda cromosòmica, a una resolució de 550 bandes, conté aproximadament 5×10^6 parelles de bases que poden codificar de 100 a 200 gens. Per tant, un pacient amb anomalies citogenèticament visibles, incloent guanyos i pèrdues tindrà un desequilibri de dosi de nombrosos gens. Per això no és estrany que la majoria de pacients amb anomalies citogenètiques visibles tinguin un fenotip anòmal.

Les tècniques de citogenètica clàssica, moltes vegades, no són suficientment resolutives per descriure certes duplicacions i delecions que tinguin una mida inferior a 5-10 Mb. Per això, en aquests casos serà de molta utilitat la tècnica de HR-CGH que podrà detectar desequilibris en el genoma de fins a 3Mb i els arrays de CGH que poden arribar a caracteritzar microdelecions i microduplicacions menors a 1 Mb. Una vegada detectada la zona del genoma on es troba el desequilibri serà de molta utilitat l'aplicació de BACs per delimitar al màxim la regió implicada en l'alteració cromosòmica.

1.4.1.1- Delecions i microdelecions

En humans, les delecions autosòmiques visibles citogenèticament tenen una incidència de 1/7.000 nounats (Jacobs i col. 1992). Quan un pacient és portador d'una delecio això comporta que els gens que s'ubiquen en aquesta regió estaran en hemizigosi (o haploinsuficiència).

Les delecions poden ser terminals (Fig.11), localitzades als extrems dels cromosomes o bé intersticials. L'efecte fenotípic de la presència de les delecions dependrà tant de la grandària de la delecio com dels gens localitzats en la regió. Pel que fa a l'aparició de les delecions, poden ser *de novo* o bé haver-se heretat d'un dels progenitors portador de la delecio o bé ser el resultat d'una alteració en la segregació durant la meiosi d'una translocació recíproca. En aquest últim cas la delecio s'acompanya d'una trisomia d'una altra regió del genoma.

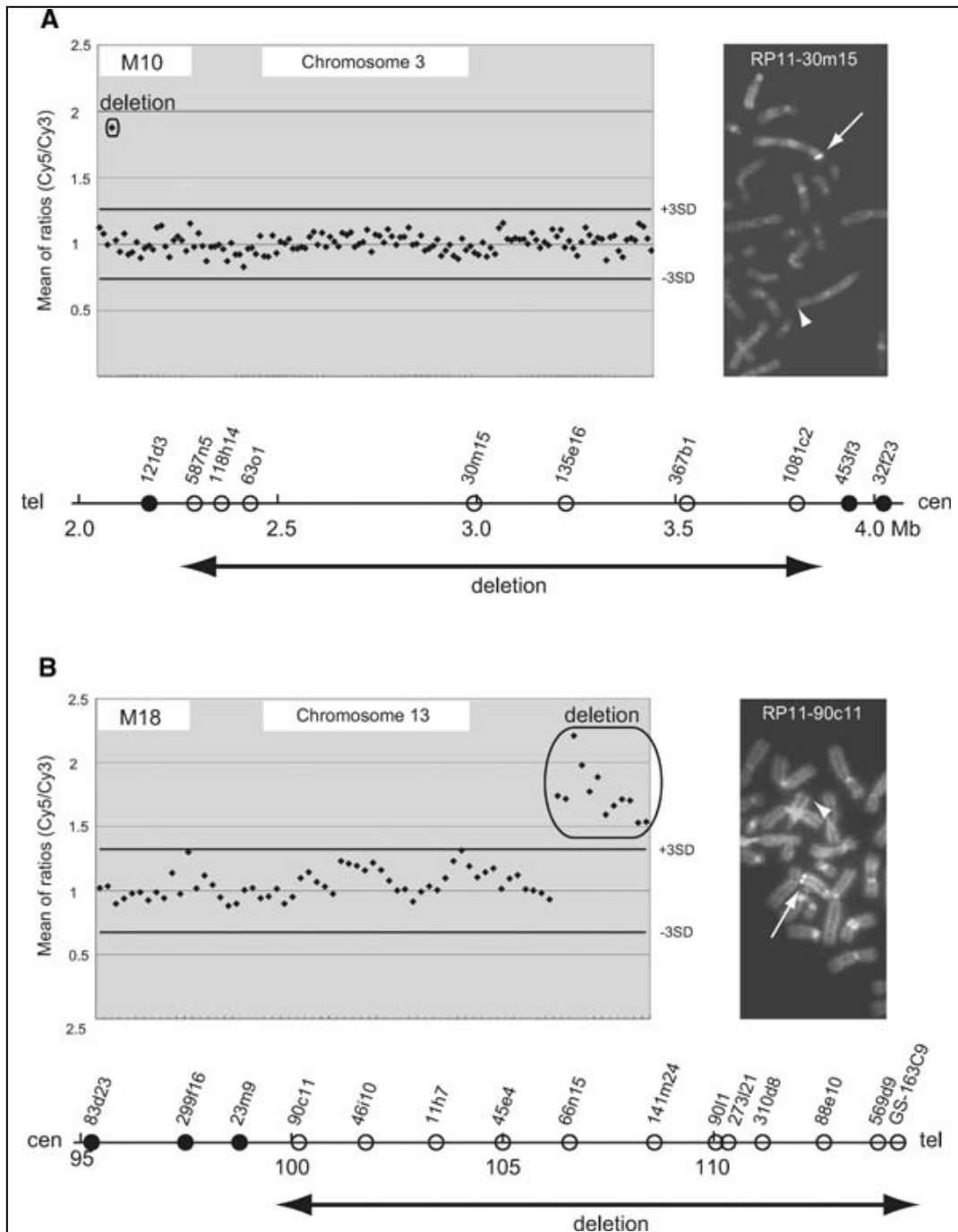


Fig.11- Anàlisi citogenètic per array-CGH i FISH de dos pacients (A i B). Ratios d'hibridació del control (Cy5) i la mostra del pacient (Cy3) (Cy3/Cy5). S'observen dues delecions, una en el cromosoma 3 del pacient A i l'altra en el cromosoma 18 del pacient B. Els resultats de FISH mitjançant els BACs implicats en la delecio confirmen els resultats obtinguts en l'array-CGH en els dos casos (Shimokawa i col. 2006).

En la base de dades Human Cytogenetics Database (HCDB) hi ha descrites les anomalies postnatales detectables citogenèticament (Schinzel, 2001). Un estudi fet per Brewer i col. (1998) sobre les delecions descrites en aquesta base de dades va demostrar que el 89% de les bandes (resolució de 400 bandes) estaven implicades en casos de delecions. També es va descriure que set de les malformacions (atrèsia anal, fissura labial, micrognàtia, hidrocefàlia, microftàlmia i peu equí) estaven associades a delecions grans comparat amb la resta i dos (anirídia i

cataractes) amb delecions petites. També es va veure que la distribució de les delecions al llarg del genoma no es produïen a l'atzar. Les delecions més comunes implicaven a 1q, 4p, 13 i 18p mentre que les que es trobaven amb menys freqüència eren les que implicaven 5p i 15.

A part de les delecions detectades citogenèticament hi ha les microdelecions responsables de moltes alteracions clíniques. Les microdelecions no es poden, o són difícils, de detectar amb la citogenètica clàssica i per determinar la seva presència s'han d'utilitzar altres tècniques com la FISH amb sondes *locus* específiques o subtelomèriques. Això comporta moltes vegades que prèviament s'ha de sospitar de la síndrome per triar la sonda que cal utilitzar.

A la Taula 5 s'indiquen algunes de les microdelecions que fins ara s'han associat a una síndrome concreta.

Taula 5- Principals microdelecions associades a síndromes concretes

Síndrome	número MIM	Anomalia cromosòmica	Freqüència en nounats
Wolf-Hirschhorn	194190	Deleció 4p16.3	1/50000
Cri du chat	123450	Deleció 5p15.2p15.3	1/20000
Williams-Beuren	194050	Deleció 7q11.23 incloent el gen de l'elastina	1/20000
Langer-Giedion	150230	Deleció 8q24.11q24.13	-
WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalies genitals, retard del creixement)	194072	Deleció 11p13 incloent els gens <i>WT1</i> i <i>PAX6</i>	1/250000
Prader-Willi	176270	Pèrdua dels gens paterns en la regió cromosòmica 15q11q13	1/10000-15000
Angelman	105830	Pèrdua dels gens materns en la regió cromosòmica 15q11q14	1/15000-20000
Rubinstein-Taybi	180849	Deleció 16p13.3	1/300000
Miller-Diecker	247200	Deleció 17p13.3	1/25000
Smith-Magenis	182290	Deleció 17p11.2	-
Alagille	118450	Deleció 20p12.1p11.23	-
DiGeorge	188400	Deleció 22q11.21q11.23	1/5000

Abreviacions: MIM, Mendelian inheritance in man

A continuació s'indiquen els principals trets clínics de síndromes associats a microdelecions:

- **Síndrome de Wolf-Hirschhorn:** trets facials característics, hipotonia, microcefàlia, convulsions i retard mental (Quarrell i col. 1991; Rodríguez i col. 2005).
- **Síndrome de Cri-du-chat:** microcefàlia, orelles malformades i retard en el desenvolupament (Lejeune i col. 1963; Zhang i col. 2005).
- **Síndrome de Williams-Beuren:** trets facials característics, estenosi supravalvular aòrtica i retard mental lligat a habilitats en el llenguatge (Beuren, 1972; Gothelf i col. 2006).
- **Síndrome de Langer-Giedion:** cabell escàs, exostosi i retard mental de greu a variable (Hall i col. 1974; Riedl i col. 2004).

- **Síndrome WAGR:** retard mental i del creixement, anirídia, predisposició a tumor de Wilms i genitals anòmals (Miller i col. 1964; Crolla i Heyningen, 2002).
- **Síndrome de Prader-Willi:** retard mental, talla baixa, obesitat, hipotonia, trets facials característics i peus petits (Prader i col. 1956; Wey i col. 2005).
- **Síndrome d'Angelman:** retard mental, atàxia i riure incontrolat (Angelman, 1965; Valente i col. 2006).
- **Síndrome de Rubinstein-Taybi:** retard mental, polzes amples i peus enormes, trets facials característics, anomalies vertebrals i d'estèrnum i estenosi pulmonar (Rubinstein i Taby, 1963; Roelfsema i col. 2005).
- **Síndrome de Miller-Dieker:** lisencefàlia i trets facials característics (Miller, 1963; Cardoso i col, 2003).
- **Síndrome de Smith-Magenis:** retard mental, hiperactivitat, trets dismòrfics i comportament autodestructiu (Smith i col. 1986; Girirajan i col. 2005).
- **Síndrome Alagille:** escassetat de conductes biliars intrahepàtics (*ductopènia*), anomalies de gravetat variable en múltiples òrgans i sistemes (Alagille i col. 1975; Lykavieris i col. 2003).
- **Síndrome de DiGeorge:** cara característica, hipocalcèmia i defectes cardíacs (DiGeorge,1968; Yamagishi i Srivastava, 2003).

1.4.1.2- Duplicacions i microduplicacions

En humans, les duplicacions autosòmiques, visibles citogenèticament, tenen una incidència de 1/7.000 naixements (Jacobs i col. 1992). Un estudi realitzat per Brewer i col. (1999) sobre les duplicacions descrites va mostrar que només un 2,1% de les bandes no estaven implicades en duplicacions. En general, les duplicacions solen tenir un efecte més lleu sobre la clínica si ho comparem amb l'efecte que tenen les delecions.

Fins ara, com s'ha descrit per les delecions, també s'han publicat algunes microduplicacions associades a patologies (Taula 6).

Taula 6- Principals microduplicacions associades a patologies concretes

"Síndrome"	número MIM	Anomalia cromosòmica
Microduplicació de 3q26.1	-	dup 3q36.1
Beckwith-Wiedemann	130650	dup 11p15
Charcote-Marie-Tooth	118220	dup 17p11.2
Microduplicació de PWACR	-	dup 15q11q13
Microduplicació de la regió 22q11.2	608363	dup 22q11.2

Abreviatures: PWACR: regió crítica del síndrome de Prader-Willi/Angelman

A continuació s'indiquen els principals trets clínics associats a microduplicacions:

- **Microduplicació de 3q26.1:** fenotípicament semblant a la síndrome de Cornelia de Lange (Rizzu i Baldini, 1994).
- **Síndrome Beckwith-Wiedemann:** exomfalmia, macroglossia, macrosomia i predisposició tumoral (Irving i col. 1967).
- **Síndrome de Charcott-Marie-Tooth:** neuropatia perifèrica (Lupski i col. 1992).
- **Microduplicació proximal 15q (reigó PWACR):** autisme, retard en el desenvolupament i dificultats d'aprenentatge i llenguatge (Cook i col. 1997; Browne i col. 1997; Koochek i col. 2006).
- **Microduplicació de la regió 22q11.2 (Fig.12):** característiques fenotípiques similars a la síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial amb alguns trets distintius com són les cel·les d'implantació alta i els ulls separats amb fissures palpebrals antimongoloides (Ensenauer i col. 2003).

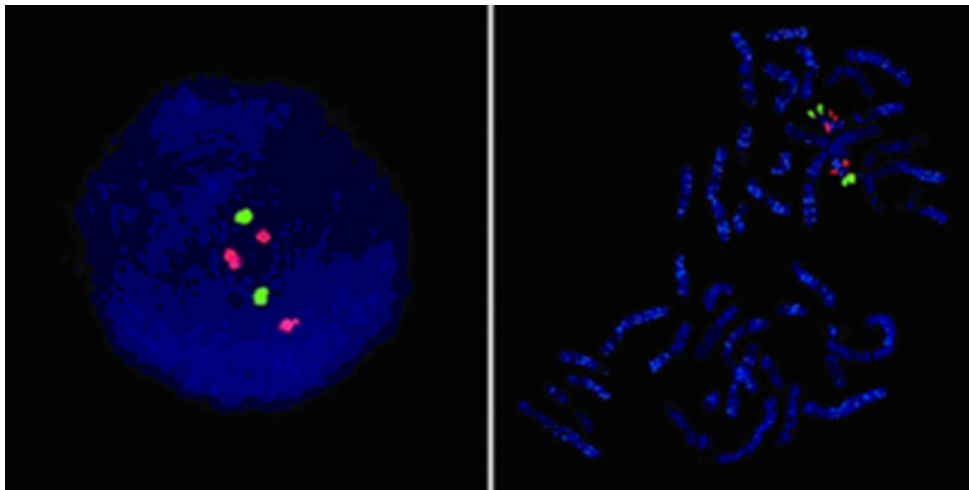


Fig.12- Anàlisi de FISH amb la sonda *locus* específica pel síndrome DiGeorge/VCFS on s'observen tres senyals de la regió 22q11.2 (vermell) i dues per la regió 22q13.3 (Yobb i col. 2005).

1.4.2- TRANSLOCACIONS

Les translocacions desequilibrades detectades per la tècnica de bandes G estan presents en aproximadament 0,04% dels naixements (Jacobs i col. 1992). Les equilibrades s'han descrit amb una freqüència de 1/500 (recíproques) i de 1/1.000 en nounats (Robertsonianes).

La majoria de portadors de translocacions "aparentment" equilibrades mostren un fenotip normal. Malgrat això, a vegades, s'ha vist que aquests portadors presenten anomalies congènites indicant que possiblement existeixi un desequilibri en el genoma no detectat per les tècniques emprades o bé que amb la translocació s'ha produït la disrupció d'algun gen o canvis en l'expressió gènica per efecte de posició.

Amb l'aplicació de tècniques de FISH i array-CGH s'han pogut detectar desequilibris de material translocat molt petit, translocacions críptiques, en individus amb cariotip normal (Fig.12). Prèviament, l'alteració cromosòmica no es detectava mitjançant la tècnica de bandes G degut a la mida de l'alteració o bé perquè el patró de bandes entre els fragments translocats era

similar. Les regions més implicades en les translocacions críptiques sovint son les telomèriques (Ledbetter, 1992; Adeyinka i col. 2005).

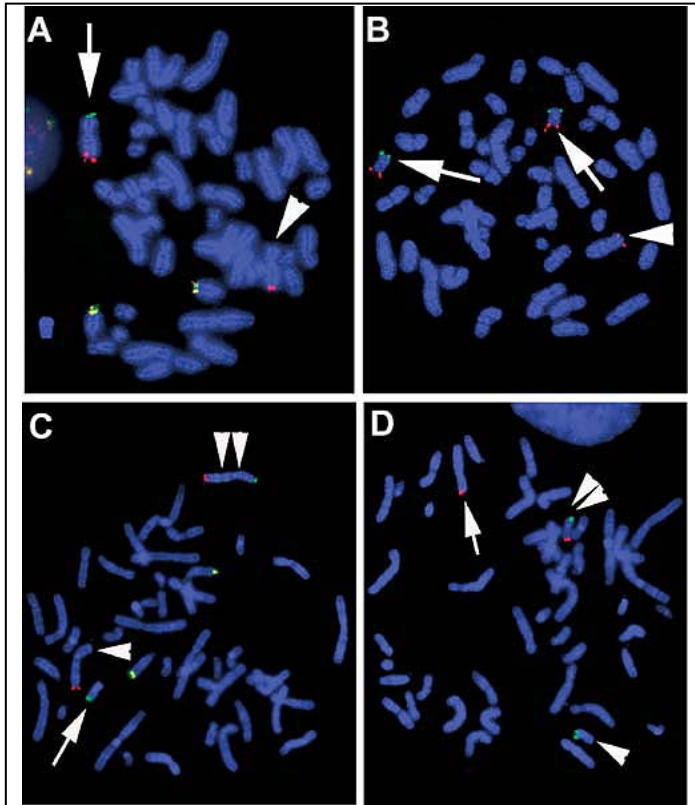


Fig.13- Identificació de dos translocacions subtelomèriques en dos pacients mitjançant sondes subtelomèriques. Determinació d'una translocació subtelomèrica desequilibrada t(7;20)(pter;qter) en un pacient (A i B). Determinació d'una translocació subtelomèrica equilibrada t(7;20)(pter;qter) en seu pare (C i D) (Adeyinka i col. 2005).

1.4.3- INVERSIONS

Una inversió és una reorganització cromosòmica que implica dos punts de trencament seguida d'una reinserció del fragment cromosòmic després d'una rotació de 180°.

S'han observat inversions en pràcticament tots els cromosomes. Les inversions s'anomenen pericèntriques si el centròmer s'inclou en la inversió (Fig.14) i es descriuen amb una freqüència de 0,12-0,7/1.000 nounats. Les inversions paracèntriques, no inclouen el centròmer, donant-se en un mateix braç cromosòmic i presenten una incidència menor (0,1-0,5/1000 nounats). En les freqüències no s'hi inclouen les variants polimòrfiques. Les inversions pericèntriques dels cromosomes 1, 9 i 16 es consideren polimòrfiques. A part d'aquestes tres típiques, avui en dia també es consideren variants polimòrfiques benignes en la població la inv(2)(p11q13), inv(3)(p11q11), inv(3)(p11q12), inv(3)(p13q12), inv(5)(p13q13) i la inv(10)(p11.2q21.2) (Gardner i Sutherland, 1996; Collinson i col. 1997; Hysert i col. 2006).

Normalment la inversió en si no eleva el risc de presentar un fenotip anormal (Madan, 1995) però sí que eleva la probabilitat de generar gàmetes cromosòmicament anormals. El risc d'obtenir gàmetes desequilibrats depèn de la probabilitat d'entrecreuament en el segment invertit durant la meiosi i és proporcional a la llargada del propi segment invertit.

Les tècniques de citogenètica molecular han permès caracteritzar inversions "críptiques" que per bandes G passaven desapercebudes o bé inversions que no es podien caracteritzar

adequadament (Kline i col. 2004; Shimokawa i col. 2004; Liang i col. 2006; Gimelli i col. 2006; Gajecka i col. 2006).

La caracterització acurada de les inversions és molt important per tal de poder entendre l'impacte fenotípic que poden originar i també per poder donar consell genètic a les famílies afectades.

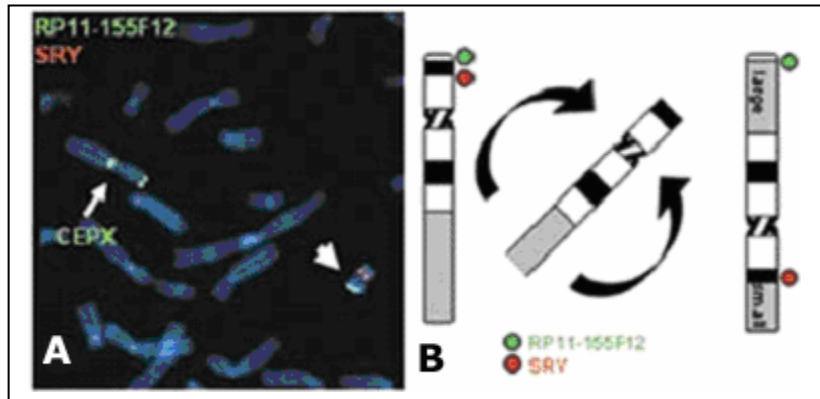


Fig.14- Caracterització dels punts de trencament implicats en una inversió del cromosoma Y. (A) FISH amb el BAC RP11-155F12 (verd) que dona una senyal al cromosoma X i una al cromosoma Y invertit i sonda *locus* específica SRY (vermella) que dona una senyal al cromosoma Y invertit. (B) representació esquemàtica del mecanisme de la inversió pericèntrica del cromosoma Y (Gimelli i col. 2006).

1.4.4- INSERCIONS

Les insercions són reorganitzacions cromosòmiques que impliquen tres punts de trencament i s'ha estimat que la freqüència en nounats és de 1/5.000 (Chudley i col. 1974).

Les insercions poden ser inter- o intracromosòmiques. Les insercions intercromosòmiques també s'anomenen translocacions insercionals i es donen quan un segment de cromosoma s'insereix en un altre cromosoma. Els productes desequilibrats que es poden trobar lligats a insercions són bàsicament duplicacions o delecions en el segment inserit.

Per altra banda hi ha les insercions intracromosòmiques. En aquest cas un fragment d'un cromosoma s'insereix en una altra posició del mateix cromosoma (s'anomena també desplaçament) diferenciant-se en pericèntrica quan el fragment s'insereix en l'altre braç del cromosoma o paracèntrica si s'insereix en el mateix braç.

Depenent de l'orientació en la que s'insereixi el fragment cromosòmic s'anomenarà inserció directa o invertida. Amb l'aplicació de la tècnica de bandes G les insercions eren difícils de caracteritzar. Aquest fet es va millorar amb les tècniques de citogenètica molecular. Actualment la tècnica de bandeig multicolor (MCB), M-FISH i l'aplicació de BACs, juntament amb l'anàlisi previ utilitzant la tècnica de bandes G ha permès millorar la caracterització de les insercions, Fig.15, posant de manifest l'existència d'insercions críptiques que abans haurien passat desapercebudes (Hernando i col. 2004; Lee i col. 2005; Rivera i col. 2006).

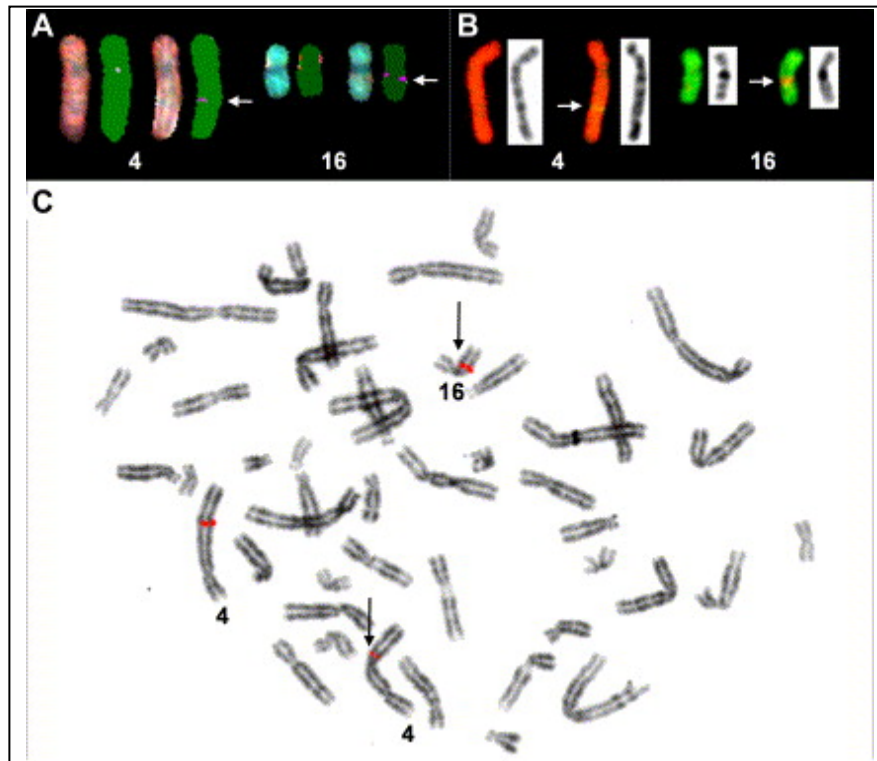


Fig.15- Anàlisi mitjançant SKY i FISH per la caracterització dels punts de trencament implicats en la inserció que presenta el pacient (A) Tècnica de SKY mostra la inserció recíproca (fletxes) confirmada per la tècnica de WCP (B). (C) Hibridació amb el BAC RP11-52k8 (vermell) que es correspon al punt de trencament en el der(4) en la banda cromosòmica 4q28.1 (fletxa) i per tant també es mostra una senyal pel BAC en el der(16)ins(4;16) (q26q28.1;q12.1q12.2)pat (Matthaei i col. 2005).

1.4.5- CROMOSOMES EN ANELL

Els cromosomes en anell es troben en baixa freqüència en nounats (0,03-0,016/1000). La formació dels cromosomes en anell comença pel trencament dels extrems distals dels dos braços cromosòmics amb la subseqüent reunió dels extrems. La quantitat de material genètic perdut dels dos extrems cromosòmics pot variar, per aquesta raó l'espectre de signes clínics en pacients amb anells del mateix cromosoma és molt ampli. El cromosoma en anell pot estar en addició al complement normal de cromosomes (cromosoma en anell supernumerari) o estar en el lloc d'un cromosoma normal. Dins dels cromosomes supernumeraris un 8-10% són cromosomes en anell (Jacobs, 1981). Majoritàriament mostren inestabilitat que contribueix a que molts cromosomes en anell es trobin en mosaïcisme.

S'han descrit cromosomes en anell de tots els cromosomes humans (Fig.16). Alguns cromosomes en anell s'han pogut associar a un quadre clínic concret. Un exemple és l'anell del cromosoma 20 que s'associa a epilèpsia, l'anell del cromosoma 13 i 14 s'associa a dismorfies i retard mental i l'anell del cromosoma 15 a retard mental, microcefàlia i nanisme. En general, en el cas que el cromosoma en anell sigui supernumerari, la clínica dependrà del material cromosòmic que es trobi en trisomia.

Per a la caracterització acurada dels cromosomes en anell han estat de molta utilitat les tècniques de CGH, HR-CGH, arrayCGH, MCB i BACs entre d'altres (Shashi i col. 2003; Andrieux i col. 2005; Balci i col. 2006; Zou i col. 2006).

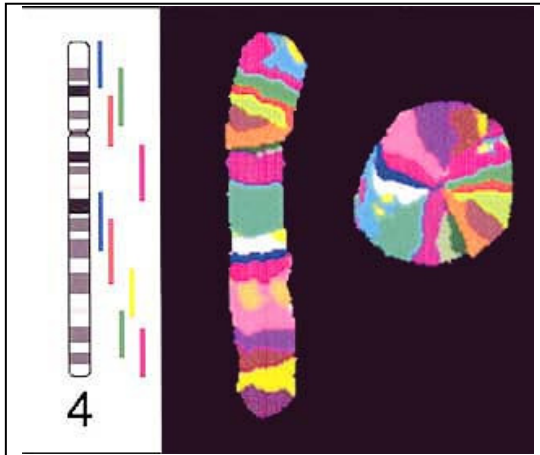


Fig.16- Caracterització d'un cromosoma 4 en anell, r(4)(p16.3q35) mitjançant la tècnica de MCB en un pacient amb síndrome de Wolf-Hirschhorn (Balci i col. 2006).

1.4.6- ISOCROMOSOMES

Un isocromosoma mostra la pèrdua d'un dels braços cromosòmics amb la subseqüent duplicació de l'altre braç. L'explicació més probable per a la formació d'un isocromosoma és la divisió transversal en lloc de la longitudinal, a nivell del centròmer durant la divisió cel·lular.

L'existència d'un isocromosoma, per tant, va lligat a una trisomia i monosomia parcial en un cromosoma a no ser que l'isocromosoma aparegui com una dotació extra al cariotip normal. En aquest cas l'isocromosoma originaria una tetrasomia parcial en un cromosoma. Diferents publicacions han descrit tetrasomies parcials lligades a l'aparició d'un isocromosoma (Wolpert i col. 2000; Genevieve i col. 2003; Lloveras i col. 2004; Polityko i col. 2005). Els isocromosomes poden presentar un o dos centròmers. En el cas que tinguin dos centròmers se'ls anomena cromosomes isodicèntrics.

La majoria dels isocromosomes descrits a la literatura estan formats pels dos braços llargs del cromosoma X i(Xq) i es troben en el 20% dels pacients amb la síndrome de Turner. L'altre isocromosoma més comú és el i(21q), constituït pels dos braços llargs del cromosoma 21 (causa de la síndrome de Down). En general, hi ha pocs isocromosomes descrits a la literatura ja que en la majoria de casos l'aneuploidia d'un dels cromosomes autosòmics no és compatible amb la vida.

La caracterització dels isocromosomes ha millorat amb l'aplicació de tècniques de FISH (Fig.17) i en especial amb la CGH o HR-CGH ja que els perfils obtinguts amb aquesta tècnica revelen clarament el material cromosòmic del que es compona l'isocromosoma (Fig.18).

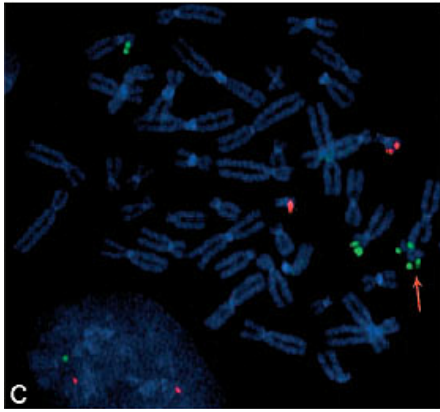


Fig.17- Caracterització mitjançant FISH amb la sonda subtelomèrica 12p (verda) d'un isocromosoma 12p extra en un pacient amb síndrome de Palliser-Killian (Polityko i col. 2005).

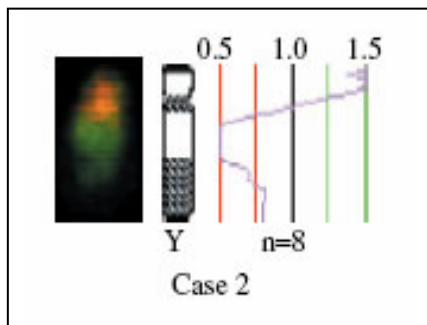


Fig.18- Caracterització mitjançant CGH d'un isocromosoma idic(Yp) amb el punt de trencament en Yq11.2. Els perfils de CGH mostren el guany de Yq11.2pter i la pèrdua de Yq11.2q12 (Hernando i col. 2002a).

1.4.7- REORGANITZACIONS SUBTELOMÈRIQUES

Les regions subtelomèriques es caracteritzen per contenir una alta densitat gènica. A més, són molt propenses a patir reorganitzacions pel fet que concentren un alt contingut de duplicacions segmentàries (Samonte i Eichler, 2002). Tot això fa que les alteracions en les regions subtelomèriques es descriguin freqüentment relacionades a retard mental, malformacions congènites i/o dismòrfies. S'ha descrit que, aproximadament, entre un 4-28% dels casos que presenten retard mental, malformacions congènites i/o trets dismòrfics tenien alteracions en aquestes regions (de Vries i col. 2003; Novelli i col. 2004; Sogaard i col. 2005; Northrop i col. 2005).

En un extens estudi portat a terme per Knight i col. (1999) es va descriure que el 50% dels casos amb reorganitzacions subtelomèriques que havien estudiat tenien origen familiar. La majoria són conseqüència d'un error en la segregació meiótica d'una translocació equilibrada present en el progenitor.

Els criteris que es tenen en compte per pre-seleccionar pacients amb possibles delecions subtelomèriques segons de Vries i col. (2001) són: 1) història familiar de retard mental, 2) retard del creixement en l'etapa prenatal, 3) anomalies del creixement en l'etapa postnatal, 4) trets dismòrfics facials i 5) trets dismòrfics no facials i/o anomalies congènites. En les sèries publicades s'han descrit majoritàriament delecions subtelomèriques i no tantes duplicacions en aquestes regions (Kirchhoff i col. 2004; Roberts i col. 2004; Palomares i col. 2006). Fins al moment, la delecio 1p36 és l'alteració subtelomèrica més freqüent i s'ha vist que està relacionada amb un quadre clínic concret que s'anomena síndrome de la monosomia 1p36 (MIM: 607872) (Shapira i col. 1997). Els casos descrits amb delecions subtelomèriques 1q, 4p, 5p i 9p mostren un fenotip consistent, ja s'ha començat a delinear un fenotip concret però per

moltes altres delecions encara no s'ha pogut descriure un quadre clínic concret degut, probablement, al baix número de casos publicats fins al moment (De Vries i col. 2001b, 2003).

També s'han descrit duplicacions subtelomèriques, encara que amb menys freqüència (Koolen i col. 2004; Northrop i col. 2005).

Les regions subtelomèriques es corresponen a bandes G negatives, per això resulta molt difícil caracteritzar alteracions en aquestes regions mitjançant la tècnica de bandes G. Les tècniques que s'utilitzen amb més èxit per caracteritzar alteracions subtelomèriques són la FISH subtelomèrica i també la tècnica de MLPA (Fig.19) (Kirchhoff i col. 2004, 2007; Northrop i col. 2005; Palomares i col. 2006).

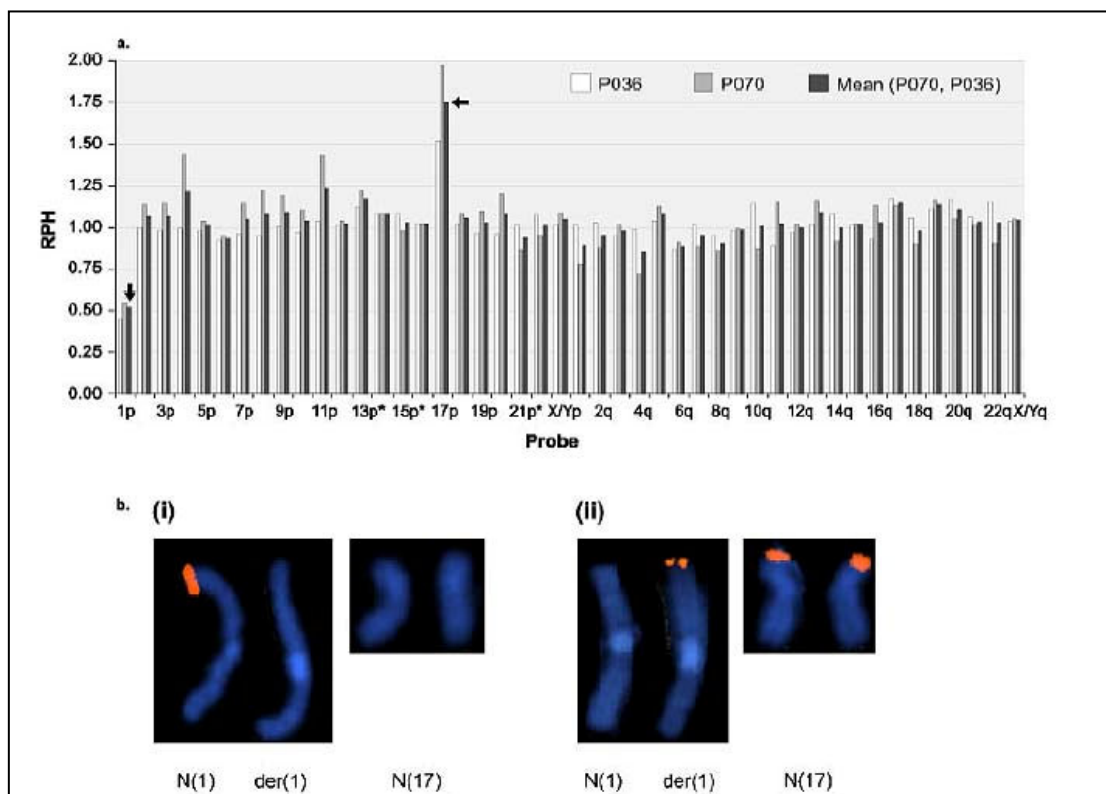


Fig.19- Identificació de dues reorganitzacions subtelomèriques en el mateix pacient. A) Histograma dels resultats obtinguts per MLPA de cada regió subtelomèrica on es mostra la deleción en 1pter i la duplicación en 17pter. B) confirmació dels resultats aplicant les sondes subtelomèriques 1p i 17p (Northrop i col. 2005).

1.4.8- REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES COMPLEXES

Les reorganitzacions cromosòmiques complexes (RCC) es defineixen com reorganitzacions estructurals amb tres, o més, trencaments i amb intercanvi de material genètic entre dos o més cromosomes (Pai i col. 1980). Es poden agrupar tenint en compte l'origen i el nombre de trencaments (Kousseff i col. 1993), el tipus de reorganització (Kausch i col. 1988), la preferència de reorganitzacions inter- o intra-cromosòmiques (Lurie col. 1994) i si són *de novo* o familiars (Kleczkowska i col. 1982). Les RCC *de novo* descrites solen estar associades a retard mental i anomalies congènites. S'assumeix que la causa del fenotip anormal en els pacients es deu a

delecions/duplicacions submicroscòpiques o disruptions, activacions o inactivacions de gens localitzats als punts de trencament o de gens propers a ells.

Les RCC són molt poc freqüents. Actualment s'han descrit més de 150 RCCs (Wakita i col. 1992, Fuster i col. 1997; Batanian i Eswara, 1998; Borg i col. 2005; Chen i col. 2006b; Karmous-Benailly i col. 2006). Les tècniques que s'utilitzen actualment per a la seva caracterització són la FISH multipintat (Fig.20), la M-FISH i també la CGH i els array-CGH ja que permeten detectar si existeixen desequilibris del genoma (Vermeulen i col. 2004; Hernando i col. 2004; Giardino i col. 2006; Schwarzbraun i col. 2006).

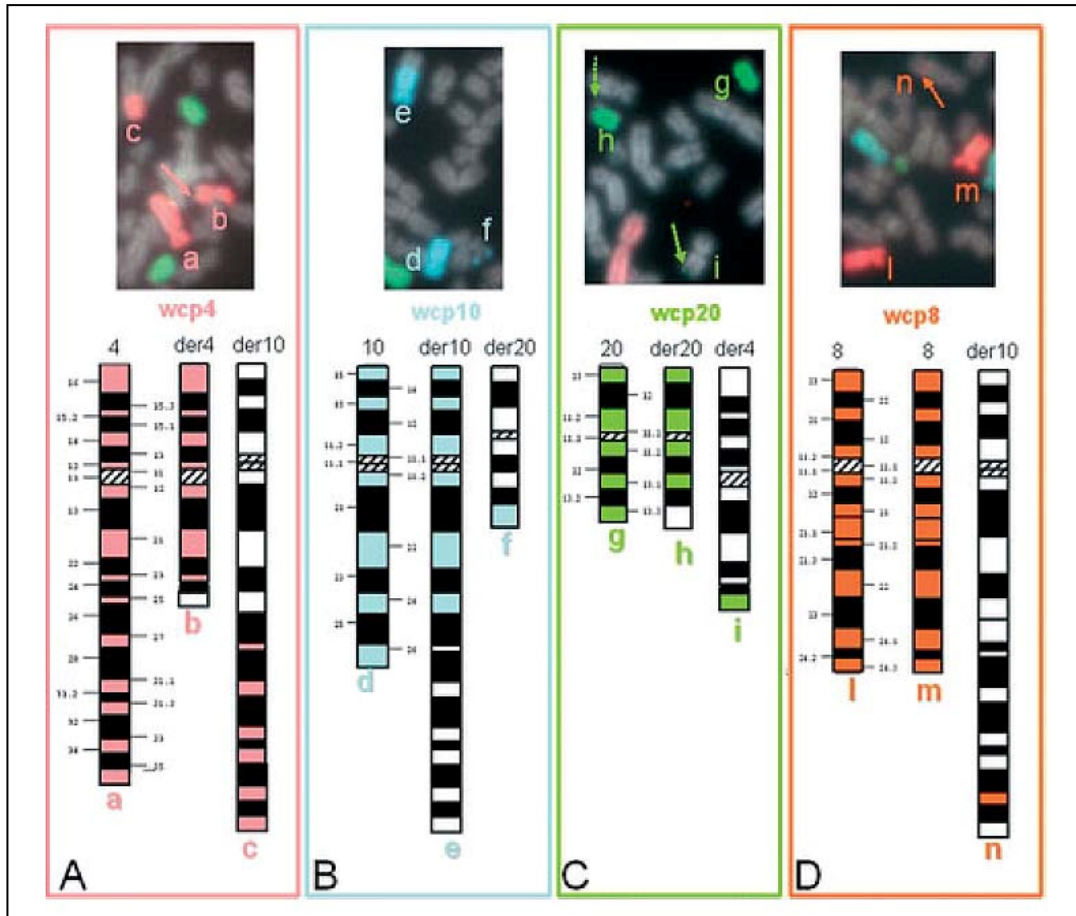


Fig.20- Caracterització d'una reorganització cromosòmica complexa que implica els cromosomes 4, 8, 10 i 20 mitjançant la tècnica de pintat cromosòmic (Giardino i col. 2006).

1.4.9- CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS

La primera descripció d'un cromosoma marcador supernumerari humà, *extra abnormal chromosome* o *small supernumeraris marker chromosome* (sSMC) la van fer Ilberry i col. (1961). A la literatura hi ha moltes definicions de cromosoma marcador supernumerari; Crolla i col. (1997) van proposar que es podien definir com petits cromosomes estructuralment anormals presents en el cariotip en addició als 46 cromosomes. Una altra definició més recent, i basada en la citogenètica, els considera com cromosomes estructuralment anormals que no es poden identificar o caracteritzar sense ambigüitats utilitzant només la citogenètica convencional i, en general, són de la mateixa mida o més petits que el cromosoma 20 de la mateixa metafase (Liehr i col, 2004a).

Els cromosomes marcadors supernumeraris poden tenir diverses mides però, en general, la majoria són petits cromosomes constituïts majoritàriament per heterocromatina centromèrica. En la seva classificació, segons Fuster i col. (2004), hi consten sis tipus segons la morfologia i la presència o absència d'eucromatina al cromosoma marcador (Taula 7): **Tipus 1:** petits cromosomes marcadors acrocèntrics d'origen familiar. Els pacients portadors d'aquest tipus de marcador presenten majoritàriament fenotip normal. En aquest grup s'hi troben el der(15) i der(22). **Tipus 2:** grans cromosomes marcadors acrocèntrics bisatel·litzats i dicèntrics. El fenotip sol ser anormal. Aquí hi trobem els cromosomes marcadors inv dup (15). **Tipus 3:** marcadors no acrocèntrics, generalment originats *de novo*. En aquest grup s'hi inclouen els marcadors no acrocèntrics de petita mida amb un risc moderat de tenir alteracions fenotípiques i els isocromosomes 12p i 18p associats a un fenotip anòmal. **Tipus 4:** marcadors en anell, la majoria són *de novo* i hi ha un risc elevat de presentar alteracions fenotípiques. **Tipus 5:** originats per una segregació anòmala a la meiosi d'un dels progenitors portador d'una reorganització cromosòmica equilibrada. Freqüentment van associats a alteracions fenotípiques. **Tipus 6:** marcadors neocèntrics. No contenen heterocromatina centromèrica detectable i es mantenen estables durant la divisió cel·lular. L'efecte fenotípic dependrà del grau de mosaïcisme i del tipus d'aneuploïdia.

Taula 7- Classificació dels marcadors supernumeraris

Tipus de sSMC	Freqüència	Morfologia	Composició	Origen cromosòmic	Risc de fenotip anòmal
Tipu I: acrocèntrics petits	>50%	acrocèntric (1 centròmer, pot ser bisatel·litzat)	heterocr	en general 15 i 22	baix/alt en el síndrome de <i>cat-eye</i>
Tipu II: acrocèntrics llargs	?	acrocèntric bisatel·litzat i dicèntric	eucr	el més comú inv dup (15)	alt
Tipu III: no acrocèntrics	25%	no acrocèntric	heterogènia	tots menys el 5	30-100%
Tipu IV: anells	10%	anell	heterogènia	tots els autosomes excepte 5, 11 i 22	heterogeni
Tipu V: derivats de translocacions	?	heterogènia	eucr	el més comú der(22)t(11;22)	alt
Tipu VI: neocèntrics	?	heterogènia sense centròmer detectable	eucr	els més freqüents 3q, 13q i 15q	alt

Abreviacions: heterocr., heterocromatina; eucr., eucromatina

Els sSMC es descriuen en un 0,043% del naixements, en un 0,077% dels estudis prenatals, en un 0,171% dels individus subfèrtils i en un 0,433% dels pacients amb retard mental (Liehr i col. 2004a,b).

La caracterització dels cromosomes marcadors és difícil ja que són molt heterogenis pel que fa a l'origen i morfologia. Fins que van aparèixer les tècniques de FISH resultava impossible caracteritzar-los mitjançant tècniques de citogenètica convencional. Diferents cromosomes marcadors s'han caracteritzat aplicant combinacions de sondes de pintat cromosòmic, específiques de centròmer o combinant la microdissecció cromosòmica i seguidament la tècnica de FISH. L'estudi amb aquestes tècniques és lenta, aquesta limitació ha estat millorada amb l'aplicació de la tècnica de FISH multicolor (Speicher i col. 1996; Schröck i col. 1996). Malgrat l'aparició de totes aquestes tecnologies de citogenètica molecular el problema en la identificació persistia quan els cromosomes marcadors eren molt petits i no presentaven eucromatina. En aquest cas va ser molt útil l'aparició de les tècniques de cenM-FISH i subcenM-FISH (Nietzel i col. 2001; Starke i col. 2003) (Fig.21).

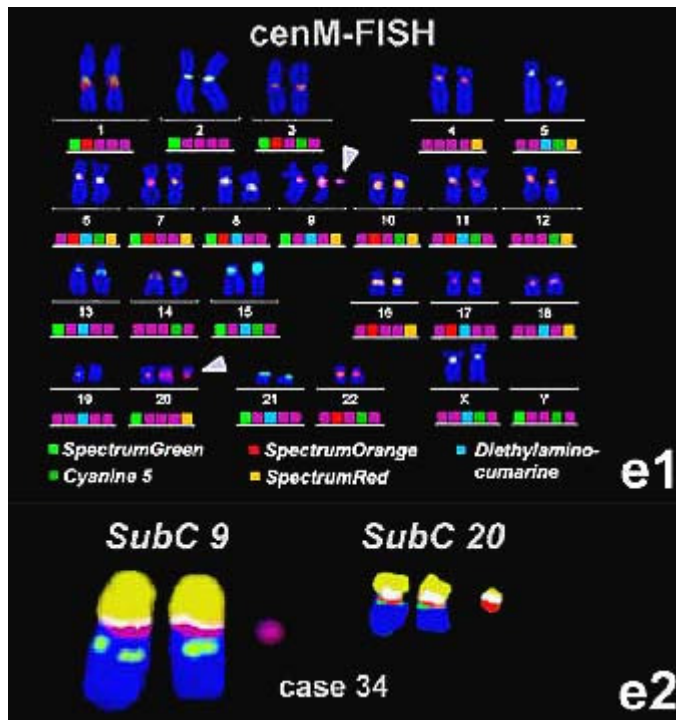


Fig.21- Caracterització de dos cromosomes marcadors derivats dels cromosomes 9 i 20 utilitzant les tècniques de cenM-FISH i subcenM-FISH (Starke i col. 2003, cas 34).

En termes generals s'ha definit que els cromosomes marcadors més freqüents són els que deriven del cromosoma 15, representant un 30% de tots els marcadors, seguits dels isocromosomes del braç curt del cromosoma 12, i(12p), amb una incidència de l'11%, el der(22) que representen el 10%, la *inv dup(22)* en un 7% i els isocromosomes del braç curt del cromosoma 18 en un 6%.

El principal problema de la presència dels sSMC en el cariotip és la gran heterogeneïtat de l'efecte fenotípic en el pacient portador. L'espectre és molt ampli i pot anar des de fenotip normal a sever (Paoloni-Giacobino i col. 1998). Amb l'excepció de la síndrome i(18p), la síndrome de Pallister-Killian (i(12p)) i la síndrome *cat-eye* (der(22)) hi ha pocs cromosomes marcadors caracteritzats associats a una clínica definida.

En general el risc d'un fenotip anormal en casos amb sSMC *de novo* és del 13% (Warburton, 1991). Aquest risc es redueix al 7% quan el marcador deriva dels cromosomes 13, 14, 21 o 22. I s'incrementa quan no deriven de cromosomes acrocèntrics (Crolla, 1998). Quan el cromosoma marcador s'ha heretat d'un progenitor amb fenotip normal no hi ha risc incrementat de presentar anomalies fenotípiques (Brondum-Nielsen Mikkelsen, 1995) encara que se n'han descrit algunes excepcions (Anderlid i col. 2001). Un altre factor a tenir en compte pel risc de presentar un fenotip anormal és la possibilitat de disomia uniparental (Shaffer i col. 2001; Kotzot, 2002; Starke i col. 2003).

Recentment, Liehr i col. (2006) han revisat els sSMC caracteritzats a la literatura. S'han descrit cromosomes marcadors derivats de tots els cromosomes i amb diferents morfologies (Taula 8). En aquesta la Taula no s'han inclòs els casos de les síndromes de Pallister-Killian, cat-eye (inv dup(22)(q11)), der(22) i i(18p).

Taula 8- Característiques dels cromosomes marcadors descrits a la literatura (Liehr i col., 2006)

Cromosoma (núm. de casos)	Minutes (%)	Anells	inv dup	Complexe
1(30 casos)	20	80	–	–
2(10 casos)	–	100	–	–
3(16 casos)	50	50	–	–
4(10 casos)	20	70	10	–
5(7 casos)	42	58	–	–
6(10 casos)	50	50	–	–
7(10 casos)	30	60	–	10
8(33 casos)	37	57	6	–
9(13 casos)	46	46	8	–
10(5 casos)	20	60	20	–
11(5 casos)	40	60	–	–
12(13 casos)	46	54	–	–
13(3 casos)	100	–	–	–
13 o 21(35 casos)	17	11	66	6
14(37 casos)	17	6	71	6
15(453 casos)	4,9	2	91,6	1,5
16(11 casos)	45	45	10	–
17(16 casos)	62	31	–	7
18(16 casos)	37	42	16	5
19(13 casos)	23	77	–	–
20(17 casos)	47	47	6	–
21(9 casos)	45	27	18	10
22(37 casos)	16	6	62	16
X(21 casos)	45	55	–	–
Y(3 casos)	–	33.3	33.3	33.3
Suma (833 casos)	34,2	45,2	16,8	3.8

1.4.10- CROMOSOMES NEOCÈNTRICS

La principal funció dels centròmers és assegurar la segregació cromosòmica correcta durant la divisió cel·lular. Els fragments o cromosomes que tenen manca de centròmer (acèntrics) tenen tendència a perdre's durant la mitosi. A més dels centròmers clàssics s'han descrit els neocentròmers (Voullaire i col. 1993).

Els neocentròmers són centròmers que apareixen en localitzacions cromosòmiques alternatives al centròmer original i que no presenten cap seqüència d'ADN α -satèl·lit, són negatius per bandes C, contenen una constricció primària i presenten proteïnes centromèriques indicatives de la formació de cinetocors funcionals. Malgrat la manca d'ADN α -satèl·lit, els neocentròmers són capaços de formar una constricció primària fent la funció de centròmer durant la mitosi però en la majoria de casos en els que els cromosomes contenen neocentròmer, aquests es troben en mosaic degut possiblement a una menor eficiència del neocentròmer, respecte el centròmer convencional, en la mitosi (Amor i Choo, 2002).

S'han descrit neocentròmers en la majoria dels cromosomes. Sembla que la formació de neocentròmers no és aleatòria ja que una gran proporció de neocentròmers s'han descrit en les regions 3q, 13q i 15q (Amor i Choo, 2002; Li i col. 2002; Barbi i col. 2003; Ventura i col. 2003).

En una revisió realitzada per Warburton (2004) es descriuen 70 neocentròmers diferents. La classe més comú de cromosomes neocèntrics són cromosomes supernumeraris que impliquen duplicacions invertides d'un fragment distal d'un cromosoma. Com resultat es presenta una tetrasomia de la regió duplicada (o una trisomia en el cas que es conservi el cromosoma delecionat).

Una altra classe de cromosomes neocèntrics s'han descrit pels cromosomes 3, 4 i 8. En aquest cas un autosoma aparentment no reorganitzat té un neocentròmer funcional mentre que el centròmer clàssic queda inactivat (Amor i col. 2004; Ventura i col. 2004). En aquests casos, els cromosomes s'anomenen neocèntrics ja que tenen dos centròmers.

També se n'han descrit casos pel cromosoma Y (Tyler-Smith i col. 1999).

La severitat del fenotip deguda a la presència d'un cromosoma neocèntric dependrà del grau d'aneuploïdia que origini i de l'estabilitat del fragment acèntric i pot variar de letal (en alguns casos de tri- o tetrasomia) a fenotip normal (en els casos equilibrats). S'ha observat la presència d'un cromosoma neocèntric en més d'una generació, quedant així provada la competència d'aquests en la meiosi (Knegt i col. 2002).

Per tal de detectar neocentròmers no són útils les sondes centromèriques convencionals ni la cenM-FISH ja que no hibriden amb els neocentròmers. Per tant s'han d'utilitzar tècniques d'immunofluorescència (Fig. 22) utilitzant anticossos contra proteïnes centromèriques (Voullaire i col. 1999; Levy i col. 2000).

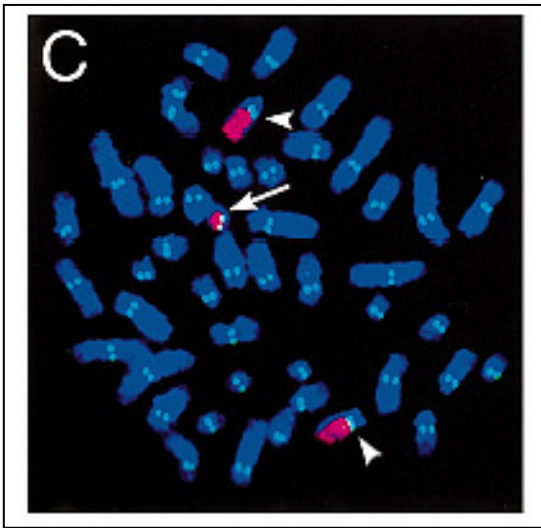


Fig.22- Caracterització d'un cromosoma neocèntric mitjançant immunofluorescència i FISH. La sonda wcp13 hibrida en el cromosoma neocèntric inv dup(13)(q32qter) i als dos cromosomes 13 normals (vermell). L'assaig immunofluorescent amb anticossos contra la proteïna CENP-C dona senyal positiva en el cromosoma neocèntric i en la resta de centròmers de tots els cromosomes (verd)(Levy i col. 2000).

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

L'**objectiu principal** d'aquest treball ha estat caracteritzar les anomalies cromosòmiques presents en individus amb malformacions congènites, o infertilitat, mitjançant tècniques de citogenètica convencional i molecular. Aquest objectiu comprèn els següents objectius concrets:

- 1- Comparar l'eficiència dels softwares de CGH convencional i HR-CGH en la identificació de desequilibris globals del genoma mitjançant l'anàlisi de mostres de retinoblastoma.
- 2- Valorar les avantatges i limitacions de les tècniques de citogenètica molecular emprades: CGH d'alta resolució, M-FISH, cenM-FISH, subcenM-FISH i MLPA per a la determinació d'alteracions cromosòmiques específiques.
- 3- Analitzar el tipus i freqüència d'alteracions cromosòmiques en aquests pacients.
- 4- Establir correlacions genotip-fenotip comparant les dades obtingudes amb les descrites a la bibliografia.

3. MATERIAL I MÈTODES

3- MATERIAL I MÈTODES

3.1- MATERIAL BIOLÒGIC

En aquest treball s'han estudiat mostres de pacients que presenten un cariotip que no ha estat resolt amb l'aplicació de les tècniques de citogenètica convencional o bé pacients que malgrat presentar un cariotip normal mostren un quadre clínic compatible amb una alteració cromosòmica. Diferents centres públics i privats que han col·laborat en aquest estudi es detallen en la Taula 9.

Taula 9- Relació de centres que han col·laborat en l'estudi

Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona
Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona
Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia
Hospital Virgen de las Nieves, Granada
Clínica de Girona, Girona
Clínica Quirón, Barcelona
Laboratori d'Anàlisis Clínics CERBA, Sabadell
Laboratori Dr. Miquel Duran Bellido, Barcelona
Laboratori General Lab, Barcelona
Laboratori Balaguer, Barcelona
Laboratori d'Anàlisis Dr. Echevarne, Barcelona
Centre de Patologia Cel·lular i Diagnòstic Prenatal, Barcelona
Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell
Instituto Hispalense de Pediatría, Sevilla

3.1.1- CARACTERÍSTIQUES DELS PACIENTS ESTUDIATS EN CADA GRUP

En el present estudi s'han analitzat diferents tipus de teixit: 10 mostres tumorals (retinoblastoma), 104 de sang perifèrica (SP), 1 de sang de cordó (SC), 17 de líquid amniòtic (LA), 1 de vellositats corials (VC) i en 1 cas es va analitzar pell.

L'estudi s'ha portat a terme a partir de 133 casos que s'han agrupat pel seu cariotip i/o la clínica que presenten. Podrem diferenciar els següents grups:

- Pacients afectes de retinoblastoma (10 casos)
- Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials autosòmiques (31 casos)
- Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials gonosòmiques (11 casos)

- Pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques: inversions i translocacions (8 casos)
- Pacients amb cromosomes marcadors supernumeraris (25 casos)
- Pacients amb cariotip normal i quadre clínic (48 casos)

Les característiques de cadascun dels casos analitzats es detallen en les Taules 10 a la 15.

Taula 10- Pacients afectes de retinoblastoma

Cas	Cariotip	Sexe/Edat	Indicació	Tipus mostra
RB1	?	M/30m	retinoblastoma	TT
RB2	?	F/19m	retinoblastoma	TT
RB3	?	M/10m	retinoblastoma	TT
RB4	?	M/9m	retinoblastoma	TT
RB5	?	F/30m	retinoblastoma	TT
RB6	?	M/6,5m	retinoblastoma	TT
RB7	?	M/72m	retinoblastoma	TT
RB8	?	M/96m	retinoblastoma	TT
RB9	?	F/24m	retinoblastoma	TT
RB10	?	F/24m	retinoblastoma	TT

Abreviacions: TT, teixit tumoral; M, sexe masculí; F, sexe femení; m, mesos

Taula 11- Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials autosòmiques

Cas	Cariotip	Sexe/Edat	Indicació	Tipus mostra
MS-44	46,XX,add(2)(q37)	F/6a	Quadre clínic	SP
MS-46	46,X,der(X)t(X;20)(p11.2;?)	F/3a	Quadre clínic	SP
MS-47	46,XX,add(10)(q26.3)	F/?	?	SP
MS-54	46,XY,del(7)(p?)	M/nn	Quadre clínic	SP
MS-55	46,XX,add(5)(p15.3)	F/f	Translucència nucal patològica	LA
MS-63	46,XX,add(2)(q37)	F/?	?	SP
MS-70	46,XY,dup(8)(p?)	M/2a	Retard psicomotor	SP
MS-71	46,XX,add(13)(p11.2)	F/1a	Quadre clínic	SP
MS-72	46,XX,add(22)(p11.2)	F/7m	Quadre clínic	SP
MS-96	46,XX,add(20)(p13)	F/?	Quadre clínic	SP

MS-99	46,XX,add(8)(p23.3)	F/f	Avortament espontani	VC
MS-100	46,XX,del(18)(q21)	F/?	?	SP
MS-104	46,XX,dup(15)(q?)[20]/46,XX[42]	F/?	?	SP
MS-105	46,XY,dup(13)(q14.3q22)	M/9a	Quadre clínic	SP
MS-105-G	46,XY,dup(13)(q21.2q22)	M/?	Hipoacúsia	SP
MS-107	46,XX,add(5)(q35)[?]/46,XX[?]	F/f	Diagnòstic prenatal: edat materna	LA
MS-110	46,XY,del(6)(q?)	M/?	Quadre clínic	SP
MS-116	46,XY,add(10)(p15.3)	M/f	?	LA
MS-120	46,XX,r(13)(q12q32)[33]/ 45,XX,-13[6]	F/f	Diagnòstic prenatal: fetus amb múltiples malformacions	LA
MS-130	46,XX,del(18)(p11.2)	F/?	Quadre clínic	SP
MS-135	46,XX,add(1)(p36.3)	?	?	SP
MS-140	46,XY,add(16)(p13.3)	M/2a	Quadre clínic	SP
MS-154	46,XX,dup(1)(q4?)	F/15a	Retard mental i malformacions	SP
MS-155	46,XY,add(12)(?)	M/6a	Retard mental i malformacions	SP
MS-159	46,XX,del(11)(q23.3)	F/?	Síndrome de Jacobsen	SP
MS-161	46,XX,del(11)(q23.3)	F/?	Síndrome de Jacobsen	SP
MS-170	46,XX,add(12)(p13.3)	F/?	Quadre clínic	SP
MS-179	46,XX,r(15)(p11.2q26.3)	F/9a	Quadre clínic	SP
MS-194	46,XX,add(10)(q26.3)	F/7m	Malformacions	SP
MS-195	46,XX,add(10)(p15.3)	F/f	Diagnòstic prenatal: fetus amb malformacions	LA
MS-196	46,XY,dup(21)(q?)	M/f	Diagnòstic prenatal: ectàsia pièlica bilateral	SC

Abreviacions: SP, sang perifèrica; LA, líquid amniòtic; VC, vellositats corials; SC, sang de cordó; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; m, mesos; nn, nounat; f, fetus; ad, adult

Taula 12- Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials en els cromosomes sexuals

Cas	Cariotip	Sexe/Edat	Indicació	Tipus mostra
MS-21	46,XX,del(X)(p22.3)	F/?	Talla baixa i deformitat de Madelung	SP
MS-25	46,X,del(X)(p22.1)	?	?	LA
MS-32	46,X,del(X)(q24)	?/f	?	LA
MS-56	46,X,add(Y)(p11.3)	M/f	Diagnòstic prenatal: antecedent d'anomalia cromosòmica	LA
MS-73	46,X,i(Y)(q11.2)[78]/46,XY[22]	M/?	Síndrome de Weaver	SP
MS-91	45,X,del(Y)(q?)dn,der(14;15)(q10;q10)pat	M/33a	Esterilitat	SP
MS-97	46,XX,del(X)(p?)	F/22a	Quadre clínic	SP
MS-129	46,XX,add(X)(p22.2)	F/6m	Estenosi anal, camptodactília i cara peculiar	SP
MS-183	46,XY,i(Y)(q11.2)	M/?	Retard mental	SP
MS-184	46,XX	M/ad	Esterilitat	SP
MS-197	46,XY,der(15)t(Y;15)(?;p11.2)	M/f	Diagnòstic prenatal: ansietat	LA

Abreviacions: SP, sang perifèrica; LA, líquid amniòtic; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; f, fetus; nn, nounat; dn, de novo; pat, patern

Taula 13- Pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques: inversions i translocacions

Cas	Cariotip	Sexe/Edat	Indicació	Tipus mostra
MS-45	46,XX,t(1;14)(p22.3;p11.2)	F/12a	Quadre clínic	SP
MS-77	46,XY,t(8;18)(p11.2;p11.2), t(12;13)(q13;q12)	M/f	Diagnòstic prenatal: edat materna avançada	LA
MS-111	46,XX,der(2)t(2;3)(q33;p21), der(3)t(2;3)inv(3)(?)	F/nn	Quadre clínic	SP
MS-117	46,XY,t(6;19)(p21.3;q13.4)mat	M/1a	Quadre clínic	SP
MS-118	46,XX,t(5;6)(q13;p23)	F/2a	Retard psicomotor, molt gran per la seva edat	SP
MS-134	46,XX,t(1;7)(q43;q22),t(2;6)(p25;q21)	F/?	?	SP
MS-146	46,XX,inv(9)(p12q13)*	F/1	Quadre clínic	SP
MS-147	46,XY,t(4;21;12)(p15.2;q22.3;p13.1)	M/f	Diagnòstic prenatal: cribratge bioquímic positiu	LA

Abreujacions: SP, sang perifèrica; LA, líquid amniòtic; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; f, fetus; nn, nounat; *inversió considerada polimorfisme en la població

Taula 14 - Pacients amb cromosomes marcadors supernumeraris

Cas	Cariotip	Sexe/Edat	Indicació diagnòstica	Tipus de mostra
MS-30	47,XX,+mar	F/31a	Diagnòstic prenatal / fetus amb cromosoma marcador	SP
MS-31	47,XY,+mar	M/37a	Infertilitat	SP
MS-36	47,XX,+mar	F/?	Displàsia ectodèrmica	Pell
MS-37	47,XX,+mar	F/?	Fenotip normal	SP
MS-42	48,XY,+21,+mar	M/7a	Síndrome de Down	SP
MS-42-M	48,XX,+2mar	F/41a	Descendents amb cariotip anormal (MS-42 i MS-43)	SP
MS-43	47,XY,+mar	M/3a	Germà amb Síndrome de Down (MS-42)	SP
MS-50	47,XY,+mar[35]/46,XY[65]	F/?	Quadre clínic	SP
MS-64	47,XX,+mar[30]/46,XX[14]	F/f	Sospita d'omfalocele, CIR, peu equí i higroma	LA
MS-78	47,XX,+mar[35]/46,XX[8]	F/f	Diagnòstic prenatal	LA
MS-82	47,XX,+mar[12]/46,XX[6]	F/18s	Dues anomalies menors i una mínima hipotonia axial	LA/SP

MS-89	47,XX,+mar	F/?	No parla, sordesa, problemes per caminar	SP
MS-101	47,XY,+mar	M/?	Quadre clínic	SP
MS-103	47,XY,+mar	M/17s	Diagnòstic prenatal	LA
MS-106	47,XX,+mar[18]/46,XX[42]	F/31a	Infertilitat	SP
MS-113	47,XX,+mar[70]/46,XX[30]	F/?	Retard psicomotor i epilèpsia	SP
MS-114	47,XX,+mar	F/f	Diagnòstic prenatal	LA
MS-138	47-53,XY,+1~7mar[?]/46,XY[?]	M/8a	Retard psicomotor, hiperactivitat, criptorquidisme unilateral	SP
MS-141	47,XY,+mar[13]/46,XY[8]	M/f	Bessons amb discordança de creixement	LA
MS-152	46,XY,+mar	M/3a	Quadre clínic	SP
MS-165	47,XX,+mar[50]/46,XX[50]	F/?	Quadre clínic	SP
MS-188	47,XY,+mar[30]/46,XY[70]	M/15d	Quadre clínic	SP
MS-198	48,XY,+2mar	M/ad	Pacient de FIV	SP
M-13	47,XX,+mar	F/?	Descendent amb cariotip anormal (M-14)	SP
M-14	48,XY,+2mar	M/37a	Infertilitat (oligozoospermia)	SP

Abreujacions: SP, sang perifèrica; LA, líquid amniòtic; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; m, mesos; d, dies; f, fetus; nn, nounat

Taula 15- Pacients amb cariotip normal i clínica severa

Cas	Cariotip	Sexe/Edat	Indicació diagnòstica	Tipus de mostra
MS-60	46,XX	F/9a	Quadre clínic	SP
MS-65	46,XY	M/3a	Quadre clínic	SP
MS-66	46,XX	F/1a	Quadre clínic	SP
MS-76	46,XX	F/ad	Quadre clínic	SP
MS-79	46,XX	F/5a	Quadre clínic	SP
MS-80	46,XY	M/2a	Quadre clínic	SP
MS-87	46,XX	M/8a	Quadre clínic	SP
MS-88	46,XY	M/7a	Quadre clínic	SP
MS-90	46,XX	F/?	Quadre clínic	SP
MS-92	46,XY	M/?	Quadre clínic	SP

MS-93	46,XY	M/?	Quadre clínic	SP
MS-102	46,XX	F/?	Quadre clínic	SP
MS-112	46,XY	M/4a	Quadre clínic	SP
MS-119	46,XY	M/4m	Quadre clínic	SP
MS-123	46,XY	M/?	Quadre clínic	SP
MS-124	46,XY	M/5m	Quadre clínic	SP
MS-127	46,XX	F/3a	Quadre clínic	SP
MS-131	46,XX	F/8a	Quadre clínic	SP
MS-132	46,XX	F/11a	Quadre clínic	SP
MS-137	46,XY	M/?	Quadre clínic	SP
MS-143	46,XX	F/2a	Quadre clínic	SP
MS-144	46,XX	F/5a	Quadre clínic	SP
MS-145	46,XY	M/6a	Quadre clínic	SP
MS-148	46,XY	M/8a	Quadre clínic	SP
MS-149	46,XY	M/5a	Quadre clínic	SP
MS-150	46,XY	M/10a	Quadre clínic	SP
MS-151	46,XX	F/9a	Síndrome de Kabuki	SP
MS-153	46,XX	F/8a	Quadre clínic	SP
MS-156	46,XY	M/2a	Retard mental i malformacions	SP
MS-157	46,XX	F/2a	Quadre clínic	SP
MS-162	46,XX	F/15a	Trets dismòrfics	SP
MS-163	46,XY	M/1a	Quadre clínic	SP
MS-164	46,XY	M/5a	Quadre clínic	SP
MS-166	46,XX	F/16a	Quadre clínic	SP
MS-169	46,XX	F/20a	Quadre clínic	SP
MS-171	46,XY	M/5a	Quadre clínic	SP
MS-172	46,XY	M/3a	Quadre clínic	SP
MS-173	46,XY	M/5a	Quadre clínic	SP
MS-175	46,XX	F/2a	Quadre clínic	SP
MS-180	46,XY	M/4a	Quadre clínic	SP
MS-181	46,XY	M/15a	Quadre clínic	SP
MS-182	46,XY	M/?	Infertilitat	SP
MS-185	46,XX	F/6a	Quadre clínic	SP
MS-186	46,XX	F/10a	Retard mental i trets dismòrfics	SP

MS-187	46,XY	M/2a	Quadre clínic	SP
MS-190	46,XY	M/?	Quadre clínic	SP
MS-191	46,XX	F/10a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
MS-192	46,XX	F/2a	Quadre clínic	SP

Abreვიციონს: SP, sang perifèrica; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; m, mesos; ad, adult

3.1.2- DESCRIPCIÓ CLÍNICA DELS PACIENTS

3.1.2.1- Pacients afectes de retinoblastoma

S'han analitzat tumors de retinoblastoma de 10 pacients. Quatre d'aquests tumors eren de tipus bilateral i la resta unilaterals. Les edats dels pacients amb tumors bilaterals estaven compresa entre 6.5 i 30 mesos i els unilaterals entre 10 i 96 mesos. Les característiques clíniques dels 10 pacients es detallen a continuació:

RB1

Nen amb retinoblastoma bilateral diagnosticat als 30 mesos. Tumoració al ull esquerra amb calcificacions i despreniment de retina. A l'ull esquerra s'hi observa leucocòria i tumoració a l'ull dret. Enucleació de l'ull esquerra i radioteràpia a l'ull dret. La tumoració de l'ull esquerra ocupa la càmera posterior, té coloració marró clar i consistència tova. Està constituïda per cèl·lules blàstiques basòfiles, regulars, rodones, amb formació d'estructures rosetoides. No s'observa invasió del nervi òptic ni de la coroide. Abundant necrosi intratumoral (60%).

RB2

Nena amb retinoblastoma bilateral diagnosticat als 19 mesos. S'observa estrabisme. A l'ull dret s'hi observen múltiples zones de calcificació corresponent a retinoblastoma acompanyat de despreniment de retina. A l'ull esquerra s'hi observen 2 implants tumorals. No s'observa invasió del nervi òptic ni de la coroide. Enucleació de l'ull dret i radioteràpia a l'ull esquerra.

RB3

Nen amb retinoblastoma unilateral diagnosticat als 10 mesos. Tumoració a l'ull dret situat a la càmera posterior ocupada per material blanc cremós dens. Constituïda per cèl·lules basòfiles petites d'escàs citoplasma i molt esporàdicament amb substància intercel·lular. Poca diferenciació rosetoide i necrosi. Invasió de la retina, coroide i cos ciliat. Nervi òptic no envaït.

RB4

Nen amb retinoblastoma bilateral diagnosticat als 9 mesos. Estrabisme convergent. Leucocòria bilateral. S'observa tumoració de gran dimensió a l'ull esquerra amb calcificació i despreniment de retina. Tumoració constituïda per cèl·lules basòfiles que es distribueixen ocupant tota la càmera posterior a partir de la superfície de la retina. Es diferencien nombroses formacions rosetoides. S'observen alguns focus aïllats de necrosi intratumoral, sense superar mai el 20% de l'extensió del tumor. A l'ull dret s'observa una massa blanca en el sector nasal de grandària important amb aspecte compatible amb retinoblastoma. Es procedeix a l'enucleació de l'ull esquerra i radioteràpia. No s'observa expansió extraocular ni invasió del nervi òptic.

RB5

Nena amb retinoblastoma unilateral diagnosticat als 30 mesos. Tumoració a l'ull dret. Presenta leucocòria i còrnia opaca. La tumoració es presenta blanca, adherida a la paret de la càmera posterior. Es procedeix a l'enucleació de l'ull dret sense afectar aparentment el nervi òptic.

RB6

Nen amb retinoblastoma bilateral diagnosticat als 6 mesos i mig. Estrabisme convergent dret. Leucocòria bilateral amb despreniment de retina secundari a massa sòlida blanquinosa. Múltiples calcificacions. Tumoració constituïda per cèl·lules petites de nucli hiperromàtic amb citoplasma escàs que focalment es disposen al voltant d'una llum central tapissada per una membrana basal formant rosetes. Abundants àrees de necrosi, amb calcificacions distròfiques. No s'observa invasió del nervi òptic ni de la coroide. Enucleació dels dos ulls i quimioteràpia. Es fa l'estudi de l'ull dret.

RB7

Nen amb retinoblastoma unilateral a l'ull dret diagnosticat als 72 mesos. Tumoració constituïda per cèl·lules rodones petites, hiperromàtiques, amb citoplasma escàs, es disposen formant rosetes amb una llum central. Necrosi 40-45%. No afectació del nervi òptic però sí de la coroide. Leucocòria a l'ull dret.

RB8

Nen amb retinoblastoma unilateral diagnosticat als 96 mesos. A l'ull esquerra s'hi observa tumoració sòlida i calcificada a l'interior del glòbul ocular, amb despreniment de retina secundari. Tumoració constituïda per cèl·lules petites d'escàs citoplasma amb estructures rosetoides aïllades. S'observa un 60% de necrosi tumoral i invasió del nervi òptic. Coroide no envaïda en el material estudiat.

RB9

Nena amb retinoblastoma unilateral diagnosticat als 24 mesos. Retina despresa a l'ull esquerra. Tumoració a l'ull esquerra molt diferenciat amb àrees de necrosi 50-60%. Tumor de cèl·lules petites i rodones, amb citoplasma escàs amb àrees de necrosi i calcificacions distròfiques. Tumor amb consistència tova i necròtica.

RB10

Nena amb retinoblastoma unilateral diagnosticat als 24 mesos. Tumoració multifocal a l'ull esquerra amb leucocòria i calcificació.

3.1.2.2- Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials autosòmiques

A continuació es detallen les característiques clíniques de dotze pacients assignats a aquest grup:

MS-44

46,XX,add(2)(q37)

Nena que als 6 anys presenta cabell fi i ros. Nas pla i ample amb pont nasal deprimat i un filtre pla. Presenta hipertelorisme important amb estrabisme divergent. Té dificultats per la deambulació i retard mental sever (diu algunes paraules). Es mossega amb freqüència però és afable. No presenta trastorns de l'espectre autista. És hipotònica globalment.

MS-46

46,X,der(X)t(X;20)(p11.2;?)

Nena de 3 anys d'edat. Mare de 32 anys, pare de 36 anys i fumador, no consanguinis i sans. Dos germanes sanes. La mare és portadora d'una translocació equilibrada t(X;20), al igual que 4 germans seus. Només una germana no té la translocació i un altre té un mosaic de trisomia 8 (3-4%). L'embaràs va ser normal amb grip al sisè mes, moviments fetals als 4 mesos. Part de natges. Test d'Apgar 7-9. El pes va ser de 2.870 g (-1,2 DS), la talla de 48,8 cm (-0,5DS) i el PC 34,5 cm (P-50). Al néixer tenia el coll curt amb pell sobrant, hiperlaxitud articular, escurçament rizomèlic de les extremitats. CIA *ostium secundum* (comunicació interauricular). Fons d'ull, mapa ossi, bioquímica rutinària i ecografia cerebral normals. Als 9 mesos de vida presentava bon estat general, 7.800 g (P-8), 63,5 cm (-3 DS) i PC 44 cm. (P-25). Mínima asimetria de l'hemicòs esquerra. La circumferència del braç dret és de 15,5 cm i la del braç esquerra 14,5 cm. La longitud de l'extremitat inferior esquerra sembla més curta que la del dret, però les radiografies informen que són normals. Ulls mongoloides, paladar alt i estret, coll curt, solc simià bilateral, dors dels dos peus grossos. Als 30 mesos presenta 9.650 g (-2,4 DS), 81 cm (-3,5 DS) i PC 46,3 cm (P-3). Discreta micrognàtia, estèrnum curt i limitació de l'extensió dels colzes. L'edat òssia és de 2 anys. Discret retard psicomotor, va començar a caminar sense ajuda als 28 mesos i als 30 mesos parla molt malament, escara que és molt espavilada, simpàtica i activa.

MS-54

46,XY,del(7)(p?)

Gestació controlada des de la setmana 34 per polihidramni, glucèmies elevades amb la prova de tolerància oral a la glucosa normal. Part a les 37 setmanes induït per ruptura prematura de membranes, presentació cefàlica y expulsu per espàtules, líquid amniòtic clar; bona adaptació neonatal i Apgar 9/10; ingressa al centre per trets dismòrfics. Pes de 3.370 g, talla de 51 cm i PC de 34 cm. Crani enfonsat pels temporals, fontanel·les obertes. Arrel nasal ampla amb pell redundat. Orelles petites amb rotació posterior. Fissures palpebrals antimongoloides amb hipertelorisme; exoftàlmia amb miosi i megalocòrnia. Retrognàtia amb paladar alt sense fissura. Galtes i barbeta prominents. Mans amb aracnodactília amb desviació cubital i al 2n dit de la mà esquerra camptodactília. Penis petit amb bossa escrotal hipoplàsica; testicles a la bossa. To muscular i reflexes primitius normals amb estat d'alerta òptim sense alteració del nivell de consciència, craneosinostosi amb tancament prematur de la sutura metòpica, trigonocefàlia. Dificultat per a l'alimentació. Infeccions de les vies respiratòries superiors i inferiors que obliga a l'alimentació per sonda nasogàstrica. Corba pondoestatural patològica amb pes per sota del P-3. L'evolució des del punt de vista neurològic és la d'una hipotonia central no paralítica amb retard psicomotor a les 4 àrees del desenvolupament. Als 8 mesos es realitza correcció de craneosinostosi precisant traqueotomia prèvia per la patologia de la laringe i dismorfologia craniofacial.

MS-71

46,XX,add(13)(p11.2)

Nena de 1 any que presenta talla baixa, hipertonia, microcefàlia, braquicefàlia, retard psicomotor lleu, quist del plexe coroide dret, hipoplàsia del clítoris i llavis menors, solc palmar simià bilateral.

MS-72

46,XX,add(22)(p11.2)

Embaràs normal, moviments fetals als 4 mesos. Part normal a les 41 setmanes. Pes de 2.945 g, longitud de 47,5 cm i PC de 32 cm. Puntuació d'Apgar de 10. Llavi leporí dret i peus equins. Als 7 mesos pes de 6,2 Kg (-2DS), talla de 64 cm (P-8), PC de 41,8 cm (P-7). Longitud de les mans de 6,7 cm (<P-3), amplada 3,6 cm (<P-3), longitud dels peus de 8,6 cm (<P-3), amplada dels peus 3,6 cm (<P-3). Mà petita i amb falanges distals molt curtes. Fontanel·la anterior 5x4 cm, epicant, arrel nasal ampla, orelles lleugerament grans amb lòbuls plegats cap a davant. Solc simià bilateral i clinodactília. L'extremitat inferior esquerra és 0,5 cm més curta que la dreta, però la mobilitat de les extremitats és normal. Distribució anormal de la grassa subcutània per sobre el gluti i la regió pubiana és molt gruixuda. No sedestació.

MS-96

46,XX,add(20)(p13)

Nena que presenta retard mental, microcefàlia, microftàlmia, estatura baixa, ronyons petits i hemivèrtebres.

MS-105

46,XY,dup(13)(q14.3q22)

Nen de 9 anys que presenta macrosomia, trets dismòrfics lleus i retard mental moderat. RMN cerebral i EEG normals.

MS-110

46,XY,del(6)(q?)

Nen que als 13 dies de vida és ingressat per cardiopatia i malformacions. Embaràs de 37 setmanes amb triple cribratge de baix risc, oligohidramni i retard del creixement (-2 SD a les 32 setmanes i -3 SD a les 36 setmanes) i finalment neix per cesària per patiment fetal agut.

Al néixer el pes és de 1.950 g, la talla de 6 cm i el PC de 31,8 cm. Apgar 6/7.

L'examen físic mostra occipital pla, retrognàtia, nas amb punta bulbosa, hipertelorisme, orelles d'implantació baixa, orella dreta amb l'hèlix desplegat i l'orella esquerra d'aspecte puntegut. El paladar és normal. Presenta tetralogia de Fallot i CIV (comunicació interventricular). En la mà esquerra s'observa una campodactília del 3er i 4rt dit. Hipoplàsia de les ungles dels dits 4 i 5. A la mà dreta els dits 5 i 4 presenten la mateixa longitud, estant duplicat el 4 a partir de la segona falange. Els genitals són normals. S'observa un dèficit d'antitrombina III i proteïna C. L'ecografia cerebral mostra un quist coroïdal, l'abdominal una ectàsia pièlica dreta. La RNM cerebral mostra una morfologia asimètrica de la calota cranial, amb ventrícles lleugerament engrandits, espai subaranoïdal dilatat, signes de pèrdua de volum del parènquima cerebral i cerebel.

MS-130

46,XX,del(18)(p?)

Nena amb pes i estatura per sota del P-3. PC en el P-25. Cara amb trets dismòrfics: boca gran, orelles d'implantació baixa i grans. Mamil·les separades. Hipertelorisme. Múltiples càries dentals. Anèmia ferropènica.

MS-140

46,XY,add(16)(p13.3)

Nen de 2 anys que pesa 11,5 Kg, mesura 87,5 cm, i el perímetre cranial és de 49 cm. No parla. Té dificultats motores lleus, amb estrabisme divergent de l'ull dret, dents petites, boca de carpa, hipertelorisme amb fissures palpebrals antimongoloides. Mans normals. Pit excavat. Taca acròmica al coll. Peus equins bilaterals. RGE i infeccions bronquials freqüents. Bronqui supernumerari amb estenosi traqueal. Estudi cardiològic normal.

MS-170

46,XX,add(12)(p13)

Nena amb aspecte de la síndrome de Cornelia de Lange. S'assembla a la mare. En el període neonatal s'observen celles gruixudes. Als 9 mesos s'observen celles juntes i hipertricosi a l'esquena i orelles. Als 29 mesos s'observen celles juntes (lleu), pestanyes llargues i poblades i hipertricosi a l'esquena i orelles.

A nivell de creixement i desenvolupament el creixement intrauterí és retardat i als 7 mesos el perímetre cefàlic és de 41.5 cm; als 9 mesos el pes és de 7.960 g, l'alçada de 68.7 cm i el perímetre cefàlic de 43 cm. Als 17 mesos el pes és de 9.570 g l'alçada de 73.8 cm. i el perímetre cefàlic de 46 cm. Als 29 mesos el pes és de 12.100 g l'alçada de 84.7 cm i el perímetre cefàlic de 46.3 cm. Pel que fa al desenvolupament motor generalment hi ha una bona avaluació encara que lenta.

I en termes de desenvolupament cognitiu i social als 9 mesos s'observa un lleuger retard però als 29 mesos l'evolució millora i el comportament social és adequat per a la seva edat i la conducta és normal. S'aprecia un lleuger retard en el llenguatge.

MS-179

46,XX,r(15)(p11.2q26.3)

Nena de 9 anys que presenta microcefàlia, obesitat generalitzada, estatura baixa, orificis nasals inclinats cap a dalt, boca de carpa, braquidactília, dits dels peus amples, fissures palpebrals cap a dalt, taques despigmentades a la pell, peus i mans petites, retard de la parla i dits de les mans afilats.

3.1.2.3- Pacients candidats a ser portadors de monosomies o trisomies parcials gonosòmiques

Els principals trets clínics de quatre pacients inclosos en aquest grup es detallen a continuació:

MS-56

46,X,add(Y)(p11.3)

Amniocentesi a les 15 setmanes per antecedent d'anomalia cromosòmica.

Ecografia d'alta resolució normal i sexe ecogràfic masculí.

MS-91

45,X,del(Y)(Yq?),der(14;15)(q10;q10)pat

Home de 31 anys que presenta esterilitat primària per oligoastenozoospermia severa.

MS-97

46,XX,del(X)(p?)

Nena que als 10 anys i 10 mesos es va remetre per talla baixa i diagnòstic anterior de síndrome de Turner. L'anàlisi mitjançant citogenètica convencional va mostrar una deleció complexa en el braç p del cromosoma X que es va interpretar com una deleció intersticial complexa (no va ser possible una interpretació precisa del patró de bandes). L'examen físic de la pacient va revelar talla baixa (127 cm, -2.3 DS) i pes correcte en relació a la seva estatura (35,5 Kg, 0,5 DS). No es va apreciar retard mental. Els genitals eren normals i s'estava iniciant el desenvolupament de les mames. L'ecografia ginecològica va mostrar un ovari dret de 23x2 i l'esquerra de 25x2, els dos amb fol·licles. Presenta un *cubitus valgus* amb lleugera limitació de la pronosupinació.

Als 13 anys presentava menàrquia amb menstruació irregular i característiques Turnerianes, amb talla baixa, lleugera ptosi i cabell d'implantació baixa. Als 15 anys l'ecografia ginecològica va mostrar un ovari dret de 44x40 amb cos luti i l'esquerra de 21x13 amb fol·licles.

Als 16 anys tenia una talla de 135 cm. Se li va practicar una osteotomia bilateral tibia-peroné amb la qual va guanyar uns 8 cm. Als 22 anys té una talla de 143 cm i presenta metrorràgies.

MS-129

46,XX,add(X)(p22.2)

Nena de 6 mesos amb malformacions congènites que presenta estenosi anal, camptodactília i cara peculiar.

3.1.2.4-Pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques: inversions i translocacions

Les principals característiques clíniques de quatre pacients classificats en aquest grup es detallen a continuació:

MS-45

46,XX,t(1;14)(p22.3;p11.2)

Nena amb retard psicomotor marcat detectat poc després del naixement. Camina als 3 anys, casi no parla i pronuncia molt malament. Es queda encantada i casi no es comunica. Somriure casi constant, baveja, cara allargada i tosca, front petit, fissures palpebrals curtes i mongoloides, nas bulbós, filtre curt, boca gran, llengua i dents prominents, paladar estret, prognatisme, cifosi lleu, mans fines amb discreta laxitud, dits dels peus llargs. La resonància magnètica cerebral detecta megacisterna magna i atròfia cortical.

MS-111

46,XX,der(2)t(2;3)(q33;p21),der(3)t(2;3)inv(3)(?)

Nena que al néixer presenta un pes baix (-3 DS), talla baixa (-2 DS) i PC petit (-2,3 DS). Apgar 6/8/10. Microcefàlia, mielomeningocele lumbar-sacre, orelles amb apèndix doble preauricular esquerra, celles arquejades, fissura palpebral horitzontal i blefarofimosi, llavis fins i orelles amb rotació posterior. Paladar alt, coll curt, sindactília proximal dits de les mans amb camptodactília, peus equins. L'ecografia renal mostrava ureterohidronefrosi bilateral i la cerebral dilatació de ventricles laterals. Malformació Arnold-Chiari i luxació de malucs.

MS-117

46,XY,t(6;19)(p21.3;q13.4)mat

Nen d'1 any amb retard psicomotor, braquicefàlia, epicant, orelles d'implantació baixa, clinodactília, microcefàlia i hipertelorisme.

MS-146

46,XX,inv(9)(p12q13)

Nena d'1 any que presenta trigonocefàlia, clindactília als dos menovells amb hipoplàsia de les segones falanges d'ambdós dits. Desenvolupament psicomotor normal. Pes, talla i perímetre cranial normals.

3.1.2.5- Pacients amb cromosomes marcadors supernumeraris

A continuació es detalla la clínica de cinc pacients inclosos en aquest grup:

MS-50

47,XY+mar[35]/46,XY[65]

Primer fill d'un matrimoni jove, sa, no consanguini sense antecedents familiars d'anomalies congènites. Embaràs normal. Part a terme, instrumental (fòrceps). Puntuació d'Apgar de 4 y 8 als 1 i 5 min respectivament. El pes al néixer va ser 3.130 g. A l'exploració presentava dolicocefàlia amb sinostosi parcial del terç anterior de la sutura sagital i camptodactília bilateral. Els estudis realitzats (sèrie òssia- exclòs el RX del crani, ecografia renal i cerebral) normals. Als quatre mesos i mig va ser intervingut de la craniosinostosi. L'estatura i el perímetre cefàlic ha seguit el P-90 i el pes el P-75. Actualment, a l'edat de cinc anys i mig, l'exploració neurològica és normal, presenta cert grau de retard psicomotor i dificultats en el llenguatge, encara que l'evolució és favorable. Els cariotips realitzats als progenitors van ser normals.

MS-101

47,XY,+mar

El pacient presentava atrèsia anal. El recte estava connectat amb la uretra. Els ossos sacrats eren displàsics i les vèrtebres finals absents. També presentava reflux sever bufeta-uretra i el ronyó dret sense funció. També tenia malformació intestinal. Va ser operat d'un teratoma immadur en la bufeta. Presenta un retard sever, no va caminar fins als quatre anys i no va parlar fins al 3 anys i mig. És hiperactiu, baix, relativament obès i microcefàlic. El cabell és dur, la cara rodona amb implantació baixa del cabell, estrabisme i el llavi superior és prim. Mínima sindactília cutània en les dues mans i nas ample.

MS-152

47,XY,+mar

Nen de 3 anys d'edat que presenta displàsia del maluc esquerra, fenedura vertebral coronal, megacisterna magna i cos callós molt fi. Ventricles laterals grans (més l'esquerra), atrofia cortical amb dubtosa anomalia de les circumvolucions, vèrtebres en papallona i retard en l'edat òssia.

MS-165

47,XX,+mar[50]/46,XX[50]

Omfalocele, linfedema d'extremitats inferiors i comunicació interventricular petita. Desenvolupament pondoestatural i psicomotor normals.

MS-188

47,XY,+mar[30]/46,XY[70]

Primer fill d'una parella sana no consanguínia. Nascut a les 39 setmanes d'una gestació no controlada. Puntuació d'Apgar de 8 i 9 als 1 i 5 min respectivament i pes de 3.500 g. La mare tenia 25 anys al moment del part.

Als 10 dies es va diagnosticar un defecte cardíac i un possible *situs inversus*. En aquell moment el pacient pesava 3.390 g, mesurava 49,5 cm i tenia un PC de 33,5 cm. Mostrava hipotonia, presentava una cicatriu necròtica cranial de 1 cm², blefarofimosi, orelles d'implantació baixa, micrognàtia, peus equins. RMN mostrava lleugera atrofia cerebral, espai subaracnoide augmentat i petites lesions cerebrals probablement secundàries a un procés hemorràgic. L'ecocardiografia va confirmar el *situs inversus* amb dextrocàrdia i moderat defecte del septe ventricular perimembranós. La ultrasonografia abdominal va mostrar un *situs inversus* complet i una duplicació bilateral del sistema col·lector renal. La ultrasonografia cerebral i l'examen fundoscòpic van ser normals.

3.1.2.6- Descripció clínica dels pacients amb cariotip normal

Les principals característiques clíniques de quaranta-dos pacients que corresponen a aquest grup es detallen a continuació:

MS-60

46,XX

Nena de 9 anys que presenta retard psicomotor i pondoestatural greu, hipotonia, hipertelorisme, nas curt i inclinat cap a dalt.

MS-65

46,XY

Nen de 3 anys amb pes en el +1,8 DS, longitud +2,5DS i PC -1,2DS. Retard psicomotor, hipoacúsia lleu. Prolinència de la sutura metòpica que ha anat a menys i front estret. Estrabisme convergent, pont nasal ample i una mica prominent, orelles baixes, maxil·lar una mica protuberant, micrognàtia i criptorquídia dreta. Els polzes estan implantats proximalment, desviació cubital de l'índex esquerra, camptodactília i sindactília molt subtil a les dues mans, clindactília bilateral, ungles fines i algunes còncaves. Els dits dels peus estan mal alineats i imbricats. Moderada hipertonia de les extremitats amb cert equinisme.

MS-66

46,XX

Nena d'1 any amb pes de 4.850 g, estatura de 62,5 cm i el PC és de 41 cm. Té el cabell fi, escàs i d'implantació alta. Front prominent, lleuger estrabisme, taques fosques a l'escleròtica, doble parpella superior, nas petit, tendència al opistòton, polzes proximals, encara que no *adductus*, clinodactília, cifosi discreta, somrient, no sedestació, moc nasal abundant i també a la boca. Hipotonia generalitzada i retard psicomotor i del desenvolupament pondoestatural amb discrets trets dismòrfics.

MS-76

46,XX

Dona amb retard mental, convulsions i fissura palatina.

MS-79

46,XX

Nena de 5 anys, retard psicomotor lleu, retard del llenguatge, fenotip facial peculiar amb epicant i boca de carpa, vèrtebra lumbar anòmala i leucomalàcia crònica periventricular en la RNM.

MS-80

46,XY

Nen de 2 anys amb retard psicomotor moderat-greu. Hipotonia, cara peculiar amb orelles desenganxades i rotades, fissures palpebrals antimongoloides, hipotelorisme. Pannicle adipós molt escàs, absència de falanges distals dels dits II, III, IV i V del peu dret i absència de falanges mitges i distals del peu esquerra.

MS-87

46,XX

Nena de 8 anys amb marcat retard psicomotor, pes en el P-5, estatura en -2,3 DS i un PC en el P-85. Hipotonia, pell de vellut, miopia, atàxia, *nistagmus* i fotofòbia.

MS-88

46,XY

Nen de 7 anys amb pes en el P-85, estatura al P-20, i PC al +3,6DS. Presenta retard psicomotor, no parla, orelles petites, té remolins frontals, estrabisme discret i hipermetropia important.

MS-92

46,XY

Nen amb marcada hipotonia, dismorfisme discret i retard mental.

MS-93

46,XY

Nen que presenta tetralogia de Fallot, síndrome de Pierre Robin (micrognàtia, paladar alt i arquejat, fissura al paladar i dents natales), retard mental i múltiples malformacions.

MS-102

46,XX

Nena amb probable síndrome d'Albright (afectació d'ossos, pigmentació de la pell, problemes hormonals i desenvolupament sexual prematur) i encefalopatia perinatal.

MS-112

46,XY

Nen de 4 anys amb cara allargada i triangular, nas quadrat amb l'extrem bulbós i piriforme. Barbeta petita, orelles normals, cabell normal però diferent al de la família, pit excavat, dents normals i dits una mica curts. Es classifica de Síndrome Trico-rino-falàngic tipus II o de Langer-Giedion.

MS-119

46,XY

Nen de 4 mesos que presenta fissura al paladar i agenèsia del cos callós. Genitals anòmals.

MS-123

46,XY

Nen amb retard psicomotor, microcefàlia, hipertonia accentuada, peu de balancí i galindó bilateral accentuat.

MS-124

46,XY

Nen de 5 mesos amb orelles d'implantació baixa, criptorquídia, hipotonia, microftàlmia, orelles malformades, desviació cubital dels dits, bleforafimosi, llavi superior prim i micrognàtia.

MS-127

46,XX

Nena de 3 anys que presenta síndrome de Young-Simpson, cara anormal, cardiopatia congènita, hipotiroidisme i retard mental.

MS-131

46,XX

Nena de 8 anys amb retard mental greu, sordesa, microcefàlia, polimicrogíria cerebral amb trastorn de la migració neuronal, llavi leporí, braquicefàlia, mans curtes i dismòrfies.

MS-132

46,XX

Nena d'11 anys amb quadre clínic compatible amb el síndrome de Taybi-Linder (enanisme primordial osteodisplàstic tipus I) però amb alguns símptomes atípics com la presència de la malaltia de Hirschprung i sindactília cutània.

MS-137

46,XY

Nen que presenta retard mental, crisis convulsives i dismòrfies.

MS-143

46,XX

Nena de 2 anys que presenta cardiopatia (comunicació interventricular i interauricular), hemiatròfia del costat esquerra, amb atròfia del braç i la cama esquerra. Dismòrfies amb displàsia de les dues orelles, filtre pla, llavi superior fi, menor expressivitat de la cara i retard mental moderat. En la zona atròfica es veuen taques de la pell més hipocròmiques.

MS-144

46,XX

Nena de 5 anys diagnosticada de síndrome de Coffin-Siris. Edat òssia molt retardada, peu esquerra amb polidactília postaxial i peu dret amb el cinquè metacarpí amb epífisi en con i terceres falanges hipoplàsiques, principalment les dels cinquens dits. Té reflux bufeta-uretra. Vèrtebres altes, AP disminuït i concavitat mitja. Mans molt petites, epífisi en con, hipoplàsia de les terceres falanges, principalment en els cinquens dits. En la ressonància magnètica nuclear s'observa colpocefàlia. Cos callós fi, atrofia cortical principalment a l'esquerra i hipoplàsia cerebelosa amb variant Dandy-Walker.

MS-145

46,XY

Nen de 6 anys que presenta retard psicomotor evident, sense control d'esfínters. Dismòrfia craniofacial, hipertelorisme, front ample, displàsia dels pavellons auditius i pont nasal alt amb hipolàsia de les ales nasals. Filtre curt i boca oberta. Absència d'incisius laterals superiors, pannicle adipós escàs i dits de les mans fins amb falanges terminals arrodonides. Els dits dels peus presenten hipoplàsia dels tercers dits dels dos peus. També presenta dolicocefàlia.

MS-148

46,XY

Nen de 8 anys amb retard maduratiu i dismòrfies. Afectació neurològica severa.

MS-149

46,XY

Nen de 5 anys amb pes per sota del P-3, estatura per sota del P-3, PC de 42,7 cm (-6DS). Crisis febrils, bisíl·labs ocasionals, nas aguilenc, orelles grans, micrognàtia i cara similar al trico-rino-falàngic.

MS-150

46,XY

Nen de 10 anys que presenta hipermetropia (2-3 dioptries), en el Rx del crani es veu un augment d'impressions digitiformes. S'observa una desmineralització marcada en el Rx de les mans. El diagnòstic és de retard mental lligat al X-Miles-Carpenter, contractures i puntes dels dits arquejades.

MS-153

46,XX

Nena de 8 anys amb síndrome polimalformativa amb dismòrfies i retard mental sever. Edat òssia accelerada en carp, genolls i malucs. Metàfisi dels fèmurs i tíbies amples. No s'observa en les extremitats superiors. Marcada atrofia cortico-subcortical, cerebel aplastat per dalt, colpocefàlia i estrabisme convergent. Desmineralització dels ossos de les mans en el carp. Escurçament i eixamplament del primer i cinquè metacarpia.

MS-157

46,XX

Nena de 2 anys amb síndrome polimalformativa amb dismòrfies, hipotonia i laxitud articular.

MS-163

46,XY

Nen d'1 any amb retard mental, trets dismòrfics i malformacions congènites.

MS-164

46,XY

Nen de 5 anys amb pes per sobre del P-97, estatura per sobre del P-97 i PC en el P-75. Braquicefàlia, cara arrodonida i ampla i fissures palpebrals llargues. Coll, tòrax, abdomen i genitals normals. Hipopsiquisme important. Maldestre en la funció motora. Hipercreixement, acceleració de l'edat òssia i retard mental.

MS-166

46,XX

Nena que als 16 anys presenta un pes de 71.5 Kg, alçada de 152 cm i PC 58.5 cm. Megacefàlia, cabell abundant amb dues àrees sense pèl en la regió occipital postcicatricial. Cara aplanada, hipertelorisme, proptosi, fissures palpebrals amb desviació antimongoloide, arrel nasal aplanada, ales nasals hipoplàsiques amb prominència de la columela, prognatisme, mala implantació dental i paladar alt. Coll curt. Fetge a dos cm de la vora costal. Cifoescoliosi molt greu. Extremitats llargues amb dits llargs, camptodactília en la mà dreta i hiperextensibilitat de les articulacions. *Genu valgo* bilateral. Peus *cavus* i el dret equí. Hipopsiquisme.

MS-169

46,XX

Noia que als 20 anys té un pes de 63.5 Kg, estatura de 165 cm i PC de 58 cm. Cara amb nas punxegut i barbata prominent. Asimetria corporal essent el costat esquerra el més petit, incloent les extremitats. Hipoplàsia del polze esquerra, camptodactília del cinquè dit esquerra i clinodactília del quart dit esquerra. Ungles curtes i amples. Hipopsiquime.

MS-171

46,XY

Nen de 5 anys amb retard maduratiu i trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat. Cert retard del creixement.

MS-172

46,XY

Nen que al néixer presenta coloboma de l'iris dret, microretrognàtia, llengua hipoplàsica amb glossoptosi, fissura del paladar, genives gruixudes, boca petita. Ales nasals hipoplàsiques, coll curt, lleugera artrogriposi dels colzes, genolls, turmells, espatlles i malucs. Els dos polzes són d'implantació proximal, clinodactília del cinquè dit dret que està mal implantat i dubtosa sindactília amb el quart. Sindactília del 2 i 3 dit del peu. Hipoplàsia de l'escrot, penis petit i no es palpen testicles a l'escrot. Als 3 anys pesa 8,9 Kg (-3DS), mesura 78 cm (-3,5DS), i té un PC de 45 cm (-4DS). Fissures palpebrals curtes, parpelles inflades, hipertelorisme i epicant. El diagnòstic és de síndrome de Hanhart.

MS-173

46,XY

Nen que als 5 anys presenta lleuger retard mental, convulsions, lleuger hipotiroidisme i lleugeres malformacions òssies.

MS-175

46,XX

Nena de 2 anys que presenta microcefàlia, trets dismòrfics que consisteixen en blefarofimosi, nas gran, macrostomia amb prognatisme, dents hipoplàsiques, estatura baixa i certa cifosi.

MS-180

46,XY

Nen que als 4 anys presenta comportament agressiu, genials ambigus/absents, macrocefàlia, retard mental i del desenvolupament.

MS-181

46,XY

Nen de 15 anys que presenta criptorquídia, comportament agressiu, macrocefàlia, estatura baixa, retard mental i crani asimètric.

MS-185

46,XX

Nena que als 6 anys presenta estatura baixa, trets dismòrfics i estenosi pulmonar valvular.

MS-186

46,XX

Nena que als 10 anys presenta retard mental i trets dismòrfics.

MS-187

46,XY

Nen que als 2 anys presenta retard mental, cardiopatia congènita, blefarofimosi, ptosi, dents hipoplàsiques. Diagnosticat de síndrome de Marden-Walker.

MS-190

46,XY

Nen que presenta retard mental, hipotonia severa, alteracions cardíques i trets dismòrfics.

MS-192

46,XX

Nena que als 2 anys presenta braquicefàlia, retard del desenvolupament i trets dismòrfics.

3.2- MÈTODES DE CULTIU CEL·LULAR PER A L'OBTENCIÓ DE CÈL·LULES EN L'ESTADI DE METAFASE

El cultiu cel·lular és necessari per obtenir preparacions cromosòmiques que seran utilitzades tant per l'aplicació de tècniques de citogenètica convencional com de tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent.

3.2.1- CULTIU CEL·LULAR A PARTIR DE SANG PERIFÈRICA

S'extreuen entre 1 i 3 ml de sang perifèrica (SP) amb una xeringa estèril i es traspasa a un tub estèril comercial que conté heparina sòdica (Rovi) com anticoagulant. La mostra es conservarà a temperatura ambient, o a 4°C, fins que es procedeixi a cultivar-la, sempre evitant les temperatures extremes. Es pot conservar uns dies a la nevera però per un creixement òptim és aconsellable cultivar la mostra dins les 24 h després de l'extracció.

3.2.1.1- Cultiu estàndard

Es sembren 0,5 ml de sang en un tub cònic que conté 5 ml de medi RPMI-1640. El medi es complementa amb 20% de sèrum fetal boví (FCS), sèrum de vedella fetal que té factors essencials pel creixement cel·lular, 2% de L-glutamina (Gibson), aminoàcids essencials per a la viabilitat cel·lular, 2% de penicil·lina i estreptomicina (10U/ml), antibiòtics per evitar contaminacions i 4% de fitohematoglutina (PHA)(10µg/ml) mitogen que estimula la proliferació dels limfòcits T.

S'incuba a 37°C en una estufa al 5% de CO₂ durant 72 h, temps en el que s'arriba al pic màxim exponencial de divisions cel·lulars. Passat aquest temps, s'afegeix al cultiu 0,1ml d'antimitòtic *colcemid* (Irvine Scientific) a una concentració final de 0,04µg/ml. El *colcemid* atura les cèl·lules en metafase perquè impedeix la despolimerització dels microtúbuls que formen el fus acromàtic. S'incuba a 37°C durant 15 min. Es centrifuga a 650 g durant 8 min i es descarta el sobrenedant. La suspensió cel·lular es sotmet a un xoc hipotònic amb una solució de Clorur Potàssic (KCl 0,075M), afegint 7-10 ml i es deixa actuar durant 30 min a 37°C. L'acció de l'hipotònic fa que s'inflin les cèl·lules per osmosi, dilueix el citoplasma i facilita la posterior fixació de la cromatina. El temps d'exposició a la solució hipotònica afecta a la morfologia dels cromosomes. Es centrifuga a 1800 rpm, o 400 g durant 8 min, i es decanta.

Posteriorment es fixa el material cromatínic, rentant 3 vegades amb 7-10 ml de *caroy* (metanol:àcid acètic; 3:1). El metanol precipita la cromatina i l'àcid acètic trenca les membranes i estructures cel·lulars que, en no precipitar-les, seran eliminades en les successives rentades. El procés de fixació es repeteix 3-4 vegades disminuint la velocitat i el temps de centrifugació a 300g durant 6 min.

Quan el material està ben net es procedeix a fer les extensions de la suspensió de material nuclear, en divisió i en interfase, sobre el portaobjectes. Aquests han estat prèviament desengreixats en metanol al 70% a -20°C per evitar que s'hi enganxin residus i aconseguir unes bones extensions. El material fixat es pot guardar en el tub a -20°C fins a la seva utilització. Es poden conservar fins a 5-6 anys.

3.2.1.2- Cultiu d'alta resolució

Per obtenir cromosomes d'alta resolució o prometafàsics, el protocol que es fa servir és el mateix que l'explicat en l'apartat anterior però amb alguns canvis.

La incubació és més llarga, de 96 h. A les 72 h d'iniciar el cultiu amb medi suplementat, s'hi afegeix metotrexat a una concentració final de 10⁻⁶ M. El metotrexat és un antimetabolit antagonista de l'àcid fòlic que produeix un bloqueig del cicle cel·lular per inhibició de la síntesi de l'ADN durant la fase S.

Després de 17-19 h d'incubació, les cèl·lules són alliberades del bloqueig rentant amb medi RPMI-1640. S'afegeix timidina, que indueix la síntesi de l'ADN, a una concentració final de 10⁻⁵ M per desbloquejar i reactivar la divisió. Aquest procés permet induir la sincronització de la divisió cel·lular. Es deixa incubar a 37°C perquè les cèl·lules es divideixin de forma sincronitzada. Passades 5 h d'haver afegit la timidina s'afegeixen 0,1 ml de *colcemid* a una concentració de

0,04 µg/ml i es deixa actuar durant 2 h, continuant amb el procés com en el cas del cultiu estàndard.

3.2.2- CULTIU CEL·LULAR A PARTIR DE LÍQUID AMNIÒTIC

S'extreuen entre 10 i 20 ml de LA (s'aconsella extreure 1 ml per setmana de gestació com a màxim) en condicions estèrils. La mostra s'ha de mantenir a temperatura ambient fins al seu cultiu essent aconsellable que es cultivi el més aviat possible.

La mostra conté cèl·lules de diferents tipus procedents de la pell del fetus, de l'aparell urinari, gastrointestinal i de l'amni. Les cèl·lules que provenen de l'amni s'anomenen amniòcits.

Si la mostra ho permet es divideix en dos o tres tubs. Es centrifuga durant 8 min a 1800 rpm. A partir del sobrenedant es poden fer diferents proves bioquímiques (α -fetoproteïna i acetilcolinesterasa). Per altra banda el botó es resuspèn i es sembra en falcons on s'han afegit 3 ml de medi de cultiu específic (AmnioMAX™-C100) que conté sals, hormones, vitamines, glucosa, pH i pressió osmòtica controlats.

El medi es complementa amb 20% de FCS, 2% de Penicilina-Estreptomicina i un 2% de L-glutamina.

S'incuba el cultiu en una estufa a 37°C i 5% de CO₂ amb el tap mig obert. Durant aquest procés d'incubació es va controlant el creixement cel·lular. Al sisè dia es canvia el medi de cultiu. El medi conté un indicador de pH que vira a grogós quan s'esgoten els nutrients. Quan s'observa la formació d'una monocapa cel·lular (11-13 dies) s'extreu el cultiu. S'afegeixen 0,3 ml de *colcemid* a una concentració final de 0,04 µg/ml i s'incuba a 37°C durant 2h. Es mira al microscopi el número de divisions cel·lulars (cèl·lules refringents i d'aspecte arrodonit). Es treu el medi de cultiu i es renta el flascó amb 3 ml de solució salina (Gibco) eliminant restes de medi de cultiu que podrien inhibir l'acció de la tripsina que utilitzarem en el següent pas. S'afegeixen 2 ml de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), que hidrolitza unions intercel·lulars i deixem que actuï durant 2 min a 37°C. S'observa al microscopi si les cèl·lules s'han desenganxat del flascó i a continuació s'afegeix medi de cultiu per neutralitzar l'acció de la tripsina. Es recull el contingut dels falcons i es traspasa a tubs cònics. Es centrifuga 5 min a 1000 rpm. Es decanta el sobrenedant i s'afegeixen 7 ml de solució hipotònica (KCl 0,075M) gota a gota, incubant els tubs a 37° C durant 15 min. Es centrifuga 5 min a 1000 rpm. Es decanta el sobrenedant. Es fixa la suspensió cel·lular amb *carnoy*, afegint el fixador primer gota a gota i per la paret del tub i posteriorment de forma contínua enrasant fins a 8 ml. Es centrifuga, es decanta el sobrenedant i es repeteix el procés de fixació tres vegades més afegint 1 ml menys de *carnoy* cada vegada. En l'últim rentat es decanta i es resuspèn el botó manualment afegint 2-3 ml de *carnoy*. El material es pot conservar a -20°C fins a la seva utilització. El material fixat es pot guardar entre 5-6 anys.

3.2.3- CULTIU CEL·LULAR A PARTIR DE VELLOSTATS CORIALS

Una vegada obtinguda la mostra de vellositats corials aquesta es transporta en medi estèril (RPMI, 1% heparina, 2% L-glutamina i 2% penicilina-estreptomicina) o en sèrum fisiològic estèril. Per garantir la viabilitat del cultiu és molt important procedir a la sembra de la mostra el més aviat possible.

3.2.3.1- Cultiu curt

Es preparen tres càpsules de Petri. En una d'elles, s'introdueixen 1,5 ml de solució salina (Gibco) per tal de poder preparar el material per sembrar (separació del material matern i disgregació del material fetal). En les altres dues càpsules s'hi afegeixen 2 ml de medi de cultiu (una s'utilitzarà per fer un cultiu curt i l'altra pel cultiu llarg). El medi de cultiu que s'utilitza és el mateix que en el cultiu de LA.

Amb una pipeta Pasteur estèril es recullen les vellositats corials del tub on s'han transportat i es posen en la càpsula de Petri on es farà la disgregació del material. Es valora la qualitat del la vellositat i se'n separa el material matern. Es traspassen les vellositats fetals a les plaques amb medi de cultiu i s'incuben a 37°C i 5% CO₂ durant 48 h. Per extreure el cultiu s'afegeixen 0,2 ml de *colcemid* i es deixa a l'estufa 1 h. Amb l'ajut d'una pipeta es traspassa la vellositat a un tub cònic de vidre. S'afegeixen 5 ml d'una solució hipotònica (citrat sòdic al 1%) a 37°C. S'incuba a 37°C durant 30 min. S'afegeixen amb una pipeta Pasteur, 6 ml de solució fixadora (etanol:àcid acètic; 1:4) gota a gota resuspenent suaument fent copets amb els dits. Es tapa el tub i es deixa que actuï la solució fixadora a 4°C durant 20 min. Es treu la solució fixadora i s'afegeixen 5 ml més de solució fixadora fresca deixant actuar a temperatura ambient durant 20 min. Es repeteixen els passos anteriors afegint 4 ml de solució fixadora. S'incuba a 4°C almenys 2h abans de realitzar l'extensió, la qual es realitza de la manera habitual. S'aconsella escalfar els portaobjectes directament sobre la placa calefactora a 42-45°C. El material fixat sobrenedant es pot conservar a -20°C entre 5-6 anys.

3.2.3.2- Cultiu llarg

Sota la lupa amb dos agulles es fragmenten les vellositats corials el més petites possible. Es traspassen amb una pipeta Pasteur a un tub de centrífuga. Es deixen sedimentar les vellositats. S'afegeix 1 ml de tripsina i s'incuba a 37°C inclinant el tub uns 45° durant almenys 15 min.

Es col·loca el tub en posició vertical i es deixen sedimentar les vellositats. Es retira la tripsina amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i s'afegeix 1 ml de colagenasa. S'incuba a 37°C durant 20 min i es centrifuga a 1.800 rpm 8 min. Es retira el sobrenedant i es resuspenen les vellositats amb 3 ml de medi de cultiu. Es reparteixen les vellositats corials en dos falcons i s'incuben amb el tap mig obert en una estufa a 37° C i 5% de CO₂. La resta del protocol és el mateix que per les mostres de LA.

El material fixat es pot conservar a -20° C entre 5-6 anys.

3.3- MÈTODES D'EXTRACCIÓ D'ADN A PARTIR DE DIFERENTS TIPUS DE MOSTRA

3.3.1- SANG PERIFÈRICA

Es col·loquen de 1 a 5 ml de sang perifèrica en un tub de 50 ml. S'enrasa fins a 50 ml amb solució salina fisiològica (NaCl 0,9M) i es centrifuga a 2.750 rpm a 4°C durant 10 min. Es descarta el sobrenedant amb una pipeta Pasteur de plàstic amb molt de compte per no resuspendre la capa blanca de leucòcits que es troben just per sobre del botó vermell d'eritròcits i altres components sanguinis. Es resuspèn el botó i en aquest punt es pot congelar a -20°C i seguir l'extracció un altre dia.

Si es continua l'extracció, s'enrasa el tub fins a 50 ml amb solució de lisi d'eritròcits (5 ml Tris 2M pH 7,5, 2,5 ml MgCl₂ 1M, H₂O miliQ fins volum final de 500 ml) que es prepara el mateix dia. Es barreja per inversió i es deixa en gel 30 min. Es centrifuga a 3000 rpm a 4°C durant 15 min. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular amb 25 ml de tampó de lisi d'eritròcits. La barreja es deixa en gel durant 30 min. Aquest pas es repeteix, amb un màxim de 4 rentats, fins que el botó que s'obté sigui blanc. Aquest és un possible punt de parada del protocol després de descartar el sobrenedant i congelar el sediment a -20°C.

Si es continua amb l'extracció d'ADN, s'afegeixen 3 ml de tampó de lisi de leucòcits (2,5 ml Tris 2M pH 8,2, 40 ml NaCl 5M, 4 ml EDTA (titriplex) 0,25M, H₂O miliQ fins un volum final de 500 ml), 500 µl de proteïnasa K i 200 µl de SDS 10% i es deixa a 37°C en agitació tota la nit (o/n). S'afegeix 1 ml de NaCl 5,5M i s'agita, vigorosament, de 15 a 20 seg fins a obtenir una emulsió completa. Es centrifuga a 3400 rpm a 4°C durant 15 min i es passa el sobrenedant a un nou tub de 50 ml. Es centrifuga de nou, ara a 3500 rpm a 4°C durant 15 min, passant el sobrenedant a un altre tub. Aquest procés es repeteix fins que el sobrenedant estigui lliure de partícules flotants.

A continuació, es precipita l'ADN afegint dos volums d'etanol absolut fred. Es recull la medusa d'ADN amb una pipeta Pasteur acabada en ganxo i es renta amb etanol 70% fred. Es treu l'excés d'etanol retintut a la medusa prement-la contra la paret del tub. Finalment, es dissol en 500 µl de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4) que hem afegit en un tub de microcentrífuga. El volum de TE pot variar depenent de la mida de la medusa.

3.3.2- LÍQUID AMNIÒTIC

Quan el cultiu cel·lular ha format una monocapa de cèl·lules, es decanta el medi de cultiu recollint-lo en un tub cònic de 10 ml. Es renta el cultiu amb solució PBS1X per tal d'eliminar les restes de medi de cultiu ja que aquest inhibeix l'acció de la tripsina. Després s'afegeix 1ml de tripsina-EDTA per desenganxar les cèl·lules donant copets al flascó. S'observa al microscopi i quan s'han desenganxat les cèl·lules, es decanta el contingut del flascó en al tub cònic de 10 ml. Es fan més rentats del flascó amb medi de cultiu i es va recollint en el tub cònic. Aquest medi de cultiu permetrà inhibir la tripsina de tal manera que no degradi les cèl·lules. Una vegada tenim tot el contingut al tub de 10 ml, centrifuguem a 600 g durant 6 min. Al final hi ha tants tubs de 10 ml com falcons teníem del cultiu cel·lular. En aquest punt es pot aturar el protocol i continuar

amb l'extracció un altre dia. En aquest cas, es deixa aproximadament 1 ml de sobrenedant i després de resuspendre el botó cel·lular es pot congelar a -20°C . Si es continua amb l'extracció de l'ADN, es descarta el sobrenedant i el botó es resuspèn en 1ml de PBS1X. La suspensió de cèl·lules es traspassa a un tub de microcentrífuga amb els que treballarem a partir d'ara.

Es centrifuga a 7000 rpm durant 5 min. Es descarta el sobrenedant utilitzant pipetes Pasteur de vidre. S'afegeixen 400 μl de tampó de lisi nuclear (5 ml Tris 2M pH 8, 80 ml NaCl 5M, 4 ml EDTA (titriplex) 0,5M pH 8, H_2O miliQ fins a un volum final de 1 l, ajustar a pH 7), 10 μl de Proteinasa K 1mg/ml i 15 μl de SDS al 10%. Es barreja bé el contingut del tub de microcentrífuga i es deixa incubar a 37°C o/n.

S'afegeixen 130 μl de solució saturada de NaCl 5,5M i es barreja, per inversió, durant 30 seg. S'incuba a temperatura ambient 5 min i es centrifuga a 4000 rpm durant 10 min. Es recupera els sobrenedant i es passa a un nou tub de microcentrífuga. Es repeteix el pas de centrifugar a 4000 rpm durant 10 min fins que el sobrenedant que recuperem estigui lliure de partícules flotants. Es precipita l'ADN afegint un volum d'isopropanol. Es barreja, per inversió, fins que apareix l'ADN en forma de medusa. Es centrifuga a 14000 rpm durant 15 min per compactar el precipitat d'ADN en un botó i no perdre res en el sobrenedant. Es descarta el sobrenedant i s'asseca la boca del tub amb un mocador de paper. S'agreguen 500 μl d'etanol 70% i es barreja el contingut varies vegades per inversió. Es centrifuga a 15000 rpm durant 3 min. Es descarta el sobrenedant i novament s'asseca la boca del tub amb un mocador de paper. S'incuba a temperatura ambient fins que les parets del tub s'assequin del tot. S'agreguen 100 μl de tampó TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4) i es deixa incubar a 37°C o/n per tal que l'ADN es dissolgui bé en el TE. Finalment, es traspassa el contingut dels tubs que corresponguin a una mateixa mostra a un únic tub de microcentrífuga.

3.3.3- ALTRES TEIXITS

S'homogeneïtzen 100 mg de teixit sense cultivar (restes abortives, pell...) en una placa de petri. Per a l'homogeneïtzació s'utilitzen unes tisores i s'afegeix 1 ml de tripsina-EDTA per facilitar el procés. Quan s'obté una barreja homogènia es traspassa a un tub de 50 ml i es centrifuga a 3.000 rpm 4°C durant 10 min. Es descarta el sobrenedant i s'afegeixen 1,2 ml de tampó de lisi (NaCl 100mM, Tris 10mM, EDTA 25mM, SDS 0,5%). S'afegeixen 180 μl de proteinasa K 10mg/ml i es deixa o/n a 56°C en agitació.

El dia següent s'afegeix un volum de cloroform. Seguidament s'agita vigorosament i es centrifuga a 3.000 rpm durant 10 min a 4°C . Es recupera el sobrenedant (el qual contindrà l'ADN dissolt) i es repeteix l'últim pas. Al sobrenedant obtingut s'hi afegeixen 400 μl de NaCl 5M per cada 5 ml de solució. S'agita amb compte i es centrifuga a 3.400 rpm a 4°C durant 10 min. Es traspassa el sobrenedant a un nou tub i es precipita l'ADN afegint 2 volums d'etanol absolut fred. Es recull la medusa d'ADN amb una pipeta Pasteur acabada en ganxo i es renta en etanol 70% fred. Es treu l'excés d'etanol retingut a la medusa prement-la amb compte contra la paret del tub i es dissol en 500 μl de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4) que hem afegit en un tub de microcentrífuga. El volum de TE pot variar depenent de la mida de la medusa.

3.4- QUANTIFICACIÓ DE L'ADN I DETERMINACIÓ DE LA PURESA

Es realitza un anàlisi espectrofotomètric de l'ADN (Biotech Photometer, UV1101) mesurant l'absorbància a 260 i 280 nm. Per fer la mesura s'han realitzat dilucions de l'ADN de 1/10 (10 μ l ADN + 90 μ l TE) o 1/20 (5 μ l ADN + 95 μ l TE) depenent de la mida de la medussa d'ADN que s'ha obtingut en l'extracció. Normalment les dilucions de 1/10 s'han aplicat en mostres provinents de líquid amniòtic i altres cèl·lules cultivades mentre que en mostres provinents de sang perifèrica o de teixit no cultivat s'ha utilitzat la dilució 1/20 (5 μ l ADN + 95 μ l TE) ja que en aquestes s'obté més quantitat d'ADN en l'extracció. Per saber la concentració de l'ADN es multipliquen les unitats d'absorbància a 260 nm per 50 (ja que sabem que una solució de l'ADN que està a 50 μ g/ml dóna una absorbància de 1 a 260 nm). El valor que ens dóna el multipliquem pel factor de dilució que hem fet per realitzar la lectura que en el nostre cas és 10 o 20.

El coeficient entre absorbància a 260 nm i 280 nm ens dóna informació de la puresa de l'ADN extret. Per dur a terme la tècnica d'hibridació genòmica comparada es requereix que les mostres de l'ADN presentin una puresa que estigui entre 1.6 i 2 (Fig.23). Valors superiors indiquen presència d'ARN i valors inferiors indiquen contaminació amb proteïnes.

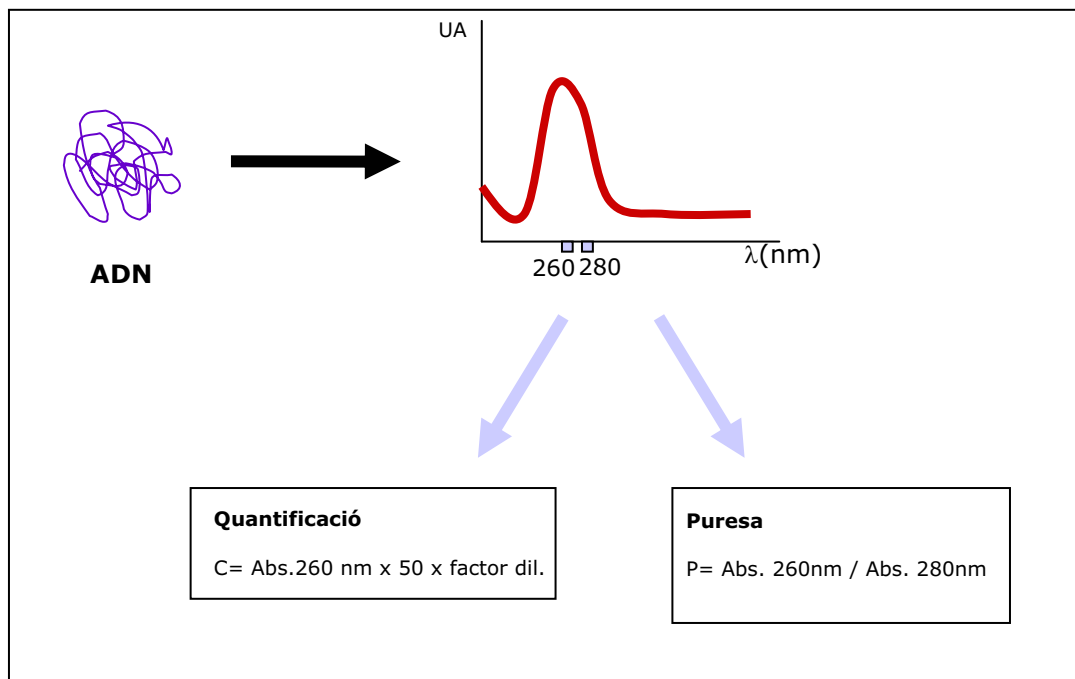


Fig.23- Esquema del mètode de valoració quantitativa i qualitativa de l'ADN.

3.5- TÈCNiques DE CITOGENÈTICA CLÀSSICA

3.5.1- BANDES G

Les preparacions cromosòmiques esteses sobre portaobjectes i prèviament envellides (3 dies temperatura ambient, o/n a 65°C o 30 min en 2xSSC a 37°C) es submergeixen en solució salina 2xSSC/citrat trisòdic (Merck), dissolt en NaCl 0,3M, a 65°C durant 1 min. Es renta la preparació amb aigua i es deixa assecar.

A continuació es tenyeix amb colorant Wright al 0,25% (Sigma) (2,5 g colorant, 1000 ml metanol dissolt en agitador magnètic 45 min, filtrat i envellit a temperatura ambient una setmana o 3 dies a 37°C) i tampó Sørensen (Merck) en proporció 1:3 durant 2-3 min. El tampó Sørensen és una barreja de solució A (KH₂PO₄, 9,08 g/l) i solució B (Na₂HPO₄, 12,88 g/l) en una proporció 1:1 en volum i ajustada a pH 6,8. Es renten amb aigua i es deixen assecar. Els temps s'estableix en funció del tipus de mostra i de les condicions particulars de cada laboratori.

A la Figura 24 es mostra un cariotip realitzat mitjançant aquesta metodologia.

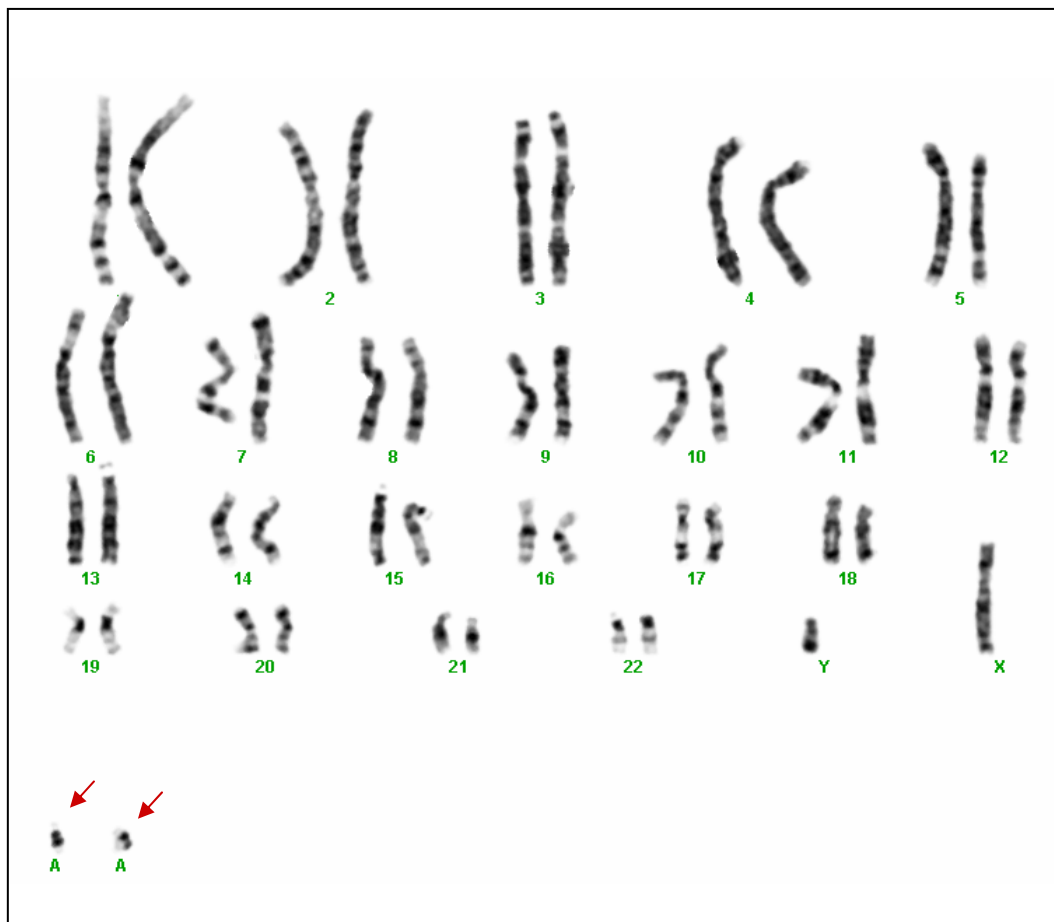


Fig.24- Cariotip del cas MS-198 (48,XY,+mar+mar) obtingut aplicant la tècnica de bandes G on s'observen dos cromosomes marcadors (fletxes)

3.5.2- BANDES C

Les preparacions cromosòmiques prèviament envellides (3 dies a temperatura ambient, o/n a 65° C o 30 min en 2xSSC a 37°C) es submergeixen en una cubeta amb HCl 0,02N (2ml HCl, 100 ml H₂O destil·lada) a temperatura ambient durant 30 min, es renten amb aigua i s'assequen. Seguidament, s'introdueixen en una cubeta amb Ba(OH)₂ saturat a 60° C (100 ml H₂O, 304 g Ba(OH)₂ al bany maria durant 2-3 min. Es renten les preparacions amb aigua destil·lada i metanol, dues vegades, per eliminar les restes de bari, es deixa assecar i s'incuba en solució salina 2xSSC a 65°C durant 30 min, es renten amb aigua i s'assequen. Finalment, es tenyeixen les preparacions amb colorant Leishman al 20% de 5-10 min. Es decanta el colorant, es renten amb aigua i es deixen assecar.

3.6- TÈCNiques D'HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

3.6.1- HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA (CGH)

3.6.1.1- Hibridació Genòmica Comparada convencional

Es basa en la hibridació competitiva d'ADN problema (pacient) i ADN control, marcats amb fluorocroms diferents, sobre cromosomes metafàsics normals. A la Figura 25 s'esquemmatitza aquesta metodologia.

- Marcatge fluorescent de l'ADN

Es marquen 700 ng d'ADN de la mostra problema i 700 ng d'ADN de la mostra control utilitzant el *kit* de *nick translation* (Vysis). Aquesta reacció es realitza dins un tub de microcentrífuga al que s'afegeixen 5 µl de dTTP 0.1mM, 5 µl de tampó del *kit* de *nick translation* (500 mM Tris-Cl pH 7,2, 100 mM MgSO₄, 1mM DDT), 10 µl de dNTP (dATP, dCTP i dGTP), (22.5-x) d'aigua lliure de nucleases, x µl d'ADN (700 ng) i 2.5 µl de fluorocrom verd (*SpectrumGreen*) si es tracta de l'ADN control o 2.5 µl de fluorocrom vermell (*SpectrumRed*) si es tracta de l'ADN problema i 5 µl d'enzim del *kit* de *nick translation* (ADN polimerasa I, ADNasa I en 50% glicerol, 50 mM Tris-Cl pH 7,2, 10 mM MgSO₄, 0,1 mM DDT, 0,5 mg/ml nucleasa lliure d'albumina sèrica bovina). Es barreja tot i s'incuba en un bany protegit de la llum a 15°C durant 1 h i 15 min. Després d'aquest temps es para la reacció posant la barreja en un bany de 70°C durant 10 min.

La barreja es deixa en gel i es corren 9µl del producte de la reacció de *nick translation* en un gel d'agarosa al 2% (0,6% agarosa, 30 ml 1X TAE) per comprovar la llargada dels fragments de l'ADN que han d'estar entre 300 i 3500 pb.

Es barreja l'ADN problema amb l'ADN control marcat i s'afegeixen 10 µl d'ADN COT-1 (Vysis). Aquest ADN COT-1 s'utilitza per bloquejar les regions repetitives del genoma que al presentar polimorfisme en la població podrien donar falsos positius i per tant aquestes regions són excloses en l'anàlisi de la CGH.

S'afegeixen 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M a la paret del tub de microcentrífuga i es fa baixar fins al fons aplicant 2,5 volums d'etanol absolut fred. Es barreja, per inversió, i es deixa al congelador un mínim de 30 min perquè precipiti l'ADN. Després, es centrifuga a 12.000 rpm

durant 30 min. S'elimina el sobrenedant i es deixa assecar durant 8 min dins l'estufa de 37° C per tal que s'evaporin les restes d'etanol.

- Hibridació

Durant aquest pas, es treu el portaobjectes comercial del congelador, amb les extensions cromosòmiques d'un individu control, del congelador (CGH Metaphase Target Slides, Vysis), i quan està descongelat es desnatura posant-lo 5 min en formamida 70% (14 ml H₂O miliQ, 7 ml 20xSSC pH 5,3, 49 ml de formamida ajustant el pH a 7-7,5) a 73°C. Després es deshidrata en solucions d'etanol al 70%, 85% i 100% fred durant un minut a cada un. Es deixa assecar a l'aire. Per altra banda, es dissol el botó (sonda) en 15 µl de tampó d'hibridació (20% dextrà sulfat en 50% formamida/2xSSC). Es desnatura la sonda posant-la a 73°C durant 8 min. S'aplica la sonda desnaturalitzada sobre la extensions cromosòmiques i es cobreix amb el cobreobjectes de 22X22 mm. Es segella amb goma. El portaobjectes es col·loca en una caixa humida i es deixa a 37°C entre 36 i 72 h, evitant que s'assequi.

- Rentats posthibridació

Transcorregut aquest temps, es treu el cobreobjectes amb molt de compte. Es renta la preparació amb 0,4xSSC/3%NP-40 a 73°C durant 2 min agitant i amb 2xSSC/0,1% NP40 a temperatura ambient durant 2 min també agitant per eliminar l'excés de sonda i la hibridació inespecífica. Es deixa assecar a l'aire. S'apliquen 10 µl de 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0,032 ng/µl) dissolt en una solució *antifade* (Vectashield), es cobreix amb un cobreobjectes de 60x24 cm que englobi tot el portaobjectes i es segella amb esmalt. Es guarda a la nevera fins al seu anàlisi.

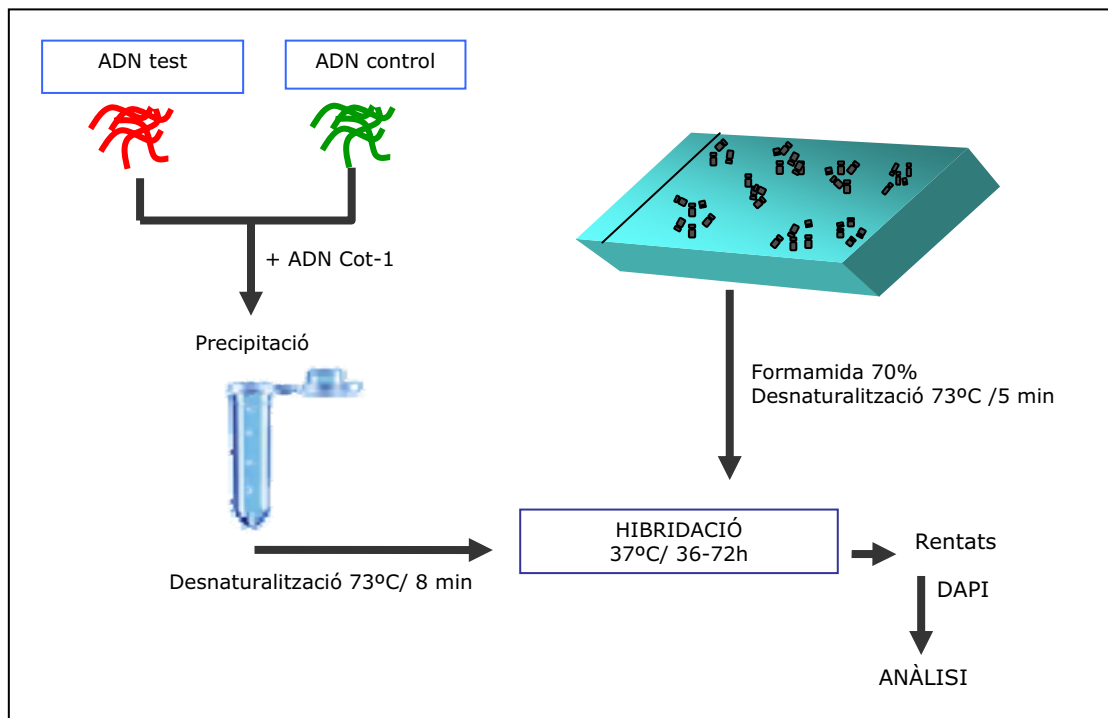


Fig.25- Esquema de la tècnica d'Hibridació Genòmica Comparada

- Anàlisi

Per a la captura d'imatges s'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència Olympus AX-70 (Olympus Optical CO, Hamburg, Germany) equipat amb els filtres: U-MNIBA (*SpectrumGreen*), U-MWIY (*SpectrumRed*) i U-MNU (DAPI), acoblat a una càmera digital CCD d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT) connectada a un sistema automatitzat d'anàlisi d'imatges dotat d'un software específic per CGH (Applied Imaging, Sunderland, UK). Per l'estudi d'una determinada mostra s'han analitzat 10-15 metafases de condensació cromosòmica semblant (400-500 bandes) ben esteses, amb el mínim de cromosomes sobreposats, sense restes citoplasmàtiques ni soroll de fons, amb un patró d'hibridació uniforme no granulós i una intensitat de fluorescència equivalent pels dos fluorocroms. Cada metafase és captada de forma seqüencial en DAPI, Fluoresceïna i Texas Red. Les senyals capturades es mostren gràficament en perfils (*ratios* de les senyals de fluorescència). Les imatges s'analitzen amb l'ajut del software específic per la CGH analitzant els resultats amb les dues opcions possibles: CGH convencional i CGH d'alta resolució (Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK). Les imatges corresponents a la fluorescència de DAPI s'inverteix i s'utilitza per realitzar el cariotipatge. El sistema d'anàlisi redueix al màxim el soroll de fons i integra les intensitats de fluorocrom verd i vermell al llarg de tot el cromosoma. La relació (*ratio*) de fluorescència vermella/verda es calcula per a cada cromosoma al llarg de tot el seu eix i es mostra en forma de perfil (Fig.26). Les regions cromosòmiques equilibrades presenten valors al voltant de 1.0. Els valors obtinguts per sobre de 1,25 s'han considerat guanys i els inferiors a 0,75 pèrdues.

S'ha descrit que artefactes del marcatge poden afavorir l'aparició de falsos positius en les regions cromosòmiques riques en citosina i guanina com 1p32pter, 19 i 22 pel que s'han descartat els desequilibris trobats en aquestes zones.

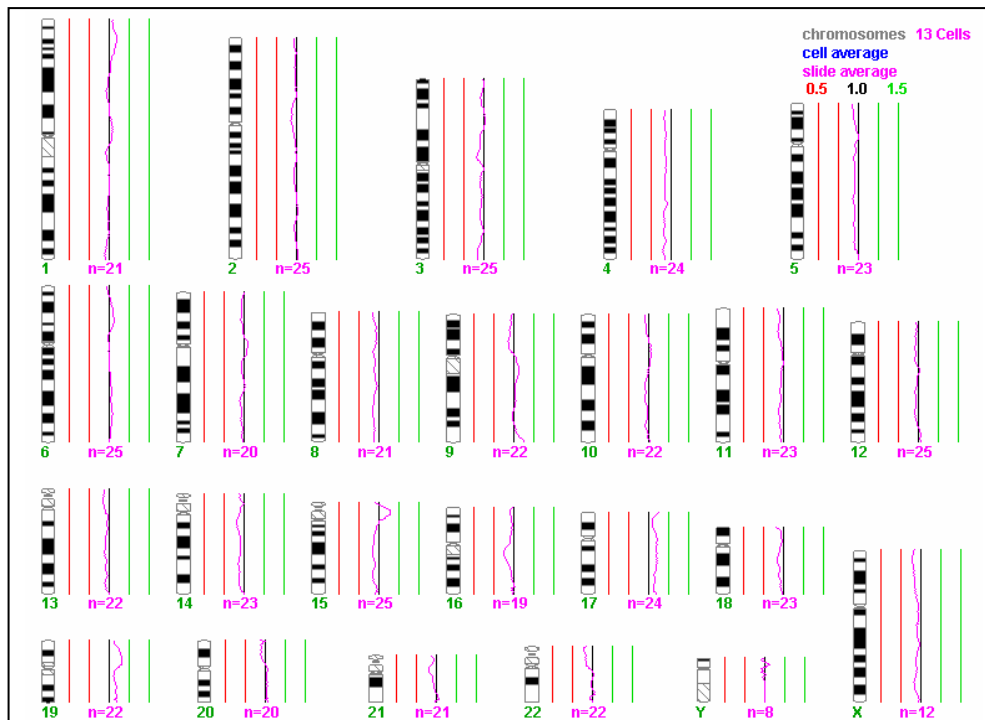


Fig.26- Perfils obtinguts per CGH convencional on es mostra un resultat equilibrat, sense guanys ni pèrdues (MS-112).

3.6.1.2- Hibridació Genòmica Comparada d'alta resolució (HR-CGH)

Tots els processos són idèntics en la CGH convencional i en la d'alta resolució. La diferència entre elles es basa en el mètode d'anàlisi dels resultats obtinguts i els criteris que s'utilitzen per determinar zones de pèrdues o guanys de material genètic.

En el cas de la HR-CGH s'incrementa l'especificitat i la sensibilitat de la tècnica i per tant permet detectar desequilibris (guanys i pèrdues) de material genètic més petits. També s'aconsegueix detectar desequilibris en regions cromosòmiques que amb la tècnica de CGH convencional s'excloïen de l'anàlisi.

En la HR-CGH el sistema d'anàlisi utilitza un interval de referència estàndard dinàmic per detectar desequilibris cromosòmics en comptes d'interval·ls fixes típics de la CGH convencional (Fig.27). Aquest interval és més ampli en les regions on s'ha descrit que hi ha tendència a resultats artefactuals.

S'han aplicat els intervals de confiança del 99,5% quan el nombre de metafases analitzades és inferior a 15 i del 99,9% si és de 15 o més.

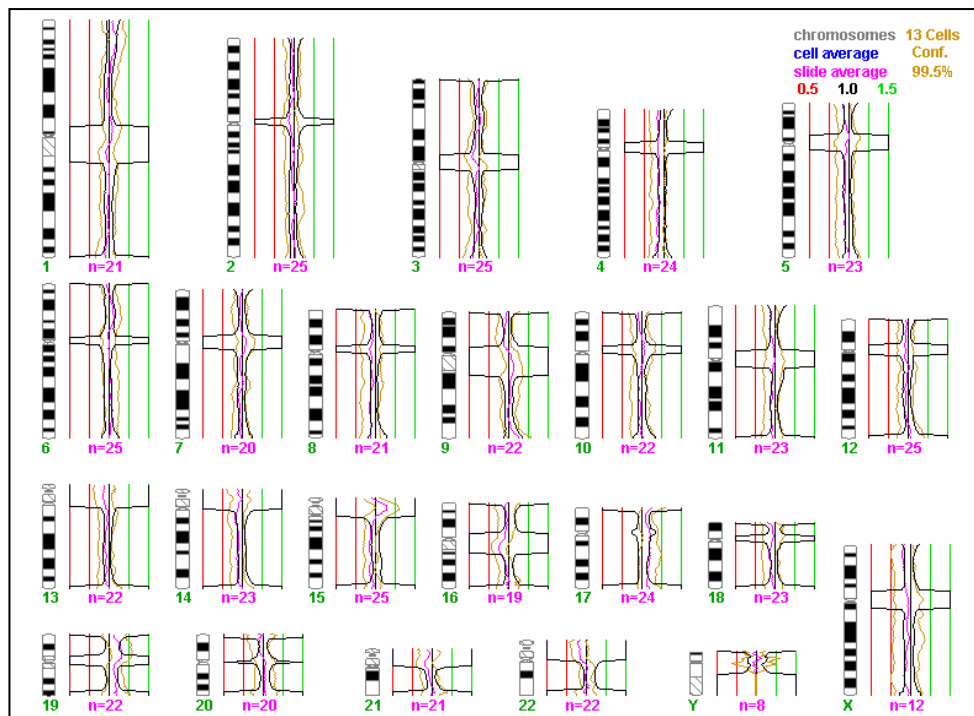


Fig.27- Perfils obtinguts per CGH d'alta resolució amb resultat equilibrat (MS-112).

3.6.2- FISH CONVENCIONAL

S'ha aplicat aquesta tècnica per tal de confirmar els resultats obtinguts per altres tècniques citogenètiques. S'han emprat diferents sondes comercials: sondes *loci* específiques (LSI), centromèriques (CEP), subtelomèriques (subtel) i de pintat cromosòmic (WPC) depenent de l'anomalia cromosòmica analitzada.

3.6.2.1- Sondes *loci* específiques (LSI), centromèriques i subtelomèriques

S'han utilitzat dos tipus de sondes *loci* específiques que són les que normalment s'apliquen de rutina en el diagnòstic citogenètic de determinades síndromes per microdeleció. Aquestes dues sondes han estat l'específica per a la síndrome de Prader-Willi (LSI Síndrome Prader-Willi/Angelman Dual Color probe (SNRPN SpOr/CEP15 SpGr/PML SpOr))(Vysis) i l'específica per a la síndrome de DiGeorge (LSI Síndrome DiGeorge/VCFS Dual color probe (TUPLE1 SpectrumOrange/ARSA SpectrumGreen, Vysis).

Les altres sondes específiques han estat per l'estudi de subtelòmers (*TelVysion ADN probes, Vysis*) i per centròmers (*satellite probes, Q-BIOgene*).

En general, la metodologia ha estat la que aconsella la casa comercial que bàsicament ha consistit en el següent:

- Envelliment

Abans de procedir a la hibridació s'ha d'envellir la preparació, així aquesta adquireix una major resistència en front els tractaments enzimàtics.

La mostra es pot envellir amb tres mètodes diferents: deixar la preparació durant tres dies a temperatura ambient, a 65°C o/n o fer un tractament amb 2xSSC a 37°C durant 30 min.

Una vegada envellit el material, si no es vol continuar amb el protocol seguidament, es pot guardar a -20°C fins a la seva utilització.

- Postfixació

Es treu la preparació del congelador i es deixa assecar a l'aire durant 1 min. Abans de procedir amb la hibridació es fa un tractament de postfixació.

Es renta el portaobjectes en PBS 1X durant 5 min a temperatura ambient. Seguidament es deshidrata en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% 1 min en cada un i es deixa assecar. Es submergeix la preparació en una solució de pepsina (49,5 ml H₂O miliQ, 0,5 ml HCl 1M, 25 µl de pepsina (100 mg/ml)) a 37°C durant 5 min. És molt important que la pepsina s'afegeixi just abans de submergir el portaobjectes perquè no es perdi la seva activitat. El temps de tractament amb la pepsina variarà depenent del tipus de mostra i també de la quantitat de citoplasma. Es submergeix en 2xSSC durant 5 min dues vegades seguides, es tracta amb formaldehid durant 2 min (en el cas que el formaldehid no s'hagi fet el mateix dia el temps s'augmentarà 1 o 2 min). Es fan dos rentats amb PBS 1X a temperatura ambient durant 5 min i es deshidrata la preparació en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% 1 min cadascun i es deixa assecar.

- Hibridació

La preparació cromosòmica es desnatura en formamida al 70% a 73° C durant 5 min si prové de sang perifèrica (4 min si prové de líquid amniòtic o cultiu de vellositat corial). Després es deshidrata en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% 1 min en cadascun. Es deixa assecat a temperatura ambient. Mentrestant es barreja la sonda amb aigua miliQ i solució d'hibridació específica per la sonda en les proporcions recomanades per la casa comercial. Es desnatura la barreja a 73°C durant 5 min. La sonda desnaturada s'aplica sobre el portaobjectes, ja sec, i es cobreix amb un cobreobjectes de 20x20. Es segella amb goma i es deixa hibridar a 37° C o/n en una caixa humida.

- Rentats posthibridació

Es treu el cobreobjectes amb compte i es renta l'excés de sonda i la hibridació inespecífica submergint la preparació en 0,4xSSC/0,3 NP-40 a 73°C 2 min i s'agita.

Després es renta en 2xSSC/0,1 NP-40 a temperatura ambient. S'afegeixen 10 µl d'una dilució DAPI ¼ (0,032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield). Es posa un cobreobjectes de 22x22 mm i es guarda a la nevera fins al seu anàlisi.

- Anàlisi

Per capturar la fluorescència de les metafases ben hibridades i per l'anàlisi s'utilitza un microscopi de fluorescència que conté filtres per *SpectrumGreen* (U-MNIBA), *SpectrumOrange* (U-MNG) i DAPI (U-MNU). Segons com estigui marcada la sonda s'utilitza el filtre de *SpectrumGreen* i/o *SpectrumOrange*. Les imatges s'obtenen a través d'una càmera CCD i amb l'ajut d'un software específic (Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK).

Les imatges corresponents a la fluorescència de DAPI s'inverteixen i serveixen per comprovar en quin cromosoma es troba la senyal de fluorescència.

Per cada cas s'analitzen 8-10 metafases.

3.6.2.2- Tècnica de pintat cromosòmic (WCP)

La tècnica de pintat cromosòmic s'ha emprat per confirmar resultats obtinguts amb altres tècniques citogenètiques.

- Envelliment

Abans de procedir a la hibridació s'ha d'envellir la preparació. Si no es vol continuar amb el protocol en el mateix moment, es pot guardar a -20°C fins a la seva utilització.

- Postfixació

Es renta la preparació en PBS 1X durant 5 min a temperatura ambient, es deshidrata en etanols 70%, 85% i 100% i es deixa assecat.

- Desnatura de la sonda

Es posen 2,5 µl de la sonda comercial (Cambio) en un tub de microcentrífuga i es desnatura a 65° C durant 10 min. Es deixa dins l'estufa a 37°C prehibridant durant 60 min com a màxim mentre es fa el tractament del portaobjectes.

- Postfixació

Es submergeix la preparació en una solució de pepsina (49,5 ml H₂O miliQ, 0,5 ml HCl 1M, 25 µl de pepsina (100 mg/ml)) a 37°C durant 5 min. És molt important que la pepsina s'afegeixi just abans de submergir el portaobjectes. El temps de tractament amb la pepsina varia depenent del tipus de mostra i de la quantitat de citoplasma. Es submergeix en 2xSSC durant 5 min dues vegades seguides. Es tracta amb formaldehid durant 2 min (en el cas que el formaldehid no s'hagi fet el mateix dia el temps s'augmentarà 1 o 2 min). Es fan dos rentats amb PBS 1X a temperatura ambient durant 5 min i es deshidrata el portaobjectes en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% durant 1 min cadascun i es deixa assecar.

- Hibridació

La mostra es desnaturalitza en formamida al 70% a 73°C durant 5 min. Seguidament es deshidrata en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% freds i es deixa assecar a temperatura ambient. S'afegeixen 2,5 µl de la sonda desnaturalitzada sobre la zona a hibridar i es posa un cobreobjectes de 20x20mm. Es segella amb goma i es deixa hibridar en càmera fosca humida a 37°C o/n.

- Rentats posthibridació

Es treu el cobreobjectes amb compte i es renta l'excés de sonda i la hibridació inespecífica submergint la preparació en 0,4xSSC/0,3 NP-40 a 73°C durant 2 min i s'agita. Després es renta en 2xSSC/0,1 NP-40 a temperatura ambient durant 2 min i es deixa assecar. S'afegeixen 10 µl d'una dilució DAPI ¼ (0,032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield). Es posa un cobreobjectes de 22x22 mm i es guarda a la nevera fins al seu anàlisi.

- Anàlisi

Per a l'anàlisi s'utilitza un microscopi de fluorescència que conté filtres per *SpectrumGreen* (U-MNIBA), *SpectrumOrange* (U-MNG) i DAPI (U-MNU) per capturar la fluorescència de les metafases ben hibridades. S'utilitza el filtre de *SpectrumGreen* o *SpectrumOrange* segons com estigui marcada la sonda de pintat cromosòmic. Les imatges s'obtenen a través d'una càmera CCD amb l'ajut d'un software específic (Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK).

Les imatges corresponents a la fluorescència de DAPI s'inverteixen per tal de comprovar en quin cromosoma hi ha la senyal de la sonda utilitzada.

Per cada cas s'analitzen 8-10 metafases.

3.6.3- TÈCNICA D'HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT MULTIPINTAT O *MULTIPLEX* (M-FISH)

Amb aquesta metodologia, en un sol experiment d'hibridació, es poden visualitzar tots els cromosomes homòlegs pintats d'un color específic (Fig.3).

- Envelliment d'extensions

Abans de procedir a la hibridació s'ha d'envellir la preparació cromosòmica. Una vegada envellit el material si no es vol continuar amb el protocol es pot guardar a -20°C fins a la seva utilització.

- Postfixació

Es treu la preparació cromosòmica del congelador i es deixa assecar a l'aire durant 1 min. Abans de procedir amb la hibridació es fa un tractament de postfixació. Es renta el portaobjectes en PBS 1X durant 5 min a temperatura ambient. Seguidament es deshidrata en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% durant 1 min en cada un i es deixa assecar. Es submergeix en una solució de pepsina (49,5 ml H_2O miliQ, 0,5 ml HCl 1M, 25 μl de pepsina (100 mg/ml)) a 37°C durant 5 min. És molt important que la pepsina s'afegeixi just abans de submergir la preparació. El temps de tractament amb la pepsina variarà depenent del tipus de mostra i també de la quantitat de citoplasma. Es submergeix en 2xSSC, durant 5 min, dues vegades seguides i a continuació es tracta amb formaldehid (41,14 ml H_2O miliQ, 2,5 ml MgCl_2 , 5 ml 10xPBS, 1,35 ml Formaldehid 37 %) durant 2 min a temperatura ambient. En el cas que el formaldehid no s'hagi fet el mateix dia el temps s'augmentarà 1 o 2 min. Es fan dos rentats amb PBS 1X, a temperatura ambient, durant 5 min. Es deshidrata el portaobjectes en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% durant 1 min en cadascun i es deixa assecar.

- Hibridació

La mostra es desnaturalitza en formamida al 70% a 73°C durant 5 min. Seguidament es deshidrata en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% durant 1 min en cadascun i es deixa assecar a temperatura ambient. Mentrestant es desnaturalitzen 2,5 μl de sonda (5 μl si la preparació és pobre en número de metafases) a 73°C durant 5 min. La sonda desnaturalitzada s'aplica sobre l'extensió cromosòmica també desnaturalitzada i seca. Es cobreix amb un cobreobjectes de 20x20mm partit per la meitat en el cas que apliquem 2,5 μl (o el cobreobjectes sencer si apliquem 5 μl de sonda). Es deixa hibridar a 37°C o/n en una caixa humida.

- Rentats posthibridació

Es treu el cobreobjectes amb compte i es renta l'excés de sonda i la hibridació inespecífica submergint el portaobjectes en 0,4xSSC/0,3NP-40 a 73°C agitant durant 2 min. Després es renta en 2xSSC/0,1 NP-40 a temperatura ambient durant 2 min i es deixa assecar. S'afegeixen 10 μl de dilució DAPI $\frac{1}{4}$ (0,032 ng/ μl) en *antifade* (Vectashield). Es posa un cobreobjectes de 22x22 mm i es guarda a la nevera fins al seu anàlisi.

- Anàlisi

La captura de les imatges es va realitzar mitjançant un microscopi epifluorescent Olympus AX60 (Olympus Optical CO, Hamburg, Germany) equipat amb una roda de filtres específics per

SpectrumAqua, *SpectrumFred*, *SpectrumGold*, *SpectrumGreen*, *SpectrumRed*, DAPI i un filtre de triple banda (FITC/PI/DAPI). El microscopi està dotat d'una càmera CCD d'alta sensibilitat refrigerada (*Photometrics Sensys*) que està acoblat a un sistema de captura *Smartcapture* (*Vysis*) i un software específic per M-FISH (*Quips Spectrasyon software, Vysis*).

Cada parella de cromosomes homòlegs es marca amb una combinació específica de fluorocroms (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7) (Fig.28).

Per cada cas s'han analitzat 8-10 metafases.

Cromosoma	<i>SpectrumFred</i>	<i>Spectrum Aqua</i>	<i>Spectrum Green</i>	<i>SpectrumGold</i>	<i>SpectrumRed</i>
1				Yellow	
2					Red
3		Green			
4			Green		Red
5	Red			Yellow	
6			Green		
7	Red				
8	Red				Red
9				Yellow	Red
10	Red	Green		Yellow	
11		Green			Red
12			Green	Yellow	
13		Green	Green		
14			Green	Yellow	Red
15		Green		Yellow	Red
16	Red		Green		
17	Red		Green		Red
18	Red			Yellow	Red
19	Red		Green	Yellow	
20	Red	Green			Red
21		Green	Green	Yellow	
22		Green	Green		Red
X	Red	Green			
Y		Green		Yellow	

Fig.28- Composició de fluorocroms de les sondes específiques per a cada cromosoma en la tècnica de M-FISH

3.6.4- FISH MULTICOLOR ESPECÍFICA DE CENTRÒMER (cenM-FISH)

Aquest treball s'ha realitzat durant l'estada al laboratori del Dr. Thomas Liehr a l'*Institut für Humangenetic und Antropologie*, Jena, Alemanya.

- Obtenció de la sonda

L'ADN específic de centròmer que està en plàsmidis i l'ADN de llibreries de microdissecció pel centròmer del cromosoma 5 s'amplifica pel mètode de la reacció en cadena de la polimerasa amb oligonucleòtids degenerats (DOP-PCR) en un volum de 50 µl d'acord amb el mètode de Senger i col. (1998). Cada tipus d'ADN es marca separatament utilitzant una segona DOP-PCR en un volum de 20 µl.

El marcatge es realitza segons l'esquema de la Figura 29 amb dUTPs marcats amb biotina, dietilaminocumarina, *SpectrumRed*, *SpectrumOrange* o *SpectrumGreen*. Totes les sondes marcades es barregen i s'aliquoten en 25 porcions iguals i cadascuna es precipita amb 25 µg de t-RNA i 2 µg de COT1-DNA. L'ADN COT-1 és necessari per evitar la hibridació entrecruada de les sondes centromèriques. Els botons d'ADN s'assequen al buit i s'emmagatzemen a -20°C fins a la seva utilització.

- Hibridació

Abans de la seva utilització, el botó es resuspèn amb 10 µl de solució d'hibridació (20% dextrà sulfat en 50% formamida/2xSSC). El volum obtingut és suficient per cobrir la zona d'hibridació amb un cobreobjectes de 24x24 mm. La barreja de sondes es desnatura a 75°C durant 5 min i es prehibrida a 37°C durant 10 min.

El portaobjectes es submergeix en una solució de pepsina, 5 min, a 37°C. Després es para la reacció submergint la preparació en PBS 1X durant 5 min. Pel tractament de postfixació s'afegeixen 100 µl de formaldehid sobre el portaobjectes, es col·loca el cobreobjectes i es deixa actuar 10 min a temperatura ambient. Seguidament es treu el cobreobjectes, es renta en PBS 1X durant 5 min a temperatura ambient i es deshidrata en una sèrie d'etanols (70%, 95% i 100%) durant 3 min en cada un. Es deixa assecat i després es desnatura a 70% a 73°C durant 3 min. Es deshidrata en una sèrie d'etanols 70% (fred), 95% i 100%, i es deixa assecat a temperatura ambient. Es col·loca la sonda desnatura sobre el portaobjectes amb la mostra també desnatura, es segella amb goma i s'hibrida a 37°C o/n.

- Rentats posthibridació i detecció amb anticossos

Es renta 2 min en 0,4xSSC a 68°C i 1 min en 4xSSC/0,005%Tween20 a temperatura ambient. El següent pas és fer la detecció de la biotina mitjançant anticossos. S'afegeixen 70µl de *marvel* (llet en pols) i 1,2 µl de l'anticòs Streptoavidina-Cy5, es col·loca sobre el portaobjectes, es cobreix amb el cobreobjectes i s'incuba 40 min a 37°C en una caixa humida. Es renta la preparació en 4xSSC/0,005%Tween20 a temperatura ambient durant 5 min i es renta 5 min en PBS 1X i finalment es renta amb aigua destil·lada i es deshidrata en una sèrie d'etanols (70%, 95% i 100%) durant 3 min en cada un. Es deixa assecat a temperatura ambient. Per últim es realitza la contratació amb una dilució DAPI ¼ (0,032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield).

- Anàlisi

La captura i anàlisi de les imatges es van realitzar mitjançant un microscopi epifluorescent Zeiss axioplan equipat amb càmera CCD (Zeiss; Jena, Gemany) i el sistema d'anàlisi d'imatges de FISH-ISIS (Metasystems, Altlussheim, Germany). Els centròmers de cada parella d'homòlegs es marquen amb una combinació específica de fluorocroms (Fig.29). Cal destacar que els centròmers dels cromosomes 13 i 21 es marquen amb la mateixa combinació de fluorocroms.

Per a cada cas s'analitzen 10-15 metafases.

Cromosoma	<i>Spectrum Green</i>	<i>Spectrum Orange</i>	<i>Spectrum Red</i>	<i>Biotin-Cyanine 5</i>	<i>Diethyl-amino coumarin</i>
1	Green	Orange			
2	Green				
3	Green	Orange		Yellow	
4			Red		
5			Red	Yellow	Blue
6		Orange	Red	Yellow	Blue
7	Green	Orange	Red		
8	Green	Orange			Blue
9	Green		Red		Blue
10		Orange	Red	Yellow	
11		Orange		Yellow	Blue
12			Red	Yellow	
13	Green				Blue
14				Yellow	
15	Green			Yellow	Blue
16		Orange	Red		
17		Orange			Blue
18			Red		Blue
19					Blue
20	Green		Red		
21	Green				Blue
22		Orange		Yellow	
X				Yellow	Blue
Y	Green			Yellow	

Fig.29- Composició de fluorocroms de les sondes específiques emprades en cada centròmer en la tècnica de cenM-FISH

3.6.5- CROMOSOMES ARTIFICIALS DE BACTERIES (BACs)

En aquesta metodologia s'han utilitzat clons de bactèries que contenen inserts d'entre 100 i 300 Kb específics del genoma humà en un plasmidi (tots els clons provenen de la llibreria del Dr. Mariano Rocchi, Universitat de Bari, Italia). Extraient aquest ADN i marcant-lo amb fluorescència es poden obtenir sondes específiques per diverses regions del genoma.

- Cultiu

En un tub de 50 ml s'afegeixen 10 ml de medi 2xYT (Bacto Yeast extract 1g, Bacto trypton 1,6 gr, NaCl 0,5 g) i l'antibiòtic a la concentració final que es correspongui amb la resistència de la bactèria (Ampicilina [50 µg/ml], Cloramfenicol [20 µg/ml] o Kanamicina [25 µg/ml]). En condicions d'esterilitat es submergeix una nansa de Kolle en l'alíquota del cultiu de *E.coli* portador del BAC que ens interessa i s'afegeix als 10 ml de cultiu amb antibiòtic que ja s'havia preparat. El cultiu es deixa a 250 rpm o/n a 37°C. El dia següent el cultiu ha de tenir una aparença turbulenta. S'agafen 850 µl del cultiu i es posen en un tub de microcentrífuga juntament amb 150 µl de glicerol. Es barreja i s'emmagatzema a -80°C de tal manera que es pugui utilitzar aquesta alíquota, en un futur, com punt de partida d'un altre cultiu.

- Extracció de l'ADN

El tub de 50 ml amb la resta del cultiu es centrifuga a 4000 rpm durant 10 min. Es descarta el sobrenedant i el botó es resuspèn amb 300 µl de GTE (Glucosa 50mM, Tris 25mM pH 8, EDTA 10mM). La suspensió obtinguda es passa a un tub de microcentrífuga de 2ml. En aquest moment es prepara la solució de desnaturalització (0,2M NaOH, SDS 1%). Al tub de microcentrífuga s'hi afegeixen 600 µl de solució de desnaturalització a temperatura ambient. Es barreja invertint el tub varies vegades durant 5 min. La solució en aquest pas tindrà aspecte viscos. S'afegeixen 500 µl d'acetat d'amoni 7,5 M, es deixa el tub en gel i es barreja invertint varies vegades durant 10 min. Es centrifuga a 13.000 rpm durant 20 min i es transfereix el sobrenedant a un altre tub de microcentrífuga. Si el sobrenedant no està net es torna a centrifugar a 14.000 rpm durant 10 min. Es passa el sobrenedant a un altre tub i s'hi afegeixen 700 µl d'isopropanol fred; es barreja invertint-lo varies vegades. Es centrifuga a 14.000 rpm, 20 min, i es descarta el sobrenedant. En aquest punt s'ha d'observar un botó (que conté l'ADN). Es renta el botó amb 500 µl d'etanol al 70% i sense resuspendre el botó es centrifuga a 14.000 rpm durant 5 min. Es descarta el sobrenedant i, sense deixar que el botó s'assequi completament, es resuspèn amb 100 µl de TE o H₂O miliQ autoclavada.

A continuació, s'afegeix l'ARNsa a una concentració final de 100 µl/ml i es deixa actuar, a 37°C, durant 30 min. Es fa precipitar l'ADN amb 0,1 volums de NaAc 3M i 3 volums d'etanol absolut fred. Es deixa incubar a -80°C durant 20 min o a -20°C o/n. Es centrifuga a 14.000 rpm durant 15 min i es renta amb 500 µl d'etanol 70%. Es resuspèn en 50 µl de H₂O miliQ i es comprova la concentració d'ADN obtinguda en un gel d'agarosa al 1,5% comparant amb patrons coneguts de concentració d'ADN.

En aquest punt també podem observar la qualitat de l'ADN obtingut així com la presència, o no, d'ARN restant.

La suspensió obtinguda d'ADN es guarda a -20°C.

- Quantificació de l'ADN

La quantificació de l'ADN extret es fa per electroforesi en gel d'agarosa 1,5% (0,3g d'agarosa + 30 ml 1xTAE). Es carrega en cada pou 1 µl de l'ADN (BAC o ADN patró), 8 µl d'H₂O i 1 µl de tampó de càrrega. En 3-5 dels pous es posa ADN de concentració coneguda (ADN patró) per tal de tenir una referència de concentracions per comparar la intensitat de la banda que obtindrem a partir dels ADNs que hem extret. Comparant les intensitats de les diverses bandes obtingudes s'extrapolerà la concentració de cada un dels BACs (Fig.30).

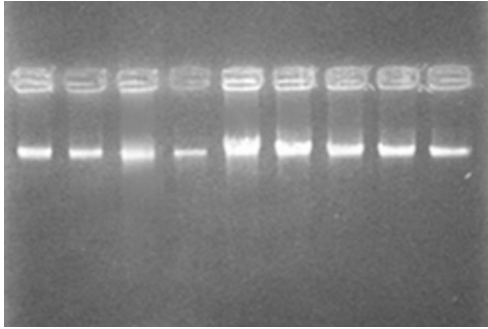


Fig.30- Quantificació per electroforesi en gel d'agarosa al 1,5% de l'ADN (BACs) extret. Carrils 1-4: mostres extretes d'ADN; carrils 5-9: ADNs de referència (500ng, 300ng, 225ng, 125 ng i 75ng)

- Marcatge fluorescent de l'ADN

Es marca 1 µg de l'ADN utilitzant el kit de *nick translation* (Vysis). Aquesta reacció es realitza dins un tub de microcentrífuga al que s'afegeix 5 µl de dTTP 0.1mM, 5 µl de tampó del kit de *nick translation*, 10 µl de dNTP (dATP, dCTP i dGTP), (22.5-x) d'H₂O lliure de nucleases, x µl d'ADN (1000 ng) i 2.5 µl de fluorocrom verd (*SpectrumGreen*) o de fluorocrom vermell (*SpectrumRed*) depenent de si es tracta de la mostra control o problema i 5 µl d'enzim del kit de *nick translation*. Es barreja tot i s'incuba en un bany protegit de la llum a 15°C durant 1 h i 30 min. Després d'aquest temps s'atura la reacció posant la barreja en un bany a 70° C durant 10 min. Finalment es para la reacció introduint el tub en gel.

Durant aquest període, quan el tub està submergit en gel, es fan córrer 9µl del producte de la reacció en un gel d'agarosa al 2% per comprovar la llargada dels fragments de l'ADN que han d'estar entre 300 i 3500 pb. Es barreja l'ADN marcat amb 10 µl d'ADN COT-1 (Vysis) i 6 µl d'ADN d'esperma de salmó (*Sonicated Salmon Sperm ADN Phenol Extracted*, Amersham Biosciences) que bloquejarà les regions repetitives del genoma (ja que al presentar polimorfisme en la població podria donar falsos positius i per tant són regions excloses de l'anàlisi).

S'afegeixen 0.1 volums d'acetat sòdic 3M a la paret del tub de microcentrífuga i es fa baixar fins al fons aplicant 3 volums d'etanol absolut fred. Es barreja per inversió i es deixa a -80° C durant 20 min o o/n a -20° C perquè precipiti l'ADN. Després es centrifuga a 12.000 rpm durant 30 min. S'elimina el sobrenedant i es deixa assecat durant 8 min dins l'estufa de 37°C perquè s'evaporin les restes d'etanol. Es resuspèn el botó d'ADN en 6,5 µl d'H₂O miliQ i si no es continua el protocol s'emmagatzema a -20° C fins a la seva utilització.

- Envelliment del material

Es fa una extensió a partir del material fixat en *carnoy* de la mostra del pacient que volem estudiar sobre un portaobjectes desengreixat. Abans de procedir a la hibridació, s'ha d'envellir la preparació.

Una vegada envellit el material si no es vol continuar amb el protocol es guarda la suspensió a -20°C fins a la seva utilització.

- Postfixació

Es treu el portaobjectes del congelador i es deixa assecar a l'aire durant 1 min. Abans de procedir amb la hibridació es fa un tractament de postfixació.

Es renta el portaobjectes en PBS 1X durant 5 min a temperatura ambient. Seguidament es deshidrata en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% durant 1 min en cadascun i es deixa assecar. Es submergeix el portaobjectes en una solució de pepsina (49,5 ml d' H_2O miliQ, 0,5 ml HCl 1M, 25 μl de pepsina (100 mg/ml)) a 37°C durant 5 min. És molt important que la pepsina s'afegeixi just abans de submergir el portaobjectes. El temps de tractament amb la pepsina variarà depenent del tipus de mostra i també de la quantitat de citoplasma.

Es submergeix en 2xSSC durant 5 min dues vegades seguides i es tracta amb formaldehid durant 2 min (en el cas que el formaldehid no s'hagi fet el mateix dia el temps s'augmentarà 1 o 2 min). Es fan dos rentats amb PBS 1X a temperatura ambient durant 5 min i es deshidrata el portaobjectes en una sèrie d'etanols 70%, 85% i 100% 1 min cadascun i es deixa assecar.

- Hibridació

El portaobjectes es desnatura amb formamida al 70% a 73°C durant 5 min. Es deshidrata en una sèrie d'etanols freds al 70%, 85% i 100% i es deixa assecar al aire. Es barregen 2 μl de l'ADN marcat amb 8 μl d' H_2O miliQ autoclavada i es desnatura a 73°C durant 5 min. S'aplica l'ADN marcat i desnaturat sobre la preparació (també desnaturada) i es col·loca un cobreobjectes segellant-lo amb goma. Es deixa hibridar a 37°C o/n en una caixa humida.

- Rentats posthibridació

Es treu el cobreobjectes, amb compte, i es renta l'excés de sonda i la hibridació inespecífica submergint el portaobjectes en 0,4xSSC/0,3 NP-40 a 73°C durant 2 min i agitant. Després es renta en 2xSSC/0,1 NP-40 a temperatura ambient 2 min i es deixa assecar. S'afegeixen 10 μl de DAPI (0,032 ng/ μl) en *antifade* (Vectashield), un cobreobjectes de 20x20mm i es guarda a la nevera fins al seu anàlisi.

- Anàlisi

Per l'anàlisi s'utilitza un microscopi de fluorescència que conté filtres per *SpectrumGreen* (U-MNIBA), *SpectrumRed* (U-MWIY) i DAPI (U-MNU) per capturar la fluorescència de les metafases ben hibridades. S'utilitza el filtre de *SpectrumGreen* o *SpectrumRed* segons com s'hagi fet el marcatge del BAC determinat que estem analitzant. Les imatges s'obtenen a través d'una càmera CCD i amb l'ajut d'un software específic (Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK).

Les imatges corresponents a la fluorescència de DAPI s'inverteix i és utilitzada per comprovar en quina banda cromosòmica hi ha la senyal de fluorescència del BAC que s'està estudiant.

Per a cada cas s'analitzen 10-15 metafases.

3.7- TÈCNICA DE MLPA ESPECÍFICA PER L'ANÀLISI DE REGIONS SUBTELOMÈRIQUES

Aquesta tècnica es basa en determinar desequilibris en les regions subtelomèriques mitjançant la PCR quantitativa. Aquest anàlisi s'ha realitzat durant l'estada en el laboratori de la Dra. Montserrat Milà del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona. Per analitzar les regions subtelomèriques s'ha emprat el *kit* P036B i per confirmar els resultats els *kits* P069 i P070 (MCD-Holland; Amsterdam, Netherlands).

- Desnaturalització de l'ADN i hibridació de la sonda SALSA

Es posen 5 µl d'ADN (20-500 ng) en un tub de PCR i s'introdueix el tub en el termociclador, escalfant 5 min a 98°C. Abans d'obrir el termociclador es refreda a 25°C. S'afegeixen a cada tub 1,5 µl de SALSA Probe-mix (MRC-Holland) i 1,5 µl de MLPA buffer (MRC-Holland). S'homogenitza amb compte i s'incuba durant 1 min a 95°C. Després es deixa 16 h a 60°C.

- Reacció de lligació

Es redueix la temperatura del termociclador a 54°C i es deixa incubar 15 min. Mentre està a 54°C s'afegeixen, a cada tub, 32 µl de barreja lligasa-65 (MRC-Holland) (3 µl de Ligase-65 buffer A, 3 µl de Ligase-65 buffer B, 25 µl d'aigua tridestilada, 1 V de Ligase-65) i es barreja amb compte. Després de 15 min a 54°C s'augmenta la temperatura a 98°C durant 5 min per tal d'inactivar la lligasa. Després, la temperatura es baixa a 60°C.

- Reacció de PCR

Es barregen 4 µl de tampó 10xSALSA PCR, 26 µl d'H₂O tridestilada, 10 µl del producte de la reacció de lligació. Mentre els tubs estan al termociclador a 60°C s'afegeixen, a cada tub, 10 µl de barreja de polimerasa (MRC-Holland) (2 µl de SALSA PCR-primers, 2 µl de SALSA Enzyme Dilution buffer, 5,5 µl d'H₂O tridestilada, 0,5 µl de SALSA Polymerase) i immediatament es comença la reacció de PCR.

- Condicions de PCR

Es realitzen 35 cicles: 30 seg a 95°C; 30 seg a 60°C; 60 seg a 72°C. S'acaba amb 20 min d'incubació a 72°C.

- Anàlisi

La reacció obtinguda de la PCR s'analitza amb un sistema de separació i quantificació relativa del producte per electroforesi amb l'analitzador genètic ABI-310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) amb el marcador estàndard ROX 500 i el software *Gene Mapper* v3.0 (Applied Biosystems). Amb aquest software obtindrem les dades de l'àrea de cada pic corresponent a l'amplificació per PCR de cada una de les regions subtelomèriques. Els valors obtinguts s'introdueixen en una fulla de càlcul *l'Excel* i les dades es normalitzen dividint l'àrea de cada pic

per la suma d'àrees en aquella mostra. Després, els valors es divideixen pels valors obtinguts en les mostres control. Si el número de còpies d'una regió està dins la normalitat el valor obtingut hauria de donar 1 amb una variació del 30%. Si el valor obtingut és superior a 1,3 es considerarà un guany i si el valor és inferior a 0,7 es considerarà una pèrdua. Els resultats es representen en un diagrama de barres perquè l'anàlisi sigui més fàcil i visual (Fig.31).

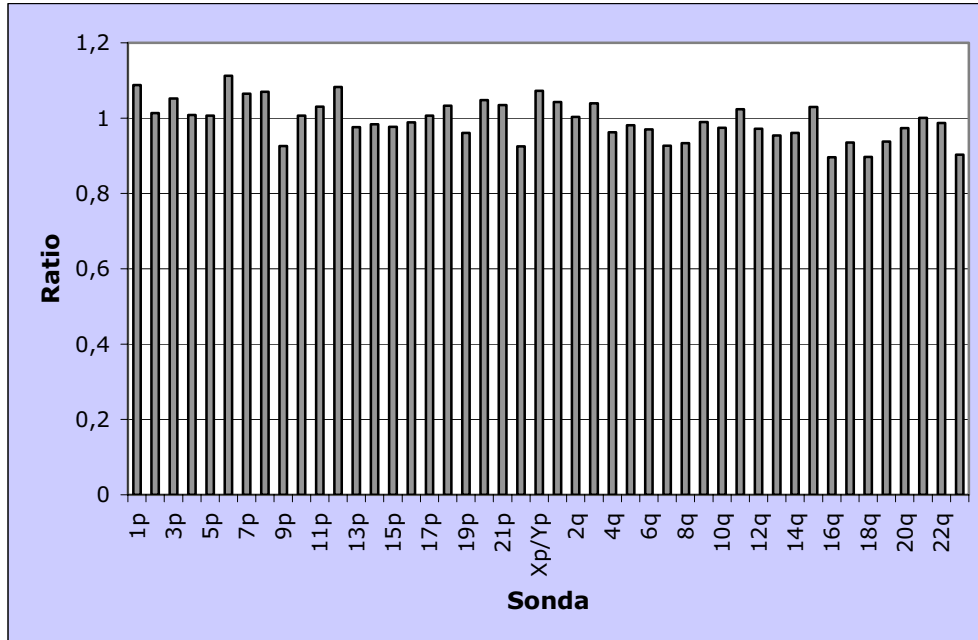


Fig.31- Resultats de l'anàlisi d'una mostra per la tècnica de MLPA. Totes les barres es troben dins l'interval 0,7-1,3 per tant considerariem el resultat equilibrat.

3.8- NOMENCLATURA

La descripció dels cariotips caracteritzats mitjançant tècniques de citogenètica convencional i molecular s'han realitzat d'acord amb les instruccions descrites en l'ISCN (*International Standing Comittee on Human Cytogenetic Nomenclature 2005*).

4. RESULTATS

4- RESULTATS

En aquest treball s'han estudiat un total de 133 casos. En un 73,7% (98/133) d'aquests, s'han detectat i/o caracteritzat alteracions cromosòmiques. En aquest apartat els casos s'han agrupat tenint en compte el resultat obtingut. Els grups han estat els següents:

- Retinoblastoma (10 casos)
- Casos sense anomalies cromosòmiques detectades (35 casos)
- Monosomies i trisomies de cromosomes autosòmics (49 casos)
- Monosomies i trisomies de cromosomes sexuals (10 casos)
- Reorganitzacions cromosòmiques aparentment equilibrades (4 casos)
- Cromosomes marcadors supernumeraris (25 casos)

Els casos de retinoblastoma s'han caracteritzat mitjançant les tècniques de CGH i HR-CGH. No s'han pogut aplicar altres tècniques de FISH ja que no es disposava de material fixat en *carnoy*.

Els casos que inicialment s'havien classificat de pacients amb clínica severa i cariotip normal i que malgrat aplicar les tècniques CGH, HR-CGH i MLPA no s'ha detectat cap anomalia cromosòmica s'han continuat agrupant en aquest apartat.

Els casos de monosomies i trisomies de cromosomes autosòmics s'han caracteritzat mitjançant les tècniques de CGH i HR-CGH, però també aplicant altres tècniques de FISH com la M-FISH, sondes de pintat cromosòmic, sondes *locus* específiques i sondes subtelomèriques. A més, s'ha utilitzat la tècnica de MLPA específica per regions subtelomèriques. Depenent dels resultats obtinguts, en aquest grup s'hi han inclòs alguns casos que en material i mètodes estaven classificats en altres grups.

- El 27,7% (13/47) dels casos (en realitat 14/48 però dos eren familiars), en material i mètodes s'havien classificat de portadors de cariotip normal però aplicant tècniques de citogenètica molecular s'ha detectat alguna monosomia o trisomia.
- El cas MS-129 inicialment s'havia classificat com possible portador de trisomia gonosòmica i s'ha classificat posteriorment de portador de trisomia autosòmica ja que el material addicionat al cromosoma X pertanyia al cromosoma 12, malgrat que també es podia apreciar una pèrdua del cromosoma X.
- Els casos MS-45, MS-77 i MS-111 inicialment s'havien classificat com casos portadors de reorganitzacions "aparentment" equilibrades però en resultats s'han classificat en l'apartat de monosomies i trisomies autosòmiques ja que s'ha detectat una deleció en la regió cromosòmica implicada en la reorganització.

Els casos de monosomies i trisomies de cromosomes sexuals s'han caracteritzat per les tècniques de CGH i HR-CGH. En part dels casos no s'han pogut aplicar altres tècniques de FISH ja que no es disposava de material fixat en *carnoy*.

S'han estudiat 4 casos que finalment s'han classificat com portadors de reorganitzacions aparentment equilibrades. En dos dels casos (MS-134 i MS-147) no es van poder aplicar les tècniques de CGH i HR-CGH ja que no es disposava d' ADN. Per tant, no podem descartar desequilibris cromosòmics que s'haguessin pogut detectar per aquestes tècniques.

Finalment, en els casos de cromosomes marcadors supernumeraris s'han utilitzat les tècniques de CGH i HR-CGH (que no han estat útils en els casos en els que el cromosoma marcador aparentment no estava compost d' eucromatina), cenM-FISH, FISH amb sondes centromèriques i BACs.

4.1- RETINOBLASTOMA

En la Taula 16 es detallen els resultats obtinguts per cada tumor de retinoblastoma a l'utilitzar la CGH i HR-CGH. També s'hi descriu el tipus de retinoblastoma (bilateral o unilateral).

En tots els casos s'han detectat desequilibris genòmics tant per CGH com per HR-CGH.

El nombre total de guanys detectats per HR-CGH ha estat de 60 mentre que per CGH convencional s'han detectat 80 guanys.

El número de pèrdues identificades per HR-CGH han estat de 92 i per CGH només se n'han detectat 22. Les regions concretes implicades en els desequilibris es detallen a la Taula 16.

Els cromosomes o regions cromosòmiques amb més guanys al analitzar els 10 tumors han estat: 1q (8 casos) , 6p (7 casos), el cromosoma 17 (8 casos per CGH convencional i en 4 per HR-CGH). La HR-CGH ens ha permès acotar les regions: 1q21 (7 casos), 1q44 (5 casos), 6p25 (5 casos), 6p22qter (6 casos) i la 17q22q23 (3 casos).

Respecte les pèrdues, les més freqüentment trobades per CGH convencional i HR-CGH han estat: 8p, 8q, 12p,12q i 16q.

En les Figures 32 i 33 es mostren els ideogrames amb els resultats obtinguts en tots els casos de retinoblastoma.

Taula 16- Resultats citogenètics obtinguts per CGH i HR-CGH en els 10 tumors de retinoblastoma

Cas	Bi/Uni	CGH	HR-CGH
RB1	Bi	rev ish enh(1)(q), enh(5)(p12p13), enh(6)(p), enh(17)(p12q11.2), enh(19), enh(20)	rev ish dim(1)(p35.3p32.3), enh(1)(q), dim(2)(p22p25.3), dim(2)(q21), dim(2)(q21.3q22.3), dim(2)(q36.1q37.3), dim(3)(p21.3p21.2), enh(5)(p13p1), dim(5)(q21.1), dim(5)(q23.2q35.2), enh(6)(p), dim(7)(p21.1p13), dim(7)(q32q36.3), dim(8)(q23.3q24.3), dim(9)(q22.2q31.3), dim(10)(q21.1), dim(10)(q22), dim(10)(q23.3qter26.3), dim(11)(p15.5), dim(11)(p15.3p15.1), dim(11)(q13.1q13.3), dim(11)(q23.1qter), dim(12)(q13.3q14.1), dim(12)(q23.1q24.2), dim(13)(q13.3q21.2), dim(13)(q31.2q33.3), dim(16)(q22q23.1), dim(18)(q12.2q22.1), enh(19), enh(20), dim(21)(q22.1), dim(22)(q1213.2)
RB2	Bi	rev ish enh(9)(q34), enh(15)(q11.2q13), enh(16)(q13p13.3), enh(16)(q24), enh(17)(p13.3q11.2), enh(17)(q25), enh(19), enh(20), enh(22)	rev ish dim(1)(p36.13), dim(3)(q22q24), dim(11)(q22.3q23.1)
RB3	Uni	rev ish enh(1)(q21q44), enh(15)(q11.2q13), enh(16)(q12pter), enh(19), enh(22), enh(Y)(q11.2p11.3)	rev ish dim(2)(q13q14.2), enh(1)(q24.3q32.1), enh(1)(q44), dim(2)(q31.1), dim(2)(q35q37.3), dim(3)(q13.3q24), dim(8)(q24.1q24.3), dim(10)(q22.3), dim(11)(q23.3), dim(15)(q25.3q26.1)
RB4	Bi	rev ish enh(1)(p36.1p36.3), enh(1)(q21q23), enh(6)(p), dim(6)(q16.1q27), dim(7)(q11.2p22.3), dim(12)(q13.1p13.3), dim(13)(q14.2q31.2), enh(14)(q11.2q12), enh(15)(q11.2q13), enh(16)(p13.3 q13), enh(17), enh(18)(q11.2p11.3), dim(18)(q21.1q23), enh(19), enh(20), enh(22), enh(Y)(p11.3q11.2)	rev ish enh(1)(q21.3), enh(6)(p24.1p22.2), enh(6)(p21.1p12.1), dim(6)(q16.1q27), dim(7)(p22.3q21.12), dim(12)(p13.3q13.3), dim(13)(q14.1q31.2), enh(14)(q11.2q12), enh(15)(q11.2), , dim(18)(q12.3q23), enh(21)(q11.2q21), enh(Y)(q11.221)
RB5	Uni	rev ish enh(1)(q21q44), enh(6)(p21.3p25.3), enh(7)(q31q36.3), dim(8), dim(14)(q11.2), dim(16), enh(17), enh(19), enh(20),	rev ish enh(1)(q21q44), enh(6)(p21.3p25.3), enh(7)(q31q36.3), dim(8)(p23.2q24.3), dim(10)(q26.1q26.3), dim(14)(q11.2q13), dim(14)(q21q22), dim(14)(q24.3q31.3), dim(15)(q11.2q14), dim(16)enh(17), enh(19), enh(20)
RB6	Bi	rev ish enh(6)(p21.3), enh(6)(p25), enh(10)(p12pter), enh(19)	rev ish enh(6)(p21.3), enh(6p25), enh(10)(p12pter), dim(10)(q25.1qter), enh(19)
RB7	Uni	rev ish dim(1)(p31), enh(1)(q21q44), dim(4)(q13q28), dim(5)(q11.2q34), enh(6)(p), dim(6)(q15q24), enh(7), dim(8)(q12q24.1), enh(10), enh(11), dim(12)(q15q21.3), dim(13)(q21.3q22), dim(14)(q13.1q32.3), enh(17), enh(18), enh(19), enh(20), enh(21), enh(22), enh(Y)	rev ish dim(1)(p31.3p36.3), enh(1)(q21.3), enh(1)(q25.2q44), enh(2)(q22.2q35), dim(3)(p24p26), dim(3)(p22p26.3), dim(3)(q21.2q24), dim(4)(p16), dim(5)(q21.3q35.3), dim(6)(q24.2q27), enh(6)(p22.3p25), enh(7)(p15.1p21.3), enh(7)(q11.22q34), dim(8)(p12p23), dim(8)(q12q21.1), dim(8)(q21.3q24.3), dim(9)(q22.3qter34.3), enh(10)(p11.23p13), enh(10)(p21.2), enh(11), dim(12)(q23q24.3), dim(13)(q34), dim(14)(q13q32.3), dim(15)(q12q26.3), dim(16), enh(17)(q22q23.2), enh(18)(p11.3q22.1), enh(19)(p13.1q13.1), enh(20), enh(21)(q11.2q22.1), dim(22)(q), enh(Y)(q11.2)

Cas	Bi/Uni	CGH	HR-CGH
RB8	Uni	rev ish enh(1)(p35p36.3),enh(1)(q21q44), enh(7)(p12q11.2),enh(9)(q33q34.3),dim(8), dim(12)(p13.3q21.2),enh(12)(q23q24.3), enh(13)(q32q34),enh(16),enh(17)(q), enh(18)(p11.2q11.2),enh(19),enh(20),enh(22)	rev ish enh(1)(q21.2q23.1),enh(1)(q32.3q42.3), dim(8),dim(12)(p13.3q21.2),enh(13)(q31.2q34),enh(16)(q13), dim(17)(p12p13.1),enh(18)(q11.2),enh(18)(q21),enh(19)(p13.2)
RB9	Uni	rev ish enh(1)(q21q24),enh(6)(p21.1p25.3), enh(15)(q11.2q13),enh(16)(p),enh(17)(q21q25.3),enh(19)	rev ish dim(1)(p32.1p34.3),enh(1)(q21.2q23.2),enh(1)(q25.2q31.1), dim(1)(q42q43),dim(2)(p23.3p25.3),dim(2)(p23.1p21),dim(2)(q13q21.1), dim(2)(q21.3q23),dim(4)(p16),dim(5)(q33.2q35.3),enh(6)(p22.3p24.1), dim(8)((q24.12q24.3),dim(10)(q25.1q26.3),dim(11)(p14.1p15.5),dim((11)(q14), dim(11)(q23.2q23.3),enh(15)(q11.2),dim(15)(q22.1q25), enh(17)(q22q25.3),dim(18)(q21),enh(21)(q11.2)
RB10	Uni	rev ish enh(1)(q),enh(6)(p),enh(9)(q22q34.3), enh(11)(p11.2q14.1),dim(11)(q14q25), dim(12)(p12.1p13.3),dim(16)(q21q24.3),dim(17)(p12p13.3), enh(17p11.2q12),enh(19),enh(X)(q25)	rev ish enh(1)(q),dim(2)(p14.1p14.3),enh(6)(p), dim(8)(p23.1),enh(9)(q22.1q34.3),enh(11)(q12.3q13.5), dim(11)(q14.3q25),dim(12)(p),dim(16)(q),dim(17)(p12p13.3), enh(17)(p11.1q12),enh(19)(p13.1p13.3),enh(19)(q13.1),enh(X)(q25),

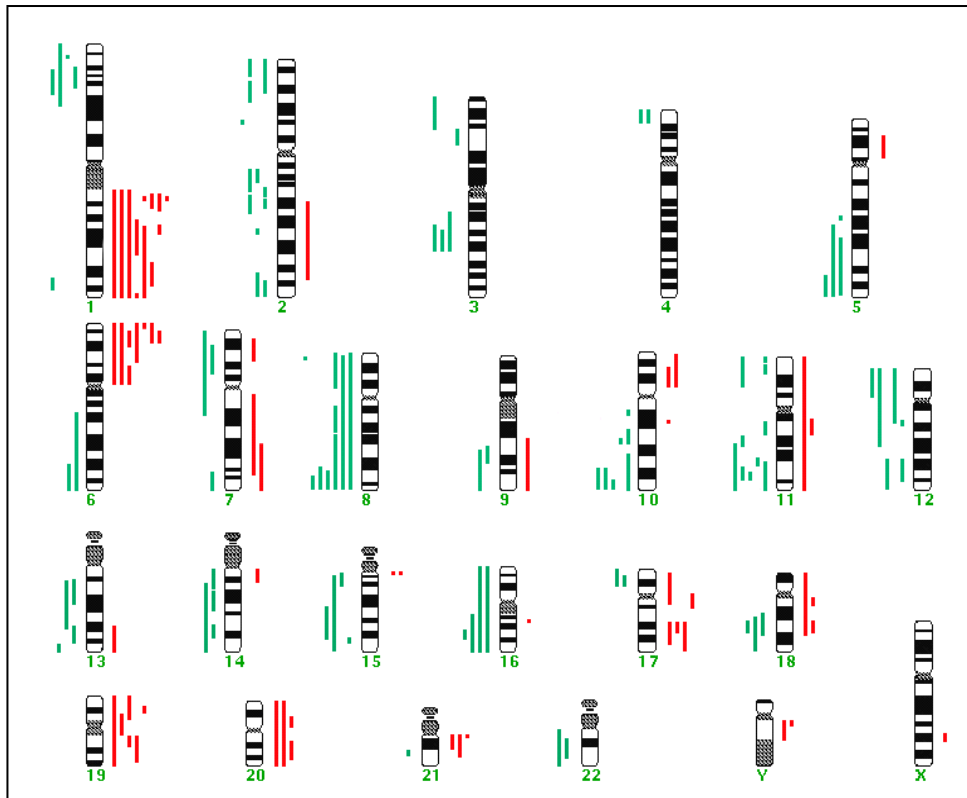


Fig. 32- Desequilibris detectats en els 10 casos de retinoblastoma mitjançant el software de CGH.

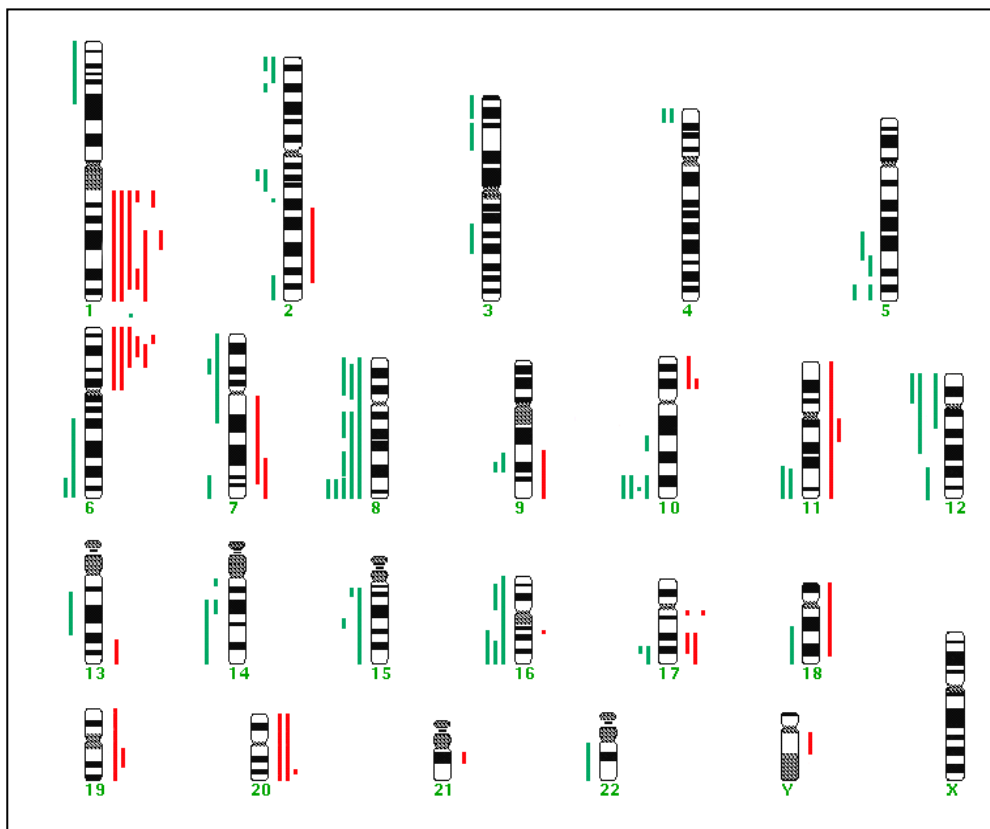


Fig. 33- Desequilibris identificats en els 10 casos de retinoblastoma mitjançant el software de HR-CGH.

4.2- CARIOTIP "APARENTMENT" EQUILIBRAT

En aquest grup s'hi ha inclòs els pacients amb clínica alterada i que presenten cariotip normal, resultats de CGH, HR-CGH i MLPA equilibrats i M-FISH normal. Els resultats es mostren en la Taula 17. En aquests casos es pot dir que no existeix cap desequilibri en el genoma superior a 3Mb (que és la resolució de la tècnica de HR-CGH) ni desequilibris cromosòmics a nivell dels subtelòmers (ja que la tècnica de MLPA ha donat resultats equilibrats).

Taula 17- Pacients amb cariotip normal i clínica alterada

Cas	Cariotip	Material	CGH/ HR-CGH	MLPA	M-FISH	Fórmula cromosòmica final
MS-60	46,XX	ADN	equilibrada	-	-	46,XX
MS-66	46,XX	ADN	equilibrada	normal	-	46,XX
MS-80	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-87	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-90	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-92	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-93	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-102	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-112	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-119	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-123	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-124	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-127	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-131	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-132	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-143	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-144	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-146	46,XX, inv(9)(p12q13)	ADN/MET	equilibrada	-	normal	46,XX,inv(9)(p12q13)
MS-148	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-149	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-150	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-151	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-156	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-162	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-164	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-169	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-171	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-173	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-175	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-180	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-182	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-186	46,XX	ADN/MET	enh(Yp11.3?)/ equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-190	46,XY	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XY
MS-191	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX
MS-192	46,XX	ADN/MET	equilibrada	normal	normal	46,XX

Abreviacions: MET: preparació cromosòmica metafàsica

4.3- MONOSOMIES I TRISOMIES PARCIALS AUTOSÒMIQUES

En la Taula 18 es resumeixen els resultats de monosomies i trisomies parcials que s'han definit aplicant la combinació de les diferents tècniques de citogenètica convencional i molecular. Concretament es detalla el cariotip del pacient, l'origen de l'anomalia cromosòmica (heretada o *de novo*) cromosòmica en cas de tenir la informació, el material del que es disposava per fer l'estudi, els resultats obtinguts amb les tècniques de CGH, HR-CGH, M-FISH, altres tècniques de FISH i MLPA, i finalment la fórmula cromosòmica tenint en compte tots els resultats globals obtinguts amb les diferents tècniques.

En total s'han detectat 20 monosomies parcials classificades en els grups:

- delecions terminals: casos MS-100, MS-130, MS-159 i MS-161
- delecions intersticials: casos MS-54 i MS-110
- anells: casos MS-120 i MS-179
- delecions críptiques: casos MS-79, MS-137, MS-153, MS-157, MS-163, MS-166, MS-172, MS-185 i MS-187
- translocacions desequilibrades críptiques: casos MS-45, MS-77 i MS-111

Per altra banda s'han detectat 21 casos amb trisomies parcials classificades en els següents grups:

- duplicació terminal: casos MS-47, MS-55, MS-63, MS-96, MS-99, MS-107, MS-170 i MS-195
- duplicació intersticial: casos MS-70, MS-104, MS-105, MS-105-G, MS-154 i MS-196
- duplicació críptica: cas MS-145
- translocació desequilibrada: casos MS-71, MS-72, MS-116, MS-135, MS-140 i MS-155

I finalment 8 casos amb combinació de trisomia i monosomia parcials:

- translocació desequilibrada observable: MS-46, MS-129 i MS-194
- translocació desequilibrada críptica: MS-65, MS-76, MS-88 i MS-181
- reorganització cromosòmica: cas MS-44

Els desequilibris detectats en el present estudi es mostren a la Figura 34. Les pèrdues de material genètic han implicat preferentment els cromosomes 2, 10, 11, 15 i 18.

Els guanys trobats implicaven més freqüentment els cromosomes 5, (3 casos), 9 (3 casos), 12 (3 casos) i 20 (5 casos) (Fig. 34).

En 5 dels casos (MS-63, MS-99, MS-116, MS-135 i MS-195) només s'ha pogut definir l'origen cromosòmic però no la regió cromosòmica implicada en el guany de material genètic ja que no es disposava d'ADN del cas, fet que ha impedit poder aplicar les tècniques de CGH i HR-CGH.

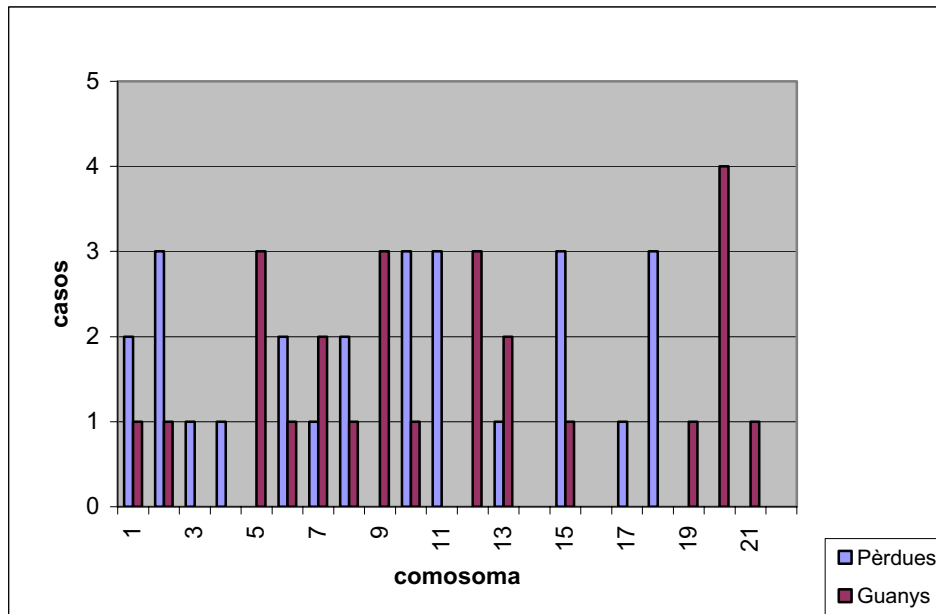


Fig.34- Cromosomes implicats en monosomies i trisomies parcials autosòmiques en el nostre estudi

Les imatges dels resultats descrits en aquest apartat es troben en l'annex.

Taula 18. Monosomies i trisomies autosòmiques parcials caracteritzades en el present estudi

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH*	MLPA	Fórmula cromosòmica final
MS-44	46,XX,add(2)(q37)	dn	ADN/ MET	enh(2)(q35q37.3)/ enh(2)(q34q37.2)	wcp2+	st 2q- 400C16(2q34)x2 129D2(2q35)x2 551D18(2q36.1)x2 467A18(2q36.2)x2 803F15(2q36.3)x2 534J17(2q37.1)x6 734G6(2q37.2)x2 315F22(2q37.3)-	P036B(del2qter) P19(del2qter)	46,XX,der(2)dup(2)(q34q37.2) del(2)(q37.3)
MS-45	46,XX,t(1;14)(p22.3;p11.2)	?	ADN/ MET	dim(1)(q22.3)?/ dim(1)(q22.3)	wcp1+ wcp14+	-	-	46,XX,t(1;14)(p22.3;p11.2) del(1)(p22.3p22.3)
MS-46	46,X,der(X)t(pX;20)(p11.2;?)	t(X;20) mat	ADN/ MET	dim(X)(p21p22.3), enh(20)(p11.2q13.3)	wcp20+	-	-	46,X,der(X;20) t(X;20)(p11.2;p11.2)
MS-47	46,XX,add(10)(q26.3)	dn	ADN/ MET	enh(10)(q24q26.3)	-	-	-	46,XX,dup(10)(q24q26.3)
MS-54	46,XY,del(7)(p?)	dn	ADN	dim(7)(p21)	-	-	-	46,XY,del(7)(p21p21)
MS-55	46,XX,add(5)(p15.3)	dn	ADN	enh(5)(p13.3p15.3)/ enh(5)(p14.1p15.3)	-	-	-	46,XX,dup(5)(p13.3p15.3)
MS-63	46,XX,add(2)(q37)	dn	MET	-	wcp2+	wcp2+	-	46,XX, dup(2)(?)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH*	MLPA	Fórmula cromosòmica final
MS-65	46,XY	t(10;20) mat	ADN/MET	dim(10)(q26), enh(20)(q13.2q13.3)/ dim(10)(q26), enh(20)(q13.2)	-	st 10q- st 20q+	P036B(del10qter) P19(del10qter) P20(dup20qter)	46,XY,der(10)t(10;20)(q26;q13.2)
MS-70	46,XY,dup(8)(p?)	?	ADN	enh(8)(p12p22)	-	wcp8+	-	46,XY,dup(8)(p12p22)
MS-71	46,XX,add(13)(p11.2)	dn	ADN/MET	enh(9)(p13.2p24.3)	-	wcp9+	-	46,XX,der(13)t(9;13)(p13.2;p11.2)
MS-72	46,XX,add(22)(p11.2)	dn	ADN/MET	enh(9)(p13.3p24.3)	wcp9+	-	-	46,XX,der(22)t(9;22)(p13.3;p11.2)
MS-76	46,XX	t(10;20) fam	ADN/MET	dim(10)(q26) enh(20)(q13.2)/ equilibrat	-	st 10q- st 20q+	P036B(del10qter) P19(del10qter) P20(dup20qter)	46,XX,der(10)t(10;20)(q26;q13.2)
MS-77	46,XY,t(8;18)(p11.2;p11.2) t(12;13)(q13;q12)	?	ADN	dim(18)(p11.2)	-	-	-	46,XY,t(8;18)(p11.2;p11.2)del(18)(p11.2) t(12;13)(q13;q12)
MS-79	46,XX	dn	ADN	equilibrat	-	-	P036B(del17pter) P20(del17pter)	46,XX,del(17)(p13.3)
MS-88	46,XY	t(7;8) mat	ADN/MET	dim(8)(p23.2p23.3), enh(7)(p22.3)/ dim(8)(p23.1p23.3)	wcp7+	18D5 (8p23.3)- 378A12 (8p23.2)- 813L8 (8p23.1)+ 776K3 (8p22)+ 713A20 (7p22.3)+	P036B(del8pter) P19(del8pter), (dup7pter)	46,XY,der(8)t(7;8)(p22.3;p23.2)
MS-96	46,XX,add(20)(p13)	?	ADN/MET	enh(20)(p11.2p13)	wcp20+	-	-	46,XX,dup(20)(p11.2p13)
MS-99	46,XX,add(8)(p23.3)	?	MET	-	wcp8+	-	-	46,XX,dup(8)(?)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH*	MLPA	Fórmula cromosòmica final
MS-100	46,XX,del(18)(q21)	?	ADN	dim(18)(q22q23)	-	-	-	46,XX,del(18)(q22)
MS-104	46,XX,dup(15)(q?)[20]/ 46,XX[42]	?	ADN	enh(15)(q24q26.2)/ enh(15)(q24.3q25)	-	arr cgh 15q24q26.2 (194N7->2288D3)x3	-	46,XX,dup(15)(q24q26.2)[20]/ 46,XX[42]
MS-105	46,XY, dup(13)(q14.3q22)	pat	ADN/MET	enh(13)(q21.1q22.3)/ enh(13)(q21.1q31.1)	-	172A19 (13q14.3)x1 10023 (13q21.1)x1 186A13 (13q21.1)x1 204N9 (13q21.1)x3 58K5(13q21.2)x3 168G22(13q21.31)x3 184B18 (13q21.33)x3 157E18 (13q22.1)x1 122K21 (13q22.2)x1 149J12(13q22.3) x1 276G3 (13q31.1)x1 210E23 (13q31.3)x1 172A19 (13q14.3)x1 10023 (13q21.1)x1 186A13 (13q21.1)x1 204N9 (13q21.1)x2 58K5 (13q21.2)x2 168G22 (13q21.31)x2 184B18 (13q21.33)x2 157E18 (13q22.1)x1 122K21 (13q22.2)x1 149J12(13q22.3)x1 276G3 (13q31.1)x1 210E23 (13q31.3)x1	-	46,XY,trp(13)(q21.1q21.33)
MS-105-G	46,XY, dup(13)(q21.2q22)	pat	ADN/MET	enh(13)(q21.1q21.3)/ enh(13)(q21.1q22.3)	-	168G22 (13q21.31)x2 184B18 (13q21.33)x2 157E18 (13q22.1)x1 122K21 (13q22.2)x1 149J12(13q22.3)x1 276G3 (13q31.1)x1 210E23 (13q31.3)x1	-	46,XY,dup(13)(q21.1q21.33)
MS-107	46,XX, add(5)(q35)[?]/ 46,XX[?]	?	ADN/MET	enh(5)(q23.1q35.3)/ enh(5)(q23.1q35.1)	wcp5+	-	-	46,XX, dup(5)(q23q35.?)[?]/46,XX[?]
MS-110	46,XY,del(6)(q?)	dn	ADN	dim(6)(q16.3q22.1)/ dim(6)(q16.3q22.2)	-	-	-	46,XY,del(6)(q16.3q22.?)
MS-111	46,XX,der(2) t(2;3)(q33;p21), der(3)t(2;3)inv(3)(?)	dn	ADN/MET	dim(2)(q36)?/ dim(2)(q36)	wcp2+, wcp3+	-	-	46,XX,der(2)t(2;3)(q33;p21), der(3)t(2;3)inv(3)(q36q2?3) del(2)(q36)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH*	MLPA	Fórmula cromosòmica final
MS-116	46,XY,add(10)(p15.3)	?	MET	-	wcp12+	wcp12+	-	46,XY,der(10)t(10;12)(p15.3;p11.1)
MS-120	46,XX,r(13)(q12q32)[33]/45,XX,-13[6]	?	ADN	dim(13)	-	-	-	46,XX,r(13)(q12q31)[33]/45,XX,-13[6]
MS-129	46,XX,add(X)(p22.2)	?	ADN/MET	enh(12)(p12p13), dim(X)(p22.3)/ enh(12)(p12p13)	wcp12+	-	-	46,X,der(X)t(X;12)(p22.2;p12.3)
MS-130	46,XX,del(18)(p11.2)	?	ADN	dim(18)(p11.2p11.3)	-	-	-	46,XX,del(18)(p11.2)
MS-135	46,XX,add(1)(p36.3)	?	MET	-	wcp20+	-	-	46,XX,der(1)t(1;20)(p36.3;?)
MS-137	46,XY	?	ADN/MET	equilibrada/ dim(15)(q13q14)	wcp15+	40J8 (15q13.2)+ 128A7(15q14)+, SNRPN-	-	46,XY,del(15)(q11.2q13.?)
MS-140	46,XY,add(16)(p13.3)	?	ADN/MET	enh(9)(p24)/ enh(9)(p23p24)	wcp9+	-	-	46,XY,der(16)t(9;16)(p23-24;p13.3)
MS-145	46,XY	?	ADN/MET	enh(6)(p12)	wcp6+	-	-	46,XY,dup(6)(p12p12)
MS-153	46,XX	dn	ADN/MET	dim(2)(q37)	-	st 2q -	P036B(del2qter) P19(del2qter)	46,XX,del(2)(q37)
MS-154	46,XX,dup(1)(q4?)	?	ADN	enh(1)(q41q42)	-	-	-	46,XX,dup(1)(q41q42)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH*	MLPA	Fórmula cromosòmica final
MS-155	46,XY,add(12)(?)	?	ADN	enh(19)(p13.3q13.2)/ enh(19)(p13.3)	-	-	-	46,XY,der(12)t(12;19)(?:p13.3)
MS-157	46,XX	?	ADN/MET	dim(8)(q23.3q24.1)	-	-	-	46,XX,del(8)(q23.3q24.1)
MS-159	46,XX, del(11)(q23.3)	dn	ADN/MET	dim(11)(q23.3q25)	-	-	-	46,XX,del(11)(q23.3)
MS-161	46,XX, del(11)(q23.3)	dn	ADN/MET	dim(11)(q24q25)	-	-	-	46,XX,del(11)(q24)
MS-163	46,XY	?	ADN/MET	dim(3)(p13)/ dim(3)(p13p14.2)	-	TUPLE1+	-	46,XY,del(3)(p13~14.2)
MS-166	46,XX	?	ADN/MET	equilibrat/ dim(11)(q22.3q23.3)	-	-	-	46,XX,del(11)(q22.3q23.3)
MS-170	46,XX, add(12)(p13.3)	?	ADN/MET	enh(12)(p13)	wcp12+	-	-	46,XX,dup(12)(p13)
MS-172	46,XY	?	ADN/MET	dim(4)(q33q35.2)	-	-	-	46,XY,del(4)(q33q35.2)
MS-179	46,XX,r(15) (p11.2q26.3)	dn	ADN/MET	equilibrat	-	89K11 (15q26.3)-	P036B(del 15qter) P20(del 15qter)	46,XX,r(15)(p11.2q26.3)
MS-181	46,XY	?	ADN/MET	enh(7)(p22.3?)/ equilibrat	-	713A20(7p22.3)+ 89K11(15q26.3)-	P036B(dup 7pter, del 15qter) P19(dup 7pter) P20(del 15qter)	46,XY,der(15)t(7;15)(p22.3;q26.3)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH*	MLPA	Fórmula cromosòmica final
MS-185	46,XX	?	ADN/MET	dim(1)(q31)/dim(1)(q25.3q31.3)	-	-	-	46,XX,del(1)(q31q31)
MS-187	46,XY	?	ADN/MET	dim(6)(q22)/dim(6)(q21q22)	-	-	-	46,XY,del(6)(q21~22)
MS-194	46,XX,add(10)(q26.3)	t(5;10)mat	ADN/MET	enh(5)(q33q35.3),dim(10)(q26)?/ enh(5)(q34q35.3)	wcp5+	st 10q-	-	46,XX,der(10) t(5;10)(q33~34;q26)
MS-195	46,XX,add(10)(p15.3)	dn	MET	-	wcp10+	-	-	46,XX,dup(10)(?)
MS-196	46,XY,dup(21)(q?)	?	ADN	enh(21)(q21)	-	-	-	46,XY,dup(21)(q21q21)

Abreviacions: *dim*: deleció, *enh*: guany, *wcp*: sonda de pintat cromosòmic, *st*: sonda subtelomèrica. *MET*: preparació cromosòmica metafàsica, *pat*: herència paterna, *mat*: herència materna, *fam*: herència familiar, *dn*: *de novo*

*En la columna de FISH s'ha indicat el resultat obtingut en el cromosoma anòmal

4.4- MONOSOMIES I TRISOMIES PARCIALS GONOSÒMIQUES

En la Taula 19 es resumeixen els resultats de monosomies i trisomies parcials que impliquen cromosomes sexuals. Aquestes s'han definit aplicant una combinació de les diferents tècniques de citogenètica convencional i molecular.

En total s'han detectat nou monosomies parcials que implicaven les bandes cromosòmiques: Xp22.3, Xp22.1p22.3, Xq21.3q26, Yq11.2q12, Xp11.4p22.3, Xp21p22.3, Xp22.3, Yq11.2q12 i Yq11.2q12.

I sis trisomies parcials que implicaven les bandes cromosòmiques: Xp22.3, Xq27q28, Yp11.3q11.2, Yp11.3q11.1, Yp11.2p11.3 i Yq11.2q12.

Pel que fa a l'origen de l'alteració cromosòmica, en dos casos eren heretades, concretament via materna i cinc eren *de novo*. En els tres casos restants no va ser possible disposar d'aquesta informació.

En tots els casos es va poder aplicar les tècniques de CGH i HR-CGH ja que es disposava d'ADN encara que en alguns casos no es va poder realitzar altres tècniques de FISH ja que no es disposava de material fixat en *carnoy*.

Taula 19- Monosomies i trisomies parcials gonosòmiques caracteritzades en el present estudi

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
MS-21	46,X,del(X)(p22.3)	mat	ADN	dim(X)(p22.3)	-	-	46,X,del(X)(p22.3)
MS-25	46,X,del(X)(p22.1)	t(X;16)mat	ADN	dim(X)(p22.1p22.3)	-	-	46,X,del(X)(p22.1)
MS-32	46,XX,del(X)(q24)	dn	ADN	dim(X)(q21.3q26)	-	-	46,X,del(X)(q21.3q26)
MS-56	46,X,add(Y)(p11.3)	dn	ADN	enh(X)(p22.3)	-	wcpX+	46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.3;p11.3)
MS-73	46,X,i(Y)(q11.2)[78]/ 46,XY[22]	dn	ADN/MET	enh(Y)(p11.3q11.2),dim(Y)(q11.2q12)/ enh(Y)(p11.3q11.2),dim(Y)(q11.23)	-	DYZ3(x2) DYZ1(-)	46,X, idic(Y)(q11.2)[78]/46,XY[22]
MS-91	45,X,del(Y)(q?)dn, der(14;15)(q10;q10)pat	dn pat	ADN/MET	dim(Y)(q11.2q12)/dim(Y)(q11.2q11.23)	wcpY+	-	45,X,del(Y)(q11.2q12)dn, der(14;15)(q10;q10)pat
MS-97	46,X,del(X)(p?)	?	ADN	dim(X)(p11.4p22.3),enh(X)(q27q28)	-	-	46,XX,der(X)del(X)(p11.4p22.3) dup(X)(q27q28)
MS-183	46,XY,i(Y)(q11.2)	?	ADN	dim(Y)(q11.2q12),enh(Y)(p11.3q11.1)/ dim(Y)(q11.2)	-	-	46,XY, idic(Y)(q11.1~11.2)
MS-184	46,XX	?	ADN/MET	enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+	wcpY+	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)
MS-197	46,XY,der(15)t(Y;15) (?; p11.2)	dn	ADN/MET	enh(Y)/enh(Y)(q11.2)	wcpY+	wcpY+	46,XY,der(15)t(Y;15)(q11.2;p11.2)

Abreviacions: *dim*: deleció, *enh*: guany, *wcp*: sonda de pintat cromosòmic, *MET*: preparació cromosòmica metafàsica, *mat*: herència materna, *pat*: herència paterna, *dn*: de novo, *DYZ3*: sonda centromèrica del cromosoma Y, *DYZ1*: sonda específica per l'heterocromatina del cromosoma Y, *i*: isocromosoma, *idic*: isocromosoma amb 2 centròmers

4.5-REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES APARENTEMENT EQUILIBRADES

En la Taula 20 es detallen els resultats dels casos amb reorganitzacions cromosòmiques aparentment equilibrades.

En total s'han estudiat quatre casos amb translocacions "aparentment" equilibrades. Els cromosomes implicats en les translocacions han estat el 1, 4, 5, 6, 7, 12, 19 i 21.

Concretament les translocacions trobades són:

- t(6;19)(p21.3;q13.4) cas MS-117
- t(5;6)(q13;p23) cas MS-118
- t(1;7)(q43;q22)t(2;6)(p25;q21) cas MS-134
- t(4;21;12)(p15.2;q22.3;p13.1) cas MS-147

En tres casos ha estat possible conèixer l'origen de l'alteració cromosòmica. En un cas la translocació era d'origen matern (MS-117) i en els altres dos era *de novo* (MS-118 i MS-147).

En dos dels casos (MS-134 i MS-147) no es va poder aplicar la tècnica de CGH ni la HR-CGH per tal de valorar si existien desequilibris en el genoma ja que no es disposava d'ADN.

Taula 20- Reorganitzacions cromosòmiques "aparentment" equilibrades analitzades en el nostre estudi

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/HR-CGH	M-FISH	Fórmula cromosòmica final
MS-117	46,XY,t(6;19)(p21.3;q13.4)	t(6;9)mat	ADN	equilibrada	-	46,XY,t(6;19)(p21.3;q13.4)
MS-118	46,XX,t(5;6)(q13;p23)	dn	ADN	equilibrada	-	46,XX,t(5;6)(q13;p23)
MS-134	46,XX,t(1;7)(q43;q22)t(2;6)(p25;q21)	dn	MET	-	der(1)(wcp1+,wcp7+) der(7)(wcp1+,wcp7+) der(2)(wcp2+,wcp6+) der(6)(wcp2+,wcp6+)	46,XX,t(1;7)(q43;q22),t(2;6)(p25;q21)
MS-147	46,XY,t(4;21;12)(p15.2;q22.3;p13.1)	dn	MET	-	der(4)(wcp4+,wcp12+) der(12)(wcp12+,wcp21+) der(21)(wcp21+,wcp4+)	46,XY,t(4;21;12)(p15.2;q22.3;p13.1)

Abreviacions: *wcp*: sonda de pintat cromosòmic, *MET*: preparació cromosòmica metafàsica, *mat*: herència materna, *dn*: *de novo*

4.6- CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS

A la Taula 21 es detallen els resultats obtinguts en els casos que presentaven un o varis cromosomes marcadors en el seu cariotip. Es descriuen els resultats obtinguts per citogenètica convencional, per CGH, HR-CGH, M-FISH i per altres tècniques de FISH. A més, també s'anomena l'origen del cromosoma marcador, *de novo* o heretat, en els casos en els que ha estat possible obtenir aquesta informació.

En total s'han analitzat 25 casos amb cromosomes marcadors supernumeraris dels quals el 32% (8/25) es presenten en mosaic. En quatre dels casos (MS-78, MS-138, MS-141 i MS-165) no ha estat possible saber l'origen del material genètic dels cromosomes marcadors presents en el cariotip ja que la CGH i HR-CGH han donat resultats equilibrats i/o no s'han pogut aplicar altres tècniques de FISH al no disposar de material fixat en *carney*. En el cas MS-138 sí que es disposava de material fixat en *carney* però les sondes de FISH utilitzades no van hibridar en cap dels cromosomes marcadors presents.

Els cromosomes implicats en la formació dels marcadors s'indiquen a la Figura 35. Els cromosomes marcadors identificats de més a menys freqüència han estat:

- derivatius del cromosoma 15: 8 casos (MS-30, MS-37, MS-50, MS-113, MS-114, MS-198, M-13 i M14)
- derivatis del cromosoma 13/21: 6 casos (MS-31, MS-36, MS-42, MS-42-M, MS-43, MS-82)
- derivatius del cromosoma 2: 1 cas (MS-188)
- derivatiu del cromosoma 3: 1 cas (MS-64)
- derivatiu del cromosoma 9: 1 cas (MS-106)
- derivatiu del cromosoma 11 i 22: 1 cas (MS-89)
- derivatiu del cromosoma 14: 1 cas (MS-103)
- derivatiu del cromosoma 20: 1 cas (MS-152)
- derivatiu del cromosoma X: 1 cas (MS-101)

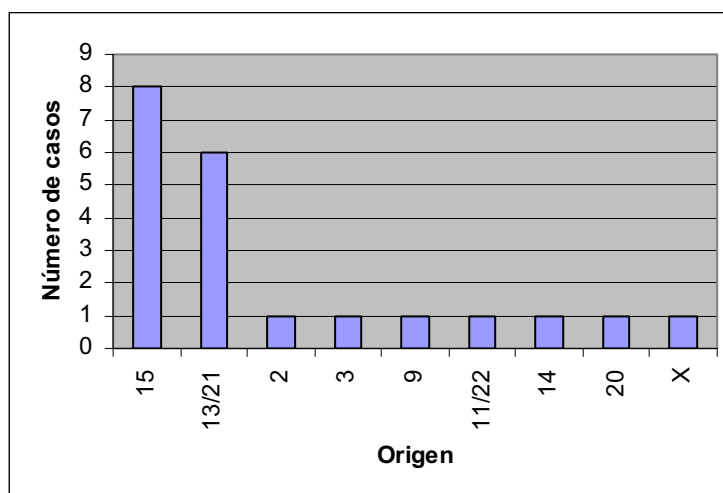


Fig.35- Cromosomes implicats en la formació de sSMC

Tenint en compte el contingut d'euromatina els casos s'han classificat en dos grups:

- amb euromatina: 9 casos
- sense euromatina: 12 casos

Els cromosomes marcadors amb euromatina impliquen les següents bandes/regions cromosòmiques: 2q12.1, 3?, 9p12q12, 11q23q25/22q11.2, 13q22q34, 15q26.1q26.3, 15q11.2, 20q13.2qter i Xp11.2.

Taula 21- Cromosomes marcadors supernumeraris caracteritzats en el present estudi

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
MS-30	47,XX,+mar	?	ADN/MET	equilibrat	-	cenM-FISH (cep15+), cep15+, MD54+, pcp15q-, 441B20-(15q11.2)	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)
MS-31	47,XY,+mar	?	ADN/MET	enh(14q11.2)?/ enh(14q11.2)	wcp14+?	cep13/21+, cep14/22-, cep15- cep22-, pcp13q-, MD54 +, 768a04-(13q12.1~12.2), PCP21q-, MD54+, vC067E3- (21q11.2)	47,XY,+del(13)(q11) or +del(21)(q11.1)
MS-36	47,XX,+mar	dn	ADN/MET	enh(13q22q34)	-	wcp13+	47,XX,+neo(13)(q22q34)
MS-37	47,XX,+mar	dn	ADN/MET	equilibrat?(cr.15?)/ equilibrat	-	cep15+ +, MD54+, pcp15q+, 441B20 - (15q11.2)	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)
MS-42	48,XY,+21,+mar	mat	ADN/MET	enh(21)	-	cep13/21+, cep14/22- pcp13q-,MD54+ +, 768a04-(13q12.1~12.2) pcp21q-, bC067E3-(21q11.2)	48,XY,+21,+ider(13)(p10) or +ider(21)(p10)
MS-42-M	48,XX,+2mar	pat	ADN/MET	-	-	cenM-FISH(cep13/21+) cep13/21+, pcp13q-, MD54 + +, 768a04-(13q12.1~12.2), pcp21q-, bC067E3-(21q11.2)	48,XY,+ider(13)(p10)x2 or +ider(21)(p10)x2

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
MS-43	47,XY,+mar	mat	ADN/MET	equilibrat	-	cep13/21+, pcp13q-, MD54++ 768a04-(13q12.1-12.2), pcp21q-, bC067E3-(21q11.2)	47,XY,+ider(13)(p10) or +ider(21)(p10)
MS-50	47,XY,+mar[35]/46,XY[65]	dn	ADN/MET	enh(15)(q26.1q26.3)/equilibrat	wcp15+	cep15-, 63A23++(15q26.1), 80F4++(15q26.3), 89K11++(15q26.3), 361M10-(15q24.1), 10K12-(15q24.3), 7M10-(15q25.3)	47,XY,+neo(15)(q26.1q26.3)[65]/ 46,XY[35]
MS-64	47,XX,+mar[30]/46,XX[14]	dn	MET	-	wcp3+	wcp3+, wcp13-	47,XX,+mar.ish der(3)(wcp3+)[30]/46,XX[14]
MS-78	47,XX,+mar[35]/46,XX[8]	?	ADN	equilibrat	-	-	47,XX,+mar[35]/46,XX[8]
MS-82	47,XX,+mar[12]/46,XX[6]	?	ADN/MET	equilibrat	-	cenM-FISH(cep13/21+) cep13/21+, pcp13q-, MD54 ++, 768a04-(13q12.1-12.2) pcp21q-, bC067E3-(21q11.2)	47,XX,+ider(13)(p10) or +ider(21)(p10)[12]/46,XX[6]
MS-89	47,XX,+mar	?	ADN	enh(11)(q23q25)	-	TUPLE1+,ARSA-	47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)
MS-101	47,XY,+mar	dn	ADN/MET	enh(X)(p11.2q13)/equilibrat	wcpX+	cepX+/++, pcpXp+/-, wcpX+, 465B24+/- (Xp11.2), 159A1-(Xq12)	47,XY,+der(X)(:p11.?3->q10::p?->p?):[1]/47,XY,+der(X)(:p11.1->q11.1:)[2]/47,XY,+der(X)(:p11.2?2->q11.1::q11.1->p11.1:)[4]/47,XY,+der(X)(:p11.1-q11.1::q11.1->p11.1:)[6]
MS-103	47,XY,+mar	?	ADN/MET	equilibrat	-	cenMFISH (cep14/22++), cep14/22+++,cep22-, pcp14q-, MD54++, 332N6-(14q11.2), 115F6-(22q11.2)	47,XY,+inv dup(14)(q11.1)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
MS-106	47,XX,+mar[18]/ 46,XX[42]	dn	ADN/MET	equilibrat	wcp9+	cep9+/++, pcp9p+, bA128P23+(9p12), bA430C15-(9q13), MD18+/++(9q12)	47,XX,+der(9)(:p12->q12:)[3]/ 47,XX,+der(9)(:p12->q12::q12->p12:)[4]/ 47,XX,+r(9)(::p12->q12::)[2]/ 48,XX,+r(9)(:p12->q12::p12->q12::)[1]x2/ 46,XX[18]
MS-113	47,XX,+mar[70]/ 46,XX[30]	dn	ADN/MET	equilibrat	-	cenM-FISH (cep15+), cep15++, MD54++, pcp15q-, 441B20 - (15q11.2)	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)[70]/46,XX[30]
MS-114	47,XX,+mar	dn	MET	-	wcp15+	D15Z1++,SRPN-, MD54 ++, pcp15q+, 441B20 +(15q11.2)	47,XX,+inv dup(15)(q11.2)
MS-138	47~53,XY,+1~7mar[?]/ 46,XY[?]	?	ADN/MET	equilibrat	-	D15Z1-,SRPN-,cenMFISH?, cep1-,cep2-,cep4-, cep5- cep13-, cep16-, cep19-,cep21-	47~53,XY,+1~7mar[?].ish der(?) (D15Z1-,SRPN-, CEP1-,CEP2-CEP4-, CEP5-,CEP13-, CEP16-, CEP19-,CEP21-)[?]/46,XY[?]
MS-141	47,XY,+mar[13]/ 46,XY[8]	dn	ADN	equilibrat	-	-	47,XY,+mar[13]/46,XY[8]
MS-152	47,XY,+mar	?	ADN/MET	enh(20)(q13.2qter)	wcp20+	-	47,XY,+neo(20)(q13.2q13.3)
MS-165	47,XX,+mar[50]/ 46,XX[50]	dn	ADN	enh(17)(p11.1 p12)	-	wcp17-	47,XX,+mar[50].ish der(?) (wcp17-)[50]/46,XX[50]
MS-188	47,XY,+mar[30]/ 46,XY[70]	dn	ADN/MET	equilibrat	wcp2+	cep2+, wcp2+, pcp2q+, 882D5-(2p11.2), 809e8+(2q11.2), 765E4-(2q12), 820C10-(2q12q13)	47,XY,+der(2)del(2)(p11.1)del(2)(q12.1)[30]/ 46,XY[70]

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	M-FISH	FISH*	Fórmula cromosòmica final
MS-198	48,XY,+2mar	?	ADN	enh(15)(q11.2q12)	-	-	48,XY,+2mar.rev ish enh(15)(q11.2q12)
M-13	47,XX,+mar	?	ADN/MET	equilibrat	wcp15+?	D15Z1++,SRPN-,MD54++, pcp15q-, 441B20 -(15q11.2)	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)
M-14	48,XY,+2mar	mat	ADN/MET	equilibrat	wcp15+?	D15Z1++,SRPN-,MD54 ++, pcp15q-, 441B20-(15q11.2)	48,XY,+inv dup(15)(q11.1)x2

Abreviacions: enh: guany, wcp: sonda de pintat cromosòmic, pcp: pintat cromosòmic d'un dels braços del cromosoma, MET: preparació cromosòmica metafàsica,

mat: herència materna, pat:herència paterna , dn: de novo, MD54: sonda específica pels braços curts dels cromosomes acrocèntrics

* En la columna de FISH s'ha indicat el resultat obtingut en el cromosoma marcador

5. DISCUSSIÓ

5- DISCUSSIÓ

5.1- AVANTATGES I LIMITACIONS DE LES DIFERENTS TÈCNiques CITOGENÈTIQUES UTILITZADES

L'aparició de tècniques de citogenètica molecular ha permès identificar anomalies cromosòmiques que amb tècniques convencionals (bandes G) passaven desapercebudes o no es podien arribar a caracteritzar.

En el nostre treball hem utilitzat moltes d'aquestes tècniques per arribar a identificar el màxim d'anomalies cromosòmiques presents en individus afectes de retinoblastoma, amb malformacions congènites o problemes de fertilitat.

Entre aquestes tècniques destaquen: la CGH (Kallioniemi i col. 1992), la HR-CGH (Kirchhoff i col. 1998) i la MLPA (Shouten i col. 2002) que hem aplicat quan disposàvem d'ADN i la tècnica de *multiplex* FISH de 24 colors (M-FISH) (Speicher i col. 1996), la cenM-FISH (Nietzel i col. 2001) i la subcenM-FISH (Starke i col. 2003) quan teníem suspensió cel·lular.

Sempre que ha estat possible s'han utilitzat les metodologies més adients en cada cas. A continuació discutirem les avantatges/limitacions de les diverses tècniques.

5.1.1- CGH vs. HR-CGH

La primera aplicació de la tècnica de CGH va estar dirigida a l'estudi de tumors ja que aquesta nova metodologia permetia la determinació dels desequilibris del genoma amb una resolució de 10-20Mb sense requerir ni el cultiu de cèl·lules tumorals ni la preparació d'extensions cromosòmiques (Kallioniemi i col. 1994). Més tard es va estendre a l'estudi d'anomalies constitucionals.

Posteriorment, es va desenvolupar un nou software conegut com HR-CGH que va incrementar en tres vegades la sensibilitat i resolució de la tècnica (Kirchhoff i col. 1998). Encara que també s'ha dit que la resolució depèn de la regió implicada degut a les diferents condicions d'hibridació que es poden donar degut a la diferent composició de les bandes cromosòmiques (ex. zones repetitives en el cromosoma 22q) (Schoumans i col. 2004).

Abans d'analitzar anomalies cromosòmiques constitucionals, es va realitzar un estudi comparatiu utilitzant ambdues metodologies (CGH convencional i HR-CGH) en mostres de retinoblastoma. Per tal d'avaluar i comparar els resultats obtinguts per la CGH i la HR-CGH vàrem estudiar 10 tumors de retinoblastoma. Cal destacar que fins aquell moment no existia cap estudi comparatiu detallat d'aquest tipus. Es van utilitzar mostres de tumor ja que en aquestes normalment es presenten molts desequilibris fet que donaria més dades per a fer una millor comparació entre els dos softwares.

Per tal de comparar els dos softwares era imprescindible conèixer els "criteris d'acceptació dels desequilibris del genoma" en cada un d'ells.

Quan s'analitzen les mostres utilitzant la CGH es pot tenir, o no, en compte l'interval de confiança mentre que en la HR-CGH sempre es té en compte aquest interval de confiança. Bàsicament tindríem:

- CGH convencional sense interval de confiança: s'accepta un desequilibri com "guany" si la zona del perfil es superposa o sobrepassa el límit que representa 1,25. S'accepta com "pèrdua" si el perfil es superposa o sobrepassa el 0,75. Aquests van ésser els criteris inicials d'aquesta tècnica (Kallioniemi et al, 1994). Fig.36A
- CGH convencional amb interval de confiança: es considera com desequilibri cromosòmic la zona en que l'interval de confiança del 95% no s'inclou en el límit entre 1,25-0,75. Aquest anàlisi és objectiu doncs és el propi software qui el defineix. Fig.36B
- HR-CGH: es considera desequilibri del genoma si l'interval al 99,5% de confiança de la mitjana dels perfils de la mostra estudiada (línia de color marró) no es sobreposa amb l'interval 99.5% de confiança de referència (línia de color negra) si s'han analitzat fins a 15 metafases. L'interval de confiança pot ser del 99.9% si el nombre de metafases es superior a 15. Fig.36C

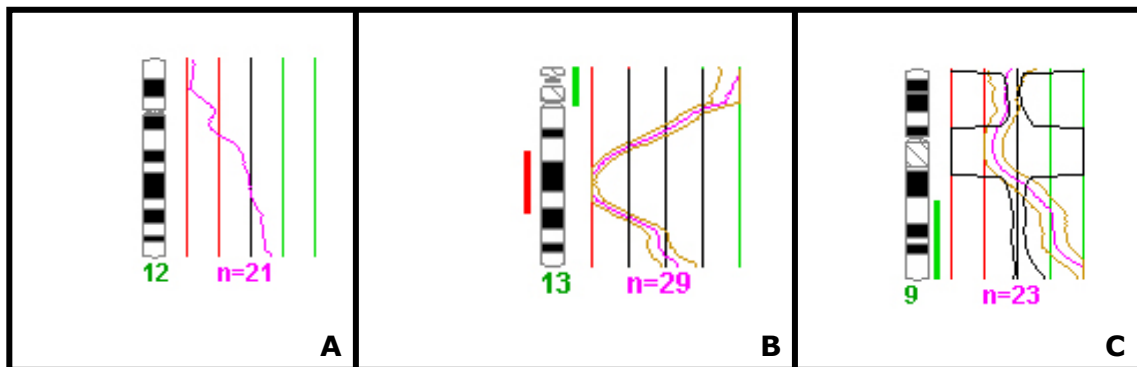


Fig.36- Perfils de CGH obtinguts d'acord amb els diferents criteris d'acceptació. a) Deleció de la regió 12q13pter detectada per CGH convencional sense interval de confiança; b) Deleció de la regió 13q14.2q31.1 detectada per CGH convencional amb interval de confiança del 95%; c) Deleció de la regió 9q22qter detectada per HR-CGH al 99,5% al analitzar-se menys de 15 metafases (s'han analitzat 23 cromosomes).

5.1.1.1 – Estudi en mostres de retinoblastoma

Per tal d'analitzar l'eficiència i les limitacions en la detecció de desequilibris del genoma de la HR-CGH i CGH convencional hem avaluat dos paràmetres:

- Freqüència dels desequilibris detectats
- Grau de coincidència i discrepància

Al comparar les freqüències totals dels desequilibris del genoma detectats en els 10 tumors obtinguts per la HR-CGH al 99.5% i CGH convencional (amb o sense els intervals de confiança), no s'observen variacions significatives pels guanys ($p > 0,05$). Però en canvi, al comparar els resultats obtinguts amb els dos criteris de CGH convencional sí que es troben diferències significatives ($p < 0,05$).

En el cas de les pèrdues (que són molt més nombroses en la HR-CGH que amb la CGH convencional amb els dos criteris d'acceptació) sí que s'han trobat diferències significatives al comparar la HR-CGH amb CGH convencional (amb o sense interval de confiança) ($p < 0,05$). No s'han detectat diferències en el nivell de pèrdues detectades amb els dos criteris per CGH convencional ($p > 0,05$). Una possible explicació de l'alt nombre de pèrdues detectades per HR-CGH (no detectades per CGH convencional) podria ser que en realitat es tractessin de falsos positius però segons Kirchhoff i col. (2001b) els falsos positius en la HR-CGH són molt rars. Altres grups també han descrit aquest mateixos resultats (Kristensen i col. 2003; Vranova i col. 2007).

Taula 22. Nombre de desequilibris genòmics detectats en els deu tumors de retinoblastoma utilitzant els softwares de CGH i HR-CGH

Cas	Guany			Pèrdua		
	CGH sense intervals	CGH amb intervals	HR-CGH 99.5%	CGH sense intervals	CGH amb intervals	HR-CGH 99,5%
1	6	6	5	0	0	27
2	9	3	0	0	0	3
3	6	1	2	0	0	8
4	12	5	7	5	5	5
5	6	6	8	3	1	7
6	4	0	2	0	0	1
7	12	13	15	8	3	17
8	12	7	7	2	2	3
9	6	5	6	0	0	15
10	7	5	8	4	2	6
Totals	80	51	60	22	13	92

Si comparem cas per cas els guanys i les pèrdues detectades per aquests softwares, mitjançant un anàlisi de variància, els resultats (Fig.37) mostren que:

a) les tres metodologies són diferents entre elles. En relació als guanys les dues CGH convencionals són molt diferents i en el cas de les pèrdues la HR-CGH és molt diferent respecte les dues CGHs convencionals.

b) no existeixen interaccions en la detecció de guanys o pèrdues a utilitzant qualsevol de les tres metodologies.

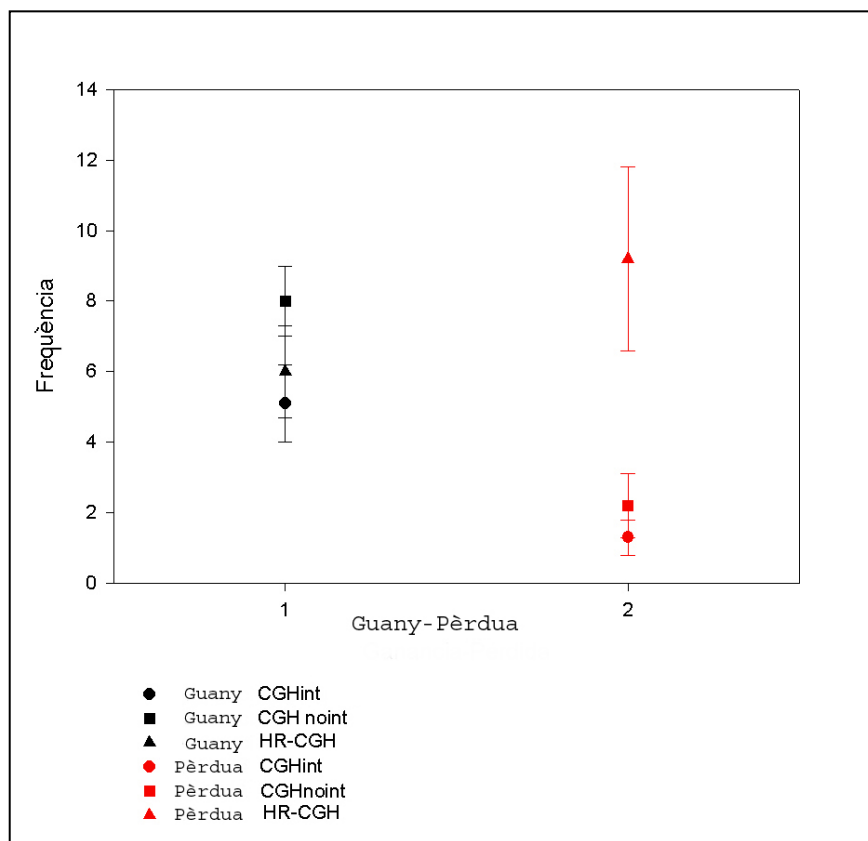


Fig.37- Representació gràfica de les diferències en la detecció de guanys i pèrdues mitjançant els tres criteris (HR-CGH, CGH amb interval de confiança i CGH sense interval de confiança).

Aquestes diferències han estat també descrites a la literatura, tal i com queda reflectit en els estudis de Kristensen i col. (2003) i de Vranova i col. (2007).

En el treball de Kristensen i col. (2003), realitzat en nens amb leucèmia limfoide aguda (ALL), es va aplicar la HR-CGH per analitzar els desequilibris del genoma i comparar les dades obtingudes amb les de bandes G i també comparar els seus resultats amb els d'altres autors que havien emprat la CGH. Les seves troballes evidencien que el nombre d'alteracions, sobretot les pèrdues, és significativament més baix al fer l'anàlisi amb la CGH. L'estudi de Vranova i col. (2007), en 18 pacients amb glioblastoma multiforme, al comparar els resultats obtinguts per CGH i HR-CGH evidencien un major nombre de desequilibris amb la HR-CGH (154 HR-CGH vs 78 en CGH).

Tots aquestes troballes, conjuntament amb les nostres, apuntarien a la utilitat de la HR-CGH per detectar desequilibris, principalment pèrdues, desapercebudes per la CGH convencional. Aquest fet és de molta importància per poder determinar regions cromosòmiques on es poden localitzar gens implicats en la tumorigènesi. Són molts els equips que han aplicat directament la HR-CGH per a l'estudi de mostres tumorals (Larsen i col. 2001; Ottensen i col. 2003, 2004; Bryndorf i col. 2004; Babicz i col. 2005; Zahn i col. 2006, Nygaard i col. 2006). Darrerament, la tècnica d'array-CGH que mostra més sensibilitat que la HR-CGH també s'ha aplicat en l'estudi de mostres tumorals (Reis-Filho i col. 2006).

Un altre aspecte a tenir en compte és el grau de coincidència i discrepància de les regions cromosòmiques amb desequilibris detectades per HR-CGH i CGH. Hem analitzat tant els guanys com les pèrdues detectades amb cadascun dels dos softwares.

- Anàlisi dels guanys (Taules 23 i 24 de l'annex).
 - Al comparar el grau de coincidència i discrepància entre els guanys detectats per CGH convencional (mitjançant els dos criteris d'acceptació) respecte els detectats per HR-CGH, s'observa que el grau de coincidència de les bandes és molt elevat, del 92%, si es compara HR-CGH i la CGH sense intervals de confiança. La coincidència baixa fins un 50% en el cas de comparar les dades obtingudes per HR-CGH i CGH amb intervals de confiança.
 - Al comparar aquestes mateixes dades a la inversa (és a dir, comparant els resultats obtinguts per HR-CGH respecte els obtinguts per CGH convencional mitjançant els dos criteris), s'observa que el grau de coincidència és del 64,8% comparant les bandes amb guany detectades per CGH sense intervals amb les de HR-CGH i del 75% si es comparen les dades obtingudes per CGH amb interval de confiança amb la HR-CGH.
- Anàlisi de les pèrdues (Taules 25 i 26 de l'annex).
 - El grau de coincidència quan es comparen les pèrdues obtingudes per CGH amb interval de confiança respecte la HR-CGH són del 34% i d'un 50% al comparar les de CGH sense l'interval i les de HR-CGH.
 - Al comparar aquestes mateixes dades a la inversa, s'observa que el grau de coincidència de les pèrdues detectades per HR-CGH respecte CGH és del 86,4% quan es compara la CGH sense interval de confiança i del 100% si es comparen amb les dades de CGH amb interval de confiança. No s'han considerat els casos en els que no s'han detectat pèrdues per CGH.

En resum, si ens fixem amb els resultats obtinguts per CGH convencional utilitzant els dos criteris d'acceptació s'arriba a la conclusió que és millor interpretar els resultats sense utilitzar intervals de confiança assumint que això implica un criteri subjectiu. Amb interval de confiança es perd molta informació.

5.1.1.2- Estudi en anomalies cromosòmiques constitucionals

Tots els casos candidats a presentar anomalies cromosòmiques constitucionals, inclosos en aquesta Tesi, s'han analitzat mitjançant els dos softwares de CGH i HR-CGH. S'han estudiat les mateixes metafases per a cada cas amb els dos softwares per tal de comprovar si els resultats concordaven entre ells. Pels motius esmentats en l'apartat anterior, en la CGH convencional no s'han utilitzat intervals de confiança per determinar els desequilibris. Sempre que ha estat possible, si els resultats no coincidien, s'ha avaluat el conjunt de les tècniques utilitzades i s'ha decidit quin dels dos resultats, els de la CGH o HR-CGH, s'adequava més.

És interessant destacar que en els anàlisis per HR-CGH, els intervals de confiança de referència que s'utilitzen per determinar els desequilibris són especialment amples en regions que s'han descrit "conflictives" en experiments de CGH com són: (i) les zones centromèriques i d'heterocromatina per l'alt contingut en seqüències repetitives i (ii) les zones telomèriques que mostren senyals d'intensitat variable. Aquest fet si bé, per una banda, és positiu ja que ens descarta "falsos positius" associats a aquestes regions, també podria donar lloc a l'aparició de "falsos negatius" degut a la major restricció de la HR-CGH. Schoumans i col. (2004) han relacionat aquest fet amb una disminució de la detecció d'anomalies en zones telomèriques i amb un increment en zones centromèriques. En la nostra sèrie també aquest fet s'ha pogut comprovar en el 3% (4/133) dels casos (MS-76, MS-88, MS-129 i MS-181).

Els intervals de confiança de referència de la HR-CGH també són més amples en regions específiques (cromosomes 1pter, 19 i 22) que per CGH convencional podien donar resultats erronis. En aquests cromosomes la sensibilitat de la HR-CGH serà més baixa encara que no s'hauran de descartar de l'anàlisi com passava en la CGH convencional.

En els casos MS-76, MS-88, MS-129 i MS-181 la tècnica de HR-CGH no detecta desequilibris que van ser determinats per la CGH convencional. Cal destacar que, en tots aquests casos, els desequilibris estaven localitzats a les zones terminals dels cromosomes. Els falsos negatius obtinguts per la HR-CGH es poden deure al fet que els intervals de confiança de referència en les zones telomèriques són especialment amplis per evitar falsos positius. Els estudis de Martínez-Ramírez i col. (2005), Kirchoff i col. (2004) i Ness i col. (2002) són exemples on s'observa la baixa sensibilitat de la tècnica de HR-CGH per detectar alteracions subtelomèriques.

La HR-CGH tampoc ha detectat cap desequilibri en el genoma en una mostra amb un cromosoma marcador supernumerari (MS-50) mentre que la CGH convencional revela un guany a la banda terminal de 15q. Per M-FISH i BACs es va confirmar que el cromosoma marcador derivava del cromosoma 15. Aquest fals negatiu també es pot explicar pel fet que el desequilibri es localitzés a la part terminal del cromosoma i a més el cromosoma marcador es trobés en mosaic.

En alguns casos (MS-104, MS-105, MS-105-G, MS-185 i MS-194) totes dues tècniques han detectat un desequilibri en el genoma en la mateixa regió cromosòmica però no implicant les mateixes bandes. En aquests, la HR-CGH ha detectat desequilibris més grans que la CGH convencional. Al comparar els resultats obtingut per la CGH i la HR-CGH amb les bandes G i/o

els resultats obtinguts amb BACs s'observa que en aquests casos la CGH convencional s'ajusta més als resultats obtinguts per les altres tècniques.

Per altra banda, també hi ha casos on s'ha mostrat més sensible la HR-CGH respecte la CGH convencional (MS-44, MS-45 i MS-111). En el cas MS-44 el guany detectat per la HR-CGH s'ajusta més als resultats obtinguts pels BACs que la CGH convencional. I en els casos MS-45 i MS-111 la HR-CGH va detectar una pèrdua just en el punt de trencament de les reorganitzacions presents en aquests casos, mentre que la CGH convencional no arribava a detectar la pèrdua, només s'intuïa. Lespinasse i col. (2004) van descriure un cas que presentava una reorganització cromosòmica complexa i la HR-CGH va identificar una microdeleció localitzada en la mateixa banda que un dels punts de trencament implicats en la reorganització. També Borg i col. (2006), gràcies a l'aplicació de la HR-CGH, van poder determinar una deleció en el punt de trencament d'una translocació aparentment equilibrada. Aquests estudis, juntament amb els nostres, suggereixen que la HR-CGH pot ésser una tècnica adequada per estudiar reorganitzacions cromosòmiques aparentment equilibrades.

En el nostre estudi s'han detectat cinc casos que presentaven desequilibris del genoma que implicaven el cromosoma Y. En tres casos (MS-73, MS-183 i MS-197) hi ha discordances en els resultats obtinguts per CGH i per HR-CGH. En dos d'ells (cas MS-73 i MS-183) els resultats obtinguts per CGH han resultat més fiables que els de HR-CGH. Per contra, en el cas MS-197, els resultats obtinguts per la HR-CGH és més fiable que el de CGH. Aquestes troballes indiquen que quan els perfils de CGH/HR-CGH suggereixen alteracions del cromosoma Y s'han d'interpretar amb molta precaució ja que el gran bloc d'heterocromatina que conté pot fer desviar els perfils i dificultar la interpretació dels resultats. Això es complica enormement quan es tracta de mosaics.

És interessant destacar que gràcies a la HR-CGH s'ha detectat un guany en el cromosoma 19 (MS-155). Aquest fet cal remarcar-ho ja que els guanys detectats en el cromosoma 19 per CGH convencional no són fiables (ja que és un dels cromosomes conflictius en la interpretació), en canvi en la HR-CGH aquest cromosoma no s'exclou de l'anàlisi.

S'han detectat per HR-CGH dos casos amb pèrdues críptiques, no detectades per bandes G ni per la CGH convencional (MS-137 i MS-166) mostrant la major sensibilitat d'aquesta en regions cromosòmiques intersticials. Kirchhoff i col. (2004) van descriure un estudi on es posava de manifest el gran potencial de la HR-CGH per detectar deleccions intersticials prèviament no detectades per bandes G. En un dels casos (MS-137), la regió perduda correspon a la regió de la síndrome de Prader-Willi/Angelman. Altres autors com Kirchhoff i col. (1998) han descrit deleccions detectades per HR-CGH, que no s'havien detectat per CGH convencional, associades a la síndrome d'Angelman d'una grandària de 4 Mb.

D'acord amb l'anàlisi realitzat, en general, podem considerar que si existeix discordança entre els resultats obtinguts per CGH convencional i els de HR-CGH són més fiables els obtinguts per CGH convencional. No obstant, en alguns casos, la HR-CGH és més potent que la CGH convencional com per exemple en l'anàlisi de translocacions recíproques (o de reorganitzacions cromosòmiques complexes) aparentment equilibrades, de la detecció de

microdelecions intersticials o quan l'alteració cromosòmica impliqui els cromosomes 1pter, 19 o el 22.

5.1.2- Array-CGH vs. CGH

La tècnica d'array-CGH té un gran avantatge si la comparem amb la CGH ja que permet definir amb molta més precisió on es troben els punts de trencament de la regió implicada en el desequilibri. Però, l'array-CGH mostra també desavantatges respecte la CGH convencional en l'aspecte econòmic, els resultats són més difícils d'interpretar i a més els resultats obtinguts sovint requereixen verificacions ja que moltes vegades es detecten desequilibris de significació desconeguda que poden ser variacions en nombre de còpies de seqüències d'ADN (CNV) sense significació clínica (Iafrate i col. 2004). Tot això fa que actualment sigui una tècnica molt més inaccessible pels laboratoris de diagnòstic. No obstant, recentment, aquesta tècnica s'està aplicant en molts estudis de pacients amb retard mental i/o malformacions congènites (Menten i col. 2006) i es preveu que en un futur es redueixin les desavantatges econòmiques i d'interpretació i es pugui aplicar més àmpliament.

En la nostra sèrie, la tècnica d'array-CGH només es va aplicar en un cas (MS-104). En aquesta mostra la tècnica de CGH havia revelat una duplicació de la regió 15q24.3q26 sense implicar la zona subtelomèrica. En canvi la HR-CGH havia determinat al guany de 15q24.3q25. Amb l'aplicació posterior de l'array-CGH específic pel cromosoma 15 compost de 1.112 clons de BACs i una resolució de 87.5Kb es va poder determinar que la regió implicada en el desequilibri era la 15q24.3q26.2 coincidint així amb els resultats de la CGH. A més es va poder determinar que el punt de trencament proximal es trobava entre els clons RP11-26819 i RP11-194N7 i el punt de trencament distal entre els clons CTD-2288D3 i RP11-294N24.

5.1.3- HR-CGH vs. MLPA

En els últims anys l'aplicació de diferents metodologies de citogenètica molecular (FISH, CGH, MLPA,...) ha permès la caracterització de desequilibris críptics en les regions subtelomèriques, especialment en pacients amb retard mental, malformacions congènites i/o trets dismòrfics que aparentment presentaven un cariotip normal (Flint i col 1995; Ness i col. 2002; Koolen i col. 2004; Soogard i col. 2005; Lam i col. 2006; Palomares i col. 2006; Kirchhoff i col. 2001, 2004, 2007).

En aquest treball s'han utilitzat paral·lelament les tècniques de HR-CGH i MLPA específica per a l'anàlisi de regions subtelomèriques en 39 casos de pacients amb trets dismòrfics, malformacions congènites i/o retard mental i cariotip normal per tal de comparar el potencial de les dues tècniques en la detecció i caracterització de desequilibris subtelomèrics críptics. (Taula 17 de l'apartat de resultats i els casos MS-65, MS-76, MS-79, MS-88, MS-153 i MS-181).

A l'utilitzar la HR-CGH es va determinar que un 7,7% (3/39) dels pacients eren portadors d'anomalies subtelomèriques desequilibrades. Els resultats de MLPA, en canvi, van determinar un nombre molt més gran de desequilibris subtelomèrics en aquests pacients (15,4%: 6/39).

Tots els resultats han estat confirmats amb la posterior aplicació de FISH utilitzant o bé sondes subtelomèriques comercials o BACs. En realitat, tenint en compte que dos casos (MS-65 i MS-76) són membres d'una mateixa família la freqüència d'alteracions subtelomèriques seria: 7,9% (3/38) per la HR-CGH i del 13,2% (5/38) per la MLPA. Les freqüències d'alteracions subtelomèriques trobades en el nostre grup de 38 pacients estan dins dels límits del 4%-28% descrits prèviament per diferents autors (de Vries i col. 2003; Novelli i col. 2004; Soogard i col. 2005; Northrop i col. 2005).

Al comparar la incidència de desequilibris genòmics detectats per HR-CGH i MLPA s'observa que les pèrdues són més freqüents que els guanys. Aquesta dada coincideix amb estudis publicats prèviament (Anderlid i col. 2002; Kirchhoff i col. 2004; Roberts i col. 2004; Palomares i col. 2006). S'han descrit relativament poques microduplicacions associades a un fenotip ben definit (Kirchhoff i col. 2007). El fenotip lligat a microduplicacions sembla ser més lleu que el lligat a microdeleccions, aquesta sembla ser la causa per la que en estudis de pacients que presenten retard mental i/o malformacions congènites es detectin amb més freqüència microdeleccions que microduplicacions.

Taula 27- Desequilibris cromosòmics detectats per les tècniques de HR-CGH, MLPA i FISH

Cas	Cariotip	HR-CGH	MLPA	Sonda subtelomèrica	Anàlisi retrospectiu del cariotip
MS-65	46,XY	dim (10q26) / enh (20q13.2)	del(10q subtel), dup(20q subtel)	del (10q subtel) dup(20q subtel)	–
MS-76	46,XX	equilibrada	del(10q subtel) dup(20q subtel)	del (10q subtel) dup(20q subtel)	–
MS-79	46,XX	equilibrada	del(17p subtel)	del(17p)	–
MS-88	46,XY	dim (8p23.1p23.3)	dup(7p subtel) del(8p subtel)	dup(7p subtel) del(8p subtel)	46,XY,del(8)(p23)
MS-153	46,XX	dim(2q37)	del (2q subtel)	del (2q subtel)	46,XX,del(2)(q37)
MS-181	46,XY	equilibrada	dup(7p subtel) del(15q subtel)	dup(7p subtel) del(15q subtel)	–

Abreviacions: dim, del: pèrdua, enh, dup: guany, subtel: subtelòmer

En el nostre estudi hem detectat deleccions subtelomèriques en les regions 2q (cas MS-153), 8p (cas MS-88), 10q (casos MS-65 i MS-76), 15q (cas MS-181) i 17p (cas MS-79). Aquestes mateixes deleccions han estat també descrites freqüentment en altres estudis (Anderlid i col. 2002; Kok i col. 2005; Soogard i col. 2005; Palomares i col. 2006; Lam i col. 2006).

Contràriament les duplicacions subtelomèriques no s'han descrit tan sovint, potser pel fet, com hem esmentat anteriorment, que les duplicacions solen tenir un impacte més lleu sobre la clínica i poden passar més desapercebudes. I també pel fet que les duplicacions són més difícils de caracteritzar per tècniques de FISH. En el nostre estudi vam determinar

duplicacions subtelomèriques en les regions cromosòmiques 7p i 20q que també han estat descrites prèviament (Fan i col. 2001; Anderlid i col. 2002).

Knight i col. (1999) van descriure que aproximadament la meitat dels casos que presentaven alteracions subtelomèriques tenien origen familiar. En el nostre estudi, dos casos (MS-65 i MS-76), portadors de la deleció subtelomèrica 10q i la duplicació 20q, són membres de la mateixa família (nebot i tia). En uns altres dos casos, les alteracions detectades tenen origen familiar que ha estat confirmat (MS-88) o que es sospita (MS-181) ja que presenta una monosomia parcial acompanyada d'una trisomia parcial conseqüència de la presència d'un cromosoma 15 derivatiu que probablement hauria heretat d'un dels pares portador d'una translocació equilibrada, encara que no va ser possible provar-ho degut a la impossibilitat d'obtenir mostra dels pares. La resta d'alteracions detectades en el nostre estudi són *de novo*.

Hem detectat una elevada sensibilitat en la detecció de desequilibris subtelomèrics críptics de la tècnica de MLPA al comparar-la amb la HR-CGH. Un 60% (6/10) de les alteracions subtelomèriques no es van detectar per la HR-CGH (MS-76, MS-79, MS-88 i MS-181). Només dues de les alteracions (MS-88 i MS-153) es van poder visualitzar en un estudi retrospectiu de bandes G (deleció subtelomèrica 8p en el cas MS-88 i la deleció de 2q37 en el cas MS-153). En aquests dos casos la HR-CGH havia detectat l'alteració. Determinades alteracions cromosòmiques detectades per HR-CGH (i que prèviament havien passat desapercibudes per bandes G) en un estudi retrospectiu de bandes G es poden apreciar i és probable que algunes de les anomalies detectades per HR-CGH (les més grans) s'haguessin vist amb bandes d'alta resolució (Kirchhoff i col. 2004). El diferent grau de detecció d'alteracions subtelomèriques comparant les dues tècniques podria explicar-se per la mida de la deleció o duplicació. La HR-CGH té una resolució d'aproximadament 3Mb, per tant només podem detectar anomalies que impliquin delecions o duplicacions iguals o més grans.

Els nostres resultats també mostren que la CGH convencional és millor respecte a la HR-CGH per la detecció d'alteracions subtelomèriques. Així per exemple en el cas MS-76 la HR-CGH no va detectar cap desequilibri, per contra, la CGH convencional sí que mostrava desequilibris en les regions terminals 10q i 20q que després van ser observades per la tècnica de MLPA. En el cas MS-88 la HR-CGH no va determinar el guany en la regió subtelomèrica 7p que després es va caracteritzar per MLPA; en canvi els perfils de la CGH feien sospitar de l'existència d'aquest desequilibri. El mateix va passar en el cas MS-181 pel guany en la mateixa regió cromosòmica.

Així doncs, els dos mètodes, MLPA i HR-CGH, requereixen la confirmació dels resultats per altres tècniques i a més totes dues comparteixen la limitació que no detecten alteracions equilibrades. La tècnica de MLPA, basada en PCR, permet processar un gran nombre de mostres simultàniament i el cost és baix. En canvi, la HR-CGH té un alt cost en els reactius i el temps que s'ha d'invertir en l'experimental és més gran si es compara amb el que es requereix per la MLPA (Palomares i col. 2006). No obstant, l'anàlisi de MLPA només està confinat a les regions subtelomèriques mentre que amb la HR-CGH s'analitza tot el genoma, encara que sigui amb una resolució més baixa.

En conclusió, el nostre estudi confirma la importància de la tècnica de MLPA per a una millor detecció i caracterització d'anomalies subtelomèriques i suggereix que aquesta

metodologia s'hauria d'utilitzar prèviament a l'anàlisi per HR-CGH. Malgrat això, en casos en els que no es detectin alteracions subtelomèriques per MLPA, l'estudi per HR-CGH seria recomanable per tal de descartar desequilibris intersticials. Darrerament, Kirchoff i col. (2007) també han suggerit que s'hauria d'aplicar la tècnica de MLPA prèviament a qualsevol altre tècnica basada en la CGH, en concret l'array-CGH.

5.1.4- M-FISH vs. cenM-FISH

Actualment, un dels reptes més importants de la citogenètica és la caracterització dels cromosomes marcadors. Les tècniques de M-FISH i de cenM-FISH han permès en molts casos assolir aquest repte. En aquesta Tesi, la sèrie de marcadors analitzats ha estat de 25 casos i per la seva caracterització s'han aplicat les dues metodologies a més de la CGH i HR-CGH.

La M-FISH permet visualitzar cada parella de cromosomes homòlegs d'un color característic, això fa possible esbrinar l'origen d'aquests cromosomes marcadors sempre que continguin material eucromàtic, ja que en la tècnica de M-FISH les regions d'heterocromatina, incloent les regions centromèriques, es bloquegen amb ADN COT1 i per tant queden excloses de l'anàlisi (Speicher i col. 1996).

Hem aplicat la M-FISH en els casos que disposàvem de material fixat en *carney* (80%: 20/ 25) dels casos. S'ha determinat, amb tota seguretat, l'origen cromosòmic del marcador en set casos (MS-50, MS-64, MS-101, MS-106, MS-114, MS-152 i MS-188) ja que tots ells presentaven eucromatina.

En el 15% (3/20) dels casos en els que s'ha aplicat la M-FISH, aquesta apuntava o feia sospitar de la implicació d'un cromosoma concret com origen del cromosoma marcador, encara que no es veia amb claredat. En aquest cas, es van aplicar les sondes específiques del cromosoma en qüestió i posteriorment la barreja de sondes de subcenM-FISH pel cromosoma. Excepte en un sol cas (MS-31), en la resta es van confirmar els resultats que apuntava la M-FISH. Els resultats de la M-FISH en aquest cas feien sospitar que el cromosoma marcador derivava del cromosoma 14 però posteriorment es va comprovar que l'origen d'aquest cromosoma marcador era el cromosoma 13 o 21 i que no contenia eucromatina, va ser doncs un fals positiu.

En sis casos (MS-30, MS-42-M, MS-82, MS-103, MS-113, MS-138), en què ni la M-FISH ni la CGH apuntaven a cap cromosoma en concret com origen del cromosoma marcador es va aplicar la tècnica de cenM-FISH. En cinc casos, excepte el MS-138, es va poder determinar l'origen del marcador que es va confirmar amb l'aplicació posterior de la subcenM-FISH específica per cada cromosoma. Aquesta sonda inclou les corresponents sondes centromèriques específiques, BAC contigu a la zona centromèrica, la sonda MD54 i la sonda de pintat cromosòmic pel braç llarg en els cas dels cromosomes acrocèntrics. En cap cas es va determinar eucromatina en el cromosoma marcador.

En cinc casos de la nostra sèrie (MS-31, MS-42, MS-42-M, MS-43 i MS-82), no s'ha pogut discernir si el cromosoma marcador provenia del cromosoma 13 o 21. Aquesta és la principal

limitació que presenta la cenM-FISH ja que no pot diferenciar entre els cromosomes marcadors derivats del cromosoma 13 i 21 pel fet que són reconeguts per les mateixes sondes ja que comparteixen el 99,7% de seqüències centromèriques (Maratou i col. 1999).

Per últim, cal esmentar que en el nostre estudi hem caracteritzat tres cromosomes marcadors amb neocentròmers (MS-36, MS-50 i MS-152). Una altra limitació que té la cenM-FISH és que no pot reconèixer aquestes regions (Nietzel i col. 2001). En canvi, la M-FISH en el cas de cromosomes neocèntrics permet determinar del seu origen ja que aquests cromosomes marcadors contenen eucromatina.

En resum, dels nostres resultats es poden treure dos conclusions: (a) que la tècnica de M-FISH es molt eficient en la caracterització de cromosomes marcadors si contenen eucromatina, i sobretot resulta de gran utilitat per a l'estudi dels cromosomes marcadors neocèntrics, i (b) que la tècnica de cenM-FISH, juntament amb la subcenM-FISH, són de gran utilitat per determinar l'origen dels cromosomes marcadors quan no contenen, o tenen molt poca, eucromatina ja que en aquests casos la M-FISH no es útil.

5.2- RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma (OMIM:RB1,+180200) és un tumor intraocular maligne infantil que apareix amb una freqüència de 1/15000-1/23000 nascuts vius (Vogel, 1979). És un dels pocs tumors que es desenvolupa com conseqüència de la inactivació d'un únic gen (*gen RB1*). Per a la manifestació de la malaltia s'han de produir dues mutacions ja que el gen *RB1* és un gen supressor de tumor i cal inactivar els dos al·lels perquè no faci la seva funció repressora. És a dir, en aquest tipus de tumors no hi ha síntesi de la proteïna RB, o bé és defectuosa, el que impedeix segrestar el factor de proliferació E2F i com conseqüència es produeix una proliferació sense control.

L'estudi citogenètic en aquests pacients va permetre associar aquesta malaltia amb la deleció a un cromosoma del grup D (Stallard, 1962) que posteriorment, amb el desenvolupament de la tècnica de bandes G, es va identificar com la deleció de la regió 13q14 on es localitza el gen *RB1* (Francke i col. 1976; Sparkes i col. 1983). L'aïllament i la seqüenciació del gen es va portar a terme per l'equip de McGee i col. (1989). Aquesta troballa constitueix l'exemple típic de la contribució de la citogenètica a la caracterització de gens responsables de l'aparició d'una patologia concreta.

Aproximadament un 10% dels pacients presenten alteracions citogenètiques constitucionals que afecten la regió 13q14 (Turleau i col. 1985) i un 3% dels pacients són portadors de delecions 13q14 (Cowell, 1992). Cal destacar que cap dels 10 pacients que hem estudiat ha presentat aquesta deleció a nivell constitucional. Aquest fet podria explicar pel baix nombre de mostres analitzades.

Es diferencien dos tipus de patologies, les que tenen un origen heretat (40%) i els *de novo* (60%). En l'hereditari una d'aquestes mutacions ja existeix en les cèl·lules germinals d'un dels progenitors i l'altra mutació necessària pel desenvolupament d'aquesta malaltia és de tipus

somàtic. En canvi, en el no hereditari, o *de novo*, les dues mutacions s'han de donar somàticament en els dos al·lels *RB1* en una mateixa cèl·lula precursora de la retina. Els dos tipus de retinoblastoma es poden diferenciar (Hogg i col. 1993). L'hereditari generalment es presenta bilateralment i a una edat més primerenca (ens els primers 6 mesos de vida). En canvi, el no hereditari és unilateral i es diagnostica més tardanament (entre els 24 i els 29 mesos de vida). En la nostra sèrie hem estudiat quatre casos de retinoblastoma bilateral i sis d'unilateral. Els afectats de tumors bilaterals tenien edats compreses entre 6.5 i 30 mesos i els unilaterals entre 10 i 96 mesos. Per tant es compleix que els afectats de retinoblastoma bilateral tenen un diagnòstic més primerenc que els que tenen retinoblastoma unilateral.

Si bé l'aparició del tumor depèn d'un únic gen (*RB1*), la progressió d'aquest requereix l'alteració d'altres gens, evidenciant que la detecció de canvis cromosòmics en aquests tumors és important per conèixer els mecanismes implicats en l'evolució tumoral. Fins ara, s'han publicat diferents treballs amb la finalitat d'intentar relacionar la presència de certes anomalies citogenètiques amb més o menys malignitat de la malaltia. Després de les delecions del cromosoma 13, les alteracions cromosòmiques més freqüents en aquests tumors són l'isocromosoma 6p, la trisomia parcial, o total, de 1q i la monosomia 16 (Potluri i col. 1986, Cowell i Hogg 1992, Cano i col. 1994, Oliveros i Yunis 1995). També s'han vist "double-minutes" i regions tenyides homogèniament relacionades amb les amplificacions dels oncogens *MYCN* i *ANT1* (Godbout i Squire, 1993).

En el nostre estudi, en dos tumors (cas RB1 i cas RB4) s'ha detectat pèrdua de la regió 13q14, mitjançant CGH (Fig.36), el que suggereix que aproximadament un 20% dels tumors de retinoblastoma presentarien la delecio. Aquesta freqüència doblaria la descrita per Turleau i col. (1985), un biaix que es podria explicar pel baix nombre de mostres estudiades en la nostra sèrie.

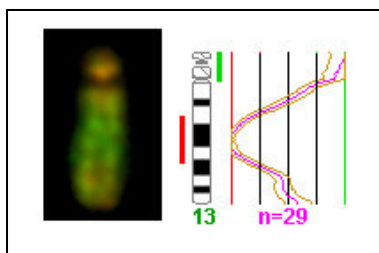


Fig.38- Perfil de CGH en el que es mostra la pèrdua que inclou la regió 13q14 (cas RB4).

Els guanys i pèrdues que detectem per CGH i HR-CGH impliquen zones on hi poden haver gens implicats en la tumoració (oncogens i/o gens supressors de tumor).

Les alteracions cromosòmiques que més freqüentment hem detectat per CGH en l'anàlisi dels 10 tumors han estat els guanys de 1q i 6p, que coincideixen amb altres estudis que utilitzen bandes G (Oliveros i col. 1995). Aquestes mateixes regions han estat també descrites en quatre treballs on s'ha aplicat la tècnica de CGH (Mairal i col. 2000; Chen i col. 2001; Herzog i col. 2001; Lillington i col. 2003) i també en un treball on s'ha emprat l'array de CGH (Zielinski i col. 2005). En tots aquests treballs s'han detectat guanys de material cromosòmic

en la regió 2p que no hem detectat en el nostre estudi, suggerint que aquesta alteració no és necessària pel desenvolupament del retinoblastoma. Els guanys del 17q i del cromosoma 19 sencer, observats en el nostre estudi, només han estat descrits per Herzog i col. (2001). Les pèrdues més freqüents detectades per CGH en la nostra sèrie han estat la del 16q que també s'ha descrit en les quatre publicacions que utilitzen la CGH per l'estudi del retinoblastoma (Mairal i col. 2000; Chen i col. 2001; Herzog i col. 2001; Lillington i col. 2003) i també en la publicació que aplica l'array-CGH (Zielinski i col. 2005).

Entre les pèrdues detectades per HR-CGH que s'han identificat en el nostre estudi hi trobem: 8q24.1q24.3, 10q25q26, 11q23 i 16q22q23. Cal destacar que només en el treball de Chen i col. (2001) es descriu la pèrdua de la regió 16q22. Pel que fa a les regions cromosòmiques amb guanys, detectades per HR-CGH, hem identificat: 1q21, 1q25, 1q44, 6p22, 6p25 i 17q22q23. Només el guany en la regió 6p22 ha estat també prèviament descrit per altres autors (Mairal i col. 2000; Chen i col. 2001).

5.3- MONOSOMIES I TRISOMIES AUTOSÒMIQUES: CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

Les monosomies i trisomies parcials en els cromosomes autosòmics detectables per bandes G apareixen amb una incidència aproximada de 1/7.000 nounats (Jacobs i col. 1992). Encara que s'han publicat molts treballs que descriuen desequilibris en cromosomes autosòmics en pacients amb retard mental i malformacions congènites, fins ara, es coneixen molt poques alteracions cromosòmiques específiques associades a una síndrome clínica ben definida (Carey i Viskochil, 2002).

En general, la correlació fenotip-genotip esdevé difícil i es caracteritza per un ampli espectre de variabilitat fenotípica que pot estar influenciat per diferents factors. El que pot estar afectant és el fons genètic, mosaïcismes sense detectar, diferent edat dels pacients, criteris de classificació clínica no homogenis, diferències en la regió delecionada/guanyada i de trisomies/monosomies acompanyants, expressió de trets fenotípics recessius degut a la deleción i la penetrància incompleta. Malgrat això, les correlacions fenotip-genotip estan millorant degut a l'increment de casos publicats i també a la millora de les tècniques de citogenètica molecular que permeten identificar amb més exactitud l'alteració cromosòmica.

Tècniques de citogenètica molecular, com les que hem aplicat en aquest treball (M-FISH, CGH, HR-CGH i MLPA), són de molta utilitat a l'hora de definir alteracions cromosòmiques en pacients amb afectació clínica. La identificació, o sospita, d'una alteració cromosòmica concreta facilita la tasca posterior dels genetistes moleculars apuntant la regió concreta per a l'estudi dels gens i obtenir una millor correlació genotip-fenotip.

En l'ideograma següent, Fig.39, es mostren els resultats obtinguts en el nostre treball. S'han determinat: 26 monosomies i 29 trisomies parcials autosòmiques (8 d'aquests casos presentaven una combinació de trisomia i monosomia parcials). En una revisió realitzada per Brewer i col. (1998) es va publicar un mapa cromosòmic de delecions autosòmiques associades

a 47 malformacions congènites diferents derivada de la informació citogenètica obtinguda de 1.753 pacients amb una monosomia parcial autosòmica aïllada i sense presència de mosaïcisme. En total es van descriure 137 regions cromosòmiques associades a malformacions concretes. Al comparar els nostres resultats amb aquests i també amb els publicats per Carey i Viskochil (2002) (descartant aquells casos en els que les monosomies anaven acompanyades de trisomies o es trobaven en mosaic) hem vist que una gran part de les delecions detectades en el nostre estudi coincideixen amb regions on s'havien associat malformacions concretes (18/21). Hi ha tres bandes, però, implicades en monosomies parcials en el nostre estudi que no estaven definides en aquests treballs: 1p22, 2q36, 15q26. Encara que cal destacar que aquestes monosomies són el resultat de translocacions o formació d'anell (en el cas de la banda 15q26) i aquest fet també podria estar influint en la clínica. Les dades clíniques d'aquests casos, conjuntament amb les d'altres autors, facilitaran la identificació de gens en aquestes regions implicats en el desenvolupament.

S'han detectat desequilibris en tots els cromosomes amb l'excepció del cromosoma 14 i 22. No tots els cromosomes mostren el mateix nombre d'alteracions evidenciant que no es produeix a l'atzar. Els cromosomes amb un major nombre d'alteracions han estat: 2, 8, 10 i 20 (s'han descartat els casos familiars que farien incrementar la freqüència d'alteracions per a un cromosoma concret).

En els següents apartats discutirem cada cas en concret comparant-lo amb la bibliografia descrita fins al moment. La informació s'ha obtingut consultant la base de dades *Entrez Pubmed*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed> i també l'OMIM <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>.

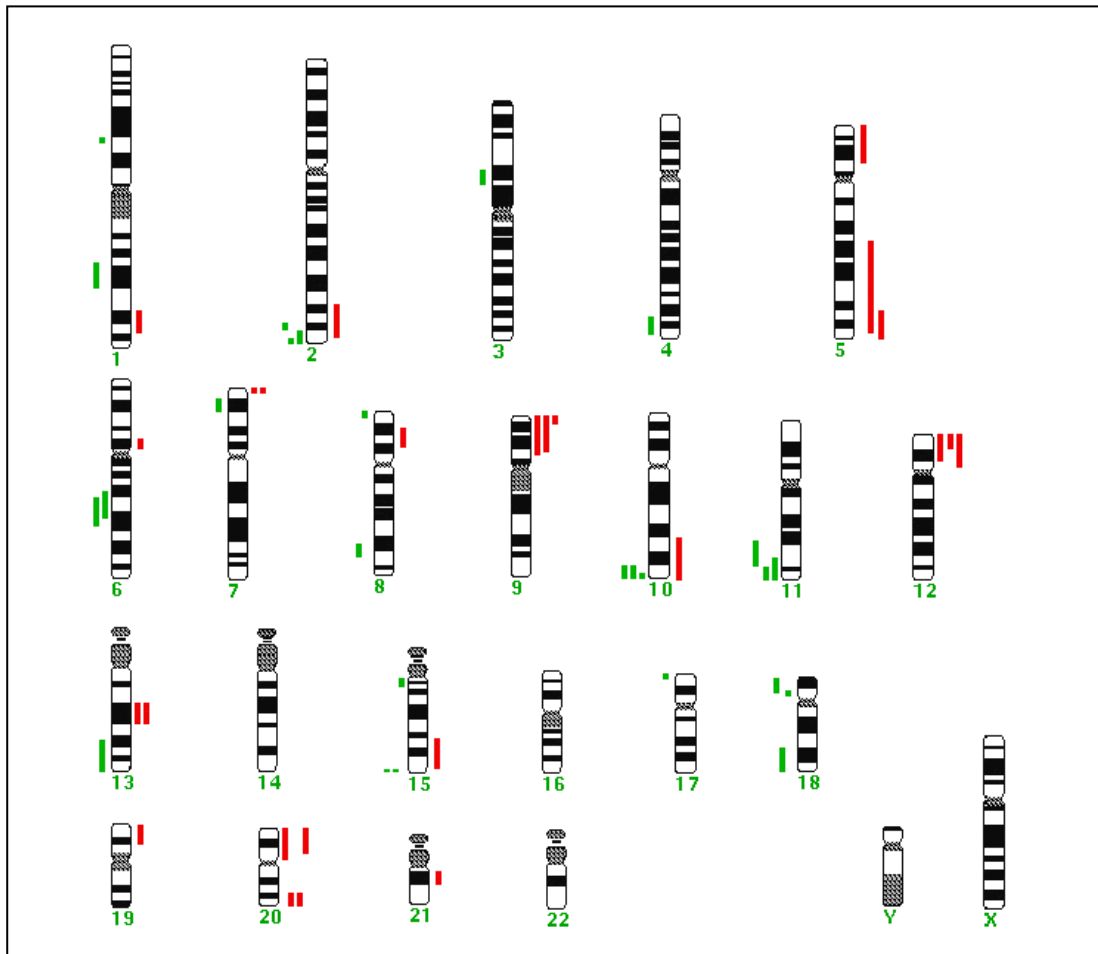


Fig. 39- Ideograma on es representen les monosomies i trisomies parcials autosòmiques trobades en el present estudi. Les monosomies parcials s'han representat en verd i les trisomies parcials en vermell.

5.3.1- MONOSOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 1

- **Monosomia parcials de 1p (MS-45)**

Les delecions intersticials del braç curt del cromosoma 1 no són molt freqüents (Howard i Porteus, 1990). La majoria de les delecions en el cromosoma 1 afecten el braç llarg o a la regió terminal del braç curt.

En la nostra sèrie hem identificat el pacient MS-45 com portador de la delecio 1p22. En aquest cas la banda delecionada coincideix amb el punt de trencament de la translocació t(1;14) que ja s'havia detectat prèviament per bandes G i s'havia considerat equilibrada.

El pacient presenta una clínica alterada que comparteix alguns aspectes amb el cas descrit prèviament en la literatura per Finelli i col. (2001). Aquests autors van publicar el cas d'un nen amb delecio 1p21p22. Entre les característiques comunes amb el nostre pacient es troben el retard psicomotor i del llenguatge, a més d'un nas bulbós. Però presenten també algunes discrepàncies. Per exemple, en el cas de Finelli i col. (2001) el nen mostra un filtre

llarg i una boca petita mentre que el nostre pacient presenta un filtre curt i una boca gran amb la llengua i dents prominents.

La revisió publicada per Mircher i col. (2003), en relació a les delecions de 1p, reflecteix que tots els casos tenen en comú retard mental però amb diferent grau de severitat i que no s'hi associen problemes de comportament. Però, que molts altres trets com anomalies a les orelles, coll curt, clinodactília, boca oberta i microcefàlia no es presenten en tots els casos. La variabilitat clínica podria ser deguda al fet que hi ha pocs pacients descrits i que tots presenten diferent mida o localització de la delecio. El cas que presenta la clínica més greu és el que van publicar Stockton i col. (1997). Aquest cas presentava la delecio 1p21p22.3 i mostrava anomalies cardíques i també respiratòries.

No hem trobat en la literatura cap cas que presentés la delecio 1p22 aïllada, per això molts aspectes clínics que presenten els altres casos descrits també es podrien deure a les altres bandes afectades. A més, en el nostre cas, la delecio s'ha originat com conseqüència de la translocació entre el cromosoma 1 i 14, per tant, també hi podria haver una efecte de posició dels gens implicats en el punt de trencament.

- **Monosomia parcial de 1q (MS-185)**

Convencionalment les delecions en el 1q s'han classificat en tres grups depenent de la regió implicada en la monosomia: 1q21-q25 (proximal), 1q25-q32 (intermitja) i 1q42-qter (distal) (Schinzel i Schmid, 1980), encara que hi ha hagut controvèrsies en el fet de si hi havia distinció entre la clínica dels pacients amb delecions proximals i distals. Alguns trets clínics es sobreposen en els casos de delecions proximals i intermitges: baix pes al néixer, retard del creixement i psicomotor, hipotonia, microbraquicefàlia, hipertelorisme, fissura del paladar, clinodactília del cinquè dit, solc palmar transversal i anomalies renals i cardíques.

En la nostra sèrie s'ha detectat un cas amb monosomia parcial de 1q (MS-185). Els perfils de la HR-CGH mostren que la regió perduda implica les bandes 1q25.31q31.3 mentre que la CGH fa sospitar d'una delecio més petita en 1q31.2q31.3. Comparant amb els resultats obtinguts per bandes G sembla que el resultat de la CGH convencional és més fiable. És a dir, aquest cas entraria en el grup de delecions intermitges.

La nostra pacient és una nena que als sis anys presenta estatura baixa, trets dismòrfics, estenosi pulmonar valvular. El cas més similar al nostre que hem trobat descrit a la literatura és el publicat per Höglund i col. (2003), però en aquest estudi el pacient no mostrava estatura baixa ni tampoc estenosi pulmonar. Malauradament, degut a les poques dades clíniques que se'ns van proporcionar no hem pogut fer una comparació clínica acurada. A més, el cas descrit per Höglund i col. (2003) també té implicada la banda 1q25.3 mentre que el nostre possiblement no.

5.3.2- TRISOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 1q (MS-154)

Les duplicacions parcials de 1q descrites a la literatura normalment s'originen a partir d'una translocació desequilibrada i per tant, implica a altres cromosomes. Ha estat difícil descriure una clínica concreta per a les duplicacions de 1q, i els fenotips que s'han associat a les duplicacions de 1q d'una regió concreta no sempre han coincidit. Però, sí que sembla que la clínica és més severa en duplicacions proximals o en duplicacions molt grans. Les duplicacions distals a 1q42 són compatibles amb la vida adulta (Verscuuren-Bemelmans i col. 1995). Comparant amb les duplicacions proximals i amb les duplicacions més grans, les duplicacions distals estan associades a dismorfies craniofacials més lleus, no presenten malformacions visceralis i el pronòstic és molt millor.

En la nostra sèrie hem caracteritzat un cas (MS-154) que presenta una trisomia parcial de 1q, concretament de les bandes 1q41q42. En aquest cas la duplicació és aïllada, no hi ha implicació de cap altra cromosoma. Es tracta d'una noia de 15 anys que presenta retard mental i malformacions. Els detalls clínics que vam obtenir són escassos, per això no s'ha pogut fer una bona correlació amb altres casos descrits a la literatura. El que sí que podem apreciar és que la pacient va superar l'etapa d'infantesa que estaria d'acord amb el fet que la duplicació que presenta la pacient implica poques bandes cromosòmiques i són distals ja que duplicacions més grans i proximals, amb absència de mosaïcisme s'han relacionat amb incompatibilitat de la viabilitat fetal o esperança de vida reduïda (Wax i col. 2000).

5.3.3- MONOSOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 2q (MS-44, MS-111 i MS-153)

En la nostra sèrie s'han detectat tres casos amb desequilibris cromosòmics en la regió 2q terminal (MS-44, MS-111 i MS-153). En el cas MS-44 vam observar una reorganització cromosòmica que implicava una deleció 2q terminal (a més d'un guany en la regió 2q34q37.2). En el cas MS-111 es va observar una reorganització complexa aparentment equilibrada i una vegada estudiada per HR-CGH es va detectar una pèrdua que implicava la banda 2q36. I en el cas MS-153 es va detectar una deleció 2q terminal.

Aquestes tres alteracions cromosòmiques són *de novo* ja que l'anàlisi de bandes G i l'aplicació de la FISH 2q subtelo mèrica van donar resultats normals en els progenitors. Altres estudis han mostrat que existeix una àmplia variabilitat clínica entre individus que presenten la mateixa deleció encara que la majoria presenten retard mental i dismorfies facial (Casas i col. 2004). També s'ha trobat la mateixa deleció en parens fenotípicament normals considerant-se un dels polimorfismes subtelo mèrics més freqüents que ha estat descrit en el 5% de la població (Ballif i col. 2000; de Vries i col. 2003).

En el cas MS-44, a més de la reorganització cromosòmica, la tècnica de MLPA va detectar una deleció subtelo mèrica de 2q que no havia estat detectada per bandes G ni per HR-CGH prèviament. L'alteració cromosòmica en aquest cas és *de novo*. Depenent de la complexitat de les reorganitzacions cromosòmiques pot ser difícil de caracteritzar per tècniques de citogenètica

clàssica i, a més, poden estar associades a desequilibris genòmics. Els desequilibris subtelomèrics críptics es poden detectar utilitzant tècniques com la MLPA o sondes subtelomèriques. En el cas MS-44 la tècnica de MLPA va permetre detectar i identificar la deleció subtelomèrica de 2q. Cal remarcar la utilitat dels BACs que han estat indispensables per definir la reorganització intracromosòmica. Els resultats obtinguts pels BACs indiquen que s'ha produït una duplicació de 2q34q37.2 i posteriorment ha succeït una reorganització i ampliació de la banda 2q37.1. No és possible donar una explicació acurada dels passos fins a la formació d'aquesta estranya reorganització ja que han estat necessaris diferents punts de trencament.

A nivell clínic, en el pacient MS-44 s'hi van poder observar múltiples anomalies. Però, sorprenentment, comparant les troballes clíniques entre els pacients MS-44 i MS-153, aquest últim mostrava una clínica més severa. Aquest fet estaria d'acord amb les troballes de Hermsen i col. (2005), que va suggerir que els pacients amb una trisomia parcial de 2q distals a 2q33, com passa en el cas MS-44, mostren una clínica "moderada". Tenint en compte aquest fet i que la deleció a 2q37 és més gran en el cas MS-153 que en el MS-44, s'evidencia que la clínica més severa es presenta en el pacient amb la deleció més gran.

Els tres pacients mostraven retard mental o en el desenvolupament que és una característica clàssica de les delecions terminals de 2q. Els pacients MS-44 i MS-153 compartien altres trets característics d'aquesta monosomia: mans petites, cabell fi, pont nasal deprimat, nas dismòrfic, hipertelorisme, retard mental sever i hipotonia. I els casos MS-111 i 153 compartien també alguns trets típics de la monosomia: malformacions del sistema nerviós central, anomalies òssies i l'apèndix preauricular dismòrfic. Els pacients MS-44 i MS-111 només compartien el retard mental o en el desenvolupament. Kitsiou-Tzeli i col. (2007) van descriure un cas portador d'una deleció que implicava les bandes 2q37.3 i part de la 2q37.2 que compartia algunes característiques clíniques amb els nostres casos. Entre les característiques que compartien hi ha les anomalies òssies, estatura baixa, mans i peus petits, pont nasal deprimat, nas dismòrfic i paladar alt, totes característiques de les delecions terminals 2q. La clínica, doncs, és més severa en els dos casos amb delecions 2q36 i 2q37 que en el cas que té una deleció més petita (2q37.3) però que també té un guany de 2q34q37.2.

En el pacient MS-153 s'hi observa autisme, que també és típic d'aquesta monosomia. Publicacions prèvies han mostrat una correlació entre les delecions en la banda 2q37 i la predisposició a l'autisme. El gen *CENTG2* (*gene centaurin gamma-2*) es localitza en aquesta banda, concretament en 2q37.2, i està correlacionat amb l'autisme (Wassink et al. 2005). Aquest fet estaria d'acord amb les nostres troballes doncs el pacient MS-153 pateix autisme i té una deleció que afecta 2q37.1q37.3 mentre que hi ha absència d'autisme en el pacient MS-44 i en el MS-111 que no tenen delecionada la regió 2q37.2. També estaria d'acord amb el treball publicat per Kitsiou-Tzeli i col. (2007) que descriuen una nena amb una deleció que implica la banda 2q37.3 i part de la 2q37.2 però sense englobar el gen *CENTG2* i que no presenta autisme.

5.3.4- MONOSOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 3p (MS-163)

Les delecions 3p proximals són rares. Fins al moment, només se n'han descrit unes 13 (Lalli i col. 2006). Neri i col (1984) van proposar un fenotip associat a les delecions 3p proximals que es caracteritzava per una cara típica, limitació en la mobilitat de les articulacions, deformitat de mans i peus i retard del desenvolupament motor.

En la nostre sèrie hem trobat un pacient que presentava una delecio en 3p (MS-163). Els resultats obtinguts per CGH i HR-CGH són discordants ja que la delecio detectada per la CGH comprèn només la banda 3p13 mentre que la detectada per la HR-CGH inclou la 3p13p14.2.

El nostre pacient mostrava retard mental, trets dismòrfics i malformacions congènites i va morir per leucèmia. La clínica que ens va ser proporcionada no és molt extensa, per això no s'ha pogut fer una bona comparació amb els casos ja descrits. Les delecions en 3p s'han relacionat en la literatura amb tumors sòlids (Yamaguchi i col. 2003; Kanjanavirojkul i col. 2005) i també amb càncers de la línia hematopoïètica (Johansson i col. 1997) apuntant a la localització de gens supressors de tumor en aquestes regions. El fet que el pacient MS-163 presentés una delecio 3p13p14.2 i morís de leucèmia podria suggerir alguna correlació entre el fet de presentar la delecio constitucional en 3p i la predisposició a desenvolupar càncer, encara que també es podria tractar d'una coincidència. Cal destacar, que en la banda 3p14.2, possiblement implicada en la present delecio, s'hi localitza el lloc fràgil FRA3B. El lloc fràgil FRA3B és el més comunament expressat i s'han observat delecions i reorganitzacions en 3p14.2 en diferents tipus de tumors encara que podria tractar-se només de l'expressió del lloc fràgil durant la progressió tumoral (Wang i col. 1998).

5.3.5- MONOSOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 4q (MS-172)

Les delecions de la part terminal de 4q s'han associat a un fenotip concret en pacients que mostren la delecio del terç terminal de 4q o de part d'aquest fragment (Lin i col. 1988). El fenotip associat inclou anomalies facials menors, fissura al paladar, anomalies digitals i a les extremitats, defectes cardíacs congènits, deficiència del creixement postnatal i retard en el desenvolupament. Un exemple seria el cas descrit per Giuffrè i col. (2004) que presentava una delecio terminal 4q31.3qter amb tots els trets clínics característics associats a les delecions terminals de 4q. Recentment, Vogt i col. (2006) han proposat que les delecions distals 4q es poden reconèixer per l'aparença característica del cinquè dit, que mostra hipoplasia de la falange distal i ungla en forma de ganxo.

En la nostra sèrie hem descrit un cas (MS-172) que mostrava una delecio de la part terminal de 4q (4q33q35.2) però sense implicar la regió subtelomèrica. L'alteració es va determinar gràcies a l'aplicació de la CGH i HR-CGH i retrospectivament es va poder apreciar la delecio en la preparació de bandes G.

Es tracta d'un nen que mostra similituds amb les característiques típiques associades a la síndrome de la delecio 4q terminal ja que presenta retard del creixement, anomalies digitals, fissura al paladar i anomalies facials menors. Comparant el nostre pacient amb el de Giuffrè i

col. (2004) el nostre no presenta cap defecte cardíac congènit potser pel fet que la seva deleció és més petita.

5.3.6- TRISOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 5

En la sèrie estudiada hem detectat tres casos amb duplicacions que implicaven el cromosoma 5 (MS-55, MS-107 i MS-194). En el cas MS-55 vam determinar una duplicació del braç curt del cromosoma 5 i en els altres dos casos (MS-107 i MS-194) vam caracteritzar la duplicació parcial del braç llarg del cromosoma 5, encara que en el pacient MS-194 aquesta duplicació anava acompanyada d'una deleció 10q26 ja que l'alteració citogenètica derivava d'una translocació t(5;10) equilibrada en la mare.

- **Trisomia parcial 5p (MS-55)**

Les duplicacions parcials de 5p són poc freqüents. Els pacients que s'han descrit mostren un fenotip variable que depèn de la regió implicada en la trisomia (Cervera i col. 2005). S'ha vist que els pacients amb trisomia de la regió distal a 5p13.3 tenen el fenotip més lleu comparat amb els pacients portadors de duplicacions totals de 5p o més proximals que 5p13.3. S'ha suggerit que la regió crítica per a la presentació de la síndrome de la trisomia 5p es trobaria entre les bandes cromosòmiques 5p10 i 5p13.1 (D'Amato i col. 2002). El fenotip crític es caracteritza per hipotonia, retard del desenvolupament, dificultats respiratòries, macrodolicocefàlia, fontanel·la anterior allargada, plecs epicàntics, hipoplàsia facial, microretrognàtia, coll curt, orelles displàsiques i d'implantació baixa, aracnodactília i hipoplàsia dels músculs abdominals (Kleczkowska i col. 1987). El cas descrit per Cervera i col. (2005) conté la mateixa regió duplicada que un dels nostres pacients (MS-55), és a dir duplicació de la regió 5p13.3p15.3. L'alteració citogenètica, en el nostre pacient, es va determinar prenatalment. El pacient estudiat per Cervera i col. (2005) mostrava retard mental i del desenvolupament, hipotonia, convulsions i una aparença facial que recordava a la trisomia 5p. En el nostre cas es va observar una translucència nucal patològica en el fetus. Malauradament no va ser possible aconseguir més dades clíniques d'aquest cas.

- **Trisomia parcial 5q (MS-107 i MS-194)**

La majoria de casos descrits a la literatura amb trisomia parcial de 5q són deguts a la segregació meiótica desequilibrada en un dels progenitors portador d'una translocació equilibrada (Levy i col. 2002). Els pacients amb duplicacions en 5q es poden dividir en tres grups: duplicació proximal (5q11q22.1)(Grup A), duplicació distal (5q31qter)(grup B) i duplicació més distal incloent la regió 5q34qter (grup C)(Rodewald i col. 1980). El grup A s'ha associat a retard psicomotor sever, anomalies muscular-esquelètiques i trets facials dismòrfics amb nas curt i llavi superior prim, front prominent, dits primers i afilats i absència de plec simià. El grup B s'associa a retard psicomotor i del creixement greu, microcefàlia, malformacions cardíques, hipertensió pulmonar, braquidactília i clinodactília, fissures palpebrals

antimongoloides, boca de carpa, epicant, estrabisme, orelles prominents, llavi superior gran i esperança de vida escurçada. Finalment, el grup C s'associa a un fenotip relativament lleu. S'hi ha descrit estatura baixa, retard mental lleu, pubertat tardana, front petit, pont nasal alt, anomalies digitals i esperança de vida normal.

En la nostra sèrie, hem trobat dos casos amb trisomia parcial 5q (MS-107, MS-194). El cas MS-107 mostra una duplicació que implica la regió 5q23.1q35. El grup on encaixaria més seria dins el B (duplicacions distals a 5q31). En canvi, el cas MS-194 presentava una trisomia 5q33q35.3, a més d'una deleció en 10q26; per tant aquest cas no es pot considerar una trisomia parcial 5q pura i s'inclouria dins del grup B.

En el cas MS-107 l'alteració citogenètica es va determinar prenatalment (per indicació d'edat materna avançada) i malauradament no tenim més dades clíniques d'aquest cas.

En el cas MS-194 l'alteració es va determinar postnatalment degut a malformacions en el pacient però no se'ns va especificar la clínica que presentava. El posterior estudi citogenètic dels pares, va revelar una translocació t(5;10) equilibrada en la mare que ha permès donar consell genètic a la família.

5.3.7- TRISOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 6p (MS-145)

La majoria de duplicacions parcials de 6p són el resultat de translocacions desequilibrades amb altres cromosomes o bé són duplicacions que inclouen la part terminal de 6p (Villa i col. 2000). Les anomalies clíniques que s'han relacionat amb les trisomies parcials de 6p són pes baix al néixer, problemes d'alimentació, infeccions respiratòries recurrents, retard del creixement i psicomotor, front ample, anomalies oculars, pont nasal ample i alt, boca petita amb llavi inferior prim, orelles malformades i d'implantació baixa i anomalies cerebrals (Villa i col. 2000).

En la nostra sèrie vam caracteritzar un cas amb duplicació críptica de la banda 6p12 (MS-145) detectada per les tècniques de CGH i HR-CGH. El pacient era un nen de sis anys que presentava alguns trets clínics característics de la trisomia parcial 6p com el retard psicomotor evident, front ample, pont nasal alt i displàsia dels pavellons auditius. Villa i col. (2000) van publicar un cas semblant al nostre amb una duplicació 6p12p21.3 que també compartia alguns trets clínics amb el cas MS-145 com la dolicocefàlia, orelles malformades, anomalies de les extremitats i retard psicomotor. Encara que el cas publicat per Villa i col. (2000), en general, presentava una clínica més severa i va morir als 16 mesos. Per altra banda, Leite i col (2006) van publicar un cas amb trisomia de 6p12p11.2 degut a la presència d'un cromosoma marcador derivat del cromosoma 6 que presentava un fenotip normal. Encara que en aquest cas el cromosoma marcador estava en mosaic.

Malgrat que el nostre cas comparteix trets clínics amb altres casos publicats s'ha de tenir en compte que la duplicació en el nostre pacient inclou menys bandes o bandes cromosòmiques diferents a la resta de casos publicats.

5.3.8- MONOSOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 6q (MS-110 i MS-187)

Les delecions parcials en 6q s'han associat a la síndrome 6q- (Schuster i col. 2003). S'ha descrit que la regió 6q té tendència a reorganitzar-se degut probablement a la presència de duplicacions segmentàries mapades en aquesta regió (Stankiewicz i Lupski, 2002).

Les manifestacions clíniques d'aquesta síndrome poden ser variables. S'han descrit delecions parcials que afecten diferents regions de 6q i es caracteritzen pel fet que són difícils de detectar, especialment quan són petites. A la literatura es poden trobar tres fenotips diferents corresponents a delecions proximals (6q11q16), intermèdies (6q15q25) i terminals (6q25qter) (Hopkin i col. 1997) encara que poden presentar variabilitat a nivell clínic. El fenotip associat a les delecions proximals (grup A) són anomalies facials menors com fissures palpebrals mongoloides, llavis primis i també hèrnies umbilicals o inguinals i peu equí. El fenotip que s'associa a les delecions intermèdies (Grup B) és el retard en el creixement i una alta mortalitat en l'infant degut a problemes respiratoris, paladar alt i arquejat, hipertelorisme, i malformacions a les extremitats superiors. El grup de delecions terminals (grup C) s'han associat a anomalies de la retina, fissura del paladar, hidrocefàl, hipoplàsia dels genitals i convulsions. Les anomalies comunes als tres grups serien anomalies de les orelles, hipotonia, retard del creixement i mental. En general, però, la síndrome 6p s'ha associat a retard mental i microcefàlia. La majoria de casos pateixen asimetries i dismòrfies cranio-facials com coll curt, pont nasal ample i prominent i normalment combinat amb alteracions del to muscular. També s'hi ha associat una sordesa severa i cardiopaties congènites (Schuster i col. 2003).

En la majoria de casos descrits els punts de trencament en 6q solen estar localitzats entre 6q14 i 6q23 (Valtat i col. 1992). En la nostre sèrie hem determinat dos casos amb delecions intersticials en 6q (MS-110 i MS-187) i en els dos, els punts de trencament es localitzaven entre 6q14 i 6q23. En el cas MS-110 l'anomalia es va detectar per bandes G però les bandes cromosòmiques implicades en la delecio es van determinar amb l'aplicació de la CGH o la HR-CGH. (6q16.3q22.2). En el cas MS-187 la pèrdua implicava una regió molt més petita del braç llarg del cromosoma 6 (6q21?q22) motiu pel qual aquesta pèrdua no es va poder apreciar amb claredat per bandes G. Els dos casos comparteixen bona part de la mateixa regió delecionada i s'inclourien dins les delecions intermèdies.

Els dos pacients presenten cardiopatia congènita. El cas MS-110 mostra, a més, asimetria cranial, hipertelorisme, alteracions en les mans i en les orelles que s'han associat a les delecions 6q. Però el paladar és normal i no té problemes respiratoris que són característics de les delecions intermèdies. El cas MS-187 també presenta la síndrome de Marden-Walker que inclou blefarofimosis, micrognàtia, cara inexpressiva, cifoescoliosi, contractures de les extremitats, pit de colom i aracnodactília. El fet que els trets clínics presents en el pacient MS-110 s'acoblin millor a la clínica descrita en les delecions de 6q podria ser perquè la delecio és més gran que la que es troba en el MS-187. Els nostres resultats confirmen que les alteracions fenotípiques presents en casos amb delecions parcials de 6q són variables, però amb una característica comú, que estaria d'acord amb la literatura, la presència de cardiopatia congènita en aquests pacients.

5.3.9- MONOSOMIES PARCIALS DEL CROMOSOMA 7p (MS-54)

La banda cromosòmica 7p21.1 conté el gen *TWIST* que quan està o bé mutat o deletat s'associa a la síndrome de Saethre-Chotzen. Aquesta síndrome es caracteritza per craniosinostosi, anomalies facials (línia frontal d'implantació del cabell baixa, asimetria facial, ptosi, paladar alt arquejat, hipertelorisme i displàsia de les orelles). A més, s'hi poden associar anomalies a les extremitats com braquidactília, sindactília del segon i tercer dit en mans i peus, i clinodactília del cinquè dit. Quan aquesta síndrome apareix com causa d'una deleció pot passar que resultin afectats gens contigus i en aquest cas s'ha vist que també es presenta retard mental (Chun i col. 2002; De Heer i col. 2004)

El cas MS-54, estudiat en la nostra sèrie, presenta una deleció de 7p21 detectada per CGH i HR-CGH que també es pot observar per bandes G. Com s'esperava, per l'alteració cromosòmica que presenta, el pacient està afectat de craniosinostosi amb tancament prematur de la fissura metòpica, presentant també trigonocefàlia. També presenta alteracions en les orelles que són petites i amb rotació posterior, paladar alt i arquejat i hipertelorisme que també és típic de la síndrome de Saethre-Chotzen. Presenta també alteracions a les mans: aracnodactília amb desviació cubital i camptodactília al segon dit de la mà esquerra.

En dos casos publicats per De Heer i col. (2004) es van observar fissures palpebrals antimongoloides que també presenta el nostre pacient.

Podríem dir doncs, que malgrat que la síndrome de Saethre-Chotzen presenta molta variabilitat com s'exemplificava la publicació de De Heer i col. (2004) on s'observava diferent afectació clínica en diferents individus de la mateixa família, el pacient MS-54 s'adapta a les característiques clíniques d'aquesta síndrome.

La deleció detectada en el nostre pacient és gran, d'aproximadament 13 Mb, per tant segons la literatura, en aquests casos s'hi associa també retard mental. Aquesta característica no es va poder corroborar perquè quan es va fer l'última exploració del pacient era un recent nascut.

5.3.10-TRISOMIES PARCIALS DEL CROMOSOMA 7p (MS-88 i MS-181)

El mecanisme més comú que porta a la aparició d'una trisomia parcial de 7p és la segregació desequilibrada durant la meiosi en un progenitor portador d'una translocació equilibrada. Aquest fet fa difícil establir un fenotip lligat a la trisomia ja que normalment va acompanyada a una monosomia parcial d'un altre cromosoma (Reish i col. 1996).

D'acord amb la literatura descrita, la regió 7p distal té tendència a reorganitzar-se amb altres cromosomes sense poder, potser degut al baix número de casos publicats, determinar si hi ha preferències per alguns cromosomes en concret. En la nostra sèrie hem caracteritzat dos casos portadors de la trisomia 7pter (MS-88 i MS-181). En els dos pacients la trisomia s'ha originat per la presència d'un cromosoma derivatiu. En el cas MS-88 el derivatiu és del cromosoma 8 i és el resultat de la mala segregació d'una translocació equilibrada t(7;8) en la mare. En el pacient MS-181 el cromosoma derivatiu és el cromosoma 15 originat per la t(7;15)

desequilibrada de la que és portador. En aquest últim cas no s'ha pogut comprovar que aquest cromosoma derivatiu provingui d'una mala segregació d'una translocació equilibrada en algun dels progenitors.

Es fa molt difícil establir unes característiques clíniques lligades a la trisomia 7pter degut a la implicació de les monosomies parcials d'altres cromosomes que poden estar influïent en la clínica. Això queda clar quan es compara la clínica dels pacients MS-88 i MS-181 i es veu que no coincideix cap tret fenotípic.

- **Trisomia 7pter lligada a monosomia 8pter (MS-88)**

S'han publicat casos de trisomia 7pter lligada a diferents monosomies. Fan i col. (2001) van publicar una sèrie on s'estudiaven les alteracions subtelomèriques en pacients amb retard mental d'etiologia desconeguda i van trobar un pacient que presentava una trisomia de 7pter acompanyada d'una monosomia de 18pter (deguda a la presència d'un cromosoma 18 derivatiu originat per una mala segregació en la meiosi materna). Yu i col. (2005) va descriure una trisomia de 7pter acompanyada d'una monosomia de 10pter també com resultat d'una mala segregació d'una translocació equilibrada en el pare. Cap d'aquests pacients mostrava trets clínics comuns al nostre pacient amb l'excepció del retard mental moderat.

L'absència de parla observada en el nostre pacient també ha estat descrita en el cas publicat per Cai i col. (1999) encara que aquest presentava una trisomia que implicava més bandes del cromosoma 7 (7p21.2pter) i el desequilibri cromosòmic era degut a la presència d'un cromosoma derivatiu 21 heretat de la mare que era una portadora equilibrada. El nostre pacient presenta també estrabisme. S'ha descrit un *locus* de susceptibilitat a l'estrabisme en el cromosoma 7 (Parikh i col. 2003) encara que la banda proposada és la 7p22.1 que no està implicada en la trisomia parcial en el nostre cas.

Les delecions de 8pter s'han associat a retard del creixement i retard mental, problemes de comportament, defectes cardíacs, estrabisme, anomalies facials menors i anomalies genital-urinàries (Reddy, 1999). El primer cas que presentava delecio 8p23 associada a retard mental va ser descrit per Fagan i col. (1988) i després se n'han descrit molts més suggerint que deu ser una alteració relativament comú (Wu i col. 1996; Giglio i col. 2000; Slavotinek i col. 2005; Lopez i col. 2006). Per altra banda també s'han descrit pacients amb delecions 8p (8p23.2p23.3) en individus aparentment normals (Reddy, 1999). El nostre cas presenta alguns trets clínics com el retard psicomotor i l'estrabisme que s'han relacionat amb la delecio 8p23, encara que com hem dit abans l'estrabisme també s'ha associat a la trisomia parcial de 7p. Per altra banda, el nostre pacient no presentava defectes cardíacs que s'han associat a delecions 8pter. S'ha postulat que els defectes cardíacs estan associats a la haploinsuficiència del *locus* *GATA4* localitzat a la banda 8p23.1. Probablement aquest *locus* no estaria implicat en la delecio en el nostre cas ja que el BAC RP11-813L8 hibrida en el cromosoma derivatiu i aquest està proper a la localització del *locus* *GATA4*. A la literatura les alteracions clíniques més severes lligades a monosomies de 8pter es presentarien en casos amb delecions que impliquessin la banda 8p23.1 comparat amb els que presenten delecions 8p23.2p23.3. S'ha de tenir en

compte, però, que el nostre cas no presenta una monosomia 8p23 aïllada sinó que va acompanyada d'una trisomia parcial 7p i que aquest fet pot estar influint sense cap dubte en la clínica presentada.

- **Trisomia 7pter lligada a monosomia 15qter (MS-181)**

El cas MS-181 presenta una trisomia 7pter acompanyada de la monosomia de 15qter. A la sèrie publicada per Fan i col. (2001) es presenta un pacient portador d'una trisomia de 7pter i una monosomia de 18pter que presenta algunes semblances clíniques amb el cas MS-181 com els problemes de comportament, estatura baixa i retard mental.

Les delecions de 15q distals pures s'han descrit en pocs casos presentant retard en el creixement i en el desenvolupament psicomotor possiblement degut a la delecio del gen *IGF1R*. (Pinson i col. 2005, Rooms i col. 2005). En un cribratge d'alteracions subtelomèriques en individus que presentaven retard mental Rooms i col. (2005) van caracteritzar un cas amb delecio de 15qter. Aquest nen presentava dificultats d'aprenentatge i estatura relativament baixa. També tenia mans i peus petits i clinodactília lleugera.

Casi tots els casos amb delecions de 15qter descrits presenten aquesta alteració com conseqüència d'un cromosoma 15 en anell. El fenotip associat a aquesta alteració es caracteritza pel retard en el creixement, microcefàlia, cara triangular, braquidactília i retard mental variable (Tümer i col. 2004) encara que en aquests casos el fenotip pot estar influenciat pel mosaïcisme que normalment es presenta per la inestabilitat dels cromosomes en anell. A més, també s'hi ha associat peu equí, sindactília dels dits dels peus i malformacions urogenitals.

El cas MS-181 de la nostra sèrie presenta retard mental i estatura baixa que també s'observava en el cas descrit per Rooms i col. (2005). A més, presenta macrocefàlia i criptorquídia que no s'havien associat ni a delecions de 15qter ni tampoc a trisomies de 7pter.

5.3.11- MONOSOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 8

- **Monosomia parcial 8p (MS-88)**

A la nostra sèrie hem detectat un pacient que presentava monosomia 8pter acompanyada d'un trisomia 7pter que ha estat discutida a l'apartat 5.3.10.

- **Monosomia parcial de 8q (MS-157)**

Les delecions de la banda cromosòmica 8q24.1 s'han associat a un ampli espectre d'alteracions fenotípiques que varien segons el punt de trencament i la mida de la delecio. S'han caracteritzat delecions de 8q24 associades a un fenotip normal (Batanian i col 2001), a un fenotip afectat lleu (Fennel i col. 1984) i a la síndrome de Langer-Giedion (OMIM:#150230). La síndrome tricorinofalàngica o de Langer-Giedion ha estat relacionada amb delecions de

8q24.1 més proximals adjacents a 8q23 (Buhler i Malik, 1984). Aquesta síndrome es caracteritza per cabell escàs, estatura baixa, nas bulbós, epífisi en forma de con, exostosi múltiple cartilaginosa i alguns pacients presenten retard mental de lleu a moderat (Bühler i Malik, 1984).

En la nostra sèrie hem caracteritzat una deleció críptica de 8q23.3q24.1 per les tècniques de CGH i HR-CGH en una nena de dos anys amb síndrome polimalformativa amb dismorfies, hipotonia i laxitud articular. Les dades clíniques referents a les dismorfies de les que disposem no són molt detallades per això no hem pogut fer una bona comparació clínica amb els altres casos descrits. El que sí que es pot destacar és que la pacient no presenta la exostosi múltiple cartilaginosa característica de la síndrome de Langer-Giedion.

5.3.12- TRISOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 8p (MS-70)

Les duplicacions invertides acompanyades de delecions en 8p conegudes com inv dup del(8p) tenen una freqüència aproximada de 1/10.000-1/30.000 nounats (Giglio i col. 2001). La manifestació clínica que impliquen aquestes trisomies parcials són retard mental, agènesi del cos callós, anomalies facials, hipotonia, anomalies cardíques i ortopèdiques (Guo i col. 1995). Per altra banda, la síndrome de Kabuki es va relacionar inicialment amb la duplicació de la regió 8p22p23.1 (Milunsky i Huang, 2003) però, recentment, aquesta relació s'ha desmentit (Sanlaville i col. 2005; Engelen i col. 2005; Kimberley i col. 2006).

En la nostra sèrie hem detectat un pacient que presentava una duplicació de 8p12p22 visible per bandes G (MS-70). No va ser possible determinar si la duplicació era invertida o directa per falta de suspensió cel·lular. Els perfils de CGH i HR-CGH revelen que la duplicació és intersticial i que no existeix pèrdua de la regió més distal de 8p (com es dona en la majoria de casos descrits a la literatura). El nostre pacient, un nen de dos anys, presentava retard psicomotor.

Moog i col. (2000) van descriure una família portadora d'una duplicació parcial de 8p sense deleció associada. Les bandes implicades en la duplicació eren la 8p12p21.1 (semblant a la del nostre pacient). La mare i la filla eren portadores de la duplicació i mostraven retard mental moderat. La nena va mostrar retard en el desenvolupament durant els primers anys de vida i als 22 anys es va visitar amb indicació de retard mental que era lleu-moderat. El cas descrit per Moog i col. (2000) estaria d'acord amb el nostre pacient ja que als 2 anys només se li aprecia retard psicomotor.

Podem dir doncs, que sembla que les duplicacions parcials de 8p sense associació de delecions tenen unes conseqüències clíniques lleus comparat amb les inv dup del(8p) descrites a la literatura.

5.3.13- TRISOMIES PARCIALS DEL CROMOSOMA 9p (MS-71, MS-72 i MS-140)

La trisomia 9p és probablement la quarta trisomia autosòmica més comuna després de les trisomies 21, 18 i 13 (Hannam i col. 1999). En la majoria de casos apareix com conseqüència de la segregació meiótica desequilibrada en un dels progenitors portador d'una translocació equilibrada (Bussani-Mastellone i col. 1991). Les trisomies parcials del 9p han estat associades a manifestacions fenotípiques típiques que formen la síndrome de la trisomia 9p (retard mental, estatura baixa, micro- o braquicefàlia, fissures palpebrals antimongoloides, ulls enfonsats, hipertelorisme, nas prominent/globular, boca de carpa, orelles d'implantació baixa i prominents i solc palmar simià, hipoplàsia d'algunes falanges i displàsia o hipoplàsia de les ungles (Centerwall i Beatty-DeSana, 1975). També s'hi ha associat la malformació de Dandy-Walker (Chen i col. 2005a). L'existència de casos amb aquesta síndrome i amb duplicació de diferent mida ha permès definir la regió crítica 9p22 associada a la síndrome de la trisomia 9p (Fujimoto i col. 1998). S'ha descrit que casos amb punts de trencament en les bandes 9p21 o 9p22 (amb duplicació de la banda 9p22) no difereixen del fenotip associat a la trisomia total de 9p (Schinzel et al., 2001).

Les tècniques de CGH, HR-CGH i M-FISH ens han permès caracteritzar tres pacients (MS-71, MS-72 i MS-140) en els que el material duplicat del cromosoma 9 estava addicionat als cromosomes 13, 22 i 16 respectivament. Les regions implicades eren: 9p13p24 en el cas MS-72, 9p13.2p24 en el cas MS-71 i 9p23p24 en el cas MS-140. En la Taula 28 es descriuen els fenotips en els tres casos i es comparen amb els trets característics de la síndrome de la trisomia 9p.

Taula 28- Característiques fenotípiques típiques de la trisomia 9p presents en els nostres pacients

Principals característiques fenotípiques associades a la trisomia parcial 9p	9p13.2-pter (MS-71)	9p13-pter (MS-72)	9p23-pter (MS-140)
Retard mental	x		
Estatura baixa	x	x	
Microcefàlia/Braquicefàlia	x	x	
Fissures palpebrals antimongoloides			x
Ulls enfonsats			
Hipertelorisme			x
Nas globular/prominent			
Boca en carpa			
Orelles d'implantació baixa/prominents		x	
Solc palmar simià	x	x	
Hipoplàsia d'algunes falanges		x	
Displàsia o hipoplàsia de les ungles			

El cas MS-71 i MS-72, que no estan emparentats, comparteixen algunes característiques fenotípiques típiques de la síndrome de la trisomia 9p: estatura baixa, microcefàlia/braquicefàlia i solc simià bilateral. A més, el cas MS-72 presenta orelles prominents i d'implantació baixa i hipoplàsia d'algunes falanges que són trets també característics de la síndrome de la trisomia 9p però que no s'observen en l'altre pacient. El cas MS-71 presenta retard mental que també és típic d'aquesta síndrome i que està absent en el cas MS-72. Altres trets fenotípics com fissures palpebrals antimongoloides, ulls enfonsats, hipertelorisme, nas globular/prominent, boca de carpa i displàsia o hipoplàsia de les ungles no estaven presents en cap dels dos casos.

En el cas MS-140 la majoria de trets clínics de la síndrome de la trisomia 9p estan absents ja que només presenta fissures palpebrals antimongoloides i hipertelorisme. A més presenta altres dismorfies però que no s'inclouen en el fenotip típic d'aquesta síndrome. Aquest fet podria explicar-se per l'absència de la regió crítica 9p22 en la trisomia i recolzaria la hipòtesi que la regió crítica per a aquesta síndrome es troba localitzada en la banda 9p22 tal i com van proposar Fujimoto i col. (1998).

Cap dels tres pacients de la nostra sèrie presenta malformació de Dandy-Walker que, com s'ha esmentat, també s'ha associat a la trisomia 9p.

5.3.14- MONOSOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 10q (MS-65, MS-76 i MS-194)

En la nostra sèrie hem identificat monosomies parcial de 10q associades a desequilibris d'altres cromosomes en tres pacients (MS-65, MS-76 i MS-194). El cas MS-194 presentava una trisomia 5q33q35.3 a més d'una deleció en 10q26 i ha estat discutit en l'apartat 5.3.6. Els altres dos pacients (MS-65 i MS-76) eren portadors alhora d'una monosomia parcial de 10q terminal i d'una trisomia parcial 20q.

S'han publicat diferents casos d'individus portadors de delecions 10q26 aïllades que han permès definir les característiques clíniques comunes a tots ells: retard mental i psicomotor, hipotonia, retard del creixement, cardiopatia congènita, anomalies al tracte urinari, microcefàlia, i trets dismòrfics lleus (pont nasal ample amb nas prominent, orelles malformades i d'implantació baixa, hipertelorisme i estrabisme) (Leonard i col. 1999; Courtens i col. 2006). Recentment, però, la deleció i la duplicació de la regió subtelomèrica 10q s'ha descrit com una de les variants familiars més comunes (Ravnan i col. 2006).

Per altra banda, les trisomies 20q "pures" són poc freqüents i normalment es troben associades a la monosomies parcials d'altres cromosomes ja que sol provenir d'una translocació equilibrada en els pares i una subseqüent segregació meiótica anormal (Plotner et al. 2002). S'han descrit casos de trisomia parcial de 20q associada a delecions molt petites d'altres cromosomes: cromosoma 3 (Nielsen i col. 1986), cromosoma 4 (Plotner i col. 2002), cromosoma 8 (Pierquin i col. 1988), cromosoma 16 (Pawlowitzki i col. 1979), i al cromosoma X (Waters i col. 1990). Però no hem trobat a la literatura cap cas en el que la translocació fos amb el cromosoma 10 com es produeix en aquests dos casos (MS-65 i MS-76).

Els pocs pacients descrits amb trisomies 20q pures i també amb trisomies 20q associades a delecions petites d'altres cromosomes han permès definir un fenotip comú en aquests casos. Els trets fenotípics característics associats són: malformacions craniofacials, anomalies muscular/esquelètiques i defectes cardíacs (Plotner i col. 2002). Grange i col (2005) van descriure un cas de trisomia parcial 20q13qter que comparteix la majoria d'aquestes característiques clíniques encara que també té associada una deleció 20p13pter.

En la nostra sèrie els dos pacients (MS-65 i MS-76) eren membres d'una mateixa família, portadors d'una trisomia parcial 20q13.2q13.3 lligada a una monosomia de 10q26. En aquesta família, la mare de MS-65 (germana de MS-76) va resultar ser portadora d'una translocació "aparentment" equilibrada $t(10;20)(q26;q13.2)$. El cas MS-65 mostra molts trets fenotípics típics dels portadors de delecions 10q26 com són el retard psicomotor i mental, criptorquidisme, estrabisme, pont nasal ample i prominent, orelles d'implantació baixa, microcefàlia al néixer i hipoacúsia lleu. Encara que també presenta alguns trets característics

de la trisomia 20q13.1qter com el creixement intrauterí normal, clinodactília i altres anomalies en les mans com camptodactília i sindactília.

La pacient MS-76, aparentment portadora de la mateixa alteració cromosòmica que el cas MS-65, presenta retard mental, convulsions i fissura palatina. La fissura palatina s'ha descrit en casos amb trisomia 20q i el retard mental en casos amb monosomia 10q26 però, pel que hem trobat a la literatura, no s'han associat convulsions a cap de les dues anomalies cromosòmiques. Els detalls clínics que ens van ser proporcionats d'aquesta pacient no eren molt extensos, i per tant podria ser que presentés més característiques fenotípiques típiques associades a l'alteració citogenètica que presenta.

No podem descartar, en el cas que es confirmés, que podria tractar-se d'alteracions cromosòmiques amb clínica heterogènia com s'ha descrit en alguns casos en la literatura. A la banda 20q13 s'han descrit gens imprintats, com per exemple el gen *GNAS1* (Juppner i col., 1998). Aquesta fet podria contribuir a la diferent presentació del fenotip en els casos MS-65 i MS-76. En el cas MS-65 sí que sabem que el cromosoma derivatiu és d'origen matern però en el cas MS-76 no ens va ser possible estudiar els pares per comprovar quin origen tenia el cromosoma derivatiu.

5.3.15- TRISOMIES PARICALS DEL CROMOSOMA 10q (MS-47)

Les trisomies distals de 10q s'han associat a una clínica concreta que inclou microcefàlia, front alt, cara rodona, epicant, hipertelorisme, celles primes, fissures palpebrals antimongoloides i curtes, microftàlmia, orelles d'implantació baixa, fissura del paladar, micrognàtia, pont nasal pla, nas curt amb narius inclinats cap a dalt, hipotonia, laxitud de les articulacions, clinodactília, escoliosi, coll curt, retard del creixement, anomalies psicomotores, anomalies cardíacques, oculars i renals (Fryns, 1990). Molts casos de trisomia distal 10q són resultat d'una translocació desequilibrada (Chen i col. 2005b). Fins ara, s'han descrit molt pocs casos que presenten duplicacions distals de 10q "pures", però han permès definir que la regió crítica associada a aquesta clínica és la 10q25.2qter (Migliori i col. 2002).

En la nostra sèrie hem caracteritzat la duplicació 10q24q26.3 en una nena (MS-47). La duplicació era pura ja que no implicava l'alteració de cap altra cromosoma. No va ser possible aconseguir detalls clínics d'aquest cas, per aquesta raó no s'ha pogut fer la comparació amb els casos publicats.

5.3.16- MONOSOMIES PARCIALS DEL CROMOSOMA 11q (MS-159, MS-161 i MS-166)

La deleció terminal de 11q, descrita inicialment per Jacobsen i col. (1973), s'ha associat a un patró de malformacions anomenat síndrome de Jacobsen (OMIM: #147791). En una revisió de 110 pacients amb delecions 11q terminals realitzada per Grossfeld i col. (2004) evidenciaven la gran variabilitat fenotípica associada a aquesta alteració cromosòmica. Els trets més comuns que es troben en aquests pacients inclouen trombocitopènia, retard del

desenvolupament, retard mental, defectes cardíacs, estatura baixa, testicles sense descendir, infeccions recurrents, deficiència de IGF-1 i malformacions estructurals del sistema nerviós central. També s'han observat refredats crònics, èczema, estenosi pilòrica i anomalies estructurals renals, encara que menys freqüentment. Penny i col. (1995) havien descrit que la síndrome de la deleció parcial de 11q s'associava a un trencament de la banda 11q23.3 fins a la regió telomèrica. Recentment, Giampietro i col. (2006) van identificar un pacient amb la deleció molt més petita (11q24.2q25) que té els trets clínics típics de la síndrome de Jacobsen.

En la nostra sèrie hem detectat tres pacients portadors d'una deleció parcial de 11q (MS-159, MS-161 i MS-166). El cas MS-159 presenta la deleció de les bandes cromosòmiques 11q23.3q25, el cas MS-161 de la regió 11q24q25 i el MS-166 de 11q22.3q23.3.

Els casos MS-159 i MS-161 són típics casos de síndrome de Jacobsen. No se'ns va donar més informació clínica detallada així que no podem discutir possibles diferències entre les dues pacients. En el cas MS-166, algunes de les característiques clíniques són comunes amb la síndrome de Jacobsen com són la macrocefàlia, epicant, hipertelorisme, pont nasal pla, nas curt, coll curt, infeccions respiratòries freqüents, contractures articulars i retard mental. Entre els trets clínics que no es relacionen amb la síndrome de Jacobsen presents en aquesta pacient cal esmentar les cataractes, proptosi i cifoesciosi. Encara que, les cataractes també van ser descrites en el cas publicat per Puvabanditsin i col. (2001) que presentava una deleció de 11q23qter.

Grossfeld i col. (2004) van descriure que un 94% dels pacients amb deleció 11q presentaven trombocitopènia i disfunció plaquetària permanent. El cas MS-166 no presenta aquesta alteració típica. Aquest fet podria deure's al fet que la deleció present en aquest pacient no inclou la regió crítica associada a la síndrome de Jacobsen.

En els tres pacients de la nostra sèrie no hem trobat cap regió cromosòmica delecionada comú, però els tres presenten una clínica característica de la síndrome de Jacobsen (encara que el cas MS-166 és el que en presenta menys). Es podria dir, doncs, que les característiques clíniques associades a aquesta síndrome estan relacionades amb delecions que inclouen diferents bandes de 11q i, segons els nostres resultats, sembla que la deleció de la banda 11q24q25 s'associaria a alguns trets molt característics de la síndrome com la trombocitopènia.

5.3.17- TRISOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 12p (MS-116, MS-129 i MS-170)

La duplicació 12p és una alteració cromosòmica rara. La correlació fenotip-genotip en aquesta alteració no ha estat fàcil ja que normalment la trisomia parcial de 12p apareix com conseqüència d'una translocació equilibrada als pares. Des de la primera descripció per Uchida i Lin (1973) només s'han descrit uns 14 casos amb duplicació 12p pura (Schinzel 2001; Zumkeller i col. 2004; De Gregori i col. 2005). Per altra banda la tetrasomia de la regió 12p s'associa a la síndrome Pallister-Killian (OMIM: #601803). En aquesta síndrome la tetrasomia es dona per un isocromosoma 12p extra en el cariotip que sovint està en mosaïcisme lligat a teixit fet que dificulta el seu diagnòstic ja que en sang perifèrica es troba un cariotip normal.

Molts trets clínics es sobreposen entre la trisomia 12p i la tetrasomia associada a la síndrome Pallister-Killian. Les característiques que tenen en comú ambdues són: retard mental, hipotonia, front prominent, hipertelorisme, epicant, orelles dismòrfiques, nas curt narius inclinats cap a dalt, filtre llarg, coll curt i peus i mans curtes. En canvi, les convulsions són freqüents en la síndrome de Pallister-Killian però són poc comunes en la trisomia 12p (Zumkeller i col. 2004).

En el nostre treball hem caracteritzat tres casos amb duplicacions de 12p (MS-116, MS-129 i MS-170). En el cas MS-116 no va ser possible acotar la regió concreta implicada en la trisomia parcial de 12p ja que no es disposava d'ADN per aplicar les tècniques de CGH i HR-CGH. Malgrat això, amb la M-FISH es va caracteritzar el material extra addicionat al 10p com derivat del cromosoma 12 i posteriorment, mitjançant les bandes G, es va poder determinar que el material addicionat al 10p probablement es tractava del braç curt del cromosoma 12. Ens va ser impossible aconseguir els detalls clínics d'aquest cas. El cas MS-170 presentava la duplicació de 12p13 i tenia una clínica que recorda a la síndrome de Cornelia de Lange (OMIM: #122470) però en la literatura no hi ha cap associació entre aquesta síndrome, on els gens responsables de la qual s'han mapat en la banda cromosòmica 5p13.1, i el braç cromosòmic 12p. La duplicació caracteritzada en el cas MS-129 implicava la regió 12p12.3p13.3 i clínicament presentava estenosi anal, camptodactília i facies peculiar. Ja que no se'ns han detallat les característiques de la *facies* peculiar no podem assegurar que aquest cas no presenti cap característica de la síndrome de Cornelia de Lange o que tingui alguna semblança amb la clínica associada a la trisomia 12p.

Els dos casos dels que tenim informació clínica (MS-129 i MS-170), en principi, no comparteixen cap característica clínica potser degut a les diferents regions de 12p implicades en la duplicació i també pel fet que en el cas MS-129 la duplicació parcial de 12p va associada a la deleció de Xp22.33 que també pot estar influenciant el fenotip.

Darrerament, De Gregori i col. (2005) han descrit una duplicació intersticial de 12p, dup(12)(p11.21p13.31), relacionada amb la presència de duplicacions segmentàries en aquestes regions del cromosoma 12 que explicaria una major tendència a les reorganitzacions, com per exemple les duplicacions, majoritàriament a través de les recombinacions homòlogues no al·lèliques.

5.3.18- MONOSOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 13q (MS-120)

Al llarg del nostre estudi hem detectat un pacient (MS-120) portador d'una monosomia parcial deguda a un cromosoma en anell que es presentava en mosaic. Aquest cas es discutirà més endavant en l'apartat 5.5.1 dedicat als anells.

5.3.19- TRISOMIES/TETRASOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 13q (MS-105, MS-105-G)

Les duplicacions parcials del cromosoma 13 mostren una extensa variabilitat fenotípica que pot anar des de ser letals a un fenotip lleu (Helali i col. 1996). La majoria de casos publicats descriuen duplicacions terminals i una minoria duplicacions intersticials. Els casos publicats mostren variabilitat fenotípica entre ells, fins i tot, quan la regió cromosòmica implicada és la mateixa (Helali i col. 1996). Aquest fet es podria explicar per les dificultats d'interpretar el patró de bandes en les trisomies parcials del cromosoma 13 si no s'apliquen tècniques de citogenètica molecular.

En la nostra sèrie hem caracteritzat una triplicació directa de la banda 13q21 en un pacient (MS-105) que presenta macrosomia, trets dismòrfics lleus i retard mental moderat. També hem caracteritzat la duplicació directa de la banda cromosòmica 13q21 en el seu germà (MS-105-G). Comparant el patró de bandes G del cas MS-105-G amb el seu pare i avi es pot dir que aquests també presenten la mateixa duplicació directa. Aquests últims només presenten hipoacúsia com alteració clínica.

La formació de la triplicació en el cas MS-105 es pot explicar pel mal aparellament dels cromosomes 13 durant la meiosi paterna amb intercanvi desigual de material de la banda duplicada. Aquests resultats mostren com pacients amb trisomies o tetrasomies per la mateixa regió cromosòmica poden tenir diferència significativa en el fenotip. Aquest fet també s'ha descrit en altres anomalies cromosòmiques com per exemple en el cas de la tetrasomia 18p que és més severa que la trisomia (Li i col. 2002).

Mathijssen i col. (2005) van publicar el cas d'una família portadora d'una duplicació parcial del cromosoma 13 (q21.31q31.1) que presentaven retard del desenvolupament, problemes de comportament, convulsions, problemes d'alimentació, estrabisme, sordesa, anomalies dentals *hallux valgus* juvenil, peus plans, hipermobilitat, front alt, celles arquejades, filtre llarg i ample i llavi superior prim. Així doncs, la nostra família amb la duplicació de 13q21 presentava una clínica molt més lleu que els casos descrits per Mathijssen i col. (2005). El cas MS-105, portador de la triplicació 13q21 tenia un fenotip més afectat però també lleu comparat amb la família de Mathijssen i col. (2005).

Podem concloure, doncs, que la trisomia/tetrasomia de la banda cromosòmica 13q21 té una implicació clínica lleu comparat amb casos que impliquen altres bandes cromosòmiques (Helali i col. 1996; Mathijssen i col. 2005).

5.3.20- MONOSOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 15q (MS-137 i MS-179)

A la nostre sèrie hem estudiat dos casos amb monosomies parcials del cromosoma 15q (MS-137, MS-179). El pacient (MS-179) és portador d'un cromosoma en anell i es discutirà més endavant en el apartat 5.5.2 dedicat als anells.

La regió cromosòmica 15q11q13 és una de les més inestables en el genoma humà. Aquesta inestabilitat s'ha relacionat amb la riquesa en duplicacions segmentàries en aquestes bandes cromosòmiques (Locke i col. 2004). El fenotip freqüentment associat a les delecions presents en aquesta regió són la síndrome de Prader-Willi i Angelman.

En la nostra sèrie hem detectat un cas amb delecio de la regió 15q11.2q13.2? (MS-137) que presentava retard mental, crisis convulsives i dismorfies. Aquest pacient no havia estat diagnosticat de síndrome de Prader-Willi ni Angelman (encara que el retard mental i les crisis convulsives són típiques de la síndrome d'Angelman). No se'ns van proporcionar els detalls de les dismorfies presents en els pacients per això ha estat impossible comparar aquest cas amb altres descrits a la literatura.

El fet que síndromes específiques no es sospitin amb anterioritat a l'anàlisi amb tècniques de citogenètica molecular podria reflectir l'heterogeneïtat en el fenotip associat a la síndrome.

5.3.21- TRISOMIES PARCIALS DEL CROMOSOMA 15q (MS-104)

La trisomia parcial de 15q que implica les bandes cromosòmiques 15q25q26 s'havia relacionat a la literatura amb una síndrome concreta que es caracteritzava per craniosinostosi i sobrecreixement (Zollino i col. 1999). Posteriorment, Roggenbuck i col. (2004) van publicar tres casos amb trisomia distal de 15q i fent una revisió de la literatura van concloure que no estava clar que la trisomia de les bandes 15q25q26 es relacionessin amb la craniosinostosi i sobrecreixement ja que hi havia molts casos amb trisomia distal de 15q que implicaven aquestes bandes cromosòmiques i que no presentaven aquesta clínica.

En la nostra sèrie hem caracteritzat un cas amb trisomia de la regió 15q24q26.2. Dos dels casos presentats per Roggenbuck i col. (2004) presentaven la trisomia de la regió 15q24q26 i presentaven ptosi, dificultats per alimentar-se, mida petita i retard mental.

El nostre cas es va detectar en un diagnòstic prenatal per indicació d'edat materna avançada. Els pares van decidir continuar l'embaràs, però el seguiment de la nena ha estat impossible ja que els pares han decidit no col·laborar per això no hem pogut contrastar les dades clíniques amb les publicades a la literatura.

5.3.22- MONOSOMIES PARCIALS DEL CROMOSOMA 17p (MS-79)

Les delecions terminals del cromosoma 17p estan relacionades amb l'aparició de la síndrome de Miller-Dieker (OMIM: #247200). Aquesta síndrome es caracteritza pel retard mental sever, la liscencefàlia, atrofia cerebral, agenèsia del cos callós, microcefàlia i anomalies del ronyó. Les microdelecions en 17p poden portar a l'aparició d'aquesta síndrome i s'ha definit que la regió crítica es localitza a la banda cromosòmica 17p13.3. La liscencefàlia present en la síndrome de Miller-Dieker és conseqüència de la delecio del gen *LIS-1* localitzat a la banda 17p13.3.

S'han descrit famílies amb translocacions críptiques afectes de la síndrome (Alvarado i col. 1993; Masuno i col. 1995; Van Zelderren-Bhola i col. 1997) i també pacients portadors de la deleció terminal 17p13.3 amb fenotip normal (Martin i col. 2002). Recentment, Menten i col. (2006) han descrit un pacient amb fenotip afectat portador de la deleció terminal 17p13.3 que presenta hipotonia, escoliosi, defectes cardíacs, estatura baixa i braquicefàlia.

El nostre pacient (MS-79), portador d'una deleció terminal 17p13.3 és una nena de cinc anys que presentava retard psicomotor lleu, retard del llenguatge, fenotip facial peculiar amb epicant i boca de carpa, vèrtebra lumbar anòmala i leucomalàcia crònica periventricular. Podem dir, doncs, que existeix un ampli ventall clínic en casos portadors de delecions 17p13.3 que es podria explicar per la mida de la deleció o bé per si aquesta deleció implica o no el gen *LIS-1*.

5.3.23- MONOSOMIES PARCIAIS DEL CROMOSOMA 18

- **Monosomia parcial 18p (MS-77 i MS-130)**

Les delecions del cromosoma 18p són una de les monosomies autosòmiques més freqüents (Schinzel i col. 2001). Les delecions terminals són les més freqüents (Rigola i col. 2001) encara que també s'han descrit delecions intersticials de 18p (Kacinski i col. 2007). Els trets clínics característics de la síndrome de 18p- inclouen retard mental de moderat a sever, retard del creixement postnatal, cara rodona, boca de carpa i orelles displàsiques. També s'hi ha associat microcefàlia, plecs epicàntics, ptosi, hipertelorisme, micrognàtia, anomalies dentals i coll curt. I amb menys freqüència s'han descrit defectes cardíacs o malformacions cerebrals majoritàriament holoprosencefàlia. Brenk i col. (2007) han publicat recentment un estudi on es correlaciona la grandària de la deleció en 18p i els trets fenotípics que s'hi associen. Així, han conclòs que la cara rodona s'associa a la deleció de la part terminal de la banda 18p11.32, el retard en el creixement postnatal i les convulsions a la deleció 18p11.23pter i finalment la ptosi i el coll curt a la deleció 18p11.21p22.

En la nostra sèrie hem descrit dos casos que presentaven delecions a 18p (MS-77 i MS-130). El cas MS-130 presenta una deleció que implicava les bandes 18p11.2pter i clínicament mostra concordança amb la síndrome de 18p- ja que presenta retard del creixement postnatal, orelles d'implantació baixa i grans i hipertelorisme. El cas MS-77 es tractava d'un cas de diagnòstic prenatal (realitzat per indicació d'edat materna avançada) en el que es va detectar per bandes G una reorganització complexa $t(8;18)(p11.2;p11.2),t(12;13)(q13;q12)$ "aparentment" equilibrada. Posteriorment els perfils de la HR-CGH i la CGH van mostrar la pèrdua de la banda 18p11.2. En aquest últim pacient no es van detectar anomalies ecogràfiques i no va ser possible aconseguir més dades clíniques. Per això, no l'hem pogut comparar amb els casos ja descrits a la literatura en relació a la deleció 18p encara que s'ha de tenir en compte que els punts de trencament implicats en la reorganització complexa també podrien afectar al fenotip.

- **Monosomies parcials 18q (MS-100)**

El fenotip associat a la síndrome de 18q- (OMIM: #601808) és molt variable però, en general, es caracteritza pel retard mental, estatura baixa, microcefàlia, hipotonia, deficiència d'oïda, defectes del paladar i deformitats dels peus.

Versacci i col. (2005) han publicat un cas amb la deleció 46,XY,del(18)(q22qter) que presentava fissures palpebrals mongoloides, hipoplàsia de la cara, filtre curt, llavis primers, prognatisme, orelles dismòrfiques, criptorquidisme, escoliosi, peu equí, estatura baixa i retard mental. Més recentment, Linnankivi i col. (2006) han descrit 14 individus portadors de deleccions de 18q evidenciant la gran variabilitat fenotípica, fins i tot, entre individus que presentaven la mateixa regió deleccionada. Els trets fenotípics comuns inclouen: estatura baixa, dismorfies facials, defectes del paladar, deformitats als peus, criptorquidisme i infeccions respiratòries recurrents degut a la deficiència de IgA. La funció cognitiva va des de intel·ligència normal a retard mental sever. A més, han vist que tots els individus amb la deleció de 18q22.3q23 tenen mielinització anormal.

El cas MS-100 de la nostra sèrie presenta una deleció de la regió cromosòmica 18q22qter, semblant als casos presentats per Versacci i col. (2005) i Linnankivi i col. (2006). Degut a que no ha estat possible aconseguir detalls clínics del nostre pacient no hem pogut fer comparacions amb els casos descrits.

5.3.24- TRISOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 19p (MS-155)

El cromosoma 19 és el que presenta més densitat gènica de l'espècie humana (Deloukas i col. 1998), per tant s'esperaria que desequilibris en aquest cromosoma comportessin grans implicacions clíniques.

La trisomia parcial del cromosoma 19p és poc freqüent. S'han publicat diferents treballs de trisomies parcials del cromosoma 19p associats a monosomies parcials d'altres cromosomes (Byrne i col. 1980; Salbert i col. 1992; Brown i col. 2000). Fins ara, només hem trobat en la literatura un únic cas, descrit per Andries i col. (2002), que presentava una duplicació de 19p terminal pura. Aquest pacient mostrava retard mental i psicomotor lleu, microcefàlia, pèl escàs, nas curt, i orelles d'implantació baixa i hiperactivitat. Compartia el retard mental, la microcefàlia, les orelles malformades i el pèl escàs amb els casos descrits anteriorment per Byrne i col. (1980) i Salbert i col. (1992). En els últims anys Nakatake i col. (2001) han relacionat el gen *FGF-22* localitzat a la banda 19p13.3, amb el desenvolupament del pèl.

El nostre pacient (MS-155) presentava una trisomia de la banda 19p13.3 detectada per HR-CGH. El cariotip del pacient havia estat definit prèviament per un altre grup com 46,XY,der(12). Per falta de suspensió cel·lular no ha estat possible comprovar si el material extra del cromosoma 19 es trobava en el cromosoma 12 derivatiu. La HR-CGH no va mostrar desequilibri en el cromosoma 12. Cap dels casos descrits, fins al moment, amb trisomia 19p deriven d'una translocació entre el cromosoma 12 i 19. El nostre pacient és un nen de sis anys amb retard mental i malformacions. No tenim dades clíniques més detallades, per aquesta raó

no s'ha pogut fer una bona comparació amb altres pacients descrits a la literatura però hem pogut confirmar la presència de retard mental que s'associa a la trisomia parcial del cromosoma 19p.

5.3.25-TRISOMIES PARCIALES EN EL CROMOSOMA 20 (MS-46, MS-65, MS-76 i MS-96)

En el nostre estudi hem trobat quatre pacient amb trisomies parcials del cromosoma 20: dos amb trisomies parcials del braç curt (MS-46 i MS-96) i els altres dos casos (MS-65 i MS-76) amb trisomies molt més petites del braç llarg del cromosoma 20.

- **Trisomia parcial 20p (MS-46 i MS-96)**

La trisomia parcial 20p és una anomalia cromosòmica rara i, fins ara, s'han descrit uns 36 casos (Molina-Gomes i col., 2006). Tots ells van ser diagnosticats postnatalment, excepte un fetus que mostrava anencefàlia i un altre fetus amb translucència nucal incrementada.

En la nostra sèrie hem trobat un sol cas (MS-96) amb trisomia 20p "pura", és a dir com única anomalia cromosòmica, que va ser determinat postnatalment. L'altre cas de la nostra sèrie, portadora d'una trisomia parcial 20p, també presentava una monosomia parcial Xp resultat de la segregació meiótica desequilibrada en la mare portadora d'una translocació t(X;20) "aparentment" equilibrada.

Dels 36 casos descrits a la literatura amb trisomies 20p, només sis eren *de novo*, la majoria s'havien originat a partir d'una translocació parental i implicaven altres cromosomes, com en el nostre pacient. Aquests resultats suggereixen una elevada tendència a les reorganitzacions cromosòmiques associades a la regió 20p.

El fenotip associat a la trisomia parcial 20p inclou retard mental i psicomotor però amb un creixement normal, cara rodona amb galtes prominents, anomalies dentals i vertebrals, coordinació motora i parla pobra. També s'hi associa, però amb menys freqüència, la presència d'occipital aplanat, hipertelorisme, epicant, estrabisme, nas curt amb narius grans, defectes congènits del cor i anomalies als dits de mans i peus (Oppenheimer i col. 2000).

El pacient MS-96, amb una trisomia 20p11.2p13, clínicament presenta característiques típiques de la trisomia 20p com retard mental i anomalies vertebrals. Però també evidenciava microcefàlia, microftàlmia, estatura baixa i els ronyons petits que no hem trobat que s'hagin associat en la literatura amb la trisomia 20q.

L'altre pacient (MS-46) presenta una trisomia 20p11.2q13.3 acompanyada d'una monosomia en Xp21p22.3 derivada d'una translocació equilibrada en la mare i subseqüent segregació meiótica desequilibrada. A nivell fenotípic presentava fissures palpebrals mongoloides, parla molt pobre, retard psicomotor discret i comunicació interauricular (CIA) per *ostium secundum* que són trets característics de la trisomia 20p. Però a més, s'hi observava paladar estret i alt, coll curt i solc simià bilateral que tampoc s'han associat a la trisomia

20p. En aquest cas la presentació clínica pot estar influenciada per la monosomia parcial del cromosoma X o per la inactivació del cromosoma X derivatiu que faria que no hi hagués efecte o que l'efecte sigués més lleu que l'observat en la trisomia parcial de 20p "pura" al inhibir-se l'expressió gènica. Per exemple, en el nostre pacient no es presenta retard mental ni alteracions vertebrals.

- **Trisomia parcial 20q - Monosomia 10q terminal (MS-65 i MS-76)**

A la nostre sèrie hem identificat dos pacients (MS-65, MS-76) que presentaven alhora una trisomia parcial 20q i una monosomia parcial del 10q que han estat discutits a l'apartat 5.3.14.

5.3.26- TRISOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 21q (MS-196)

La síndrome de Down (OMIM:#190685) està associada a uns trets fenotípics concrets i apareix quan existeix una trisomia total o parcial del cromosoma 21.

La major part dels trets clínics que defineixen la síndrome de Down han estat associats a la duplicació d'una regió crítica localitzada a la banda 21q22.3 (Delabar i col. 1993).

El cas MS-196 de la nostra sèrie presenta una trisomia de 21q21 i va ser diagnosticat prenatalment al detectar-se una ectàsia pièlica bilateral a les 21 setmanes de gestació. La parella va decidir fer una interrupció de l'embaràs i malauradament no va ser possible aconseguir dades de l'anatomia patològica. Cal destacar que no hem trobat cap cas descrit a la literatura amb duplicació 21q21, però, creiem que possiblement el nostre pacient no hagués presentat la típica síndrome de Down ja que la trisomia no incloïa la regió crítica per la síndrome.

5.4- TRISOMIES I MONOSOMIES GONOSÒMIQUES: CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

Les anomalies en els cromosomes sexuals apareixen en aproximadament 0.2% dels nounats (Robinson i col. 1998). Entre les anomalies més comunes i que tenen un fenotip associat destaquen els cariotips 45,X, 47,XXY, 47,XXX i 47,XYY. Per contra, hi ha altres anomalies, menys freqüents, que no tenen associat un fenotip clar degut probablement al baix nombre de casos descrits i també perquè moltes vegades el fenotip associat és lleu.

La patologia associada a alteracions dels cromosomes sexuals depèn, no només de les zones cromosòmiques delecionades o duplicades. Depèn també d'altres aspectes com la inactivació del cromosoma X, la implicació de les regions pseudoautosòmiques o de la presència/absència del gen *SRY* (sex-determining region Y).

Les regions distals Xp i Yp contenen seqüències d'ADN molt semblants (PAR1). Durant la meiosi masculina hi ha recombinació entre aquestes regions altament homòlogues (regions pseudoautosòmiques). També existeixen unes altres regions pseudoautosòmiques (PAR2) localitzades als extrems Xq i Yq que també semblen recombinar en la meiosi masculina (Freije i col. 1992)

Al llarg del nostre estudi hem identificat monosomies i trisomies parcials que impliquen els cromosomes sexuals (Fig.40). Entre elles hem trobat tant anomalies aïllades, és a dir, sense implicar cap cromosoma autosòmic (deu casos), com delecions en Xp associades a altres alteracions en cromosomes autosòmics (dos pacients).

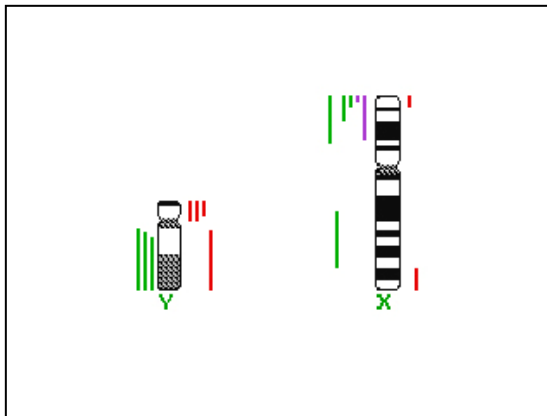


Fig.40- Ideograma representant les monosomies i trisomies parcials de cromosomes sexuals trobades en el present estudi. Les monosomies parcials s'han representat en verd i les trisomies parcials en vermell. En color lila s'han marcat dues monosomies parcial del X associades a trisomies parcials autosòmiques.

5.4.1- ALTERACIONS ESTRUCTURALS DEL CROMOSOMA X

En les cèl·lules somàtiques d'una dona amb cariotip normal (46,XX), només es manté actiu un dels cromosomes X. La inactivació és a l'atzar, tant es pot inactivar el cromosoma X patern com el matern. El gen que sembla ser el responsable de la inactivació, gen *XIST* (*X-inactive-specific transcript*) s'ha identificat i seqüenciat i només s'expressa al cromosoma X inactiu (Brown i col. 1991). Es localitza al centre d'inactivació del cromosoma X (XIC), a la banda Xq13 (Fig.41). S'ha de tenir en compte, però, que no tots els gens del cromosoma X inactivat es silencien i aquest fet podria explicar el fenotip Turner per l'efecte de la monosomia dels gens que normalment no s'inactiven en cap dels dos cromosomes de la dona (Zinn i col. 1998).

Generalment, les alteracions estructurals del cromosoma X en dones s'associen a una clínica més lleu que en homes. Aquest fet s'ha associat a la inactivació preferencial del cromosoma X desequilibrat en el cas de les dones. La presència d'alteracions fenotípiques lleus en dones portadores de translocacions desequilibrades t(X;autosoma) es podria explicar per l'existència d'una inactivació preferencial del cromosoma X amb la translocació respecte el cromosoma X normal (Blennow i col. 1999). Actualment, es sap que aquesta inactivació preferencial no sempre es compleix (Chen i col. 2006c). Per contra, si en una dona el cromosoma X presenta una translocació equilibrada es tendeix a la inactivació del cromosoma X

normal evitant així la monosomia que implicaria la inactivació del fragment del cromosoma autosoma translocat al cromosoma X.

En el nostre estudi hem caracteritzat: dos casos amb deleció parcial de Xp (MS-21 i MS-25), un cas amb deleció parcial de Xq (MS-32), un cas amb guany parcial de Xp resultat d'una inserció d'aquest en el cromosoma Y (MS-56), un cas amb deleció parcial de Xp i guany parcial de Xq (MS-97) i finalment dos casos amb translocacions desequilibrades cromosoma X;autosoma (MS-46 i MS-129).

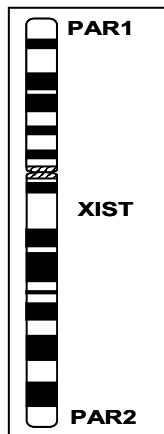


Fig. 41- Ideograma del cromosoma X on s'indiquen les regions pseudo-autosòmiques (PAR1 i PAR2) i el gen *XIST* (*X-inactive-specific transcript*).

5.4.1.1- Monosomies/Trisomies parcials del cromosoma X (MS-21, MS-25, MS-32 i MS-97)

Les monosomies/trisomies parcials del cromosoma X són relativament freqüents. Tenen expressió fenotípica molt variable però s'han descrit algunes regions crítiques. La regió Xp11.2p22.1 sembla ser la responsable de diferents trets presents en la síndrome de Turner (Zinn i col. 1998). En canvi, les delecions en Xq s'associen principalment a amenorrea primària o secundària. S'han descrit dones fèrtils amb delecions de Xq però aquestes delecions es trobaven en Xq21 o en regions més distals (Toniolo, 2006).

En el nostre estudi hem caracteritzat dues pacients que presentaven la deleció Xp22.3 (MS-21) i la Xp22.1pter (MS-25). Una dona amb monosomia Xq21.3q26 (MS-32) i una altre amb dos alteracions alhora, la deleció Xp11.4p22.3 i la duplicació Xq27q28 (MS-97). En tots aquest casos, el fenotip va ser femení i a part del cromosoma X alterat (parcialment duplicat i/o deleccionat) hi havia sempre un cromosoma X normal.

El cas MS-21 presentava una clínica alterada (lleu): talla baixa i deformatat de Madelung (torsió de l'extrem inferior del radi amb dislocació del cúbit cap a darrera). Dels casos MS-25 i MS-32, diagnòsticats prenatalment, no disposem d'informació clínica encara que probablement la clínica associada hagués estat lleu per l'efecte de la inactivació del cromosoma X alterat.

El cas MS-97 presentava característiques Turnerianes (talla baixa, lleugera ptosi i cabell d'implantació baixa). A més s'hi observava *cubitus valgus* amb lleugera limitació de la pronosupinació, menarquia als 13 anys amb menstruació irregular i metrorràgies. Probablement el mal funcionament del ovaris en aquest cas és degut a la deleció de la regió

Xq27qter que es troba dins la regió "crítica" (Xq13q27) pel funcionament ovàric normal (Therman i col. 1990). El cas publicat per Chen i col. (2006c) presentava delecionada la mateixa regió cromosòmica que la nostre pacient però a més tenia una trisomia 5q21qter i presentava disfunció ovàrica a més de retard mental. En la nostra pacient no s'observa retard mental probablement perquè aquest tret podria deure's a la presència de la trisomia parcial de 5q.

5.4.1.2- Translocacions cromosoma X-autosoma (MS-46 i 129)

Les translocacions X-autosoma generalment tenen origen matern o són *de novo* (Kalz-Füller i col. 1999). L'efecte de la translocació dependrà del sexe de l'individu, els punts de trencament i el patró d'inactivació (Kalz-Füller i col. 1999; Waters i col. 2001). Les dones solen tenir un fenotip més lleu ja que en aquestes, normalment, la inactivació del cromosoma X derivatiu es dona preferentment quedant així inactivada també la regió del cromosoma autosòmic que estaria en trisomia (Blennow i col. 1999). En els homes no hi ha aquesta opció.

En la nostra sèrie hem estudiat dos casos que presenten translocació desequilibrada entre el cromosoma X i un autosòmic. En el cas MS-46 la translocació era t(X;20)(p11.2;p11.2) i d'origen matern mentre que en el cas MS-129 era t(X;12)(p22.2;p12.3) i l'origen era desconegut. L'afectació clínica dels dos casos s'ha discutit en l'apartat 5.3.25 corresponent a les trisomies 20p (MS-46) i en l'apartat 5.3.17 corresponent a trisomies 12p (MS-129). Per la zona de Xp delecionada en els dos casos semblaria que la pacient MS-46 hauria d'estar més afectada ja que inclou la regió que s'ha descrit com crítica per la presentació de característiques Turnerianes (Zinn i col. 1998), mentre que el cas MS-129 no la inclou.

5.4.2- ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ESTRUCTURALS DEL CROMOSOMA Y

Al cromosoma Y se li han associat principalment dues funcions. Una d'elles és la determinació sexual, controlada pel gen *SRY* i l'altra és el control de l'espermatogènesi pel *cluster* dels gens *AZF* (factor d'azoospermia). Aquest cromosoma es caracteritza per contenir dues regions pseudoautosòmiques (*PAR1* i *PAR2*) que s'aparellen amb el cromosoma X durant la meiosi. Al braç llarg del cromosoma Y es troben localitzats el *cluster* de gens *AZF* (*AZFa*, *AZFb* i *AZFc*) i a la banda Yp11.3 el gen *SRY* (que és un dels gens implicats en la determinació sexual) (Fig.42). Alteracions en el cromosoma Y, depenent de la zona afectada, poden influir en la determinació sexual i en la fertilitat de l'individu, encara que també s'hi ha associat altres aspectes com per exemple l'estatura de l'individu (Kirsch i col. 2002, Kleinman i col. 2004, DesGroseilliers i col. 2006, Bruyère i col. 2006).

En la sèrie estudiada hem caracteritzat sis casos amb alteracions cromosòmiques que implicaven el cromosoma Y. Entre ells, tenim un pacient amb deleció del cromosoma Y (MS-91), dos casos amb un isocromosoma Yp (MS-73 i MS-183), un altre cas amb una inserció de material del cromosoma X en el cromosoma Y (MS-56), un home amb cariotip XX (amb material de la

banda cromosòmica Yp11.2p11.3 addicionat al Xp corresponent al cas MS-184) i una translocació desequilibrada entre el cromosoma Y i el 15 (MS-197).

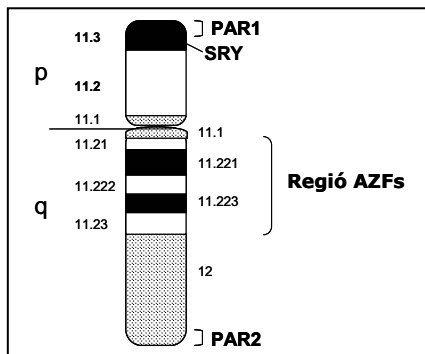


Fig.42- Ideograma del cromosoma Y on es mostra la localització de les dues region pseudoautosòmiques (*PAR1* i *PAR2*), del gen *SRY* (*sex-determining region Y*) i de la regió del cluster de gens *AZFs* (*azoospermic factors*).

5.4.2.1- Monosomies parcials del cromosoma Y (MS-91)

La majoria de casos publicats fins ara (Kirsch i col. 2002, Kleinman i col. 2004, DesGroseilliers i col. 2006, Bruyère i col. 2006) amb monosomies parcials de Yq mostren fenotip de baró i normalment tenen estatura baixa i infertilitat. La infertilitat es deu a la deleció del *cluster* de gens *AZF*. Un estudi recent portat a terme per Hadj-Kacem i col. (2006) en el que es van analitzar les microdeleccions en el cromosoma Y d'una població que presentava infertilitat, ha revelat que el gen més freqüentment deletat en aquesta població era l'*AZFc* com ja havien descrit prèviament Machev i col. (2004).

En la nostra sèrie hem caracteritzat un cas amb cariotip 45,X,del(Y)(q11.22), der(14;15)(q10;q10)pat que presenta un fenotip normal i esterilitat primària per oligoastenozoospermia severa que es pot explicar perquè la banda Yq11.23 perduda és on es localitza el cluster de gens *AZF*. Cal esmentar que l'estudi per PCR de les microdeleccions del cromosoma Y no va confirmar la regió deletada detectada tant per la CGH com per la HR-CGH (dades cedides per Marta Carrera).

5.4.2.2- Cromosomes Y isodicèntrics (MS-73 i MS-183)

Els cromosomes Yp isodicèntrics (idic Yp) s'han associat a un ampli ventall de fenotips en els casos detectats postnatalment (Bruyère i col. 2006). S'han associat a fenotips de la síndrome de Turner (Patsalis i col. 2005) o amb talla baixa com única alteració (Guedes i col. 2006). També s'han associat a pacients amb genitals ambigus (Marrocco i col. 2003), a nens fenotípicament normals però amb agenèsia renal unilateral (Hernando i col. 2002a), nens amb retard mental aïllat (Neas i col. 2005) o amb anomalies craniofacials (Stankiewicz i col. 2001), estatura baixa i masculinització incompleta (Kozstolanyi, 1988) i a homes infèrtils amb estatura baixa (Takahara i col. 1993) o a homes fenotípicament normals però infèrtils (Álvarez-Nava i col. 2003). Els casos detectats prenatalment són rars i a més en molt pocs ha estat possible fer un seguiment dels pacients.

Tots els pacients descrits fins al moment amb cromosomes Yp isodicèntrics mostraven l'alteració *de novo*, fet que recolzaria la hipòtesi que els individus amb cromosomes Yp isodicèntrics són infèrtils degut a la disrupció del *cluster* de gens *AZF*. En el cas MS-73 de la nostra sèrie es confirma l'herència *de novo* i en el cas MS-183 no va ser possible aconseguir aquesta informació però probablement sigui heretat *de novo*.

Normalment aquest tipus de cromosoma es troba en mosaic degut a la naturalesa inestable dels cromosomes isodicèntrics. S'ha suggerit que la proporció de cèl·lules amb cromosomes Y isodicèntrics en el teixit gonadal respecte l'altra línia cel·lular quan aquesta és 45,X determina el sexe del pacient (Alvarez-Nava i col. 2003; Guedes i col. 2006). En els nostres pacients (MS-73 i MS-183) el sexe és masculí i en cap cas hem trobat una línia cel·lular 45,X. En el cas MS-73 el cromosoma Y isodicèntric es troba en mosaic amb una línia normal XY, encara que la línia normal només representa un 22% de les cèl·lules. Aquest fet evidencia que el trencament en el cromosoma Y precedent a la formació del cromosoma Yp isodicèntric es va donar postzigòticament. En l'altre cas estudiat (MS-183) el cromosoma Y isodicèntric es troba en totes les cèl·lules analitzades. Aquest fet manifesta una estabilització primerenca del cromosoma isodicèntric amb la inactivació d'un dels centròmers del cromosoma.

El pacient MS-73 presenta un fenotip concordant amb la síndrome de *Weaver* (maduració i creixement ossi accelerat, aparença craniofacial inusual, hipertonia amb camptodactília, retard psicomotor i hèrnies). Revisant la literatura es veu que aquest és el primer cas amb cromosoma isodicèntric Yp associat a aquest fenotip. Encara que no es pot descartar que aquest fenotip estigui causat per una altra alteració cromosòmica críptica no detectada amb les tècniques utilitzades. El cas MS-183 presenta retard mental coincidint amb altres casos descrits portadors de cromosomes Y isodicèntrics (Neas i col. 2005). Comparant amb casos similars publicats en la literatura es veu una gran diversitat en el fenotip associat, mostrant-se des de fenotip normal (Bruyère i col. 2006) fins a pacients amb trets dismòrfics i amb retard del llenguatge (DesGroseilliers i col. 2006).

5.4.2.3- Translocació cromosoma Y-autosoma (MS-197)

Les translocacions entre el cromosoma Y i un cromosoma autosòmic tenen una freqüència en la població de 1/2.000 individus (Alitalo i col. 1988). En la majoria de casos (70%) es tracta de translocacions amb punts de trencament localitzats als braços curts d'un cromosoma acrocèntric i en l'heterocromatina del braç llarg del cromosoma Y (Rajcan-Separovic i col. 2001).

Una de les més freqüents és la que implica el Yq (amb punts de trencament a la regió Yq12) i el braç curt del cromosoma 15. Aquesta alta freqüència pot ser conseqüència d'una associació al paquetè en la meiosi masculina entre l'heterocromatina de 15p i Yq degut a seqüències homòlogues (Metzler-Guillemain i col. 1999). Aquest tipus de translocació moltes vegades es transmet a la generació següent i generalment s'accepta que no té conseqüències en el fenotip incloent una fertilitat normal (Fryns i col. 1985; Alitalo i col. 1988).

En el present estudi, en el cas MS-197 s'ha caracteritzat una translocació $t(Y;15)(q11.2;p11)$ *de novo*. En la bibliografia no hi ha cap altre cas descrit portador d'una translocació amb aquests punts de trencament. La tècnica de M-FISH va mostrar que el material addicionat al cromosoma 15 procedia del cromosoma Y i a més per HR-CGH es va determinar el guany de la banda Yq11.2 posant de manifest que aquesta regió era la que estava inclosa en la translocació. D'aquest cas, detectat prenatalment, no va ser possible obtenir dades clíniques.

5.4.2.4- Inserció X:Y (MS-56)

Les translocacions que impliquen els braços curts dels cromosomes X i Y són rares i una de les conseqüències millor conegudes són els homes 46,XX i les dones 46,XY degut a la translocació del gen *SRY* responsable de la reversió sexual (McElreavey i Cortes, 2001). En alguns casos la translocació pot resultar en una disomia funcional de part del braç curt del cromosoma X. Depenent de les bandes cromosòmiques implicades en la disomia es podrà manifestar una reversió sexual, també retard mental, anomalies facials menors i estatura baixa (Lugtenberg i col. 2005). La reversió sexual podrà aparèixer quan la disomia funcional inclogui el gen *DAX1* (DSS-AHC critical region on the X, gene 1) localitzat a la banda Xp21 (Swain i col. 1998). Segons la literatura, els homes amb duplicació parcial de Xp presenten una clínica diversa. Per exemple, el pacient descrit per Bonnet i col. (2005) amb una duplicació de la regió Xp11.22p11.23 presentava retard mental lleu, comportament autístic, talla baixa i trets dismòrfics lleus. Normalment, les regions pseudoautosòmiques de X i Y (*PAR1* i *PAR2*) s'aparellen i intercanvien material genètic. Ocasionalment, però, recombinacions aberrants poden donar lloc a translocacions entre altres regions dels cromosomes X i Y. En la bibliografia s'han descrit diferents exemples de translocacions X:Y (Frints i col. 2001; Chagnon i col. 2006). Aquest fet podria explicar la inserció de material del braç curt del cromosoma X en el braç curt del cromosoma Y en el nostre pacient.

En la nostra sèrie hem caracteritzat un fetus (MS-56) amb una inserció, *de novo*, de la banda Xp22.2 al braç curt del cromosoma Y. L'ecografia d'alta resolució era normal i el sexe ecogràfic masculí. El diagnòstic prenatal es va realitzar per anomalia cromosòmica detectada en un embaràs previ de la parella. El perfil de CGH pel cromosoma Y no ha mostrat cap pèrdua. Aquest fet concordaria amb el fenotip masculí del fetus ja que el gen *SRY* no s'hauria perdut i la banda Xp21.2, on es localitza el gen *DAX1*, no està implicada en la disomia. No hem trobat en la literatura cap cas que presentés la mateixa alteració cromosòmica que la descrita.

5.4.2.5- Home XX (MS-184)

Els homes amb cariotip 46,XX són rars i es troben amb una freqüència de 1/20.000-1/25.000 nounats (De La Chapelle i col. 1972).

S'han identificat tres tipus fenotípics d'homes XX: homes amb genitals interns i externs normals, homes amb genitals ambigus (normalment detectats al naixement) i els homes hermafrodites vertaders. En tots tres tipus, el fenotip va acompanyat d'esterilitat deguda a

l'absència del braç llarg del cromosoma Y, on es localitzen els gens *AZF* relacionats amb l'espermatogènesi/azoospermia.

El nostre pacient (MS-184) s'inclou en el primer grup ja que és un home que presenta genitals interns i externs normals i azoospermia.

A nivell molecular aproximadament el 90% dels homes XX sense ambigüitats als genitals tenen material genètic del cromosoma Y al seu cariotip, incloent el gen *SRY*. En aquests casos el desenvolupament testicular es pot explicar per la presència d'aquest gen ja que té la funció de determinar el desenvolupament del sexe masculí. Per contra, la majoria de casos d'homes XX que són *SRY* negatius mostren ambigüitat als genitals externs. Però hi ha hagut algunes excepcions (Valetto i col. 2004; Rajender i col. 2006) i s'ha hipotetitzat que en aquests casos podria estar mutat un altre component dins la via de factors determinants del fenotip sexual. La majoria dels homes XX són portadors del gen *SRY* resultant d'un intercanvi de material genètic entre els cromosomes X i Y durant la meiosi paterna (Fechner i col. 1993). El nostre pacient s'inclou en aquest grup ja que amb la tècnica de CGH i HR-CGH, utilitzant com control un individu XY vam determinar el guany de tot el cromosoma X i la pèrdua de Yp11.2q12. Per tant, es podria assumir que el pacient a més de presentar dos cromosomes X sencers presenta la regió Yp11.2p11.3. Aquest fet es va confirmar per la M-FISH amb la qual es va determinar que part del cromosoma Y es trobava addicionat a l'extrem del braç curt del cromosoma X. En el nostre grup ja s'havia descrit amb anterioritat un altre cas de baró XX com el nostre que presentava tres regions PAR1 (dos del cromosoma X i una del Y) (Rigola i col. 2002b).

5.5- CROMOSOMES EN ANELL

Els cromosomes en anell són el resultat del trencament del braç curt i llarg d'un mateix cromosoma i la posterior reunió dels braços trencats. Normalment, aquest fet porta a l'aparició d'una monosomia parcial d'aquest cromosoma. Els cromosomes en anell, en general, són inestables i per això moltes vegades es troben en mosaic. Però també s'han trobat cromosomes en anell estables (Gardner i Sutherland, 1996). El fenotip associat als portadors de cromosomes en anell dependrà dels gens perduts (monosomia parcial) o guanyats si l'anell és supernumerari (trisomia parcial). I també dependrà del grau de mosaïcisme en el que es trobi el cromosoma en anell.

En la nostra sèrie hem caracteritzat dos casos (MS-120 i MS-179) que presentaven un cromosoma en anell en el seu cariotip. En els dos casos el cromosoma en anell era un acrocèntric. En un cas es tractava del cromosoma 13 (MS-120) i en l'altre cas (MS-179) el cromosoma implicat era el 15. En el cas MS-120 el cromosoma en anell es trobava en mosaic compartit amb una línia cel·lular monosòmica pel cromosoma 13 que indicava la inestabilitat característica dels cromosomes en anell. En canvi en el cas MS-179 el cromosoma 15 en anell es trobava en totes les cèl·lules analitzades. Com que no va ser possible estudiar altres teixits no es va poder comprovar si existia mosaïcisme en altres tipus cel·lulars del pacient (MS-179).

5.5.1- ANELLS DEL CROMOSOMA 13 (MS-120)

Els trets clínics de la síndrome del cromosoma 13 en anell inclouen retard mental, retard en el creixement, microcefàlia, dismorfies facials, malformacions genitals, atrèsia anal, malformacions oculars, retinoblastoma i anomalies en les mans o peus. Encara que no s'ha pogut establir una correlació clara entre el punt de trencament i la clínica (Brandt i col., 1992). Per exemple, Bedoyan i col. (2004) van descriure un cas de transmissió d'un anell del cromosoma 13, r(13)(p13q34), via materna essent el fenotip que mostra tant la mare com la filla molt lleu comparat amb altres casos descrits amb els mateixos punts de trencament.

El cas MS-120 descrit a la nostra sèrie presenta un cromosoma en anell, r(13)(q12q31), en mosaic amb una línia cel·lular amb monosomia de tot el cromosoma 13. Tant la CGH com la HR-CGH detectaven la pèrdua de tot el cromosoma 13. Amb el perfil de CGH, però, va ser possible determinar quina regió probablement formava el cromosoma en anell ja que aquesta regió no es veia tant perduda en el perfil de CGH encara que no es va poder comprovar per BACs ja que no disposàvem de material fixat en *carney*.

Aquest cas va ser detectat prenatalment a les 22 setmanes de gestació degut a la presència en el fetus de múltiples malformacions observades al realitzar l'estudi ecogràfic rutinari. Malauradament no va ser possible obtenir més informació de les malformacions concretes que presentava. Pensem que la monosòmia total del cromosoma 13 en mosaic podria ser la causa de les múltiples malformacions presents en aquest fetus.

5.5.2- ANELLS DEL CROMOSOMA 15 (MS-179)

Els cromosomes 15 en anell són rars (Schinzel, 2001). En alguns estudis s'ha vist la transmissió generacional d'aquests anells, majoritàriament via materna (Nikitina i col. 2003). L'espectre clínic associat a aquesta alteració citogenètica és molt ampli. La variabilitat clínica pot ser deguda al nivell de mosaïcisme de l'anell, a la variació del grau de mosaïcisme en els diferents teixits, a la mida de la regió delecionada en l'anell, a l'origen parental de l'anell i a la seva inestabilitat mitòtica (Glass i col. 2006). Malgrat aquesta variabilitat, s'ha establert un fenotip associat als anells del cromosoma 15. La síndrome del cromosoma 15 en anell es caracteritza pel retard en el creixement, microcefàlia, cara triangular, braquidactília i retard mental variable (Tümer i col. 2004). A més, també s'hi ha associat peu equí, sindactília dels dits dels peus i malformacions urogenitals. S'hi ha associat retard en el creixement en pacients amb cromosoma 15 en anell degut a delecio del gen *IGF1R* (*insuline-like growth factor 1 receptor gene*, MIM 147370) que es localitza a la banda 15q26.3 (Tümer i col. 2004).

En la nostra sèrie hem detectat un cromosoma 15 en anell en un cas (MS-179). El cromosoma en anell s'ha observat en totes les metafases analitzades i s'ha originat *de novo*. El nostre pacient mostra similituds amb la clínica relacionada amb la síndrome del cromosoma 15 en anell ja que presenta microcefàlia, estatura baixa i braquidactília. L'obesitat, el paladar alt i arquejat, les taques acròmiques, mans petites i el retard en la parla presents en el nostre cas també s'han descrit en altres casos de cromosoma 15 en anell encara que no majoritàriament

(Tümer i col. 2004, cas 2). Per tant la clínica presentada pel nostre cas s'ajusta perfectament al quadre clínic associat a la síndrome del cromosoma 15 en anell.

5.6- ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES CRÍPTIQUES

Les alteracions críptiques, en especial les subtelomèriques desequilibrades, són una causa important de retard mental associat a anomalies congènites. Les regions subtelomèriques són riques en gens i en els últims anys s'han vist implicades en molts casos que presentaven retard mental i/o malformacions congènites (de Vries i col. 2003; Gignac i col. 2006). La incidència de desequilibris subtelomèrics en poblacions amb retard mental i/o anomalies congènites s'ha descrit en un rang de 4%-28% per diferents autors (de Vries i col. 2003; Novelli i col. 2004; Soogard i col. 2005; Northrop i col. 2005).

En la nostra sèrie hem estudiat 49 casos que presentaven cariotip normal i malformacions congènites amb les tècniques de CGH, HR-CGH, M-FISH i/o MLPA per tal de detectar possibles desequilibris cromosòmics críptics que expliquessin la seva clínica.

En nou casos hem caracteritzar deleccions aïllades, en un cas un guany aïllat i en quatre es va determinar una combinació de guany i pèrdua degut a la presència d'un cromosoma derivatiu que provenia d'una translocació equilibrada familiar (encara que en un pacient, MS-181, no va ser possible confirmar-ho). Per tant, en un 71,4% (35/49) dels casos de la sèrie estudiada que presentaven cariotip normal (Taula 17; apartat de resultats) no va ser possible determinar cap alteració cromosòmica que pogués ser responsable de la clínica alterada dels pacients. Podem dir, però, que en tots aquest pacients s'han descartat tant l'existència de desequilibris superiors a 3 Mb (que és el límit de resolució de la HR-CGH) com l'existència de desequilibris subtelomèrics (gràcies a la tècnica de MLPA).

5.6.1- MICRODELECCIONS/MICRODUPLICACIONS (MS-79, MS-137, MS-145, MS-153, MS-157, MS-163, MS-166, MS-172, MS-185 i MS-187)

Les microdeleccions/microduplicacions cromosòmiques, no visibles per tècniques de citogenètica convencional, s'han associat repetidament a pacients amb retard mental i malformacions congènites (Kirhhoff i col. 2001; Lisenka i col. 2003; Soogard i col. 2005; Palomares i col. 2006). Tècniques basades en FISH (CGH, HR-CGH array-CGH i sondes *locus* específiques) i també tècniques basades en la PCR (com per exemple la MLPA) han estat imprescindibles per caracteritzar aquestes alteracions.

En la nostra sèrie hem trobat 10 pacients portadors de petites monosomies o trisomies parcials. En tres d'ells (MS-79, MS-153 i MS-172) es van identificar deleccions terminals aïllades que inclouen les regions subtelomèriques; la resta dels pacients presentaven afectades petites regions intersticials (MS-137, MS-145, MS-157, MS-163, MS-166, MS-185 i MS-187). S'ha de destacar que només en un cas (MS-145) s'ha detectat una microduplicació i que en la resta es

tractava de delecions. Aquest fet es podria explicar perquè les duplicacions sovint tenen un efecte més lleu en el fenotip i passen més desapercebudes.

En el nostre estudi les microdelecions/microduplicacions detectades han implicat a diferents cromosomes: # 1 (MS-185), #2 (MS-153), #3 (MS-163), #4 (MS-172), #6 (MS-145 i MS-187), #8 (MS-157), #11 (MS-166), #15 (MS-137) i # 17 (MS-79).

5.6.2- TRANSLOCACIONS SUBTELOMÈRIQUES CRÍPTIQUES FAMILIARS (MS-65, MS-76, MS-88 i MS-181)

Les reorganitzacions críptiques subtelomèriques desequilibrades són, com hem comentat, una causa important de retard mental associat a anomalies congènites. S'ha suggerit que els cromosomes no homòlegs comparteixen regions repetitives localitzades als telòmers que poden potenciar el mal aparellament meiótic i facilitar les translocacions terminals (Ledbetter, 1992). Adeyinka i col. (2005) van determinar que un alt percentatge (65%) dels pacients que van estudiar presentaven alteracions subtelomèriques degut a la presència d'un cromosoma derivatiu que era resultat d'una mala segregació meiótica d'una translocació equilibrada familiar. L'alta incidència de translocacions críptiques desequilibrades familiars en pacients amb retard mental i/o malformacions congènites ja s'havia descrit amb anterioritat (Knight i col. 1999).

En la nostra sèrie s'han determinat quatre casos (MS-65, MS-76, MS-88 i MS-181) amb translocacions desequilibrades de regions cromosòmiques terminals. El cas MS-65 i MS-76 són membres d'una mateixa família i presenten la mateixa translocació desequilibrada que implica els cromosomes 10 i 20. En el cas MS-88 la translocació desequilibrada afecta els cromosomes 7 i 8 i té un origen familiar ja que la mare presenta la translocació equilibrada. El pacient MS-181 presenta una translocació desequilibrada entre els cromosomes 7 i 15 però en aquest cas no va ser possible estudiar els pares per confirmar si es tractava d'una alteració familiar. Així, en el nostre estudi, la majoria dels casos amb cromosomes derivatius críptics provenien de translocacions equilibrades familiars. Aquests resultats estan d'acord amb les publicacions de Knight i col. (1999) i Adeyinka i col. (2005) que com hem dit abans ressaltaven la importància de les translocacions subtelomèriques críptiques desequilibrades familiars com causa de retard mental i anomalies congènites. Tots aquest resultats mostren que quan un membre de la família té una monosomia associada a una trisomia subtelomèrica probablement és el resultat de la presència d'un cromosoma derivatiu. Així doncs, quan es caracteritza un desequilibri críptic cal fer l'estudi familiar per confirmar, o descartar, la presència de translocacions críptiques familiars per tal de poder donar un consell genètic més acurat.

5.6.3- REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES "APARENTMENT" EQUILIBRADES (MS-45, MS-117 i MS-118)

Les translocacions recíproques aparentment equilibrades entre dos cromosomes són relativament freqüents, es troben aproximadament en 1 de cada 500 individus (Jacobs i col. 1974). Per establir una bona correlació genotip-fenotip és de vital importància caracteritzar si la reorganització cromosòmica és realment equilibrada. En els últims anys s'han publicat diferents treballs on s'evidencia la importància de les tècniques de citogenètica molecular per a la caracterització de desequilibris i dels punts de trencament de les reorganitzacions (Ness i col. 2002, Hoffer i col. 2006).

En la nostra sèrie s'han caracteritzat postnatalment tres pacients amb anomalies clíniques que eren portadors de translocacions recíproques aparentment equilibrades al ser estudiades per bandes G. Pel que fa a l'origen de l'alteració cromosòmica, en el cas MS-117 era d'origen matern mentre que en el MS-118 era *de novo*. En el cas MS-45 no va ser possible determinar l'origen de l'alteració cromosòmica.

Els cromosomes implicats en les translocacions van ser els cromosomes 1 i 14 (MS-45), els cromosomes 6 i 19 (MS-117) i el 5 i 6 (MS-118). L'únic cromosoma que es va trobar repetit va ser el cromosoma 6 encara que la regió cromosòmica implicada era diferent (6p21.3 en el cas MS-117 i 6p23 en el MS-118). En els tres casos es van aplicar les tècniques de CGH i HR-CGH per determinar possibles desequilibris genòmics. En el cas MS-45 vam poder observar una deleció de la banda 1p22.3 implicada en la translocació. En els altres dos casos es van descartar desequilibris del genoma superiors a 3 Mb que és el límit de resolució de la HR-CGH.

5.7- REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES COMPLEXES (RCC) (MS-77, MS-111, MS-134 i MS-147)

Les reorganitzacions cromosòmiques complexes (RCC) són alteracions estructurals que impliquen tres, o més, punts de trencament i intercanvi de material genètic entre dos o més cromosomes (Pai i col. 1980). Són rares i la majoria són *de novo*. Warburton (1991) va definir que el risc de trobar malformacions i retard mental associades a translocacions simples *de novo* era del 6.1%. Aquest risc incrementaria al tractar-se de RCC ja que quants més punts de trencament estan implicats, més probable és la disrupció gènica que condueix a anomalies fenotípiques (Batista i col. 1994, Karmous-Benailly i col. 2006). Encara que la relació entre el número de trencaments implicats en la RCC i la severitat del fenotip no sempre es compleix (Hernando i col. 2004). En aquest treball es descriu el cas d'una dona amb una RCC amb 7 punts de trencament i 4 cromosomes implicats que presenta un fenotip normal excloent amenorrea primària i absència aparent d'ovaris.

En la nostra sèrie els quatre casos portadors de RCC presentaven l'alteració cromosòmica *de novo* coincidint amb la literatura (Pai i col. 1980). En dos casos les RCC van ser diagnosticades prenatalment (MS-77 i MS-147) i en els altres dos postnatalment (MS-111 i MS-134).

Entre els casos caracteritzats postnatalment, el MS-111 presentava malformacions congènites i en el cas MS-134 no va ser possible aconseguir detalls clínics. Els altres dos casos portadors de RCC estudiats en la nostra sèrie (MS-77 i MS-147) es van diagnosticar prenatalment. El cas MS-147 es tractava d'un diagnòstic prenatal a les 17 setmanes de gestació per un cribratge bioquímic positiu. No va ser possible obtenir dades clíniques i els pares van decidir acabar amb la gestació. I el cas MS-77 també es tractava d'un diagnòstic prenatal realitzat per indicació d'edat materna avançada i ecogràficament no mostrava cap alteració (ha estat discutit a l'apartat 5.3.23).

Els punts de trencament implicats en les RCCs sembla que no són a l'atzar. En pacients amb retard mental i malformacions congènites s'ha descrit una major implicació dels cromosomes 1, 2, 7 i 11 seguit dels cromosomes 3, 4, 10, 5 i 6 en les RCC (Vermeulen i col. 2004; Borg i col. 2005; Karmous-Benailly i col. 2006). Els cromosomes implicats en les nostres RCCs són el 2 i 3 (MS-111) i el 1, 7, 2 i 6 (MS-134). És a dir, en els dos pacients hem trobat implicat el cromosoma 2 i tots els cromosomes implicats en ambdues RCCs s'han descrit amb freqüència a la literatura.

Giardino i col. (2006) van fer una revisió de 21 RCC diagnosticades prenatalment. En aquest estudi van observar que la freqüència dels cromosomes més implicat en RCC eren diferents. Així el cromosoma 4 era el més implicats, seguit dels cromosomes 6, 14, 3, 10, 2, 5, 11, 13, 15, 18, 21, 7, 16, 8, 12 i només en una de les RCC revisades es van veure els cromosomes 1, 9, 17 i 20. Segons aquestes dades els cromosomes 19, 22, X i Y mai s'han trobat implicats en RCC diagnosticades prenatalment. En el cas MS-77 els cromosomes implicats han estat el 8, 18, 12 i 13 ja descrits anteriorment. I en el cas MS-147 s'han trobat el cromosoma 4 (que és el que més freqüentment s'ha descrit en RCC prenatals) i els cromosomes 12 i 21.

Els punts de trencament implicats en les RCC en la nostra sèrie, han estat: 8p11.2, 18p11.2, 12q13 i 13q12 (MS-77), 2q33, 3p21 i 2q36 (MS-111), 1q43, 7q22, 2p25 i 6q21 (MS-134) 4p15.2, 21q22.3 i 12p13.1 (MS-147). Per tant cap banda ha estat implicada en més d'una RCC. Només tres de les 14 bandes implicades en aquestes RCCs havien estat descrites en altres RCC en la literatura: 13q12 (Drummond-Borg i col. 2002; Kim i col. 2001; Till i col. 1991), 2p25 (Schwarzbraun i col. 2006) i 21q22.3 (Weise i col. 2003).

Les RCC normalment s'identifiquen primer mitjançant tècniques de citogenètica convencional, però gràcies a l'aplicació de tècniques basades en FISH, en el nostre cas la M-FISH, la CGH i HR-CGH és possible una millor caracterització. En dos dels casos de la nostra sèrie (MS-77 i MS-111) es va determinar una pèrdua cromosòmica en un dels punts de trencament de la RCC gràcies a les tècniques de CGH i HR-CGH. En els altres dos casos (MS-134 i MS-147) no es van poder aplicar les tècniques de CGH i HR-CGH per falta d'ADN, per tant no es va poder determinar si existien desequilibris cromosòmics.

5.8- CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS

Els cromosomes marcador supernumeraris petits (sSMC) s'han descrit en 0,04% dels nounats, 0,08% dels casos prenatals, 0,2% de la població subfèrtil i en el 0,4% de pacients amb retard mental (Liehr i col. 2004a, 2004b). En la nostra sèrie hem trobat 25 pacients portadors de sSMC. Sis casos van ser diagnosticats prenatalment i dinou postnatalment. Entre aquests últims quatre presentaven problemes de fertilitat.

Per tal d'obtenir informació dels casos de sSMC publicats i així poder saber les característiques citogenètiques i fenotípiques associades ha estat de molta utilitat la pàgina: http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm confeccionada pel Dr. Thomas Liehr. En aquesta pàgina s'hi resumeixen tots els cromosomes marcador descrits fins al moment i s'hi citen les referències corresponents.

En la nostra sèrie, l'origen cromosòmic més comú implicat en els sSMC ha estat el cromosoma 15, detectat en un 29% (7/24) dels casos. En realitat hem determinat vuit casos però dos d'ells pertanyien a la mateixa família. Aquesta freqüència coincideix amb aproximadament un 30% que és la descrita a la literatura (Buckton i col. 1985; Paoloni-Giacobino i col. 1998; Liehr i col. 2006). La majoria d'aquests marcador són *inv dup* (15) que també ha estat observat a la nostra sèrie ja que un 85,7% (6/7) dels casos mostren aquesta morfologia.

El segon cromosoma marcador descrit a la literatura freqüentment és el der(22) que es troba en el 10% dels casos estudiats. En la nostra sèrie la incidència ha estat menor ja que només n'hem caracteritzat un únic cas el que representa el 4%.

El segon marcador més freqüent que hem trobat ha estat el derivat del cromosoma 13 o 21. D'aquest tipus n'hem caracteritzat sis casos. Tenint en compte que tres d'aquests casos eren membres de la mateixa família la freqüència trobada es del 17% (4/23). Cal destacar que en cinc d'aquests casos no va ser possible definir si l'origen era el cromosoma 13 o 21 ja que no contenien eucromatina i en tots ells s'observa morfologia *d'inv dup*.

Recentment s'han descrit casos de mosaïcisme críptic en alguns pacients portadors de sSMC (Starke i col. 2003; Liehr i col. 2006; Santos i col. 2007). La determinació d'aquest mosaïcisme críptic no va ser possible fins a la introducció de la tècnica de subcenM-FISH amb la qual s'estudien les regions properes al centròmer. En la sèrie estudiada hem determinat dos casos que presenten mosaïcisme críptic pel sSMC (MS-101 i MS-106).

La freqüència de sSMC d'origen familiar a la literatura és del 40% (Liehr i col. 2004). En la nostra sèrie, tenint en compte els casos en els que l'origen familiar s'ha confirmat (MS-42 i M-14) aquesta incidència ha estat del 15,3% (2/13). Aquest valor és molt més baix del que s'ha descrit però aquest fet pot ser perquè hi ha molts casos en els que no ha estat possible saber l'origen. Dins els casos familiars s'ha descrit a la literatura que la majoria es transmeten via materna. En els dos casos descrit en la nostra sèrie es compleix aquest fet encara que una de les mares portadora del cromosoma marcador (MS-42-M) a la vegada l'havia heretat via paterna.

Segons les dades publicades el 76% dels casos amb sSMC d'origen familiar no mostren anomalies clíniques mentre que el 75% dels casos amb sSMC *de novo* sí. En el nostre estudi cap de les dues famílies presenten alteracions fenotípiques exceptuant la infertilitat en un dels casos (M-14). En els casos en els que l'origen del sSMC és *de novo* (11 casos) un 72,7% (8/11) presentaven alteracions fenotípiques, fet que s'aproxima a les dades publicades (Liehr i col. 2006).

En la nostra sèrie s'ha constatat l'existència d'una relació directa entre la presència d'euromatina en el cromosoma marcador i alteracions fenotípiques i per contra, també s'ha relacionat l'absència d'aquesta amb un fenotip normal. Aquestes observacions han estat també descrites a la literatura amb anterioritat (Liehr i col. 2006). Però, cal esmentar que hem trobat algunes excepcions com en el cas MS-82 i MS-113 en els que no es va detectar euromatina i en canvi s'hi presentaven alteracions fenotípiques. Aquest fet podria perquè la presència d'euromatina no va poder ser detectada amb les tècniques utilitzades, a un efecte de disomia uniparental o bé una altra alteració cromosòmica no caracteritzada. És interessant destacar que la banda euromàtica 9p12 "extra" present en el cas MS-106 no va associada a alteracions fenotípiques, amb excepció d'infertilitat. Aquest fet està d'acord amb la bibliografia ja que aquesta banda ja s'havia definit com variant euromàtica (Barber i col. 2005).

En l'ideograma de la Fig.43 es detallen les regions cromosòmiques implicades en la composició dels sSMC que han estat caracteritzades.

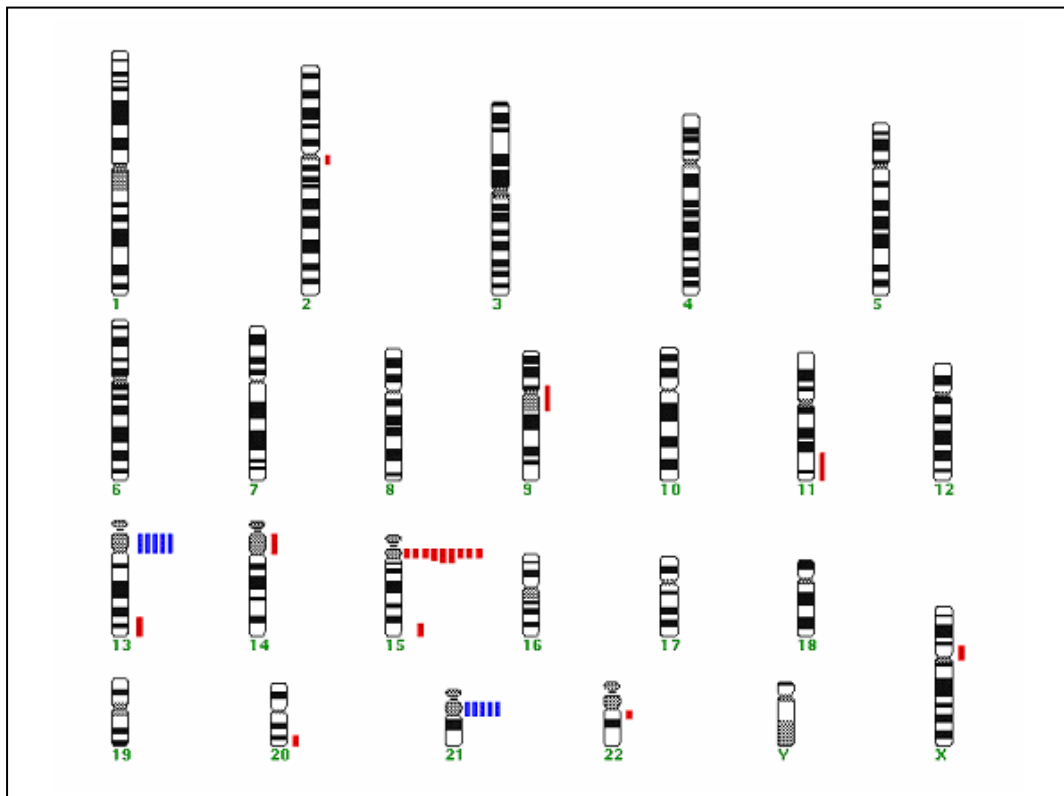


Fig.43- Ideograma on es mostren les regions implicades en la composició dels cromosomes marcadors caracteritzats en el present estudi. En els casos en els que no s'ha pogut determinar si el cromosoma marcador tenia origen en el cromosoma 13 o 21 s'han marcat les dues regions per un cromosoma marcador (color blau).

5.8.1- sSMC ACROCÈNTRICS

5.8.1.1- sSMC derivats del cromosoma 15 (MS-30, MS-37, MS-50, MS-113, MS-114, MS-198, M-13 i M-14)

L'origen més comú dels sSMC és el cromosoma 15, que aproximadament es troba en 1/5.000 nounats i representa el 30%-40% de tots els cromosomes marcadors (Buckton i col. 1985; Paoloni-Giacobino i col. 1998; Liehr i col. 2006). En la sèrie que hem estudiat nosaltres s'han detectat marcadors d'aquest tipus en el 29,2% (7/24) casos; en realitat hem determinat vuit casos però dos d'ells pertanyien a la mateixa família. La freqüència que hem trobat coincideix amb la descrita prèviament. En general només s'inclouen les regions pericentromèriques i freqüentment són *inv dup* (15)(Schinzel i Niedrist, 2001). En la nostra sèrie tots els casos de sSMC(15) eren *inv dup*(15) evidenciant també la prevalença d'aquest tipus de sSMC. Només en dos casos d'aquests sSMC(15), MS-114 i MS-198, es va detectar eucromatina en el cromosoma marcador. El cas MS-50 presentava un cromosoma marcador neocèntric amb morfologia *inv dup* però compostat per la regió distal de 15q i serà discutit en l'apartat 5.9.

Els sSMC, *inv dup*(15), es transmeten majoritàriament via materna (Warburton, 1991). En la nostra sèrie aquest fet només es compleix en el cas M-14, quatre casos són *de novo* i de la resta no se'n sap l'origen ja que no va ser possible fer l'estudi dels pares. En el cas M-14, l'origen matern dels dos sSMC s'ha originat per una no-disjunció a nivell de la segona divisió meiótica, ja que la mare (M-13) només presenta un d'aquests cromosomes marcador. Per contra, aquests sSMC són estables durant la mitosi, tenen una baixa tendència a la no disjunció mitòtica i això s'evidencia pel fet que casi tots els casos estudiats en la nostra sèrie de *inv dup*(15) no són mosaics pel sSMC (MS-30, MS-37, MS-114, MS-198, M-13 i M-14).

S'ha descrit molta heterogeneïtat en les conseqüències clíniques que tenen els cromosomes marcadors derivats del cromosoma 15 (Blennow i col.1994; Huang i col. 1997; Wolpert i col. 2000). En general s'accepta que els petits cromosomes marcadors derivats del cromosoma 15 als quals se'ls hi ha descartat la disomia uniparental no comporten alteracions clíniques mentre que els cromosomes marcadors derivats del cromosoma 15 que continguin la regió de Prader-Willi/Angelman (PWA) solen presentar anomalies fenotípiques. Els nostres resultats estan d'acord amb aquests autors ja que tots els casos que hem estudiat que presentaven cromosomes marcador *inv dup* (15)(q11.1), excepte un (MS-113) que presenta epilèpsia i retard psicomotor, no mostren alteració en la clínica. El cas MS-114 inclou material eucromàtic en el cromosoma marcador però es tracta d'un cas de diagnòstic prenatal i ens va ser impossible aconseguir dades clíniques del fetus. Malgrat això, s'han descrit diferents casos en els quals no s'observava afectació clínica (Liehr i col. 2006). En el nostre cas el cromosoma marcador no contenia la zona crítica PW/A.

Aquest tipus de sSMC, *inv dup*(15), s'han associat a individus amb problemes de fertilitat (Buckton i col. 1985; Wisniewski, 1985; Eggermann i col. 2002). S'ha descrit una alta incidència de cromosomes marcador derivats del cromosoma 15 en homes oligozoospermics i azoospermics (Buckton i col. 1985; Cotter i col. 2000; Eggermann i col. 2002). S'han publicat

tres casos de pacients adults portadors de dos cromosomes marcadors *inv dup* (15)(q11), dos homes i una dona que presentaven problemes de fertilitat (Martin-Lucas i col. 1986; Manenti, 1992; Shim i col. 2001). En la nostra sèrie els casos M-14 i MS-198 serien un exemple com els casos publicat. En el cas MS-198 la CGH i la HR-CGH detecten un desequilibri en la banda eucromàtica 15q12 encara que la implicació d'aquesta en el cromosoma marcador no es va poder comprovar per FISH ja que no va ser possible aconseguir suspensió cel·lular. S'han descrit a la literatura diferents casos de cromosomes marcadors amb implicació d'aquesta mateixa banda 15q12 que presentaven infertilitat (Liehr i col. 2006). En el cas MS-198 i M-14 la infertilitat podria ser deguda a la presència dels dos cromosomes marcadors que podrien interferir a nivell meiótic degut a l'excés d'activitat NOR (Martin-Lucas et al. 1986) o a l'excés d'heterocromatina que podria originar la fallada en la maduració de les cèl·lules germinals (Gentile i col. 1993) o finalment també podria deure's a l'existència d'algun tipus de selecció contra les cèl·lules germinals anòmals en els homes durant l'espermatogènesi originant oligozoospermia (Cotter i col. 2000).

5.8.1.2- sSMC derivats dels cromosomes 13/21 (MS-31, MS-36, MS-42, MS-42-M, MS-43 i MS-82)

La majoria de marcadors del cromosoma 13 o 21 descrits a la literatura tenen un origen *de novo*. En el nostre estudi hem trobat sis pacients amb aquest tipus de marcador; en tres casos (MS-31, MS-36 i MS-82) l'origen del sSMC ha estat *de novo* i en els altres tres (MS-42, MS-42-M i MS-43) familiar.

En aquesta família la mare (MS-42-M) portadora de dos sSMC, té un fill (MS-42) portador d'un d'aquests marcadors i un cromosoma 21 extra i un altre fill (MS-43) presenta un sSMC. Els posteriors estudis familiars realitzats han revelat que aquest cromosoma marcador s'ha heretat a través d'almenys tres generacions, sense tenir cap efecte en el fenotip, incloent una fertilitat normal. L'absència de conseqüències clíniques en tots els membres de la família amb el cromosoma marcador està d'acord amb el fet que els marcadors familiars normalment no estan associats a anomalies fenotípiques (Warburton, 1991). Aquest cas també està d'acord amb la literatura pel que fa a la major prevalença de l'origen matern (Crolla i col. 1992,1998; Blennow i col. 1994; Bartsch i col. 2005).

La presència d'un sol cromosoma marcador en els fills suggereix un efecte de no disjunció meiótica o una pèrdua anafàsica d'un dels cromosomes marcadors. Es coneix que aquest procés podria afectar a la no disjunció d'altres cromosomes (Buckton, 1985). Per tant, podria ser que els dos cromosomes marcadors presents en la mare poguessin incrementar la incidència de disrupcions a nivell de meiosi afavorint la producció de no disjuncions d'altres cromosomes, en aquest cas especialment els cromosomes 13 o 21. Encara que Steinbach i Djalali (1983) van fer un estudi on arribaven a la conclusió que els cromosomes marcadors bisatelitzats accessoris no induïen la no disjunció meiótica. Per això s'haurien de fer estudis més extensos per arribar a concloure si efectivament existeix una relació entre la presència de cromosomes marcadors bisatelitzats i l'increment de risc d'aneuploidies.

En el cas MS-82, s'ha determinat la presència d'un sSMC (13/21) però tampoc s'ha detectat eucromatina. Aquest cromosoma marcador es trobava en mosaic i es va detectar prenatalment. Es va continuar l'embaràs i en l'examen clínic del nou-nat es van detectar manifestacions clíniques molt lleus, dues anomalies menors i una mínima hipotonia axial. Aquest fet estaria d'acord amb els resultats obtinguts en l'estudi de citogenètica molecular al no detectar-se eucromatina en el cromosoma marcador.

En el pacient MS-31, infèril, s'ha caracteritzat un sSMC (13/21) en el que tampoc s'ha detectat eucromatina. Aquest fet estaria d'acord amb publicacions que descriuen que la presència de sSMC en dones no afecta a la fertilitat mentre que en homes sí (Buckton i col. 1985; Manenti i col. 1992).

Cal destacar que en els casos anteriors no va ser possible esbrinar si aquests sSMC provenien del cromosoma 13 o 21 ja que no contenen eucromatina i l'ADN centromèric dels dos cromosomes comparteixen un 99,7% de seqüència (Maratou i col. 1999). És a dir, a nivell metodològic, actualment, no es pot diferenciar si un sSMC deriva del cromosoma té 13 o del 21 si no conté eucromatina.

El cas Ms-36 presentava un cromosoma marcador neocèntric derivat de la regió distal de 13q i serà discutit en l'apartat 5.9.

5.8.1.3- sSMC derivats del cromosoma 14 (MS-103)

S'ha descrit que els cromosomes marcadors derivats del cromosoma 14 moltes vegades no tenen impacte a nivell fenotípic. Diferents publicacions descriuen portadors de cromosomes marcadors *inv dup* (14)(q10) o *inv dup* (14)(q11.1), és a dir que no contenen eucromatina, que no estan associats a alteracions clíniques (Starke i col. 2003; Liehr i col. 2003, 2006). En canvi, cromosomes marcadors derivats del cromosoma 14 que impliquin regions més distals a la 14q11.2 sí que s'han associat a alteracions fenotípiques (Eggermann i col. 2005; Fdez-Novoa i col. 2006). El cromosoma 14 està subjecte a *imprinting* i s'ha descrit la síndrome de la disomia uniparental materna (OMIM:#608149) i la paterna (retard mental sever i anomalies musculoesquelètiques). Aquest factor s'ha de tenir en compte quan es detecta un cromosoma marcador derivat del cromosoma 14 i s'ha de fer l'estudi de la disomia uniparental (Shaffer i col. 2001).

Hem determinat un sSMC (14) en totes les cèl·lules analitzades en un cas (MS-103). En aquest el cromosoma marcador es va caracteritzar per la tècnica de cenM-FISH. La cenM-FISH no permet distingir entre els centròmers dels cromosomes 14 i 22 pel seu alt grau d'homologia. Per tal d'aclarir-ho es va utilitzar una sonda centromèrica específica pel cromosoma 22, sintetitzada pel grup del Dr. Liehr per discriminar entre els dos cromosomes. Com que no va hibridar amb aquesta sonda es va concloure que el cromosoma marcador derivava del cromosoma 14. Posteriorment per confirmar-ho es va aplicar la barreja de sondes subcenM-FISH específica pel cromosoma 14 amb el qual es va determinar que el cromosoma marcador no contenia eucromatina. En el cas MS-103 el cromosoma marcador es va detectar prenatalment i no va ser possible obtenir dades clíniques.

5.8.1.4-sSMC derivats dels cromosomes 22/11 (MS-89)

La translocació $t(11;22)(q23;q11.2)$ és la única translocació constitucional no-Robertsoniana recurrent en humans (Fraccaro i col. 1980). Els portadors d'aquesta translocació són fenotípicament normals però tenen el risc de tenir descendència portadora del cromosoma marcador $der(22)t(11;22)$ com resultat d'una segregació meiótica desequilibrada. Els individus amb $+der(22)$ tenen un fenotip característic que consisteix en retard mental sever, apèndix preauricular, malformació de les orelles, paladar arquejat, micrognàtia, microcefàlia, anomalies dels ronyons, defectes de cor i anomalies genitals en homes (Zackai i Emanuel 1980).

En la sèrie estudiada, hem detectat un sSMC derivat dels cromosomes 11 i 22 en un pacient (MS-89). Malauradament no ha estat possible estudiar els pares per tant no sabem l'origen del cromosoma marcador. I només s'han aconseguit algunes dades clíniques com el fet que no parlava, presentava sordesa i problemes al caminar. L'únic punt que es podria relacionar amb les característiques clíniques dels portadors del $der(22)$ són les malformacions a les orelles.

La sonda *locus* específica per la síndrome de DiGeorge va hibridar en el cromosoma marcador en la regió específica per a aquesta síndrome que es localitza a la banda 22q11.2 (TUPLE) però no va donar senyal per a la regió control també inclosa en aquest assaig situada a la banda 22q13.3 (ARSA). La tècnica de CGH i la HR-CGH van mostrar un guany en la regió 11q23q25 però no van detectar cap desequilibri en la regió 22q11.2, encara que el perfil mostrava una desviació amb tendència al guany en aquesta banda. Aquest fet es pot explicar perquè la regió 22q11.2 és molt propera a la regió centromèrica i a més el cromosoma 22 és conflictiu per a la tècnica de CGH (Moore i col. 1997). Aquests resultats ens fan pensar que es tracta d'un sSMC $der(22)$. No es van poder realitzar més hibridacions amb la sonda centromèrica del cromosoma 14/22 per comprovar si tenia o no centròmer (ja que no es disposava del material necessari) però podem assumir que el cromosoma marcador no contenia un neocentròmer ja que la tècnica de bandes C va donar senyal positiva en el cromosoma marcador.

5.8.2- sSMC NO ACROCÈNTRICS

Tal i com s'ha esmentat anteriorment aquests sSMC són menys freqüents que els derivats de cromosomes acrocentrics (Warburton, 1991).

5.8.2.1- sSMC derivats del cromosoma 2 (MS-188)

Els cromosomes marcadors derivats del cromosoma 2 són poc freqüents. Fins ara, s'han descrit a la literatura només 12 casos (Plattner i col. 1993; Daniel i col. 1994; Ostroverkhova i col. 1999; Villa i col. 2001; Giardino i col. 2002; Starke i col. 2003; Lasan Trcic i col. 2003; Guanciali-Franchi i col. 2004; Mrasek i col. 2005; Brecevic i col. 2006). En tots ells excepte en el publicat per Brecevic i col. (2006), els sSMC mostraven morfologia d'anell. S'ha suggerit que podria deure's a la presència de duplicacions segmentàries presents en la regió

pericentromèrica del cromosoma 2 igual que també passa en els cromosomes 10 i 12 (Jackson i col. 1999; Vermeesch i col. 2003). A més, un 58% (7/12) dels casos descrits com sSMC(2) estaven associats a mosaïcisme. L'únic sSMC(2) de la nostra sèrie (cas MS-188) no mostrava morfologia d'anell i es trobava en mosaic com la majoria d'aquest sSMC descrits en la literatura. El mosaïcisme ha estat confirmat en un segon teixit (fibroblasts).

Respecte l'efecte a nivell fenotípic, un 58% (7/12) dels casos presenten anomalies clíniques (Plattner i col. 1993; Ostroverkhova i col. 1999; Giardino i col. 2002; Starke i col. 2003; Guanciali-Franchi i col. 2004; Brecevic i col. 2006). I la resta (42%: 5/12) de casos publicats no tenen símptomes clínics associats. Cal esmentar, però, que només nou dels casos publicats han estat caracteritzats detalladament. Quan s'ha pogut fer una identificació acurada del marcador s'ha vist una clara correlació entre la presència de certes bandes cromosòmiques i l'absència o presència de símptomes clínics. Així, la presència de seqüències pericentromèriques que inclouen la banda 2p11.2 va acompanyada de símptomes clínics. Els casos restants, que no presenten anomalies clíniques, tenen en comú que els sSMC estan formats només per la banda 2q11.2 (Daniel i col. 1994; Villa i col. 2001; Starke i col. 2003 (case 6); Mrasek i col. 2005). Només en un cas amb fenotip normal el cromosoma marcador incloïa les bandes 2p11.2p12, però el cromosoma marcador es trobava associat a una deleció de 2p10p12, per tant la dosi gènica quedava compensada (Lasan Trcic i col. 2003). També s'ha descrit que les seqüències distals a 2q11.2 estan relacionades amb alteracions fenotípiques (Ostroverkhova i col. 1999).

En el nostre estudi l'aplicació de subcenM-FISH i altres BACs/YACs ha permès caracteritzar acuradament el cromosoma marcador com der(2)del(2)(p11.1)del(2)(q12.1). El marcador implica la banda 2q11.2 a més de part de la banda 2q12.1). Cal destacar que el nostre pacient presenta alteracions fenotípiques. Aquest fet està d'acord amb els casos prèviament publicats pel que fa a l'aparició de l'alteració clínica en relació a la banda cromosòmica 2q12.1.

El cas descrit per Giardino i col. (2002) presentava un marcador, en mosaic, compost per les mateixes bandes cromosòmiques que el nostre pacient però es tractava d'un marcador en anell que s'havia heretat via materna. Sorprenentment la mare només presentava trets dismòrfics lleugers i el fill, en canvi, presentava malaltia psicòtica, lleuger retard mental, lleugera braquicefàlia i la columela nasal prominent. En el nostre pacient, MS-188, el cromosoma marcador és *de novo*. Com que el pacient té pocs mesos de vida no s'ha pogut avaluar el retard mental o la malaltia psicòtica. Però cal destacar que a nivell fenotípic presentava una clínica molt més severa que el cas publicat per Giardino i col. (2002). Creiem que l'heterogeneïtat clínica observada podria ser deguda al diferent grau de mosaïcisme en els diferents teixits o també a l'existència d'un punt de trencament diferent dins la banda 2q12.

5.8.2.2-sSMC derivats del cromosoma 9 (MS-106)

Fins al moment, s'han publicat diferents sSMC derivats del cromosoma 9 caracteritzats per citogenètica molecular. En tres d'aquests casos, els sSMC(9) es troben en combinació amb altres sSMC derivats d'altres cromosomes (Aalfs i col. 1996; Starke i col. 2003; Hall i col. 2005) i en 15 casos els sSMC (9) es presenten com única alteració cromosòmica (Callen i col. 1990, 1992; Raimondi i col. 1991; Müller-Navia i col. 1995; Blennow i col. 1995; James i col. 1995; Depinet i col. 1997; Langer i col. 2001; Mowrey i col. 2001; Starke i col. 2002; Amor i Choo 2002; Warburton, 2004; Guanciali- Franchi i col. 2004; Liehr i col. 2005; Paulis i col. 2006).

En la nostra sèrie només hem trobat sSMC(9) en una pacient (MS-106). Aquest cas és un exemple perfecte per il·lustrar la utilitat de les metodologies de FISH per tal de caracteritzar un mosaïcisme de cromosomes marcadors que per citogenètica convencional passava desapercbut. Cal esmentar que la CGH i HR-CGH no han estat útils per determinar la regió cromosòmica implicada en el marcador. El mosaïcisme, la petita proporció d'euromatina que forma el cromosoma marcador i el fet que la regió euromàtica implicada està molt propera a la regió centromèrica bloquejada per l'ADN COT1 han estat limitacions molt importants per aquestes tècniques.

La nostra pacient presenta almenys quatre línies cel·lulars diferents, cada una amb sSMC diferents, tots derivats del cromosoma 9, en combinació amb una línia cel·lular normal. Es tracta d'una pacient infèrtil sense altres símptomes clínics. Els cromosomes marcadors presenten diversitat morfològica: petits marcadors, anells, amb un o dos centròmers, però tots estaven constituïts per les bandes cromosòmiques 9p12q12. Aquest fet apunta a un origen comú de tots els cromosomes marcadors i una reorganització posterior degut a una inestabilitat mitòtica.

En els últims anys, s'han descrit alguns casos amb mosaïcisme críptic de sSMC derivat de cromosomes diferents o del mateix cromosoma. Fins ara, el nostre cas és el primer publicat amb mosaïcisme críptic de sSMC derivats del cromosoma 9 (Santos i col. 2007). És interessant destacar que 7/8 dels casos publicats amb sSMC en mosaic derivats del mateix cromosoma presenten infertilitat o fenotip alterat.

Un cas publicat per Starke i col. (2002; cas 55) presentava un cromosoma marcador r(9)::p12q10::) en totes les cèl·lules analitzades i, per tant la mateixa banda extra d'euromatina (9p12) que en la nostra pacient (MS-106). Es tractava d'una dona sana amb una història de tres avortaments. La resta de casos amb sSMC que contenien només la banda euromàtica 9p12 presentaven fenotip normal amb l'excepció d'un nen afectat de retard mental i de parla moderat (Blennow i col. 1995). En general, podem concloure que quan en la formació del sSMC(9) està implicada una banda euromàtica diferent de la 9p12 s'observa un fenotip alterat. De fet, s'ha descrit que la variació en número de còpia de 9p12 és una variant sense efectes fenotípics (Barber i col. 2005). Starke i col. (2002) van suggerir que aquesta regió cromosòmica no era vertaderament euromatina ni heterocromatina. El nostre estudi estaria d'acord amb aquesta afirmació.

També s'ha descrit que en parelles subfèrtils la presència de sSMC(9) és quatre vegades més freqüent que en la població general i que mentre en els homes causa infertilitat en les dones la fertilitat és normal (Buckton i col. 1985, Manenti, 1992). Malgrat aquesta afirmació s'han publicat treballs relacionant infertilitat en dones i la presència de sSMC (Starke i col. 2002). La nostra pacient, MS-106, seria un altre exemple que relaciona la presència de sSMC(9) amb infertilitat en la dona. L'excés d'heterocromatina present en el nostre cas podria estar interferint en l'aparellament cromosòmic correcte i podria potenciar l'aparició de gàmetes desequilibrats.

5.8.2.3-sSMC derivats del cromosoma X (MS-101)

Els sSMC derivats del cromosoma X, en mosaic o no, són rars. Només se n'han descrit deu casos, set dels quals estaven associats a un alt grau de mosaïcisme (Callen i col. 1991, 1995; Rauch i col. 1992; Duncan i col. 1993; Amiel i col. 1995; Manea i col. 1997; Le Caignec i col. 2003; Chen i col. 2006d; Liehr i col. 2006). En un 60% (6/10) dels casos el sSMC(X) es troba com anell. Aquest fet podria anar associat a l'alt grau de mosaïcisme ja que els cromosomes en anell són més inestables mitòticament. En la nostra sèrie hem identificat un sSMC(X) en un pacient (MS-101) present en totes les cèl·lules analitzades.

Es creu que el fenotip associat a aquest tipus de marcador depèn de la presència, o no, del centre d'inactivació del cromosoma X (XIST) situat en la regió Xq13.2, en el cromosoma marcador. L'absència d'aquesta regió dóna lloc a la disomia parcial del cromosoma X. S'han publicat deu casos amb aquest tipus de marcadors en homes (Callen i col. 1991, 1995; Rauch i col. 1992; Duncan i col. 1993; Amiel i col. 1995; Manea i col. 1997; Le Caignec i col. 2003; Chen i col. 2006d; Liehr i col. 2006). Les característiques fenotípiques, que coincideixen amb el nostre cas són el retard en el desenvolupament, dismòrfies i microcefàlia. No obstant, no tots els casos descrits presenten aquests trets. A més, el nostre pacient presenta, altres alteracions fenotípiques com atrèsia anal, el recte està connectat amb la uretra, els ossos sacrats són displàsics i les vèrtebres finals estan absents. També presenta reflux sever bufeta-uretra i el ronyó dret no funcional i una malformació intestinal. També mostra hiperactivitat i ha estat operat d'un teratoma immadur en la bufeta.

S'han descrit fenotips més lleus que podrien anar associats al fet que el cromosoma marcador contingui poca quantitat d'euromatina o que el cromosoma marcador estigui absent en alguns teixits importants (Turner i col. 2000). Per exemple en el cas descrit per Chen i col. (2006d) s'observa un fenotip normal en un pacient que presentava un petit sSMC(9) i *XIST* negatiu, però que estava present en un baix percentatge de cèl·lules (25% en sang perifèrica).

En el nostre pacient, MS-101, hem caracteritzar diferents cromosomes marcadors tots derivats del cromosoma X. Per tant és un altre cas de mosaïcisme críptic en cromosomes marcador (com el cas MS-106 descrit anteriorment en el apartat 5.8.2.2). Hem detectat quatre sSMC(X) diferents, en dos d'aquests marcadors la banda Xp11.2 està present i en els altres dos els marcadors només presenten la zona centromèrica. També hem vist que alguns marcadors contenen dos centròmers mentre que els altres només en presenten un, però cap d'ells té

morfologia d'anell. S'ha suggerit que la banda cromosòmica Xp11.21, implicada en els sSMC del nostre pacient, es un punt calent per trencaments (Wolff i col. 1994). Fins ara només ha estat descrit un altre cas de mosaïcisme críptic associat a un sSMC (X) (Liehr i col. 2006).

5.9- sSMC I NEOCENTRÒMERS (MS-36, MS-50, MS-64? i MS-152)

Els cromosomes marcadors neocèntrics, tenen una aparença normal, amb una constricció centromèrica i són negatius per bandes C (Amor i Choo, 2002). Aquesta característica es compleix en els quatre casos detectats en la nostra sèrie (MS-36, MS-50, MS-63 i MS-152) on els sSMC derivaven respectivament del cromosoma 3, 13, 15 i 20. La distribució dels neocentròmers no es dóna a l'atzar, sinó que hi ha certes regions amb més tendència a la formació d'aquest, com són: 3q, 13q i 15q (Warburton, 2004). Dues d'aquestes regions, la 13q i la 15q coincideixen amb dos dels casos que hem analitzat (MS-36 i MS-50). Sovint els casos amb cromosomes marcadors amb neocentròmer es presenten en mosaïcisme. Això és normal ja que la inestabilitat mitòtica del neocentròmer és més alta que la del centròmer comú (Amor i Choo, 2002). En els casos analitzats en la nostra sèrie amb neocentròmer només un, el cas MS-152, no presentava mosaïcisme.

Els cromosomes marcador amb neocentròmer no mostren senyal al hibridar amb sondes centromèriques específiques d'ADN alfa-satèl·lit. Això s'ha confirmat en el cas MS-50 ja que no s'ha observat cap senyal al realitzar la hibridació amb la sonda específica pel centròmer del cromosoma 15. En els altres dos casos (MS-36 i MS-152) no es va fer aquest tipus de confirmació. Per confirmar la presència dels neocentròmers es poden utilitzar anticossos contra proteïnes de centròmer (CENPs) en assaigs d'immunofluorescència (Warburton, 2000), encara que en cap dels nostres marcadors es va poder utilitzar aquesta tècnica.

La classe més comú de cromosomes amb neocentròmers són els cromosomes supernumeraris *inv dups* de la part distal d'un dels braços del cromosoma. En aquests casos el resultat és una tetrasomia per la regió implicada en el neocentròmer. En tots els casos de la nostra sèrie (MS-36, MS-50 i MS-152) els sSMC tenen aparença de cromosoma submetacèntric i la regió implicada en el guany detectada per la CGH i HR-CGH és més petita que la longitud del cromosoma marcador. Per això, possiblement tots aquests marcadors deriven d'una *inv dup*. La formació d'aquests sSMC es podria haver donat pel trencament del cromosoma normal seguit d'un intercanvi *U-type* entre dues cromàtides de cromosomes homòlegs acompanyat de l'activació d'un neocentròmer en un dels braços cromosòmics (Fig.44). Aquest procés probablement explica la formació del marcador del cas MS-50 ja que s'observa que els BACs de les regions implicades en la formació d'aquest cromosoma marcador donen dues senyals en el cromosoma marcador.

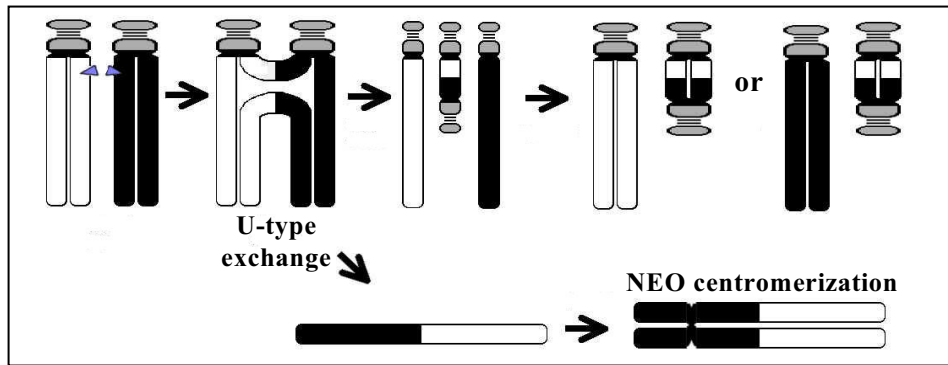


Fig.44- Esquema de la formació d'un cromosoma marcador neocèntric: trencament de dues cromàtides de cromosomes homòlegs seguit d'un intercanvi U-type i de l'activació d'un neocentròmer en un dels braços cromosòmics (http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm).

El cromosoma 13 presenta una gran tendència per a la formació de neocentròmers suggerint que aquesta alta freqüència s'explicaria per la viabilitat de les trisomies 13 (Warburton i col. 2000). No obstant, aquesta raó no es pot aplicar a altres trisomies que es toleren bé, com la 18, 21 o X. S'ha descrit un punt calent per a la formació de neocentròmers a la banda 13q32. encara que també s'han descrit neocentròmers en les regions 13q21 i 13q31 (Warburton i col. 2000). La banda 13q32, especialment implicada en la formació de neocentròmers, està inclosa en el sSMC del cas MS-36 suggerint que el neocentròmer es podria trobar en aquesta regió. El fenotip associat a aquest tipus de cromosomes marcador sol incloure: microftàlmia o altres defectes oculars, hemangioma i sordesa (Warburton i col. 2000). En la nostra pacient es presentava una displàsia ectodèrmica, però la clínica no es pot comparar amb el cas descrit per Warburton i col. (2000) ja que en la nostra pacient el cromosoma marcador es trobava en cèl·lules de la pell i no en sang perifèrica.

En el cas MS-50 el cromosoma marcador neocèntric inclou la regió cromosòmica 15q26.1q26.3. Aquesta regió es troba en tetrasomia ja que es tracta d'un *inv dup*. Fins ara s'han descrit uns trets clínics comuns per a la tetrasomia de 15q que inclouen orelles d'implantació baixa, micrognàtia i aracnodactília encara que també s'hi ha associat la craniosinostosi, nas bulbós, pont nasal ample, filtre llarg, paladar alt i retard en el desenvolupament i mental (Mahjoubi i col. 2005). D'aquestes característiques en el nostre pacient s'hi observa craniosinostosi i retard en el desenvolupament psicomotriu. Les diferències amb els altres casos es podrien deure al grau de mosaïcisme i a les diferències en les regions implicades en el cromosoma marcador, encara que Rowe i col (2000) van descriure que la mida del cromosoma marcador analfòide no semblava correlacionar-se amb la severitat de la clínica. Un altre factor important que cal tenir en consideració és l'origen parental del cromosoma marcador.

El cas MS-36 de la nostra sèrie presenta un cromosoma marcador derivat del cromosoma 13 que inclou la regió 13q22qter. Aquest cromosoma marcador ha estat detectat en mosaic en les cèl·lules de la pell, però no es va detectar en sang perifèrica. Es tracta d'una nena amb

displàsia ectodèrmica i absència de molts dels trets que s'han associat a la presència d'aquests tipus de cromosomes marcadors, com la sordesa, dificultats d'aprenentatge i convulsions (Barwell i col. 2004). Això es podria deure, al fet que en la nostra pacient el cromosoma marcador només es trobés restringit a certs teixits.

Fins ara només hi ha hagut un cas descrit de cromosoma marcador neocentromèric derivat del cromosoma 20 (Voullaire i col. 1999). En aquest cas el cromosoma marcador era un *inv dup* (20p) i anava acompanyat d'una deleció 20p11.2pter d'un dels cromosomes 20. En el nostre pacient, MS-152, el cromosoma marcador deriva del cromosoma 20 però del braç llarg i també era neocèntric ja que no incloïa la regió centromèrica en la seva composició. Revisant la literatura, el nostre cas seria el primer on es descriuria un cromosoma marcador amb un neocentròmer en el braç llarg del cromosoma 20. Sembla que també es tracta d'un *inv dup* ja que el cromosoma marcador és el doble de gran que la regió implicada en el desequilibri detectat per la CGH i la HR-CGH. En el cas descrit per Voullaire i col. (1999) el sSMC presentava un aspecte de cromosoma submetacèntric al igual que el nostre i estava present en totes les metafases, també igual que en el nostre cas. S'han descrit molts pacients amb una trisomia parcial de 20q però moltes d'elles estan associades a monosomies parcials d'altres cromosomes ja que sovint s'originen a partir d'una translocació equilibrada en un dels progenitors. Per això ha estat difícil definir un fenotip concret associat a la trisomia parcial del 20q. Malgrat això, s'han descrit casos associats a deleccions d'altres cromosomes molt petites i s'ha pogut definir un fenotip característic per la trisomia 20q que inclou malformacions craniofacials, anomalies muscular-esquelètiques i defectes cardíacs (Grange i col. 2005). El nostre pacient, MS-152, presenta múltiples malformacions esquelètiques i cerebrals a més de mostrar un retard en l'edat òssia. Aquests trets es correspondrien amb els fenotips descrits amb anterioritat per la trisomia 20q. En canvi, la principal diferència entre aquest cas es l'absència de defectes cardíacs en el nostre pacient.

Hem inclòs en aquest apartat el cas MS-64 que presenta un cromosoma marcador derivat del cromosoma 3. Els resultats de bandes C han estat negatius per tant es podria tractar d'un cromosoma marcador amb neocentròmer. Com que només hem disposat d'una única preparació cromosòmica no ha estat possible saber la regió específica del cromosoma 3 implicat en el cromosoma marcador. El patró de bandes present en el cromosoma marcador no ha permès identificar la regió implicada ja que no s'identificava cap patró característic del cromosoma 3. La regió distal de 3q s'ha descrit com una regió calenta per a la formació de neocentròmers (Amor i col. 2002). Cal tenir en compte, que normalment aquests tipus de cromosomes marcadors solen ser *inv dup* que coincideix amb el patró de bandes que mostra el nostre cromosoma marcador. Les característiques fenotípiques que s'han associat amb la presència de cromosomes marcadors neocèntrics derivats del cromosoma 3 són anomalies de pigmentació en la pell, retard mental i en el desenvolupament (Barbi i col. 2003). En el nostre cas, que ha estat detectat prenatalment, s'ha observat per ecografia la presència d'omfalocèle, creixement intrauterí retardat, peu equí i higroma. No obstant, no ha estat possible obtenir dades de la pell per determinar si existien anomalies. Només el retard en el desenvolupament (tret poc específic) ha estat coincident amb els altres casos descrits.

5.10- ANÀLISI DELS PUNTS DE TRENCAMENT

En aquest estudi hem caracteritzat 116 punts de trencament implicats en translocacions (45), duplicacions (17), delecions (28), formació de cromosomes marcador (21), cromosomes en anell (4) i isocromosomes (1) (Fig.45).

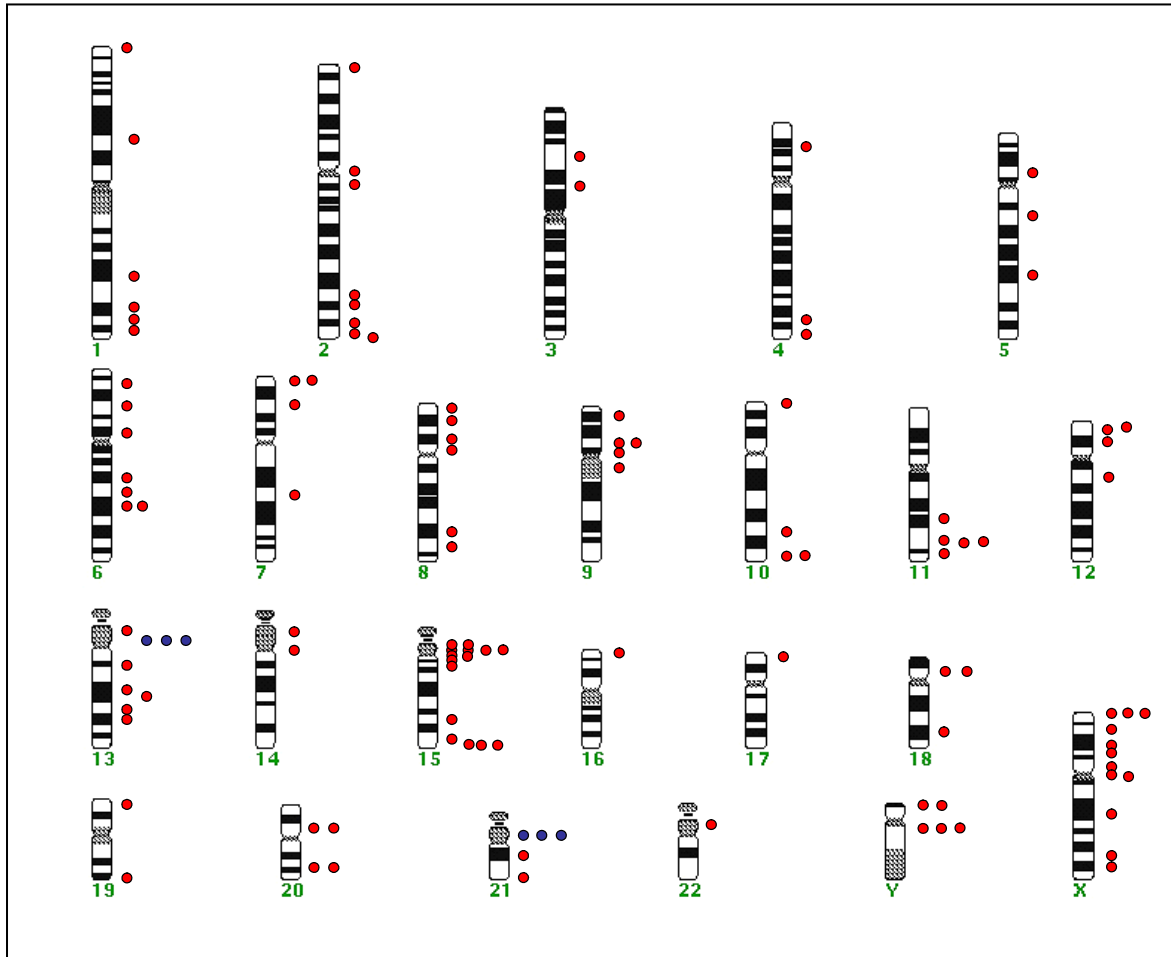


Fig.45- Ideograma representant els punts de trencament detectats en el present estudi (vermell). En blau s'han marcat les regions implicades (13q11/21q11.1 o 13p10/21p10) en els casos (MS-82, MS-31 i MS-42-M). No s'han repetit els punts de trencaments trobats dins d'una mateixa família.

Per a cada banda cromosòmica implicada en aquests punts de trencament s'han recopilat una sèrie de dades: el tipus de patró de banda G (clar o fosc), la mida de la banda, el nombre de gens en aquesta regió, grau de coincidència amb la localització d'un lloc fràgil i la presència o absència de duplicacions segmentàries. El conjunt de dades s'han resumit a la Taula 29, on també s'ha descrit el tipus d'anomalia cromosòmica associada a cada punt de trencament.

Per obtenir la informació del número de gens que s'han definit en cada banda implicada en un punt de trencament hem utilitzat el *NCBI Map Viewer* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=), per localitzar els llocs fràgils s'ha consultat el *Human Gene Mapping 11. London conference (1991). 11th International Workshop on Human Gene Mapping. Human Gene Mapping. Cytogenet Cell Genet*

58: 27-84 i per últim, per la localització de duplicacions segmentàries ens hem basat en la base de dades *Human Genome Segmental Duplications* (<http://projects.tcag.ca/humandup/>).

En el nostre treball tots els cromosomes han mostrat algun punt de trencament implicat en alteracions cromosòmiques, encara que no amb la mateixa freqüència evidenciant que és un esdeveniment no a l'atzar. El cromosoma 22 està implicat en el cas MS-89 però no s'ha representat ja que no ha estat possible definir el punt de trencament en aquest cromosoma. Els cromosomes més implicats han estat per ordre: el 15, X, 13, 2 i 6.

Al analitzar les bandes cromosòmiques implicades en els punts de trencament hem observat que tampoc es dona a l'atzar. Les bandes cromosòmiques més implicades han estat: 15q11.1 (4 casos), 15q26 (4 casos), Xp22.3 (4 casos), Yq11.2 (3 casos) i 11q23 (3 casos).

Hem analitzant el tipus de patró de bandes G dels punts de trencament implicats. Si descartem de l'anàlisi les bandes que estan compostes d'heterocromatina en el nostre estudi hem observat que una majoria de punts de trencament implicaven les bandes clares (62,2%) comparat amb les bandes fosques (37,8%). Aquest fet suggereix una major predisposició de les bandes clares a patir trencaments. S'ha de tenir en compte que les bandes clares són més riques en gens i també més actives transcripcionalment (Swansbury, 2003) i per això, els trencaments en aquest tipus de bandes podrien provocar disruptcions gèniques que impliquessin alteracions clíniques amb més probabilitat que si afectessin a bandes fosques. La major implicació dels punts de trencament en les bandes clares respecte les fosques ja s'havia observat prèviament (Savage,1977; Bauchinger i Gotz, 1979; Tanaka i col. 1983; Fuster i col. 1989; Barrios et al. 1989; Hernando, 2005). En el nostre estudi, les bandes clares implicades en punts de trencament que presentaven més densitat gènica han estat: 3p21, 6p21.3, 12p13, 12q13, 16p13.3, 19q13.4 i 21q22.3. Cal destacar que totes aquestes bandes s'han vist implicades en translocacions excepte la banda 12q13 que estava implicada en una duplicació.

Els llocs fràgils (FS) són regions específiques del genoma amb una gran predisposició als trencaments (Sutherland, 1979; HGM11, 1991). S'expressen com *gaps* o trencaments en els cromosomes de les cèl·lules que creixen sota condicions específiques de cultiu. Es pensa que l'expressió dels llocs fràgils podria predisposar a l'aparició d'anomalies cromosòmiques estructurals. Si aquesta expressió dels llocs fràgils tingués lloc durant la meiosi podrien originar-se gàmetes genèticament desequilibrades amb els conseqüents problemes de fertilitat o descendència afectada de malformacions congènites o avortaments espontanis (Hecht i Hecht, 1984; De Braekeler, 1985). Aquest fet, però, encara no ha estat demostrat (Sutherland i Baker, 2000). En canvi, si aquesta expressió es produeix a la mitosi les cèl·lules genèticament desequilibrades podrien originar inestabilitat cromosòmica transformant-se en canceroses si quedés afectada la funció de protooncogens o gens supressors de tumor (Coquelle i col,1997; Sutherland and Richards,1999; Richards, 2001; Pollack, 2006). Comparant els punts de trencament en el nostre estudi amb els llocs fràgils que han estat descrits (HGM11, 1991) observem que només un 25% coincideixen. Aquest percentatge no és significatiu ja que s'acosta al que trobaríem per atzar (28,3%; ja que s'han descrit 113 llocs fràgils en les 400 bandes). Per tant, podem dir que no sembla que hi hagués cap correlació entre els punts de trencament implicats en el nostre estudi i els llocs fràgils.

Finalment també hem tingut en compte la presència o absència de duplicacions segmentàries en les bandes cromosòmiques implicades en els punts de trencament. Les duplicacions segmentàries (DSs) són regions d'una llargada variable >5kb i que comparteixen una alta homologia de seqüència (>95%) i representen entre el 5-10% del genoma humà (Samonte i Eichler, 2002). En els últims anys s'han relacionat les duplicacions segmentàries amb l'aparició d'alteracions cromosòmiques pel mecanisme de recombinació homòloga no al·lèlica (Christian i col. 1999; Antonell i col. 2005). Al analitzar les bandes implicades en punts de trencament en el nostre estudi veiem que un 81,9% de les bandes contenen duplicacions segmentàries i que 9 d'aquestes bandes contenen gran densitat de duplicacions segmentàries (7q22, 12p13, 13q12(x2), 15q11.2(x2), 19q13.4, Xp22.3(x4), Xp11.2, Xq21.3 i Yq11.2(x3)). Així doncs, els nostres resultats estarien d'acord amb el fet que les zones cromosòmiques que contenen duplicacions segmentàries podrien estar més freqüentment implicades en els punts de trencament de les anomalies cromosòmiques. Aquesta observació ja s'havia fet anteriorment en el nostre grup (Hernando, 2005).

Taula 29- Característiques de les bandes cromosòmiques implicades en els punts de trencament del nostre estudi.

Banda Citogenètica	Patró de Bandes G	Mida banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc Fràgil	Duplicacions segmentàries	Tipus d'alteració cromosòmica en la que participa
1p36.3	C	7,1Mb	135	19	-	+	t
1p22.3	C	3,5Mb	30	8,6	+	+	t
1q31	F	13,5Mb	51	3,8	+	+	del
1q41	F	9,9Mb	66	6,6	-	+	dup
1q42	C	13,1Mb	149	11,4	+	+	dup
1q43	F	6,6Mb	43	6,5	-	+	t
2p25	C	12,1Mb	83	6,9	-	+	t
2p11.1	H	2,4Mb	13	5,4	-	+	mar
2q12.1	F	2,9Mb	20	6,9	-	+	mar
2q33	C	11,6Mb	126	10,9	+	+	t
2q34	F	6,3Mb	21	3,3	-	+	dup
2q36	F	9,4Mb	48	5,1	-	+	del
2q37.1	C	4,6Mb	84	18,3	-	+	del
2q37.3	C	5,9Mb	84	14,2	+	+	del
3p21	C	10,8Mb	234	21,7	-	+	t
3p13	C	4,3Mb	13	3	-	+	del
4p15.2	C	5,2Mb	25	4,8	+	-	t
4q33	C	1,8Mb	10	5,5	-	+	del
4q35.2	F	3,911Mb	41	10,5	-	+	del
5p13.3	C	5,1Mb	28	5,5	+	+	dup

Banda Citogenètica	Patró de Bandes G	Mida banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc Fràgil	Duplicacions segmentàries	Tipus d'alteració cromosòmica en la que participa
5q13	C	5,7Mb	97	17	-	+	t
5q23	F	17Mb	65	3,8	-	+	dup
6p23	C	1,8Mb	12	6,6	+	-	t
6p21.3	C	5Mb	267	53,4	-	+	t
6p12	F	11,4Mb	101	8,9	-	+	dup
6q16.3	F	5,1Mb	16	3,1	-	+	del
6q21	C	9,4Mb	81	8,6	+	+	t
6q22(x2)	F	15,9Mb	71	4,5	-	+	del
7p22.3(x2)	C	2,7Mb	29	10,7	+	+	t
7p21	F	13,7Mb	46	3,4	-	+	del
7q22	C	9,3Mb	158	17	+	++	t
8p23.2	F	4Mb	3	0,75	-	+	t
8p22	F	6,4Mb	31	4,8	-	+	dup
8p12	F	9,6Mb	58	6	-	+	dup
8p11.2	C	4,7Mb	44	9,3	-	+	t
8q23.3	F	5,5Mb	3	0,6	-	-	del
8q24.1	C	9,6Mb	61	6,3	+	+	del
9p23	F	5,1Mb	14	2,7	-	-	t
9p13.3	C	3Mb	109	36,3	-	+	dup/t
9p13.2	F	2,4Mb	19	7,9	-	+	dup/t
9p12	F	2,8Mb	21	7,5	-	+	mar

Banda Citogenètica	Patró de Bandes G	Mida banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc Fràgil	Duplicacions segmentàries	Tipus d'alteració cromosòmica en la que participa
9q12	H	8,3Mb	47	5,7	+	+	mar
10p15.3	C	3Mb	21	7	-	+	t
10q24	C	8,7Mb	128	14,7	+	-	dup
10q26(x2)	C	16,7Mb	161	9,6	+	+	t
11q22.3	F	7,6Mb	50	6,6	-	+	del
11q23	C	11,2Mb	147	13,1	+	+	mar
11q23.3(x2)	C	6,8Mb	88	12,9	+	+	del
11q24	F	9,1Mb	138	15,2	-	+	del
12p13.1	C	1,8Mb	25	13,9	-	-	t
12p13	C	14,7Mb	266	18,1	-	++	dup
12p12.3	F	5,2Mb	36	6,9	-	-	t
12q13	C	11,7Mb	330	28,2	+	+	t
13p11.2	H	5,2	0	0	-	-	t
13p10/ 21p10(x2)	H	189,5Kb/ 44,63Kb	0/0	0	-	-	mar
13q11/ 21q11.1	H	2,4Mb/ 900Kb	9/0	3,8/0	-	+	mar
13q12(x2)	C	12,7Mb	133	10,5	-	++	t/r
13q21.1	F	4,3Mb	11	2,6	+	+	dup
13q21.33	F	4,6Mb	8	1,7	+	-	dup
13q22	C	5,8Mb	31	5,3	-	+	mar
13q31	F	15,9Mb	35	2,2	-	+	r
14p11.2	H	6,9Mb	0	0	-	-	t

Banda Citogenètica	Patró de Bandes G	Mida banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc Fràgil	Duplicacions segmentàries	Tipus d'alteració cromosòmica en la que participa
14q11.1	H	3,4Mb	21	6,2	-	+	mar
15p11.2(x2)	H	6,2	0	0	-	-	r/t
15q11.1(x4)	H	1,3Mb	1	0,8	-	-	mar
15q11.2(x2)	C	4,9Mb	98	20	-	++	mar/del
15q12	F	2,5Mb	8	3,2	-	+	mar
15q13	C	5,7Mb	72	12,6	-	+	del
15q24	C	5,7Mb	97	17	-	+	dup
15q26.1	C	5,2Mb	70	13,5	-	+	mar
15q26.2	F	4,2Mb	11	2,6	-	-	dup
15q26.3(x2)	C	4Mb	45	11,3	-	+	r/t
16p13.3	C	6,3Mb	294	46,7	-	+	t
17p13.3	C	3,2Mb	80	25	-	+	del
18p11.2(x2)	C	8,2Mb	85	10,4	-	+	t/del
18q22	F	11,5Mb	31	2,7	-	+	del
19p13.3	C	6,9Mb	231	33,5	+	+	t
19q13.4	F	7,8Mb	290	37,2	+	++	t
20p11.2(x2)	C	7,9Mb	83	10,5	+	+	t/dup
20q13.2(x2)	F	4,3Mb	23	5,3	-	+	t/mar
21q21	F	15,2Mb	58	3,8	-	+	dup
21q22.3	C	5,5Mb	114	20,7	-	+	t

Banda Citogenètica	Patró de Bandes G	Mida banda	Número de Gens	Densitat gènica	Lloc Fràgil	Duplicacions segmentàries	Tipus d'alteració cromosòmica en la que participa
22p11.2	H	3Mb	0	0		-	t
Xp22.3(x4)	C	4,2Mb	64	15,2	+	++	del/t
Xp22.1	C	7,5Mb	49	6,5	-	+	del
Xp21	F	12,7Mb	65	5,1	-	+	t
Xp11.4	C	4,7Mb	40	8,5	-	+	del
Xp11.2	C	9,3Mb	188	20,2	-	++	mar
Xp11.1	H	2,9Mb	12	4,1	-	+	mar
Xq11.1	H	2,1Mb	19	9	-	-	mar
Xq21.3	F	12,1Mb	25	2	-	++	del
Xq26	C	8Mb	97	12,1	-	+	del
Xq27	F	9,1Mb	60	6,6	+	+	dup
Yp11.3(x2)	F	3,3Mb	34	10,3		+	t
Yq11.2(x3)	C	14,7Mb	187	12,7	-	++	iso/t

Abreviacions. dup: duplicació, del: deleció, t: translocació, mar: cromosoma marcador, r: cromosoma en anell, iso: isocromosoma, C: banda clara, F: banda fosca, H: heterocromatina, Mb: Megabases, kb: kilobases.

6. CONCLUSIONS

6- CONCLUSIONS

1- Al comparar l'eficiència en la detecció/identificació de desequilibris globals del genoma en tumors de retinoblastoma emprant els softwares de CGH convencional i de HR-CGH s'ha observat que:

- És millor interpretar els resultats de CGH sense utilitzar intervals de confiança ja que amb interval de confiança es perd molta informació encara que tot el que es detecta té un elevat grau de coincidència amb els resultats obtinguts per HR-CGH.
- El software de HR-CGH és més potent que el de CGH a l'hora de determinar pèrdues.

2- L'aplicació de diferents tècniques de citogenètica molecular per la detecció/identificació anomalies cromosòmiques en pacients amb malformacions congènites o infertilitat ha permès concloure que:

- Quan existeixen discordances entre els resultats obtinguts pels dos softwares, són més fiables els obtinguts per CGH. En alguns casos, però, la HR-CGH és més potent que la CGH com per exemple en l'anàlisi de translocacions recíproques aparentment equilibrades, en la detecció de microdelecions intersticials i quan l'alteració impliqui els cromosomes 1pter, 19 o 22.
- Les observacions respecte els softwares de CGH i HR-CGH descrites anteriorment són vàlides per l'anàlisi d'anomalies cromosòmiques constitucionals.
- La tècnica de MLPA és la més idònia per a la caracterització d'anomalies subtelomèriques en pacients amb cariotip normal i suggereix que aquesta metodologia s'hauria d'utilitzar prèviament a l'anàlisi per HR-CGH. En casos en els que no es detectin alteracions subtelomèriques per MLPA l'estudi per HR-CGH seria recomanable per descartar desequilibris intersticials.
- La tècnica de M-FISH és molt eficient en la caracterització de reorganitzacions cromosòmiques complexes i de cromosomes marcadors que continguin eucromatina i sobretot resulta de gran utilitat per a l'estudi del cromosomes marcadors neocentromèrics. La tècnica de cenM-FISH, juntament amb la subcenM-FISH, són de gran utilitat per determinar l'origen dels cromosomes

marcadors quan no contenen, o tenen molt poca, eucromatina ja que en aquests casos la M-FISH no és útil.

3- La combinació de tècniques de citogenètica convencional i molecular ha permès identificar en aquests pacients:

- 26 monosomies i 29 trisomies parcials autosòmiques
- 9 monosomies i 6 trisomies parcials gonosòmiques
- 4 reorganitzacions cromosòmiques complexes
- 21 marcadors supernumeraris petits

4- L'anàlisi citogenètic global ha revelat que en la nostra sèrie:

- Existeixen desequilibris autosòmics i gonosòmics per a tots els cromosomes amb l'excepció del cromosoma 14, 16 i 22.
- L'origen cromosòmic més comú implicat en els sSMC ha estat el cromosoma 15, seguits dels derivats del cromosoma 13/21 amb morfologia d' *inv dup*. S'ha determinat un percentatge important (16%) de sSMC neocentromèrics.

5- La combinació de tècniques de citogenètica convencional i molecular ens ha permès establir diferents correlacions fenotip-genotip tant associades a alteracions autosòmiques com gonosòmiques.

6- Per últim, l'anàlisi de 116 punts de trencament implicats en les anomalies cromosòmiques estudiades mostra que:

- Les bandes cromosòmiques més implicades han estat: 15q11.1 (4 casos), Xp22.3 (4 casos), Yq11.2 (3 casos), 15q26 (4 casos) i 11q23 (3 casos).
- La seva distribució en el genoma no és a l'atzar ja que la majoria es localitzen en les bandes clares (62,2%) que corresponen a regions amb major densitat gènica.
- En la majoria de casos (75%) no coincideixen amb les bandes on s'ubiquen llocs fràgils.
- El 81,9% es localitzen regions del genoma riques en duplicacions segmentàries

7. BIBLIOGRAFIA

7- BIBLIOGRAFIA

A

- **Aalfs CM, Jacobs ME, Nieste-Otter MA, Hennekam RC, Hoovers JM.** Two supernumerary marker chromosomes, derived from chromosome 6 and 9, in a boy with mild developmental delay. *Clin Genet* 1996 Jan;49(1):42-45.
- **Aase JM.** The physical examination in dysmorphology. In: *Diagnostic dysmorphology*. New York and London: Plenum Medical Book Company. 1990. p33-42.
- **Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, Van Dyke DL, Jalal SM.** Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. *Am J Med Genet A* 2005 May 15;135(1):28-35.
- **Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B.** Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Bioessays* 1995 Jul;17(7):661-664.
- **Alagille D, Odievre M, Gautier M, Dommergues JP.** Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental and sexual development, and cardiac murmur. *J Pediat* 1975; 86:63-71.
- **Albertson DG, Pinkel D.** Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 2003 Oct 15;12 Spec No 2:R145-52.
- **Alitalo T, Tiihonen J, Hakola P, de la Chapelle A.** Molecular characterization of a Y;15 translocation segregating in a family. *Hum Genet* 1988 May;79(1):29-35.
- **Alvarado M, Bass HN, Caldwell S, Jamehdor M, Miller AA, Jacob P.** Miller-Dieker syndrome. Detection of a cryptic chromosome translocation using in situ hybridization in a family with multiple affected offspring. *Am J Dis Child* 1993 Dec;147(12):1291-1294.
- **Alvarez-Nava F, Soto M, Martinez MC, Prieto M, Alvarez Z.** FISH and PCR analyses in three patients with 45,X/46,X,idic(Y) karyotype: clinical and pathologic spectrum. *Ann Genet* 2003 Oct-Dec;46(4):443-448.
- **Amiel A, Fejgin M, Appelman Z, Shapiro I, Gaber E, Bachar A, Zamir R, Kedar I, Golbus M.** Fluorescent in-situ hybridization (FISH) as an aid to marker chromosome identification in prenatal diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995 Mar;59(1):103-107.
- **Amor DJ, Choo KH.** Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet* 2002 Oct;71(4):695-714.
- **Anderlid BM, Sahlen S, Schoumans J, Holmberg E, Ahsgren I, Mortier G, Speleman F, Blennow E.** Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. *Am J Med Genet* 2001 Mar 15;99(3):223-233.
- **Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M.** Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 2002 Feb 1;107(4):275-284.
- **Andries S, Sartenaer D, Rack K, Rombout S, Tuerlinckx D, Gillerot Y, Van Maldergem L.** Pure terminal duplication of the short arm of chromosome 19 in a boy with mild microcephaly. *J Med Genet* 2002 Oct;39(10):E60.
- **Andrieux J, Devisme L, Valat AS, Robert Y, Frnka C, Savary JB.** Prenatal diagnosis of ring chromosome 6 in a fetus with cerebellar hypoplasia and partial agenesis of corpus callosum: case report and review of the literature. *Eur J Med Genet* 2005 Apr-Jun;48(2):199-206.
- **Angelman H.** 'Puppet children': a report of three cases. *Dev Me Child Neurol* 1965;7: 681-688.

- **Antonell A, de Luis O, Domingo-Roura X, Perez-Jurado LA.** Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res.* 2005 Sep;15(9):1179-88.

B

- **Babicz M, Kowalczyk JR, Winnicka D, Gaworczyk A, Lejman M, Dmowski R, Kaczanowska K.** The effectiveness of high-resolution-comparative genomic hybridization in detecting the most common chromosomal abnormalities in pediatric myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 2005 Apr 1;158(1):49-54.
- **Balci S, Engiz O, Aktas D, Vargel I, Beksac MS, Mrasek K, Vermeesch J, Liehr T.** Ring chromosome 4 and Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) in a child with multiple anomalies. *Am J Med Genet A* 2006 Mar 15;140(6):628-632.
- **Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG.** FISHing for mechanisms of cytogenetically defined terminal deletions using chromosome-specific subtelomeric probes. *Eur J Hum Genet* 2000 Oct;8(10):764-770.
- **Barber JC.** Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. *J Med Genet* 2005 Aug;42(8):609-629.
- **Barbi G, Spaich C, Adolph S, Kehrer-Sawatzki H.** Anaphoid de novo marker chromosome inv dup(3)(q28qter) with neocentromere in a dysmorphic and developmentally retarded girl. *J Med Genet* 2003 Mar;40(3):e27.
- **Barrios L, Miro R, Caballin MR, Fuster C, Guedea F, Subias A, Egozcue J.** Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989 Aug;41(1):61-70.
- **Bartholdi D, Klein A, Weissert M, Koenig N, Baumer A, Boltshauser E, Schinzel A, Berger W, Matyas G.** Clinical profiles of four patients with Rett syndrome carrying a novel exon 1 mutation or genomic rearrangement in the MECP2 gene. *Clin Genet.* 2006 Apr;69(4):319-326.
- **Bartsch O, Loitzsch A, Kozlowski P, Mazaauric ML, Hickmann G.** Forty-two supernumerary marker chromosomes (SMCs) in 43,273 prenatal samples: chromosomal distribution, clinical findings, and UPD studies. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1192-1204.
- **Barwell J, Mazzaschi R, Bint S, Ogilvie CM, Elmslie F.** A new neocentromere locus on chromosome 13 resulting in mosaic tetrasomy for distal 13q and an asymmetric phenotype. *Am J Med Genet A* 2004 Oct 15;130(3):295-298.
- **Batania JR, Morris K, Ma E, Huang Y, McComb J.** Familial deletion of (8)(q24.13q24.22) associated with a normal phenotype. *Clin Genet* 2001 Nov;60(5):371-373.
- **Batanian JR, Eswara MS.** De novo apparently balanced complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosomes 4, 18 and 21 in girl with mental retardation: report and review. *Am J Med Genet* 1998; 78:44-51
- **Batista DA, Pai GS, Stetten G.** Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. *Am J Med Genet* 1994 Nov 15;53(3):255-263.
- **Battaglia A, Bianchini E, Carey JC.** Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet* 1999 Jan 1;82(1):60-66.
- **Bauchinger M, Gotz G.** Distribution of radiation induced lesions in human chromosomes and dose-effect relation analysed with G-banding. *Radiat Environ Biophys.* 1979;16(4):355-66
- **Bauters M, Van Esch H, Marynen P, Froyen G.** X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur J Med Genet* 2005 Jul-Sep;48(3):263-275.

- **Bedoyan JK, Flore LA, Alkatib A, Ebrahim SA, Bawle EV.** Transmission of ring chromosome 13 from a mother to daughter with both having a 46,XX, r(13)(p13q34) karyotype. *Am J Med Genet A* 2004 Sep 1;129(3):316-320.
- **Belloso JM, Caballin MR, Gabau E, Baena N, Vidal R, Villatoro S, Guitart M.** Characterization of six marker chromosomes by comparative genomic hybridization. *Am J Med Genet A* 2005 Jul 15;136(2):169-174.
- **Benetkiewicz M, Piotrowski A, Diaz De Stahl T, Jankowski M, Bala D, Hoffman J, Srutek E, Laskowski R, Zegarski W, Dumanski JP.** Chromosome 22 array-CGH profiling of breast cancer delimited minimal common regions of genomic imbalances and revealed frequent intra-tumoral genetic heterogeneity. *Int J Oncol* 2006 Oct;29(4):935-945.
- **Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P.** Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 Feb;21(2):172-175.
- **Bettex M, Graf B, Winkler B, Gerber-Huber S.** Oro-palatal dysplasia Bettex-Graf--a new syndrome. *Eur J Pediatr Surg* 1998 Feb;8(1):4-8.
- **Beuren AJ.** Supravalvular aortic stenosis: a complex syndrome with and without mental retardation. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* VIII(5): 45-56, 1972.
- **Blennow E, Bui TH, Kristoffersson U, Vujic M, Anneren G, Holmberg E, Nordenskjold M.** Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39 105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 1994;14:1019-1028
- **Blennow E, Nielsen KB, Telenius H, Carter NP, Kristoffersson U, Holmberg E, Gillberg C, Nordenskjold M.** Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1995 Jan 2;55(1):85-94.
- **Blennow E, Sahlen S.** Rescue from the effects of trisomy 13q32-->qter owing to skewed X inactivation in a der(X)t(X;13)(p21;q32) carrier. *J Med Genet* 1999 Sep;36(9):718-719.
- **Bonnet C, Gregoire MJ, Brochet K, Raffo E, Leheup B, Jonveaux P.** Pure de-novo 5 Mb duplication at Xp11.22-p11.23 in a male: phenotypic and molecular characterization. *J Hum Genet* 2006;51(9):815-821.
- **Borg K, Stankiewicz P, Bocian E, Kruczek A, Obersztyn E, Lupski JR, Mazurczak T.** Molecular analysis of a constitutional complex genome rearrangement with 11 breakpoints involving chromosomes 3, 11, 12, and 21 and a approximately 0.5-Mb submicroscopic deletion in a patient with mild mental retardation. *Hum Genet* 2005 Nov;118(2):267-275.
- **Borg K, Bocian E, Stankiewicz P, Obersztyn E, Kruczek A, Nowakowska B, Ilnicka A, Mazurczak T.** Cytogenetic-molecular analysis of balanced chromosomal rearrangements in nine patients with intellectual disability, dysmorphic features and congenital abnormalities. *Med Wieku Rozwoj* 2006 Jan-Mar;10(1 Pt 2):227-246
- **Brandt CA, Hertz JM, Petersen MB, Vogel F, Noer H, Mikkelsen M.** Ring chromosome 13: lack of distinct syndromes based on different breakpoints on 13q. *J Med Genet* 1992 Oct;29(10):704-708.
- **Brevecic L, Michel S, Starke H, Muller K, Kosyakova N, Mrasek K, Weise A, Liehr T.** Multicolor FISH used for the characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in commercially available immortalized cell lines. *Cytogenet Genome Res* 2006;114(3-4):319-324.
- **Breen CJ, Barton L, Carey A, Dunlop A, Glancy M, Hall K, Hegarty AM, Khokhar MT, Power M, Ryan K, Green AJ, Stallings RL.** Applications of comparative genomic hybridisation in constitutional chromosome studies. *J Med Genet*. 1999 Jul;36(7):511-517.

- **Brenk CH, Prott EC, Trost D, Hoischen A, Walldorf C, Radlwimmer B, Wiczorek D, Propping P, Gillessen-Kaesbach G, Weber RG, Engels H.** Towards mapping phenotypical traits in 18p- syndrome by array-based comparative genomic hybridisation and fluorescent in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet* 2007 Jan;15(1):35-44.
- **Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, FitzPatrick D.** A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet* 1998 Oct;63(4):1153-1159.
- **Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, FitzPatrick D.** A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality--and tolerance of segmental aneuploidy--in humans. *Am J Hum Genet* 1999 Jun;64(6):1702-1708.
- **Brondum-Nielsen K, Mikkelsen M.** A 10-year survey, 1980-1990, of prenatally diagnosed small supernumerary marker chromosomes, identified by FISH analysis. Outcome and follow-up of 14 cases diagnosed in a series of 12,699 prenatal samples. *Prenat Diagn* 1995 Jul;15(7):615-619.
- **Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW, Willard HF.** Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature*. 1991 Jan 3;349(6304):82-84.
- **Brown J, Horsley SW, Jung C, Saracoglu K, Janssen B, Brough M, Daschner M, Beedgen B, Kerkhoffs G, Eils R, Harris PC, Jauch A, Kearney L.** Identification of a subtle t(16;19)(p13.3;p13.3) in an infant with multiple congenital abnormalities using a 12-colour multiplex FISH telomere assay, M-TEL. *Eur J Hum Genet* 2000 Dec;8(12):903-910.
- **Browne CE, Dennis NR, Maher E, Long FL, Nicholson JC, Sillibourne J, Barber JC.** Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 1997 Dec;61(6):1342-1352.
- **Bruyere H, Speevak MD, Winsor EJ, de Freminville B, Farrell SA, McGowan-Jordan J, McGillivray B, Chitayat D, McFadden D, Adouard V, Terespolsky D, Prieur F, Pantzar T, Hrynychak M.** Isodicentric Yp: prenatal diagnosis and outcome in 12 cases. *Prenat Diagn* 2006 Apr;26(4):324-329. Review.
- **Bryndorf T, Kirchoff M, Larsen J, Andreasson B, Bjerregaard B, Westh H, Rose H, Lundsteen C.** The most common chromosome aberration detected by high-resolution comparative genomic hybridization in vulvar intraepithelial neoplasia is not seen in vulvar squamous cell carcinoma. *Cytogenet Genome Res*. 2004;106(1):43-8. Erratum in: *Cytogenet Genome Res* 2005;108(4):365.
- **Buckton KE, Spowart G, Newton MS, Evans HJ.** Forty four probands with an additional "marker" chromosome. *Hum Genet* 1985;69(4):353-370.
- **Buhler EM, Malik NJ.** The tricho-rhino-phalangeal syndrome(s): chromosome 8 long arm deletion: is there a shortest region of overlap between reported cases? TRP I and TRP II syndromes: are they separate entities? *Am J Med Genet* 1984 ;19:113-119.
- **Bussani Mastellone C, Giovannucci Uzielli ML, Guarducci S, Nathan G.** Four cases of trisomy 9p syndrome with particular chromosome rearrangements. *Ann Genet* 1991;34(2):115-119.
- **Byrne JLB, Korn GA, Dev VG, Bunch GM, Brooks K, Friedman JM, Harrod MJE.** Partial trisomy 19p. *Am J Hum Genet* 1980;32:64A.

C

- **Cai T, Yu P, Tagle DA, Xia J.** Duplication of 7p21.2-->pter due to maternal 7p;21q translocation: implications for critical segment assignment in the 7p duplication syndrome. *Am J Med Genet* 1999 Oct 8;86(4):305-311.
- **Caldwell PD, Smith DW.** The XXY (Klinefelter's) syndrome in childhood: detection and treatment. *J Pediatr* 1972;80: 250-258.

- **Callen DF, Ringenbergs ML, Fowler JC, Freemantle CJ, Haan EA.** Small marker chromosomes in man: origin from pericentric heterochromatin of chromosomes 1, 9, and 16. *J Med Genet* 1990 Mar;27(3):155-159.
- **Callen DF, Eyre HJ, Ringenbergs ML, Freemantle CJ, Woodroffe P, Haan EA.** Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics. *Am J Hum Genet.* 1991 Apr;48(4):769-82. Erratum in: *Am J Hum Genet* 1991 Aug;49(2):503.
- **Callen DF, Eyre H, Yip MY, Freemantle J, Haan EA.** Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet* 1992 Jul 1;43(4):709-715.
- **Callen DF, Eyre HJ, Dolman G, Garry-Battersby MB, McCreanor JR, Valeba A, McGill JJ.** Molecular cytogenetic characterisation of a small ring X chromosome in a Turner patient and in a male patient with congenital abnormalities: role of X inactivation. *J Med Genet* 1995 Feb;32(2):113-116.
- **Camps J, Mrasek K, Prat E, Weise A, Starke H, Egozcue J, Miro R, Liehr T.** Molecular cytogenetic characterisation of the colorectal cancer cell line SW480. *Oncol Rep* 2004a Jun;11(6):1215-1218.
- **Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, Peinado MA, Miro R.** Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer* 2004b Jul 20;110(6):869-874.
- **Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miro R.** Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. *Carcinogenesis.* 2006 Mar;27(3):419-428.
- **Cano J, Oliveros O, Yunis E.** Phenotype variants, malignancy, and additional copies of 6p in retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1994 Sep;76(2):112-115.
- **Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, Mutchinick OM, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns WB, Ledbetter DH.** Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet* 2003;72: 918-930.
- **Carey JC, Viskochil DH.** Status of the human malformation map: 2002. *Am J Med Genet.* 2002 Dec 30;115(4):205-220.
- **Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B.** High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 2004 Jun;57(6):644-646.
- **Casas KA, Mononen TK, Mikail CN, Hased SJ, Li S, Mulvihill JJ, Lin HJ, Falk RE.** Chromosome 2q terminal deletion: report of 6 new patients and review of phenotype-breakpoint correlations in 66 individuals. *Am J Med Genet A* 2004 Nov 1;130(4):331-339.
- **Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ.** Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 1970;30(2):215-227
- **Centerwall WR, Beatty-DeSana JW.** The trisomy 9p syndrome. *Pediatrics* 1975 Nov;56(5):748-755.
- **Cervera M, Sanchez S, Molina B, Alcantara MA, Del Castillo V, Carnevale A, Gonzalez-del Angel A.** Trisomy of the short arm of chromosome 5 due to a de novo inversion and duplication (5)(p15.3 p13.3). *Am J Med Genet A* 2005 Aug 1;136(4):381-385. Review.
- **Cetin Z, Berker Karauzum S, Yakut S, Mihci E, Baumer A, Wey E, Tacoy S, Bagci G, Luleci G.** M-FISH applications in clinical genetics. *Genet Couns* 2005;16(3):257-268.
- **Chagnon P, Schneider R, Hebert J, Fortin PR, Provost S, Belisle C, Gingras M, Bolduc V, Perreault C, Silverman E, Busque L.** Identification and characterization of an Xp22.33;Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudoautosomal region 1 in an XX male patient with severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006 Apr;54(4):1270-1278.

- **Chen D, Gallie BL, Squire JA.** Minimal regions of chromosomal imbalance in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001 Aug;129(1):57-63.
- **Chen CP, Chen CP, Shih JC.** Association of partial trisomy 9p and the Dandy-Walker malformation. *Am J Med Genet A* 2005a Jan 1;132(1):111-112.
- **Chen CP, Chern SR, Chang TY, Lee CC, Chen WL, Wang W.** Prenatal diagnosis of partial trisomy 10q (10q25.3-->qter) and partial monosomy 18q (18q23-->qter). *Prenat Diagn* 2005b Nov;25(11):1069-1071.
- **Chen CP, Lin SP, Wang TH, Chen YJ, Chen M, Wang W.** Perinatal findings and molecular cytogenetic analyses of de novo interstitial deletion of 9q (9q22.3-->q31.3) associated with Gorlin syndrome. *Prenat Diagn* 2006a Aug;26(8):725-729.
- **Chen CP, Chern SR, Lee CC, Lin CC, Li YC, Hsieh LJ, Chen WL, Wang W.** Prenatal diagnosis of de novo t(2;18;14)(q33.1;q12.2;q31.2), dup(5)(q34q34), del(7)(p21.1p21.1), and del(10)(q25.3q25.3) and a review of the prenatally ascertained de novo apparently balanced complex and multiple chromosomal rearrangements. *Prenat Diagn* 2006b Feb;26(2):138-146. Review.
- **Chen CP, Lin CC, Li YC, Hsieh LJ, Lee CC, Wang W.** Primary ovarian failure in a mentally retarded woman with a de novo unbalanced X;autosome translocation. *Fertil Steril* 2006c Nov;86(5):1514.e1-2.
- **Chen CP, Lin SP, Lin CC, Li YC, Hsieh LJ, Chern SR, Lee CC, Chen LF, Hua HM, Wang W.** Prenatal diagnosis of low-level mosaicism for a small XIST-negative supernumerary ring X chromosome in a nondysmorphic male fetus. *Prenat Diagn* 2006d Apr;26(4):387-391.
- **Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH.** Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet.* 1999 Jun;8(6):1025-1037.
- **Chudley AE, Bauder F, Ray M, McAlpine PJ, Pena SD, Hamerton JL.** Familial mental retardation in a family with an inherited chromosome rearrangement. *J Med Genet.* 1974 Dec;11(4):353-366.
- **Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G.** High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999;84(3-4):156-160.
- **Chudoba I, Hickmann G, Friedrich T, Jauch A, Kozlowski P, Senger G.** mBAND: a high resolution multicolor banding technique for the detection of complex intrachromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 2004;104(1-4):390-393.
- **Chun K, Teebi AS, Jung JH, Kennedy S, Laframboise R, Meschino WS, Nakabayashi K, Scherer SW, Roy PN, Teshima I.** Genetic analysis of patients with the Saethre-Chotzen phenotype. *Am J Med Genet.* 2002;110:136-143,.
- **Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M.** Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 1999 Dec;19(12):1099-1103.
- **Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M.** Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod* 2004 Nov;10(11):839-846.
- **Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, Canadas P, Ordonez E, Lloveras E, Plaja A, Fuster C, Adinolfi M.** Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Sep;1075:288-298.
- **Clyde JM, Gosden RG, Rutherford AJ, Picton HM.** Demonstration of a mechanism of aneuploidy in human oocytes using Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril.* 2001 Oct;76(4):837-840.

- **Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher MR, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J, Benet J.** Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet Genome Res* 2004;107(1-2):18-21.
- **Codina-Pascual M, Campillo M, Kraus J, Speicher MR, Egozcue J, Navarro J, Benet J.** Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol Hum Reprod* 2006 Feb;12(2):123-133.
- **Collinson MN, Fisher AM, Walker J, Currie J, Williams L, Roberts P.** Inv(10)(p11.2q21.2), a variant chromosome. *Hum Genet* 1997 Dec;101(2):175-180.
- **Cook EH Jr, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E.** Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* 1997 Apr;60(4):928-934.
- **Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M.** Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):215-225.
- **Cotter PD, Ko E, Larabell SK, Rademaker AW, Martin RH.** Segregation of a supernumerary del(15) marker chromosome in sperm. *Clin Genet* 2000;58,488-492.
- **Courtens W, Wuyts W, Rooms L, Pera SB, Wauters J.** A subterminal deletion of the long arm of chromosome 10: a clinical report and review. *Am J Med Genet A*. 2006 Feb 15;140(4):402-409.
- **Crolla JA, Dennis NR, Jacobs PA.** A non-isotopic in situ hybridisation study of the chromosomal origin of 15 supernumerary marker chromosomes in man. *J Med Genet* 1992;29:699-703.
- **Crolla JA, Howard P, Mitchell C, Long FL, Dennis NR.** A molecular and FISH approach to determining karyotype and phenotype correlations in six patients with supernumerary marker(22) chromosomes. *Am J Med Genet* 1997;72:440-447.
- **Crolla JA.** FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am J Med Genet* 1998;75:367-381.
- **Crolla JA, van Heyningen V.** Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet* 2002;71(5):1138-1149.
- **Courtens W, Wuyts W, Rooms L, Pera SB, Wauters J.** A subterminal deletion of the long arm of chromosome 10: a clinical report and review. *Am J Med Genet A* 2006;15;140(4):402-409.
- **Cowell JK, Hogg A.** Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992 Nov;64(1):1-11. Review.

D

- **D'Amato Sizonenko L, Ng D, Oei P, Winship I.** Supernumerary marker chromosomes 5: confirmation of a critical region and resultant phenotype. *Am J Med Genet* 2002 Jul 22;111(1):19-26. Review.
- **Daniel A, Malafiej P, Preece K, Chia N, Nelson J, Smith M.** Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing. *Am J Med Genet* 1994 Oct 15;53(1):8-18.
- **Daniely M, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A.** Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;86(1):51-55.
- **Dawson AJ, Putnam S, Schultz J, Riordan D, Prasad C, Greenberg CR, Chodirker BN, Mhanni AA, Chudley AE.** Cryptic chromosome rearrangements detected by subtelomere assay in patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 2002 Dec;62(6):488-494.

- **De Braekeleer M.** Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements. *Clin Genet.* 1985 May;27(5):523-4.
- **de Bustos C, Diaz de Stahl T, Piotrowski A, Mantripragada KK, Buckley PG, Darai E, Hansson CM, Grigelionis G, Menzel U, Dumanski JP.** Analysis of copy number variation in the normal human population within a region containing complex segmental duplications on 22q11 using high-resolution array-CGH. *Genomics* 2006 Aug;88(2):152-162.
- **De Gregori M, Pramparo T, Memo L, Gimelli G, Messa J, Rocchi M, Patricelli MG, Ciccone R, Giorda R, Zuffardi O.** Direct duplication 12p11.21-p13.31 mediated by segmental duplications: a new recurrent rearrangement? *Hum Genet* 2005 Nov;118(2):207-213.
- **de Heer IM, Hoogeboom J, Vermeij-Keers C, de Klein A, Vaandrager JM.** Postnatal onset of craniosynostosis in a case of Saethre-Chotzen syndrome. *J Craniofac Surg* 2004 Nov;15(6):1048-1052.
- **De la Chapelle A, Schroder J, Pernu M.** Isochromosome for the short arm of X, a human 46, XXpi syndrome. *Ann Hum Genet* 1972 Jul;36(1):79-87.
- **de la Hoya M, Gutierrez-Enriquez S, Velasco E, Osorio A, Sanchez de Abajo A, Vega A, Salazar R, Esteban E, Llorca G, Gonzalez-Sarmiento R, Carracedo A, Benitez J, Miner C, Diez O, Diaz-Rubio E, Caldes T.** Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem.* 2006 Aug;52(8):1480-1485.
- **De Santis M, Di Gianantonio E, Straface G, Cavaliere AF, Caruso A, Schiavon F, Berletti R, Clementi M.** Ionizing radiations in pregnancy and teratogenesis: a review of literature. *Reprod Toxicol* 2005 Sep-Oct;20(3):323-329.
- **De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM.** Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001a Mar;38(3):145-150.
- **De Vries BB, Knight SJ, Homfray T, Smithson SF, Flint J, Winter RM.** Submicroscopic subtelomeric 1qter deletions: a recognisable phenotype? *J Med Genet* 2001 Mar;38(3):175-178.
- **De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C.** Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003 Jun;40(6):385-398.
- **De Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA.** Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005 Oct;77(4):606-616.
- **Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, Noel B, Sinet PM.** Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1993;1(2):114-124.
- **Deloukas P, Schuler GD, Gyapay G, Beasley EM, Soderlund C, Rodriguez-Tome P, Hui L, Matise TC, McKusick KB, Beckmann JS i col.** A physical map of 30,000 human genes. *Science* 1998 Oct 23;282(5389):744-746.
- **Demirhan O, Tastemir D, Sertdemir Y.** Chromosomal fragile sites in schizophrenic patients. *Genetika* 2006 Jul;42(7):985-992.
- **Depinet TW, Zackowski JL, Earnshaw WC, Kaffe S, Sekhon GS, Stallard R, Sullivan BA, Vance GH, Van Dyke DL, Willard HF, Zinn AB, Schwartz S.** Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet* 1997 Aug;6(8):1195-1204.
- **DesGroseilliers M, Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N.** Phenotypic variability in isodicentric Y patients: study of nine cases. *Clin Genet* 2006 Aug;70(2):145-50.
- **Di George AM.** *Birth Defects Orig. Art Ser* IV (1):116-121.

- **Drummond-Borg M, Kulharya AS, Tonk V, Garcia-Heras J.** Maternal complex chromosome rearrangement ascertained through a del (13)(q12.1q14.1) detected in her mildly affected daughter. *Am J Med Genet* 2002 Jan 1;107(1):61-63.
- **Duncan AM, Macdonald A, Brown CJ, Wolff D, Willard HF, Sutton B.** Characterization of a small supernumerary ring X chromosome by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1993 Dec 1;47(8):1153-1156.

E

- **Eggermann K, Mau UA, Bujdoso G, Koltai E, Engels H, Schubert R, Eggermann T, Raff R, Schwanitz G.** Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. *Clin Genet* 2002;62,89-93.
- **Eggermann T, Gamerding U, Bosse K, Heidrich-Kaul C, Raff R, Meyer E, Heil I, Schuler H, Korsch E, Schwanitz G.** Mosaic tetrasomy 14pter-q13 due to a supernumerary isodicentric derivative of proximal chromosome 14q. *Am J Med Genet A* 2005;134(3):305-308
- **Engelen JJ, Loneus WH, Vaes-Peters G, Schrandt-Stumpel CT.** Kabuki syndrome is not caused by an 8p duplication: a cytogenetic study in 20 patients. *Am J Med Genet A* 2005 Jan 30;132(3):276-277.
- **Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM.** Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 2003;73:1027-1040.
- **Erdogan F, Ullmann R, Chen W, Schubert M, Adolph S, Hultschig C, Kalscheuer V, Ropers HH, Spaich C, Tzschach A.** Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. *Am J Med Genet A* 2007 Jan 15;143(2):172-178.

F

- **Fagan K, Wilkinson I, Allen M, Brownlea S.** The coagulation factor VII regulator is located on 8p23.1. *Hum Genet* 1988 Aug;79(4):365-367.
- **Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM.** Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 2001 Nov-Dec;3(6):416-421.
- **Fauth C, Zhang H, Harabacz S, Brown J, Saracoglu K, Lederer G, Rittinger O, Rost I, Eils R, Kearney L, Speicher MR.** A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Hum Genet* 2001 Dec;109(6):576-583.
- **Fdez-Novoa C, Vargas MT, Torres F, Munoz J.** Partial tetrasomy chromosome 14. A new prenatal diagnosis case. *Prenat Diagn* 2006 Aug;26(8):746-749.
- **Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD, Amrhein JA, Bard PA, et al.** The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 Mar;76(3):690-695.
- **Fennell SJ, Benson JWT, Kindley AD, Schwarz MJ, Czepulkowski B.** Partial deletion 8q without Langer-Giedion syndrome: a recognisable syndrome. *J Med Genet* 1989;26: 67-171.

- **Finelli P, Giardino D, Russo S, Gottardi G, Cogliati F, Grugni G, Natacci F, Larizza L.** Refined FISH characterization of a de novo 1p22-p36.2 paracentric inversion and associated 1p21-22 deletion in a patient with signs of 1p36 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet* 2001 Apr 1;99(4):308-313.
- **Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE.** The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995 Feb;9(2):132-140.
- **Fracarro M, Lindsten J, Ford CE, Iselius L.** The 11q;22q translocation: a European collaborative analysis of 43 cases. *Hum Genet* 1980;56(1):21-51.
- **Francke U.** Retinoblastoma and chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet* 1976;16 (1-5):131-134.
- **Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H.** Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science*. 1992 Dec 11; 258(5089):1784-1787.
- **Frints SG, Fryns J, Lagae L, Syrrou M, Marynen P, Devriendt K.** Xp22.3; Yq11.2 chromosome translocation and its clinical manifestations. *Ann Genet* 2001 Apr-Jun;44(2):71-76.
- **Fryns J, Kleczkowska A, Van den Berghe H.** 1985. Clinical manifestation of Y/A translocation in man. In: Sandberg A, editor. *The Y chromosome, Part B: Clinical aspects of Y chromosome abnormalities*. New York:Alan R. Riss, Inc. p 213-243.
- **Fryns JP.** Chromosome 10, trisomy 10q2. In: Buyse ML, ed. *Publications*, 1990:359-360.
- **Fujimoto A, Lin MS, Schwartz S.** Direct duplication of 9p22-->p24 in a child with duplication 9p syndrome. *Am J Med Genet* 1998 May 26;77(4):268-271.
- **Fujiwara M, Yoshimoto T, Morita Y, Kamada M.** Interstitial deletion of chromosome 16q: 16q22 is critical for 16q- syndrome. *Am J Med Genet*. 1992 Jun 1;43(3):561-564.
- **Fuster C, Miro R, Templado C, Barrios L, Moreno V, Egozcue J.** Fragile sites and breakpoints in constitutional rearrangements and in human sperm chromosomes. *Hum Genet* 1989 Jul;82(4):330-334.
- **Fuster C, Miguez L, Miro R, Rigola MA, Perez A, Egozcue J.** Familial complex chromosome rearrangement ascertained by in situ hybridisation. *J Med Genet*. 1997 Feb;34(2):164-6.
- **Fuster C, Rigola MA, Egozcue J.** Human supernumeraries: are they B chromosomes? *Cytogenet Genome Res* 2004;106(2-4):165-172. Review.

G

- **Gajecka M, Glotzbach CD, Shaffer LG.** Characterization of a complex rearrangement with interstitial deletions and inversion on human chromosome 1. *Chromosome Res* 2006;14(3):277-282.
- **Gardner RJM, Sutherland GR** (1996). *Chromosome abnormalities and genetic counselling*. Oxford University Press, New York.
- **Genevieve D, Cormier-Daire V, Sanlaville D, Faivre L, Gosset P, Allart L, Picq M, Munnich A, Romana S, de Blois M, Vekemans M.** Mild phenotype in a 15-year-old boy with Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet A* 2003 Jan 1;116(1):90-93.
- **Gentile M, Susca F, Resta N, Stella A, Cascone A, Guanti G.** Infertility in carriers of two bisatellited marker chromosomes. *Clin Genet* 1993;44:71-75.
- **Giampietro PF, Babu D, Zabel CA, Silberman T, Zador I, DeBauche D, Ravnan JB, Dave BJ.** Novel clinical features in a child with partial deletion of chromosome 11 [del(11)(q24.2)]: further evidence for phenotypic heterogeneity. *Am J Med Genet* 2006;140A:385-387.

- **Giardino D, Finelli P, Russo S, Gottardi G, Rodeschini O, Atza MG, Natacci F, Larizza L.** Small familial supernumerary ring chromosome 2: FISH characterization and genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 2002 Aug 15;111(3):319-323.
- **Giardino D, Corti C, Ballarati L, Finelli P, Valtorta C, Botta G, Giudici M, Grosso E, Larizza L.** Prenatal diagnosis of a de novo complex chromosome rearrangement (CCR) mediated by six breakpoints, and a review of 20 prenatally ascertained CCRs. *Prenat Diagn* 2006 Jun;26(6):565-570.
- **Giglio S, Graw SL, Gimelli G, Pirola B, Varone P, Voullaire L, Lerzo F, Rossi E, Dellavecchia C, Bonaglia MC, Digilio MC, Giannotti A, Marino B, Carrozzo R, Korenberg JR, Danesino C, Sujansky E, Dallapiccola B, Zuffardi O.** Deletion of a 5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. *Circulation* 2000 Jul 25;102(4):432-437.
- **Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O.** Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 2001 Apr;68(4):874-883.
- **Gignac J, Danis K, Tihy F, Lemyre E.** Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations. *Am J Med Genet A* 2006 Dec 15;140(24):2768-2775.
- **Gimelli G, Giorda R, Beri S, Gimelli S, Zuffardi O.** A 46,X,inv(Y) young woman with gonadal dysgenesis and gonadoblastoma: cytogenetics, molecular, and methylation studies. *Am J Med Genet A*. 2006 Jan 1;140(1):40-45.
- **Gimelli G, Gimelli S, Dimasi N, Bocciardi R, Battista ED, Pramparo T, Zuffardi O.** Identification and molecular modelling of a novel familial mutation in the SRY gene implicated in the pure gonadal dysgenesis. *Eur J Hum Genet* 2007 Jan;15(1):76-80.
- **Girirajan S, Elsas LJ, Devriendt K, Elsea SH.** RAI1 variations in Smith-Magenis syndrome patients without 17p11.2 deletions. *J Med Genet* 2005;42:820-828.
- **Giuffrè M, La Placa S, Carta M, Cataliotti A, Marino M, Piccione M, Pusateri F, Meli F, Corsello G.** Hypercalciuria and kidney calcifications in terminal 4q deletion syndrome: further evidence for a putative gene on 4q. *Am J Med Genet A* 2004 Apr 15;126(2):186-190.
- **Glass IA, Rauen KA, Chen E, Parkes J, Alberston DG, Pinkel D, Cotter PD.** Ring chromosome 15: characterization by array CGH. *Hum Genet* 2006 Jan;118(5):611-617.
- **Glasser L, Meloni-Ehrig A, Joseph P, Mendiola J.** Benign chronic neutropenia with abnormalities involving 16q22, affecting mother and daughter. *Am J Hematol* 2006 Apr;81(4):262-270.
- **Godbout R, Squire J.** Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Aug 15;90(16):7578-7582.
- **Grange DK, Garcia-Heras J, Kilani RA, Lamp S.** Trisomy 20q13 --> 20qter in a girl with multiple congenital malformations and a recombinant chromosome 20 inherited from a paternal inversion (20)(p13q13.1): clinical report and review of the trisomy 20q phenotype. *Am J Med Genet A* 2005 Sep 1;137(3):308-12. Review.
- **Grossfeld PD, Mattina T, Lai Z, Favier B, Jones KL, Cotter F, Jones C.** 11q Consortium : The 11q terminal deletion disorder: a prospective study of 110 cases. *Am J Med Genet* 2004;129A: 51-61,
- **Gothelf D, Farber N, Raveh E, Apter A, Attias J.** Hyperacusis in Williams syndrome: characteristics and associated neuroaudiologic abnormalities. *Neurology* 2006;66:390-395.
- **Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Morizio E, Fantasia D, Colosimo A, Rinaldi MM, Cristini L, Simonelli A, Lonardo F, Turci A, Zatterale A, Lagana C, Stuppia L, Sabatino G, Palka G.** Identification of 14 rare marker chromosomes and derivatives by spectral karyotyping in prenatal and postnatal diagnosis. *Am J Med Genet* 2004 Jun 1;127A(2):144-148.

- **Guedes AD, Bianco B, Lipay MV, Brunoni D, de Lourdes Chauffaille M, Verreschi IT.** Determination of the sexual phenotype in a child with 45,X/46,X,Idic(Yp) mosaicism: importance of the relative proportion of the 45,X line in gonadal tissue. *Am J Med Genet A* 2006 Sep 1;140(17):1871-1875.
- **Guo WJ, Callif-Daley F, Zapata MC, Miller ME.** Clinical and cytogenetic findings in seven cases of inverted duplication of 8p with evidence of a telomeric deletion using fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1995 Sep 11;58(3):230-236.
- **Gutierrez-Mateo C, Benet J, Starke H, Oliver-Bonet M, Munne S, Liehr T, Navarro J.** Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH, a new 24-colour centromere-specific technique. *Hum Reprod* 2005 Dec;20(12):3395-3401.

H

- **Hadj-Kacem L, Hadj-Kacem H, Ayadi H, Ammar-Keskes L, Chakroun-Fki N, Rebai T, Bahloul A, Mhiri MN.** Screening of Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile men. *Arch Androl* 2006 May-Jun;52(3):169-174.
- **Hall BD, Langer LO, Giedion A, Smith DW, Cohen MM, Beals RK, Brandner M.** Langer-Giedion syndrome. *Birth Defects Orig. Art. Ser. X*(12): 147-164, 1974.
- **Hall S, Boda Y, Cohen M, Junio J, Polihronis A, Tyrrell V, Wright D.** FISH-mapping of r(9) and r(18) chromosomes in a mosaic newborn female. *Chromosome Res* 2005; 13 suppl. 1: 61 (Abstractnr. 1.108-P).
- **Hannam S, Greenough A, Dawson JM.** An unusual presentation of trisomy 9p syndrome with a partial Dandy-Walker malformation. *Eur J Pediatr.* 1999 Dec;158(12):1012.
- **Hanson JW. Human teratology.** In: **Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (eds).** Principles and practice of medical genetics, 3rd edn. Churchill Livingstone, New York, 1997 pp. 697-724.
- **Hecht F, Hecht BK.** Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements I. Amniocentesis. *Clin Genet.* 1984 Sep;26(3):169-73.
- **Helali N, Iafolla AK, Kahler SG, Qumsiyeh MB.** A case of duplication of 13q32-->qter and deletion of 18p11.32-->pter with mild phenotype: Patau syndrome and duplications of 13q revisited. *J Med Genet* 1996 Jul;33(7):600-602.
- **Hermsen MA, Tijssen M, Acero IH, Meijer GA, Ylstra B, Toral JF.** High resolution microarray CGH and MLPA analysis for improved genotype/phenotype evaluation of two childhood genetic disorder cases: ring chromosome 19 and partial duplication 2q. *Eur J Med Genet* 2005 Jul-Sep;48(3):310-318.
- **Hernando C, Carrera M, Ribas I, Parear N, Baraibar R, Egocue J, Fuster C.** Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis. *Prenat Diagn* 2002a Sep;22(9):802-805.
- **Hernando C, Plaja A, Rigola MA, Perez MM, Vendrell T, Egocue J, Fuster C.** Comparative genomic hybridisation shows a partial de novo deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations. *J Med Genet* 2002b May;39(5):E24.
- **Hernando C, Plaja A, Catala V, Sarret E, Egozcue J, Fuster C.** Primary amenorrhea in a woman with a cryptic complex chromosome rearrangement involving the critical regions Xp11.2 and Xq24. *Fertil Steril* 2004 Dec;82(6):1666-1671.
- **Hernando C.** Caracterización de anomalías cromosómicas en diagnóstico prenatal y postnatal mediante técnicas de citogenética molecular. Tesis doctoral, 2005.
- **Herzog S, Lohmann DR, Buiting K, Schuler A, Horsthemke B, Rehder H, Rieder H.** Marked differences in unilateral isolated retinoblastomas from young and older children studied by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2001 Feb;108(2):98-104.
- **Hoffer MJ, Hilhorst-Hofstee Y, Knijnenburg J, Hansson KB, Engelberts AC, Laan LA, Bakker E, Rosenberg C.** A 6Mb deletion in band 2q22 due to a complex chromosome rearrangement associated with severe psychomotor retardation, microcephaly and distinctive dysmorphic facial features. *Eur J Med Genet* 2006 Dec 8.

- **Hoog A, Bia B, Onadim Z, Cowell JK.** Molecular mechanism of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 90:7351-7355.
- **Hoglund P, Jalkanen R, Marttinen E, Alitalo T.** Interstitial 1q25.3-q31.3 deletion in a boy with mild manifestations. *Am J Med Genet A* 2003 Dec 15;123(3):290-295.
- **Hopkin RJ, Schorry E, Bofinger M, Milatovich A, Stern HJ, Jayne C, Saal HM.** New insights into the phenotypes of 6q deletions. *Am J Med Genet.* 1997 Jun 27;70(4):377-386.
- **Horvath JE, Viggiano L, Loftus BJ, Adams MD, Archidiacono N, Rocchi M, Eichler EE.** Molecular structure and evolution of an alpha satellite/non-alpha satellite junction at 16p11. *Hum Mol Genet* 2000;9:113-123
- **Howard PJ, Porteus M.** Deletion of chromosome 1p: a short review. *Clin Genet* 1990 Feb;37(2):127-131.
- **Huang B, Crolla JA, Christian SL, Wolf-Ledbetter ME, Macha ME, Papenhausen PN, Ledbetter DH.** Refined molecular characterization of the breakpoints in small inv dup(15) chromosomes. *Hum Genet* 1997;99:11-17.
- **Huang XL, de Michelena MI, Mark HF, Harston R, Benke PJ, Price SJ, Milunsky A.** Characterization of an alphoid supernumerary marker chromosome derived from 15q25-->qter using high-resolution CGH and multiplex FISH analyses. *Clin Genet* 2005 Dec;68(6):513-519.
- **Human gene mapping 11. London Conference.** Eleventh International Workshop on Human Gene Mappig. London, UK, August 18-22, 1991. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 58: 1-984
- **Hysert M, Bruyere H, Cote GB, Dawson AJ, Dolling JA, Fetni R, Hrynychak M, Lavoie J, McGowan-Jordan J, Tihy F, Duncan AM.** Prenatal cytogenetic assessment and inv(2)(p11.2q13). *Prenat Diagn* 2006 Sep;26(9):810-813.

I

- **Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C.** Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004 Sep;36(9):949-951.
- **Ilberry PLT, Lee CWG, Winn SM.** Incomplete trisomy in a mongoloid child exhibiting minimal stigmata. *Med J Austr* 1961;48:182-184.
- **Irving IM.** Exomphalos with macroglossia: a study of eleven cases. *J Pediat Surg* 1967;2:499-507.
- **ISCN(2005):** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer L.G., Tommerup N. (eds); S. Karger, Basel 2005.

J

- **Jackson MS, Rocchi M, Thompson G, Hearn T, Crosier M, Guy J, Kirk D, Mulligan L, Ricco A, Piccininni S, Marzella R, Viggiano L, Archidiacono N.** Sequences flanking the centromere of human chromosome 10 are a complex patchwork of arm-specific sequences, stable duplications and unstable sequences with homologies to telomeric and other centromeric locations. *Hum Mol Genet.* 1999 Feb;8(2):205-215.
- **Jacobs PA, Buckton KE, Cunningham C, Newton M.** An analysis of the break points of structural rearrangements in man. *J Med Genet* 1974 Mar;11(1):50-64.
- **Jacobs PA.** Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet* 1981;33:44-54
- **Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H.** Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 1992 Feb;29(2):103-108.

- **Jacobsen P, Hauge M, Henningsen K, Hobolth N, Mikkelsen M, Philip J.** An (11;21) translocation in four generations with chromosome 11 abnormalities in the offspring: a clinical, cytogenetical, and gene marker study. *Hum. Hered.* 1973;23:568-585.
- **James RS, Temple IK, Dennis NR, Crolla JA.** A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes. *Eur J Hum Genet* 1995;3(1):21-26.
- **Johansson B, Billstrom R, Kristoffersson U, Akerman M, Garwicz S, Ahlgren T, Malm C, Mitelman F.** Deletion of chromosome arm 3p in hematologic malignancies. *Leukemia* 1997 Aug;11(8):1207-1213.
- **Juppner H, Schipani E, Bastepe M, Cole DE, Lawson ML, Mannstadt M, Hendy GN, Plotkin H, Koshiyama H, Koh T, Crawford JD, Olsen BR, Vikkula M.** The gene responsible for pseudohypoparathyroidism type Ib is paternally imprinted and maps in four unrelated kindreds to chromosome 20q13.3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 29;95(20):11798-11803.

K

- **Kacinski M, Jaworek M, Skowronek-Bala B.** Caudal regression syndrome associated with the white matter lesions and chromosome 18p11.2 deletion. *Brain Dev.* 2007 Apr;29(3):164-166.
- **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 Oct 30;258(5083):818-821.
- **Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D.** Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994 Aug;10(4):231-243.
- **Kalz-Fuller B, Slegers E, Schwanitz G, Schubert R.** Characterisation, phenotypic manifestations and X-inactivation pattern in 14 patients with X-autosome translocations. *Clin Genet* 1999 May;55(5):362-366.
- **Kanjanavirojkul N, Limpaboon T, Patarapadungkit N, Yuenyao P, Pairojkul C.** Chromosome 3p alterations in northeastern Thai women with cervical carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005 Oct-Dec;6(4):501-504.
- **Karmous-Benailly H, Giuliano F, Massol C, Bloch C, De Ricaud D, Lambert JC, Perelman S.** Unbalanced inherited complex chromosome rearrangement involving chromosome 8, 10, 11 and 16 in a patient with congenital malformations and delayed development. *Eur J Med Genet* 2006 Sep-Oct;49(5):431-438.
- **Karst C, Gross M, Haase D, Wedding U, Hoffken K, Liehr T, Mkrtychyan H.** Novel cryptic chromosomal rearrangements detected in acute lymphoblastic leukemia detected by application of new multicolor fluorescent in situ hybridization approaches. *Int J Oncol* 2006 Apr;28(4):891-897.
- **Kausch K, Haaf T, Kohler J, Schmid M.** Complex chromosomal rearrangement in a woman with multiple miscarriages. *Am J Med Genet.* 1988 Oct;31(2):415-420.
- **Kim SK, Kim HJ, Yang YH, Kim IK, Bai SW, Kim JY, Park KH, Cho DJ, Song CH.** A case with balanced chromosome rearrangement involving chromosomes 9, 14, and 13 in a woman with recurrent abortion. *Yonsei Med J* 2001 Jun;42(3):345-348.
- **Kimberley KW, Morris CA, Hobart HH.** BAC-FISH refutes report of an 8p22-8p23.1 inversion or duplication in 8 patients with Kabuki syndrome. *BMC Med Genet* 2006 May 18;7:46.
- **Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C.** Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998 Mar 1;31(3):163-173.
- **Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, Lundsteen C.** Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 1999 Aug;25(4):410-413.

- **Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C.** High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001a Nov;38(11):740-744.
- **Kirchhoff M, Rose H, Gerdes T, Lundsteen C.** Screening for submicroscopic chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization. *European cytogeneticists association. Newsletter. No.8 July 2001b*
- **Kirchhoff M, Pedersen S, Kjeldsen E, Rose H, Duno M, Kolvraa S, Lundsteen C.** Prospective study comparing HR-CGH and subtelomeric FISH for investigation of individuals with mental retardation and dysmorphic features and an update of a study using only HR-CGH. *Am J Med Genet A* 2004 Jun 1;127(2):111-117.
- **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 Jan-Feb;50(1):33-42.
- **Kirsch S, Weiss B, Kleiman S, Roberts K, Pryor J, Milunsky A, Ferlin A, Foresta C, Matthijs G, Rappold GA.** Localisation of the Y chromosome stature gene to a 700 kb interval in close proximity to the centromere. *J Med Genet* 2002 Jul;39(7):507-513.
- **Kitsiou-Tzeli S, Sismani C, Ioannides M, Bashiardes S, Ketoni A, Touliatou V, Kolialexi A, Mavrou A, Kanavakis E, Patsalis PC.** Array-CGH analysis and clinical description of 2q37.3 de novo subtelomeric deletion. *Eur J Med Genet* 2007 Jan-Feb;50(1):73-78.
- **Kleczkowska A, Fryns JP, Van den Berghe H.** Complex chromosomal rearrangements (CCR) and their genetic consequences. *J Genet Hum.* 1982 Oct;30(3):199-214.
- **Kleczkowska A, Fryns JP, Moerman P, Vandenberghe K, Van den Berghe H.** Trisomy of the short arm of chromosome 5: autopsy data in a malformed newborn with inv dup (5) (p13.1---p15.3). *Clin Genet* 1987 Jul;32(1):49-56.
- **Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Paz G, Yavetz H.** The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum Reprod* 2001 Mar;16(3):399-402.
- **Kline AD, Griffin CA, Haddadin MH, Chudoba I, Morsberger LA, Hawkins AL, Amato RS, Munshi G, Cohen MM.** A de novo complex karyotype with two independent balanced translocations and a double inversion of chromosome 6 presenting with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet A.* 2004 Aug 30;129(2):124-129.
- **Knegt AC, Li S, Engelen JJ, Bijlsma EK, Warburton PE.** Prenatal diagnosis of a karyotypically normal pregnancy in a mother with a supernumerary neocentric 13q21 -->13q22 chromosome and balancing reciprocal deletion. *Prenat Diagn* 2003 Mar;23(3):215-220.
- **Knight SJ, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DL, Flint J, Kearney L.** Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Gene* 1997 Jan-Feb;5(1):1-8.
- **Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J.** Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999 Nov 13;354(9191):1676-1681.
- **Kok K, Dijkhuizen T, Swart YE, Zorgdrager H, van der Vlies P, Fehrmann R, te Meerman GJ, Gerssen-Schoorl KB, van Essen T, Sikkema-Raddatz B, Buys CH.** Application of a comprehensive subtelomere array in clinical diagnosis of mental retardation. *Eur J Med Genet* 2005 Jul-Sep;48(3):250-262.
- **Komura D, Shen F, Ishikawa S, Fitch KR, Chen W, Zhang J, Liu G, Ihara S, Nakamura H, Hurles ME, Lee C, Scherer SW, Jones KW, Shapero MH, Huang J, Aburatani H.** Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res* 2006 Dec;16(12):1575-1584.

- **Koochek M, Harvard C, Hildebrand MJ, Van Allen M, Wingert H, Mickelson E, Holden JJ, Rajcan-Separovic E, Lewis ME.** 15q duplication associated with autism in a multiplex family with a familial cryptic translocation t(14;15)(q11.2;q13.3) detected using array-CGH. *Clin Genet* 2006 Feb;69(2):124-134.
 - **Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sijm EA.** Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004 Dec;41(12):892-899.
 - **Kosztolanyi G.** Giemsa-11 technique elucidating three structurally altered nonfluorescent Y chromosomes: r (Y), idic (Yp), dir tan dup (Yp). *Ann Genet* 1988;31(4):235-240.
 - **Kotzot D.** Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. *Am J Med Genet* 2002 111:366-375.
 - **Kousseff BG, Papenhausen P, Essig YP, Torres MP.** Complex chromosome rearrangement with ankyloblepharon filiforme adnatum. *J Med Genet.* 1993 Feb;30(2):167-170.
 - **Kristensen TD, Wesenberg F, Jonsson OG, Carlsen NT, Forestier E, Kirchhoff M, Lundsteen C, Schmiegelow K.** High-resolution comparative genomic hybridisation yields a high detection rate of chromosomal aberrations in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Haematol* 2003 Jun;70(6):363-372.
- L**
- **Lalli C, Galasso C, Castro AL, Nardone AM, Paolo AD, Curatolo P.** Interstitial deletion of a proximal 3p: A clinically recognisable syndrome. *Brain Dev* 2006 Nov 22.
 - **Lam AC, Lam ST, Lai KK, Tong TM, Chau TC.** High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem* 2006 Mar;39(3):196-202.
 - **Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J i col.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
 - **Langer S, Fauth C, Rocchi M, Murken J, Speicher MR.** AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. *Hum Genet* 2001 Aug;109(2):152-158.
 - **Larsen J, Ottesen AM, Kirchhoff M, Lundsteen C, Larsen JK.** High resolution comparative genomic hybridization detects 7-8 megabasepair deletion in PCR amplified DNA. *Anal Cell Pathol* 2001;23(2):61-64.
 - **Lasan Trcic R, Hitrec V, Letica L, Cuk M, Begovic D.** Small supernumerary marker chromosome derived from proximal p-arm of chromosome 2: identification by fluorescent in situ hybridization. *Croat Med J* 2003 Aug;44(4):477-479.
 - **Le Caignec C, Boceno M, Joubert M, Winer N, Aubron F, Fallet-Bianco C, Rival JM.** Prenatal diagnosis of a small supernumerary, XIST-negative, mosaic ring X chromosome identified by fluorescence in situ hybridization in an abnormal male fetus. *Prenat Diagn* 2003 Feb;23(2):143-145.
 - **Ledbetter DH.** Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 1992 Sep;51(3):451-456.
 - **Lee J, Stanley JR, Vaz SA, Mulvihill JJ, Wilson P, Hopcus-Niccum D, Li S.** Down syndrome with pure partial trisomy 21q22 due to a paternal insertion (4;21) uncovered by uncultured amniotic fluid interphase FISH. *Am J Med Genet A* 2005 Jan 15;132(2):206-208.
 - **Leite RP, Souto M, Carvalho B, Martins M, Chaves R, Morais A, Guedes-Pinto H, Wienberg J, Ribeiro E.** Identification, characterization and clinical implications of two markers detected at prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2006 Oct;26(10):920-924.

- **Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatta J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R.** Trois cas de deletion partielle du bras court d'un chromosome 5. C. R. Acad. Sci. (Paris) 257: 3098, 1963.
- **Leonard NJ, Harley FL, Lin CC.** Terminal deletion of chromosome 10q at band 26.1: follow-up in an adolescent male with high-output renal failure from congenital obstructive uropathy. *Am J Med Genet* 1999 Sep 10;86(2):115-117.
- **Lespinasse J, Bugge M, Rethore MO, North MO, Lundsteen C, Kirchhoff M.** De novo complex chromosomal rearrangements (CCR) involving chromosome 1, 5, and 6 resulting in microdeletion for 6q14 in a female carrier with psychotic disorder. *Am J Med Genet A* 2004 Jul 15;128(2):199-203.
- **Levy B, Papenhausen P, Tepperberg J, Dunn T, Fallet S, Magid M, Kardon N, Hirschhorn K, Warburton P.** Prenatal molecular cytogenetic diagnosis of partial tetrasomy 10p due to neocentromere formation in an inversion duplication anaphoid marker chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 2000;91(1-4):165-170.
- **Levy B, Dunn TM, Kern JH, Hirschhorn K, Kardon NB.** Delineation of the dup5q phenotype by molecular cytogenetic analysis in a patient with dup5q/del 5p (cri du chat). *Am J Med Genet* 2002 Mar 15;108(3):192-197.
- **Li S, Malafiej P, Levy B, Mahmood R, Field M, Hughes T, Lockhart LH, Wu Z, Huang M, Hirschhorn K, Velagaleti GV, Daniel A, Warburton PE.** Chromosome 13q neocentromeres: molecular cytogenetic characterization of three additional cases and clinical spectrum. *Am J Med Genet* 2002 Jul 1;110(3):258-267.
- **Liang D, Wu L, Pan Q, Harada N, Long Z, Xia K, Yoshiura K, Dai H, Niikawa N, Cai F, Xia J.** father and son with mental retardation, a characteristic face, inv(12), and insertion trisomy 12p12.3-p11.2. *Am J Med Genet A* 2006 Feb 1;140(3):238-244.
- **Lin AE, Garver KL, Diggans G, Clemens M, Wenger SL, Steele MW, Jones MC, Israel J.** Interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4: further delineation of phenotypes. *Am J Med Genet* 1988 Nov;31(3):533-548. Review.
- **Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U.** Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002a Apr;9(4):335-339.
- **Liehr T, Claussen U.** Review: multicolor-FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. *Curr Genomics* 2002b 3:213-235
- **Liehr T, Nietzel A, Starke H, Heller A, Weise A, Kuechler A, Senger G, Ebner S, T Martin, Stumm M, Wegner R, Tönnies H, Hoppe C, Claussen U, von Eggeling F.** Characterization of small marker chromosomes (SMC) by recently developed molecular cytogenetic approaches. *J Ass Genet Techn* 2003;29:5-10.
- **Liehr T, Claussen U, Starke H.** Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* 2004a:107:55-67
- **Liehr T, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, von Eggeling F, Claussen U Starke H.** Characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in human. *Curr Genomics* 2004b:5:279-286
- **Liehr T, Mrasek K, Starke H, Claussen U, Schreiber G.** Unusual small supernumerary marker chromosome (sSMC) 9 in a Klinefelter patient. *Cytogenet Genome Res* 2005;111(2):179-181.
- **Liehr T, Mrasek K, Weise A, Dufke A, Rodriguez L, Martinez Guardia N, Sanchis A, Vermeesch JR, Ramel C, Polityko A, Haas OA, Anderson J, Claussen U, von Eggeling F, Starke H.** Small supernumerary marker chromosomes--progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res* 2006;112(1-2):23-34.
- **Lillington DM, Kingston JE, Coen PG, Price E, Hungerford J, Domizio P, Young BD, Onadim Z.** Comparative genomic hybridization of 49 primary retinoblastoma tumors identifies chromosomal regions associated with histopathology, progression, and patient outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Feb;36(2):121-128.

- **Linnankivi T, Tienari P, Somer M, Kahkonen M, Lonnqvist T, Valanne L, Pihko H.** 18q deletions: clinical, molecular, and brain MRI findings of 14 individuals. *Am J Med Genet A* 2006 Feb 15;140(4):331-339.
- **Lloveras E, Perez C, Sole F, Zamora L, Lladonosa A, Espinet B, Silvestre E, Serra J, Vendrell T, Fernandez B, Salido M, Plaja A.** Two cases of tetrasomy 9p syndrome with tissue limited mosaicism. *Am J Med Genet A* 2004 Feb 1;124(4):402-406.
- **Locke DP, Segraves R, Nicholls RD, Schwartz S, Pinkel D, Albertson DG, Eichler EE.** BAC microarray analysis of 15q11-q13 rearrangements and the impact of segmental duplications. *J Med Genet* 2004 Mar;41(3):175-182.
- **Lopez I, Bafalliu JA, Bernabe MC, Garcia F, Costa M, Guillen-Navarro E.** Prenatal diagnosis of de novo deletions of 8p23.1 or 15q26.1 in two fetuses with diaphragmatic hernia and congenital heart defects. *Prenat Diagn* 2006 Jun;26(6):577-580.
- **Lugtenberg D, de Brouwer AP, Kleefstra T, Oudakker AR, Frints SG, Schrandt-Stumpel CT, Fryns JP, Jensen LR, Chelly J, Moraine C, Turner G, Veltman JA, Hamel BC, de Vries BB, van Bokhoven H, Yntema HG.** Chromosomal copy number changes in patients with non-syndromic X linked mental retardation detected by array CGH. *J Med Genet.* 2006 Apr;43(4):362-370.
- **Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI.** Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992 Apr;1(1):29-33.
- **Lurie IW, Wulfsberg EA, Prabhakar G, Rosenblum-Vos LS, Supovitz KR, Cohen MM.** Complex chromosomal rearrangements: some breakpoints may have cellular adaptive significance. *Clin Genet.* 1994 Sep;46(3):244-247.
- **Lykavieris P, Crosnier C, Trichet C, Meunier-Rotival M, Hadchouel M.** Bleeding tendency in children with Alagille syndrome. *Pediatrics* 2003;111:167-170.

M

- **Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, Guichaoua M, Metzler-Guillemain C, Collignon P, Frances AM, Belougne J, Clemente E, Chiaroni J, Chevillard C, Durand C, Ducourneau A, Pech N, McElreavey K, Mattei MG, Mitchell MJ.** Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet.* 2004 Nov;41(11):814-825.
- **Madan K.** Paracentric inversions: a review. *Hum Genet* 1995 Nov;96(5):503-515. Review.
- **Madrigal I, Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Fernandez I, Fernandez-Buriel M, Mila M.** MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med.* 2007 Feb;9(2):117-22.
- **Mahjoubi F, Peters GB, Malafiej P, Shalhoub C, Turner A, Daniel A, Hill RJ.** An anaphoid marker chromosome inv dup(15)(q26.1qter), detected during prenatal diagnosis and characterized via chromosome microdissection. *Cytogenet Genome Res* 2005;109(4):485-490.
- **Mairal A, Pinglier E, Gilbert E, Peter M, Validire P, Desjardins L, Doz F, Aurias A, Couturier J.** Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes Chromosomes Cancer* 2000 Aug;28(4):370-379.
- **Manea SR, Gershin IF, Babu A, Willner JP, Desnick RJ, Cotter PD.** Mosaicism for a small supernumerary ring X chromosome in a dysmorphic, growth-retarded male: mos47,XXY/48,XXY, +r(X). *Clin Genet* 1997 Dec;52(6):432-435.
- **Manenti E.** Two extra inv dup(15) chromosomes and male infertility: second case. *Am J Med Genet* 1992;42:402-403.
- **Mansfield ES, Kronick MN.** Alternative labeling techniques for automated fluorescence based analysis of PCR products. *Biotechniques* 1993 Aug;15(2):274-279.

- **Maratou K, Siddique Y, Kessler AM, Davies GE.** Novel methodology for the detection of chromosome 21-specific alpha-satellite DNA sequences. *Genomics* 1999 May 1;57(3):429-432.
- **Marrocco G, Poscente M, Majore S, De Bernardo C, Rinaldi R, Del Porto G, Storniello G, Grammatico P.** Clinical management and molecular cytogenetic characterization in a 45,X/46,X,idic(Yp) patient with severe hypospadias. *J Pediatr Surg* 2003 Aug;38(8):1258-1262.
- **Martin CL, Waggoner DJ, Wong A, Uhrig S, Roseberry JA, Hedrick JF, Pack SD, Russell K, Zackai E, Dobyns WB, Ledbetter DH.** "Molecular rulers" for calibrating phenotypic effects of telomere imbalance. *J Med Genet* 2002 Oct;39(10):734-740.
- **Martin-Lucas MA, Perez-Castillo A, Abrisqueta JA.** Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes. *Hum Genet* 1986 73,133-136.
- **Martinez-Ramirez A, Urioste M, Melchor L, Blesa D, Valle L, de Andres SA, Kok K, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Benitez J.** Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer* 2005 Mar;42(3):287-298.
- **Masuno M, Imaizumi K, Nakamura M, Matsui K, Goto A, Kuroki Y.** Miller-Dieker syndrome due to maternal cryptic translocation t(10;17)(q26.3;p13.3) *Am J Med Genet* 1995 Dec 4;59(4):441-443.
- **Mathijssen IB, Hoovers JM, Mul AN, Man HY, Ket JL, Hennekam RC.** Array comparative genomic hybridization analysis of a familial duplication of chromosome 13q: a recognizable syndrome. *Am J Med Genet A* 2005 Jul 1;136(1):76-80.
- **Matthaei A, Werner W, Gerlach EM, Koerner U, Tinschert S, Nitz I, Herr A, Rump A, Bartsch O, Hinkel KG, Schrock E, Oexle K.** Small reciprocal insertion detected by spectral karyotyping (SKY) and delimited by array-CGH analysis. *Eur J Med Genet.* 2005 Jul-Sep;48(3):328-38.
- **McElreavey K, Cortes LS.** X-Y translocations and sex differentiation. *Semin Reprod Med* 2001 Jun;19(2):133-139.
- **McGee TL, Yandell DW, Dryja TP.** Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene* 1989 Aug 1;80(1):119-128.
- **McKenzie F, Turner A, Withers S, Dalzell P, McGlynn M, Kirk EP.** Dominant inheritance of cleft palate, microstomia and micrognathia--possible linkage to the fragile site at 16q22 (FRA16B). *Clin Dysmorphol* 2002 Oct;11(4):237-241.
- **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 imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 2006 Aug;43(8):625-633. Epub 2006 Feb 20.
- **Metzler-Guillemain C, Mignon C, Depetris D, Guichaoua MR, Mattei MG.** Bivalent 15 regularly associates with the sex vesicle in normal male meiosis. *Chromosome Res* 1999;7(5):369-378
- **Migliori MV, Ciaschini AM, Discepoli G, Abbasciano V, Barbato M, Pannone E.** Distal trisomy of 10q. Report of a new case of duplication 10q25.2-25.3-->qter defined by FISH. *Ann Genet* 2002 Jan-Mar;45(1):9-12.
- **Miller JQ.** Lissencephaly in 2 sibs. *Neurology* 1963;13:841-850.
- **Miller RW, Fraumeni JFJr, Manning MD.** Association of Wilms' tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. *New Eng J Med* 1964;270:922-927.
- **Milunsky JM, Huang XL.** Unmasking Kabuki syndrome: chromosome 8p22-8p23.1 duplication revealed by comparative genomic hybridization and BAC-FISH. *Clin Genet* 2003 Dec;64(6):509-516.

- **Mircher C, Rethore MO, Lespinasse J, Fert-Ferrer S, Lundsteen C, Kirchoff M.** Interstitial deletion of the short arm of chromosome 1: attempt to establish a clinical phenotype (46,XX,del (1)(p22p32)). *Am J Med Genet A* 2003 Apr 15;118(2):176-179. Review.
- **Molina-Gomes D, Nebout V, Daikha-Dahmane F, Vialard F, Ville Y, Selva J.** Partial trisomy 20p resulting from recombination of a maternal pericentric inversion: case report of a prenatal diagnosis by chorionic villus sampling. *Prenat Diagn* 2006 Mar;26(3):239-341.
- **Moog U, Engelen JJ, Albrechts JC, Baars LG, de Die-Smulders CE.** Familial dup(8)(p12p21.1): mild phenotypic effect and review of partial 8p duplications. *Am J Med Genet* 2000 Oct 2;94(4):306-310. Review.
- **Moore DH, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW.** A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997 Jul 1;28(3):183-190.
- **Mowrey PN, Williford B, Kratzer S, Tepperberg JH, Gadi IK, Phillips KK, Canterino J, Neal R, Dalayar T, Pappenhausen PR.** Risk assessment of prenatal double supernumerary ring(9) chromosomes. *Am J Hum Genet* 2001, 68(Suppl 4):807
- **Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Rocchi M, Claussen U, Liehr T .** Reconstruction of the female Gorilla gorilla karyotype using 25-color FISH and multicolour banding (MCB). *Cytogenet Cell Genet* 2001 93:242-248
- **Mrasek K, Starke H, Liehr T.** Another small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 2: towards a genotype/phenotype correlation. *J Histochem Cytochem* 2005 Mar;53(3):367-370.
- **Mueller RF, Young ID.** *Genética Médica*. Emery's. 10a edició 2001
- **Müller-Navia J, Nebel A, Schleiermacher E.** Complete and precise characterization of marker chromosomes by application of microdissection in prenatal diagnosis. *Hum Genet* 1995 Dec;96(6):661-669.
- **Munne S, Bahce M, Schimmel T, Sadowy S, Cohen J.** Case report: chromatid exchange and predivision of chromatids as other sources of abnormal oocytes detected by preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Prenat Diagn* 1998 Dec;18(13):1450-1458.

N

- **Nakatake Y, Hoshikawa M, Asaki T, Kassai Y, Itoh N.** Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Biochim Biophys Acta* 2001 Feb 16;1517(3):460-463.
- **Neri G, Reynolds JF, Westphal J, Hinz J, Daniel A.** Interstitial deletion of chromosome 3p: report of a patient and delineation of a proximal 3p deletion syndrome. *Am J Med Genet* 1984 Sep;19(1):189-193.
- **Neas KR, Yip MY, James C, Kirk EP.** Patient with a non-mosaic isodicentric Yp and mild developmental delay. *Am J Med Genet A* 2005 Aug 30;137(2):223-224.
- **Ness GO, Lybaek H, Houge G.** Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 2002 Nov 22;113(2):125-136.
- **Nielsen KB, Tommerup N, Jespersen B, Nygaard P, Kleif L.** Segregation of a t(3;20) translocation through three generations resulting in unbalanced karyotypes in six persons. *J Med Genet* 1986 Oct;23(5):446-451.
- **Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T.** A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 2001 Mar;108(3):199-204.

- **Nikitina NV, Bushueva OA, Nikolaeva EB, Pavlov GV, Lurie IW.** Maternal transmission of a ring chromosome 15. *Genet Couns* 2003;14(2):181-186.
- **Northrop EL, Ren H, Bruno DL, McGhie JD, Coffa J, Schouten J, Choo KH, Slater HR.** Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. *Hum Mutat* 2005 Nov;26(5):477-486.
- **Novelli A, Ceccarini C, Bernardini L, Zuccarello D, Caputo V, Digilio MC, Mingarelli R, Dallapiccola B.** High frequency of subtelomeric rearrangements in a cohort of 92 patients with severe mental retardation and dysmorphism. *Clin Genet* 2004 Jul;66(1):30-38.
- **Nygaard U, Larsen J, Kristensen TD, Wesenberg F, Jonsson OG, Carlsen NT, Forestier E, Kirchhoff M, Larsen JK, Schmiegelow K, Christensen IJ.** Flow cytometric DNA index, G-band karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006 Mar;28(3):134-140.

O

- **Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J, Benet J.** Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet.* 2003 Nov;11(11):879-83.
- **Oliveros O, Yunis E.** Chromosome evolution in retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995 Jul 15;82(2):155-160.
- **Opitz JM.** Invited editorial comment: Study of minor anomalies in childhood malignancy. *Eur J Pediatr* 1985;144:252-254
- **Oppenheimer S, Dignan P, Soukup S.** Partial trisomy 20p: familial occurrence. *Am J Med Genet* 2000 Dec 11;95(4):316-319. Review.
- **Ostroverkhova NV, Nazarenko SA, Rubtsov NB, Nazarenko LP, Bunina EN.** Characterization of a small supernumerary ring marker derived from chromosome 2 by forward and reverse chromosome painting. *Am J Med Genet* 1999 Nov 26;87(3):217-220.
- **Ottesen AM, Skakkebaek NE, Lundsteen C, Leffers H, Larsen J, Rajpert-De Meyts E.** High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Oct;38(2):117-125.
- **Ottesen AM, Larsen J, Gerdes T, Larsen JK, Lundsteen C, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E.** Cytogenetic investigation of testicular carcinoma in situ and early seminoma by high-resolution comparative genomic hybridization analysis of subpopulations flow sorted according to DNA content. *Cancer Genet Cytogenet* 2004 Mar;149(2):89-97.

P

- **Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR.** Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet* 1980 Dec;18(6):436-444.
- **Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Aminosos C, Arcas J, Martinez Bermejo A, Fernandez L, Lopez Pajares I.** MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet* 2006 Mar;69(3):228-233.
- **Paoloni-Giacobino A, Morris MA, Dahoun SP.** Prenatal supernumerary r(16) chromosome characterized by multiprobe FISH with normal pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 1998 Jul;18(7):751-752.

- **Parikh V, Shugart YY, Doheny KF, Zhang J, Li L, Williams J, Hayden D, Craig B, Capo H, Chamblee D, Chen C, Collins M, Dankner S, Fiergang D, Guyton D, Hunter D, Hutcheon M, Keys M, Morrison N, Munoz M, Parks M, Plotsky D, Protzko E, Repka MX, Sarubbi M, Schnall B, Siatkowski RM, Traboulsi E, Waeltermann J, Nathans J.** A strabismus susceptibility locus on chromosome 7p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Oct 14;100(21):12283-12288.
- **Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C, Stavrides G, Ioulianos A, Kitsiou-Tzeli S, Galla-Voumvouraki A, Kosmaidou Z, Hadjiathanasiou CG, McElreavey K.** Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *Am J Med Genet A*. 2005 Jun 1;135(2):145-149.
- **Paulis M, Bensi M, Moralli D, De Carli L, Raimondi E.** A set of duplicons on human chromosome 9 is involved in the origin of a supernumerary marker chromosome. *Genomics* 2006;87(6):747-757.
- **Pawlowitzki IH, Grobe H, Holzgreve W.** Trisomy 20q due to maternal t(16;20) translocation. First case. *Clin Genet* 1979 Feb;15(2):167-170.
- **Pazooki M, Lebbar A, Roubergues A, Baverel F, Letessier D, Dupont JM.** Pure familial 6q21q22.1 duplication in two generations. *Eur J Med Genet* 2007 Jan-Feb;50(1):60-65.
- **Penaherrera MS, Ma S, Ho Yuen B, Brown CJ, Robinson WP.** X-chromosome inactivation (XCI) patterns in placental tissues of a paternally derived bal t(X;20) case. *Am J Med Genet A* 2003 Apr 1;118(1):29-34.
- **Penny LA, Dell'Aquila M, Jones MC, Bergoffen J, Cunniff C, Fryns JP, Grace E, Graham JM Jr, Kousseff B, Mattina T, Syme J, Voullaire L, Zelante L, Zenger-Hain J, Jones OW, Evans GA.** Clinical and molecular characterization of patients with distal 11q deletions. *Am J Hum Genet* 1995;56: 676-683.
- **Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M.** Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 1994 May 14;343(8907):1197-1198.
- **Plotner PL, Smith JL, Northrup H.** Trisomy 20q caused bder(4)t(4;20)(q35;q13.1): report of a new atient and review of the literature. *Am J Med Genet* 2002 Jul 22;111(1):71-75.
- **Pierquin G, Herens C, Dodinval P, Frederic J, Weber I, Senterre J, Fryns JP.** Partial trisomy 20q due to paternal t(8;20) translocation. Case report and review of the literature. *Clin Genet* 1988 May;33(5):386-389.
- **Pinson L, Perrin A, Plouzenec C, Parent P, Metz C, Collet M, Le Bris MJ, Douet-Guilbert N, Morel F, De Braekeleer M.** Detection of an unexpected subtelomeric 15q26.2 --> qter deletion in a little girl: clinical and cytogenetic studies. *Am J Med Genet A* 2005 Oct 1;138(2):160-165. Review.
- **Piovani G, Borsani G, Bertini V, Kalscheuer VM, Viertel P, Bellotti D, Valseriati D, Barlati S.** Unexpected identification of two interstitial deletions in a patient with a pericentric inversion of a chromosome 4 and an abnormal phenotype. *Eur J Med Genet* 2006 May-Jun;49(3):215-223.
- **Plattner R, Heerema NA, Yurov YB, Palmer CG.** Efficient identification of marker chromosomes in 27 patients by stepwise hybridization with alpha-satellite DNA probes. *Hum Genet* 1993 Mar;91(2):131-140.
- **Plotner PL, Smith JL, Northrup H.** Trisomy 20q caused by der(4) t(4;20) (q35;q13.1): report of a new patient and review of the literature. *Am J Med Genet* 2002 Jul 22;111(1):71-75. Review.
- **Polityko AD, Goncharova E, Shamingina L, Drozdovskaja N, Podleschuk L, Abramchik E, Jaroshevich E, Khurs O, Pisarik I, Pribushenya O, Romyantseva N, Naumchik I.** Pallister-Killian syndrome: rapid decrease of isochromosome 12p frequency during amniocyte subculturing. Conclusion for strategy of prenatal cytogenetic diagnostics. *J Histochem Cytochem* 2005 Mar;53(3):361-364.

- **Pollack JR.** Chromosome instability leaves its mark. *Nat Genet.* 2006 Sep;38(9):973-4.
- **Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Brough M, Hager H-D, Tariverdian G, Brown J, Kearney L, Jauch A.** Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet* 2002 111:31-39.
- **Potluri VR, Helson L, Ellsworth RM, Reid T, Gilbert F.** Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma. A review. *Cancer* 1986 Aug 1;58(3):663-671. Review.
- **Prader A, Labhart A, Willi H.** Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach Myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wschr* 1956;86:1260-1261.
- **Puvabanditsin S, Garrow E, Zia-Ullah MO, Supavekin S, Lianthanasarn P, Denev KI.** Monosomy 11Q: report of new phenotypic manifestations. *Genet Couns* 2001;12(3):283-286.

Q

- **Quarrell OWJ, Snell RG, Curtis MA, Roberts SH, Harper PS, Shaw DJ.** Paternal origin of the chromosomal deletion resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet* 1991;28:256-259.

R

- **Raimondi E, Ferretti L, Young BD, Sgaramella V, De Carli L.** The origin of a morphologically unidentifiable human supernumerary minichromosome traced through sorting, molecular cloning, and in situ hybridisation. *J Med Genet* 1991 Feb;28(2):92-96.
- **Rajcan-Separovic E, Robinson WP, Stephenson M, Pantzar T, Arbour L, McFadden D, Guscott J.** Recurrent trisomy 15 in a female carrier of der(15)t(Y;15)(q12;p13). *Am J Med Genet* 2001 Apr 1;99(4):320-324.
- **Rajender S, Rajani V, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K.** SRY-negative 46,XX male with normal genitals, complete masculinization and infertility. *Mol Hum Reprod* 2006 May;12(5):341-346.
- **Rauch A, Pfeiffer RA, Trautmann U, Liehr T, Rott HD, Ulmer R.** A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Clin Genet* 1992 Aug;42(2):84-90.
- **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 Jun;43(6):478-489.
- **Reddy KS.** A paternally inherited terminal deletion, del(8)(p23.1)pat, detected prenatally in an amniotic fluid sample: a review of deletion 8p23.1 cases. *Prenat Diagn* 1999 Sep;19(9):868-872.
- **Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC, Lambros MB, Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Sarrio D, Savage K, Dexter T, Irvani M, Fenwick K, Weber B, Hardisson D, Schmitt FC, Palacios J, Lakhani SR, Ashworth A.** FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006 Nov 15;12(22):6652-6662.
- **Reish O, Berry SA, Dewald G, King RA.** Duplication of 7p: further delineation of the phenotype and restriction of the critical region to the distal part of the short arm. *Am J Med Genet* 1996 Jan 2;61(1):21-25. Review.
- **Richards RI.** Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet.* 2001 Jun;17(6):339-345.

- **Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, Ng BL, Scott C, Whittaker J, Adinolfi M, Carter NP, Bobrow M.** Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet.* 2006 Apr;43(4):353-361.
- **Riedl S, Giedion A, Schweitzer K, Mullner-Eidenbock A, Grill F, Frisch H, Ludecke HJ.** Pronounced short stature in a girl with tricho-rhino-phalangeal syndrome II (TRPS II, Langer-Giedion syndrome) and growth hormone deficiency. *Am J Med Genet* 2004;131A: 200-203.
- **Rigola MA, Plaja A, Mediano C, Miro R, Egozcue J, Fuster C.** Characterization of a heritable partial monosomy 18p by molecular and cytogenetic analysis. *Am J Med Genet* 2001 Nov 15;104(1):37-41.
- **Rigola MA, Carrera M, Ribas I, Egozcue J, Miro R, Fuster C.** A comparative genomic hybridization study in a 46,XX male. *Fertil Steril.* 2002a Jul;78(1):186-8.
- **Rigola MA, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.** Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2002b Aug;137(1):49-53.
- **Rivera H, Ayala-Madrigal ML, Barros-Nunez JP, Arnaud-Lopez L, Maloney V, Crolla JA.** A highly complex rea(2;3;11) and aniridia by position effect. *Cytogenet Genome Res* 2006;114(1):83-88.
- **Rizzu P, Baldini A.** Subchromosomal band interval mapping and ordering of DNA markers in the region 3q26.3-q27 involved in the dup(3q) syndrome. *Genomics* 1994 Dec;24(3):580-582.
- **Roberts AE, Cox GF, Kimonis V, Lamb A, Irons M.** Clinical presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature. *Am J Med Genet A* 2004 Aug 1;128(4):352-63. Review.
- **Robinson A, Linden MG, Bender BG.** Prenatal diagnosis of sex chromosome abnormalities. In: Milunsky A, editor. *Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention, and treatment.* 4th ed. Baltimore (MD): John Hopkins University Press; 1998. p. 249-85.
- **Rodewald A, Zankl M, Gley EO, Zang KD.** Partial trisomy 5q: three different phenotypes depending on different duplication segments. *Hum Genet* 1980;55(2):191-198.
- **Rodriguez L, Zollino M, Climent S, Mansilla E, Lopez-Grondona F, Martinez-Fernandez M L, Murdolo M, Martinez-Frias M L.** The new Wolf-Hirschhorn syndrome critical region (WHSCR-2): a description of a second case. *Am J Med Genet* 2005;136A: 175-178.
- **Roelfsema JH, White SJ, Ariyurek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, Bacino CA, den Dunnen JT, van Ommen GJB, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJM.** Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet* 2005;76:572-580.
- **Roggenbuck JA, Mendelsohn NJ, Tenenholz B, Ladda RL, Fink JM.** Duplication of the distal long arm of chromosome 15: report of three new patients and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2004 May 1;126(4):398-402. Review.
- **Rooms L, Reyniers E, Kooy RF.** Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat* 2005 Jun;25(6):513-524. Review.
- **Rowe AG, Abrams L, Qu Y, Chen E, Cotter PD.** Tetrasomy 15q25-->qter: cytogenetic and molecular characterization of an analphoid supernumerary marker chromosome. *Am J Med Genet* 2000 Aug 28;93(5):393-398.
- **Rubinstein JH, Taybi H.** Broad thumbs and toes and facial abnormalities. *Am J Dis Child* 1963;105:588-608.

S

- **Salbert BA, Solomon M, Spence JE, Jackson-Cook C, Brown J, Bodurtha J.** Partial trisomy 19p: case report and natural history. *Clin Genet.* 1992 Mar;41(3):143-146.
- **Samonte RV, Eichler EE.** Segmental duplications and the evolution of the primate genome. *Nat Rev Genet* 2002 Jan;3(1):65-72. Review.
- **Sanlaville D, Genevieve D, Bernardin C, Amiel J, Baumann C, de Blois MC, Cormier-Daire V, Gerard B, Gerard M, Le Merrer M, Parent P, Prieur F, Prieur M, Raoul O, Toutain A, Verloes A, Viot G, Romana S, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Turleau C.** Failure to detect an 8p22-8p23.1 duplication in patients with Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005 May;13(5):690-693. Review.
- **Santos M, Mrasek K, Rigola MA, Starke H, Liehr T, Fuster C.** Identification of a "cryptic mosaicism" involving at least 4 different, small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 9 in a woman without reproductive success. *Fertil Steril* 2007. Acceptat.
- **Savage JR.** Assignment of aberration breakpoints in banded chromosomes. *Nature.* 1977 Dec 8;270(5637):513-4.
- **Schinzl A, Schmid W.** Interstitial deletion of the long arm of chromosome 1, del(1)(q21 leads to q25) in a profoundly retarded 8-year-old girl with multiple anomalies. *Clin Genet* 1980 Oct;18(4):305-313.
- **Schinzl A.** Catalogue of Chromosome Aberrations in Man 2. Edition Berlin, W.deGruyter, 2001.
- **Schinzl A, Niedrist D.** Chromosome imbalances associated with epilepsy. *Am J Med Genet* 2001;106:119-124.
- **Schoumans J, Nielsen K, Jeppesen I, Anderlid BM, Blennow E, Brondum-Nielsen K, Nordenskjold M.** A comparison of different metaphase CGH methods for the detection of cryptic chromosome aberrations of defined size. *Eur J Hum Genet* 2004 Jun;12(6):447-454.
- **Schoumans J, Staaf J, Jonsson G, Rantala J, Zimmer KS, Borg A, Nordenskjold M, Anderlid BM.** Detection and delineation of an unusual 17p11.2 deletion by array-CGH and refinement of the Smith-Magenis syndrome minimum deletion to approximately 650 kb. *Eur J Med Genet* 2005 Jul-Sep;48(3):290-300.
- **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.
- **Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T.** Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996 Jul 26;273(5274):494-297.
- **Schuster M, Lohscheller J, Kummer P, Eysholdt U, Rosanowski F.** Severe sensory hearing loss in del(6q)-syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003 Nov;67(11):1263-1266.
- **Schwarzbraun T, Ullmann R, Schubert M, Ledinegg M, Ofner L, Windpassinger C, Wagner K, Kroisel PM, Petek E.** Characterization of a de novo complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosomes 2 and 12, associated with mental retardation and impaired speech development. *Cytogenet Genome Res* 2006; 115(1):84-89.
- **Senger G, Chudoba I, Plesch A.** Multicolor-FISH – the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *Bioforum* 1998;9:499–503
- **Shaffer LG, Agan N, Goldberg JD, Ledbetter DH, Longshore JW, Cassidy SB.** American College of Medical Genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med* 2001;3:206–211.

- **Shali W, Helias C, Fohrer C, Struski S, Gervais C, Falkenrodt A, Leymarie V, Lioure B, Raby P, Herbrecht R, Lessard M.** Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias: conventional cytogenetics, FISH, and multiplex FISH. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006 Jul 15;168(2):133-145.
- **Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FFB, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG.** Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 1997;61:642-650.
- **Shashi V, White JR, Pettenati MJ, Root SK, Bell WL.** Ring chromosome 17: phenotype variation by deletion size. *Clin Genet* 2003 Oct;64(4):361-365.
- **Shaw CJ, Lupski JR.** Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R57-64. Epub 2004 Feb 5. Review.
- **Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP.** Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004 Apr;41(4):241-248.
- **Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M.** Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet* 1998 Jan;62(Pt 1):9-23.
- **Shim SH, Lee CH, Park YJ, Lee HJ, Park WI, Cho YH.** Two inv dup(15) chromosomes in a woman with repeated abortions. *Am J Med Genet* 2001;104:303-306.
- **Shimokawa O, Kurosawa K, Ida T, Harada N, Kondoh T, Miyake N, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N.** Molecular characterization of inv dup del(8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet A* 2004 Jul 15;128(2):133-137.
- **Slavotinek A, Lee SS, Davis R, Shrit A, Leppig KA, Rhim J, Jasnosz K, Albertson D, Pinkel D.** Fryns syndrome phenotype caused by chromosome microdeletions at 15q26.2 and 8p23.1. *J Med Genet* 2005 Sep;42(9):730-736.
- **Spranger J, Benirschke K, Hall JG, Lenz W, Lowry RB, Opitz JM, Pinsky L, Schwarzacher HG, Smith DW.** Errors of morphogenesis: concepts and terms. Recommendations of an international working group. *J Pediatr* 1982 Jan;100(1):160-165.
- **Smith ACM, McGavran L, Robinson J, Waldstein G, Macfarlane J, Zonana J, Reiss J, Lahr M, Allen L, Magenis E.** Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am J Med Genet* 1986;24:393-414.
- **Smith DI, McAvoy S, Zhu Y, Perez DS.** Large common fragile site genes and cancer. *Semin Cancer Biol* 2007 Feb;17(1):31-41.
- **Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG.** Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001 Nov;29(3):263-264.
- **Sogaard M, Tumer Z, Hjalgrim H, Hahnemann J, Friis B, Ledaal P, Pedersen VF, Baekgaard P, Tommerup N, Cingoz S, Duno M, Brondum-Nielsen K.** Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter. *BMC Med Genet* 2005 May 17;6:21.
- **Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk SJ, Benedict WF.** Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science* 1983 Feb 25;219(4587):971-973.
- **Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC.** Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996 Apr;12(4):368-375.

- **Spranger J, Benirschke K, Hall JG, Lenz W, Lowry RB, Opitz JM, Pinsky L, Schwarzacher HG, Smith DW.** Errors of morphogenesis: concepts and terms. Recommendations of an international working group. *J Pediatr.* 1982 Jan;100(1):160-165.
 - **Stallard HB.** The conservative treatment of retinoblastoma. Doyne Memorial Lecture. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1962;82:473-535
 - **Stankiewicz P, Helias-Rodzewicz Z, Jakubow-Durska K, Bocian E, Obersztyn E, Rappold GA, Mazurczak T.** Cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Y chromosomes. *Am J Med Genet* 2001 Jun 1;101(1):20-25.
 - **Stankiewicz P, Lupski JR.** Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2002 Jun;12(3):312-319. Review.
 - **Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T.** Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 2002 Dec;10(12):790-800.
 - **Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T.** Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 2003 Dec;114(1):51-67.
 - **Steinbach P, Djalali M.** Ineffectivity of accessory bisatellited marker chromosomes in inducing meiotic nondisjunction. *Hum Genet* 1983;64(4):402-403
 - **Stockton DW, Ross HL, Bacino CA, Altman CA, Shaffer LG, Lupski JR.** Severe clinical phenotype due to an interstitial deletion of the short arm of chromosome 1: a brief review. *Am J Med Genet* 1997 Aug 8;71(2):189-193.
 - **Strachan T, Read AP.** *Human Molecular Genetics.* 3rd edition. Garland Science, London and New York. 2004.
 - **Stumm M, Wegner RD, Bloechle M, Eckel H.** Interphase M-FISH applications using commercial probes in prenatal and PGD diagnostics. *Cytogenet Genome Res* 2006;114(3-4):296-301.
 - **Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, Rademaker A, Martin RH.** Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men. *Hum Reprod* 2006 Sep;21(9):2335-2339.
 - **Sutherland GR.** Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet.* 1979 Mar;31(2):125-135.
 - **Sutherland GR, Baker E.** The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. *Clin Genet.* 2000 Sep;58(3):157-161.
 - **Sutherland GR, Richards RI.** Fragile sites-cytogenetic similarity with molecular diversity. *Am J Hum Genet.* 1999 Feb;64(2):354-359.
 - **Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R.** Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 1998 Feb 19;391(6669):761-767.
 - **Swansbury J.** Introduction to the analysis of the human G-banded karyotype. *Methods Mol Biol.* 2003;220:259-269.
- T**
- **Tanaka K, Kamada N, Ohkita T, Kuramoto A.** Nonrandom distribution of chromosome breaks in lymphocytes of atomic bomb survivors. *J Radiat Res (Tokyo).* 1983 Dec;24(4):291-304.
 - **Takahara H, Tsukahara M, Baba Y, Naito K, Kajii T.** Dicentric Y chromosome in azoospermic males. *Br J Urol.* 1993 May;71(5):596-599.

- **Therman E, Laxova R, Susman B.** The critical region on the human Xq. *Hum Genet* 1990 Oct;85(5):455-461. Review.
- **Tijo H, Levan A.** The chromosomes of man. *Hereditas* 1956;42:1-6
- **Till M, Devillard F, Crost P, Bachy M, Prieur F, Bertheas MF.** Balanced complex chromosomal rearrangements with more than four breakpoints: report of a new case. *Am J Med Genet* 1991 Sep 1;40(3):370-373. Review.
- **Toniolo D.** X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Curr Opin Genet Dev* 2006 Jun;16(3):293-300.
- **Tumer Z, Harboe TL, Blennow E, Kalscheuer VM, Tommerup N, Brondum-Nielsen K.** Molecular cytogenetic characterization of ring chromosome 15 in three unrelated patients. *Am J Med Genet A* 2004 Nov 1;130(4):340-344.
- **Turleau C, de Grouchy J, Chavin-Colin F, Junien C, Seger J, Schlienger P, Leblanc A, Haye C.** Cytogenetic forms of retinoblastoma: their incidence in a survey of 66 patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1985 Apr 15;16(4):321-334.
- **Turner C, Dennis NR, Skuse DH, Jacobs PA.** Seven ring (X) chromosomes lacking the XIST locus, six with an unexpectedly mild phenotype. *Hum Genet* 2000 Jan;106(1):93-100.
- **Tyler-Smith C, Gimelli G, Giglio S, Florida G, Pandya A, Terzoli G, Warburton PE, Earnshaw WC, Zuffardi O.** Transmission of a fully functional human neocentromere through three generations. *Am J Hum Genet* 1999 May;64(5):1440-1444.

U

- **Uchida IA, Lin CC.** Identification of partial 12 trisomy by quinacrine fluorescence. *J Pediatr* 1973 Feb;82(2):269-272.
- **Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Muller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR.** Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 1999 Aug;65(2):448-462.

V

- **Valente KD, Koiffmann, C. P.; Fridman, C.; Varella, M.; Kok, F.; Andrade, J. Q.; Grossmann, R. M.; Marques-Dias, M. J. :** Epilepsy in patients with Angelmann syndrome caused by deletion of the chromosome 15q11-13. *Arch. Neurol* 2006;63:122-128.
- **Valetto A, Bertini V, Rapalini E, Simi P.** A 46,XX SRY-negative man with complete virilization and infertility as the main anomaly. *Fertil Steril* 2005 Jan;83(1):216-219.
- **Valtat C, Galliano D, Mettey R, Toutain A, Moraine C.** Monosomy 6q: report on four new cases. *Clin Genet* 1992 Mar;41(3):159-166.
- **van Beers EH, Nederlof PM.** Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006;8(3):210.
- **van den Ijssel P, Tijssen M, Chin SF, Eijk P, Carvalho B, Hopmans E, Holstege H, Bangarusamy DK, Jonkers J, Meijer GA, Caldas C, Ylstra B.** Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nucleic Acids Res* 2005 Dec 16;33(22):e192.
- **van Zelderen-Bhola SL, Breslau-Siderius EJ, Beverstock GC, Stolte-Dijkstra I, de Vries LS, Stoutenbeek P, de Pater JM.** Prenatal and postnatal investigation of a case with Miller-Dieker syndrome due to a familial cryptic translocation t(17;20) (p13.3;q13.3) detected by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 1997 Feb;17(2):173-179.
- **Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG i col.** The sequence of the human genome. *Science* 2001 Feb 16;291(5507):1304-1351.

- **Ventura M, Mudge JM, Palumbo V, Burn S, Blennow E, Pierluigi M, Giorda R, Zuffardi O, Archidiacono N, Jackson MS, Rocchi M.** Neocentromeres in 15q24-26 map to duplicons which flanked an ancestral centromere in 15q25. *Genome Res* 2003 Sep;13(9):2059-2068.
- **Ventura M, Weigl S, Carbone L, Cardone MF, Misceo D, Teti M, D'Addabbo P, Wandall A, Bjorck E, de Jong PJ, She X, Eichler EE, Archidiacono N, Rocchi M.** Recurrent sites for new centromere seeding. *Genome Res.* 2004 Sep;14(9):1696-1703.
- **Verma L, Macdonald F, Leedham P, McConachie M, Dhanjal S, Hulten M.** Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet* 1998 Jul 4;352(9121):9-12.
- **Vermeesch JR, Duhamel H, Raeymaekers P, Van Zand K, Verhasselt P, Fryns JP, Marynen P.** A physical map of the chromosome 12 centromere. *Cytogenet Genome Res.* 2003;103(1-2):63-73.
- **Vermeulen S, Menten B, Van Roy N, Van Limbergen H, De Paepe A, Mortier G, Speleman F.** Molecular cytogenetic analysis of complex chromosomal rearrangements in patients with mental retardation and congenital malformations: delineation of 7q21.11 breakpoints. *Am J Med Genet A* 2004 Jan 1;124(1):10-18.
- **Versacci P, Digilio MC, Sauer U, Dallapiccola B, Marino B.** Absent pulmonary valve with intact ventricular septum and patent ductus arteriosus: a specific cardiac phenotype associated with deletion 18q syndrome. *Am J Med Genet A.* 2005 Oct 1;138(2):185-186.
- **Verschuuren-Bemelmans CC, Leegte B, Hodenius TM, Cobben JM.** Trisomy 1q42 -> qter in a sister and brother: further delineation of the "trisomy 1q42 --> qter syndrome". *Am J Med Genet* 1995 Jul 31;58(1):83-86. Review.
- **Villa A, Gomez EG, Rodriguez L, Rastrollo RH, Martinez Tallo ME, Martinez-Frias ML.** Interstitial tandem duplication of 6p: a case with partial trisomy (6)(p12p21.3). *Am J Med Genet* 2000 Feb 28;90(5):369-75.
- **Villa N, Riva P, Colombo D, Sala E, Mariani S, Zorloni C, Crosti F, Dalpra L.** Identification of a small supernumerary marker chromosome, r(2)(p10q11.2), and the problem of determining prognosis. *Prenat Diagn* 2001 Oct;21(10):801-805.
- **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.** Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003 Dec;73(6):1261-1270.
- **Vogel F.** Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 1979 Nov 1;52(1):1-54. Review.
- **Vogt J, Ryan E, Tischkowitz MD, Reardon W, Brueton LA.** The tale of a nail sign in chromosome 4q34 deletion syndrome. *Clin Dysmorphol.* 2006 Jul;15(3):127-132.
- **Voullaire LE, Slater HR, Petrovic V, Choo KH.** A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am J Hum Genet* 1993 Jun;52(6):1153-1163.
- **Voullaire L, Saffery R, Davies J, Earle E, Kalitsis P, Slater H, Irvine DV, Choo KH.** Trisomy 20p resulting from inverted duplication and neocentromere formation. *Am J Med Genet* 1999 Aug 6;85(4):403-408.
- **Vranova V, Necesalova E, Kuglik P, Cejpek P, Pesakova M, Budinska E, Relichova J, Veselska R.** Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncol Rep* 2007 Feb;17(2):457-464.

W

- **Wakita Y, Narahara K, Tsuji K, Yokoyama Y, Ninomiya S, Murakami R, Kikkawa K, Seino Y.** De novo complex chromosome rearrangement in identical twins with multiple congenital anomalies. *Hum Genet.* 1992 Mar;88(5):596-598.
- **Wang L, Paradee W, Mullins C, Shridhar R, Rosati R, Wilke CM, Glover TW, Smith DI.** Aphidicolin-induced FRA3B breakpoints cluster in two distinct regions. *Genomics* 1997 May 1;41(3):485-488.
- **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 Nov;49(5):995-1013.
- **Warburton PE, Dolled M, Mahmood R, Alonso A, Li S, Naritomi K, Tohma T, Nagai T, Hasegawa T,** Ohashi H, Govaerts LC, Eussen BH, Van Hemel JO, Lozzio C, Schwartz S, Dowhanick-Morrisette JJ, Spinner NB, Rivera H, Crolla JA, Yu C, Warburton D. Molecular cytogenetic analysis of eight inversion duplications of human chromosome 13q that each contain a neocentromere. *Am J Hum Genet.* 2000 Jun;66(6):1794-1806.
- **Warburton PE.** Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Res* 2004;12(6):617-626. Review.
- **Wassink TH, Piven J, Vieland VJ, Jenkins L, Frantz R, Bartlett CW, Goedken R, Childress D, Spence MA, Smith M, Sheffield VC.** Evaluation of the chromosome 2q37.3 gene CENTG2 as an autism susceptibility gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005 Jul 5;136(1):36-44.
- **Waters JJ, Gourley DS, Aitken DA, Davison BCC.** Trisomy 20q caused by der (X) t(X;20)(q28;q11.2). *Am J Med Genet* 1990;36:310-312.
- **Waters J, Campbell PL, Crocker AJ, Campbell CM.** Phenotypic effects of balanced X-autosome translocations in females: aretrospective survey of 104 cases reported from UK laboratories. *Hum Genet* 2001;108:318-327.
- **Wax JR, Benn P, Steinfeld JD, Ingardia CJ.** Prenatally diagnosed sacrococcygeal teratoma: a unique expression of trisomy 1q. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000 Feb;117(1):84-86.
- **Weise A, Starke H, Heller A, Uwe C, Liehr T.** Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: a multicolor banding analysis. *Int J Mol Med.* 2002 Apr;9(4):359-361.
- **Weise A, Rittinger O, Starke H, Ziegler M, Claussen U, Liehr T.** De novo 9-break-event in one chromosome 21 combined with a microdeletion in 21q22.11 in a mentally retarded boy with short stature. *Cytogenet Genome Res* 2003;103(1-2):14-16.
- **Weiss MM, Snijders AM, Kuipers EJ, Ylstra B, Pinkel D, Meuwissen SG, van Diest PJ, Albertson DG, Meijer GA.** Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization. *J Pathol* 2003 Jul;200(3):320-326.
- **Wester U, Bondeson ML, Edeby C, Anneren G.** Clinical and molecular characterization of individuals with 18p deletion: a genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet A* 2006 Jun 1;140(11):1164-1171.
- **Wey E, Bartholdi D, Riegel M, Nazlican H, Horsthemke B, Schinzel A, Baumer A.** Mosaic imprinting defect in a patient with an almost typical expression of the Prader-Willi syndrome. *Europ J Hum Genet* 2005;13:273-277.
- **Willard HF, Wayne JS.** Hierarchical order in chromosome specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 1987;3:192-198
- **Williams SV, Adams J, Coulter J, Summersgill BM, Shipley J, Knowles MA.** Assessment by M-FISH of karyotypic complexity and cytogenetic evolution in bladder cancer in vitro. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005 Aug;43(4):315-328.

- **Wisniewski LP, Doherty RA.** Supernumerary microchromosomes identified as inverted duplications of chromosome 15: a report of three cases. *Hum Genet* 1985;69:161-163.
- **Wolff DJ, Miller AP, Willard HF.** Evidence for a chromosomal breakage hotspot in a 3 Mb region of Xp11.21. *Am J Hum Genet Suppl* 1994;55:A37.
- **Wolpert CM, Menold MM, Bass MP, Qumsiyeh MB, Donnelly SL, Ravan SA, Vance JM, Gilbert JR, Abramson RK, Wright HH, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA.** Three probands with autistic disorder and isodicentric chromosome 15. *Am J Med Genet* 2000 Jun 12;96(3):365-72. Review.
- **Wu BL, Schneider GH, Sabatino DE, Bozovic LZ, Cao B, Korf BR.** Distal 8p deletion (8)(p23.1): an easily missed chromosomal abnormality that may be associated with congenital heart defect and mental retardation. *Am J Med Genet.* 1996 Mar 1;62(1):77-83.
- **Wyandt HE, Shim SH, Mark HF, Huang XL, Milunsky JM.** Duplication of 11p14.3-p15.1 in a mentally retarded proband and his mother detected by G-banding and confirmed by high-resolution CGH and BAC FISH. *Exp Mol Pathol.* 2006 Jun;80(3):262-266.

Y

- **Yamaguchi S, Yoshihiro S, Matsuyama H, Nagao K, Fukunaga K, Matsumoto H, Matsuda K, Oba K, Naito K.** The allelic loss of chromosome 3p25 with c-myc gain is related to the development of clear-cell renal cell carcinoma. *Clin Genet.* 2003 Mar;63(3):184-191.
- **Ymagishi H, Srivastava D.** Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome. *Trend Mol Med* 9(9):383-389.
- **Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, Gallo N, Morrow BE, Shaffer LG, Babcock M, Chernos J, Bernier F, Sprysak K, Christiansen J, Haase S, Elyas B, Lilley M, Bamforth S, McDermid HE.** Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet* 2005 May;76(5):865-876.
- **Yu S, Baker E, Hinton L, Eyre HJ, Waters W, Higgins S, Sutherland GR, Haan E.** Frequency of truly cryptic subtelomere abnormalities--a study of 534 patients and literature review. *Clin Genet.* 2005 Nov;68(5):436-341. Review.

Z

- **Zackai EH, Emanuel BS.** Site-specific reciprocal translocation, t(11;22) (q23;q11), in several unrelated families with 3:1 meiotic disjunction. *Am J Med Genet* 1980;7(4):507-521.
- **Zahn S, Sievers S, Alemazkour K, Orb S, Harms D, Schulz WA, Calaminus G, Gobel U, Schneider DT.** Imbalances of chromosome arm 1p in pediatric and adult germ cell tumors are caused by true allelic loss: a combined comparative genomic hybridization and microsatellite analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2006 Nov;45(11):995-1006.
- **Zhang X, Snijders A, Seagraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D.** High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2005;76:312-326.
- **Zielinski B, Gratias S, Toedt G, Mendrzyk F, Stange DE, Radlwimmer B, Lohmann DR, Lichter P.** Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005 Jul;43(3):294-301.
- **Zinn AR, Ross JL.** Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr Opin Genet Dev* 1998 Jun;8(3):322-327. Review.

- **Zollino M, Tiziano F, Di Stefano C, Neri G.** Partial duplication of the long arm of chromosome 15: confirmation of a causative role in craniosynostosis and definition of a 15q25-qter trisomy syndrome. *Am J Med Genet* 1999 Dec 22;87(5):391-394.
- **Zou YS, Van Dyke DL, Thorland EC, Chhabra HS, Michels VV, Keefe JG, Lega MA, Feely MA, Uphoff TS, Jalal SM.** Mosaic ring 20 with no detectable deletion by FISH analysis: Characteristic seizure disorder and literature review. *Am J Med Genet A* 2006 Aug 1;140(15):1696-1706.
- **Zumkeller W, Volleth M, Muschke P, Tonnies H, Heller A, Liehr T, Wieacker P, Stumm M.** Genotype/phenotype analysis in a patient with pure and complete trisomy 12p. *Am J Med Genet A* 2004 Sep 1;129(3):261-264.

8. ANNEX

8- ANNEX

8.1- SUMARI DELS RESULTATS CITOGENÈTICS

Resultats obtinguts en cada un dels casos ordenats correlativament

Cas	Fórmula cromosòmica final
MS-21	46,X,del(X)(p22.3)
MS-25	46,X,del(X)(p22.1).
MS-30	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)
MS-31	47,XY,+del(13)(q11) or +del(21)(q11.1)
MS-32	46,X,del(X)(q21.3q26)
MS-36	47,XX,+neo(13)(q22q34)
MS-37	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)
MS-42	48,XY,+21,+ider(13)(p10) or ider(21)(p10)
MS-42-M	47,XY,+ider(13)(p10)x2 or +ider(21)(p10)x2
MS-43	48,XY,+21,+ider(13)(p10) or +ider(21)(p10)
MS-44	46,XX, der(2)dup(2)(q34q37.2)del(2)(q37.3)
MS-45	46,XX,t(1;14)(p22.3;p11.2)del(1)(p22.3p22.3)
MS-46	46,X,der(X;20)t(X;20)(p11.2;p11.2)
MS-47	46,XX,dup(10)(q24q26.3)
MS-50	47,XY,+inv dup(15)(q26.1q26.3)[65]/46,XY[35]
MS-54	46,XY,del(7)(p21p21)
MS-55	46,XX,dup(5)(p13.3p15.3)
MS-56	46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.3;p11.3)
MS-60	46,XX
MS-63	46,XX, add(2)(q37).ish der(2)dup(2)(?)(wcp2+)
MS-64	47,XX,+mar.ish der(3)(wcp3+)[30]/46,XX[14]
MS-65	46,XY,der(10)t(10;20)(q26,q13.2)
MS-66	46,XX
MS-70	46,XY,dup(8)(p12p22)

Cas	Fórmula cromosòmica final
MS-71	46,XX,der(13)t(9;13)(p13.2p11.2)
MS-72	46,XX,der(22)t(9;22)(p13.3;p11.2)
MS-73	46,X,idel(Y)(q11.2)[78]/46,XY[22]
MS-76	46,XX,der(10)t(10;20)(q26,q13.2)
MS-77	46,XY,t(8;18)(p11.2;p11.2)del(18)(p11.2),t(12;13)(q13;q12)
MS-78	47,XX,+mar[35]/46,XX[8]
MS-79	46,XX,del(17)(p13.3)
MS-80	46,XY
MS-82	47,XX,+ider(13)(p10) or +ider(21)(p10)
MS-87	46,XX
MS-88	46,XY,der(8)t(7;8)(p22.3;p23.2)
MS-89	47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)
MS-90	46,XX
MS-91	45,X,del(Y)(q11.2q12),der(14;15)(q10;q10)
MS-92	46,XY
MS-93	46,XY
MS-96	46,XX,dup(20)(p11.2p13)
MS-97	46,X,der(X)del(X)(p11.4p22.3)dup(X)(q27q28)
MS-99	46,XX,dup(8)(?)
MS-100	46,XX,del(18)(q22)
MS-101	47,XY,+der(X)(:p11.??->q10::p?->p?):[1]/ der(X)(:p11.1->q11.1:)[2]/ der(X)(p11.2?2->q11.1::q11.1->p11.1:)[4]/ der(X)(:p11.1->q11.1::q11.1->p11.1:)[6]
MS-102	46,XX
MS-103	47,XY,inv dup(14)(q11.1)
MS-104	46,XX,dup(15)(q24q26.2)[20]/46,XX[42]
MS-105	46,XY,trp(13)(q21.1q21.33)
MS-105-G	46,XY,dup(13)(q21.1q21.33)

Cas	Fórmula cromosòmica final
MS-106	47,XX,+der(9)(:p12->q12:)[3]/ 47,XX,+der(9)(:p12->q12::q12->p12:)[4]/ 47,XX,+r(9)(::p12->q12:)[2]/ 47,XX,+r(9)(:p12->q12::p12->q12::)x2[1]/ 46,XX[18]
MS-107	46,XX,dup(5)(q21q35.?)[?]/46,XX[?]
MS-110	46,XY,del(6)(q16.3q22.?)
MS-111	46,XX,der(2)t(2;3)(q33;p21), der(3)t(2;3)inv(3)(q36q2?3)del(2)(q36)
MS-112	46,XY
MS-113	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)[70]/46,XX[30]
MS-114	47,XX,+inv dup(15)(q11.2)
MS-116	46,XY,der(10)t(10;12)(p15.3;p11.1?)
MS-117	46,XY,t(6;19)(p21.3;q13.4)
MS-118	46,XX,t(5;6)(q13;p23)
MS-119	46,XY
MS-120	46,XX,r(13)(q12q31)[33]/ 45,XX,-13[6]
MS-123	46,XY
MS-124	46,XY
MS-127	46,XX
MS-129	46,X,der(X)t(X;12)(p22.2;p12.3)
MS-130	46,XX,del(18)(p11.2).
MS-131	46,XX
MS-132	46,XX
MS-134	46,XX, t(1;7)(q43;q22)t(2;6)(p25;q21)
MS-135	46,XX,der(1)t(1;20)(p36.3;?)
MS-137	46,XY,del(15)(q11.2q13.?)
MS-138	47~53,XY,+1~7mar[?].ish der(?)(D15Z1-,SRPN-,CEP1-,CEP2-CEP4-, CEP5-,CEP13-, CEP16-,CEP19-,CEP21-)/46,XY[?]

Cas	Fórmula cromosòmica final
MS-140	46,XY,der(16)t(9;16)(p23~p24;p13.3)
MS-141	47,XY,+mar[13]/46,XY[8]
MS-143	46,XX
MS-144	46,XX
MS-145	46,XY,dup(6)(p12p12)
MS-146	46,XX,inv(9)(p12q13)
MS-147	46,XY,t(4;21;12)(p15.2;q22.3;p13.1)
MS-148	46,XY
MS-149	46,XY
MS-150	46,XY
MS-151	46,XX
MS-152	47,XY,+neo(20)(q13.2q13.3)
MS-153	46,XX,del(2)(q37)
MS-154	46,XX,dup(1)(q41q42)
MS-155	46,XY,der(12)t(12;19)(?;p13.3)
MS-156	46,XY
MS-157	46,XX,del(8)(q23.3q24.1)
MS-159	46,XX,del(11)(q23.3)
MS-161	46,XX,del(11)(q24)
MS-162	46,XX
MS-163	46,XY,del(3)(p13~14.2)
MS-164	46,XY
MS-165	47,XX,+mar[50].ish der(?)(wcp17-)/46,XX[50]
MS-166	46,XX,del(11)(q22.3q23.3)
MS-169	46,XX
MS-170	46,XX,dup(12)(p13)
MS-171	46,XY
MS-172	46,XY,del(4)(q33q35.2)
MS-173	46,XY
MS-175	46,XX
MS-179	46,XX,r(15)(p11.2q26.3)

Cas	Fórmula cromosòmica final
MS-180	46,XY
MS-181	46,XY,der(15)t(7;15)(p22.3;q26.3)
MS-182	46,XY
MS-183	46,XY,idic(Y)(q11.1~11.2)
MS-184	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)
MS-185	46,XX,del(1)(q31q31)
MS-186	46,XX
MS-187	46,XY,del(6)(q21~22)
MS-188	47,XY,+der(2)del(2)(p11.1)del(2)(q12.1)[30]/46,XY[70]
MS-190	46,XY
MS-191	46,XX
MS-192	46,XX
MS-194	46,XX,der(10)t(5;10)(q33~34;q26)
MS-195	46,XX,dup(10)(?)
MS-196	46,XY,dup(21)(q21q21)
MS-197	46,XY,der(15)t(Y;15)(q11.2;p11.2)
MS-198	48,XY,+2mar.rev ish enh(15)(q11.2q12)
M-13	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)
M-14	47,XX,+inv dup(15)(q11.1)x2

8.3- COINCIDÈNCIES I DISCREPÀNCIES DE LES BANDES IMPLICADES EN DESEQUILIBRIS DEL GENOMA EN TUMORS DE RETINOBLASTOMA

Taula 23.- Coincidències i discrepàncies en les bandes cromosòmiques en les que es detecten guanys al utilitzar CGH convencional respecte les detectades per HR-CGH

Cas	HR-CGH vs CGH sense interval				HR-CGH vs CGH amb interval			
	Bandes equiparades		% coincidència	Banda només detectada per HR-CGH	Bandes equiparades		% coincidència	Banda només detectada per HR-CGH
	HR-CGH	CGH			HR-CGH	CGH		
1			100% (5/5)		1q	1q2123, 1q32, 1q32.3q42	80%(4/5)	5p13p14
2			-				-	
3	1q24.3q32.1, 1q44	1q21-qter	100% (2/2)				0%(0/2)	1q24.3q32.1, 1q44
4	6p24.1p22.2, 6p21.1p12.1	6p	85.7%(6/7)	21q11.2q21			43 %(3/7)	6p24.1p22.2, 6p21.1p12.1, 21q11.2q21, Yq11.211
5	17p13.2q11.2, 17q22q25, 20p11.2, 20q12q13.2	17, 20	100% (8/8)				62,5% (5/8)	6p21.3p25.3, 17q22q25.1, 20p11.2
6			100% (2/2)				0%(0/2)	
7	1q21.3, 1q25.2q44, 7p15.1p21.3, 7q11.22q34, 10p11.23p13, 10p21.2	1q21q44, 7, 10	93.3% (14/15)	2q22.2q35	7q11.22q34	7q22, 7q34q36.11	40%(6/15)	2q22.2q35, 7p15.1p21.3, 10p11.23, 10p21.2, 17q22q23.2, 19p13.1q13.1, 20, 21q11.2q22.1, Yq11.2
8	1q21.2q23.1, 1q32.3q42.3	1q21q44	85.7%(6/7)	18q21			57%(4/7)	1q32.3q42.3, 18q11.2, 18q21
9	1q21.2q23.1, 1q32.3q42.3, 18q11.2, 18q22		66.7%(4/6)	1q25.2q31.12 1q11.2			50%(3/6)	1q25.2q31.1, 6p22.3p24.1, 21q11.2
10	19p13.1p13.3, 19q13.1	19	100%(8/8)				62,5 % (5/8)	19p13.1p13.3, 19q13.1, Xq25
Total			92% (55/60)				50% (30/60)	

Taula 24- Coincidències i discrepàncies en les bandes cromosòmiques en les que es detecten guanys al utilitzar HR-CGH respecte les detectades mitjançant CGH convencional

Cas	CGH sense interval vs. HR-CGH				CGH amb interval vs. HR-CGH			
	Bandes equiparades		% coincidència	Banda detectada només per CGH	Bandes equiparades		% coincidència	Banda detectada només per CGH
	CGH	HR-CGH			CGH	HR-CGH		
1			83,3% (5/6)	17p12q11.2	1q21q23, 1q32, 1q32.3q42	1q	100% (6/6)	
2			-	9q34, 15q11.2q13, 16q13p13.3, 16q24, 17q11.2p13.3, 17q25, 19, 20, 22			-	17p11.2p12, 19, 22q13
3	1q21q44	1q24.3q32.1, 1q44	16,7% (1/6)	15q11.2q13, 16q12p13.3, 19, 22, Yq11.2p11.3			0% (0/1)	19p13.3
4	6p	6p24.1p22.2, 6p21.1p12.1	41,7% (5/12)	1p36.1p36.3, 16q13p13.3, 17, 18q11.2p11.3, 19, 20, 22			60% (3/5)	19p13.3, 22q11.2
5	17, 20	17p13.2q11.2, 17q22q25.1, 20p11.2, 20q12q13.2	100% (6/6)				83,3% (5/6)	19p13.2p13.3
6			50% (2/4)	6p21.3, 19			-	
7	1q21q44, 7, 10	1q21.3, 1q25.2q44, 7p15.1p21.3, 7q11.22q34, 10p11.23p13, 10p21.2	91,7% (11/12)	22	7q22, 7q34q36	7q11.2q34	76,9% (10/13)	6p21.3, 17p13.1, 22
8	1q21q44	1q21.2q23.1, 1q32.3q42.3	41,7% (5/12)	1p35p36.3, 7p12q11.2, 9q33q34.3, 12q23q24.3, 17q, 20, 22			57,1% (4/7)	9q34.1q34.3, 16p13.3, 17q25
9			66,7% (4/6)	19, 16p			60% (3/5)	16p11.2, 19p13.2p13.3
10	19	19p13.1p13.3, 19q13.1	100% (7/7)				100% (5/5)	
Total			64,8% (46/71)				75% (36/48)	

Taula 25- Coincidències i discrepàncies en les bandes cromosòmiques en les que es detecten pèrdues al utilitzar CGH respecte les detectades per HR-CGH

Cas	HR-CGH vs CGH amb interv.conf.		HR-CGH vs CGH sense interval de confiança			
	% coincidència	Banda només detectada per HR-CGH	Bandes equiparades		% coincidència	Banda només detectada per HR-CGH
			HR - CGH	CGH		
1	-				-	
2	-				-	
3	-				-	
4	100% (5/5)				100% (5/5)	
5	14%(1/7)	10q26.1q26.3, 14q11.2q13, 14q21q22, 14q24.3q31.3, 15q11.2q14, 16			43% (3/7)	10q26.1q26.3, 14q21q22, 14q24.3q31.3, 15q11.2q14
6	-				-	
7	18% (3/17)	1p31.3p36.3, 3p24p26, 3p22p26.3, 3q21.2q24, 4p16, 6q24.2q27, 8p12p23, 8q12q21.1, 9q22.3q34.3, 12q23q24.3, 13q34, 15q12q26.3, 16, 22q	8q12q21.1, 8q21.3q24.3	8q12q24.1	29% (5/17)	3p24p26, 3p22p26.3, 3q21.2q24, 4p16, 6q24.2q27, 8p12p23, 9q21.3q34.3, 12q23q24.3, 13q34, 15q12q26.3, 16, 22q
8	67% (2/3)	17p12p13.1			67% (2/3)	17p12p13.1
9	-				-	-
10	33% (2/6)	2q14.1p14.3, 8p23.1, 16q, 17p12p13.3			67% (4/6)	2p14.1p14.3, 8p23.1
Total	34% (13/38)				50% (19/38)	

Taula 26- Coincidències i discrepàncies en les bandes cromosòmiques en les que es detecten pèrdues al utilitzar HR-CGH respecte les detectades per CGH

Cas	CGH amb interval de confiança vs HR-CGH		CGH sense interval de confiança vs HR-CGH			
	% coincidència	Banda només detectada per CGH	Bandes equiparades		% coincidència	Banda només detectada per CGH
			HR-CGH	CGH sense interval		
1	-				-	
2	-				-	
3	-				-	
4	100% (5/5)	-			100% (5/5)	-
5	100% (1/1)	-			100% (3/3)	-
6	-				-	
7	100% (3/3)	-	8q12q21.1, 8q21.3qter	8q12q24.1	62.5% (5/8)	4q13q28, 12q15q21.3, 13q21.3q22
8	100% (2/2)	-			100% (2/2)	-
9	-				-	
10	100% (2/2)	-			100% (4/4)	-
Total	100%(13/13)				86,4%(19/22)	

Identification of a “cryptic mosaicism” involving at least four different small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 9 in a woman without reproductive success

Mònica Santos, M.S.,^a Kristin Mrasek, M.S.,^b Maria Àngels Rigola, Ph.D.,^a Heike Starke, Ph.D.,^b Thomas Liehr, Ph.D.,^b and Carme Fuster, Ph.D.^a

^a Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; and ^b Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, Germany

Objective: To characterize the small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) present in the female member of an infertile couple who has no further clinical symptoms.

Design: Case report.

Setting(s): Faculty of medicine and institute of human genetics and anthropology.

Patient(s): A young, healthy, nonconsanguineous couple asked for genetic evaluation for infertility.

Intervention(s): Intracytoplasmic sperm injection, conventional and molecular cytogenetic analyses.

Main Outcome Measure(s): We characterized the sSMCs present in a woman, who was a member of an infertile couple, by molecular cytogenetic techniques.

Result(s): The G-banding technique showed that a marker chromosome was present in some of the examined cells describing the 47,XX,+mar[30]/46,XX[70] karyotype. Subsequently, using new fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques, four distinguishable sSMCs (cryptic mosaicism), all derived from chromosome 9, were observed, including minute and ring chromosomes. This heterogeneity was impossible to detect by the conventional G-banding technique or conventional FISH technique that were used before the new FISH techniques (subcentromere-specific multicolor-FISH [subcenM-FISH]) and specific probe for the 9q12 band. In each metaphase with sSMCs, only one or two markers were observed. On the basis of the FISH analyses, the patient's karyotype was defined as 47,XX,+min(9)(:p12→q12:)/47,XX,+min(9)(:p12→q12::q12→p12:)/47,XX,+r(9)(::p12→q12:)/47,XX,+r(9)(::p12→q12::p12→q12::)x2/46,XX.

Conclusion(s): The presence of sSMCs derived from chromosome 9 could influence the couple's infertility. The new subcenM-FISH techniques are very useful in the characterization of cryptic mosaicisms of marker chromosomes. Additionally, the hypothesis that the 9p12 chromosomal band is an euchromatic variant region without any phenotypic impact other than possible infertility is supported by this case study since the woman shows a normal phenotype. (Fertil Steril® 2007; ■: ■–■. ©2007 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Small supernumerary marker chromosome (sSMC), multiplex-fluorescence in situ hybridization (M-FISH), subcentromere-specific multicolor-FISH (subcenM-FISH), infertility

Infertility and sterility are an extensive widespread problem in the general population. It has been suggested that infertility may be due to different causes such as systemic infections, endocrine and immunology disorders, or cytogenetic alterations. In fact, one important cause of infertility is the presence of a chromosomal aberration in one member of the couple. In the general population, there is a 1% frequency of chromosomal aberration; however, it has been reported that in couples with repeated spontaneous abortions, the frequency is 2.4%–6.8% (1).

Received October 20, 2006; revised and accepted December 20, 2006. This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2003-03894), CIRIT (SGR05-00495), Generalitat de Catalunya (grant nos. 2002FI00281 and 2005BE00172), and the Evangelische Studienwerk e.V. Villigst.

Reprint requests: Carme Fuster, Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Edifici M., Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona), Spain (FAX: 00-34-93-581-10-25; E-mail: carme.fuster@uab.es).

Small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) were recently defined as structurally abnormal chromosomes that cannot be identified or characterized unambiguously by conventional-banding cytogenetics alone and are generally equal in size to or smaller than chromosome 20 of the same metaphase spread (2). The sSMCs are common findings in karyotypes of cancer, in constitutional genetic disorders or mentally retarded patients, in patients with reproduction problems, and in prenatal diagnosis (3–5). In a review published by Liehr et al. (2), the sSMC frequency was described as 0.043% in newborns, 0.077% in prenatal cases, 0.433% in mentally retarded patients, and 0.171% in infertile people.

The genetic origin of these sSMCs usually remains unknown by conventional cytogenetic techniques, but the development of technologies based on fluorescence in situ hybridization (FISH) has allowed for important progress toward this goal. Comparative genomic hybridization (CGH) (6), multiplex-FISH (M-FISH) (7), spectral karyotyping

(SKY) (8), centromere-specific multicolor FISH (cenM-FISH) (9), and subcentromeric multicolor FISH (subcenM-FISH) (10) are some of these methodologies.

Here we describe the combined use of G banding, CGH, M-FISH, and subcenM-FISH for the detection and characterization of the sSMCs present in a woman who is the infertile member of a couple with no other clinical symptoms.

CASE REPORT

A young, healthy, nonconsanguineous couple with no reproductive success over a period of 4 years asked for genetic evaluation due to their apparent infertility. Both members of the couple had a normal phenotype. A gynecological examination of the woman was normal, but the husband's exam revealed teratoasthenozoospermia (22 million/mL, spermatozooids with normal morphology 5%, and motility 3 + 2 and 30%). Cytogenetic analysis revealed a normal (46,XY) karyotype in the man and the 47,XX,+mar de novo/46,XX karyotype in his wife.

The couple decided to undergo an in vitro fertilization (IVF) program, and they underwent two intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatments because with this technique the teratoasthenozoospermia was circumvented. Fourteen eggs were retrieved, and three were fertilized. All three embryos were transferred. However, no pregnancy was achieved.

The study was approved by the Universitat Autònoma de Barcelona's Institutional Ethics Committee. Informed consent was given in writing by the patient.

Cytogenetic and FISH Studies

A peripheral blood sample from the 31-year-old woman was cultured for 72 hours in RPMI-1640 medium. Metaphasic chromosomes were analyzed by Wright G-banding and FISH techniques. FISH was performed by M-FISH according to the methodology used by Speicher et al. (7). Moreover, the chromosome 9 centromeric probe (alpha satellite), the probe for 9q12, and the subcenM-FISH mixture for chromosome 9 described by Starke et al. (10) were used for analysis. SubcenM-FISH is a new FISH technique that combines various FISH probes to characterize the composition of sSMCs.

Slides were evaluated on a fluorescence microscope equipped with a charge-coupled-device camera and an image-analysis system (MetaSystems; Altusheim, Germany). For M-FISH analysis, digital fluorescence imaging was performed using an Olympus BX-60 epifluorescence microscope and SpectraVysion software (Vysis).

CGH Analysis

To determine gains and losses of genomic material, the DNA from the patient was compared with the control DNA using the CGH technique. DNA isolation and labeling, hybridization, and detection were performed essentially as described

by Kallioniemi et al. (11). Slides were analyzed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging; Sunderland, United Kingdom) and high-resolution CGH (HR-CGH) software (Rigshospitalet; Copenhagen, Denmark). Aberrations were detected by standard reference intervals as described in Kirchhoff et al. (6).

RESULTS

G-banded chromosome preparations analysis revealed the presence of normal cells and cells with an extra marker chromosome (mosaicism) that define karyotype 47,XX,+mar[30]/46,XX [70], in which the origin of the small chromosome marker was impossible to characterize by this technique. HR-CGH analysis detected no imbalances in the genome. M-FISH showed that the marker chromosome stained in chromosome 9—a typical fluorochrome combination, with no other abnormal findings being found. The hybridization with the chromosome 9 centromeric probe confirmed the origin of the marker as chromosome 9.

Further analysis with the subcenM-FISH mixture for chromosome 9 and the probe for 9q12 showed that the marker consisted of chromosome 9 heterochromatic material and that it also contained the 9p12 euchromatic region. Molecular cytogenetic analysis showed the presence of at least four sSMCs (Fig. 1), all derived from chromosome 9, which confirms a “cryptic mosaicism” (not detected previously) involving chromosome 9.

This heterogeneity was impossible to detect by the conventional G-banding or M-FISH techniques that were used before the new FISH techniques (subcenM-FISH). In each metaphase with sSMCs, only one or two markers were observed.

Based on the FISH analyses, the patient's karyotype was defined as 47,XX,+min(9):(p12→q12:)/47,XX,+min(9):(p12→q12::q12→p12:)/47,XX,+r(9):(p12→q12:)/47,XX,+r(9):(p12→q12::p12→q12::)x2/46,XX. The abbreviation “min” is used here according to the definition of Crolla (12), not according to ISCN 2005 (13).

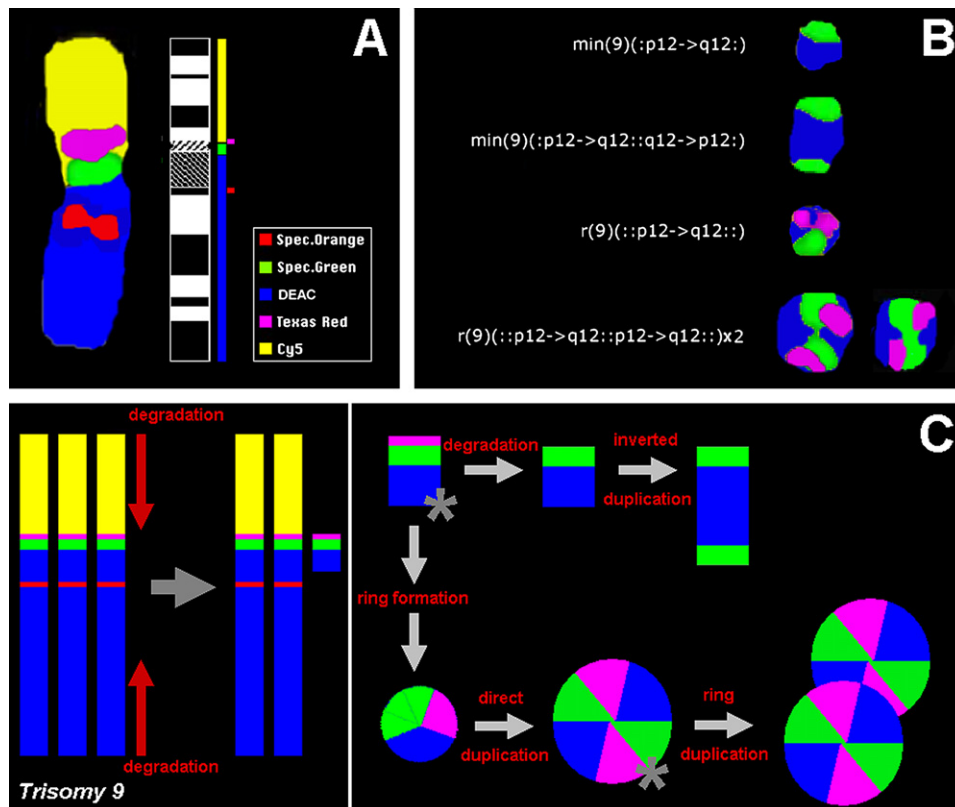
DISCUSSION

The interpretation of the clinical significance of marker chromosomes is extremely problematic, as sSMCs have heterogeneous phenotypic consequences and their effects seem to depend on their size, origin, presence or absence of euchromatin, degree of mosaicism, affected tissues, and, in some cases, their parental origin (whenever the marker contains imprinted genes). Our patient with at least four different sSMCs, all derived from chromosome 9, in combination with a normal cell line, presents the possibility of infertility without further clinical symptoms.

This report is a new case study that illustrates the usefulness of FISH methodologies to detect and characterize the presence of at least four different sSMCs, all derived from chromosome 9, present in a phenotypically normal woman,

FIGURE 1

The subcentromeric-FISH scheme and a normal chromosome 9 depicted in pseudocolors are shown. The four different sSMCs 9 from the present patient are shown (2-minute and two-ring chromosomes). Scheme of sSMC formation. A trisomy 9 was omitted by degradation of the superfluous chromosome (left part of figure). The resulting sSMCs 9 developed by further degradation and inverted duplication to the observed 2-minute chromosomes and/or by ring formation directly and ring duplication to the observed ring chromosomes. The not detected and postulated variants are marked with asterisks.



Santos. "Cryptic mosaicism" of marker chromosomes. *Fertil Steril* 2007.

who is a member of an infertile couple and who has a 47,XX,+mar[30]/46,XX[70] karyotype.

The CGH technique, described by Kallioniemi et al. (11), has been used for marker chromosome identification to determine the chromosome region involved in the composition of the marker chromosome. CGH determines gains and losses of genomic material comparing DNA from the patient with control DNA. High-resolution CGH, described by Kirchhoff et al. (6), defines aberrations using standard reference intervals by increasing resolution in the detection of imbalances of conventional CGH. However, mosaicism and the small amount of euchromatin found in sSMCs < 3-5 Mb are two important limitations (14). In our case, it is important to remark that the HR-CGH cannot detect the origin of the marker chromosome even when it contains euchromatic material. The explanation could be that the mosaicism degree is at the limit of HR-CGH resolution and that the euchromatic gain is very near the centromere region and is blocked with COT-1 DNA (DNA rich in repetitive sequences used to

exclude from analysis polymorphic regions) in HR-CGH experiments.

Mosaicism in association with sSMCs is well known, and great variations in mosaicism with no clinical consequences have been reported (15, 16). Our patient, phenotypically normal, has at least four different sSMCs, all composed of chromosome 9 pericentromeric euchromatin and heterochromatin (p12 → q12) and with a high degree of morphological heterogeneity (ring/min and one/two centromeres). The sSMC mosaicism observed in this woman points out a common origin of all marker chromosomes, but a high degree of rearrangements, due to mitotic instability of the markers, led to the "cryptic karyotype."

In recent years, several cases with cryptic mosaicism for sSMCs derived from different chromosomes (17–24) or from the same chromosome (5, 7, 8, 19, 20) or X chromosomes (5, 9, 10, 16) have been published. To date, our patient is the first case reported with cryptic mosaicism for sSMCs

TABLE 2

Cases with sSCM derived from chromosome 9.

Case	Age at diagnosis	Origin	Karyotype	FISH methods	sSCM	Phenotype	Fertility problems?	Reference
1	Prenatal	De novo	47,XY,+mar[5]/ 46,XY[15]	Midi	min(9)(p12→q10);	Not affected	—	(25) (case 56)
2	28 years	De novo	47,XX,+mar[15]/ 46,XX[5]	Midi;cenM; subcenM	r(9)(:p12→q10::)	Not affected	Yes	(25) (case 55)
3	Prenatal	Maternal	47,XY,+mar[10]/ 46,XY[16]	Midi	min(9)(p12→q11);	Mother not affected; child data not available	—	(26) (case3)
4	Prenatal	Maternal	47,XY,+mar	SKY; cep9; YAC782D6	min(9)(p12→q11);	Not affected	—	(27) (case 8)
5	Prenatal	De novo	47,XX,+mar[40%]/ 46,XX[60%]	Radioactive ISH; satellite III probe for chromosome 9	r(9)(:p?1.1→q?13::)	Not affected	No	(28) (case2)
6	Prenatal	Maternal	47,XX,+mar[80%]/ 46,XX[20%]	All available centromeric probes	min(9)	Not affected	No	(29) (case8)
7	?	Maternal	47,XX,+mar	FISH with cep probes	mar(9)	Not affected	No	(30)
8	?	De novo	47,XX,+mar[36%]/ 46,XX[64%]	Midi	r(9)(:p12→q10::)	Affected	—	(31) (case 4)
9	?	De novo	Not available	AcroM; M-FISH	r(9)(:p23→12?::)	Affected	—	(32) (case 12)
10	1 week	De novo	47,XX,+9[?]/ 47,XX,+mar[?]/ 46,XX[?]	Radioactive ISH; specific probe for 9p13	min(9)(p13→q10);	Affected	—	(33)
11	34 years	?	48,XXY,+mar[15]	CenM; subcenM	dic(9)(p12→q11.1:: q11.1→p11.1);	Affected	—	(34)
12	Prenatal	Maternal	48,XY,+marx2	Different FISH probes	r(9).ish(D9Z3+, D9Z5+, wcp9+)	?	No	(35)
13	Postnatal	?	47,XX,+9[4%]/47,XX,+ mar[70%]/46,XX[26%]	Various FISH probes	min(9)(p21.1→q13);	?	?	(36)
14	1 week	De novo	47,XY,+mar	Alpha-, beta-satellite satIII probes, telomeric probe, all wcp, YAC probes	inv dup(9)(pter→ p21.1::p21.1→pter)	Affected	—	(39)
15	1 week	De novo	47,XY,del(9)(p12 +mar	Alpha-, beta-satellite satIII probes, telomeric probe, all wcp, YAC probes	inv dup(9)(qter→q22:: q22→qter)	Affected	—	(39)
—	31 years	De novo	47,XX,+mar[30%]/ 46,XX[70]	M-FISH; HR-CGH; subcenM; cep9; probe for 9q12	min(9)(p12→q12:)[1]/ min(9)(p12→q12:: q12→p12:)[5]/ r(9)(:p12→q12:)[2]/ r(9)(:p12→q12:: p12→q12:):x2[1]	Not affected	Yes	Present case

Note: ISH = in situ hybridization; cep = centromeric probe; YAC = yeast artificial chromosome.

Santos. "Cryptic mosaicism" of marker chromosomes. *Fertil Steril* 2007.

derived from chromosome 9. Detections of all cryptic mosaicisms derived from the same chromosome (Table 1), with the exception of the case reported by Daniel and Malafiej (16), have been made using subcenM-FISH, testing the utility of this methodology; moreover, in our study we also used the probe for 9q12. It is interesting to note that 8 of the 9 cases (including the present report) with mosaicism for the same chromosome presented with infertility or phenotypic manifestations (congenital malformations or/and dysmorphism). These findings show that cryptic mosaicism of sSMCs is a new factor to take into account to establish the relationship between genotype and phenotype.

To the best of our knowledge, there are three published cases with markers derived from chromosome 9 combined with an sSMC derived from another chromosome (20, 10, 24) and 15 reported cases with markers only derived from chromosome 9 (Table 2) (25–39) that have been determined cytogenetically at the molecular level. In one patient (case 55) reported by Starke et al. (25), the sSMC, without cryptic mosaicism, also contained the 9p12 chromosome euchromatic region; the patient was a healthy woman with a history of three miscarriages. The rest of the cases with sSMC, containing only the 9p12 region, presented normal phenotypes, with the exception of a child who was affected with moderate mental retardation and speech delay (31). In general, whenever other chromosome 9 bands are implied in the composition of the sSMC, the phenotype seems to be affected.

The 9p12 euchromatic region has been described as a variant without clinical effects (40, 41). Starke et al. (25) suggested that this chromosome region is neither really euchromatic nor really heterochromatic since this region shows homology with short arms of acrocentric chromosomes and many genes located at this band are pseudogenes. All data summarized in this report and the absence of clinical symptoms in our patient (apart from possible infertility) are in agreement with this hypothesis.

It has been reported that the presence of a marker chromosome in infertile couples is four times more frequent compared with the overall population (2). Small SMCs have been described in 0.171% of the infertile population (5). In general, the presence of sSMCs in the male causes infertility, while females usually present normal fertility (42, 43). However, to date, two reports about infertile females with sSMCs have been published (25, 42). Although the confirmation of the unusual karyotype in a second type of tissue was not possible, it is probable that the woman had a germ-line mosaicism. The heterochromatin excess present in the sSMCs in our patient could disturb correct chromosome pairing, and it could influence acquisition of unbalanced gametes. It may be the cause of the couple's infertility. The present report could be a case in which the presence of sSMCs in a woman also led to infertility. Nevertheless, it is not possible to confirm or refute this fact because of the presence of teratoasthenozoospermia in the husband. At first sight, the low quality of sperm in the husband could explain the infertility, but the unsuccessful ICSI treatment and the published reports

correlating cytogenetic anomalies with infertility suggest that the presence of the sSMCs could influence in the couple's reproductive problems.

We conclude that it is essential to perform karyotype analysis in couples with fertility problems to discover the possible reason for the infertility, such as the cytogenetic anomalies. The presence of various sSMCs could exert influence on the reproductive problems in the couple. New FISH techniques like subcenM-FISH are very useful in the characterization of cryptic mosaicism of marker chromosomes. And, finally, our findings support the hypothesis that the 9p12 chromosomal band is a euchromatic variant region without phenotypic impact other than possible infertility since the woman in this case presents a normal phenotype.

REFERENCES

- Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stupia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2005;20:437–42.
- Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* 2004;107:55–67.
- Li MM, Howard-Peebles PN, Killos LD, Fallon L, Listgarten E, Stanley WS. Characterization and clinical implications of marker chromosomes identified at prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2000;20:138–43.
- Eggermann K, Mau UA, Bujdosó G, Koltai E, Engels H, Schubert R, et al. Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. *Clin Genet* 2002;62:89–93.
- Liehr T, Mrasek K, Weise A, Dufke A, Rodriguez L, Martinez Guardia N, et al. Small supernumerary marker chromosomes—progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res* 2006;112:23–34.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998;31:163–73.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12:368–75.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494–7.
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, et al. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 2001;108:199–204.
- Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, et al. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 2003;114:51–67.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10:231–43.
- Crolla JA. FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15. II. Review of the literature. *Am J Med Genet* 1998;75:367–81.
- Shaffer LG, Tommerup N. ISCN 2005. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel, Switzerland: S. Karger, 2005.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001;38:740–4.
- Anderlid BM, Sahlen S, Schoumans J, Holmberg E, Ahsgren I, Mortier G, et al. Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. *Am J Med Genet* 2001;99:223–33.

16. Daniel A, Malafiej P. A series of supernumerary small ring marker autosomes identified by FISH with chromosome probe arrays and literature review excluding chromosome 15. *Am J Med Genet A* 2003; 117:212–22.
17. Callen DF, Eyre HJ, Ringenbergs ML, Freemantle CJ, Woodroffe P, Haan EA. Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics. *Am J Hum Genet* 1991; 48:769–82. Erratum in *Am J Hum Genet* 1991;49:503.
18. Plattner R, Heerema NA, Howard-Peebles PN, Miles JH, Soukup S, Palmer CG. Clinical findings in patients with marker chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1993;91:589–98.
19. Wiktor A, Van Dyke DL, Weiss L. Characterization of a de novo 48,XX,+r(X),+r(17) by in situ hybridization in a patient with neurofibromatosis (NF1). *Am J Med Genet* 1993;45:22–4.
20. Aalfs CM, Jacobs ME, Nieste-Otter MA, Hennekam RC, Hoovers JM. Two supernumerary marker chromosomes, derived from chromosome 6 and 9, in a boy with mild developmental delay. *Clin Genet* 1996;49:42–5.
21. Haddad BR, Schrock E, Meck J, Cowan J, Young H, Ferguson-Smith MA, et al. Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum Genet* 1998;103:619–25.
22. Maurer B, Haaf T, Stout K, Reissmann N, Steinlein C, Schmid M. Two supernumerary marker chromosomes, originating from chromosomes 6 and 11, in a child with developmental delay and craniofacial dysmorphism. *Cytogenet Cell Genet* 2001;93:182–7.
23. Nandi KN, McDonald MT, Rogers KK, Rao KW. Mosaicism for two de novo supernumerary markers derived from chromosomes 18 and 13. *Am J Hum Genet* 2001;68:793.
24. Hall S, Boda Y, Cohen M, Junio J, Polihronis A, Tyrrell V, et al. FISH-mapping of r(9) and r(18) chromosomes in a mosaic newborn female. *Chromosome Res* 2005;13(Suppl1):61.
25. Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, et al. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 2002;10:790–800.
26. Müller-Navia J, Nebel A, Schleiermacher E. Complete and precise characterization of marker chromosomes by application of microdissection in prenatal diagnosis. *Hum Genet* 1995;96:661–7.
27. Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Morizio E, Fantasia D, Colosimo A, Rinaldi MM, et al. Identification of 14 rare marker chromosomes and derivatives by spectral karyotyping in prenatal and postnatal diagnosis. *Am J Med Genet A* 2004;127:144–8.
28. Callen DF, Ringenbergs ML, Fowler JC, Freemantle CJ, Haan EA. Small marker chromosomes in man: origin from pericentric heterochromatin of chromosomes 1, 9, and 16. *J Med Genet* 1990;27:155–9.
29. James RS, Temple IK, Dennis NR, Crolla JA. A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes. *Eur J Hum Genet* 1995;3:21–6.
30. Callen DF, Eyre H, Yip MY, Freemantle J, Haan EA. Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet* 1992;43:709–15.
31. Blennow E, Nielsen KB, Telenius H, Carter NP, Kristoffersson U, Holmberg E, et al. Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1995;55:85–94.
32. Langer S, Fauth C, Rocchi M, Murken J, Speicher MR. AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. *Hum Genet* 2001;109:152–8.
33. Raimondi E, Ferretti L, Young BD, Sgaramella V, De Carli L. The origin of a morphologically unidentifiable human supernumerary minichromosome traced through sorting, molecular cloning, and in situ hybridisation. *J Med Genet* 1991;28:92–6.
34. Liehr T, Mrasek K, Starke H, Claussen U, Schreiber G. Unusual small supernumerary marker chromosome (sSMC) 9 in a Klinefelter patient. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:179–81.
35. Mowrey PN, Williford B, Kratzer S, Tepperberg JH, Gadi IK, Phillips KK, et al. Risk assessment of prenatal double supernumerary ring(9) chromosomes. *Am J Hum Genet* 2001;68:807.
36. Paulis M, Bensi M, Moralli D, Carli L, Raimondi E. A set of duplicons on human chromosome 9 is involved in the origin of a supernumerary marker chromosome. *Genomics* 2006;87:747–57.
37. Depinet TW, Zackowski JL, Earnshaw WC, Kaffe S, Sekhon GS, Stallard R, et al. Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet* 1997;6: 1195–204.
38. Amor DJ, Choo KH. Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet* 2002;71:695–714.
39. Warburton PE. Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Res* 2004;12:617–26.
40. Sutherland GR, Eyre H. Two unusual G-band variants of the short arm of chromosome 9. *Clin Genet* 1981;19:331–4.
41. Di Giacomo MC, Cesarano C, Bukvic N, Manisali E, Guanti G, Susca F. Duplication of 9 p11.2-p13.1: a benign cytogenetic variant. *Prenat Diagn* 2004;24:619–22.
42. Buckton KE, Spowart G, Newton MS, Evans HJ. Forty-four probands with an additional “marker” chromosome. *Hum Genet* 1985;69: 353–70.
43. Manenti E. Two extra inv dup(15) chromosomes and male infertility: second case. *Am J Med Genet* 1992;42:402–3.