

**Aplicació de les tècniques de citogenètica
molecular per l'establiment d'associacions
genotip-fenotip**

Memòria presentada per
Ariadna Escalona Mena

Per optar al títol de
Doctor en Biologia

Tesi dirigida per
Dra. Carme Fuster Marquès

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

Directora

Doctoranda

Carme Fuster Marquès

Ariadna Escalona Mena

Als meus pares,

Al meu germà,

A tota la meva família,

I al Marc, el meu futur marit.

Amb el suport econòmic:

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

AGRAÏMENTS

Són tantes les persones sense les quals aquest treball no hauria estat possible que es fa massa curt aquest espai per donar-los les més sinceres gràcies. Espero de tot cor no deixar-me a ningú.

Voldria començar agraint a la meva directora de tesi, la Carme Fuster, la confiança que va tenir en mi quan em va escollir per realitzar aquest projecte; sense el seu suport, sense els seus ànims i sense la seva il·lusió per la feina, aquest treball no hagués estat possible. Vull fer constar, també, la meva gratitud envers la Rosa, la Quima, el Jordi, la Montse i la Cristina, els professors de la unitat, perquè m'han donat sempre un consell i una dosi d'il·lusió i d'esperança quan més les he necessitades.

Les meves més sinceres gràcies a totes les institucions, centres públics o privats, i als metges que ens han proporcionat les mostres. Especialment, vull agrair la participació de la Isabel Lòpex-Expósito i de la Asunción Vera-Carbonell, sense la col·laboració de les quals no haguéssim publicat els dos articles; de l'Antonio González Meneses, el metge que més mostres ens ha proporcionat; de l'Alberto Plaça, pels seus valuosíssims consells; del Thomas Liehr i d'Olaya Villa, per la seva ajuda amb els cromosomes marcador; de la Montse Milà i del Lluís Armengol, per la seva col·laboració amb els casos de MLPA i aCGH, respectivament, i a Pilar Grao, a M^a del Mar Pérez, a M^a Rosa Martorell, a Anna Lladonosa, a Míriam Guitart i a Ester Margarit, per haver-me proporcionat casos difícils per analitzar.

Gràcies, també, als meus companys de trajectòria de la UAB, al Javi, la Raquel, la Laia, l'Albert i la Gemma, que vam iniciar aquest llarg camí tots junts i amb qui hem compartit moltes penes però també moltes alegries. Vull agrair especialment a la Mònica, la meva

mentora, que m'ho va ensenyar tot, el seu suport i la seva paciència. Moltes gràcies, també, a la M^a Àngels Rígola i a la Cristina Hernando pels seus consells i, per descomptat, a l'Àngels, ja que sense les seves extensions ni les seves bandes, no hagués acabat mai la feina, i a l'Ana, la secretària de la unitat, pel seu somriure i la seva atenció constants.

Anna, Guio, Ramon, Àlex i Gabriele, moltíssimes gràcies pel vostre suport i la vostra amistat, especialment vosaltres, Anna i Guio, que sempre heu estat al meu costat i que m'heu animat moltíssim, sobretot durant els últims mesos. Cristina, Júlia, Dani, Carme, Marcel, Francesc, Miquel i Judit, moltes gràcies també a tots vosaltres, pel vostre interès i suport. I, evidentment, moltíssimes moltíssimes gràcies a la Sandra, la Meri, la Leo, l'Amparo i la Susana, les meves companyes de feina, per aguantar les meves queixes, per deixar-me fer tots els canvis d'horari que necessitava i per cobrir-me durant els dies lliures que m'agafava per escriure.

Han estat pràcticament set anys de trajectòria, i els últims quatre han estat especialment durs, en haver hagut de combinar una feina de vuit hores amb la tesi. Agraeixo profundament als meus pares, Carme i Joan, al meu germà, Marc, per ajudar-me amb la portada, a tota la meva família en general -avi Agustí, àvia M^aRosa, tieta Núria, tiet Agustí- i a la Mari, que m'hagin animat sempre a no abandonar i a continuar endavant.

Les meves últimes paraules d'agraïment són per tu, Marc. Gràcies per ser com ets, per haver-me recolzat en tot moment, per haver-me ajudat en tot el que has pogut, per aguantar el meu mal humor, per fer-me companyia; sincerament penso que sense el teu suport i els teus ànims no hagués acabat mai la tesi. Moltíssimes moltíssimes gràcies a tu i a tots, de tot cor.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	17
1.1. DEFECTES CONGÈNITS	18
1.1.1. Anomalies cromosòmiques constitucionals responsables dels defectes Congènits	20
1.2. RETARD MENTAL	25
1.2.1. Retard mental sindròmic	26
1.2.2. Retard mental no sindròmic	29
1.3. TÈCNiques EMPRADES EN LA CITOGÈNÈTICA	30
1.3.1. Tècniques de FISH	31
1.3.1.1. FISH multipintat o multiplex (MFISH)	31
1.3.1.2. FISH amb bandeig multicolor (MCB)	33
1.3.1.3. FISH multicolor específica de centròmers (cenM-FISH)	34
1.3.1.4. FISH multicolor subcentromèrica (subcenM-FISH)	35
1.3.1.5. FISH multicolor específica de subtelòmers (stM-FISH)	35
1.3.1.6. FISH amb cromosomes artificials de bacteries (BACs)	36
1.3.2. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	38
1.3.3. PCR quantitativa fluorescent (QF-PCR)	41
1.3.4. Hibridació genòmica comparada convencional (CGH) i d'alta resolució (HR-CGH)	42
1.3.5. CGH amb micromatrius o arrays de CGH (aCGH)	45
1.4. RELACIÓ ENTRE ARQUITECTURA DEL GENOMA HUMÀ I MALFORMACIONS CONGÈNITES	46
1.4.1. Llocs fràgils (FS)	47
1.4.2. Duplicacions segmentàries (DSs)	49
1.4.3. Variacions genòmiques submicroscòpiques del nombre de còpies (CNVs)	52
2. OBJECTIUS	59
3. MATERIAL I MÈTODES	63
3.1 MATERIAL BIOLÒGIC	65
3.1.1. Classificació dels pacients segons el cariotip/clínica	66

3.2. MÈTODES DE CULTIU CEL·LULAR PER A L'OBTENCIÓ DE CÈL·LULES EN L'ESTADI DE METAFASE	77
3.3. MÈTODES D'EXTRACCIÓ D'ADN	78
3.4. TÈCNICA DE CITOGÈNÈTICA CONVENCIONAL: BANDES G	81
3.5. TÈCNIQUES D'HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> FLUORESCENT (FISH)	81
3.5.1. Hibridació Genòmica Comparada Convencional i d'Alta Resolució (CGH/HR-CGH)	81
3.5.2. FISH convencional	83
3.5.3. FISH multipintat o <i>multiplex</i> (M-FISH)	84
3.5.4. FISH multicolor específica de centròmer (cenM-FISH)	85
3.5.5. FISH amb sondes de cromosomes artificials de bacteries (BACs)	86
3.6. TÈCNICA DE MLPA ESPECÍFICA PER A L'ANÀLISI DE REGIONS SUBTELOMÈRIQUES	92
3.7 ARRAY D'HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA (aCGH)	93
3.8. NOMENCLATURA	94
4. RESULTATS	97
4.1. GRUP A. PACIENTS AMB CARIOTIP "APARENTMENT" NORMAL I QUADRE CLÍNIC	100
4.2. GRUP B. PACIENTS BARONS 46,XX	113
4.3. GRUP C. PACIENTS AMB ANOMALIA CROMOSÒMICA "APARENTMENT" EQUILIBRADA	117
4.4. GRUP D. PACIENTS AMB MONOSOMIES PARCIALS O TRISOMIES PARCIALS	121
4.5. GRUP E. PACIENTS AMB CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS	127
5. DISCUSSIÓ	137
5.1. GRUP A. PACIENTS AMB CARIOTIP "APARENTMENT" NORMAL I QUADRE CLÍNIC	139
3.5.1.1. Detecció d'alteracions cromosòmiques críptiques : l'aplicació conjunta de tècniques de citogenètica molecular	139
3.5.1.1.1. Anomalies críptiques detectades mitjançant la CGH/HR-CGH	139
3.5.1.1.2. Anomalies críptiques detectades mitjançant la MLPA	141

5.1.1.3. Anàlisi dels casos amb alteracions críptiques a la regió 1pter	143
5.1.1.4. Anomalies críptiques detectades mitjançant aCGH	145
5.1.1.5. Anomalies críptiques detectades mitjançant l'aplicació conjunta de les tècniques de CGH/HR-CGH, MLPA, FISH i aCGH	149
5.1.2. Protocol d'actuació en pacients amb clínica afectada i cariotip normal	150
5.2. GRUP B. PACIENTS BARONS 46,XX	157
5.3. GRUP C. PACIENTS AMB ANOMALIA CROMOSÒMICA "APARENTMENT" EQUILIBRADA	159
5.4. GRUP D. PACIENTS AMB MONOSOMIES PARCIALS O TRISOMIES PARCIALS	165
5.4.1. Reorganització cromosòmica complexa del cromosoma 5 (cas 110)	168
5.4.2. Cromosoma 19 recombinant (cas 123)	171
5.4.3. Anells del cromosoma 15 (casos 125 i 126)	173
5.5. GRUP E. PACIENTS AMB CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS	175
5.5.1. Protocol d'actuació davant d'un diagnòstic de sSMC	178
5.5.2. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 15 (casos 129, 131, 133, 134, 138, 142, 143, 144, 145 i 146)	182
5.5.3. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 8 (casos 130, 132 i 137)	185
5.5.4. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 13/21 ó 14/22 (casos 128 i 140)	186
5.5.5. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 2 (cas 136)	187
5.5.6. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 7 (cas 139)	188
5.5.7. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 9 (cas 137)	189
5.5.8. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 22 (cas 141)	190
5.5.9. Cromosomes marcador amb neocentròmers (casos 130, 135 i 146)	191
5.5.10. Recopil·lació de les dades relacionades amb el genotip i fenotip obtingudes de l'estudi dels sSMC	194
5.6. ANÀLISI DELS PUNTS DE TRENCAENT	195
5.6.1. Utilitat de l'anàlisi dels punts de trencament per a la genètica clínica	203
5.6.1.1. Anàlisi dels punts de trencament implicats en translocacions i/o inversions aparentment equilibrades	204
5.6.1.2. Anàlisi dels punts de trencament implicats en monosomies i trisomies parcials autosòmiques	209

5.6.1.3. Anàlisi dels punts de trencament implicats en monosomies i trisomies parcials gonosòmiques	219
6. CONCLUSIONS	227
7. BIBLIOGRAFIA	235
8. ANNEXOS	265
ANNEX 1: DADES CITOGENÈTIQUES DE CADA PACIENT	267
8.1. GRUP A. PACIENTS AMB CARIOTIP NORMAL I QUADRE CLÍNIC	269
8.2. GRUP B. PACIENTS BARONS 46,XX	291
8.3. GRUP C. PACIENTS AMB ANOMALIA CROMOSÒMICA “APARENTMENT” EQUILIBRADA	295
8.4. GRUP D. PACIENTS AMB MONOSOMIES PARCIALS O TRISOMIES PARCIALS	300
8.5. GRUP E. PACIENTS AMB CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS	315
ANNEX 2: PUBLICACIONS D’AQUESTA TESI	335
Lopez-Exposito I, Guillen-Navarro E, Bafalliu JA, Bernabe MC, Escalona A, Fuster C. Duplication 19q13-qter and deletion 19p13-p13.3 arising from an inversion (19)(p13.3q13.3) of maternal origin. Eur J Med Genet 2006 Nov-Dec; 49(6): 511-5	
Vera-Carbonell A, Bafalliu JA, Guillen-Navarro E, Escalona A, Ballesta-Martinez MJ, Fuster C, Fernandez A, Lopez-Exposito I. Characterization of a de novo complex chromosomal rearrangement in a patient with cri-du-chat and trisomy 5p syndromes. Am J Med Genet A 2009 Nov; 149A(11): 2513-21	

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

Les malformacions congènites sovint s'originen per l'acumulació de molts canvis genètics. La pèrdua o el guany d'un segment cromosòmic d'una mida similar pot tenir conseqüències clíniques molt diferents depenent del nombre i de la funció dels gens ubicats en aquest fragment.

En els darrers anys, la introducció de les noves tècniques de citogenètica molecular, com la hibridació *in situ* fluorescent o la hibridació genòmica comparada, ha representat disposar d'una eina molt eficaç des d'un punt de vista clínic en permetre un diagnòstic més acurat de les alteracions genètiques i cromosòmiques tant prenatal com postnatalment. En efecte, l'ús d'aquestes tècniques ha permès en molts casos identificar i definir amb més precisió els segments cromosòmics involucrats en el fenotip, fet de gran importància en la recerca dels gens implicats en aquests desordres clínics.

L'aplicació conjunta de la citogenètica molecular i del desenvolupament de les noves tècniques ecogràfiques d'alta definició -especialment als grups de gestants amb una indicació clara per al diagnòstic prenatal- ha permès, d'una banda, la identificació d'anomalies cromosòmiques associades a moltes malformacions congènites i, de l'altra, conèixer els desordres cromosòmics susceptibles a originar retard mental abans que aquest es manifesti. No obstant, una part important de les anomalies cromosòmiques detectades durant el diagnòstic prenatal presenten greus dificultats per al pronòstic del fenotip del fetus en cas que la gestació arribi a terme i, a més, en moltes d'elles resulta quasi impossible preveure la presència de retard mental.

Avui dia encara són molts els nadons, nens o adolescents que consulten els Serveis de Genètica Clínica per presentar malformacions congènites i/o retard mental. En aquests casos, cal establir un bon diagnòstic genètic així com realitzar una bona exploració clínica. La comparació dels trets presents en pacients amb alteracions cromosòmiques idèntiques o similars permet detectar les anomalies clíniques comunes i, per tant, establir les correlacions genotip-fenotip. Posteriors estudis amb models animals i les anàlisis funcionals *in vitro* dels gens de la regió crítica permetran determinar la contribució de cadascun dels gens al fenotip, conèixer-ne la seva patogènia i fisiopatologia, i desenvolupar nous mètodes terapèutics.

D'altra banda, encara que l'etiologia de la infertilitat és molt heterogènia, moltes parelles que arriben als Serveis de Reproducció Assistida són portadores d'anomalies

cromosòmiques. En aquest cas, la identificació citogenètica permetrà oferir un Consell Genètic previ al tractament de la fecundació *in vitro*, en permetre el càlcul del risc de tenir avortaments o descendència afectada.

Per totes aquestes raons resulta, doncs, imprescindible avançar en l'establiment d'associacions genotip-fenotip que permetin oferir un pronòstic acurat de la presència de malformacions congènites i/o de retard mental d'origen cromosòmic.

1.1. DEFECTES CONGÈNITS

Les anomalies congènites són conseqüència de desordres que alteren el procés normal del desenvolupament embrionari. Aquests desordres es classifiquen en primaris o secundaris segons siguin conseqüència de factors interns o externs que alterin el procés normal de desenvolupament del fetus, respectivament. Les fases primerenques del creixement són les més vulnerables a l'acció d'aquests factors (Davies i col. 2003).

La classificació de les anomalies congènites es basa en les recomanacions del *International Working Group, 1982* (Spranger i col. 1982) on van definir termes com dismorfologies, malformacions, etc, que fins aquell moment eren utilitzats com a sinònims. Les anomalies congènites es poden classificar en 4 grups: les malformacions, les disrupcions, les displàsies i les deformacions (Spranger i col. 1982).

Les *malformacions* són conseqüència d'un desenvolupament defectuós d'un òrgan, parts d'un òrgan o altres teixits de l'organisme. Les malformacions són resultat de l'acció primerenca de factors intrínsecs al desenvolupament embrionari, i aquests factors poden ser tant poligènics com oligogènics. Moltes d'elles s'associen a anomalies cromosòmiques -com els defectes cardíacs que presenten un percentatge molt elevat de pacients amb síndrome de *Down* i de *Turner*, encara que també n'hi ha que han estat generades per mutacions espontànies en gens únics (Davies i col. 2003).

Les *disrupcions* són defectes morfològics d'òrgans, parts d'òrgans o altres estructures com a resultat de l'acció de factors externs que alteren el procés normal de morfogènesi. Acostumen a produir-se durant les primeres etapes de l'embriogènesi. Alguns d'aquests factors extrínsecs podrien ser infeccions fetals, exposició a productes químics i fàrmacs nocius, irradiacions i anomalies metabòliques (com la diabetis materna). Exemples típics de disrupció serien les anomalies del tub neural provocades per la ingesta materna del fàrmac contra l'epilèpsia (valproat de sodi) i la microcefàlia causada per radiació atòmica, entre d'altres. Tot i

que les disrupcions no són hereditàries, es pot tenir una predisposició genètica envers elles (Davies i col. 2003).

Les *displàsies* són la conseqüència morfològica d'una organització anòmala (dishistogènesi) de les cèl·lules durant la formació dels teixits. A diferència de les malformacions i disrupcions, les displàsies acostumen a estar distribuïdes per tot el cos. Les causes que poden provocar una displàsia són bàsicament genètiques, com la displàsia esquelètica de la síndrome de *Hurler*, una mucopolisacaridosi (Davies i col. 2003).

I per últim, les *deformacions* són alteracions en la forma, estructura o posició d'una part del cos -prèviament ben formada- a causa de forces mecàniques aberrants. Aquestes poden ser tant extrínseques com intrínseques al fetus i es poden produir en qualsevol moment de la gestació. Les deformacions solen afectar al sistema musculoesquelètic i poden arribar a ser reversibles després del naixement segons la severitat de la deformació. Alguns exemples podrien ser la dislocació del maluc i el peu equí, els quals poden ser produïts per una falta de líquid amniòtic (oligohidramni), una aglomeració intrauterina per la presència de bessons o bé per una estructura anòmala de l'úter (Davies i col. 2003).

A la Taula 1 hi ha representades les incidències de les anomalies congènites més freqüents en la població segons Mueller i col. (2001).

Les anomalies congènites afecten aproximadament un 3% de tots els naixements (Davies i col. 2003); malauradament, en un 50% dels casos és impossible esbrinar-ne l'etiologia (Mueller i col. 2001). Poden ser degudes a factors tant intrínsecs com extrínsecs al fetus; els primers corresponen als factors genètics i els segons, a teratògens. Dins dels factors de risc genètics, s'ha calculat que les anomalies cromosòmiques són responsables d'aproximadament el 6% de totes les anomalies congènites, mentre que un 7.5% estan provocades per disfuncions en un únic gen (Mueller i col. 2001).

D'altra banda, els teratògens són responsables del 2% de totes les anomalies congènites (Hanson i col. 1997). De factors extrínsecs al fetus que puguin actuar com a teratògens n'hi ha d'ambientals i de físics. Entre els ambientals, els més importants són els *fàrmacs i compostos químics* (alcohol, cloroquina, dietilestilbestrol, liti, fenitoïna, retinoides, estreptomina, tetraciclina, àcid valproic i la warfarina), les *infeccions maternes* (rubeola, citomegalovirus i toxoplasmosi) i les *malalties maternes* (diabetis mellitus, fenilcetonúria i epilèpsia). I entre els físics, els més destacables són les radiacions ionitzants i la hipertèrmia prolongada (Hanson i col 1997).

Taula 1. Incidència de les anomalies congènites més freqüents en la població.

Sistema i anomalia congènita	Incidència per cada 1000 naixements
<i>Cardiovascular</i>	10
Defecte septal ventricular	2,5
Defecte septal atrial	1
<i>Ductus</i> arterial	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 poliquistics (infantil)	0,02
Exstrosia de bufeta	0,03

1.1.1. ANOMALIES CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS RESPONSABLES DELS DEFECTES CONGÈNITS

Les anomalies cromosòmiques són molt freqüents en la població -s’observen en 1 de cada 200 naixements- i poden afectar seriosament la integritat física i mental del individu. La repercussió fenotípica pot ser molt diversa depenent dels cromosomes afectats i/o de les regions cromosòmiques implicades. Fins i tot es poden trobar anomalies cromosòmiques en individus fenotípicament normals però amb un elevat risc d’avortaments espontanis, d’avortaments de repetició i de descendència afectada per retard mental i/o defectes congènits. En tots aquests casos, és molt important conèixer les repercussions fenotípiques associades a anomalies cromosòmiques per poder assessorar acuradament als pacients.

En relació a les aneuploïdies totals, la pèrdua de material genètic (monosomies totals) és, en general, menys viable i té repercussions clíniques més severes que el guany (trisomies totals). De fet, l'única monosomia total que és compatible amb la vida és la 45,X (*S. de Turner*), que es presenta molt sovint en forma de mosaic. La resta de monosomies totals únicament són viables quan es troben en mosaic. La majoria de les trisomies de cromosomes autosòmics són també incompatibles amb la vida, com la del cromosoma 16, que es troba molt freqüentment en avortaments espontanis de primer trimestre. Únicament les trisomies 13 (*S. de Patau*), 18 (*S. d'Edwards*) i 21 (*S. de Down*) són viables tot i que les dues primeres tenen una esperança de vida molt curta. Les trisomies que afecten els cromosomes sexuals són també viables (*S. de Klinefelter*), així com les tetrasomies o pentasomies sexuals (Moreno Garcia i col. 2004). Finalment, les triploidies (69 cromosomes) i les tetraploidies (92 cromosomes) són generalment incompatibles amb la vida: es troben en un 16% i un 6% dels avortaments espontanis cromosòmicament anormals, respectivament.

La repercussió fenotípica de les anomalies estructurals dependrà de si l'alteració en l'estructura del cromosoma provoca un guany o una pèrdua de material genètic, de si és heretada o *de novo*, de si genera la ruptura d'algun gen o bé, un canvi de la pauta de lectura del gen. Dins d'aquestes anomalies cromosòmiques, podem trobar les translocacions recíproques i Robertsonianes, delecions, duplicacions, insercions, inversions pericèntriques i paracèntriques, cromosomes en anell, cromosomes marcador i les reorganitzacions cromosòmiques complexes.

A la majoria dels casos on l'anomalia estructural és *equilibrada* -és a dir, quan no hi ha pèrdua ni guany de material genètic- no hi ha repercussions clíniques ja que l'individu manté tota la informació genètica completa. Tanmateix, s'han publicat casos en què sí que s'han produït afectacions clíniques, tant en el cas de les anomalies *de novo* com en les heretades (Warburton, 1991). De fet, un estudi realitzat per Warburton (1991) va evidenciar que un 6.7% de les anomalies estructurals equilibrades *de novo* detectades durant el diagnòstic prenatal presentaven anomalies congènites i/o retard mental. Existeixen diverses explicacions possibles: a) que aquestes alteracions estructurals en realitat no siguin equilibrades, sinó que presentin guanys o pèrdues de material genètic tan petits que no poden ser detectats per tècniques de citogenètica convencional (anomalies críptiques o subtils); b) que el punt de trencament estigui situat enmig d'un gen i provocar-ne, així, una modificació de la seva funció (sovint pèrdua de funció gènica); c) que l'alteració hagi produït un canvi en la pauta de lectura del gen i també provocar-ne la modificació de la funció gènica, i d) que hi hagi hagut un mosaicisme a altres teixits amb un reordenament desequilibrat (Moreno Garcia i col. 2004).

Pel que fa a les anomalies estructurals equilibrades *heretades*, el risc d'anomalies congènites que té el fill d'un portador sa és pràcticament igual al de la població general. Però no es pot descartar que el fill tingui una reorganització més complexa que la del progenitor impossible de detectar per citogenètica convencional, ni tampoc la presència d'un mosaïcisme amb un reorganització desequilibrada a altres teixits. D'altra banda, un altre factor a tenir en compte és la *disomia uniparental*, ja que pot ser també una de les causes de repercussió clínica al fill d'un portador sa. S'ha vist que els portadors d'alteracions cromosòmiques equilibrades tenen tendència a generar cèl·lules germinals disòmiques a causa de la tendència a retenir el cromosoma normal amb l'alterat (Villa i col, 1998).

En general, la presència d'una anomalia estructural desequilibrada –és a dir, quan sí que hi ha una pèrdua o un guany de material genètic- s'acompanya quasi sempre de repercussions fenotípiques, produint anomalies tant en òrgans interns com externs; de fet, la presència de dismorfologies facials característiques és molt freqüent en aquests casos i facilita moltes vegades el reconeixement de l'anomalia cromosòmica. També, les anomalies desequilibrades comprometen sovint les funcions mentals i d'intel·ligència, tenint en compte que el cervell és l'òrgan més complex de l'organisme. D'altra banda, alguns desequilibris menors poden originar defectes fenotípics únicament detectables durant la infància primerenca sense tenir, de vegades, cap efecte al fenotip.

La identificació d'aquestes anomalies estructurals desequilibrades en pacients amb malformacions congènites ha permès establir diferents associacions genotip-fenotip; de fet, per a cada síndrome causada per una alteració cromosòmica s'ha descrit la *regió crítica*, és a dir, la mínima regió cromosòmica comuna a la majoria d'individus que comparteix un fenotip concret. En els últims anys s'han publicat revisions en què es descriuen de l'ordre de 140 regions cromosòmiques associades a malformacions concretes (Brewer i col. 1998; Brewer i col. 1999; Carey i Viskochil, 2002, 2007). Les conseqüències fenotípiques originades per pèrdues de regions cromosòmiques específiques es mostren a la Figura 1 i les degudes a duplicacions a la Figura 2.

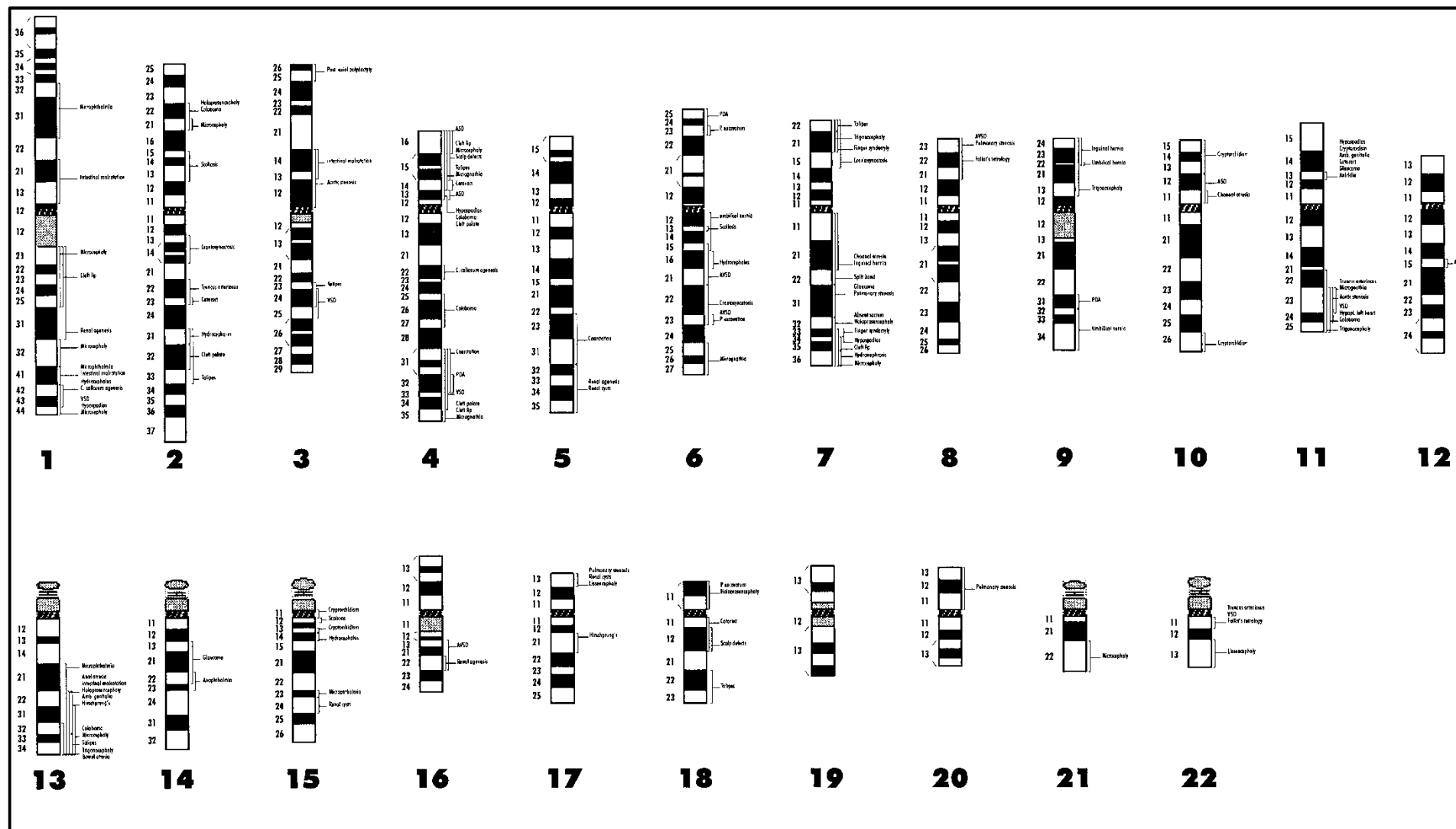


Figura 1. Mapa de la correlació delecíó regió cromosòmica-fenotip (Brewer i col. 1998). Abreviacions: ASD: Atrial septal defect; AVSD: Atrio-ventricular septal defect; PDA: Patent ductus arteriosus; VSD: Ventricular septal defect.

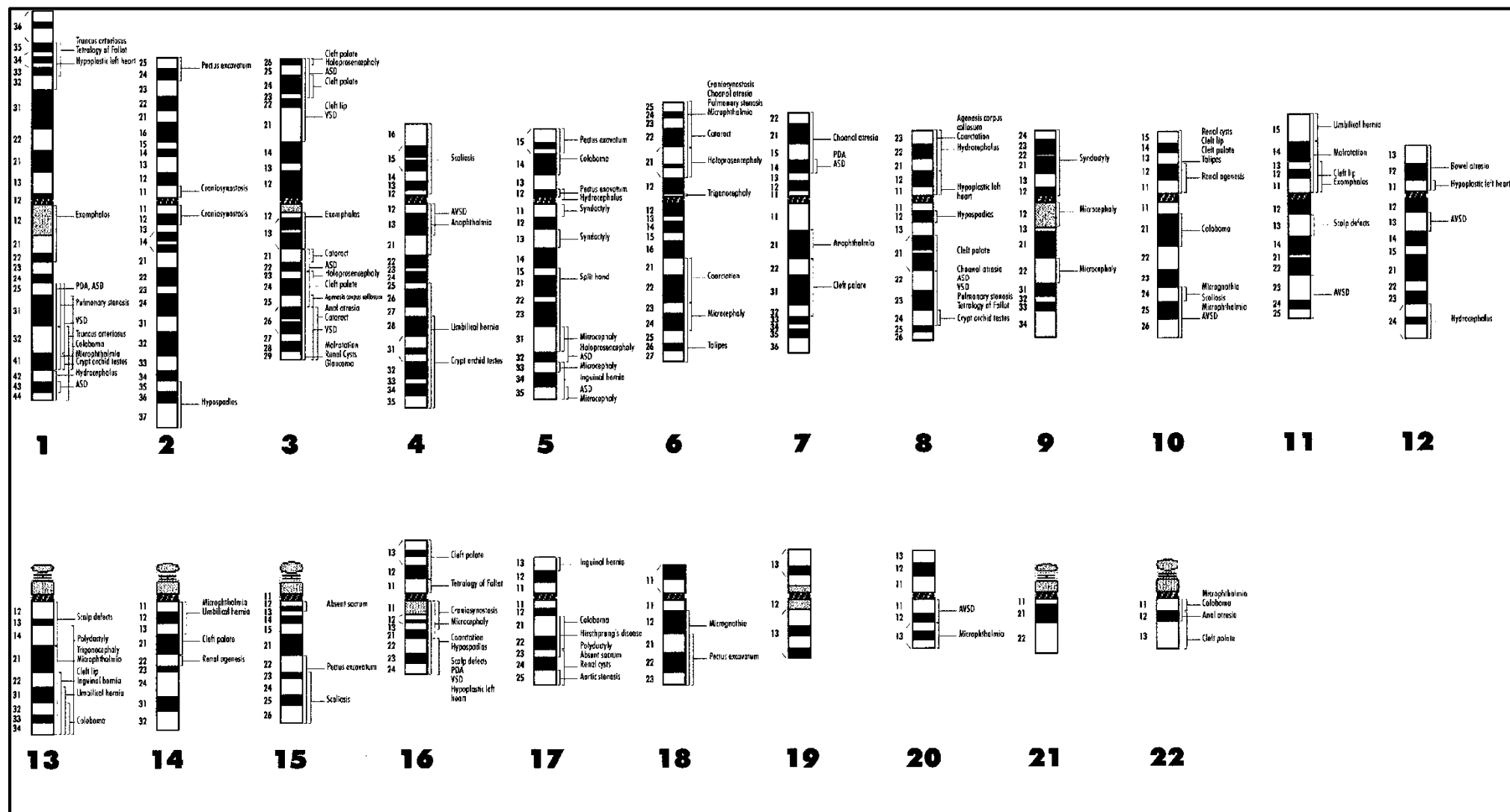


Figura 2. Mapa de la correlació duplicació regió cromosòmica-fenotip (Brewer i col. 1999). Abreviacions: ASD: Atrial septal defect; AVSD: Atrio-ventricular septal defect; PDA: Patent ductus arteriosus; VSD: Ventricular septal defect.

En els darrers anys, s'han publicat casos d'individus sense cap afectació clínica, tant amb material extra (als cromosomes 1, 2, 9, 13, 15 i 16) com amb delecions intersticials (als cromosomes 5, 11, 13 i 16). En aquest últim cas, totes les delecions afectaven a bandes G fosques, menys riques en gens que les clares. Una possible explicació de l'absència d'efecte fenotípic podria ser que la còpia del gen o dels gens de l'altre cromosoma fos suficient per donar un fenotip normal (Moreno Garcia i col. 2004).

En el cas d'un mosaïcisme -és a dir quan en un mateix individu hi ha dos o més línies cel·lulars amb una dotació cromosòmica diferent- les repercussions fenotípiques depenen del tipus d'anomalia cromosòmica, del número de cèl·lules que presentin l'anomalia cromosòmica i també, dels teixits afectats. Són molt més lleus que la mateixa anomalia numèrica o estructural en estat homogeni (present a totes les cèl·lules de l'individu).

La consulta a les bases de dades de l'OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) i de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) permet estar al dia de les noves associacions.

1.2. RETARD MENTAL

El retard mental (MR) és una manifestació variable i heterogènia d'una disfunció del sistema nerviós central (Battaglia i col. 1999). L'Organització Mundial de la Salut defineix el retard mental com un estat de desenvolupament mental incomplet o aturat, especialment caracteritzat per una deficiència d'habilitats -cognitives, lingüístiques, motores i socials- que es manifesten durant el període de desenvolupament i que contribueix al nivell d'intel·ligència general. El retard mental esdevé evident durant la infància com un retard en el desenvolupament (Stankiewicz i col. 2007). Segons els autors, aquest retard es produeix abans dels 5 anys, i pot involucrar funcions motores, habilitats cognitives, de llenguatge o combinacions d'aquestes. Determinar si aquestes discapacitats estan associades a malformacions o a anomalies congènites múltiples i/o trets dismòrfics pot ser molt útil ja que pot suggerir un diagnòstic clínic sindròmic i pot ajudar a guiar, així, les proves diagnòstiques. S'estima que el retard mental afecta entre un 2% i un 3% de la població (Stankiewicz i col. 2007).

El retard mental és un dels camps més difícils d'estudiar a causa de la seva gran heterogeneïtat i de la complexitat genètica. Les etiologies del retard mental són molt diverses i inclouen agents teratogènics i ambientals, asfíxia perinatal i causes genètiques; malauradament, només en un 50% dels casos aproximadament es pot arribar a conèixer-ne l'etiologia.

El retard mental d'origen genètic pot ser degut a diversos factors: i) la presència d'anomalies cromosòmiques, ii) a mutacions en un gen únic (herència mendeliana: autosòmica recessiva, autosòmica dominant o lligada al cromosoma X) o a mutacions en diversos gens combinades amb factors ambientals (herència multifactorial), i iii) a factors epigenètics (Fig.3). La relació de retard mental entre homes i dones és 1.4:1 a 1.6:1, bàsicament a causa de l'elevat nombre de gens lligats al cromosoma X causants de retard mental (Basel- Vanagaite, 2008).

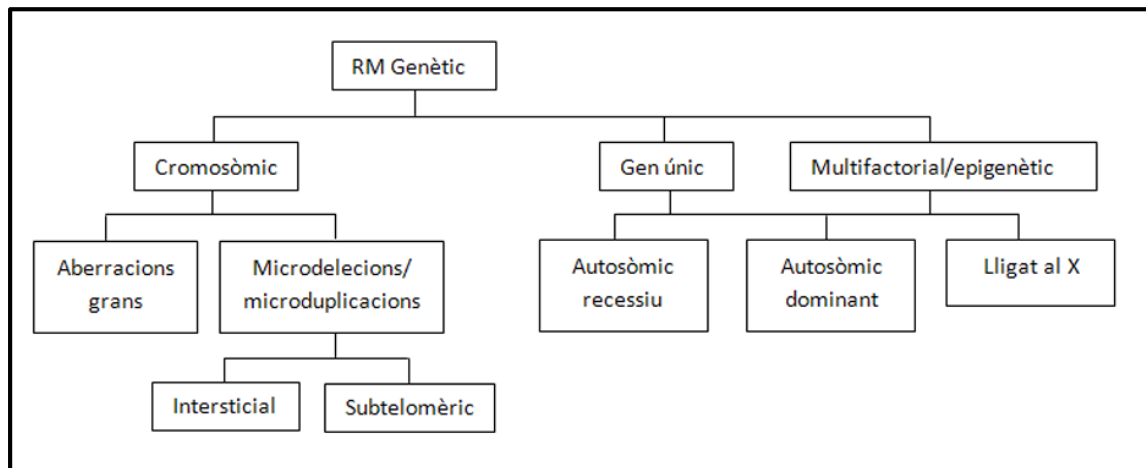


Figura. 3. Causes de retard mental d'origen genètic.

Existeixen essencialment dues classificacions del retard mental: les basades en els resultats de tests psicològics, que classifiquen el retard mental en *borderline* (70-85), *mild* (50-70), *moderate* (35-49), *severe* (20-34) o *profound* (<20) segons el coeficient d'intel·ligència o IQ (Wechler, Stanford Bined), o altres classificacions que l'agrupen en *sindròmic* (si està associat a altres alteracions somàtiques, neurològiques o de comportament) o *no sindròmic* (si no està associat a cap alteració clínica ni bioquímica destacable i es presenta aparentment aïllat). Tant el retard mental sindròmic com el no sindròmic poden ser causats per anomalies cromosòmiques, mutacions en un gen únic o mutacions en diversos gens i factors epigenètics (Fig.3). Tanmateix, en el cas del retard mental no sindròmic, resulta molt difícil trobar-ne la causa, ja que el pacient no presenta cap altre tret clínic que ajudi a establir un lligam entre el fenotip i el defecte molecular (Basel- Vanagaite, 2008).

1.2.1. RETARD MENTAL SINDRÒMIC

El diagnòstic clínic del retard mental sindròmic és relativament senzill si es reconeix la síndrome que acompanya el retard mental (trets dismòrfics característics, un comportament específic, etc) ja que es poden realitzar les proves diagnòstiques específicament dirigides a la detecció d'una anomalia cromosòmica concreta o de mutacions en un gen determinat. Les

anomalies cromosòmiques (alteracions cromosòmiques grans i microdeleccions/microduplicacions) constitueixen la causa genètica més freqüent del retard mental sindròmic: les primeres són les més freqüents i les causants del retard mental de lleu a profund, i les segones, es troben en un 5% -7% dels pacients (Basel-Vanagaite, 2008).

El desenvolupament de les tècniques de bandeig cromosòmic va suposar un pas molt important en l'estudi de les bases genètiques del retard mental sindròmic. Cada banda cromosòmica conté un elevat nombre de gens i per tant, qualsevol alteració cromosòmica, per més petita que sigui, pot alterar el funcionament d'aquests gens i provocar alteracions clíniques severes. La citogenètica convencional pot detectar deleccions i duplicacions d'entre 5Mb i 10Mb, i de fins a 3Mb amb el bandeig d'alta resolució. Segons Basel Vanagaite (2008), cal realitzar sempre el cariotip a tots aquells pacients amb retard mental que no hagin estat diagnosticats per alteració en gen únic.

Els guanys o pèrdues constitucionals de fragments d'ADN d'entre 1Mb i 5Mb són també una causa important del retard mental sindròmic; alteracions, però, que queden per sota el nivell de resolució de les tècniques de bandeig cromosòmic. La hibridació *in situ* fluorescent, o FISH, amb sondes locus específiques, permet detectar duplicacions i deleccions submicroscòpiques, i la seva aplicació al diagnòstic clínic rutinari ha permès elaborar pautes concretes quan els pacients presenten retard mental i anomalies congènites associades a alteracions submicroscòpiques específiques (Friedman, 2009). Aquestes microdeleccions i microduplicacions poden generar-se tant als extrems dels cromosomes (regions subtelomèriques) com a les regions intersticials.

Les reorganitzacions subtelomèriques s'ha vist que poden arribar a tenir un risc familiar de recurrència de fins el 50% si algun dels pares és portador d'una reorganització subtelomèrica equilibrada, mentre que les alteracions intersticials generalment són esporàdiques (Basel-Vanagaite, 2008). Les regions subtelomèriques són una de les regions més estudiades en retard mental, ja que són molt riques en gens. L'any 1995 Flint i col. van demostrar que un 6% dels casos de pacients amb retard mental idiopàtic i anomalies congènites múltiples presentaven alteracions submicroscòpiques en aquestes regions. Aquest fet ha estat demostrat per altres autors amb altres metodologies (Ness i col, 2002, Kirchoff i col 2004; Balikova, 2007).

Recentment, el desenvolupament de la tecnologia dels arrays d'hibridació genòmica comparada (aCGH) ha aportat més llum en aquest camp, ja que permet identificar variacions en el número de còpies de regions tant intersticials com subtelomèriques del genoma amb una resolució d'entre 100kb i 200kb. De fet, amb l'aplicació d'aquesta tecnologia s'ha observat que els pacients amb un retard mental sindròmic de moderat a sever poden arribar a tenir doblada

la freqüència de microduplicacions i microdelecions que els pacients amb retard mentalindròmic de lleu a *borderline* (Stankiewicz i col. 2007; Basel-Vanagaite, 2008).

La síndrome de la X fràgil és el tipus de retard mentalindròmic heretat més freqüent en la població. Té una herència dominant lligada al cromosoma X i una penetrància reduïda coneguda com la *paradoxa de Sherman* (Sherman i col. 1985). El gen responsable d'aquesta síndrome és el FMR1, format per 17 exons i situat al punt fràgil citogenètic del cromosoma X anomenat FRAXA ubicat a Xq27.3. A l'exó 1 hi ha una regió repetitiva i polimòrfica de triplets CGG; quan hi ha entre 6 i 50 repeticions, el fenotip és normal, però si se superen les 200 repeticions, es produeix una hipermetilació de la illa CpG que hi ha a l'extrem 5' de l'exó 1 i el gen no s'expressa, desenvolupant-se conseqüentment la síndrome de la X fràgil (els afectats tenen generalment unes 800 repeticions). Entre les 50 i 200 repeticions, no es desenvolupa la patologia perquè aquesta hipermetilació no es produeix, però es considera que la persona és portadora de la premutació. Aquests al·lels premutats són molt inestables durant la meiosi, especialment la femenina, de manera que d'una generació a una altra es poden expandir moltíssim aquestes repeticions i superar les 200 donant lloc a un individu afectat (Bassell i col. 2008). El gen FMR1 codifica per la proteïna FMRP, un factor de transcripció de 71kDa que s'expressa en molts teixits i que és especialment abundant al cervell. Tot i que la funció exacta de la proteïna és encara desconeguda, se sap que és altament conservada en l'evolució, que intervé en els processos sinàptics i que quan no hi és es produeixen espines dendrítiques dismòrfiques. Els nens afectats tenen problemes bàsicament de conducta (hiperactivitat) i aprenen les coses més lentament. Els adults presenten, en termes generals, hiperlaxitud de les articulacions, uns testicles molt grans, una expressió facial característica, es mosseguen les mans i eviten la mirada. El retard mental es va accentuant a mida que l'afectat va creixent i pot arribar a ser molt sever. La síndrome de la X fràgil té una incidència de 1:2500 en homes i 1:8000 en dones (Basel-Vanagaite, 2008).

Per últim, cal esmentar que els desordres metabòlics (com la fenilcetonúria i l'hipotiroidisme) també constitueixen entre un 1% i un 5% dels casos de retard mentalindròmic. Normalment, aquests desordres metabòlics es caracteritzen per una progressió de símptomes neurològics, com hipotonia, espasmes, convulsions, hepatosplenomegàlia, trets facials bastos, anomalies oculars i una visió i audició també anormals i un futur retard mental (Basel-Vanagaite, 2008). Aquestes malalties generalment són "curables" si es detecten en noutats amb una dieta adequada. Per exemple, en la fenilcetonúria, no es produeix un enzim anomenat fenilalanina hidroxilasa (gen PAH), provocant una acumulació de tirosina al cervell i per tant, l'aparició del retard mental posterior. Els afectats han de vigilar de no incorporar fenilalanina a la dieta per no desenvolupar el fenotip corresponent.

1.2.2. RETARD MENTAL NO SINDRÒMIC

Aquest tipus de retard mental presenta una gran heterogeneïtat. Només a la base de dades de l'OMIM s'hi poden trobar més de 1000 entrades. Pot tenir una herència autosòmica dominant o recessiva, o bé lligada al cromosoma X; però es desconeix la freqüència de retard mental no sindròmic originat per gens lligats al cromosoma X i per gens únics autosòmics. La dificultat en la identificació dels gens implicats ha fet, però, que la majoria d'estudis s'hagin centrat en aquells gens responsables de retard mental lligats al cromosoma X. És important conèixer el tipus d'herència que presenten aquestes patologies per poder calcular el risc de recurrència d'una parella amb un fill afectat de tenir-ne un altre i oferir, per tant, un Consell Genètic més acurat. La identificació d'aquests gens no és una tasca senzilla; una de les maneres d'estudiar-los és a través d'estudis de lligament en famílies grans (de mínim tres generacions) o també, a través de translocacions equilibrades associades a retard mental. Recentment, s'han identificat diversos gens que presumiblement estan involucrats en retard mental no sindròmic d'herència autosòmica dominant gràcies a la identificació dels punts de trencament en pacients amb alteracions cromosòmiques equilibrades (Guzauskas i col. 2007).

En pacients amb retard mental no sindròmic es desconeix també la freqüència d'anomalies cromosòmiques present, tant d'anomalies cromosòmiques "grans" com de microdeleccions i microduplicacions (Basel-Vanagaite, 2008).

La majoria dels gens únics causants de retard mental es concentren al cromosoma X; això explica que aproximadament el 10% dels homes que pateixen un retard mental estigui causat per gens lligats al cromosoma X (Basel-Vanagaite, 2008). Els estudis de lligament han permès identificar 50 gens del cromosoma X associats a un retard mental sindròmic (FMR1, ATRX, etc) i 25 a un retard mental no sindròmic (FRAXE, OPHN1, ARHGEF6, GDI1, PAR3, MAOA i MAOB, entre altres) (de Brouwer i col. 2007). S'ha vist que la majoria d'aquests gens identificats tenen un paper molt important en la diferenciació neuronal, la plasticitat sinàptica, la transmissió sinàptica, la regulació del citoesquelet d'actina i la regulació d'expressió de gens, entre altres funcions. També s'ha pogut observar que mutacions en els mateixos gens presenten una elevada variabilitat fenotípica en pacients sindròmics i no sindròmics: per exemple, mutacions en el gen OPHN1 provoquen un retard mental no sindròmic però també retard mental associat a hipoplàsia cerebel·lar (Renieri i col. 2005).

Avui dia hi ha un desconeixement força important dels gens implicats en el retard mental no sindròmic d'origen autosòmic. Com ja s'ha comentat anteriorment, és molt difícil estudiar les bases genètiques del retard mental no sindròmic, i fins i tot els gens autosòmics dominants causants d'aquest tipus de retard són difícils d'identificar per la manca de famílies

prou grans per fer estudis de lligament, ja que els individus afectats rarament es reproduïen. Fins ara s'han pogut descriure 5 gens: el PRSS12 (4q26), el CRBN (3p26), el CC2D1A (19p13), el GRIK2 (6q16) i el TUSC3 (8p22), i recentment s'han identificat 10 *loci* nous, cosa que demostra l'heterogeneïtat d'aquest tipus de retard mental (Molinari i col. 2002; Higgins i col. 2004; Basel-Vanagaite i col. 2006; Motazacker i col. 2007; Molinari i col. 2007). D'altra banda, totes les mutacions identificades als gens autosòmics s'ha vist que són mutacions que provoquen la manca de la proteïna corresponent.

1.3. TÈCNiques EMPRADES EN LA CITOGENÈTICA

Des que l'any 1956 Tijo i Levan (Tijo i Levan, 1956) van poder determinar que l'espècie humana tenia una dotació cromosòmica de 46 cromosomes, la citogenètica ha patit una revolució tecnològica cada dècada (Taula 2). A propòsit de la celebració dels 50è aniversari de la Citogenètica Humana, s'han publicat diferents treballs de revisió, entre els quals cal destacar el de Berger (2007) i el de Ledbetter (2008).

La primera tècnica de bandeig de cromosomes va ser desenvolupada per Caspersson i col. l'any 1970 (bandes Q), que va permetre el desenvolupament de les bandes G i R poc temps després. Aquesta tecnologia de bandeig cromosòmic va permetre per primera vegada que es pogués identificar cada cromosoma individualment i que es poguessin detectar alteracions cromosòmiques de més de 5Mb.

La dècada de 1980 va veure néixer el bandeig d'alta resolució, que permetia identificar alteracions cromosòmiques d'entre 3Mb i 5Mb, identificar síndromes cromosòmics desconeguts (com les síndromes de microdeleció) i establir les bases cromosòmiques de síndromes ja conegudes (com la de *Prader-Willi*).

Els anys 90 van ser de la *fluorescence in situ hybridization* o FISH, que va permetre el descobriment de noves microdeleccions i establir les bases per al desenvolupament de noves tècniques de biologia molecular, com el clonatge i la seqüenciació.

Finalment, la dècada del 2000 ha estat la dècada de la tecnologia dels *arrays* que, aplicada a la citogenètica clínica, ha permès el descobriment de noves síndromes causades per deleccions de segments genòmics d'entre 500kb i 2Mb.

Taula 2. Principals avenços metodològics en citogenètica humana al llarg de les darreres dècades.

Categoria	Anys 60	Anys 70	Anys 80	Anys 90	Anys 2000
Tècnica	Tècniques de prebandeig	Tècniques de bandeig	Bandeig d'alta resolució	FISH	Arrays de citogenètica
Resolució	10-20Mb	5-10Mb	3-5Mb	100kb	50-500kb
Fenotip amb una base genotípica coneguda	<i>S. Down</i> <i>S. Klinefelter</i> <i>S. Turner</i>		<i>S. Prader-Willi</i> <i>S. Miller-Dieker</i> <i>S. DiGeorge</i>	<i>S. Williams</i>	
Genotip amb manifestació fenotípica específica coneguda	Trisomia 18 Trisomia 13 5p- 4p-	<i>S. WAGR*</i> <i>S. Jacobsen</i>	<i>S. Smith-Magenis</i>	1p36 22q13	17q21.3

*WAGR: tumor de Wilms, aniridia, anomalies genitourinàries i retard mental.

1.3.1. TÈCNiques DE FISH

Les primeres tècniques de FISH, desenvolupades a la dècada dels 90, van classificar-se en quatre grans grups segons el tipus de sonda utilitzada. Un primer grup estaria constituït per sondes identificadores de loci específics o LSI (*Locus Specific Identifier*) que, en reconèixer gens específics, són de gran utilitat per a la detecció de síndromes concretes. Un segon grup el formarien les sondes centromèriques o CEP (*Chromosome Enumeration Probe*), que hibriden als centròmers dels cromosomes i que s'utilitzen en l'anàlisi d'aneuploidies, sobretot en diagnòstic prenatal. Un tercer grup, per sondes de pintat cromosòmic o WCP (*Whole Chromosome Probe*), que hibriden al llarg de tot un cromosoma en concret i són molt útils per a la detecció de reorganitzacions intercromosòmiques. I finalment, un quart grup que inclou sondes subtelomèriques o *subtel*, de gran utilitat en la detecció de reorganitzacions subtelomèriques.

A continuació, es detallen les característiques principals d'algunes d'elles.

1.3.1.1. FISH MULTIPINTAT O MULTIPLEX (MFISH)

La tècnica de multipintat cromosòmic (MFISH) va ser posada a punt l'any 1996 per Speicher i col., i va suposar un gran avenç en el món de la FISH ja que permetia, amb una sola hibridació, identificar tots els cromosomes d'una mateixa metafase. En aquesta tècnica s'utilitzen 24 sondes específiques per a cadascuna de les 22 parelles d'autosomes i per als cromosomes sexuals X i Y. Aquestes sondes són marcades amb diferents combinacions de cinc

fluorocroms (FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5 i Cy7), aconseguint que cada parella presenti un color característic i diferent, obtenint, així, l'anomenat "cariotip multicolor".

El desenvolupament d'aquesta tècnica va facilitar la caracterització de moltes anomalies cromosòmiques que fins llavors havien estat impossibles d'identificar o d'aclarir amb les tècniques de la citogenètica convencional. Aquesta metodologia és actualment indispensable per aconseguir una correcta identificació de reorganitzacions cromosòmiques complexes i críptiques, així com en la caracterització de marcadors supernumeraris i de cromosomes en anell (Fig. 4).

L'avantatge principal de la tècnica és que no és necessari un coneixement previ o sospita de l'anomalia cromosòmica; en canvi, requereix cèl·lules en metafase per a l'anàlisi. Un altre desavantatge és la impossibilitat de detectar alteracions intracromosòmiques estructurals ni les bandes exactes implicades en les diferents alteracions, ja que la seva resolució és limitada (de 1Mb a 1.5Mb) i és especialment baixa a les zones pericentromèriques i telomèriques.

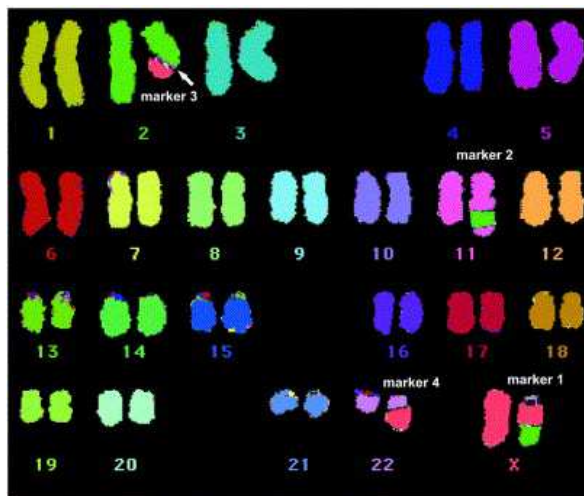


Figura 4. Cariotip multicolor obtingut per M-FISH on es mostra un cromosoma $der(X)t(22;X;2)$, $der(11)ins(11;2)$, $der(2)t(2;X)$ i un $der(22)t(X;22)$ (Hernando i col. 2004).

L'any 1996, Schröck i col. van desenvolupar la tècnica de SKY, *Spectral Karyotyping*, una tècnica germana de la MFISH. Amb l'SKY cada parella de cromosomes també queda marcada amb una combinació de fluorocroms característica i també s'aconsegueix una resolució de 1Mb a 1.5Mb; l'únic que les diferencia és el sistema de captació d'imatges i d'anàlisi que tenen. En totes dues tècniques s'utilitza una càmera CCD (*Charge Couple Device*) per a la captura de les imatges. L'avantatge del sistema de captura de la MFISH respecte al de l'SKY és que permet ajustar els paràmetres (com per exemple el temps d'exposició) per a cada fluorocrom, cosa impossible amb l'SKY ja que es capturen tots simultàniament.

La utilitat d'aquestes dues tècniques en el diagnòstic clínic ha quedat palesa sobradament en l'àmbit prenatal i postnatal (Uhrig i col. 1999; Vermeulen i col. 2004; Cetin i col. 2005).

1.3.1.2. FISH AMB BANDEIG MULTICOLOR (MCB)

Aquesta tècnica va ser desenvolupada per primera vegada per Chudoba i col. l'any 1999; des de llavors, diferents tècniques basades en el bandeig multicolor s'han anat desenvolupant amb èxit. L'avantatge principal que presenta aquesta tècnica respecte a les altres tècniques de bandeig tradicionals – com per exemple, les bandes GTG, que generen un patró blanc i negre segons si les regions són riques, o no, en guanina-, és que és específica per ADN i no per proteïnes i genera bandes de diferents colors, amb la qual cosa resulta més informativa (Liehr i col. 2006).

Chudoba i col. (1999) el que van fer va ser microdisseccionar regions parcials del cromosoma 5, amplificar-les per DOP-PCR i marcar-les amb combinacions de fluorocroms diferents i específiques per cadascuna d'elles. Cada regió microdisseccionada se sobreposava parcialment amb l'anterior, de manera que la parella de cromosomes homòlegs quedava marcada amb un patró de bandes multicolor característic. Els autors van comprovar que aquest patró de bandes no variava amb el grau de condensació de la cromatina; això va evidenciar el potencial de la tècnica, de manera que en els últims anys s'han anat dissenyant sondes per a altres cromosomes, fins que a avui dia n'hi ha pels 24 cromosomes humans (Lemke i col. 2001; Liehr i col. 2002a; Weise i col. 2002; Chudoba i col. 2004).

Aquesta tècnica és molt eficaç en la caracterització d'alteracions intracromosòmiques; a més a més, pot definir millor els punts de trencament implicats (Fig. 5).

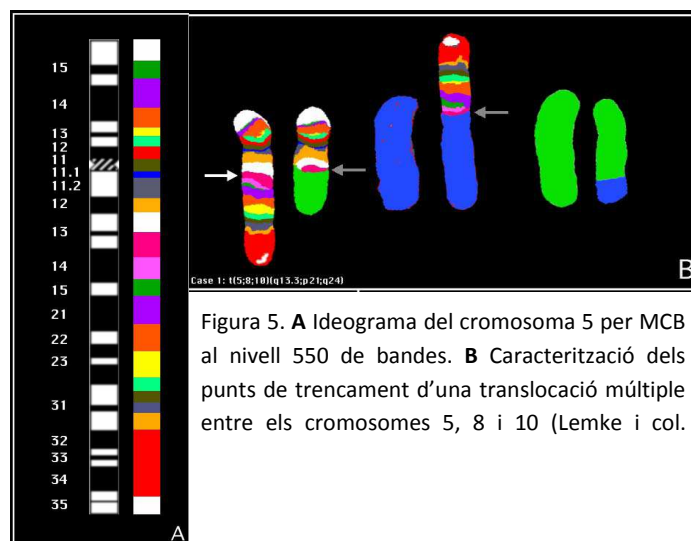


Figura 5. **A** Ideograma del cromosoma 5 per MCB al nivell 550 de bandes. **B** Caracterització dels punts de trencament d'una translocació múltiple entre els cromosomes 5, 8 i 10 (Lemke i col.

1.3.1.3. FISH MULTICOLOR ESPECÍFICA DE CENTRÒMERS (cenM-FISH)

L'any 2001 Nietzel i col. van desenvolupar aquesta FISH multicolor específica de centròmers. L'interès que té aquesta tècnica és que permet identificar tots els centròmers en humans sense confusió, exceptuant els dels cromosomes 13 i 21, que presenten ambigüitat. El que van fer aquests autors va ser marcar amb combinacions de 5 fluorocroms diferents les sondes específiques disponibles de tots els centròmers, barrejar-les i hibridar-les simultàniament sobre una preparació de metafases. Un cop capturades les senyals de fluorescència, la imatge final que s'obté permet reconèixer els centròmers de cada parella de cromosomes homòlegs ja que queden marcats d'un color específic i únic per a cada parella de cromosomes (Fig. 6).

Un altre gran avantatge de la cenM-FISH és que es pot realitzar la hibridació sobre cromosomes bandejats, amb la qual cosa la mateixa extensió de metafases emprada per l'estudi de citogenètica convencional pot ser reutilitzada.

Aquesta tècnica ha estat especialment útil al diagnòstic prenatal en permetre la identificació de cromosomes marcadors supernumeraris petits (sSMC). Els sSMC són impossibles d'identificar per citogenètica convencional i sovint tampoc són útils altres tècniques com la MFISH, en contenir molt poc -o gens- material eucromàtic (Nietzel i col. 2001; Liehr i col. 2005; Mrasek i col 2005).

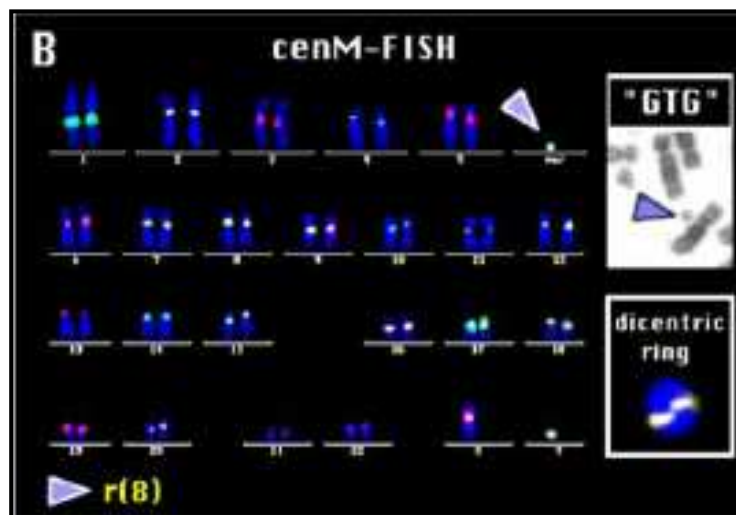


Figura. 6. Imatge d'un cariotip analitzat per cenM-FISH (Nietzel i col, 2001).

1.3.1.4. FISH MULTICOLOR SUBCENTROMÈRICA (subcenM-FISH)

Aquesta tècnica va ser desenvolupada per Starke i col. (2003) amb l'objectiu de completar la informació obtinguda amb la cenM-FISH i poder determinar si un sSMC conté, a més a més de centròmer, material eucromàtic.

Per posar a punt la tècnica, es van escollir 43 sondes de cromosomes artificials de bactèria o llevat (BACs o YACs) localitzades en les regions més proximals de cada centròmer d'acord amb la base de dades *Ensembl*. Aquestes sondes van ser amplificades per DOP PCR i marcades a través d'una DOP PCR secundària (Nietzel i col. 2001). Starke i col. (2003) van preparar una barreja subcenM-FISH específica per a cada cromosoma. Cadascun d'aquests conjunts de sondes estava compost per: les sondes més proximals als centròmers de còpia única, les sondes de pintat cromosòmic parcials derivades d'una microdissecció específica dels braços llarg i curt del cromosoma i, finalment, una sonda específica del centròmer (Fig. 7). En el cas dels cromosomes acrocèntrics, com que no es disposava de cap sonda de còpia única del braç curt proximal al centròmer ni tampoc de cap sonda de pintat cromosòmic parcial del braç curt del cromosoma, s'hi incloïa la sonda MD54, que és específica de tots els braços p dels cromosomes acrocèntrics (Mrasek i col. 2001).

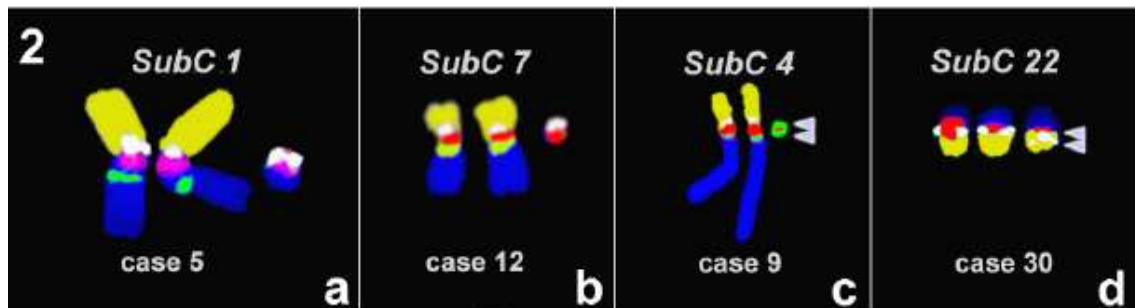


Figura 7. Imatges de diferents sSMC minute caracteritzats amb l'aplicació de la tècnica de subcenM-FISH (Starke i col, 2003).

1.3.1.5. FISH MULTICOLOR ESPECÍFICA DE SUBTELÒMERS (stM-FISH)

L'any 1997 Knight i col. van descriure una tècnica que permetia l'estudi dels telòmers de tots els cromosomes. Amb l'objectiu de solucionar l'anàlisi de les regions subtelomèriques, Fauth i col. (2001) van desenvolupar la FISH multicolor específica de subtelòmers (stM-FISH) que permet visualitzar tots els subtelòmers amb colors diferents.

Amb aquesta tècnica s'utilitza un primer grup de sondes específiques de subtelòmers generades per microdissecció i d'una mida d'entre 5Mb i 10Mb. Aquestes sondes es marquen

amb combinacions de fluorocroms -DEAC, FluoroGreen, Cy3, TexasRed, Cy5, biotina (avidin-Cy5.5), digoxigenina (anti-digoxigenin-Cy7)-, amb la qual cosa s'aconsegueix que quedin marcades amb 24 colors diferents. També s'utilitza un segon grup de sondes que són específiques de loci situats a poca distància de les regions subtelomèriques repetitives. Aquestes sondes consisteixen en clons PAC-, P1- i BAC-, i es marquen en verd si estan situades al braç p i en vermell si ho estan al braç q dels cromosomes (Fig. 8).

Una de les aplicacions més interessants de la tècnica ha estat la identificació de reorganitzacions subtelomèriques críptiques en pacients amb defectes congènits (Dawson i col. 2002; Palomares i col. 2006) i en pacients amb retard mental i cariotip normal i (Flint i col.1995; Knight i col. 1997; Fauth i col. 2001).

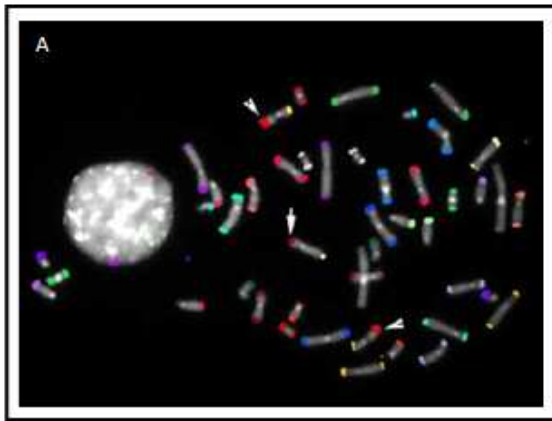


Figura 8. Imatge d'una metafase híbrida amb stM-FISH de dona en què els telòmers de cadascun dels cromosomes són del mateix color excepte el cromosoma X (fletxa) i els cromosomes 11 (caps de fletxa), evidenciant la presència d'una translocació t(X;11)(Fauth i col, 2001).

1.3.1.6. FISH AMB CROMOSOMES ARTIFICIALS DE BACTÈRIES (BACs)

La clonació cel·lular d'ADN - és a dir, l'amplificació selectiva d'una seqüència d'ADN a través d'un sistema cel·lular (bactèries, llevats, cèl·lules eucariotes) - ha revolucionat el món de la biologia, ja que ha permès incrementar moltíssim el coneixement que es tenia de la molècula d'ADN i del genoma. De fet, el *Projecte del Genoma Humà* no hagués estat possible sense el desenvolupament d'aquest sistema de clonació cel·lular.

Aquesta tècnica es va desenvolupar a principis de la dècada dels 70 gràcies al descobriment, d'una banda, dels *plàsmids* - ADN bacterià circular de doble cadena que conté gens de resistència a antibiòtics i que té capacitat de replicar-se independentment del genoma bacterià - i, de l'altra, de les *endonucleases de restricció de tipus II* - enzims bacterians que tallen l'ADN per tots aquells punts que continguin una seqüència de reconeixement específica (Strachan i Read, 2004).

La base d'aquest mecanisme de clonació és construir molècules d'ADN recombinant o *vectors* que continguin la seqüència d'ADN que es vulgui amplificar (el *target* ADN) i introduir-les en una cèl·lula hoste que després és induïda a proliferar, de manera que s'aconsegueix obtenir moltíssimes còpies del *target* ADN (Strachan i Read, 2004). La utilitat que té aquesta tècnica per a la citogenètica molecular és evident, ja que un cop crescuda la colònia de cèl·lules hostes, es pot aïllar el *target* ADN, marcar-lo i utilitzar-lo com a sonda en una FISH convencional.

Existeixen diferents tipus de vectors que s'han anat desenvolupant per permetre la clonació de fragments d'ADN cada vegada més grans. Les característiques essencials que ha de tenir qualsevol vector de clonació (Fig.9) són les següents: *capacitat d'autoreplicació* - ha de contenir un origen de replicació apropiat per a la cèl·lula hoste, algun *mecanisme de selecció* un cop introduït a la cèl·lula hoste -per exemple, un gen de resistència a un antibiòtic determinat- i *punts de restricció* que no estiguin situats ni a l'origen de replicació ni al gen de selecció - per exemple, les seqüències *Polylinker* o *Multiple Cloning Region*.

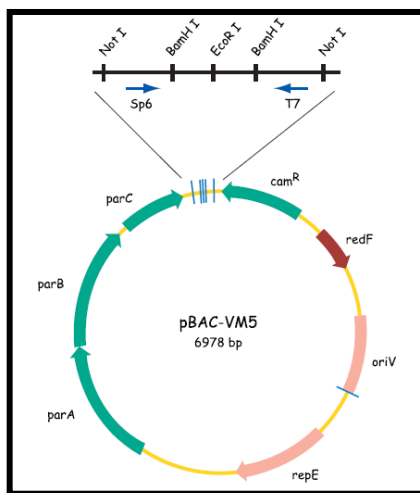


Figura 9. Diagrama d'un vector típic (BAC). Conté un gen de resistència a l'antibiòtic Cloramfenicol (camR), un origen de replicació (oriV), gens essencials per a la replicació (parA, parB, parC, repE, redF) i diferents punts de restricció (Not1, BamH, EcoR9).

Les característiques principals d'alguns dels vectors de clonació desenvolupats fins ara es resumeixen a la Taula 3.

Taula 3. Característiques principals d'alguns vectors de clonació.

<i>Vector</i>	<i>Origen</i>	<i>Mida ADN inserit</i>	<i>Número de còpies/cèl·lula</i>
Plàsmid	bacterià	0-10Kb	0-300
Bacteriòfag λ	viral	9-23Kb	>300
Còsmid	viral+bacterià	30-44Kb	>300
BAC	bacterià	100-300Kb	1-2
PAC	viral+bacterià	130-150Kb	>300
YAC	llevat	0.2-2.0 Mb	1

El principal avantatge de la utilització dels BACs en els experiments de FISH és la seva gran estabilitat; a més, produeixen senyals clars i ben definits en preparacions de cromosomes metafàsics i de nuclis interfàsics (Korenbergi col. 1999). Tenen altres avantatges respecte els YACs: són lliures de quimerisme i no poden coexistir més d'un BAC en una mateixa cèl·lula. Això ha fet que tinguin un ampli ventall d'aplicacions, que s'extén des de la seqüenciació i la construcció del mapa físic dels gens del genoma humà, fins a la identificació de loci i gens individuals responsables de malalties (Borg i col. 2005; Piovani i col. 2006; Pazooki i col. 2007). Darrerament, amb el desenvolupament de la tecnologia dels *BAC microarrays*, s'han publicat diversos estudis en els que s'aplicaven aquestes construccions, ja sigui comprnent tot el genoma (Albertson i col. 2003; Rickman i col. 2006), o comprnent regions específiques (Kok i col. 2005).

1.3.2. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Aquesta tècnica va ser descrita per primera vegada per Schouten i col. l'any 2002 com a alternativa a la FISH, Southern Blot, PCR quantitativa/semiquantitativa i la hibridació Múltiple Amplificable (MAPH, *Multiplex Amplifiable Probe Hybridization*). L'objectiu d'aquesta tècnica és amplificar - per PCR mitjançant encebadors universals - únicament les sondes que s'han unit a la seqüència diana i analitzar posteriorment els resultats per seqüenciació per tal de mesurar el número de còpies d'un gen determinat.

Per a cada regió específica del genoma que es vulgui estudiar per MLPA, es sintetitzen 2 oligonucleòtids: un oligonucleòtid curt i sintètic que anomenarem A i un oligonucleòtid llarg

derivat del fag M13 que anomenarem B. L'oligonucleòtid A consisteix en una seqüència específica de 20-30 nucleòtids de l'ADN diana a estudiar que està flanquejada per una seqüència universal que reconeixerà l'encebador. L'oligonucleòtid B conté, en un extrem, una seqüència de 25-43 nucleòtids específica per una regió adjacent a la que reconeix l'oligonucleòtid A, i a l'altre extrem, una seqüència universal que reconeixerà l'encebador. Aquest darrer oligonucleòtid conté, a més a més, un fragment variable (*Stuffer fragment*) entremig d'aquestes dues seqüències (19-370 nucleòtids) que permetrà generar fragments de mides variables per poder-los separar posteriorment per electroforesi.

Els dos oligonucleòtids s'uneixen de forma adjacent a la seqüència diana i són lligats per l'enzim lligasa, de manera que es genera una sonda contínua flanquejada per seqüències universals que seran reconegudes per encebadors universals i que, per tant, podran ser amplificades per PCR. Si un dels dos oligonucleòtids no pot unir-se a l'ADN diana o no ho fa correctament (com seria el cas si hi hagués una deleció a la seqüència diana), no es generarà aquesta sonda contínua i no hi haurà amplificació. Cada producte d'amplificació tindrà una mida específica i es podrà separar per electroforesi i procedir a la quantificació relativa. La quantitat de producte lligat serà proporcional al número de còpies de la seqüència diana, i analitzant les alçades relatives dels pics obtinguts després de l'amplificació per PCR, es poden detectar deleccions o duplicacions de la seqüència diana (Sellner i Taylor, 2004). A la Figura 10, hi ha esquematitzat el protocol de la MLPA proposat per Sellner i Taylor (2004).

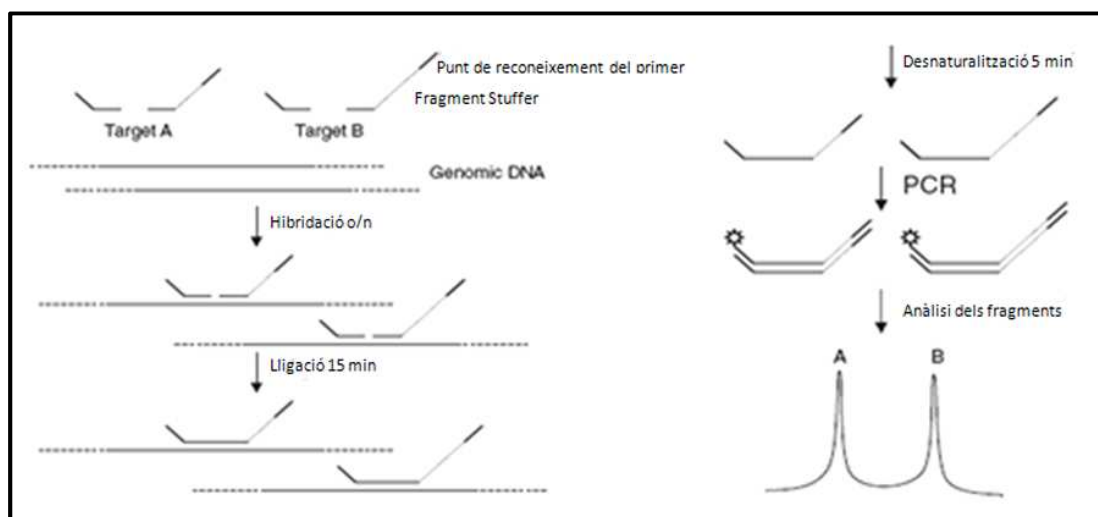


Figura 10. Esquema del protocol de la MLPA (Sellner i Taylor 2004). En primer lloc es produeix la hibridació dels dos oligonucleòtids sintetitzats A i B a la seqüència diana; seguidament l'acció de l'enzim lligasa permet generar sondes contínues flanquejades per seqüències universals que seran reconegudes per encebadors universals i podran ser amplificades per PCR. Finalment, la presència del *Stuffer fragment* permet generar fragments amplificats de mida variable que podran ser separats i analitzats per electroforesi.

INTRODUCCIÓ

Els principals avantatges d'aquesta tècnica són els següents: presenta molt pocs problemes de contaminació (ja que les sondes només es poden amplificar si hi ha hagut lligació), es poden analitzar moltes mostres en un mateix experiment, es necessita poca quantitat d'ADN diana, l'anàlisi és força senzill, és ràpida (en 24h es poden tenir resultats), altament reproducible i de baix cost.

L'alta especificitat de la tècnica (és capaç de diferenciar entre seqüències que varien en un únic nucleòtid) pot comportar errors en l'anàlisi ja que polimorfismes o mutacions en una única base de la seqüència diana poden impedir una correcta hibridació dels oligonucleòtids, impedir-ne l'amplificació, i aparèixer com a delecions (Sellner i Taylor 2004). Així es recomana que totes les delecions de fragments d'ADN detectades per MLPA siguin sempre confirmades per altres mètodes independents com per exemple, FISH. Altres desavantatges són que no detecta reorganitzacions equilibrades i que no es pot analitzar tot el genoma complet.

Actualment existeixen diferents kits comercials de MLPA (MRC-Holland) que permeten estudiar una àmplia varietat de gens i que tenen aplicació des del diagnòstic prenatal i postnatal.

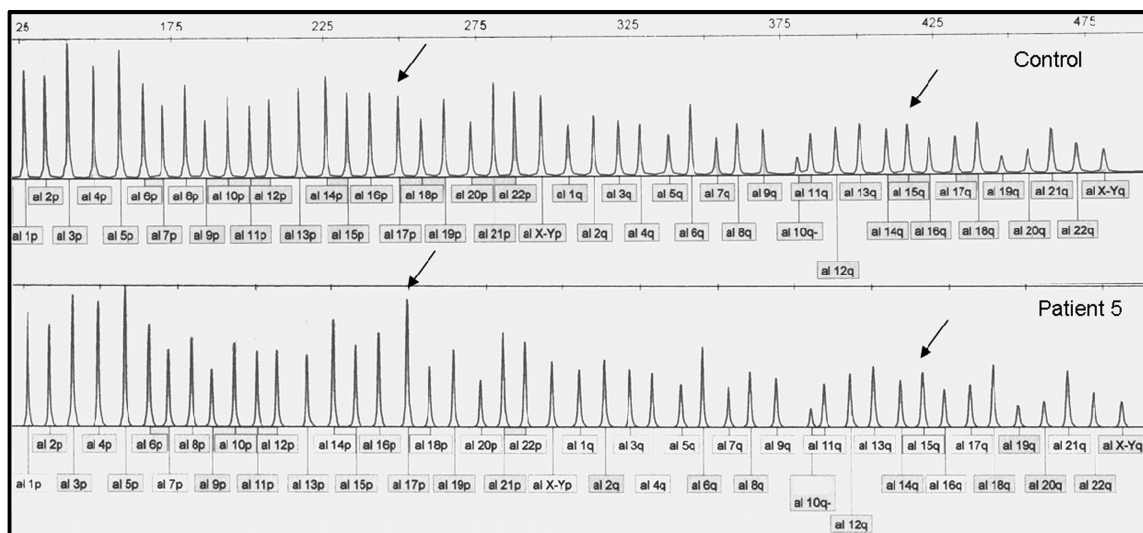


Figura 11. Anàlisi d'alteracions subtelo mèriques emprant el kit de MLPA P036B de MRC-Holland, a partir d'una mostra control i d'un pacient en què s'observa una duplicació de 17psubtel (Palomares, 2006).

1.3.3 PCR QUANTITATIVA FLUORESCENT (QF-PCR)

La PCR quantitativa fluorescent (QF-PCR) va començar a aplicar-se al camp del diagnòstic prenatal a finals de la dècada dels 90 com a alternativa al cultiu d'amniòcits per oferir un diagnòstic ràpid de les aneuploidies més freqüents (Nicolini i col. 2004).

Aquesta tècnica es basa en l'amplificació per PCR de seqüències específiques d'ADN, les STR (*Short Tandem Repeats*). Aquestes seqüències tenen una longitud de només 3-5 nucleòtids, es van repetint al llarg del genoma i presenten un elevat grau de polimorfisme entre individus. S'utilitzen encebadors marcats fluorescentment i els segments amplificats poden ser visualitzats i quantificats com a àrees de pic en seqüenciadors automatitzats. La quantitat de producte amplificat sempre serà proporcional a la quantitat de producte analitzat, de manera que podrem saber el número de cromosomes per cada marcador analitzat (Fig. 12). Els individus heterozigots normals s'espera que presentin dos àrees de pic amb una proporció o ratio 1:1 per cada cromosoma analitzat, mentre que les trisomies es poden presentar amb un pic extra (si són individus tri-al·lèlics) o també amb dos pics però amb una ratio de 2:1 entre les dues àrees (Adinolfi i col.1995; Cirigliano i col. 2006).

Tant la FISH com la QF-PCR ofereixen un resultat entre 24h i 48h, i tot i que es podrien aplicar en la identificació de qualsevol cromosoma, rutinàriament en el diagnòstic prenatal s'utilitzen únicament per a l'anàlisi dels cromosomes sexuals, 13, 18 i 21, ja que aquests cromosomes estan implicats en les aneuploidies més freqüents de la població. Actualment els resultats obtinguts amb aquestes tècniques sempre es consideren preliminars a l'espera del resultat del cariotip de les cèl·lules fetals, ja que són tècniques que no permeten l'anàlisi de tot el genoma complet i no detectarien possibles alteracions presents als cromosomes no analitzats. De tota manera, avui dia està en discussió fins a quin punt o en quins casos es podria prescindir del cariotip d'amniòcits tenint en compte els factors de risc materns, els resultats dels marcadors ecogràfics i bioquímics i els de proves ràpides com la FISH o la QF-PCR (Nicolini i col. 2004; Bocian, 2007).

La QF-PCR presenta alguns avantatges respecte la FISH: requereix molt poc volum de mostra, és una tècnica de baix cost i com que l'anàlisi és automatitzada, es poden analitzar moltes mostres a la vegada i en un espai de temps molt reduït (Nicolini i col. 2004). Els desavantatges principals són els mateixos que la FISH: la dificultat en la interpretació dels resultats si hi ha contaminació materna, la incapacitat de detectar mosaicismes inferiors al 30% i la possibilitat d'anàlisi de només una part del genoma (Cirigliano i col. 2004; 2006).

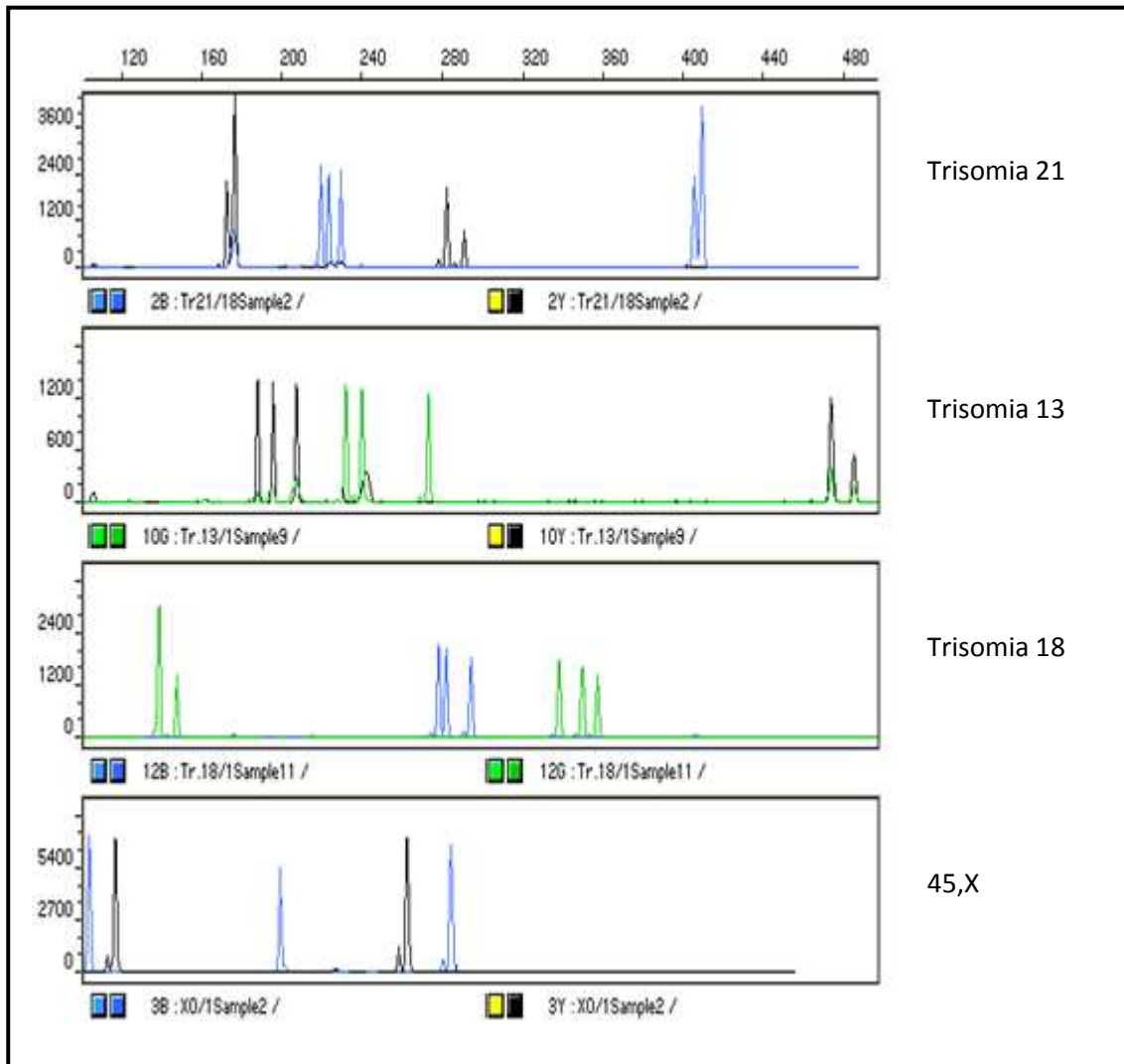


Figura 12 Electroforetogrames de QF-PCR corresponents a diferents mostres amb desequilibris cromosòmics (imatge cedida per Vincenzo Cirigliano).

1.3.4. HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA CONVENCIONAL (CGH) I D'ALTA RESOLUCIÓ (HR-CGH)

La hibridació genòmica comparada, o CGH, va ser descrita l'any 1992 per Kallioniemi i col. i va ser desenvolupada amb l'objectiu d'analitzar, en un únic experiment, el número de còpies de diverses regions del genoma d'una mostra problema en comparació amb les d'una mostra control.

A la CGH, l'ADN genòmic de la mostra problema i el de la mostra control es marquen amb fluorocroms diferents i es fan cohibridar sobre preparacions de cromosomes metafàsics normals, utilitzant ADN COT1 per bloquejar les senyals de les seqüències repetitives de, per exemple, les regions centromèriques. La relació de les intensitats de fluorescència resultant en

una determinada localització del mapa citogenètic serà un indicatiu del número de còpies de l'ADN problema i control en aquell punt concret del cromosoma. El *software* d'anàlisi de CGH presenta aquesta relació d'intensitats de fluorescència com un perfil al costat de cada cromosoma, de manera que es consideren *guanys* totes aquelles desviacions del perfil superiors a 1.25 i *pèrdues* aquelles situades per sota de 0.75 (Fig. 13). Com que les variacions en el nombre de còpies d'ADN són molt comunes en càncer, aquesta tècnica va ser inicialment aplicada en aquest camp per posteriorment estendre's en l'estudi d'anomalies constitucionals.

Els avantatges principals de la tècnica són: en primer lloc, que permet l'anàlisi de tot el genoma sense la necessitat prèvia de conèixer l'anomalia que s'està buscant; en segon lloc, que no requereix tècniques de cultiu cel·lular; en tercer lloc, que només són necessaris entre 200ng i 1µg d'ADN; en quart lloc, que permet l'anàlisi del genoma d'una única cèl·lula si aquest ha estat prèviament amplificat per DOP-PCR i, finalment, que permet l'estudi de mostres tant fresques com parafinades. Per contra, el fet d'utilitzar cromosomes metafàsics en l'anàlisi limita la resolució de la tècnica: anomalies que afectin regions inferiors a 10Mb-20Mb són difícils de detectar.

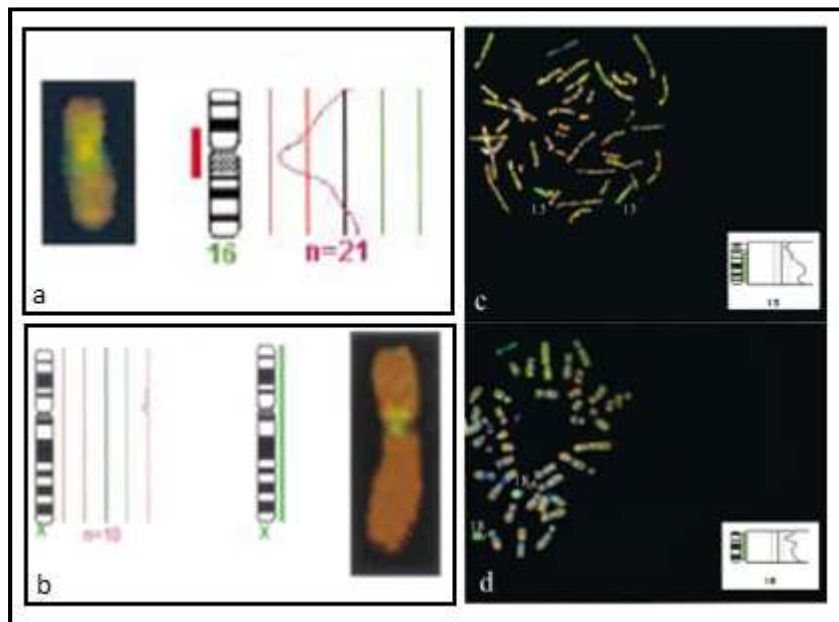


Figura 13. Perfils de CGH. **a)** Pèrdua de la banda 16p11.2 (Hernando i col. 2002), **b)** Guany del cromosoma X (Rigola i col. 2002), **c)** Trisomia 13 i **d)** Trisomia 18 (Lapierre i col. 2000)

El desenvolupament de la CGH d'alta resolució, o HR-CGH, va suposar una millora ja que es va aconseguir augmentar la resolució fins a 3Mb-5Mb (Kirchhoff i col. 1998, 1999). Aquests autors van observar que el perfil de relació de les intensitats de fluorescència de

INTRODUCCIÓ

mostres control es desviaven en determinades regions del genoma cap a valors diferents de "1" sense que hi hagués cap anomalia. Aquest fet els va conduir a elaborar un interval dinàmic de referència estàndard basat en la mitjana de l'anàlisi de 17 CGHs de mostres control. D'aquesta manera, a la HR-CGH es substitueixen els intervals fixos de la CGH convencional per aquests intervals dinàmics de referència estàndard (Fig. 14). Es considera que hi ha un desequilibri al genoma si la mitjana dels perfils obtinguts 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 el desenvolupament de la CGH d'alta resolució a més d'aconseguir augmentar la resolució de l'anàlisi fins a 3Mb, s'evitava excloure regions de l'anàlisi i reduir així els falsos positius (Kirchhoff i col. 1998). En efecte, amb la CGH convencional certes regions del genoma són susceptibles de donar falsos positius pel fet de contenir un elevat número de còpies de seqüències repetitives (com per exemple, les regions centromèriques, telomèriques, els blocs d'heterocromatina dels cromosomes 1, 9 i 16, i els cromosomes 19 i 22).

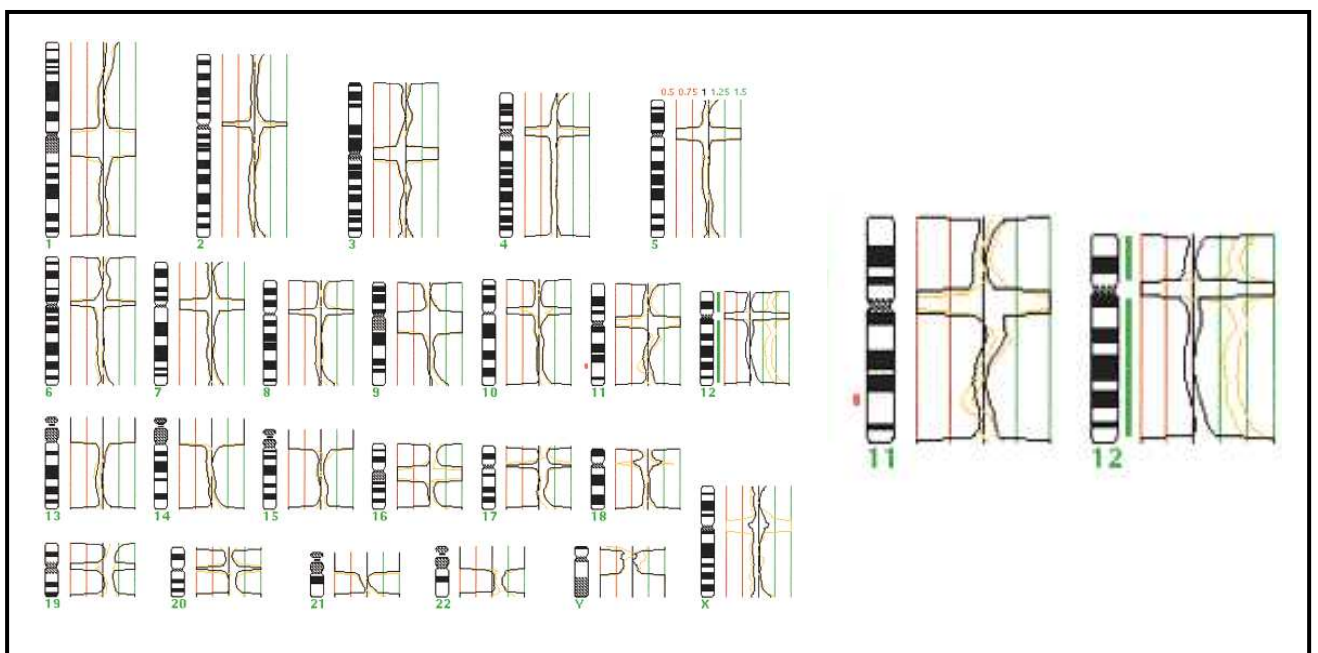


Figura 14. Perfil general obtingut per HR-CGH en què s'observa una deleció intersticial al braç q del cromosoma 11 (11q23.1q23.2) i un guany del cromosoma 12 i detall dels perfils dels cromosomes afectats pels desequilibris (Kirchhoff i col. 1999).

Tant la CGH convencional com la HR-CGH segueixen presentant certs desavantatges: no permeten detectar alteracions cromosòmiques equilibrades ni els nivells de ploïdia, tampoc detecten mosaïcismes inferiors al 20%, la resolució continua essent baixa en certes regions del genoma -com els telòmers- i la localització exacta de l'anomalia no és sempre possible a causa

de la limitació de la resolució en l'espai -longitud variable i estirament no linial dels cromosomes (Shoumans i col. 2004; Kirchhoff i col. 2004).

1.3.5. CGH AMB MICROMATRIUS o ARRAYS DE CGH (aCGH)

Amb l'objectiu d'augmentar la resolució de la CGH i solucionar el problema de la localització exacta de l'anomalia, s'han desenvolupat els arrays de CGH (aCGH). Amb aquesta tècnica, la hibridació de les mostres control i problema es fa no sobre cromosomes metafàsics sinó sobre una matriu de fragments d'ADN clonats (per exemple, BACs). Com a la CGH, la relació de les intensitats de fluorescència de les mostres control i problema a cada diana de la matriu serà un indicatiu del número de còpies d'aquella seqüència en concret, i la resolució serà determinada per la distància entre les seqüències diana en el mapa genòmic o per la longitud dels fragments d'ADN clonats (Pinkel i col. 1998; Schoumans i col. 2005; Erdogan i col. 2007). Amb aquesta tècnica s'aconsegueix una resolució d'entre 45Kb i 1Mb, depenent de la densitat de la matriu. Aquestes matrius poden ser específiques per a un cromosoma concret (Bauters i col. 2005; Benetkiewicz i col. 2006), per a regions del genoma (Kok i col. 2005; de Bustos i col. 2006) o bé per a tot el genoma (Snijders i col. 2001; Vissers i col. 2003; Erdogan i col. 2007).

Des del seu desenvolupament, la tècnica de l'aCGH ha tingut un gran èxit en el diagnòstic clínic, especialment per estudis de malformacions congènites, dismòrfies i retard mental (Shaw-Smith i col. 2004; de Vries i col. 2005). A més, ha permès determinar variacions del número de còpies de seqüències d'ADN (LCVs) en individus sans (de Bustos i col. 2006), cosa que és molt interessant ja que així es poden determinar variacions no patològiques.

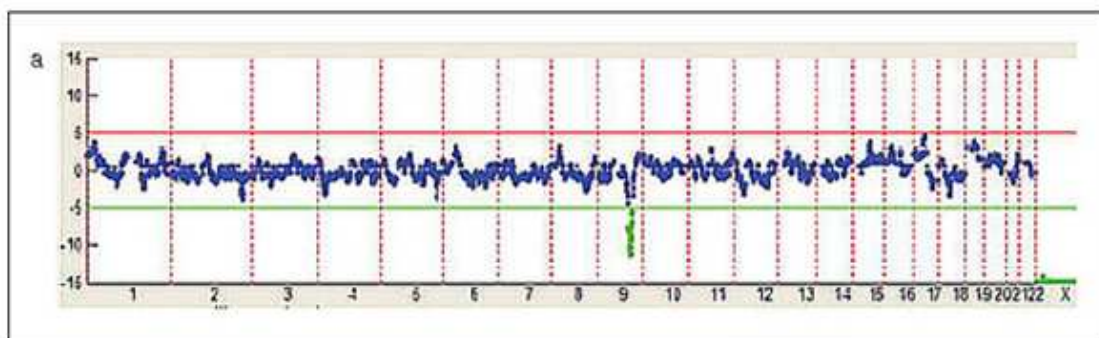


Figura 15. Imatge d'una anàlisi per aCGH de tot el genoma on es detecta una deleción intersticial del cromosoma 9 (Chen i col. 2006a).

1.4. RELACIÓ ENTRE ARQUITECTURA DEL GENOMA HUMÀ I MALFORMACIONS CONGÈNITES

L'arquitectura del genoma presenta determinades regions més susceptibles a trencar-se i/o a originar rearranjaments genòmics que generen delecions, duplicacions i inversions contribuint a l'existència d'una inestabilitat genòmica i a la variabilitat de la genètica humana. Quan aquests trencaments o rearranjaments provoquen una dosi anormal o una desregulació d'un o més gens, és quan apareixen els *desordres genòmics* (Lupski i col. 2005). A diferència de les malalties originades per mutacions gèniques que provoquen un canvi en la seqüència de la proteïna i de la seva funció, el mecanisme de la malaltia deguda als reordenaments genòmics canvia el nombre de còpies dels gens; per tant, en aquests casos el fenotip alterat no és conseqüència d'un canvi en la conformació de la proteïna codificada sinó que és el resultat d'una alteració en la dosi del gen i de la proteïna (Inoue i col. 2002; Lupski i col. 2005).

Hi ha dos tipus d'inestabilitat genòmica: la cromosòmica i la genètica. La primera afecta als cromosomes donant lloc a guanys o pèrdues de cromosomes sencers o de regions cromosòmiques i també, a reorganitzacions. El segon tipus d'inestabilitat s'origina per alteracions puntuals de l'ADN provocant canvis de parells de bases que normalment afecten a regions curtes i repetitives anomenades microsatèl·lits; per això es coneix, també, com inestabilitat de microsatèl·lits. Les cèl·lules amb inestabilitat cromosòmica poden presentar diferents tipus d'anomalies cromosòmiques –veure la Fig. 16- tan equilibrades com desequilibrades (Frohling i Dohner, 2008).

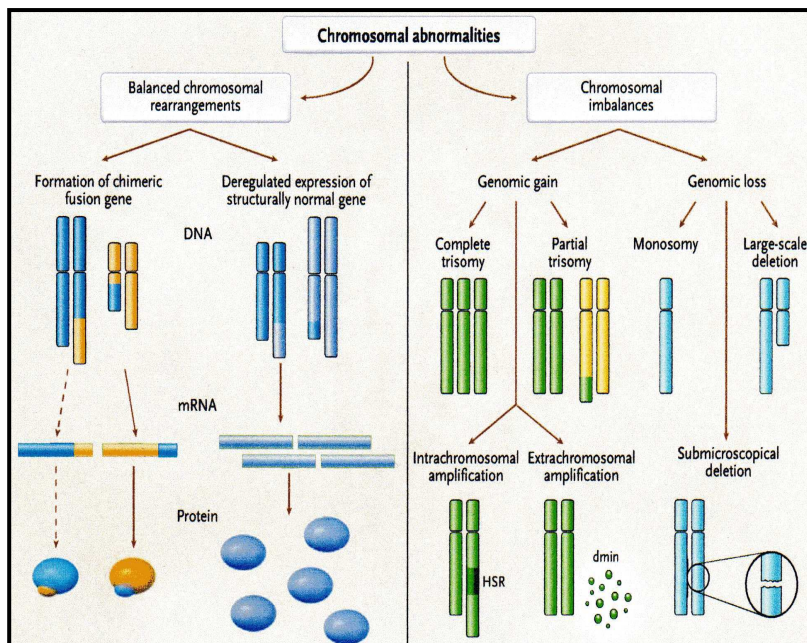


Figura 16. Esquema de com les anomalies cromosòmiques poden originar desordres genòmics. D'una banda, les anomalies cromosòmiques equilibrades poden provocar la formació de gens quimèrics per fusió o bé, provocar un canvi en la regulació de l'expressió d'un gen, generant el desordre genòmic. D'altra banda, els desequilibris cromosòmics poden provocar un guany genòmic (trisomies completes, trisomies parcials, amplificacions intracromosòmiques o extracromosòmiques) o bé, una pèrdua genòmica (monosomies, delecions críptiques o delecions grans), generant en tots els casos, el desordre genòmic (Fröhling i Döhner, 2008).

Entre aquestes regions inestables es troben els llocs fràgils (FS) i les duplicacions segmentàries (duplicons) que es distribueixen de forma no homogènia per tot el genoma i que poden ser veritables punts calents que originen deleccions, duplicacions o disrupcions gèniques degudes a reordenaments genòmics com inversions o translocacions. Recentment, s'han descrit regions genòmiques que variaven en nombre de còpies entre individus sans (Lee i col. 2007); aquestes variacions submicroscòpiques del nombre de còpies s'anomenen CNVs (*Copy Number Variations*) i es creu que també són regions inestables del genoma.

1.4.1. LLOCS FRÀGILS (FS)

Els llocs fràgils (*fragile sites*, FS) són regions específiques del genoma amb una gran predisposició a patir trencaments (Sutherland, 1979; HGM11, 1991). S'expressen com *gaps* o trencaments als cromosomes de cèl·lules que creixen sota condicions especials de cultiu que provoquen una inhibició parcial de la replicació, com poden ser el dèficit d'àcid fòlic o la presència de distamicina A o bromodeoxiuridina, afidicolina o azacitidina al medi de cultiu (Human Genome Database; <http://www.gdb.org>). Els FS rars són presents en una petita part de la població (<5%) mentre que els comuns apareixen a tots els individus, ja que es consideren com a part intrínseca de l'estructura normal del cromosoma. Cadascun d'aquests grups es classifica segons el mecanisme d'inducció emprat per a la seva expressió *in vitro* (Taula 4).

Taula 4. Classificació dels llocs fràgils segons el mecanisme d'inducció emprat per a la seva expressió *in vitro*.

Tipus	Número de loci	Seqüència
FS rars	31	
Sensibles al folat	24	(CGG) _n
Distamicina A	5	repeticions riques en AT
BrdU	2	repeticions riques en AT
FS comuns	87	
Afidicolina	76	rics en AT
BrdU	7	rics en AT
5-Azacitidina	4	?

Fins ara s'han descrit 118 FS al genoma humà: 31 són rars i 87 comuns (Taula 4), dels quals se n'ha caracteritzat molecularment 9 i 15 respectivament (Debacker i Kooy, 2007; Lukusa i Fryns, 2008).

Els FS són regions genòmiques grans de l'ordre de megabases (Freudenreich, 2007). En tots els FS rars hi ha seqüències expandides d'ADN repetitiu que són conseqüència de mutacions dinàmiques en regions polimòrfiques del trinucleòtid CCG repetit o de minisatèl·lits rics en AT, mentre que els comuns s'ha vist que són rics amb seqüències AT no repetitives i que presenten, també, una replicació tardana. Aquesta última característica afecta la dinàmica de replicació i disminueix l'eficiència en l'assemblatge de nucleosomes, originant defectes de condensació que es detecten com a gaps o com a trencaments als cromosomes metafàsics (Wang i col. 1996; Glover, 2006). Els FS són altament inestables i mostren una forta tendència a originar anomalies cromosòmiques estructurals: delecions, translocacions i intercanvis entre cromàtides germanes (Glover i Stein, 1988; Hirsch, 1991; Arlt i col, 2006).

Des d'un punt de vista clínic, el FRAXA (Fig. 17) és el més important ja que es troba associat amb la síndrome de la X fràgil, la forma de retard mental familiar més comuna, afectant al voltant de 1/4000 homes i 1/6000 dones; bàsicament, és conseqüència de l'absència del gen FMR1 a causa d'una hipermetilació (Hanson i col, 1997). El FRAXE està associat a un retard mental no específic lligat al X i el FRA11B amb l'aparició d'alguns casos com la síndrome de *Jacobsen* (Subramanian i col, 1996; Jones i col. 1995). La possible implicació del FRA12A (FS rar) en patologies neuropsiquiàtriques i en desordres del desenvolupament no està confirmada (Debacker i Kooy, 2007). No obstant, s'han trobat coincidències respecte la localització de FS i dels punts de trencament implicats en reorganitzacions cromosòmiques i malformacions congènites; com per exemple el FRA18C sembla estar implicat amb la síndrome de *Beckwith-Wiedemann* (Penny i col 1995; Debacker i Kooy, 2007). Finalment, hi ha evidències molt sòlides que relacionen els FS amb reorganitzacions cromosòmiques, delecions i translocacions presents en càncer, essent els exemples més típics el FRA3B i FRA16D, associats als gens supressors de tumors FHIT i WWOX respectivament (Sutherland i Richards, 1999; Arlt i col, 2006; Lukusa i Fryns, 2008).

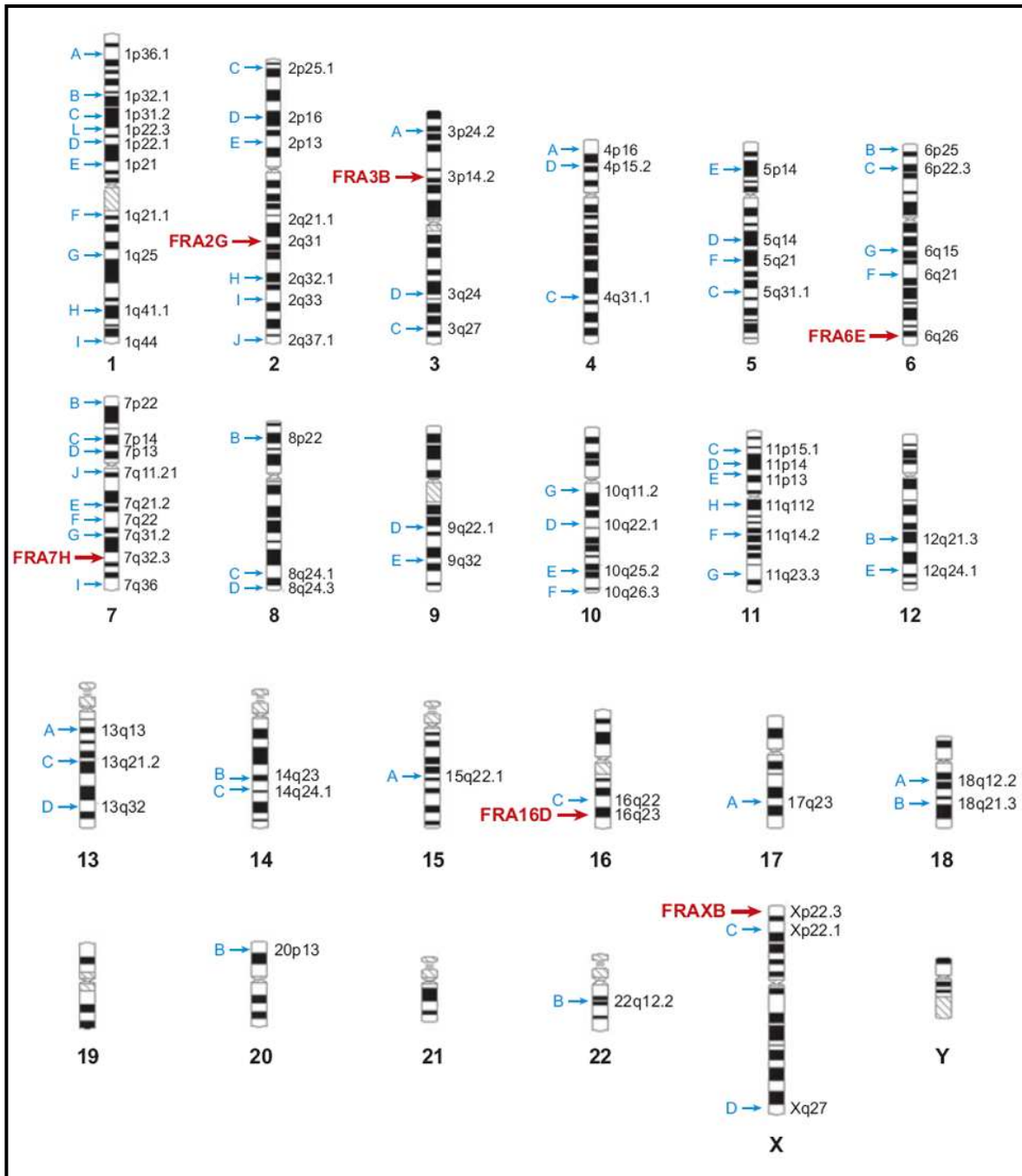


Figura 17. Ideograma dels cromosomes humans amb la localització dels llocs fràgils comuns; els més freqüents estan indicats en vermell i els menys freqüents en blau (Durkin i Glover, 2007).

1.4.2. DUPLICACIONS SEGMENTÀRIES (DSs)

Les duplicacions segmentàries (DSs) -també conegudes com a duplicons i *low-copy repeats* (LCR)- són regions del genoma d'una longitud variable (>5Kb), que comparteixen una alta homologia de seqüència -més d'un 90%- i representen el 5% del genoma humà (Bailey i col, 2008).

Alguns autors han suggerit l'existència d'una associació entre la localització d'aquestes duplicacions segmentàries amb les regions d'inestabilitat cromosòmica implicades en malalties genètiques o en l'evolució d'homínids, ja que un gran nombre de punts de trencament implicats en les reorganitzacions cromosòmiques es troben a l'interior o són molt pròximes a aquestes DSs (Sharp i col. 2005; Bailey i col, 2008).

Les duplicacions segmentàries poden produir-se tant en un mateix cromosoma -DSs intracromosòmiques- com entre cromosomes diferents -DSs intercromosòmiques. En els darrers anys, s'ha relacionat el mecanisme de recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR) entre regions DSs (principalment intracromosòmiques) amb l'aparició d'alteracions cromosòmiques (Inoue i col. 2002; Redon i col 2006). Aquestes regions es poden trobar tant en tàndem com en ordre invertit, i l'elevat grau d'identitat entre seqüències pot afavorir-ne la recombinació homòloga, originant diferents productes de recombinació, ja siguin translocacions, duplicacions, delecions o inversions (Fig. 18).

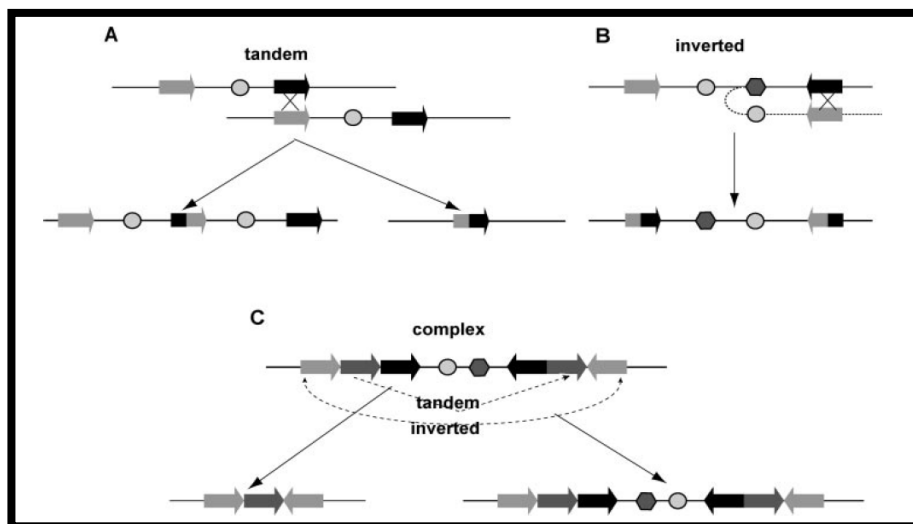


Figura 18. **A.** Recombinació entre dos LCR en tàndem origina duplicacions i delecions recíproques. **B.** Recombinació entre dos LCR invertits dóna lloc a segments invertits, però no es produeix cap canvi en la dosi del segment genòmic. **C.** Seqüències de LCR complexes amb diverses unitats LCR i orientades de diferent manera originen diversos productes de recombinació depenent dels substrats LCR utilitzats per la NAHR: rearranjaments de duplicació/deleción entre LCR en tàndem o rearranjaments d'inversió entre LCR invertits (Inoue i col. 2002).

La identificació d'aquestes DSs ha estat possible gràcies al desenvolupament de tècniques de FISH amb BACs. S'ha descrit fins ara més de 250 DSs (Bailey i col. 2008).

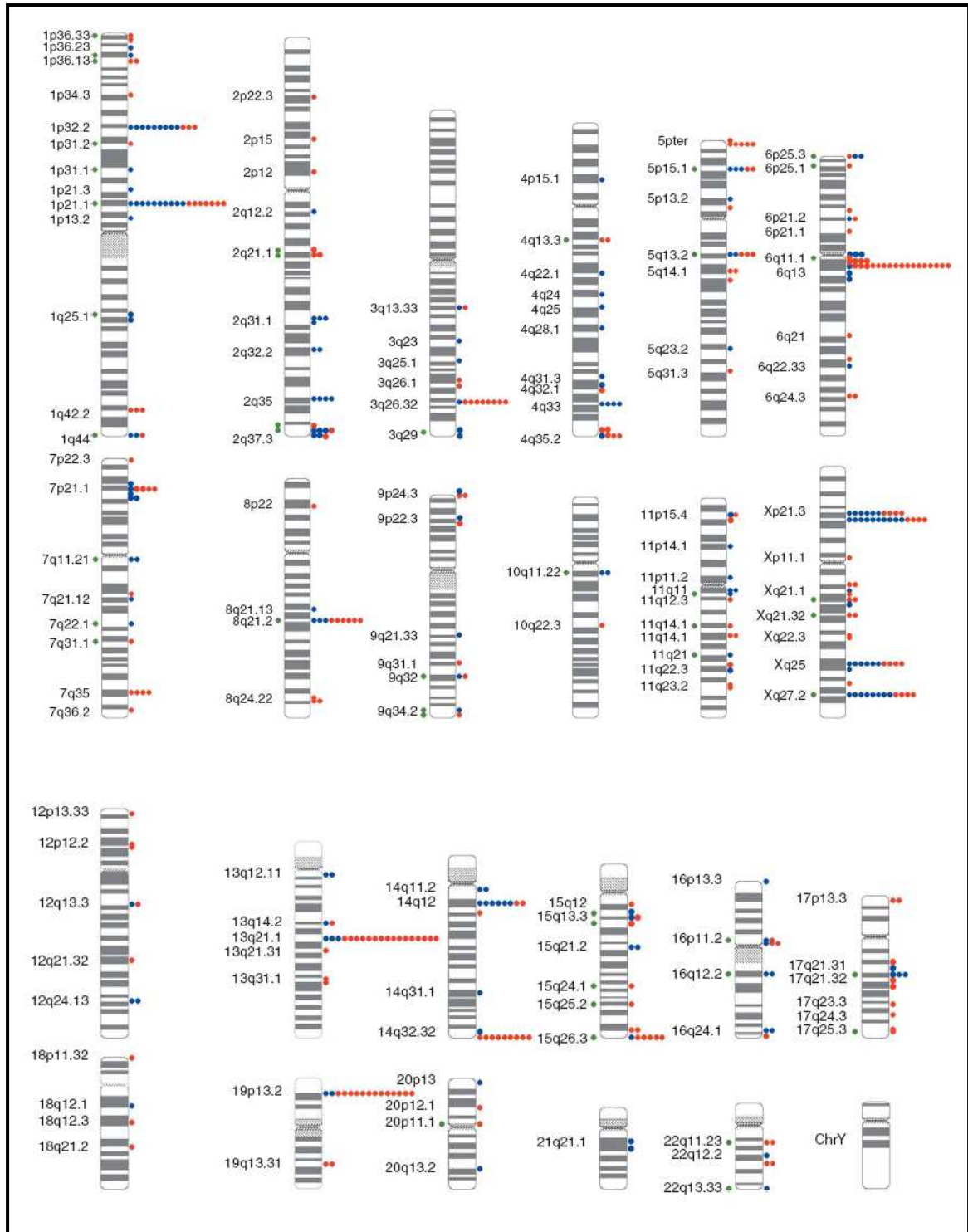


Figura 19. Distribució de regions DSs al llarg del genoma humà Els punts a la dreta dels cromosomes representen el nombre d'individus amb còpies guanyades (blau) o perdudes (vermell) en 39 individus control sans (Iafate i col, 2004).

Tenint en compte la presència de DSs en individus fenotípicament normals, no resulta fàcil establir correlacions entre aquestes duplicacions segmentàries i certes malalties genètiques. Tot i així, és molt probable que en provocar l'anomalia cromosòmica, aquesta produeixi un canvi en l'expressió de gens específics i, d'aquesta manera, originar la patologia o una variació fenotípica subtil. S'ha vist que les DSs són unes deu vegades més freqüents en regions subtelomèriques i pericentromèriques. Recentment, les DSs han estat associades a càncer i a malalties genètiques causades per microdeleccions i/o microduplicacions, com les síndromes *velocardiofacial/DiGeorge*, *Smith-Magenis* i *Prader-Willi/Angelman* (Bailey i col. 2008).

1.4.3. VARIACIONS GENÒMIQUES SUBMICROSCÒPIQUES DEL NOMBRE DE CÒPIES (CNVs)

Fins l'any 2000 aproximadament, es creia que els individus sans compartien un 99.9% del genoma, i que les diferències entre individus eren conseqüència de variacions en parells de bases repartides per tot el genoma (un 0.1%). Quan l'any 2003 es va completar el Projecte del Genoma Humà, es pensava que en conèixer tota la seqüència d'ADN de referència es tenia la seqüència de pràcticament tots els éssers humans; però recentment, l'aplicació de la tecnologia dels arrays de CGH en l'estudi de genomes d'individus sans i no relacionats entre ells, ha evidenciat que el genoma humà és genèticament més variable. En efecte, a més a més dels canvis d'una sola base i dels canvis que inclouen centenars o milers de kb coneguts com SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), s'han detectat centenars de regions genòmiques que varien en el nombre de còpies. Aquestes variacions genòmiques submicroscòpiques del nombre de còpies s'anomenen CNVs (*Copy Number Variations*). La *Wellcome Trust DECHIPER Workshop* celebrada l'any 2005 al Regne Unit va definir els CNVs com a fragments d'ADN de més d'1kb que es troben en un nombre inferior o superior de còpies respecte un ADN de referència i que no han estat generats per la inserció o delecció d'elements transposables (Zahir i col. 2007; Lee i col. 2007).

S'han descrit més de 1500 CNVs; representen un 12% del genoma i inclouen deleccions, insercions i duplicacions amb una freqüència a la població superior al 1% (Sebat i col. 2004; Redon i col. 2006; Lee i col. 2007). Generalment són heretats i s'ha descrit que un 40% dels CNVs heretats es localitzen en regions del genoma en què els gens es troben molt dispersos i, també, que tenen tendència a situar-se fora de les regions més conservades en l'evolució (Edelmann i col. 2009).

Tot i que la presència de variabilitat genòmica ja era coneguda des de fa moltes dècades, els CNVs representen un nou avenç en la comprensió d'aquesta variabilitat i també

de la seva influència en les diferents patologies genètiques. Avui dia, els CNVs constitueixen un repte per als citogenetistes clínics, ja que han de saber distingir entre els CNVs que molt probablement siguin patogènics, dels CNVs amb més probabilitat de ser benignes i dels CNVs dels quals no se'n sap la seva rellevància clínica (Lee i col. 2007). Fins ara, la majoria dels estudis amb aCGH s'ha centrat en la identificació de CNVs que apareixen amb el càncer i en l'estudi dels CNVs constitucionals en pacients amb retard mental idiopàtic (Zahir i col. 2007).

La identificació i caracterització dels CNVs humans és molt important per poder valorar l'impacte clínic de desequilibris genòmics específics. Per detectar i identificar aquestes regions s'apliquen les tècniques de FISH si són superiors a les 40kb, o bé de MLPA, QF-PCR o array de CGH si els desequilibris són inferiors. Les CNVs poden originar patologies: a) en produir disrupció directa d'un o més gens mitjançant reorganitzacions cromosòmiques; b) per l'alteració de la dosi o l'expressió gènica; c) desemmascarar al·lels recessius o polimorfismes funcionals (Feuk i col. 2006).

Per regla general, els CNVs situats en regions crítiques de síndromes de microdeleció o microduplicació conegudes o bé els situats en regions de rellevància clínica significativa –com per exemple, les regions subtelomèriques-, tindran més probabilitats de ser patogènics. Respecte els CNVs que no es troben en cap regió de rellevància clínica, s'ha d'estudiar al seu origen: si són heretats o *de novo*. Els primers acostumen a ser benignes en cas que es localitzin, també, en algun progenitor sa. Els segons, en canvi, són més difícils de diagnosticar; s'han creat moltes bases de dades –com per exemple, la *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER, <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>) en les quals els citogenetistes clínics poden recórrer i buscar-hi casos semblants als seus per poder oferir un consell genètic més acurat. En cas de no trobar cap ajuda en aquestes bases de dades, s'han de tenir en compte factors com el *contingut en gens* –com més ric en gens sigui, major probabilitat de ser patogènic-, la *naturallesa del CNV* –si conté deleccions també tindrà més risc de ser patogènic, ja que la pèrdua de material és menys tolerada en general que el guany- i la *mida del CNV* –com més gran, major risc- per arribar a una conclusió (Lee i col. 2007; Edelman i col. 2009).

A la Figura 20 es mostra la distribució de CNVs a l'ideograma humà.

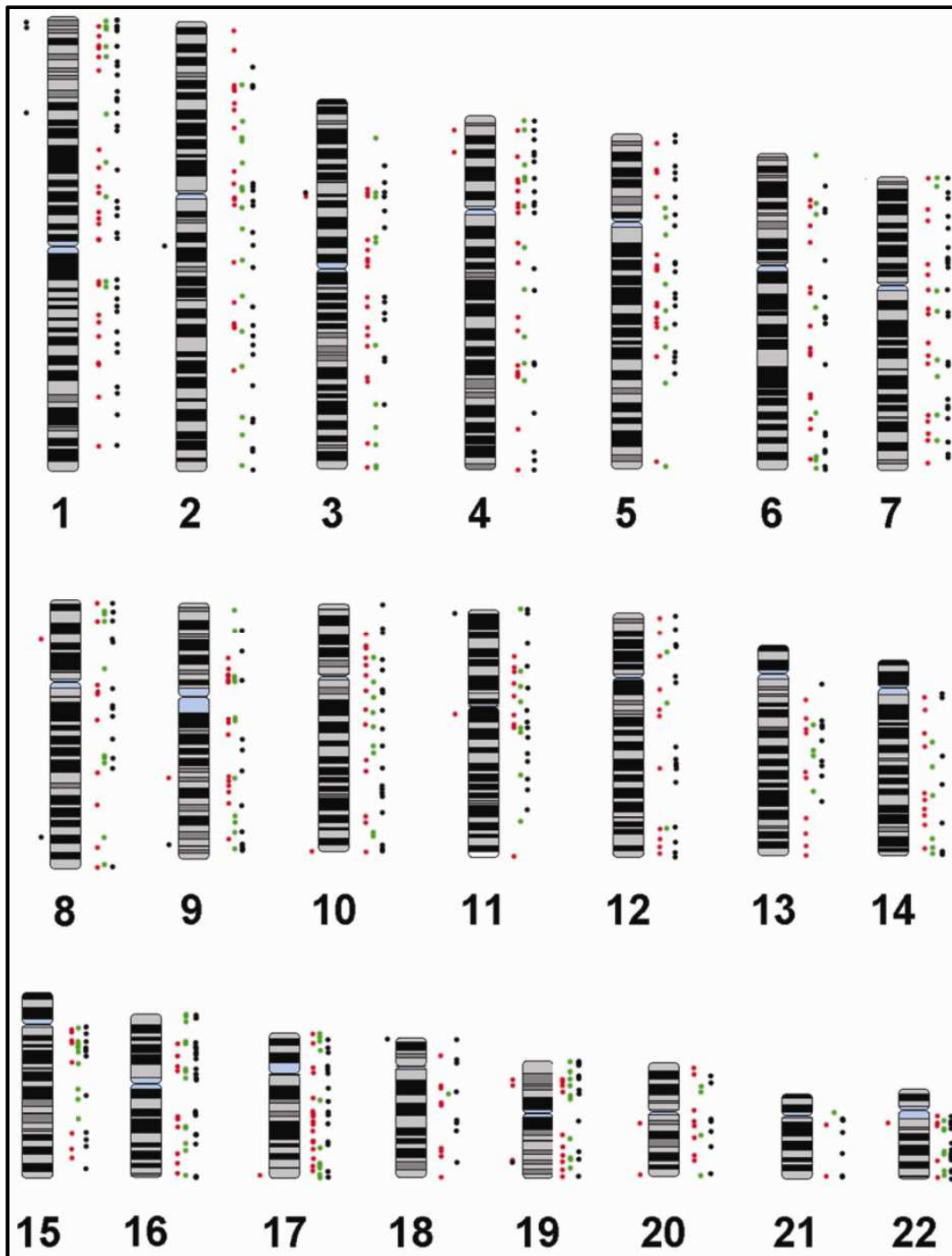


Figura 20. Distribució de regions CNVs . Les CNVs d'alta freqüència es troven a la dreta dels cromosomes: els punts en vermell, verd i negre representen una presència en 3, 4-5 i 6 o més individus, respectivament. Els punts a l'esquerra representen CNVs que se solapen amb microRNAs (vermell) o gens cancerígens (negre) (Wong i col, 2007).

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

L'**objectiu general** d'aquest treball de recerca ha estat la detecció i caracterització més precisa d'alteracions cromosòmiques estructurals constitucionals presents en individus amb malformacions congènites o infertilitat mitjançant tècniques de citogenètica molecular per tal de poder establir correlacions genotip –fenotip més acurades.

Per assolir-lo, s'ha subdividit en d'altres més concrets:

1. Valoració dels avantatges i limitacions d'utilitzar tècniques moleculars com la CGH/HR-CGH i la MLPA per a la detecció d'anomalies estructurals en pacients amb cariotip "aparentment" normal.
2. Detecció de possibles desequilibris cromosòmics crítics en pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques "aparentment" equilibrades
3. Identificació de les regions cromosòmiques i dels punts de trencament implicats en les trisomies i monosomies parcials presents en aquests pacients.
4. Caracterització dels cromosomes marcadors supernumeraris presents en els pacients portadors.
5. Establir correlacions genotip-fenotip comparant les dades obtingudes amb les descrites a la bibliografia.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

Totes les mostres estudiades en aquest treball provenen de: i) pacients amb un cariotip aparentment normal d'acord amb les tècniques de citogenètica convencional i amb quadre clínic compatible amb una alteració cromosòmica, ii) pacients amb un cariotip anormal però que no s'ha pogut caracteritzar del tot mitjançant bandeig cromosòmic.

En aquest estudi han col·laborat diferents serveis de Genètica, públics o privats, que es detallen a la Taula 5.

Taula 5. Procedència de les mostres.

<i>Clínica Girona, Girona</i>
<i>Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell</i>
<i>Hospital de Cruces, Vizcaya</i>
<i>Hospital de la Ribera, Valencia</i>
<i>Hospital de Maternitat del Clínic, Barcelona</i>
<i>Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona</i>
<i>Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona</i>
<i>Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia</i>
<i>Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla</i>
<i>Hospital Virgen de las Nieves, Granada</i>
<i>Laboratori d'Anàlisis Clíniques CERBA, Sabadell</i>
<i>Laboratori d'Anàlisis Clíniques mdb, Barcelona</i>
<i>Laboratori General Lab, Barcelona</i>

En aquest estudi s'ha analitzat bàsicament dos tipus de teixit: sang perifèrica (SP, 136 casos) i líquid amniòtic (LA, 10 casos).

3.1.1. Classificació dels pacients segons el cariotip/clínica.

En total s'ha analitzat 146 casos. Els pacients s'han agrupat en cinc grups d'acord amb el cariotip i/o la clínica que presentaven:

Grup A: pacients amb cariotip “aparentment” normal i quadre clínic (90 casos)

Grup B: pacients barons 46,XX (8 casos)

Grup C: pacients amb anomalia cromosòmica “aparentment” equilibrada (10 casos)

Grup D: pacients amb trisomies o monosomies parcials (18 casos)

Grup E: pacients amb cromosomes marcadors supernumeraris (19 casos)

GRUP A: PACIENTS AMB CARIOTIP “APARENTMENT” NORMAL I QUADRE CLÍNIC

CAS	CARIOTIP	SEXE/EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
1 (A-1)	46,XY	M/?	Trets dismòrfics	SP
2 (A-3)	46,XY	M/23a	Retard mental, trets dismòrfics	SP
3 (A-4)	46,XX	F/8a	Retard mental, microcefàlia i trets dismòrfics	SP
4 (A-5)	46,XX	F/19m	Retard psicomotor i de creixement, microcefàlia, trets dismòrfics i cardiopatia congènita	SP
5 (A-6)	46,XY	M/12a	Trets dismòrfics, estereotípies, clinodactília i retard maduratiu	SP
6 (A-7)	46,XX	F/16a	Trets dismòrfics	SP
7 (A-8)	46,XY	M/13a	Discret retard psicomotor, dolicocefàlia, alçada baixa i trets dismòrfics	SP
8 (A-10)	46,XX	F/6a	Retard maduratiu, alçada baixa i trets dismòrfics	SP
9 (A-11)	46,XY	M/f	Fetus avortat amb reducció extremitats superiors, microfetàlmia, atrèsia coanes, agenèsia renal i de cos callós i anomalies genitals.	LA
10 (A-12)	46,XY	M/3a	Macrocefàlia i trets dismòrfics	SP
11 (A-16)	46,XY	M/3.5a	Anomalies congènites múltiples i retard psicomotor	SP

CAS	CARIOTIP	SEXE/EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
12 (A-17)	46,XY	M/8.5a	Encefalopatia no progressiva, epilèpsia mioclònica i síndrome dismòrfica	SP
13 (A-18)	46,XY	M/3a	Trets dismòrfics diversos	SP
14 (A-19)	46,XY	M/5.5a	*	SP
15 (A-20)	46,XY	M/9a	*	SP
16 (A-21)	46,XX	F/?	Retard mental	SP
17 (A-22)	46,XY	M/?	Retard mental	SP
18 (A-23)	46,XY	M/?	Trets dismòrfics	SP
19 (A-24)	46,XX	F/?	Trets dismòrfics	SP
20 (A-25)	46,XY	M/?	Trets dismòrfics	SP
21 (A-26)	46,XY	M/?	Trets dismòrfics	SP
22 (A-27)	46,XX	F/?	Trets dismòrfics	SP
23 (A-31)	46,XX	F/3a	Microcefàlia i trets dismòrfics	SP
24 (A-32)	46,XY	M/?	Microcefàlia i retard mental	SP
25 (A-33)	46,XY	M/?	Trets dismòrfics	SP
26 (A-35)	46,XX	F/7a	Retard mental sever i trets dismòrfics	SP
27 (A-36)	46,XX	F/6m	Retard mental sever, trets dismòrfics i miocardiopatia espongiforme	SP
28 (A-40)	46,XY	M/?	Retard mental greu i dismòrfies múltiples	SP
29 (A-41)	46,XX	F/?	Retard mental, coloboma d'iris, retina unilateral i afectació renal del mateix costat	SP
30 (A-48)	46,XX	F/19m	Fenotip similar a la síndrome de Kabuki	SP

MATERIAL I MÈTODES

CAS	CARIOTIP	SEXE/EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
31 (A-51)	46,XX	F/11a	Retard mental, trastorns de comportament i trets dismòrfics	SP
32 (A-52)	46,XX	F/5a	Retard mental, trets dismòrfics, crisis convulsives, nistagmus, fotofòbia, estrabisme i no camina ni parla	SP
33 (A-53)	46,XX	F/f mort	*	SP
34 (A-59)	46,XX	F/19a	Trets dismòrfics i retard mental que recorden a la síndrome de Rubinstein-Taiby	SP
35 (A-62)	46,XY	M/5a	Trets dismòrfics, retard mental, síndrome Dandy-Walker, alteració cardíaca i hipoplàsia ocular unilateral	SP
36 (A-67)	46,XX	F/9a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
37 (A-68)	46,XY	M/?	Retard mental	SP
38 (A-71)	46,XX	F/6a	Dismòrfies i retard mental	SP
39 (A-73)	46,XY	M/9a	Trets dismòrfics	SP
40 (A-94)	46,XX,14ps+	F/?	Retard mental, dismòrfies i distonia (exclosa síndrome d'Angelman i Rett)	SP
41 (A-95)	46,XX	F/9a	Retard mental greu i síndrome polimalformativa	SP
42 (A-97)	46,XX	F/?	Trets dismòrfics, retard mental i malformacions congènites	SP
43 (A-99)	46,XX,21ps+	F/8a	Trets dismòrfics i retard mental	SP
44 (A-101)	46,XY	M/2a	Retard psicomotor i trets dismòrfics	SP
45 (A-102)	46,XY	M/6a	Trastorn específic de l'àrea del llenguatge i hipospàdies	SP
46 (A-104)	46,XX	F/13m	Trets dismòrfics que recorden a la síndrome de Dubowitz i retard de creixement	SP
47 (A-141)	46,XY	M/12a	Retard mental i trets dismòrfics amb alteracions de caràcter	SP
48 (A-142)	46,XX	F/8a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
49 (A-143)	46,XX	F/5a	Trets dismòrfics	SP

CAS	CARIOTIP	SEXE/EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
50 (A-144)	46,XY	M/3a	Hipoplàsia associada a anomalies facials	SP
51 (A-145)	46,XX	F/5a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
52 (A-146)	46,XY	M/6a	Retard mental i malformacions congènites	SP
53 (A-150)	46,XY	M/?	Gastrosquisis, hipospàdies	SP
54 (A-151)	46,XY	M/?	Gastrosquisis, hipospàdies	SP
55 (A-153)	46,XY	M/1a	Retard de creixement, dismòrfies i alteracions congènites	SP
56 (A-154)	46,XX	F/18a	Retard mental, dismòrfies i malformacions congènites	SP
57 (A-155)	46,XY	M/11a	Retard mental i alteracions en caminar	SP
58 (A-156)	46,XX	F/10a	Retard mental i trets dismòrfics que recorden a la síndrome Treacher-Collins	SP
59 (A-157)	46,XX	M/?	Trets dismòrfics facials, megacefàlia, retard mental i peu bot esquerre	SP
60 (A-161)	46,XY	M/?	*	SP
61 (A-166)	46,XX	F/?	Trets dismòrfics	SP
62 (A-167)	46,XY	M/?	Gastrosquisis, hipospàdies	SP
63 (A-168)	46,XY	M/?	Gastrosquisis, hipospàdies	SP
64 (A-169)	46,XY	M/17a	Malformacions congènites i trets dismòrfics greus	SP
65 (A-170)	46,XX	F/7a	Malformacions congènites greus	SP
66 (A-173)	46,XX	F/11a	Fenotip similar a la síndrome de Kabuki	SP
67 (A-174)	46,XY	M/10a	Retard mental greu i trets dismòrfics	SP
68 (A-175)	46,XY	M/13a	Trets dismòrfics i retard psicomotor	SP
69 (A-176)	46,XY	M/2a	*	SP

MATERIAL I MÈTODES

CAS	CARIOTIP	SEXE/EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
70 (A-177)	46,XX	F/16a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
71 (A-179)	46,XX	F/8m	Gastrosquisis, hipospàdies	SP
72 (A-182)	46,XY	M/1a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
73 (A-183)	46,XY	M/7a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
74 (A-184)	46,XX	F/10a	Trets dismòrfics, hipertelorisme, arrel nasal ampla i retard mental lleu	SP
75 (A-186)	46,XX	F/1a	Trets dismòrfics, alteració cardíaca, antecedents familiars d'avorts de repetició i germà amb hèrnia diafragmàtica	SP
76 (A-187)	46,XX	F/?	Alteracions severes als arcs branquials	SP
77 (A-188)	46,XX	F/6m	Trets dismòrfics i malformacions congènites	SP
78 (A-189)	46,XY	M/13a	Alteracions suggeridores de la síndrome de Cohen	SP
79 (A-190)	46,XY	M/?	Retard mental, gastrosquisis i hipospàdies	SP
80 (A-191)	46,XX	F/?	Gastrosquisis, hipospàdies	SP
81 (A-192)	46,XX	F/19a	Trets dismòrfics	SP
82 (A-193)	46,XX	F/7a	Trets dismòrfics	SP
83 (A-194)	46,XY	M/12a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
84 (A-195)	46,XY	M/15a	Retard mental i trets dismòrfics	SP
85 (A-196)	46,XY	M/4a	Retard mental inespecífic i dismòrfies lleus	SP
86 (A-198)	46,XY	M/2a	Retard mental, gastrosquisis i hipospàdies	SP
87 (A-199)	46,XY	M/9a	Desconeguda	SP
88 (A-200)	46,XY	M/5a	Desconeguda	SP

CAS	CARIOTIP	SEXE/EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
89 (A-202)	46,XY	M/?	Desconeguda	SP
90 (A-204)	46,XY	M/?	Desconeguda	SP

Abreujacions: M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; m, mesos; f, fetus; SP, sang perifèrica; LA, líquid amniòtic; *, descripció clínica més detallada a peu de taula.

***14 (A-19):** Pacient amb fenotip amb sospita de la síndrome de *Costello*. Presenta megacefàlia relativa, fàcies triangular, pavellons auriculars grans i displàsics (absència de lòbuls), front prominent, llavis gruixuts, macrostomia i lleuger prognatisme. Clinodactília bilateral del 5è dit, pell redundant al dors de les mans i augment de teixit subcutani a les palmes i plantes dels peus. Estudi del X fràgil normal.

***15 (A-20):** Pacient amb trets dismòrfics diversos. Baixa implantació dels cabells, pont nasal elevat, blefarofimosi, microrretrognatia, llavis fins, orelles també de baixa implantació, narius antevertits, penis hipoplàssic, clinodactília del 5è dit de les mans, baixa implantació dels polzes i plecs planars anòmals. Sindactília cutània del 2on i 3er dits dels peus.

***33 (A-53):** Fetus mort. Trets dismòrfics, hipoplàsia malar, cara triangular, blefarofimosi, hipertelorisme, pavellons auriculars de baixa implantació, fàcies neuromiopàtica, artrogriposi de genolls, peus i canells, aracnodactília amb desviació cubital del 3er i 5è dits de les dues mans. No presenta obertura ocular, té un escàs desenvolupament muscular i presenta una atròfia cerebral important. L'estudi genètic de la distròfia miotònica de Steinert ha donat negatiu.

***60 (A-161):** Pacient amb un fenotip amb sospita de la síndrome de *Floating-Harbour*. Fàcies triangular, celles espesses i superficials, pestanyes llargues, arrel nasal alta, ptosis palpebral lleu, narius lleugerament antevertits, llavis fins, macrostomia, hipoplàsia maxil·lar, lleu prognatisme i orelles baixes i displàsiques. Solc simiesc. A la mà dreta, baixa implantació del 1er dit i clinodactília del 5è dit de les mans, dents cariades i mal implantades, hirsutisme i ungles hipertròfiques als peus.

***69 (A-176):** Pacient amb diabetis neonatal transitòria, hipospàdia perineal, sospita de glaucoma congènit no confirmat, camina amb ajuda i es manté assegut. Menja molt malament i li costa augmentar de pes, cosa que provoca que s'hagi d'alimentar per sonda nasogàstrica. Microsoma, nas una mica de pera, genitals una mica ambigus i comissures labials cap avall.

GRUP B: PACIENTS BARONS 46,XX

CAS	CARIOTIP	SEXE/EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
91 (A-197)	Baró 46,XX	M/37a	Síndrome de Opitz-Trías, esterilitat	SP
92 (MS-184)	Baró 46,XX	M/34a	Esterilitat, azoospermia	SP
93 (10)	Baró 46,XX	M/?	Hipogonadisme, atròfia testicular, azoospermia	SP
94 (1041)	Baró 46,XX	M/?	Esterilitat, hipogonadisme, atròfia testicular, azoospermia	SP
95 (1155)	Baró 46,XX	M/?	Atròfia testicular, azoospermia	SP
96 (1389)	Baró 46,XX	M/?	Atròfia testicular, azoospermia, obesitat, ginecomàstia	SP
97 (3607)	Baró 46,XX	M/?	Azoospermia	SP
98 (9805-493)	Baró 46,XX	M/33a	Esterilitat, azoospermia	SP

Abreviacions: M, sexe masculí; a, anys; SP, sang perifèrica.

GRUP C: PACIENTS AMB ANOMALIA CROMOSÒMICA “APARENTMENT” EQUILIBRADA

CAS	CARIOTIP	ORIGEN	SEXE/ EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
99(A-30)	46,XX,inv(9)(p12q13)	dn	F/8a	Múltiples angiomes plans i cavernosos als membres inferiors	SP
100 (A-42)	46,XX,t(1;21)(p21;q11.1)	dn	F/f	Fetus amb una translocació <i>de novo</i> . Diagnòstic prenatal a causa de progenitor amb anomalia cromosòmica. La mare té el cariotip: 46,XX,t(2;14)(q33;q12) i el pare és 46,XY	LA
101 (A-44)	46, XX,t(10;15),(q25.3;q14)	?	F/?	Fenotip normal. Gestant del cas 131 (A-45).	SP
102 (A-46)	46, XX,t(11;15),(p12;q13)	?	F/?	Fenotip normal. Va tenir un abort intrauterí d'un fetus de 21s per malformacions congènites múltiples	SP
103 (A-49)	46,XX,der(7) inv(7)(p13q22), t(2;7)(q21;p13)	dn	F/f	Angoixa materna. Antecedents familiars de retard mental	LA

CAS	CARIOTIP	ORIGEN	SEXE/ EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
104 (A-79)	46, XX,inv(7)(q11.2q22)	pat	F/3a	Alçada baixa	SP
105 (A-92)	46, XY,t(16;19)(q13;q13.4)	dn	M/5a	Microcefàlia tipus II i retard mental lleu	SP
106 (A-100)	46, XY,t(5;18)(q13;q11.2)	dn	M/2a	Trets dismòrfics	SP
107 (A-148)	46,XX,inv(19)(p13.3q13.3)	?	F/?	Fenotip normal. Mare del cas 123 (A-147)	SP
108 (A-163)	46,XX,RCC	dn	F/?	Avortaments de repetició	SP

Abreujacions: dn, de novo; pat, origen patern; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; f, fetus; SP, sang perifèrica; LA, líquid amniòtic.

GRUP D: PACIENTS AMB TRISOMIES O MONOSOMIES PARCIALS

CAS	CARIOTIP	ORIGEN	SEXE/ EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE DE MOSTRA
109 (A-9)	46,XY del(2)(q33q34)	dn	M/10a	Retard mental sever	SP
110 (A-15)	46, XX, der(5)invdup	dn	F/3m (morta)	*	SP
111 (A-29)	46,XX,add(3)(p?)	dn	F/8a	Retard mental sever i trets dismòrfics	SP
112 (A-38)	46,XY,r(18)	dn	M/3a	Trets dismòrfics	SP
113 (A-43)	46,XY,add(18)	dn	M/3a	Trets dismòrfics	SP
114 (A-47)	46,XY,invdup(8)(p12p22)	?	M/?	Retard mental sever i trets dismòrfics	SP
115 (A-61)	46, XX, add(17)(p13)	dn	F/3a	Trets dismòrfics i retard psicomotor	SP
116 (A-75)	46, XX, add(9)(q34.3)	dn	F/3a	Trets dismòrfics	SP
117 (A-76)	46,XX,del(11)(q23q25)	?	F/?	Trets dismòrfics	SP
118 (A-80)	46,XY,add(8)	?	M/?	Malformacions congènites i retard mental	SP
119 (A-93)	46, XY, add(11)(q24.1)	dn	M/8a	Retard mental associat a malformacions oculars i facials	SP

CAS	CARIOTIP	ORIGEN	SEXE/ EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
120(A-96)	46,XX,del(10)(q25.2q26)	dn	F/12a	Síndrome dismòrfica, retard mental i absència d'úter	SP
121 (A-98)	46,XX,del(15)(q)	dn	F/6a	Retard mental, trets dismòrfics i l'estudi d'Angelman negatiu	SP
122 (A-103)	46,XY,dup(10)	?	M/?	Sospita de síndrome de microdeleció	SP
123 (A-147)	46,XY,der(19)	mat	M/?	*	SP
124 (A-159)	46, XX,del(8)(p23.1p23.1)	?	F/?	Trets dismòrfics	SP
125 (M71)	46,XX,r(15)(p11q26)	dn	F/18m	*	SP
126 (M74)	46,XX,r(15)(p11q26)	dn	F/13a	*	SP

Abreviacions: dn, de novo; mat, matern; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; m, mesos; SP, sang perifèrica; *, descripció clínica més detallada al peu de taula.

***110 (A-15):** La pacient era la primera filla d'una dona de 34 anys i d'un home de 38 no consanguini. La mare va tenir un avort espontani previ i prenia tiroxina per un hipotiroïdisme autoimmune diagnosticat anys enrere. L'història familiar no era rellevant i no hi va haver cap exposició teratogènica coneguda durant l'embaràs. Aquest es va complicar durant les dues últimes setmanes a causa d'una hipertensió i retard de creixement intrauterí. El part va tenir lloc per cesària a les 39 setmanes de gestació. El pes en néixer va ser de 2.400kg (<3er percentil); la llargada va ser de 44.5cm (<3er percentil) i el OFC de 33.5cm (25è percentil). La puntuació Apgar va ser de 5 i 9 als minuts 1 i 5 respectivament. L'examen físic va demostrar fissures palpebrals horitzontals i estretes, hipertelorisme, pont nasal deprimit, nas curt, narius antevertides, micrognàtia, orelles de baixa implantació, anus anterior, hipotonia generalitzada molt marcada, crit de miol de gat, hipoplàsia dels músculs abdominals, aracnodactília i plec palmar únic i unilateral. La ressonància magnètica del cervell va demostrar la presència de ventriculomegàlia i hipoplàsia del cos callós i del cerebel. Cor triatrium i hipoplàsia de pulmó dret identificada per ecocardiograma i cateterisme cardíac. El pacient va haver de ser intubat per alimentar-lo a causa de les dificultats que tenia per mamar i empassar. Al primer mes de vida, va haver de ser connectat a la ventilació mecànica a causa d'una infecció pulmonar severa; va morir dos mesos després sense haver pogut abandonar la unitat de cures intensives.

***123 (A-147):** El pacient era el segon fill d'un matrimoni jove no consanguini. No hi havia història familiar d'anomalies congènites o d'avortaments. Durant la gestació, es va detectar per ecografia un retard de creixement intrauterí. El pacient va néixer a les 39 setmanes de gestació amb un pes de 2.350kg (<3er percentil) i el OFC de 32cm (2on percentil). Presentava també trets facials dismòrfics i criptorquidisme esquerre. Als 2.5 mesos de vida, va ser ingressat a l'hospital per problemes cardíacs i en aquell moment presentava els cabells bastos, el front prominent, les orelles de baixa implantació, les celles espesses, hipertelorisme, estrabisme dret, pont nasal ample, filtrum prominent i curt, llavis prims, coll curt, caixa toràcica ampla, taquipnea i clinodactília lleu. Presentava també un defecte al septe ventricular que va ser reparat amb cirurgia. La ressonància magnètica del cervell va detectar hipoplàsia del cos callós i una lleugera atròfia cortical. El seu desenvolupament psicomotor era retardat: als 16 mesos s'asseia i als 3 anys començava a caminar. Als 4 anys, presentava un comportament autista sense llenguatge verbal. La mare (cas 107 (A-148), grup C) presenta fenotip normal i és portadora d'una inversió pericèntrica del cromosoma 19.

***125 (M71):** Nadó de 18 mesos que durant la gestació va patir un retard de creixement intrauterí i, en néixer, tenia problemes respiratoris greus, la falange distal del polze dret era bífida, displàsia del maluc i icterícia patològica. També presentava trets dismòrfics lleus, com micrognàtia, fàcies triangular i cabells amb metxes. A l'any i mig de vida, s'evidencia un retard del creixement però el desenvolupament neurològic és normal.

***126 (M74):** Pacient de 13 anys d'edat afectat d'un nanisme congènit aparent. En néixer ja tenia un pes baix i durant la infància ha tingut problemes d'alimentació, d'alçada baixa i un retard psicomotor sever. El seu coeficient intel·lectual és de 46 i el seu llenguatge és molt limitat. Té les extremitats del costat dret més curtes, coixeja en caminar i té problemes de mobilitat a la mà dreta. Presenta també trets dismòrfics lleus: micrognàtia, orelles prominents i fàcies triangular.

GRUP E: PACIENTS AMB CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS

CAS	CARIOTIP	ORIGEN	SEXE/ EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
128 (A-28)	47,XX,+mar[100%]	dn	F/f	Diagnòstic prenatal per angoixa materna	LA
129 (A-34)	47,XY,+mar[100%]	dn	M/9a	*	SP
130 (A-37)	47,XX,+mar[100%]	dn	F/?	Retard mental lleu	SP
131 (A-45)	47,XX,+der(15)	mat	F/f	*	SP

MATERIAL I MÈTODES

CAS	CARIOTIP	ORIGEN	SEXE/ EDAT	INDICACIÓ DIAGNÒSTICA	TIPUS DE MOSTRA
132 (A-50)	47,XY,+mar[84]/46,XY[16]	dn	M/16a	*	SP
133 (A-60)	47,XX,+mar[100%]	dn	F/f	Diagnòstic prenatal per angoixa materna	LA
134 (A-64)	47,XX,+mar[100%]	? (adoptada)	F/7a	Retard psicomotor i displàsia ectodèrmica	SP
135 (A-78)	47, XX,+mar[100%]	dn	F/?	Trets dismòrfics, sordesa i microftàlmia	SP
136 (A-106)	47,XY,+mar[7]/46,XY[93]	dn	M/f	Diagnòstic prenatal per angoixa materna	LA
137 (A-158)	47,XY, +mar/ 48,XY,+mar1,+mar2/ 46,XY	?	M/?	Trets dismòrfics	SP
138 (A-165)	47, XX,+mar[100%]	dn	F/?	Trets dismòrfics	SP
139 (A-178)	47, XY,+mar[100%]	dn	M/f	Diagnòstic prenatal per angoixa materna	LA
140 (07LA494)	47,XX,+mar[100%]	mat	F/f	Diagnòstic prenatal per angoixa materna	LA
141 (07LA717)	47,XY,+mar[78]/46,XY[22]	dn	M/f	Diagnòstic prenatal per angoixa materna	LA
142 (M13)	47,XX,+mar [100%]	?	F/?	Fenotip normal Mare del cas M14	SP
143 (M14)	48,XY,+2mar[100%]	mat	M/?	Oligozoospermia	SP
144 (M20)	47, XY,+mar[100%]	dn	M/?	*	SP
145 (M42)	47,XX,+mar	dn	F/?	Fenotip similar a la síndrome de <i>Prader- Willi</i>	SP
146 (MS-50)	47,XY,+mar[35]/ 46,XY [65]	dn	M/?	*	SP

Abreviacions: dn, de novo; M, sexe masculí; F, sexe femení; a, anys; m, mesos; f, fetus; SP, sang perifèrica; LA, líquid amniòtic; *, descripció clínica més detallada al peu de taula.

***129 (A-34):** Marcador detectat postnatalment. Presenta alteracions quasi contínues al EEG però de poca durada. El pacient està amb tractament anticomicial. Presenta absència de llenguatge i de control d'esfínters.

***131 (A-45):** Fetus de 22 setmanes (filla del cas A-44) la gestació de la qual va ser interrompuda per diagnòstic ecogràfic de malformacions múltiples. La necròpsia indica fàcies dismòrfica, canell esquerre en flexió anterocubital, comunicació anterocubital tipus *ostium secundum* i dilatació de l'aurícula dreta. Presenta displàsia multiquística del ronyó dret, urèter filiforme a la meitat proximal, agenèsia d'una artèria umbilical i desenvolupament del sistema nerviós central sense grans malformacions.

***132 (A-50):** Pacient de 16 anys a qui se li ha detectat un cromosoma marcador extra *de novo* en mosaic. El noi presenta retard mental, hipoacúsia, miopia important i peus plans valgs intervinguts. La fàcies la té allargada, les dents les té mal implantades i les orelles grans. Presenta també escoliosi amb deformitat de pit i d'esquena, absència de ròtules i una limitació en l'extensió de les extremitats. És molt longilini, amb el coll llarg i amb els dits també allargats i contrets en flexió.

***144 (M20):** Nadó de 3 mesos d'edat amb el quadre clínic següent: fàcies lleugerament dismòrfica, hipotonia axial amb tendència a la hipertonia de les extremitats superiors, comunicació interventricular muscular petita, hemodinàmicament restrictiva, medi septal i testicles petits.

***146 (MS-50):** Primer fill d'un matrimoni jove i sa, no consanguini i sense antecedents familiars d'anomalies congènites. Embaràs normal. Part a terme, instrumental (fòrceps). Puntuació Agbar de 4 a 8 als 1 i 5 min respectivament. 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 5 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.

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

- **Cultiu cel·lular a partir de sang perifèrica**

Les mostres de sang perifèrica arribaven al laboratori en tubs d'heparina sòdica com a anticoagulant i en un volum d'entre 3 ml i 5 ml el mateix dia o el dia següent de l'extracció, i es conservaven a 4°C fins que eren processades. L'addició de fitohemaglutinina (PHA) al medi de cultiu actua com a mitògen estimulant la divisió cel·lular dels limfòcits T. El medi utilitzat ha

estat RPMI 1640 i la incubació s'ha realitzat durant 72h. Es recomana cultivar-les durant les 24 hores següents de l'extracció.

Les extensions metafàsiques eren obtingudes a partir de cultiu de limfòcits de sang perifèrica estimulats d'acord amb el protocol estàndard utilitzat al nostre laboratori.

- **Cultiu cel·lular a partir de líquid amniòtic**

Sempre que el volum de líquid amniòtic (LA) era suficient, es sembraven 3 línies de cultiu per mostra per assegurar-ne la viabilitat i per descartar possibles pseudomosaicismes. És aconsellable extreure 1 ml de LA per setmana de gestació. Generalment, s'extreien entre 10 i 20 ml de LA en xeringues estèrils, que es mantenen a temperatura ambient fins que la mostra era processada. Dels diferents tipus cel·lulars que podem trobar en una mostra de LA, només ens interessaran els amniòcits, que són els que procedeixen de l'amni; els medis de cultiu utilitzats (AmnioMAXTM-C100), n'afavoreixen el creixement en detriment dels altres i són les cèl·lules que posteriorment seran estudiades al microscopi.

Les extensions metafàsiques eren obtingudes d'acord amb el protocol estàndard del nostre laboratori.

3.3. MÈTODES D'EXTRACCIÓ D'ADN

- **Sang perifèrica venosa**

En un tub de 50 ml es col·loquen de 1 ml a 5 ml de sang perifèrica, s'enrasa fins a 50 ml amb solució salina fisiològica (NaCl 0,9M) i es centrifuga a 2750 rpm a 4°C durant 10 min. Si s'observa el botó vermell d'eritròcits en aquest punt, es pot veure una fina capa blanca de leucòcits just per sobre. Procurant no ressuspèndre aquesta fina capa, es descarta el sobrenedant amb una pipeta Pasteur. Es ressuspèn el botó i en aquest punt es pot aturar el protocol i es pot congelar la mostra 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) recent del dia i que prèviament haurem deixat a 4°C. Es barreja per inversió i es deixa en gel 30 min. A continuació, es centrifuga a 3000 rpm a 4°C durant 15 min. Es decanta el sobrenedant i es ressuspèn el botó cel·lular amb 25 ml de tampó de lisi d'eritròcits. La barreja es torna a deixar en gel durant 30 min. Aquest pas es repeteix, amb un màxim de 4 rentats, fins que el botó que s'obté és blanc, cosa que

significa que haurem eliminat la major part dels eritròcits. Aquest és un altre possible punt de parada del protocol un cop descartat el sobrenedant i congelat el sediment a -20°C . Si es continua amb l'extracció, 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).

Passat aquest temps, 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 i es mou suaument el tub fins que aconseguim visualitzar la medusa d'ADN flotant. Aquesta es recull amb una pipeta Pasteur acabada en ganxo i es renta amb etanol al 70% fred. Se li extreu l'excés d'etanol retingut prement-la contra la paret del tub amb suavitat. Finalment, es dissol en 500 μl de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4) que hem afegit prèviament en un tub de microcentrífuga. El volum de TE varia depenent de la mida de la medusa.

- **Líquid amniòtic**

L'extracció s'ha realitzat a partir del cultiu de LA que hem sembrat un cop aquest ha crescut suficientment i ha estat preparat per ser extret (presència de com a mínim 5 colònies i cèl·lules en mitosi a la base del flascó Falcon). En aquest cas, es decanta el medi de cultiu recollint-lo en un tub cònic de 10 ml. Seguidament, es renta el cultiu amb solució PBS1X per eliminar possibles restes de medi de cultiu i així evitar que s'inhibeixi l'acció de la tripsina. Després, s'afegeix 1ml de tripsina-EDTA per desenganxar les cèl·lules i es deixa actuar durant 2 min. Es colpeja el flascó Falcon sobre la taula per facilitar que les cèl·lules es desenganxin de la base del Falcon i es comprova seguidament al microscopi. Quan s'han desenganxat les cèl·lules, es decanta el contingut del flascó al tub cònic de 10 ml. Amb l'objectiu d'agafar el major nombre de cèl·lules possible i d'inhibir l'acció de la tripsina de tal manera que no degradi les cèl·lules, es van fer més rentats del flascó Falcon amb medi de cultiu i es va recollint al mateix tub cònic. Al final hi haurà tants tubs de 10 ml com flascons Falcon teníem del cultiu cel·lular.

Una vegada hi tenim tot el contingut del flascó Falcon, centrifuguem a 600 g durant 6 min. Aquest és un possible punt de parada del protocol. En aquest cas, es deixa

aproximadament 1 ml de sobrenedant i després de ressuspèndre 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 ressuspèn en 1ml de PBS1X. La suspensió de cèl·lules es traspasa a un tub de microcentrífuga amb el que treballarem a partir d'ara. Es centrifuga a 7000 rpm durant 5 min i es descarta el sobrenedant utilitzant pipetes Pasteur de vidre i procurant no moure el botó. 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, H₂O 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.

Passat aquest temps, 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 fred. Es mou suaument el tub 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 amb el sobrenedant. Aquest es descarta i s'asseca la boca del tub amb un mocador de paper. S'afegeixen 500 μl d'etanol al 70% fred 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'afegeixen 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 totalment. Finalment, es traspasa el contingut dels tubs que corresponguin a una mateixa mostra a un únic tub de microcentrífuga.

- **Quantificació de l'ADN i determinació de la puresa**

La quantificació de l'ADN i la determinació de la puresa es realitzen mitjançant un anàlisi espectrofotomètric de l'ADN (Biotech Photometer, UV1101) mesurant l'absorbància a 260 nm i 280 nm respectivament. La concentració s'obté en multiplicar el factor de dilució que hem utilitzat per realitzar la lectura per el valor de l'absorbància a 260nm.

La puresa de l'ADN s'obté del coeficient entre l'absorbància a 260nm i a 280nm. Per l'estudi de CGH, la puresa ha d'estar entre els valors 1.6 i 2.

3.4. TÈCNICA DE CITOGENÈTICA CONVENCIONAL: BANDES G

Les extensions cromosòmiques prèviament envellides (3 dies a temperatura ambient, o/n a 65°C o 30min en 2xSSC a 37°C) es submergeixen en una solució salina 2xSSC/citrat trisòdic (Merck), dissolt en NaCl 0,3M a 65°C durant 1 min. Aquest temps pot variar segons les característiques de la mostra i les condicions ambientals. Es renta amb aigua i es deixa assecar. Es tenyeix en colorant Wright al 0,25% (Sigma)(2,5g colorant, 1000ml metanol dissolt en agitador magnètic durant 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 1 min. Aquest temps pot variar en funció de les condicions ambientals de cada laboratori i les característiques de la mostra. Es renta amb aigua i es deixa assecar.

*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.

3.5. TÈCNiques D'HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

3.5.1. Hibridació Genòmica Comparada Convencional i d'Alta Resolució (CGH/HR-CGH)

L'objectiu d'aquesta tècnica és generar una hibridació competitiva entre l'ADN problema (pacient) i l'ADN control, cadascun marcat amb un fluorocrom diferent, sobre una extensió de cromosomes metafàsics normals. L'anàlisi posterior amb el software de CGH detecta els desequilibris entre la hibridació de l'ADN problema i la del control.

Tant la CGH convencional com la d'alta resolució van ser realitzades d'acord amb els protocols descrits per Kallioniemi et al. (1994).

Marcatge fluorescent de l'ADN

Es preparen tants eppendorfs com mostres d'ADN es vulguin marcar, i a cadascun d'ells s'afegeixen els següents reactius: 700ng d'ADN (X µL) + (22,5µL – X) d'aigua lliure de nucleases, + 5µl de 0,1mM dTTP + 10µl de 0,1mM dNTP (dATP; dCTP; dGTP) + 5µl de 10X tampó (500 mM Tris-Cl pH 7,2; 100mM MgSO₄; 1mM DDT) + 2,5µl de 0,2 mM dUTP-Texas Red + 5µl d'enzim (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 bé el contingut de cada tub, es fa un spin de centrifuga i es deixen tots els Eppendorfs en un bany a 15°C durant 1 hora i 30 min per tal que tingui lloc la reacció enzimàtica de *Nick Translation*. És aconsellable mantenir els tubs protegits de la llum directa durant aquest temps. Passats els 90 min, s'atura

la reacció introduint els Eppendorfs en un bany a 70°C durant 10 min; d'aquesta forma, els enzims es desnaturalitzen evitant, així, que l'ADN acabi degradant-se. Es col·loquen els tubs un mínim de 5 min en gel i es procedeix a la comprovació del marcatge mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa al 2% (0,6g d'agarosa + 30ml 1xTAE) i es comprova que els fragments obtinguts durant la reacció de *Nick Translation* són del tamany correcte (entre 300 i 3500 pb).

Seguidament, es barreja l'ADN problema amb el control marcats i s'afegeixen 10 µl d'ADN COT-1 (Vysis) per bloquejar les regions repetitives del genoma, ja que aquestes regions podrien generar falsos positius en presentar variants polimòrfiques a la població general i han de ser excloses de l'anàlisi. Es precipita l'ADN afegint 0,1 volums d'acetat sòdic 3M a la paret de cada Eppendorf i 2.5 volums d'etanol absolut fred. Es mescla bé invertint el contingut varies vegades i es deixa precipitant 20 min a -80°C o *overnight* a -20°C. A continuació, es centrifuguen els tubs 30 min a 12000rpm; es descarta el sobrenedant per decantació i s'assequen bé les parets del tub amb l'ajuda d'una punta de *Kleenex*, procurant eliminar totes les gotes d'etanol absolut, ja que aquestes podrien interferir en el procés d'hibridació.

Hibridació

Es descongela el portaobjectes comercial (CGH Metaphase Target Slides, Vysis) que conté extensions metafàsiques d'un individu control i es desnaturalitza durant 5 min en formamida al 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 una sèrie de solucions d'etanol al 70%, 85% i 100% fred durant un minut a cada un i es deixa assecar a l'aire. Paral·lelament, es dissol el botó (sonda) en 15 µl de tampó d'hibridació (20% dextrà sulfat en 50% formamida/2xSSC). Es desnaturalitza la sonda posant-la a 73°C durant 8 min. Finalment, es col·loca la sonda desnaturalitzada sobre l'àrea del portaobjectes a hibridar i es cobreix amb el cobreobjectes d 22x22 mm. Es segella amb goma, es col·loca el portaobjectes dins d'una càmera fosca i humida i es deixa hibridar a 37°C entre 36h i 72h, evitant que s'assequi.

Rentats posthibridació

Passat aquest temps, es treu el cobreobjectes amb molta cura i 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 i s'afegeixen 10 µl de 4'-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 guarda a la nevera o congelador fins al seu anàlisi.

Anàlisi

La captura d'imatges s'ha realitzat amb 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) i 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 cada mostra, s'han analitzat entre 10 i 15 metafases de condensació cromosòmica semblant (400-500 bandes), ben esteses, amb el mínim de cromosomes sobreposats possible, sense restes citoplasmàtiques ni soroll de fons, amb un patró d'hibridació uniforme no granulós i una intensitat de fluorescència equivalent per als dos fluorocroms.

Els valors obtinguts per sobre de 1.25 s'han considerat guanys i els inferiors a 0.75 pèrdues. Respecte la HR-CGH, 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.

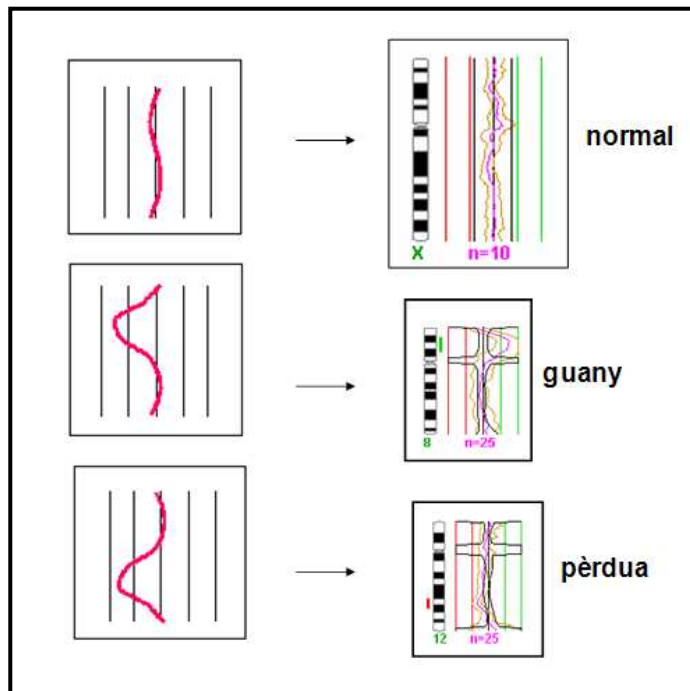


Figura 21. Imatge que il·lustra les 3 possibles situacions en què ens podem trobar amb els perfils de CGH/HR-CGH.

3.5.2. FISH convencional

La FISH convencional s'ha aplicat per confirmar els resultats obtinguts per altres tècniques citogenètiques. Depenent de l'anomalia cromosòmica analitzada, s'han utilitzat

diferents sondes comercials: sondes *loci* específiques (LSI), centromèriques (CEP), subtelomèriques (subtel) o de pintat cromosòmic (WPC).

Bàsicament, s'han utilitzat dos tipus de sondes *loci* específiques: l'específica per a la detecció de 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 (TUPLE *SpectrumOrange*/ARZA *SpectrumGreen*, Vysis). Aquestes dues sondes són les que s'apliquen més sovint en el diagnòstic citogenètic prenatal, ja que són les síndromes de microdeleció més freqüents. Altres sondes específiques emprades han estat les subtelomèriques per a l'estudi de subtelòmers (*TelVysion ADN probes*, Vysis), les centromèriques per a l'estudi de centròmers (*satellite probes*, Q-BIOgene) i les de pintat cromosòmic (*wcp probes*, Q-BIOgene).

En general, s'ha seguit la metodologia aconsellada per la casa comercial.

L'anàlisi s'ha realitzat a través d'un microscopi d'epifluorescència Olympus AX-70 (Olympus Optical CO, Hamburg, Germany) equipat amb els filtres: U-MNIBA (*SpectrumGreen*), *SpectrumOrange* (U-MNG) i U-MNU (DAPI) i acoblat a una càmera digital CCD d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT). Les imatges s'obtenen a través d'una càmera CCD i amb l'ajut d'un software específic (Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK, o Metasystems). Es capturen únicament les metafases més ben hibridades. Per cada cas s'analitzen entre 8 i 10 metafases.

3.5.3. FISH multipintat o *multiplex* (M-FISH)

Aquesta tècnica permet visualitzar tots els cromosomes homòlegs pintats d'un color específic en una sola hibridació. El protocol que s'ha seguit ha estat el recomanat per la casa comercial (Vysis). L'anàlisi i captura de les imatges s'ha realitzat mitjançant un microscopi epifluorescent Olympus AX60 (Olympus Optical CO, Hamburg, Germany) equipat amb una roda de filtres específics per *SpectrumAqua*, *SpectrumFared*, *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). Per cada cas s'han analitzat 8-10 metafases.

3.5.4. FISH multicolor específica de centròmer (cenM-FISH)

Aquesta tècnica s'ha emprat per a la identificació i caracterització de tots els cromosomes marcadors que va ser possible estudiar. Donat que no hi ha cases comercials que subministrin aquestes sondes, aquest estudi s'ha realitzat al laboratori del Dr. Thomas Liehr a l'*Institut für Humangenetic und Antropologie*, Jena, Alemanya, on es farbiu aquestes sondes.

Obtenció de la sonda: L'ADN específic de centròmer que està en plàsmids 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 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 25µg de t-RNA i 2µg de COT1-DNA. L'ADN COT-1 és necessari per evitar la hibridació entrecreuada 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 assecar 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 assecar a temperatura ambient. Es col·loca la sonda desnaturada sobre el portaobjectes amb la mostra també desnaturada, 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 assecar a temperatura ambient. Per últim es realitza la contratinció 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, Germany) 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. Cal destacar que els centròmers dels cromosomes 14 i 22 es marquen amb la mateixa combinació de fluorocroms i el mateix passa entre els cromosomes 13 i 21. Per a cada cas s'analitzen 10-15 metafases.

3.5.5. FISH amb sondes de cromosomes artificials de bacteries (BACs)

La hibridació *in situ* fluorescent amb sondes BAC requereix tota una sèrie de protocols de preparació de la sonda a hibridar que no són necessaris a altres tipus de FISH, com per exemple, a la FISH locus específica, en què la sonda és proporcionada directament per la casa comercial i ja està preparada per ser utilitzada. Així, la FISH amb sondes BAC requereix, en primer lloc, aconseguir un creixement òptim de les bacteries que contenen el plàsmid amb el BAC corresponent; en segon lloc, extreure aquest ADN plasmídic i quantificar-lo; en tercer lloc, marcar-lo amb fluorocroms específics i, finalment, hibridar-lo amb les preparacions metafàsiques corresponents.

Característiques i selecció de les sondes BAC

La majoria de les sondes BAC utilitzades en aquest estudi van ser gentilment proporcionades pel Dr. *Mariano Rocchi*. Les sondes BAC 136J14 i BAC 105A3 van ser cedides pel Dr. Luis Pérez-Jurado. La majoria dels clons pertanyen a les llibreries BAC o PAC produïdes pel *BACPAC Resource Center (BPRC)* del *Children's Hospital Oakland Research Institute in Oakland, California* (<http://bacpac.chori.org>). El vector desenvolupat per aquest institut s'anomena pBACe3.6; es tracta d'ADN circular de doble cadena, de 11612 pb i amb resistència al Cloramfenicol (20 µg/ml). A la web <http://bacpac.chori.org/download/pBACe3.6updated.gb>, es poden consultar les característiques del vector (punts de restricció, sistema de selecció, etc). La nomenclatura de la llibreria construïda amb el vector pBACe3.6 és *RP11*; la placa, la fila i la columna corresponents al BAC s'indiquen a continuació de la manera següent: RP11 -

345 A12, on 345 seria la placa, A la fila i 12 la columna. La mida mitjana de l'insert és de 164 kb aproximadament. La selecció de la sonda es va realitzar d'acord amb els resultats citogenètics i consultant a les bases de dades de la web <http://www.biologia.uniba.it/rmc>.

Cultiu, extracció i quantificació

El protocol que s'ha utilitzat en aquest treball per al cultiu de les sondes BAC i per a l'extracció de l'ADN plasmídic és el proposat pel Dr. *Mariano Rocchi* publicat a la seva pàgina web <http://www.biologia.uniba.it> amb algunes modificacions.

Les sondes BAC arriben al laboratori contingudes en colònies de bacteries *Escherichia Coli* en agar i en Eppendorfs petits. Després de comprovar-ne l'estat i la identificació, es deixen a 4°C fins a la seva posterior utilització. Per evitar problemes de contaminació, o en cas de sospita de contaminació, és aconsellable fer-ne un cultiu en placa amb l'antibiòtic corresponent al vector previ al cultiu en suspensió. Es deixen créixer *overnight* a 37°C; posteriorment, s'agafen amb una nansa de Kolle les colònies crescudes i se'n fa el cultiu en suspensió. El medi idoni pel cultiu en suspensió és el 2*YT (per cada 100 ml, afegir 1.6 g de Bacto-triptona (*DIFCO*), 1 g d'extracte de llevat (*DIFCO*) i 0.5 g de NaCl (*Fluka Chemika*); enrasar amb *H₂O MilliQ* i ajustar el pH a 7), ja que en ser un medi molt ric, facilita molt el creixement de les bacteries. Un cop esterilitzat a l'autoclau, el medi s'atempera fins als 37°C i seguidament es procedeix a realitzar el cultiu en una campana de flux, prèviament esteril·litzada, i amb un encenedor Bunsen encès. Es preparen tants tubs cònics de 50 ml estèril·ls com BACs es vulguin cultivar; després de rotular-los adequadament, s'afegeixen 10ml de medi i l'antibiòtic a la concentració final que es correspongui amb la resistència de la bactèria (*Kanamicina* 25µg/ml, *Cloramfenicol* 20 µg/ml o *Ampicil·lina* 50 µg/ml) (*Sigma*) a cada tub, sempre vigilant de no apartar-se de la flama del Bunsen per assegurar-ne l'esteril·litat. A continuació, s'agafen colònies de bacteries de cada Eppendorf i s'introdueixen al tub de 50ml corresponent, procurant sempre d'esteril·litzar la nansa de Kolle amb la flama després de cada sembra. Finalment, es deixa incubant els tubs tancats amb parafilm en un incubador-agitador a 250 rpm i a 37°C entre 16 i 20 hores.

Passades unes 20 hores d'incubació, el medi dels tubs presenta un aspecte blanquinós, opac, gens transparent; això significa que hi ha hagut un creixement fort de les colònies i ja es pot procedir amb l'extracció de l'ADN plasmídic. Si el medi dels tubs, contràriament, presenta un aspecte transparent, no hi ha hagut creixement i s'ha de tornar a cultivar. Per poder tenir BACs de reserva, abans de començar amb l'extracció és aconsellable agafar 850 µL de cultiu crescut (sempre s'ha de treballar sota una campana de flux i al costat d'una flama de Bunsen) i

MATERIAL I MÈTODES

afegir-los a un Eppendorf amb 150 µL de glicerol al 87% autoclavat. Es barreja bé amb vòrtex i s'emmagatzema a -80°C.

A continuació, es centrifuguen els tubs de 50 ml durant 10 min a 4000 rpm i a 4°C. S'elimina el sobrenedant per decantació i es ressuspèn el *pellet* amb l'ajuda d'un agitador vòrtex. Per 10 ml de cultiu, seguidament s'afegeixen 100µL de *solució GTE* (0.99g glucosa 50mM, 0.30285g Tris 25mM pH=8 i 0.3722g EDTA 10mM) i es barreja bé també amb l'ajuda d'un vòrtex. Es deixa reposar 5 min a temperatura ambient. Es fa un cop (spin) de centrifuga per fer baixar les gotes de suspensió que hagin pogut quedar a les parets del tub i aquesta es transfereix a Eppendorfs de 2 ml. Arribats a aquest punt, es procedeix amb el tractament de desnaturalització, és a dir, trencar la paret bacteriana per tal que l'ADN plasmídic i circular de les bactèries surti a l'exterior. Amb aquest objectiu, s'afegeixen 200µL de *solució de desnaturalització* (NaOH 0.2M i SDS al 1% a temperatura ambient) feta del dia a cada Eppendorf, es barreja bé invertint varies vegades i es deixen els tubs 5 min en gel. A continuació, s'afegeixen 150 µL d'acetat de sodi 3M pH5.2, es mescla bé per inversió i es deixen els Eppendorfs en gel 10 min. És aconsellable invertir varies vegades els tubs durant aquest temps. Passats aquests 10 min, es centrifuguen els tubs 8 min a 14000 rpm i es traspassa el sobrenedant a un altre Eppendorf de 2 ml.

A continuació, es procedeix a l'aïllament de l'ADN plasmídic i circular de la resta de proteïnes bacterianes mitjançant una solució de fenol-cloroform-isoamílic (25:24:1) (*Sigma*). En una campana, s'afegeixen 500 µl de fenol-cloroform-isoamílic a cada Eppendorf, s'agita amb l'ajuda d'un vòrtex i es centrifuguen els tubs 10 min a 12500 rpm. Es recupera només la fase aquosa de cadascun d'ells - ja que és la fase que contindrà l'ADN bacterià - i es transfereix a un altre Eppendorf de 2 ml. En aquest punt, es pot repetir si es considera necessari, el pas del fenol. És aconsellable fer un spin de centrifuga dels tubs abans de continuar amb el protocol per tal de comprovar que no hagin quedat restes de fenol a les fases superiors recuperades. Un cop eliminades les possibles gotes de fenol, s'afegeixen 0,1 volums d'acetat de sodi 3M i 2,5 volums d'etanol 100% fred i es mescla invertint varies vegades. Es deixa precipitar l'ADN 1 hora a -80°C o a -20°C o/n.

A continuació, es centrifuguen els tubs 30 min a 4°C. En aquest punt, el *pellet* d'ADN hauria de ser visible. Es descarta el sobrenedant per decantació i es renta el *pellet* amb 1ml d'etanol al 70% fred. Es tornen a centrifugar els tubs 15 min a 4°C i s'elimina el sobrenedant. S'assequen bé les parets del tub amb l'ajuda de la punta d'un *Kleenex* i es deixa assecar bé el *pellet* dins d'una estufa a 37°C un màxim de 8 min. Seguidament, es ressuspèn el *pellet* en 50

μL d' H_2O lliure d'exonucleases i 1 μL de RNAsa (10 mg/ml) i es deixa incubar 15 min a 65°C. Amb aquest tractament enzimàtic el que es pretén és eliminar l'ARN bacterià que ha quedat precipitat juntament amb el ADN. A continuació, s'emmagatzemen els tubs a -20°C fins a la seva posterior quantificació (si aquesta es fa el mateix dia de l'extracció, emmagatzemar els tubs a 4°C).

La quantificació de l'ADN bacterià (BAC) extret s'ha realitzat a través d'una electroforesi en un gel d'agarosa al 1% (0.3g d'agarosa + 30 ml 1xTAE).

Marcatge i hibridació

El marcatge i precipitació de l'ADN plasmídic (BAC) s'han fet seguint el mateix protocol del *Nick Translation Kit* per CGH de Vysis. Es preparen tants Eppendorfs com mostres d'ADN plasmídic es vulguin marcar, i a cadascun d'ells s'afegeixen els següents reactius: 1000 ng d'ADN (si no és possible perquè la concentració obtinguda és massa baixa, afegir-ne el màxim volum, és a dir, 22,5 μL) + (22,5 μL - X) d'aigua lliure de nucleases, essent X el volum corresponent als 1000 ng d'ADN problema + 5 μl de 0,1mM dTTP + 10 μl de 0,1mM dNTP (dATP; dCTP; dGTP) + 5 μl de 10X tampó (500 mM Tris-Cl pH 7,2; 100mM MgSO_4 ; 1mM DDT) + 2,5 μl de 0,2 mM dUTP-Texas Red + 5 μl d'enzim (ADN polimerasa I, ADNasa I en 50% glicerol; 50 mM Tris-Cl pH 7,2; 10 mM MgSO_4 ; 0,1 mM DDT; 0,5 mg/ml nucleasa lliure d'albúmina sèrica bovina).

Es barreja bé el contingut de cada tub, es fa un cop (spin) de centrífuga i es deixen tots els Eppendorfs en un bany a 15°C durant 1 hora i 30 min per tal que tingui lloc la reacció enzimàtica de *Nick Translation*. És aconsellable mantenir els tubs protegits de la llum directa durant aquest temps. Passats els 90 min, s'atura la reacció introduint els Eppendorfs en un bany a 70°C durant 10 min; d'aquesta forma, els enzims es desnaturalitzen evitant, així, que l'ADN acabi degradant-se. Es col·loquen els tubs un mínim de 5 min en gel i es procedeix a la comprovació del marcatge mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa al 2% (0,6g d'agarosa + 30ml 1xTAE). Un cop carregats 9 μl de cada mostra i 0,5 μl d'ADN *patró* l'electroforesi es realitza a 110V durant 30min. A continuació, el gel es tenyeix amb bromur d'etidi entre 2 i 5 min, es destenyeix en aigua destil·lada entre 10 i 12 min i s'analitza en un transil·luminador de rajos UV. La migració de cada mostra es compara amb la de l'ADN *patró*, i d'aquesta manera es comprova que els fragments obtinguts durant la reacció de *Nick Translation* són del tamany correcte (entre 300 i 600 pb).

Seguidament, s'afegeixen 10 μl d'ADN COT-1 (Vysis) i 6 μl d'ADN d'esperma de salmó (*Sonicated Salmon Sperm ADN Phenol Extracted, Amersham Biosciences*) a cada tub per tal de

bloquejar les seqüències altament repetitives de l'ADN plasmídic que impedirien una hibridació específica del BAC. Es precipita l'ADN afegint 0,1 volums d'acetat sòdic 3M a la paret de cada Eppendorf i 3 volums d'etanol absolut fred. Es mescla bé invertint el contingut varies vegades i es deixa precipitant 20 min a -80°C o *overnight* a -20°C . A continuació, es centrifuguen els tubs 30 min a 12000 rpm; es descarta el sobrenedant per decantació i s'assequen bé les parets del tub amb l'ajuda d'una punta de *Kleenex*, procurant eliminar totes les gotes d'etanol absolut, ja que aquestes podrien interferir en el procés d'hibridació. Es ressuspèn el *pellet* en $6,5\mu\text{l}$ d'aigua MilliQ i, si no es continua amb el protocol el mateix dia, s'emmagatzemen els tubs a -20°C fins a la seva posterior utilització.

L'estat de les extensions metafàsiques és especialment important en el cas de la FISH amb sondes BAC per aconseguir bons resultats a les hibridacions. Per facilitar la detecció de la senyal, és important que la preparació de les extensions metafàsiques es faci procurant que els cromosomes quedin el més extensos possible, que hi hagi el mínim de superposicions, que hi hagi una elevada quantitat de metafases i que els cromosomes siguin el més llarg possible i lliures de restes citoplasmàtiques. El protocol de preparació de les extensions (envelliment, rentats de prehibridació, hibridació i rentats de postfixació) és el protocol estàndard per a qualsevol altre tipus de FISH.

Anàlisi

L'anàlisi de les preparacions s'ha fet a través d'un microscopi d'epifluorescència Olympus AX-70 (*Olympus Optical CO., Hamburg, Germany*) amb els filtres adequats: U-MNU (contratinció DAPI) i U-MWIY (*Texas Red*). La captura de les imatges s'ha fet amb una càmera CCD d'alta sensibilitat (*Photometrics Sensys/ Olympus U-SPT*) acoblada al microscopi i amb l'ajuda d'un *software* específic (*Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK*). Per cada cas, eren capturades entre 5 i 10 metafases.

En aquest estudi s'han utilitzat, a banda dels emprats al laboratori del Dr. Liehr, 35 BACs dels cromosomes següents: **cromosoma 15** (13 BACs diferents, aplicats a 16 casos); **cromosoma 19** (10 BACs diferents, aplicat a 1 cas); **cromosoma 5** (9 BACs diferents, aplicats a 1 cas); **cromosoma 16** (2 BACs diferents, aplicats a 5 casos); **cromosoma 11** (1 BAC, aplicat a 1 cas). Per a cadascun d'ells, s'ha procedit al cultiu, extracció, quantificació, marcatge i hibridació. A la figura 22, se'n detalla la localització.

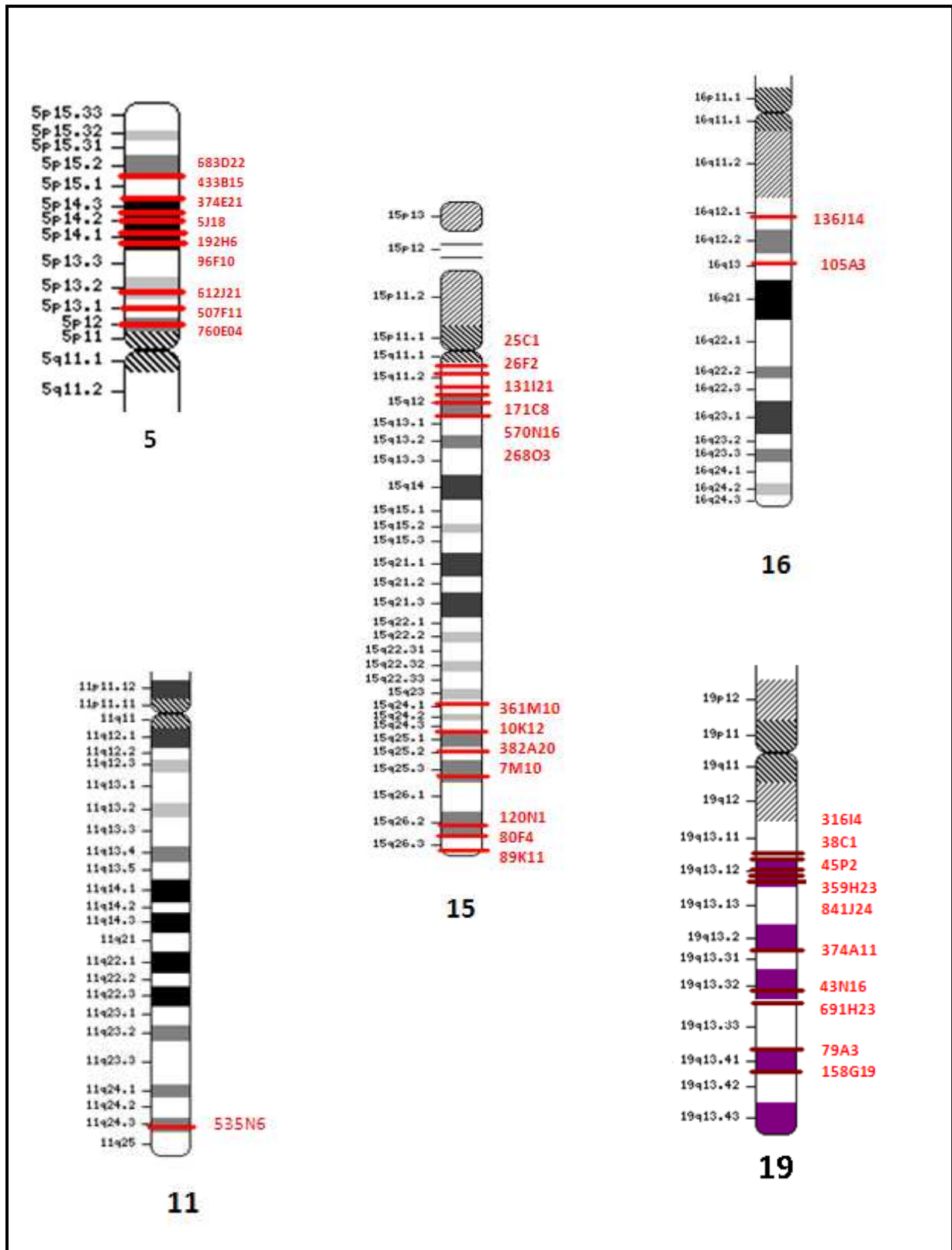


Figura 22. Ideogrames dels cromosomes 5, 11, 15, 16 i 19 amb la localització de les sondes BAC utilitzades en aquest treball.

3.6. TÈCNICA DE MLPA ESPECÍFICA PER A 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 al Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona (gràcies a la col·laboració de la Dra. Montserrat Milà) i també, a la Unitat de Genètica de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona (amb col·laboració del Dr. Alberto Plaja).

Per analitzar les regions subtelomèriques, s'han emprat el *kits* P036B i P070 (MRC-Holland; Amsterdam, Netherlands), i per a l'anàlisi de la regió Xq12, el *kit* P106-B1 de la mateixa casa comercial. Per a l'anàlisi de la regió 1p36 dels casos 41 (A-95), 48 (A-142) i 52 (A-146) s'ha utilitzat a més a més un *kit* desenvolupat per la Universitat Pompeu Fabra especialment dissenyat per a l'anàlisi de regions amb reorganitzacions recurrents freqüents amb les sondes SKI I TP73, que es creu que estan situades a la regió crítica de la síndrome de deleció del 1p36.

Desnaturalització de l'ADN i hibridació de la sonda SALSA: 5 µl d'ADN (20-500 ng) es col·loquen en un tub de PCR i s'introdueix al 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 i 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. 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 subtromèriques. Els valors obtinguts s'introdueixen en una fulla de càlcul d'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 (Fig. 23).

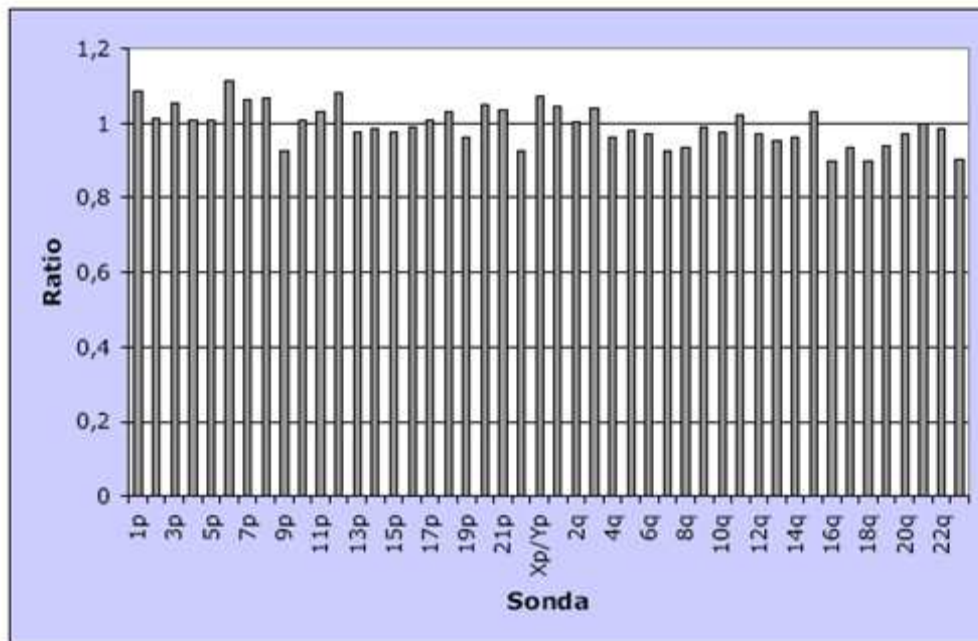


Figura 23. Resultat de l'anàlisi d'una mostra mitjançant MLPA. Com que totes les barres han quedat entre l'interval 0.7-1.3, s'ha de considerar el resultat com a equilibrat (imatge cedida per Mònica Santos, 2007).

3.7. ARRAY D'HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA (aCGH)

Aquesta tècnica permet la detecció de guanys i pèrdues de material amb una resolució molt més elevada que l'aconseguida mitjançant la CGH i la HR-CGH. En aquest treball s'ha analitzat un total de cinc mostres mitjançant aquesta tècnica: quatre al laboratori *Quantitative Genomic Medicine Laboratories SL*, de Barcelona (casos: 30 (A-48), 34 (A-59), 46 (A-104) i 66 (A-173)) amb la col·laboració del Dr. Lluís Armengol, i una a la Unitat de Bioquímica i Genètica Clínica de l'Hospital Virgen de la Arrixaca de Múrcia (cas 109 (A-15)), gràcies a la col·laboració de la Dra. Ascensión Vera-Carbonell.

Per a l'anàlisi de les quatre mostres al laboratori del Dr. Armengol s'ha utilitzat el xip *qChip Post*, que conté aproximadament 60000 sondes repartides pel genoma, fent especial èmfasi en aquelles regions conegudes que s'han associat a patologies (síndromes de microdeleció, etc). La qualitat de cadascuna de les mostres va ser determinada mitjançant la lectura de densitat òptica amb un lector Nanodrop. Se'n va comprovar la integritat a través d'electroforesi i tinció per SybrGreen II. Es van marcar 1µg de cada mostra i 1µg d'ADN de referència femení (21F). Un cop comprovada la qualitat del marcatge es va procedir a hibridar sobre el xip *qChip Post*. Després de la hibridació i els rentats, es va procedir a escanejar el xip i a obtenir-ne la imatge. El processament i l'anàlisi de la informació continguda a l'array s'ha realitzat amb el *software DNA Analytics 5.0* d'Agilent. La interpretació de les alteracions s'ha dut a terme utilitzant el mateix software amb els paràmetres: *window=0.1Mb; Algoritme ADM2 ≥ 6.5; abs (log₂ratio) ≥ 0.25; probes ≥ 2*.

L'anàlisi del cas 109 (A-15) al laboratori de la Dra. Vera-Carbonell es va realitzar a través d'un xip comercial d'array de CGH constituït per 19000 clons, amb una resolució de 162kb al llarg del genoma i amb regions solapades (Arraygenomics, France). Els detalls del disseny, la llista de clons i el protocol eren proporcionats per la casa comercial d'Arraygenomics. Es van marcar 1 µg d'ADN de la mostra i 1 µg d'ADN de referència masculí (Promega, Madison, WI, USA) amb Cy5-dCTP i Cy3-dCTP respectivament. La hibridació competitiva es va realitzar d'acord amb les instruccions del fabricant. Els punts de tall es van marcar com a 0.2 i -0.2 per guanys i pèrdues respectivament. Les imatges van ser obtingudes mitjançant un escàner AXON genepix 4000B i les dades es van processar a través del software BACMAGIC V2 (Arraygenomics, France).

3.8. NOMENCLATURA

La descripció dels cariotips caracteritzats mitjançant tècniques de citogenètica convencional i molecular s'han realitzat d'acord amb les instruccions descrites per l'*International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 2009* (ISCN, 2009).

4. RESULTATS

4. RESULTATS

En aquest treball s'ha realitzat l'anàlisi citogenètica d'un total de 146 pacients.

A les taules següents, es detallen el cariotip del pacient obtingut prèviament mitjançant bandes G, l'origen de l'anomalia cromosòmica (heretada o *de novo*) en cas de tenir aquesta informació, el material de què es disposava per fer l'estudi, els resultats obtinguts amb les tècniques de CGH, HR-CGH, M-FISH, altres tècniques de FISH, aCGH i MLPA i, finalment, la fórmula cromosòmica segons la normativa ISCN 2009 (tenint en compte tots els resultats globals obtinguts amb les diferents tècniques), incloent una abreviació de la caracterització de l'anomalia .

Per a la realització d'aquest estudi, s'han aplicat al 48.6% (71/146) dels casos més d'una tècnica. Concretament, en un 26% (39/146) dels casos s'han aplicat dues tècniques diferents (CGH/HR-CGH/M-FISH + FISH/MLPA/aCGH); en un 18.5% (27/146) dels casos, se n'han aplicat tres (CGH/HR-CGH + FISH + MLPA/aCGH).

L'aplicació d'aquesta bateria de tècniques de citogenètica molecular ha permès detectar alteracions cromosòmiques que no havien estat prèviament identificades per bandes G en un 37.5% (55/146) dels casos, mentre que al 62.5% restant s'ha confirmat el resultat de la citogenètica convencional.

Únicament en 3 casos -53 (A-150), 128 (A-28) i 139 (A-178)- no s'ha pogut acabar de caracteritzar totalment l'alteració cromosòmica: en els dos primers perquè les tècniques emprades no han estat prou resolutives i en l'últim cas, per no disposar de prou material (aquest darrer aspecte representa un dels grans problemes en aquests tipus d'estudi ja que es difícil aconseguir una nova mostra). En un 85.5% dels casos del grup A no s'han pogut detectar alteracions cromosòmiques de més de 3Mb; està pendent l'estudi de tots ells mitjançant aCGH.

Per tal de facilitar el seguiment dels resultats citogenètics obtinguts a cada cas, s'ha continuat ubicant-los al mateix grup encara que es trobés una alteració corresponent a un altre grup.

4.1. GRUP A. PACIENTS AMB CARIOTIP “APARENTMENT” NORMAL I QUADRE CLÍNIC

En aquest grup s’han inclòs tots aquells casos (90 en total) que presentaven un cariotip “aparentment” normal per citogenètica convencional però que manifestaven una clínica alterada amb major o menor grau. A les Taules 6 i 7, es mostren els resultats citogenètics de cadascun d’ells; les seves corresponents imatges es troben a l’annex 1.

Els 90 pacients estudiats en aquesta sèrie es poden dividir en quatre grans grups d’acord amb la indicació diagnòstica manifestada: 1) individus afectats únicament de retard mental (5 pacients); 2) individus amb trets dismòrfics sense retard mental (17 pacients); 3) individus que presentaven retard mental i trets dismòrfics (24 pacients) i 4) individus amb retard mental i/o quadre clínic, amb afectacions físiques més severes (40 pacients). No es va poder aconseguir la clínica dels quatre darrers casos. L’estudi mitjançant la CGH/HR-CGH no va detectar desequilibris en cap dels pacients del primer grup; en canvi, va identificar-ne 4 al segon, 7 al tercer i 5 al quart.

Totes les mostres incloses en aquest grup van ser estudiades mitjançant la Hibridació Genòmica Comparada (CGH/HR-CGH). Dels 16 casos amb el perfil de CGH/HR-CGH desequilibrat, només s’ha pogut confirmar el resultat en 3 casos (39, 41 i 48) mitjançant l’aplicació de les tècniques de FISH amb sondes locus específiques (LSI *DiGeorge*, LSI *PW/A*, subtelomèriques, BACs,...) i/o de MLPA. En 10 casos el desequilibri no ha estat confirmat en aplicar FISH o MLPA (38, 52, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85 i 86) i en 3 casos més, no s’ha pogut confirmar l’anomalia per manca de sondes BAC específiques de la regió (47, 51 i 53); aquests últims desequilibris no involucraven regions problemàtiques per a la resolució de la tècnica.

En aquells casos en què el perfil de CGH/HR-CGH era equilibrat però la clínica feia sospitar l’existència d’alguna alteració gènica/cromosòmica, es van aplicar altres tècniques com la M-FISH -casos 1 (A-1) i 4 (A-5)- per descartar possibles reorganitzacions intercromosòmiques no visibles per bandes G, la MLPA -cas 58 (A-156)- per descartar desequilibris a les regions subtelomèriques o l’aCGH -casos 30 (A-48), 34 (A-59), 46 (A -104) i 66 (A-173), per descartar desequilibris genòmics inferiors a 3Mb.

D’aquesta manera, s’han dividit els casos inclosos en aquest grup en dues taules: la primera (Taula 6), inclou els casos en què s’ha pogut confirmar la presència d’un cariotip normal; la segona (Taula 7), inclou aquells casos en què s’han trobat desequilibris en aplicar les diferents tècniques citades anteriorment.

En resum, dels 90 casos analitzats en aquest grup, 77 han estat confirmats amb cariotip normal, és a dir, no s'han trobat desequilibris del genoma superiors a 3Mb (resolució de la HR-CGH). A més a més, s'ha detectat i identificat la presència d'una alteració cromosòmica en 8 casos.

RESULTATS

Taula 6. Casos en què s'ha confirmat la presència d'un cariotip normal.

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
1 (A-1)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	MFISH normal	-	46,XY
2 (A-3)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
3 (A-4)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
4 (A-5)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	MFISH normal	-	46,XX
5 (A-6)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
6 (A-7)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
7 (A-8)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
8 (A-10)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
9 (A-11)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
10 (A-12)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
11 (A-16)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
12 (A-17)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
13 (A-18)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
14 (A-19)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
15 (A-20)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
16 (A-21)	46,XX	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XX
17 (A-22)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
18 (A-23)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
19 (A-24)	46,XX	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XX
20 (A-25)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
21 (A-26)	46,XX	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XX
22 (A-27)	46,XX	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XX
23 (A-31)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
24 (A-32)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY

RESULTATS

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
25 (A-33)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
26 (A-35)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
27 (A-36)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
28 (A-40)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
29 (A-41)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
30 (A-48)	46,XX	ADN	equilibrat	arr(1-22,X)x2	-	-	46,XX. arr(1-22,X)x2 --- 46,XX
31 (A-51)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
32 (A-52)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
33 (A-53)	46,XX	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XX
35 (A-62)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
36 (A-67)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
37 (A-68)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
38 (A-71)	46,XX	ADN/MET	dim(22)(q11.2)?	-	22q13.3 (ARZAx2) 22q11.2 (TUPLEx2)	-	46,XX.ish 22q13.3(ARZAx2), 22q11.2(TUPLEx2) --- 46,XX
40 (A-94)	46,XX,14ps+	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX,14ps+
42 (A-97)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
43 (A-99)	46,XX,21ps+	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX,21ps+
44 (A-101)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
45 (A-102)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
49 (A-143)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
50 (A-144)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
52 (A-146)	46,XY	ADN/MET	dim(1)(p36)	-	1psubtel (QBIOGENE)x2	1psubtel(P036B)x2,(SINDROMES)x2	46,XY.ish cgh dim(1)(p36).mlpa 1psubtel(P036B)x2,(SINDROMES)x2 --- 46,XY
53 (A-150)	46,XY	ADN/MET	dim(15)(15q24q26)	-	15q13q24 (SNRPN)x2 15q26.1 (63A23)x2 15q26.2 (120N1)x2	-	46,XY.ish cgh dim(15)(q24q26).ish 15q13q24 (SNRPN)x2.ish 15q26.1 (63A23)x2.ish 15q26.2 (120N1)x2 --- 46,XY,del(15)(q25)?

RESULTATS

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
54 (A-151)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
55 (A-153)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
56 (A-154)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
57 (A-155)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
58 (A-156)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	17psubtel(P036B)x2	46,XX.mlpa (P036B)x2 --- 46,XX
59 (A-157)	46,XX	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XX
60 (A-161)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
61 (A-166)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
62 (A-167)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
63 (A-168)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
64 (A-169)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
65 (A-170)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
66 (A-173)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	arr(1-22,X)x2		-	46,XX.arr(1-22,X)x2 --- 46,XX
67 (A-174)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
68 (A-175)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
69 (A-176)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
70 (A-177)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
71 (A-179)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
72 (A-182)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
73 (A-183)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
74 (A-184)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
75 (A-186)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
76 (A-187)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
77 (A-188)	46,XX	ADN/MET	dim(16)(q11.2q12)?	-	16q12.1 (136J14)x2 16q13 (105A3)x2	-	46,XX.ish 16q12.1 (136J14)x2.ish 16q13 (105A3)x2 --- 46,XX

RESULTATS

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
78 (A-189)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
79 (A-190)	46,XY	ADN/MET	enh(X)(q12q13)?	-	-	MRX (P106-B1)x2	46,XY.mlpa (P106-B1)x2 -- 46,XY
80 (A-191)	46,XX	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XX
81 (A-192)	46,XX	ADN/MET	dim(16)(q11.2q12)?	-	16q12.1 (136J14)x2 16q13 (105A3)x2	-	46,XX.ish 16q12.1 (136J14)x2.ish 16q13 (105A3)x2 --- 46,XX
82 (A-193)	46,XX	ADN/MET	dim(16)(q11.2q12)?	-	16q12.1 (136J14)x2 16q13 (105A3)x2	-	46,XX.ish 16q12.1 (136J14)x2.ish 16q13 (105A3)x2 --- 46,XX
83 (A-194)	46,XY	ADN/MET	enh(X)(q11.2q12)?	-	-	MRX (P106-B1)x2	46,XY.mlpa (P106-B1)x2 -- 46,XY
84 (A-195)	46,XY	ADN/MET	dim(16)(q11.2q12)?	-	16q12.1 (136J14)x2 16q13 (105A3)x2	-	46,XY.ish 16q12.1 (136J14)x2.ish 16q13 (105A3)x2 --- 46,XY
85 (A-196)	46,XY	ADN/MET	dim(16)(q11.2q12)?	-	16q12.1 (136J14)x2 16q13 (105A3)x2	-	46,XY.ish 16q12.1 (136J14)x2.ish 16q13 (105A3)x2 --- 46,XY

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
86 (A-198)	46,XY	ADN/MET	enh(X)(q12q13)?	-	-	MRX (P106-B1)x2	46,XY.mlpa (P106-B1)x2 -- 46,XY
87 (A-199)	46,XY	ADN/MET	equilibrat	-	-	-	46,XY
88 (A-200)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
89 (A-202)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY
90 (A-204)	46,XY	ADN	equilibrat	-	-	-	46,XY

Abreviacions: MET, preparació cromosòmica metafàsica; enh, guany; dim, pèrdua; ARZA, sonda comercial de Vysis corresponent a la banda 22q13.3; TUPLE, sonda comercial de Vysis corresponent a la banda 22q11.2; QBIOGENE, sonda subtelomèrica comercial de Qbiogene corresponent a 1pter; MRX, retard mental lligat al cromosoma X; P106-B1, kit de MLPA de la casa comercial MCR Holland que estudia les regions del cromosoma X associades a retard mental; P036B, kit de MLPA de la casa comercial MCR Holland que estudia totes les regions subtelomèriques; SINDROMES, kit de MLPA desenvolupat per la Unitat de Genètica de la Universitat Pompeu Fabra per a l'estudi de les regions del genoma associades a síndromes de microdeleció.

RESULTATS

Taula 7. Casos en què s'han trobat desequilibris i no s'ha pogut confirmar un cariotip normal.

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
34 (A-59)	46,XX	ADN/MET	Equilibrat	arr 8q12.1q12.3(60,799,914-64,946,286)x3,5p11 (46,153,466-4,154,374)x1,9q22.32(96,902,86-96,902,686)x1,10p12.1 (27,914,822-27,952,464)x1,15q25.1(76,612,193-76,639,418)x1	-	-	46,XX.arr 8q12.1q12.3(60,799,914-64,946,286)x3,5p11(46,153,466-4,154,374)x1,9q22.32(96,902,86-96,902,686)x1,10p12.1 (27,914,822-27,952,464)x1,15q25.1(76,612,193-76,639,418)x1 --- 46,XX,dup(8)(q12.1q12.3)
39 (A-73)	46,XY	ADN/MET	dim(9) (p23p24), enh(18) (q22q23)	-	9psubtel (QBIOGENE)x1 18qsubtel (QBIOGENE)x3	9psubtel(P036B)x1 18qsubtel(P036B)x3	46,XY.ish cgh dim(9)(p23p24),enh(18)(q22q23).mlpa 9psubtel(P036B)x1, 18qsubtel(P036B)x3 --- 46,XY,der(9)t(9;18)(p24;q22)
41 (A-95)	46,XX	ADN/MET	dim(1)(p36)	-	1psubtel (QBIOGENE)x1	1psubtel(P036B, SINDROMES)x1	46,XX.ish cgh dim(1)(p36).mlpa 1subtel(P036B,SINDROMES)x1 --- 46,XX,del(1)(p36.3)
46 (A-104)	46,XX	ADN	Equilibrat	arr 4p15.32(16,362,319-16,422,496)x3,10p12.1(27914,822-27,952,464)x1,10p11.23(29,053,623-29,234,923)x3	-	-	46,XX.arr 4p15.32(16,362,319-16,422,496)x3,10p12.1(27914,822-27,952,464)x1,10p11.23(29,053,623-29,234,923)x3 --- 46,XX,dup(4)(p15.32)
47 (A-141)	46,XY	ADN/MET	dim(5)(q15)	-	-	-	46,XY.ish cgh dim(5)(q15) --- 46,XY,del(5)(q15)
48 (A-142)	46,XX	ADN/MET	dim(1)(p36)	-	1psubtel(QBIOGENE)x2	1psubtel(P036B)x2, (SINDROMES)x1	46,XX.ish cgh dim(1)(p36).mlpa 1psubtel(SINDROMES)x1 --- 46,XX,del(1)(p36.3)

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	aCGH	FISH	MLPA	Fórmula cromosòmica final
51 (A-145)	46,XX	ADN/MET	dim(12)(q22q23)	-	-	-	46,XX.ish cgh dim(12)(q22q23) --- 46,XX,del(12)(q22q23)

Abreviacions: MET, preparació cromosòmica metafàsica; enh, guany; dim, deleció; P036B, kit de MLPA de la casa comercial MCR Holland que estudia totes les regions subtelomèriques; SINDROMES, kit de MLPA desenvolupat per la Unitat de Genètica de la Universitat Pompeu Fabra per a l'estudi de les regions del genoma associades a síndromes de microdeleció; QBIOGENE, sonda subtelomèrica comercial de Qbiogene corresponent a 1pter.

4.2. GRUP B. PACIENTS BARONS 46,XX

Aquest grup inclou 8 casos de pacients barons però amb cariotip 46,XX que van ser diagnosticats en presentar problemes d'esterilitat. A causa de la baixa incidència d'aquests individus en la població i del seu elevat interès científic, es va decidir treure'ls del grup A i agrupar-los dins d'aquesta minisèrie.

D'aquests 8 casos estudiats, un prové d'una nova mostra que va arribar al nostre laboratori –cas 91 (A-197)- i la resta són casos anteriorment analitzats però que han estat recuperats per a completar-ne l'anàlisi. D'aquests darrers, dos han estat estudiats pel nostre equip –casos 92 (MS-184), tesi Mònica Santos any 2007, i cas 98 (9805-493), tesi M^aÀngels Rigola any 2003, mentre que els altres sis provenen d'un altre centre, en aquest cas de l'Hospital de Maternitat de l'Hospital Clínic –casos 93-97, tesi Esther Margarit any 1998.

La presència de material derivat del cromosoma Y ha estat confirmada en tots els casos mitjançant FISH: als casos analitzats pel nostre grup (91, 92 i 98), s'ha aplicat la tècnica de la MFISH, mentre que als casos 93-97, s'ha utilitzat una sonda de pintat cromosòmic corresponent al cromosoma Y conjuntament amb sondes centromèriques dels cromosomes X i Y (Margarit, 1998). En tots els casos s'ha observat presència de material del cromosoma Y a l'extrem més terminal del braç curt del cromosoma X. L'aplicació de la tècnica de la PCR pel gen SRY als casos 93-98 va confirmar la presència d'aquest gen a tots aquests pacients (Margarit i col, 1998; Rigola i col, 2002); als casos 91 i 92 estan pendents els resultats d'aquesta anàlisi.

Nosaltres hem volgut ampliar l'estudi mitjançant l'aplicació de les tècniques de CGH/HR-CGH i MLPA en aquells casos en què encara no s'havien aplicat. L'objectiu ha estat determinar amb exactitud els desequilibris genòmics implicats en aquests intercanvis de material entre les regions pseudoautosòmiques (PAR1) dels cromosomes sexuals durant la meiosi paterna. A totes les mostres analitzades, la CGH/HR-CGH confirma els resultats anteriors detectant un guany de material del cromosoma Y corresponent a la regió Yp11.2p11.3. A més a més, en 3 pacients –casos 91, 96 i 97- el perfil sembla indicar, també, pèrdua de material de l'extrem més terminal del braç curt del cromosoma X. Tanmateix, l'anàlisi posterior mitjançant MLPA i FISH subtelomèrica no ha confirmat aquests darrers resultats en no detectar cap pèrdua a la regió subtelomèrica del Xp en cap dels casos analitzats. A continuació es mostren amb detall els resultats d'aquests 8 pacients; les seves corresponents imatges es troben a l'annex 1.

RESULTATS

Taula 8. Resultats obtinguts de l'anàlisi citogenètica dels barons 46,XX.

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	FISH / PCR	MLPA	Fórmula cromosòmica final
91 (A-197)	46,XX	ADN/MET	dim(X)(p22.3), enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/-	Xpsubtel(P070)x2	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3).ish cgh dim(X)(p22.3),enh(Y)(p11.2p11.3).mlpa Xpsubtel (P070)x2 --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.3)
92 (MS-184)	46,XX	ADN/MET	enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/-	Xpsubtel(P070)x2	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3).ish cgh enh(Y)(p11.2p11.3).mlpa Xpsubtel (P070)x2 --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.3)
93 (10)	46,XX	ADN	enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/Yp11.31(SRY)+	Xpsubtel(P070)x2	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2).ish cgh enh(Y)(p11.2p11.3).mlpa Xpsubtel (P070)x2 --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.3)
94 (1041)	46,XX	ADN	enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/Yp11.31(SRY)+	-*	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2).ish cgh enh(Y)(p11.2p11.3) --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.2)
95 (1155)	46,XX	ADN	enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/Yp11.31(SRY)+	-*	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2).ish cgh enh(Y)(p11.2p11.3) --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.2)

Cas	Cariotip	Material	CGH/HR-CGH	FISH / PCR	MLPA	Fórmula cromosòmica final
96 (1389)	46,XX	ADN	dim(X)(p22.3), enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/Yp11.31(SRY)+	Xpsubtel(P070)x2	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2).ish cgh dim(X)(p22.3),enh(Y)(p11.2p11.3).mlpa Xpsubtel (P070)x2 --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.2)
97 (3607)	46,XX	ADN	dim(X)(p22.3), enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/Yp11.31(SRY)+	Xpsubtel(P070)x2	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2).ish cgh dim(X)(p22.3),enh(Y)(p11.2p11.3).mlpa Xpsubtel (P070)x2 --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.2)
98 (9805-493)	46,XX	ADN/MET	enh(Y)(p11.2p11.3)	wcpY+/Yp11.31(SRY)+	**	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2).ish cgh enh(Y)(p11.2p11.3) --- 46,X,der(X)t(X;Y) (p22.3p11.2)

Abreviacions: MET, preparació cromosòmica metafàsica; enh, guany; dim, deleció; wcp, sonda de pintat cromosòmic. * en aquests dos casos, no es va poder realitzar l'estudi de MLPA per mala qualitat de l'ADN (puresa molt baixa); **en aquest cas, tampoc es va poder realitzar l'estudi de MLPA per manca de material.

4.3. GRUP C. PACIENTS AMB ANOMALIA CROMOSÒMICA “APARENTMENT” EQUILIBRADA

En aquest grup s'inclouen nou individus amb reorganitzacions cromosòmiques aparentment equilibrades. La mostra 101 (A-44) és una mare d'un fetus –cas 131 (A- 45) del grup E- que va ser avortat a causa d'un diagnòstic ecogràfic de malformacions múltiples; la mostra 107 (A-148), es tracta d'una mare d'un nen –cas 123 (A-147) del grup D- amb malformacions congènites i quadre clínic . També s'han estudiat tres pacients amb inversions (implicant els cromosomes 7, 9 i 19), cinc pacients amb translocacions recíproques, un cas amb un derivatiu del cromosoma 7 i un cas amb una reorganització cromosòmica complexa -cas 125 (A-163).

Amb l'objectiu de descartar possibles alteracions subtils associades a les reorganitzacions cromosòmiques i una possible implicació -no visible per bandes G- d'altres cromosomes en l'alteració, s'ha aplicat la tècnica de la M-FISH a cadascun dels casos.

D'altra banda, l'estudi d'Hibridació Genòmica Comparada de sis de les nou mostres, ha permès descartar desequilibris del genoma superiors a 3Mb. Als casos restants no s'ha pogut realitzar l'anàlisi de CGH/HR-CGH en no disposar d'una nova mostra per fer extracció d'ADN.

També, l'aplicació de bateries de sondes BAC en tres casos -101 (A-44), 102 (A-46) i 105 (A-92)- ha permès una caracterització molt més acurada dels punts de trencament de la translocació.

En resum, s'ha confirmat la presència d'un cariotip equilibrat –és a dir, absència de desequilibris genòmics superiors a 3Mb- en tots els casos i, a més a més, en cinc dels nou pacients s'ha aconseguit caracteritzar amb molta més precisió l'anomalia cromosòmica estudiada.

A la Taula 9, es mostren amb detall els resultats obtinguts; les seves corresponents imatges es troben a l'annex 1.

RESULTATS

Taula 9. Casos amb alteracions aparentment equilibrades analitzades en aquest treball.

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	MFISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
99 (A-30)	46,XX,inv(9)(p12q13)	?	ADN/ MET	equilibrat	ish (wcp9+)	-	46,XX,inv(9)(p12q13)
100 (A-42)	46,XX,t(1;21)(p21;q11.1)	dn	ADN/ MET	equilibrat	ish t(1;21)(wcp1+,wcp21+)	-	46,XX,t(1;21)(p21;q11.1).ish (wcp1+,wcp21+) --- 46,XX,t(1;21)(p21;q11.1)
101 (A-44)	46,XX,t(10;15)(q25.3;q14)	mat	MET	-	ish t(10;15)(wcp10+,wcp15+)	t(10;15)(93I17+;10I10+, 248I17+,133K1+)	46, XX, t(10;15)(q25.3;q15.1).ish t(10;15)(93I17+;10I10+, 248I17+,133K1+) --- 46, XX, t(10;15)(q25.3;q15.1)
102 (A-46)	46,XX,t(11;15)(p12;q13)	?	MET	-	ish t(11;15)(wcp11+,wcp15+)	t(11;15) (93I17+;25D17+,11J16+, 10I10+,248I17+,133K1+)	46, XX, t(11;15)(p12;q15.1).ish t(11;15) (93I17+;25D17+,11J16+,10I10+,248I17+, 133K1+) --- 46, XX, t(11;15)(p12;q15.1)
103 (A-49)	46,XX,der(7)inv(7)(p13q22) t(2;7)(q21;p13)	?	ADN/ MET	equilibrada	ish (wcp7+)	-	46,XX,der(7)inv(7)(p13q22) t(2;7)(q21;p13)
104 (A-79)	46,XX,inv(7)(q11.2q22)	pat	ADN/ MET	equilibrat	ish (wcp7+)	-	46, XX inv(7)(q11.2q22)
105 (A-92)	46,XY,t(16;19)(q13;q13.4)	dn	ADN/ MET	equilibrat	ish t(16;19)(wcp16+,wcp19+)	t(16;19) (691H23+,79A3+,158G1 9+; 316I4+,38C1+,45P2+,35 9H23+,841J24+,374A11 +,43N16+)	46,XY,t(16;19)(q13;q13.32). ish t(16;19) (691H23+,79A3+,158G19+;316I4+,38C1+,4 5P2+,359H23+,841J24+,374A11+,43N16+) --- 46,XY,t(16;19)(q13;q13.32)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HR-CGH	MFISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
106 (A-100)	46,XY,t(5;18)(q13;q11.2)	?	MET	-	ish t(5;18)(wcp5+,wcp18+)	-	46,XY,t(5;18)(q13;q11.2). ish t(5;18)(wcp5+,wcp18+) --- 46,XY,t(5;18)(q13;q11.2)
107 (A-148)	46,XX,inv(19)(p13.3q13.3)	?	AND/MET	equilibrat	ish (wcp19+)	19psubtlel (CYTOCELL)x2 19qsubtel (CYTOCELL)x2	46,XX,inv(19)(p13.3q13.3).ish 19psubtlel (CYTOCELL)x2,19qsubtel (CYTOCELL)x2 --- 46,XX,inv(19)(p13.3q13.3)
108 (A-163)	46,XX,RCC	MET	-	-	der(1)(wcp1+,wcp5+) der(5)(wcp5+,wcp10+) der(10)(wcp5+,wcp10+)	-	46,XX,der(1).ish ins(5;1)(wcp5+,wcp1+), der(5).ish t(5;10)(wcp5+,wcp10+), der(10).ish t(5;10)(wcp5+,wcp10+) --- 46,XX,der(1)ins(5;1)(q35;q32q31), der(5)t(5;10)(q33;q26),der(10)t(5;10) ins(5;1)

Abreviacions: MET, preparació cromosòmica metafàsica; enh, guany; dim, deleció; wcp, sonda de pintat cromosòmic; CYTOCELL,, sonda subtelomèrica comercial de CytoCELL corresponent a 19pter i 19qter.

4.4. GRUP D. PACIENTS AMB MONOSOMIES PARCIAIS O TRISOMIES PARCIAIS

En aquest grup s'han inclòs tots aquells pacients que presentaven monosomies i/o trisomies parcials en el seu cariotip i que no havien pogut acabar de ser caracteritzades per citogenètica convencional. S'han inclòs tots aquells casos que presentaven un desequilibri genòmic, ja fos autosòmic com gonosòmic.

A la Taula 10 es resumeixen els resultats obtinguts amb les diferents tècniques de citogenètica molecular aplicades a cada cas. Concretament, es detalla el cariotip del pacient, l'origen de l'anomalia cromosòmica (heretada o *de novo*) en cas de tenir aquesta informació, el material de què es disposava per fer l'estudi, els resultats obtinguts amb les tècniques de CGH, HR-CGH, M-FISH, altres tècniques de FISH, MLPA i aCGH, i finalment la fórmula cromosòmica final tenint en compte tots els resultats anteriors. Totes les mostres han estat analitzades mitjançant CGH/HR-CGH. En un 77,8% el desequilibri identificat ha estat confirmat per MLPA, FISH ó aCGH; la resta de casos (109, 112, 117 i 121) no ha estat possible aquesta comprovació per FISH en no disposar de suspensió cel·lular fixada en Carnoy.

S'ha analitzat un total de 18 pacients, dels quals 8 presentaven monosomies parcials, 7 trisomies parcials i 3, una combinació de monosomia i trisomia parcials.

Les monosomies parcials identificades han implicat preferentment els cromosomes 2, 8, 10, 11, 15 i 18 (Fig. 24) i corresponen a:

- **delecions terminals** (casos 117, 120 i 124)
- **delecions intersticials** (casos 109 i 121))
- **anells** (casos 112, 125 i 126)

Les set trisomies parcials caracteritzades han implicat preferentment els cromosomes 2, 8, 9, 10, 17, 19 i 22 (Fig. 24) i corresponen a:

- **duplicacions terminals** (cas 111)
- **duplicacions intersticials** (casos 116 i 122)
- **inversió-duplicació** (casos 114 i 123)
- **guanys resultat de translocacions desequilibrades** (casos 115 i 118)

Finalment, els tres casos que presentaven una monosomia parcial i una trisomia parcials simultàniament implicaven preferentment els cromosomes 5, 11, 18 i Y (Fig. 24):

- **inversió-duplicació** (cas 110)
- **guanys i pèrdues resultat de translocacions desequilibrades** (casos 113 i 119)

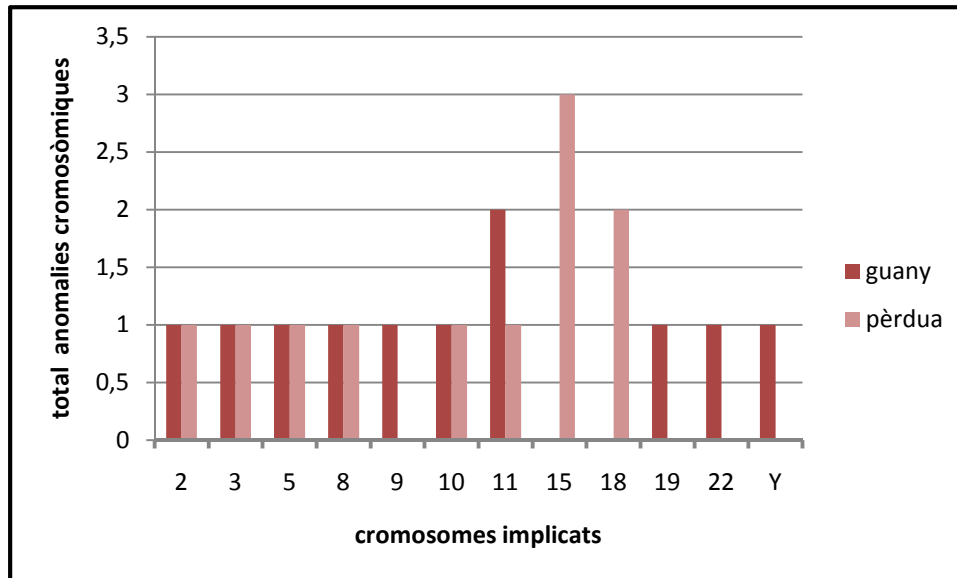


Figura 24. Cromosomes implicats en els casos de monosomies i trisomies parcials estudiats.

En resum, s'ha confirmat el desequilibri genòmic detectat per l'estudi de la Hibridació Genòmica Comparada en un 77.8% dels casos analitzats; només en una única ocasió, el cas 124 (A-159), s'ha descartat l'existència de desequilibri genòmic, d'acord amb els resultats de la CGH/HR-CGH, MLPA i FISH. D'altra banda, s'ha pogut identificar l'origen cromosòmic de cadascun dels desequilibris de tots els casos estudiats i s'ha aconseguit, també, una caracterització de l'alteració cromosòmica molt més precisa en el 94% dels casos.

A continuació, es mostren amb detall els resultats dels pacients d'aquest grup a la Taula 10; les seves corresponents imatges es troben a l'annex 1.

Taula 10. Casos amb monosomies o trisomies parcials estudiats en aquest treball.

Cas	Cariotip	Material	CGH/HRCGH	MLPA	FISH	CGH-Array	Fórmula cromosòmica final
109 (A-9)	46,XY del(2)(q33q34)	ADN	dim(2)(q33q34)	-	-	-	46,XY del(2)(q33q34).ish cgh dim(2)(q33q34) --- 46,XY del(2)(q33q34)
110 (A-15)	46,XX,der(5)	ADN/ MET	dim(5)(p15.1pter), enh(5)(p13.1p14.1)	-	wcp(5+) der(5)(192H6++,96F10++, 612J21++,507F11++, 760E04++,246M9-, 5J18-,433B15-, 374E21-,683D22-)	arr 5p14.2pter(24,345,314- 44,000,000)x1, 5p12p14.2(24,374,567- 45,099,078)x3	46,XX.arr 5p14.2pter(24,345,314- 44,000,000)x1, 5p12p14.2(24,374,567- 45,099,078)x3.ish cgh dim(5)(p15.1pter), enh(5)(p13.1p14.1).ish der(5)(192H6++,96F10++,612J21++, 507F11++,760E04++,246M9-,5J18- ,43315-, 374E21-,683D22-) --- 46,XX,invdup(5)(13.1p14.1)del(5) (p14.2pter)dup(5)(p12)
111 (A-29)	46,XX,add(3)(pter)	ADN/MET	enh(3)(pter)?	3psubtel (P070)x1	wcp(3+)	-	46,XX,dup(3).mlpa 3psubtel (P070)x1 --- 46,XX,dup(3)(?),del(3)(p26)
112 (A-38)	46,XY,r(18)	ADN	dim(18)(q23)	-	-	-	46,XY,r(18),del(18)(q23).ish cgh dim(18)(q23) --- 46,XY,r(18)del(18)(q23)
113 (A-43)	46,XY,der(18)	ADN/ MET	dim(18)(q22q23), enh(Y)(q11.2)	-	wcpY+	-	46,XY,der(18).ish cgh dim(18)(q22q23),enh(Y)(q11.2) --- 46,XY,der(18)t(Y;18)(q11.23;q22)

RESULTATS

Cas	Cariotip	Material	CGH/HRCGH	MLPA	FISH	CGH-Array	Fórmula cromosòmica final
114 (A-47)	46,XY,der(8)	ADN/ MET	enh(8)(p12p22)	-	wcp8+	-	46,XY,der(8).ish cgh enh(8)(p12p22).ish der(8)(wcp8+) --- 46,XY,invdup(8p12p22)
115 (A-61)	46,XX,der(17)	ADN/ MET	enh(22)(q13)	-	22q13.3 (ARZAx3) 22q11.2 (TUPLEx2)	-	46,XX,der(17).ish cgh enh(22)(q13).ish 22q13.3 (ARZAx3),22q11.2 (TUPLEx2) --- 46,XX,der(17)t(17;22)(p13;q13)
116 (A-75)	46,XX,der(9)	ADN/ MET	enh(9)(q34)	-	wcp9+	-	46,XX,der(9).ish cgh enh(9)(q34).ish der(9)(wcp9+) --- 46,XX,dup(9)(q34.3)
117 (A-76)	46,XX,del(11)(q23)	ADN	dim(11)(q23q25)	-	-	-	46,XX,del(11)(q23q25).ish cgh dim(11)(q23q25) --- 46,XX,del(11)(q23)
118 (A-80)	46,XY,der(8)	ADN/ MET	enh(2)(p24)	-	wcp2+	-	46,XY,der(8).ish cgh enh(2)(p24).ish der(2)(wcp2+) --- 46,XY,der(8)t(2;8)(p24;p23)
119 (A-93)	46,XY,der(11)	ADN/ MET	enh(11)(q22q23)/ dim(11)(q24)?	-	11q24.3 (535N6)x1	-	46,XY,der(11).ish cgh enh(11)(q22q23).ish 11q24.3 (535N6)x1 --- 46,XY,der(11)t(11;11)(q24.3;q22)
120(A-96)	46,XX,del(10)(q26)	ADN/ MET	dim(10)(q25.2q26.1)	10qsubtel(P036B)x2	-	-	46,XX,del(10)(q25.2q26).ish cgh dim(10)(q25.2q26.1).mlpa 10qsubtel (P036B)x2 --- 46,XX,del(10)(q25.2q26.1)
121 (A-98)	46,XX,del(15)(q)	ADN	dim(15)(q13q15)	-	-	-	46,XX,del(15)(q).ish cgh dim(15)(q13q15) --- 46,XX,del(15)(q13q15)

Cas	Cariotip	Material	CGH/HRCGH	MLPA	FISH	CGH-Array	Fórmula cromosòmica final
122 (A-103)	46,XY,der(10)	ADN	enh(10)(p12p15)	-	wcp10+	-	46,XY,dup(10).ish cgh enh(10)(p12p15).ish der(10)(wcp10+) --- 46,XY,dup(10)(p12p15)
123 (A-147)	46,XY,der(19)mat	ADN	enh(19)(q13.3qter)	-	wcp19+ 19psubtlel (CYTOCELL)x1 19qsubtel (CYTOCELL)x3	-	46,XY,der(19).ish cgh enh(19)(q13.3qter).ish der(19)(wcp+).ish 19psubtlel (CYTOCELL)x1, 19qsubtel (CYTOCELL)x3 --- 46,XY, rec (19)dup(19q)inv(19)(p13.3q13.3)mat
124 (A-159)	46, XX,del(8)(p23.2)	ADN/MET	equilibrada	8psubtel (P036B)x2	wcp8+ 8psubtel (CYTOCELL)x2	-	46, XX,del(8)(p23.1p23.1).ish der(8)(wcp8+).mlpa 8psubtel (P036B)x2.ish 8psubtel (CYTOCELL)x2 --- 46,XX
125 (M71)	46,XX,r(15)	ADN/MET	dim(15)(q26.2qter)	-	cep(15)(D15Z1,D15Z4)x1 15q26.1 (63A23)x2 15q26.2 (120N1)x2 15q26.3 (80F4)x1 15q26.3 (89K11)x1	-	46,XX,r(15)(p11q26).ish cgh dim(15)(q26.2qter).ish der(15)(D15Z1-,D15Z4- ,63A23+,120N1+, 80F4-,89K11-) --- 46,XX,r(15)(p11.1q26.2)
126 (M74)	46,XX,r(15)	ADN/MET	dim(15)(q26.3)	-	cep(15)(D15Z1,D15Z4)x1 15q26.1 (63A23)x2 15q26.2 (120N1)x2 15q26.3 (89K11)x1	-	46,XX,r(15)(p11q26).ish cgh dim(15)(q26.3).ish der(15) D15Z1- ,D15Z4-,63A23+,120N1+, 89K11-) --- 46,XX,r(15)(p11.1q26.2)

Abreviacions: MET, preparació cromosòmica metafàsica; enh, guany; dim, deleció; wcp, sonda de pintat cromosòmic; P036B i P070, kits de MLPA de la casa comercial MCR Holland que estudien totes les regions subtelomèriques; CYTOCELL, sonda subtelomèrica comercial de CYTOCELL corresponent a 8pter; ARZA, sonda comercial de Vysis corresponent a la banda 22q13.3; TUPLE, sonda comercial de Vysis corresponent a la banda 22q11.2.

4.5. GRUP E. PACIENTS AMB CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS (SMCs)

Aquest grup inclou tots els casos en què es va detectar la presència d'un o múltiples cromosomes marcadors per citogenètica convencional. En total s'han analitzat 19 casos, dels quals un 31.6% es presenten en mosaic. En només 8 casos s'ha pogut saber si el marcador és *de novo* o hereditat. Un 31.6% corresponen a casos prèviament analitzats pel nostre equip (tesi Cristina Hernando, 2005; tesi Monica Santos, 2007) o per altres grups (tesi Olaya Villa, 2009) per a completar l'anàlisi amb altres metodologies.

Amb l'objectiu de determinar l'origen del material genètic contingut en cadascun dels cromosomes marcadors, s'ha aplicat la següent bateria de tècniques: CGH, HR-CGH, M-FISH, cenM-FISH, MCB i FISH (sondes BAC, sondes de pintat cromosòmic, sondes centromèriques i/o subtromèriques i sondes LSI: *DiGeorge*, *SNRPN*, *PLM*,...). En únicament un cas no s'ha pogut determinar amb exactitud l'origen d'aquest material genètic (128 (A-28) pot tractar-se d'una invdup13, 14, 21 o 22); en un segon cas, el 139 (A-178), només es va poder determinar que es tractava d'un *minute* derivatiu del cromosoma 7, sense haver pogut especificar exactament el material eucromàtic present al marcador. En ambdós casos, el material fixat en Carnoy era insuficient per aprofundir en l'estudi.

Respecte la morfologia dels cromosomes marcador estudiats a la nostra sèrie, cal dir que en 10 casos es tractava de derivatius del cromosoma 15. D'aquests, un 70% (7 casos) eren marcadors dicèntrics, no es trobaven en mosaic i només en un 30% (3 casos) es va detectar material eucromàtic; un 20% (2 casos) dels sSMC (15) tenien un sol centròmer i el 10% restant (1 cas) es tractava d'un marcador acèntric amb neocentròmer. Els dicèntrics amb material eucromàtic eren els que tenien una mida més gran, excepte el cas 131, en què el marcador va resultar ser un derivatiu del 15 fruit d'una translocació entre els cromosomes 10 i 15 d'origen matern; tota la resta, eren marcadors de petit tamany.

Pel que fa als tres casos de sSMC derivatius del cromosoma 8, en un sol cas el marcador es trobava a totes les metafases analitzades, mentre que als altres dos casos es trobava en mosaic. Tots els sSMC (8) eren marcadors *minute* amb presència de material eucromàtic; en dos d'ells es va confirmar la morfologia de marcador en anell i la presència d'un centròmer per FISH. Al tercer cas no va ser possible determinar la presència de centròmer per manca de suficient material fixat; tanmateix, tenint en compte que és present a totes les cèl·lules i és positiu per bandes C, podem afirmar que també té un centròmer.

Respecte als dos casos de sSMC derivatius dels cromosomes 13/21 o 14/22, cal dir que es tracta de marcadors petits i presents a totes les metafases analitzades. Únicament es va poder confirmar la presència de centròmer per FISH en un únic cas, però com al cas anterior, el fet que el marcador no estigui en mosaic i sigui positiu per bandes C, fa que es pugui afirmar que té centròmer. No es va detectar material eucromàtic en cap dels dos casos.

Finalment, en referència als sSMC detectats una sola vegada tenim: el SMC(2), que és un marcador molt petit o *minute*, en mosaic, i amb un sol centròmer, que ha estat confirmat per FISH; el SMC (7), que és un marcador *minute* que s'ha trobat a totes les metafases amb presència de material eucromàtic i al que no ha estat possible confirmar la presència de centròmer per FISH; el SMC (9), que és un marcador *minute*, en mosaic, i amb presència de material eucromàtic (en aquest cas, tampoc ha resultat possible la confirmació per FISH de la presència de centròmer, però el fet que a tots dos casos no estigui en mosaic fa pensar que sí que en té); i el SMC (22) que es tracta d'un marcador petit, amb centròmer i amb presència de material eucromàtic.

A la Taula 11 es resumeixen les característiques generals dels cromosomes marcadors supernumeraris (sSMC) de la nostra sèrie.

A la Taula 12, es detalla tota la informació obtinguda per citogenètica convencional i a través de la bateria de tècniques anteriorment citada, així com l'origen del marcador en els casos en què ha estat possible aconseguir aquesta informació. En 17 dels 19 casos s'ha pogut identificar l'origen cromosòmic del material genètic present al marcador; d'aquests, el 47% estaven constituïts exclusivament per material heterocromàtic. També, cal destacar que dels dos casos (137 i 143) en què es va detectar la presència de dos cromosomes marcadors per bandes G, un cop aplicada la bateria de tècniques citada anteriorment, aquest dos marcadors van poder ser classificats com a diferents en el primer cas i com a idèntics en el segon.

Taula 11. Característiques generals dels sSMC de la nostra sèrie.

Morfologia i distribució dels sSMC		Cromosoma implicat: Referència del cas							
		sSMC (2)	sSMC (7)	sSMC (8)	sSMC (9)	sSMC (13)	sSMC (13/21)/ (14/22)	sSMC (15)	sSMC (22)
Dicèntric Eucromatina	Mosaic	-	-	-	-	-	-	-	-
	No mosaic	-	-	-	-	-	-	129, 134, 144	-
Dicèntric Heterocromatina	Mosaic	-	-	-	-	-	128, 140	-	-
	No mosaic	-	-	-	-	-	-	133, 142, 143, 145	-
Un centròmer Eucromatina	Mosaic	-	-	132, 137	137	-	-	-	141
	No mosaic	-	139	-	-	-	-	131	-
Un centròmer Heterocromatina	Mosaic	136	-	-	-	-	-	-	-
	No mosaic	-	-	-	-	-	-	138	-
Acèntric Eucromatina	Mosaic	-	-	130	-	-	-	146	-
	No mosaic	-	-	-	-	135	-	-	-

Els cromosomes implicats en la formació d'aquests marcadors s'indiquen a la Fig. 25.

Els cromosomes marcadors identificats són:

- derivatius del cromosoma 2: 1 cas (136)
- derivatius del cromosoma 7: 1 cas (139)
- derivatius del cromosoma 8: 3 casos (130, 132 i 137)
- derivatius del cromosoma 9: 1 cas (137)
- derivatius del cromosoma 13: 1 cas (135)
- derivatius del cromosoma 13/21 o 14/22: 2 casos (128, 140)

RESULTATS

- **derivatius del cromosoma 15:** 10 casos (129, 131, 133, 134, 138, 142, 143, 144, 145 i 146)
- **derivatius del cromosoma 22:** 1 cas (141)

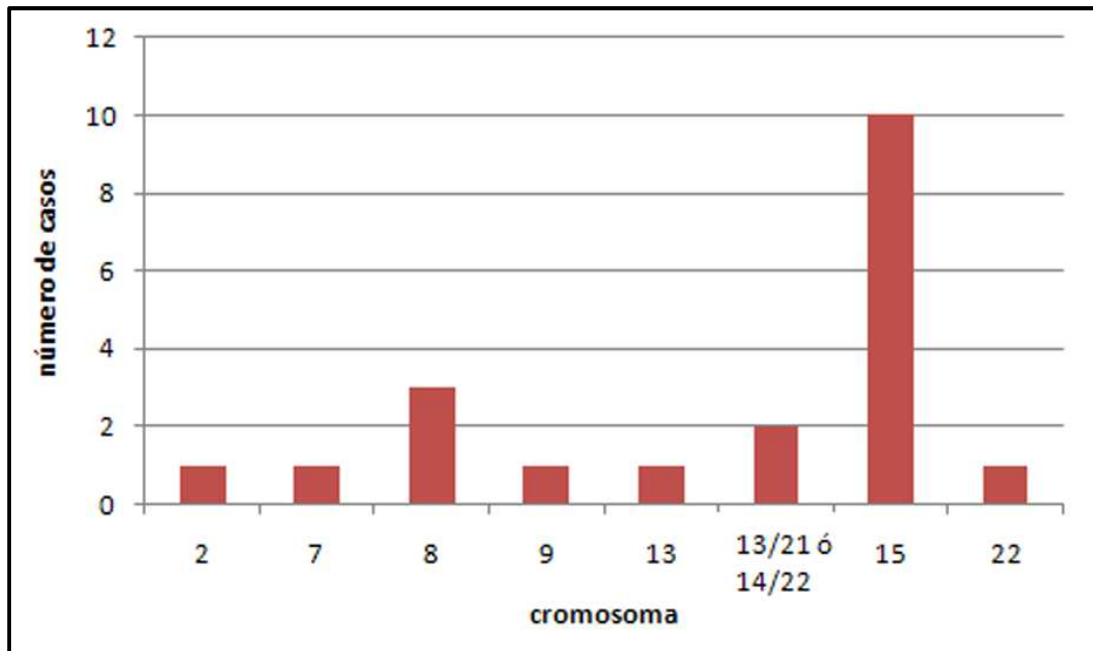


Figura 25. Cromosomes implicats en la formació de sSMC.

Els cromosomes marcadors amb euromatina impliquen les següents bandes/regions cromosòmiques: 8p22p23, 13q32.3, 15q13.1, 15q13.2, 15q15.1, 15q26.1q26.3 i 22q11.2.

En resum, la utilització de les tècniques de CGH/HR-CGH, de sondes subcenMFISH i de BACs ha permès una identificació molt acurada de tots els casos estudiats.

A continuació, a la Taula 12 es mostren amb detall tots els resultats obtinguts de cada cas; les seves corresponents imatges es troben a l'annex 1.

Taula 12. Cromosomes marcadors supernumeraris caracteritzats en aquest treball.

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HRCGH	MFISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
128 (A-28)	47,XX,+mar [100%]	dn	MET	-	-	cep(15)(D15Z1-,D15Z4-) 15q11.2 (171C8)-,15q13.1 (268O3)-, 15q15.1 (248I17)- MCB (15-), 15qsubtel-,SNRPN-,PML-	47,XX,+mar. ish cep(15)(D15Z1 -,D15Z4-).ish (171C8- 268O3-,248I17-).ish MCB (15-).ish 15qsubtel- ish (PML-,SNRPN-) --- 47,XX,+mar
129 (A-34)	47,XY,+mar [100%]	dn	ADN/ MET	enh(15)(q11.2q 13)/ enh(15)(q11.2 q15.1)	-	cenMFISH (cep15++) der(15)(D15Z1++,D15Z4++,268O3++,138C5 ++, 25D17-,11J16-,128A17-,736J24-)	47,XY,+mar.ish cgh enh(15)(q11.2q13).ish cenMFISH (cep15++) .ish der(15)(D15Z1++,D15Z4++,268O3++,138C5++,25D17 -, 11J16-,128A17-,736J24-) --- 47,XY,+invdup(15)(q13.1)
130 (A-37)	47,XX,+mar [100%]	dn	ADN/ MET	enh(8)(p22p23)	-	der(8)(wcp8+)	47,XX,+mar.ish cgh enh(8)(p22p23).ish der(8)(wcp8+) --- 47,XX,+der(8)(p22p23)
131 (A-45)	47,XX,+der(15) [100%]	mat	MET	-	-	der(15)(D15Z1+,D15Z4+, 133K1+, 93I17-)	47,XX,+mar(15)(q15.1).ish der(15)(D15Z1+,D15Z4+, 133K1+,93I17-) --- 47,XX,+der(15)(q15.1)
132 (A-50)	47,XY,+mar[84]/46,XY[16]	dn	ADN/ MET	equilibrada	-	der(8)(wcp8+) cenMFISH (cep8+) der(8)(503E24+,116A4+)	47, XY,+mar[81]/48,XY,+2mi[1]/46,XY[18].ish der(8)(wcp8+).ish cenMFISH (cep8+).ish der(8)(503E24+,116A4+) --- 47,XY,+r(8)(p11.2q12)[81]/46,XY[19]
133 (A-60)	47,XX,+mar [100%]	dn	MET	-	-	cenMFISH (cep 15++) der(15)(D15Z1++,D15Z4++,171C8- ,570N16- 10I10-,128A17-)	47,XY,+mar.ish cenMFISH (cep 15++) .ish der(15)(D15Z1++,D15Z4++,171C8-,570N16-,10I10- ,128A17-) --- 47,XY,+invdup(15)(q11.1)

RESULTATS

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HRCGH	MFISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
134 (A-64)	47,XX, +mar [100%]	?(adoptada)	ADN/ MET	enh(15)(q11.2q13.1)/ enh(15)(q11.2q15.1)	wcp15	cenMFISH (cep15++) der(15)(D15Z1++,D15Z4++,110H13++, 138C5++,570N16++,268O3++, 261B23++,10I10-,248I17-)	47,XX,+mar.ish cgh enh(15)(q11.2q13.1).ish cenMFISH (cep15++)ish der(15)(D15Z1++,D15Z4++, 110H13++,138C5++,570N16++, 268O3++,261B23++,10I10- ,248I17-) --- 47,XX,+invdup(15)(q13.2)
135 (A-78)	47,XX, +mar [100%]	dn	ADN/ MET	enh(13)(q32q34)	wcp13	MCB (13+) 13qsubtlel ++ cenMFISH (cep13/21 -) der(13)(midi 54 -,89H21-,110K18-)	47,XX,+mar.ish cgh enh(13)(q32q34).ish der(13)(wcp13+).ish MCB (13+).ish der(13)(qsubtlel++)ish cenMFISH (cep13/21 -).ish der(13) (midi 54-,89H21-,110K18-) 47,XX,del(13)(q32.3),+ invdup(13)(q32.3)
136 (A-106)	47,XY,+mar[7]/46,XY [93]	dn	MET	-	-	cenMFISH (cep2+) der(2)(316G9-,708D7-)	47,XY,+mar[7]/46,XY[93].ish cenMFISH (cep2+).ish der(2) (316G9-,708D7-) --- 47,XY,+min(2)(p11.1q11.1)

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HRCGH	MFISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
137 (A-158)	47,XY, +mar/48,XY,+mar1,+mar2/46,XY	?	ADN/ MET	enh(9)(p11.2p12)/ enh(8)(p12p21)	-	mar1: cenMFISH (cep9+)der(9)(midi36+,bA128P23+, bA430C15-) mar2: MCB (8+)	47,XY, +mar/48,XY,+mar1,+mar2/ 46,XY.ish cgh enh(8)(p12p21),enh(9)(p11.2p12).ish MCB (8+).ish cenMFISH (cep9+).ish der(9)(midi36+,128P23+,430C15-) --- 47,XY,+min(9)(p12q12)/48,XY,+ min(9)(p12q12),+r(8)(p21q11.21)/ 46,XY
138 (A-165)	47,XX, +mar[100%]	dn	ADN/ MET	equilibrada	ni	cenMFISH (cep15+) der(15)(307C10-)	47,XX, +mar.ish der(15) cenMFISH (cep15+).ish der(15)(307C10-) --- 47,XX,+r(15)(p11q11.1)
139 (A-178)	47,XY, +mar [100%]	dn	MET	-	wcp7	cep15 -, cep13/21 -, cep14/22 -, cep X,Y - MCB (7+)	47,XY, +mar.ish der(7)(wcp7+).ish MCB (7+), der(7)(cep15-,cep13/21-, cep14/22-,cepX,Y-) --- 47,XY,+min(7)
140 (07LA494)	47,XX,+ mar [100%]	mat	MET	-	-	cenMFISH (cep13/21++) der(13/21)(110K18-,89H21-)	47,XX,+ mar.ish der(13/21)cenMFISH (cep13/21++).ish der(13/21) (110K18-,89H21-) --- 47,XX,+invdup(13/21)(q11.1)
141 (07LA717)	47,XYqs,+mar[78]/46,XYqs[22]	dn	ADN/ MET	equilibrada	wcp22	22q11.2 (TUPLE+) 22q13.3 (ARZA-)	47,XYqs,+mar[78]/46,XY[22].ish der(22)(wcp22+).ish der(22) (TUPLE+, ARZA-) --- 47,XYqs,+der(22)(q11.2)

RESULTATS

Cas	Cariotip	Origen	Material	CGH/ HRCGH	MFISH	FISH	Fórmula cromosòmica final
142 (M13)	47,XX,+mar [100%]	¿	ADN/ MET	equilibrada	wcp15	der(15)(D15Z1++,D15Z4 ++, SNRPN -,MD54 ++, pcp15q-, 131I21-,570N16-)	47,XX,+mar.ish der(15)(wcp15+).ish der(15)(D15Z1++,D15Z4 ++, SNRPN - ,MD54 ++, pcp15q-,131I21-,570N16-) --- 47,XX,+invdup(15)(q11.1)
143 (M14)	48,XY,+2mar [100%]	mat	ADN/ MET	equilibrada	wcp15	der(15)(D15Z1++, D15Z4 ++, SNRPN -,MD54 ++, pcp15q-, 131I21-,570N16 -)	48,XY,+2mar.ish der(15)(wcp15+). ish der(15)(D15Z1++, D15Z4 ++, SNRPN-,MD54 ++, pcp15q-, 131I21-,570N16 -) --- 48,XX,+invdup(15)(q11.1)x2
144 (M20)	47, XY,+mar [100%]	dn	ADN/ MET	enh(15)(q11.2q13)	wcp15	der(15)(D15Z1++, D15Z4 ++,SNRPN +, 171C8++,570N16++,268O3++, 25D17 -,11J16-)	47,XY,+mar.ish cgh enh(15)(q11.2q13).ish der(15)(wcp15+).ish der(15)(D15Z1++, D15Z4 ++,SNRPN +, 171C8++,570N16++,268O3++, 25D17 -,11J16-) --- 47,XY,+invdup(15)(q13.1)
145 (M42)	47,XX,+mar[100%]	dn	ADN/ MET	equilibrada	-	der(15)(D15Z1++, D15Z4 ++, SNRPN -,131I21 -,268O3-)	47,XX,+mar.ish der(15)(D15Z1++, D15Z4 ++, SNRPN -,131I21 -,268O3-) --- 47,XX,+invdup(15)(q11.1)
146 (MS-50)	47,XY,+mar[35]/46,XY [65]	dn	ADN/ MET	enh(15)(q26.1q26.3)/ equilibrat	wcp15	der(15)(D15Z1-, D15Z4 - ,63A23 ++,80F4++,89K11++, 361M10 -,10K12-,7M10-)	47,XY,+mar[35]/46,XY [65].ish cgh enh(15)(q26.1q26.3).ish der(15)(wcp15+).ish der(15)(D15Z1- D15Z4-,63A23++,80F4++,89K11++, 361M10 -,10K12-,7M10-) --- 47,XY,+invdup(15)(q26.1q26.3)[35]/ 46,XY[65]

Abreviacions: dn, de novo; MET, preparació cromosòmica metafàsica; enh, guany; dim, deleció; D15Z1 i D15Z4, sondes comercials (Vysis) centromèriques del cromosoma 15; SNRPN i PML, sondes comercials (Vysis) corresponent a la regió PW/A; MCB, *multicolour banding* FISH; MD54, sonda específica pels braços curts dels cromosomes acrocèntrics; pcp, pintat cromosòmic d'un dels braços del cromosoma; ARZA, sonda comercial (Vysis) corresponent a la banda 22q13.3; TUPLE, sonda comercial (Vysis) corresponent a la banda 22q11.2. *A la columna de la FISH s'han indicat els resultats per als cromosomes marcadors.

5. DISCUSSIÓ

5.1. GRUP A: PACIENTS AMB CARIOTIP “APARENTMENT” NORMAL I QUADRE CLÍNIC

5.1.1. Detecció d'alteracions cromosòmiques críptiques

En aquest treball s'ha estudiat una sèrie de 90 individus amb alteracions clíniques, de menor o major grau, però que presentaven un cariotip normal. L'aplicació conjunta d'una bateria de tècniques de citogenètica molecular ha permès detectar, en un 20% dels casos, anomalies cromosòmiques que no havien estat prèviament identificades per bandes G. Més concretament, la CGH/HR-CGH va detectar desequilibris al genoma en 16 dels 90 casos analitzats (38, 39, 41, 47, 48, 51, 52, 53, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85 i 86); l'aCGH, en 2 dels 4 casos estudiats (34 i 46) i la MLPA, en 3 dels 8 casos estudiats (39, 41, 48).

5.1.1.1. Anomalies críptiques detectades mitjançant la CGH/HR-CGH

A la literatura, l'aplicació de la tècnica de CGH/HR-CGH per a l'estudi de pacients amb cariotip normal afectats de retard mental i trets dismòrfics, ha permès identificar desequilibris genòmics que havien passat desapercibuts en diferents percentatges, que oscil·len entre un 10% i un 41%. Per ordre cronològic, s'han publicat les següents freqüències: un 11% (16/144)(Kirchhoff i col, 2001), un 10% (5/50)(Ness i col, 2002) i un 12% (51/424) dels casos (Kirchhoff i col, 2004), fins a un 41.2% (7/17)(Joly i col, 2001) i un 16.3% (7/43) dels casos (Nowakowska i col, 2008).

A la nostra sèrie, dels 90 pacients analitzats amb cariotip normal i amb indicació diagnòstica de retard mental i/o trets dismòrfics, s'han identificat desequilibris al 17.8% (16/90) dels casos. Els nostres resultats, juntament amb els dels altres autors, confirmen el gran potencial de la CGH convencional -i especialment de la HR-CGH- en la detecció de desequilibris críptics en pacients que presentin alteracions clíniques -retard mental, retard de desenvolupament, trets dismòrfics, etc- i cariotip normal. Resulta interessant destacar que a l'estudi de Kirchhoff i col. (2001) només es van detectar desequilibris del genoma en pacients afectats de retard mental i trets dismòrfics, mentre que a la nostra sèrie, s'han identificat anomalies del genoma en pacients afectats no només de retard mental i trets dismòrfics (29%; 4/24), sinó que també en individus amb trets dismòrfics sense retard mental (23.5%; 4/17) i en individus amb retard mental i afectacions clíniques severes (12.5%; 5/40).

Per estar segurs de l'existència d'un determinat desequilibri detectat tant amb CGH/HR-CGH com amb aCGH és necessari confirmar-ho mitjançant una altra tècnica, normalment FISH. Respecte als desequilibris considerats com a patològics detectats pels aCGH (casos 34 i 46), no van poder ser confirmats per FISH per manca de suficient material fixat.

Respecte als 16 casos amb el perfil de CGH/HR-CGH desequilibrat, l'aplicació de la FISH va descartar la presència del desequilibri en tots els 6 casos en què aquest estava situat en regions conflictives per a la resolució de la tècnica, com són les regions 16q12 (casos 77, 81, 82, 84 i 85) i 22q11.2 (cas 38). Paral·lelament, l'aplicació de la MLPA va descartar, també, els desequilibris corresponents al cromosoma X detectats per la CGH/HR-CGH (casos 79, 83 i 86) i el corresponent a la regió 1pter del cas 52. Sí que van ser confirmats els desequilibris detectats als casos 39, 41 i 48 mitjançant l'aplicació de la FISH i/o MLPA; respecte als tres casos restants - 47, 51 i 53- no van poder acabar de ser confirmats per manca de suficient material fixat. Descartant, doncs, els 10 casos de desequilibris críptics que no han estat confirmats després de l'aplicació d'altres tècniques, el percentatge d'identificació d'anomalies críptiques identificades mitjançant la CGH/HR-CGH oscil·laria entre el 3.3% (3/90) i el 6.7% (6/90) en cas que els casos 47, 51 i 53 quedessin confirmats. Aquest valor és considerablement inferior al publicat per altres autors (Kirchhoff i col, 2001; Ness i col, 2002; Kirchhoff i col, 2004).

D'acord amb aquests resultats, el nostre estudi posa de manifest la dificultat d'interpretació dels desequilibris dels perfils obtinguts mitjançant aquesta tècnica, especialment a les regions considerades com a conflictives per a la CGH/HR-CGH. En efecte, els cromosomes 19, 22, les regions centromèriques i d'heterocromatina presenten un alt contingut en seqüències repetitives, i les regions telomèriques presenten molta variabilitat en la intensitat de la senyal de fluorescència, cosa que podria generar falsos positius en l'anàlisi amb la CGH convencional i, per tant, han de descartar-se sempre de l'anàlisi. Si s'utilitza el software de la HR-CGH no cal excloure-les però cal tenir en compte que també es podrien generar falsos negatius. Així doncs, s'han de considerar amb molt de compte els desequilibris del genoma detectats en aquestes regions conflictives.

A la nostra sèrie, tots cinc pacients amb possible pèrdua críptica de 16q12 presentaven trets dismòrfics; un pacient presentava, a més a més, malformacions congènites (cas 77) i dos pacients estaven afectats de retard mental (casos 84 i 85). Tot i tractar-se d'una banda molt pròxima a una regió conflictiva per la CGH/HR-CGH, es va decidir no excloure les pèrdues identificades des d'un principi i confirmar-ne l'existència mitjançant la FISH de BACs, ja que teníem 5 pacients afectats i a la regió 16q12.1q12.2 hi ha 67 gens descrits segons el Refseq. Entre aquests gens, cal destacar, a 16q12.1, ABCC12 (OMIM *607041 ATP-BINDING CASSETTE, SUBFAMILY C, MEMBER 12) i ABCC11 (OMIM * 607040 ATP-BINDING CASSETTE, SUBFAMILY C, MEMBER 11), que han estat identificats com a possibles candidats per a la síndrome PKC/ICCA (PKC; MIM# 128200)(Tammur i col, 2001). A més a més, la regió 16q12q21 s'ha identificat com a regió crítica de la síndrome BFPP (*Bilateral Frontoparietal Polymicrogyria*)

(Chang i col, 2003). L'aplicació de la FISH amb sondes BAC d'aquesta regió no va detectar pèrdua de material en cap dels 5 casos.

Respecte el cas 38, l'anàlisi de CGH/HR-CGH detectava una pèrdua de la regió 22q11.2. Com que la banda implicada és l'associada a la síndrome de *DiGeorge* i tenint en compte que la pacient presentava retard mental i dismorfies, es va decidir comprovar l'existència de la deleció per descartar o confirmar la síndrome aplicant la FISH amb la sonda LSI de *DiGeorge*. Com als casos anteriors, tampoc es va confirmar la pèrdua de material, evidenciant una vegada més la dificultat d'aquesta tècnica en l'anàlisi d'aquestes regions.

5.1.1.2 Anomalies críptiques detectades mitjançant la MLPA

L'objectiu de l'anàlisi amb MLPA era confirmar o descartar els desequilibris identificats per CGH/HR-CGH. Dels 8 casos estudiats amb aquesta tècnica, únicament es va confirmar el desequilibri en 3 casos (39, 41, 48). El 62.5% (5/8) de les mostres analitzades amb MLPA tenien una sospita d'alteracions subtelomèriques (39, 41, 48, 52 i 58), mentre que als 3 casos restants (79, 83, 86) es sospitava d'una duplicació intersticial a nivell de la banda Xq12.

Segons les dades publicades, el percentatge de detecció d'alteracions críptiques desequilibrades –tant subtelomèriques com intersticials- a través de l'aplicació de la MLPA en sèries de pacients amb cariotip normal i retard mental amb o sense anomalies congènites és, també, molt variable: oscil·la entre el 3.9% (18/466)(Stegmann i col, 2007), el 4.4% (12/275)(Rooms i col, 2006), el 5% (13/258) (Kirchhoff i col, 2005), el 5.3% (4/75)(Rooms i col, 2004), el 10% (5/50)(Palomares i col, 2006) i el 15% (3/20)(Lam i col, 2006). Aquestes divergències podrien quedar justificades per diferències en els criteris d'inclusió dels pacients en aquest tipus d'estudis (Stegmann i col, 2007). A la nostra sèrie, aquest percentatge està molt incrementat –un 37.5% (3/8)- no tan sols perquè s'ha aplicat la tècnica en un nombre molt reduït de casos, sinó perquè aquests pacients ja van ser escollits per confirmar o descartar una alteració prèviament detectada per CGH/HR-CGH, cosa que provoca un esbiaixament del resultat.

Si comparem l'eficiència de la MLPA respecte la FISH a l'hora d'identificar alteracions críptiques subtelomèriques segons les nostres dades, podem observar com existeix una concordança de resultats –casos 39, 41 i 52- entre aquestes dues tècniques excepte únicament en un cas, el 48, en què la FISH va ser incapaç de detectar una deleció a nivell de la banda 1p36.3 (veure apartat 5.1.1.3). Aquests resultats concorden amb els publicats a la literatura,

com l'estudi de Palomares i col l'any 2004, en què d'una sèrie de 50 pacients, només van detectar una discrepància de resultats en un únic cas.

Paral·lelament, si comparem l'eficiència de la MLPA respecte la CGH/HR-CGH, les nostres dades indiquen que en un 50% (4/8; casos 39, 41, 48 i 58) existeix una concordança de resultats entre aquestes dues tècniques mentre que a l'altre 50% (4/8; casos 52, 79, 83 i 86), hi ha una discrepància de resultats. Autors com Kirchhoff i col (2005) han publicat discordances entre aquestes dues tècniques, sobretot a nivell de regions subtelomèriques, en les quals la MLPA és més sensible, mentre que la CGH/HR-CGH ho és més a les regions intersticials. Resulta interessant especificar que al cas 48, el resultat de la CGH/HR-CGH concorda amb el de l'anàlisi amb la MLPA però no amb la FISH; en canvi, al cas 52, hi ha concordança de resultats entre FISH i MLPA però no amb la CGH/HR-CGH. Aquests resultats posen de manifest que aquestes dues tècniques han de ser sempre complementàries a l'hora d'analitzar aquest tipus de pacients.

El pacient del cas 39 va resultar ser portador d'una translocació críptica desequilibrada entre les regions subtelomèriques del 9q i 18q, que donava lloc a una trisomia parcial de la regió subtelomèrica 18q lligada a una monosomia parcial de la regió subtelomèrica 9q. L'aplicació de la FISH amb sondes subtelomèriques de les regions afectades confirmava aquests resultats. No es va poder realitzar l'estudi molecular del cariotip dels pares per esbrinar si un dels dos era portador d'una translocació críptica equilibrada entre aquestes dues regions. La presència de translocacions críptiques desequilibrades entre regions subtelomèriques en pacients afectats de retard mental i cariotip normal ja ha estat àmpliament descrita a la literatura; recentment, Stegmann i col (2007), de les 53 senyals aberrants que van detectar per MLPA en una sèrie de 466 pacients amb aquestes característiques fenotípiques, 8 -és a dir, el 15%- eren translocacions críptiques desequilibrades entre regions subtelomèriques.

Als casos 79, 83 i 86, la CGH/HR-CGH detectava un guany de material de la regió Xq12q13 en tots ells. A la banda Xq12 s'ha descrit un gen, el OPHN1 (OMIM *300127 OLIGOPHRENIN 1), que ha estat associat a retard mental lligat al cromosoma X: autors com Billuart i col (1998), Govek i col (2004) i Kasri i col (2009) han demostrat que alteracions en l'expressió d'aquest gen provoquen defectes en la longitud de l'espina dendrítica, amb la qual cosa la transmissió sinàptica queda alterada, donant peu a l'aparició del retard mental. De fet, Bedeschi i col (2008) van estudiar un pacient amb una duplicació intersticial Xq12q13.1 que estava afectat d'un retard psicomotor sever; tenint en compte aquest fet, i com que tots tres

pacients presentaven retard mental -tot i no presentar una clínica tan severa- i eren barons, es va voler aplicar el kit de MLPA P106-B1, que té una sonda específica pel gen OPHN1, per confirmar o descartar el desequilibri. No es va confirmar la duplicació intersticial en cap dels tres casos.

5.1.1.3. Anàlisi dels casos amb alteracions críptiques a la regió 1pter

El retard mental afecta entre un 2% i un 3% de la població, i només en un 20% dels casos s'aconsegueix identificar-ne la seva etiologia. Les síndromes de microdeleció es calcula que representen el 5% dels casos de retard mental d'origen desconegut. L'inconvenient més rellevant de les síndromes de microdeleció és que estan causades per anomalies cromosòmiques críptiques, ja siguin reordenaments subtelomèrics o intersticials, i no poden detectar-se mitjançant tècniques de citogenètica convencional. El desenvolupament de tècniques com la FISH, la MLPA i l'aCGH han representat un gran avenç en aquesta línia, permetent establir noves correlacions genotip-fenotip. Algunes de les síndromes de microdeleció més estudiades són: síndrome de la deleció 1p36 (1p36.33), síndrome de *Williams* (7q11.23), síndrome de *Smith-Magenis* (17p11.2), síndrome de *Miller-Dieker* (17p13.3), síndrome de *DiGeorge* (22q11.21) i síndrome de *Prader-Willi/Angelman* (15q11.2) (Cho i col. 2009). En el nostre estudi hem detectat tres pacients (casos 41, 48 i 52) no emparentats amb deleció 1p36.

La síndrome de la deleció 1p36 està considerada com la síndrome de microdeleció subtelomèrica més comuna, amb una freqüència de 1/5000 nounats; es calcula que entre el 0.5% i el 1.2% del retard mental idiopàtic està causat per delecions a la banda 1p36.3 (Battaglia i col, 2008). Cap dels tres casos analitzats havien estat prèviament diagnosticats com a individus afectats per aquest desordre. A tots tres se'ls havia diagnosticat retard mental, i només a un d'ells (cas 41), se li havia detectat una síndrome polimalformativa. Va ser l'estudi de CGH qui va detectar la pèrdua de material a la banda 1p36, pèrdua que només va ser confirmada per FISH en un únic pacient (cas 41). L'anàlisi posterior específic d'aquesta regió amb MLPA va identificar la deleció en dos pacients (casos 41 i 48) i la va descartar en un (cas 52). Les sondes MLPA utilitzades van ser: SCNNID (1p36.33), SKI (1p36.32) i TP73 (1p36.31). Totes tres –i en concret SKI i TP73- es troben situades a la zona crítica de la síndrome. Al cas 41, es va detectar deleció de les sondes SCNNID, SKI i TP73; al cas 48, no es va detectar deleció de la sonda SCNNID però sí de les sondes SKI i TP73.

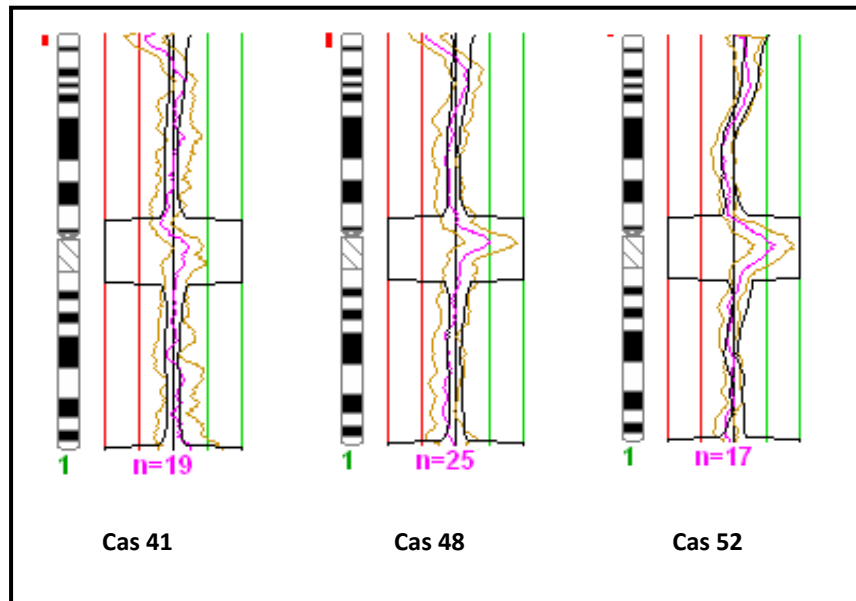


Figura 26. Imatge dels perfils de HR-CGH de tots tres casos on s'observen les mides diferents dels fragments delecionats a 1pter identificats per la tècnica.

A la literatura hi ha molts treballs publicats que comparen l'eficiència de la FISH i la MLPA en la detecció de síndromes de microdeleció en sèries molt més grans d'individus, i en tots ells queda demostrat un alt nivell de concordança entre els resultats d'una i altra tècnica (Palomares i col, 2006; Cho i col, 2009). El fet que en el nostre estudi la FISH no hagi confirmat la delecio detectada tant per la CGH com per la MLPA podria explicar-se pel fet que la sonda 1ptel de QBIOGENE utilitzada no hibridés exactament a banda 1p36.3, si no que ho fes a la 1p36.2 (la casa comercial no indicava la banda exacta d'hibridació de la sonda, només indicava 1ptel).

En aquests moments no disposem de la clínica detallada d'aquest pacients, aspecte molt important perquè en cas de presentar variabilitat fenotípica, aquesta podria ésser explicada per les diferències entre els fragments delecionats d'aquesta regió. A la Taula 13, s'indica la relació entre les dades clíniques dels pacients de què disposem i la mida del fragment delecionat.

Taula 13. Relació entre la informació clínica dels pacients i la mida dels fragments delecionats.

	Clínica	Fragment delecionat	Mida del fragment delecionat
Cas 41	Retard mental greu i síndrome polimalformativa	SCNNID (1p36.33) SKI (1p36.32) TP73 (1p36.31)	7.1Mb
Cas 48	Retard mental i trets dismòrfics	SKI (1p36.32) TP73 (1p36.31)	4.8Mb
Cas 52	Retard mental i malformacions congènites	-	-

5.1.1.4. Anomalies críptiques detectades mitjançant aCGH

Dels quatre casos d'aquest grup (30, 34, 46, 66), analitzats mitjançant aCGH, en dos d'ells s'han trobat alteracions potencialment patogèniques (casos 34 i 46).

El cas 34 tenia una sospita diagnòstica de la síndrome de *Rubinstein-Taybi* (RSTS; OMIM 180849). Aquesta síndrome té una incidència de 1:100 000-125 000 en nounats i en més de la meitat dels casos es detecta una anomalia citogenètica. La clínica associada a la síndrome és la següent: retard mental, retard de creixement, microcefàlia, trets facials característics, polzes amples i dits del peu grans. Les alteracions associades a la síndrome són: microdeleció de la banda 16p13.3 o mutacions als gens CBP o p300 (Hennekam, 2006). A través de l'anàlisi amb l'aCGH, es va determinar l'existència d'alteracions que podrien ser potencialment patogèniques en no estar descrites a la població general, però cap d'elles coincidia amb les associades a la síndrome. Aquestes alteracions van ser: un guany a 8q12.1q12.3 i les pèrdues a 5p11, 9q22.32, 10p12.1 i 15q25.1.

El desequilibri més gran va ser identificat com una trisomia segmentària de 4,14Mb situada al braç q del cromosoma 8 (8q12.1q12.3). Aquesta regió duplicada conté fins a 10 gens anotats al Refseq, d'entre els quals destaca el gen CHD7 (OMIM *608892- CHROMODOMAIN HELICASE DNA-BINDING PROTEIN 7; CHD7). Delecions en aquesta regió van permetre identificar el gen responsable de la síndrome de *Charge*, que s'associa a mutacions i/o pèrdues de funció del gen CHD7. Aquesta síndrome té una incidència més elevada que el RSTS, 1:12000, i cursa amb múltiples malformacions: coloboma, defectes cardíacs, atrèsia coanes, retard de creixement i de desenvolupament, malformacions als genitals i anomalies a l'oïda

que poden acabar amb sordesa (Kallen i col, 1999; Vissers i col, 2004; Kim i col, 2008). Tot i les diferències fenotípiques amb la síndrome de RSTS, a la bibliografia s'ha descrit un cas amb una duplicació similar a la del cas 34 i amb unes manifestacions clíniques molt diferents a les associades amb la síndrome de *Charge* (Monfort i col, 2008).

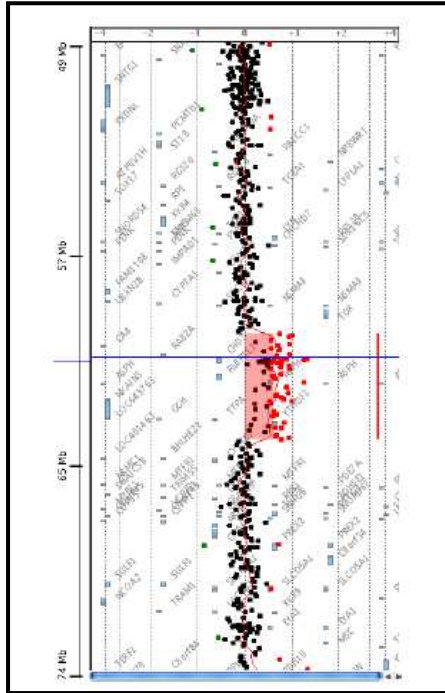


Figura 27. Trisomia parcial detectada al braç q del cromosoma 8 per aCGH.

Paral·lelament, es van identificar pèrdues genòmiques a les bandes 5p11 (deleció de 908Kb), 9q22.32 (deleció de 87,2Mb), 10p12.1 (monosomia segmentària de 37Kb) i a 15q25.1 (monosomia segmentària de 27.3Kb). Respecte a les deleccions a 5p11 i 10p12.1, està descrit que no existeixen gens ni altres elements funcionals coneguts en cap d'aquestes dues regions, de manera que és poc probable que aquestes alteracions puguin estar relacionades o tinguin alguna implicació en el fenotip de la pacient, i encara més tenint en compte la presència de la duplicació detallada anteriorment. Pel que fa a la deleció a 9q22.32, creiem que es tracta d'un fals positiu ja que el suport experimental per aquesta teòrica deleció consisteix en una única sonda i no s'ha pogut corroborar, doncs, el resultat. I finalment, respecte la monosomia segmentària a 15q25.1, tot i no solapar amb CNVs publicades a la literatura, ha estat identificada prèviament en individus normals amb aquest mateix xip.

El cas 46 tenia una sospita diagnòstica de la síndrome de *Dubowitz*. La clínica associada a aquesta síndrome és: retard de creixement intrauterí, alçada baixa, presència d'erupcions cutànies, microcefàlia i una fàcies característica (Winter i col, 1986). Es van detectar

alteracions en el número de còpia de loci cromosòmics als braços p dels cromosomes 4 i 10; també, es va determinar l'existència d'un nombre d'alteracions que coincideixen amb regions variables de número de còpia (CNVs) conegudes i descrites en la població general.

Les alteracions potencialment patogèniques detectades van ser les següents. En primer lloc, una trisomia segmentària d'aproximadament 60Kb a la banda 4p15.32. Aquesta variant no s'ha descrit mai en la població general ni ha estat mai associada a cap patologia. Es solapa amb el gen LDB2 (OMIM 603450, LIM DOMAIN-BINDING 2; LDB o CLIM), que pertany a una família de proteïnes capaces a unir-se a diferents factors de transcripció i que actuen en regions *enhancer*, unint diferents factors de transcripció per formar i/o destruir complexos activadors de transcripció. Aquest gen en concret se sap que té funcions relacionades amb el desenvolupament del sistema nerviós central i altres òrgans durant l'embriogènesi (Kotaka i col, 2001; Caqueret i col, 2006; Ostendorff i col, 2006; Fassunke i col, 2008; Azim i col, 2009; Storbeck i col, 2009). En segon lloc, es va detectar una altra trisomia segmentària situada a la banda 10p11.23 d'unes 181Kb. No s'han descrit gens ni altres elements funcionals coneguts en aquesta regió, de manera que és poc probable la seva implicació en el fenotip de la pacient. I en tercer lloc, es va identificar una monosomia segmentària a la banda 10p12.1 d'unes 37Kb; com al cas anterior, aquesta alteració creiem que és poc probable que estigui implicada en la clínica de la pacient ja que no hi ha descrits a la literatura gens ni altres elements funcionals en aquesta regió.

D'altra banda, també es van identificar tres alteracions més que, tot i no solapar-se amb CNVs descrits a les bases de dades, no es van considerar com a patològiques perquè apareixien en controls interns.

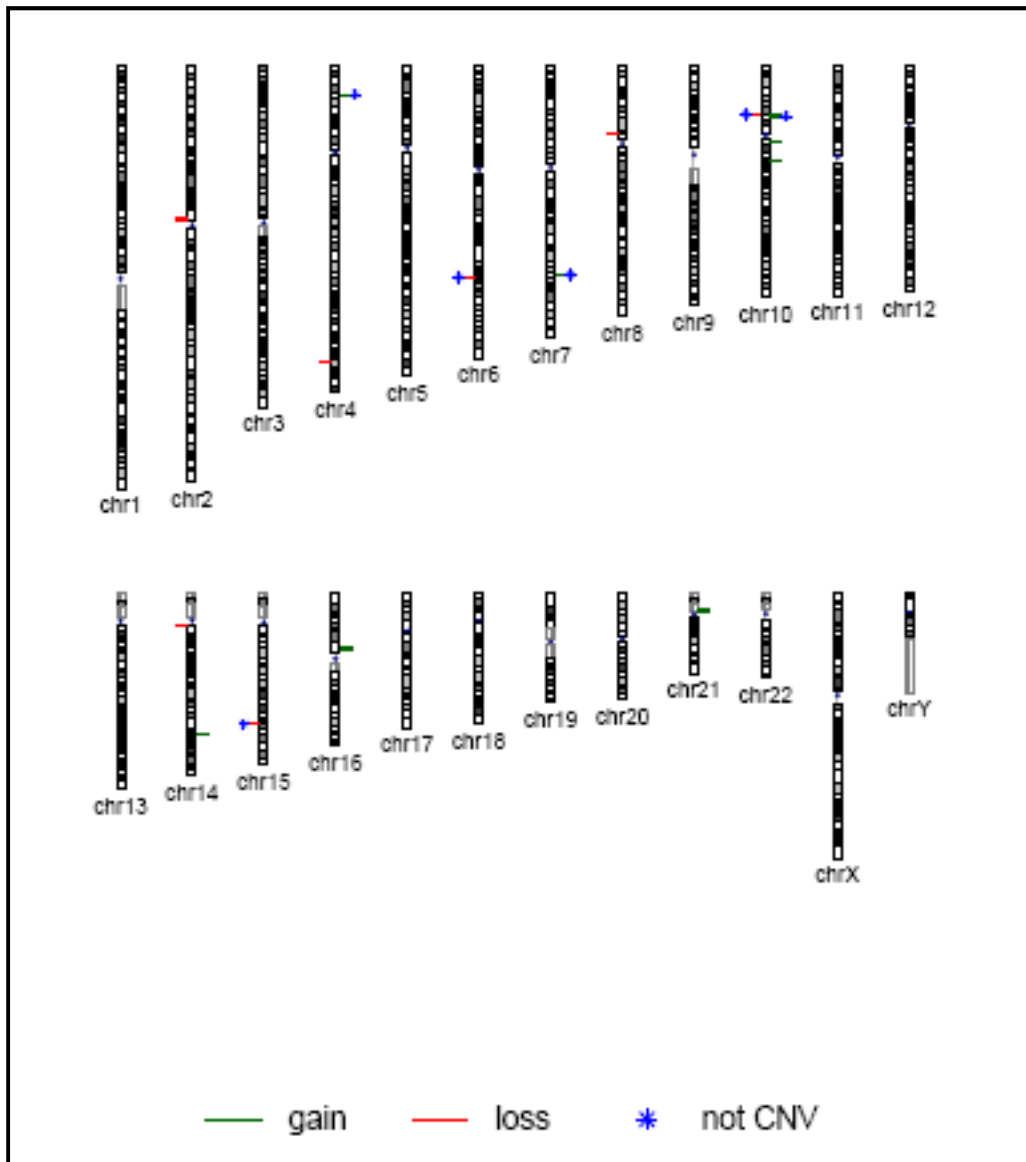


Figura 28. Cariotip molecular utilitzant l'aCGH al cas 46.

Els altres dos pacients en què es va aplicar l'aCGH (casos 30 i el 66) tenien una sospita diagnòstica de síndrome de *Kabuki*, que es calcula que té una incidència de 1:32000 individus japonesos (Niikawa i col, 1988). Encara avui dia hi ha controvèrsia respecte quina és la regió genòmica associada a aquesta síndrome: l'any 2003, Milunsky i Huang van identificar duplicacions a la regió 8p23.1p22 en 6 pacients afectats d'aquesta síndrome; tanmateix, l'any 2004, Miyake i col no van detectar cap duplicació en aquesta regió en 28 pacients afectats, suggerint que aquest mecanisme pot no ser el més comú per originar la malaltia. En cap dels dos casos es van detectar alteracions en aquesta regió, sinó que les alteracions identificades

coincidien amb regions variables de número de còpia (CNVs) conegudes i descrites a la població general. Aquestes alteracions no s'han considerat com a potencialment patogèniques ja que les duplicacions i delecions que conformen els CNVs s'hereten en individus amb fenotip normal i, en conseqüència, se suposa que són variants polimòrfiques de la població, tot i que està per determinar quin podria ser el seu paper com a factors de predisposició a malalties complexes. Així doncs, en tots dos casos es pot descartar l'existència de guanys i pèrdues de material de petit tamany (<100Kb) en regions de reordenament recurrent amb una elevada probabilitat i, també, de reordenaments de mida considerable (>500Kb) a la resta de regions del genoma interrogades per l'array que puguin estar associades a patologia.

5.1.1.5. Anomalies críptiques detectades mitjançant l'aplicació conjunta de les tècniques de CGH/HR-CGH , MLPA, FISH i aCGH.

En resum, l'aplicació conjunta de diferents tècniques de citogenètica molecular com són la CGH/HR-CGH, la MLPA, la FISH i l'aCGH, ha permès identificar un 7.8% (7/90) d'aberracions cromosòmiques críptiques a la nostra sèrie de 90 pacients amb cariotip normal però que presentaven una clínica alterada amb major o menor grau (retard mental, trets dismòrfics, i/o anomalies congènites més severes). D'aquests 7 casos, tres han estat confirmats per CGH/HR-CGH, FISH i MLPA (casos 39, 41 i 48), dos han estat identificats mitjançant l'aplicació de l'aCGH (34 i 46) i dos més mitjançant únicament CGH/HR-CGH (casos 47 i 51); els resultats d'aquests darrers 4 casos no han pogut ser confirmats per altres tècniques.

Paral·lelament, l'aplicació de la FISH ha permès descartar alteracions que havien estat prèviament identificades per la CGH/HR-CGH en regions considerades com a problemàtiques per la tècnica (casos 38, 77, 81, 82, 84 i 85). D'altra banda, l'aplicació de la MLPA ha permès descartar en 3 casos (79, 83 i 86) duplicacions intersticials identificades per la CGH/HR-CGH i, també, ha permès redefinir en 2 casos més la mida del fragment delecionat identificat per CGH/HR-CGH (casos 41 i 48) o descartar-la (cas 52). Finalment, l'ús de l'aCGH ha permès identificar en dos dels quatre casos analitzats amb aquesta tècnica aberracions cromosòmiques críptiques que havien passat desapercebudes per l'anàlisi de CGH/HR-CGH.

L'aplicació, doncs, d'una combinació de bateria de tècniques de citogenètica molecular és essencial per a la identificació d'aberracions cromosòmiques críptiques amb una rellevància clínica significativa per als pacients (Kirchhoff i col, 2001; 2005). Tanmateix, decidir quina o quines d'aquestes tècniques utilitzar en un cas clínic no resulta fàcil per als citogenetistes clínics, sobretot en diagnòstic prenatal, ja que totes tenen els seus avantatges i limitacions, no sempre es disposa de suport econòmic suficient i sovint el temps que es té per analitzar la

mostra és molt curt. Per totes aquestes raons i facilitar la feina als clínics, al següent apartat intentarem proposar un protocol d'actuació.

5.1.2. Protocol d'actuació en pacients amb clínica afectada i cariotip normal

Aquest estudi ha demostrat que la tècnica de la CGH/HR-CGH és especialment útil quan s'ha d'aclarir/confirmar un cariotip anormal, ja que s'han identificat desequilibris, acotant les bandes implicades en l'anomalia, a pràcticament tots els casos en què s'havia de confirmar o aclarir un cariotip anormal. Però aquesta tècnica és tan útil si l'individu té un cariotip normal i presenta retard mental, trets dismòrfics i/o una clínica més severa? En quins casos s'hauria d'aplicar si es tracta d'un diagnòstic prenatal?

Respecte aquesta última qüestió, en diagnòstic prenatal no hi ha gaires estudis publicats sobre la utilitat clínica de la CGH/HR-CGH, però sí que n'hi ha, en canvi, en l'anàlisi de teixits fetals. En efecte, els treballs de Daniely i col (1998) i Lomax i col (2000) van demostrar que aquesta tècnica és molt útil per a l'anàlisi d'aberracions cromosòmiques de restes avortives, ja que s'eviten els problemes de contaminació materna, d'artefactes de cultiu i de no creixement de les cèl·lules fetals. Paral·lelament, altres autors han comparat els resultats obtinguts amb CGH/HR-CGH i amb citogenètica convencional en l'estudi de mostres de fetus avortats espontàniament al primer trimestre d'embaràs: en general, s'ha observat una concordança de resultats excepte en el cas de poliploidies i d'inversions pericentromèriques, no detectades per la primera però sí per bandes G (Tabet i col, 2001; Fritz i col, 2001). D'altra banda, Lestou i col (1999) van publicar un treball en què aplicaven la CGH per a l'estudi d'aneuploidies en mosaic en teixit de placenta, fet de gran utilitat en casos de retard de creixement intrauterí (Warburton, 1999). En aquest estudi, però, es demostrava l'altíssima sensibilitat de la CGH a l'hora de detectar aneuploidies prèviament identificades per FISH però no la seva especificitat ni sensibilitat en cas que el cromosoma involucrat en l'aneuploidia sigui desconegut (Lestou i col, 1999; Warburton, 1999). No va ser fins l'any 2000 que va ser publicat el primer estudi prospectiu de 71 casos reals de diagnòstic prenatal –de mares amb edat gestacional avançada i marcadors ecogràfics- analitzats conjuntament per citogenètica convencional i CGH (Lapierre i col, 2000). En aquest estudi, es van obtenir un 93% (66/71) de resultats informatius i es van identificar 7 casos (9.8%) amb anomalies cromosòmiques numèriques, amb una concordança entre les dues tècniques de pràcticament el 100%, excepte en 3 casos en què es van detectar inversions pericentromèriques per bandes G que van passar desapercibudes per CGH. No hem sabut trobar cap més estudi prospectiu d'aquestes característiques; la laboriositat de la tècnica i d'anàlisi del *software*, així com el temps que es

necessita per a l'anàlisi dels resultats i la limitació de la resolució, són factors que segurament han contribuït negativament a que no s'apliqui com a eina habitual en el diagnòstic clínic prenatal rutinari (Shaffer i Bui, 2007). Alguns autors sí que han utilitzat la tècnica per confirmar, per exemple, que les translocacions aparentment equilibrades detectades en líquid amniòtic siguin realment equilibrades (Kirchhoff i col, 2001) o bé, per a la identificació de l'origen de marcadors identificats en líquid amniòtic (Shaffer i Bui, 2007).

Tornant al diagnòstic postnatal, respecte als pacients amb cariotip normal acompanyat de retard mental, trets dismòrfics i/o d'alguna indicació clínica més severa, decidir quina tècnica –FISH subtelomèrica, MLPA o CGH/HR-CGH- serà la que més probabilitats tindrà de detectar algun desequilibri és més difícil. Tal com hem comentat anteriorment, l'aplicació de la CGH/HR-CGH permet la identificació de desequilibris entre un 10% i un 41.2% dels casos (Ness i col, 2002; Joly i col, 2001). Tenint en compte, però, que estudis realitzats per diversos autors com Flint i col (1995), Knight i col (1999), Jalal i col (2003), entre altres, han demostrat que les alteracions críptiques a les regions subtelomèriques poden ser una de les causes de retard mental idiopàtic més rellevants -ja que aquestes regions són molt riques en gens- i considerant les dificultats que té la CGH/HR-CGH en l'anàlisi d'aquestes regions, aquesta tècnica no hauria de ser l'única que s'hauria d'utilitzar.

L'anàlisi d'aquestes regions subtelomèriques s'ha dut a terme fins al moment a través de dues tècniques principalment: la FISH subtelomèrica i la MLPA. El percentatge d'aquests pacients amb anomalies terminals críptiques identificats mitjançant l'aplicació de la FISH subtelomèrica varia entre un 0 i un 23% segons la literatura (Lamb i col, 1999; Ballif i col, 2000; Riegel i col 2001; Kirchhoff i col, 2004). Paral·lelament, l'aplicació de la MLPA en aquest tipus de pacients detecta aberracions cromosòmiques críptiques a les regions subtelomèriques al voltant del 10% segons la literatura (Kirchhoff i col, 2005; Lam i col, 2006). Tot i que no hi ha un consens generalitzat sobre quina de les dues tècniques és millor per a l'anàlisi de les regions subtelomèriques, aquesta darrera presenta uns clars avantatges respecte la primera, com són una millor relació qualitat/cost i una major rapidesa en l'obtenció de resultats, dos factors de gran importància per a una aplicació clínica rutinària (Lam i col, 2006; Rooms i col, 2006; Stegmann i col, 2008).

En diagnòstic prenatal, l'aplicació de la MLPA –així com la de la QF-PCR- ha estat enfocada principalment al cribatge d'aneuploidies dels cromosomes sexuals, 13, 18 i 21, i s'ha demostrat que es tracta d'una alternativa molt vàlida a la FISH per a aquest tipus d'anàlisi (Gerdes i col, 2008; Boormans i col, 2010), tant per la seva rapidesa com per la seva relació

qualitat/cost. Actualment, altres branques d'aplicació més habituals d'aquesta tècnica en aquest camp són, d'una banda, el diagnòstic genètic de malalties congènites, com la distròfia muscular de *Duchenne/Becker*, entre altres, en fetus d'alt risc (Wu i col, 2009) i, de l'altra, l'anàlisi de tots aquells "punts calents" amb una importància clínica coneguda -com la microdeleció de la banda 22q11 responsable de la síndrome de *DiGeorge/VCFs*- en fetus amb marcadors ecogràfics com a alternativa a la FISH (Lautrup i col, 2009).

Respecte l'anàlisi d'alteracions subtelomèriques críptiques, tot i que es tracta d'un estudi altament recomanat en pacients amb retard mental idiopàtic i dismorfies (Shevell i col, 2003; Gignac i col, 2006), i resulta lògic pensar que, en diagnòstic prenatal, seria molt útil realitzar-lo en casos de fetus amb marcadors ecogràfics i cariotip normal (Faas i col, 2008), encara hi ha pocs estudis publicats sobre aquest tema i, conseqüentment, les dades encara no són del tot concloents (Gignac i col, 2006; Faas i col, 2008). Un exemple de l'ús de la FISH subtelomèrica aplicada al diagnòstic prenatal de fetus amb malformacions ecogràfiques importants i cariotip normal és el treball de Gignac i col (2006). En aquest estudi, de 48 mostres analitzades, es van detectar un 4% d'anomalies subtelomèriques (2/48) amb una rellevància clínica significativa i un 6% (3/48) que corresponien a polimorfismes sense cap implicació clínica. Un altre exemple seria el treball de Faas i col (2008), en què van aplicar la MLPA per l'estudi d'anomalies subtelomèriques críptiques també en fetus amb marcadors ecogràfics i cariotip normal. En aquest cas, només es van estudiar 3 fetus, però es van identificar desequilibris subtelomèrics -no detectats per citogenètica convencional- que podien explicar les malformacions observades de tots tres fetus (Faas i col, 2008). En tots dos treballs, els autors deixen ben clar que, davant de la identificació d'una anomalia subtelomèrica, sempre s'ha de descartar la possibilitat que es tracti d'un polimorfisme heretat, de manera que sempre caldrà fer un anàlisi de l'ADN dels progenitors (Gignac i col, 2006; Faas i col, 2008). Aquesta és una de les raons per les quals Faas i col (2008) creuen que cap d'aquestes dues tècniques no ha estat introduïda encara al diagnòstic prenatal rutinari, tot i que afirmen que la MLPA presenta molts més avantatges respecte la FISH subtelomèrica en aquests casos: és més barata, més ràpida i permet analitzar diverses regions d'interès en una mateixa reacció.

És ben conegut, però, que les aberracions cromosòmiques críptiques intersticials també poden estar associades a retard mental (Kirchhoff i col, 2004). De fet, si analitzem els nostres resultats en aquest tipus de pacients, podem observar com el 3% dels 90 pacients estudiats presentaven alteracions terminals, mentre que el 5.6%, alteracions intersticials. Aquests resultats s'ajusten amb els obtinguts al treball de Kirchhoff i col (2001), en què el percentatge d'anomalies intersticials (7.6%) era superior al d'anomalies terminals (2.8%). Això

posa de manifest que l'aplicació únicament de la FISH o MLPA subtelomèriques no són suficients per detectar tots els possibles desequilibris que poden estar presents en pacients amb retard mental idiopàtic i trets dismòrfics. Seguint aquesta línia, en un estudi posterior realitzat per aquests mateixos autors l'any 2004 (Kirchhoff i col, 2004), d'una sèrie de 94 individus afectats de retard mental i trets dismòrfics, la CGH/HR-CGH va detectar un 8.5% d'alteracions intersticials i la FISH de regions subtelomèriques un 3.2% d'alteracions terminals, demostrant que aquestes dues tècniques haurien de ser complementàries en l'estudi d'aquest tipus de pacients.

En diagnòstic prenatal, ha estat l'aplicació de la tècnica de l'aCGH la que permès identificar un major nombre d'alteracions cromosòmiques críptiques, tan intersticials com terminals. En estudis retrospectius realitzats de mostres de fetus avortats espontàniament al primer trimestre d'embaràs, hi ha molta variabilitat en el tipus d'anomalia cromosòmica detectada. Per exemple, al treball de LeCaignec i col (2005), de 49 fetus estudiats, es van identificar un 8.2% d'anomalies críptiques, de les quals aproximadament la meitat eren alteracions subtelomèriques i l'altra meitat, intersticials. Al treball de Shimokawa i col (2006), dels 19 casos estudiats, es detectava un 5.3% d'alteracions críptiques, totes elles terminals. En canvi, al treball de Benkhalifa i col (2005), es va identificar un 57.7% d'alteracions –bàsicament monosomies autosòmiques i dobles aneuploïdies de cromosomes sencers- de les 29 mostres estudiades. En un dels primers estudis prospectius publicats més recentment, el treball de Van de Veyver i col (2009), en què s'estudiaven 300 mostres de líquid amniòtic i de vellositats corials, es va identificar una gran variabilitat, també, d'anomalies cromosòmiques clínicament significatives: delecions terminals i intersticials, duplicacions intersticials, cromosomes marcador supernumeraris i, fins i tot, casos d'aneuploïdies de cromosomes sencers. Aquestes dades suggereixen, doncs, que en diagnòstic prenatal també s'haurien d'aplicar tècniques que permetessin detectar tant alteracions terminals com intersticials.

Respecte al diagnòstic postnatal, l'aplicació de l'aCGH per a l'estudi de pacients amb cariotip normal i retard mental idiopàtic ha donat, també, resultats interessants. En una sèrie de 1375 nounats estudiats amb aCGH, Shaffer i col (2008) van detectar un 11.4% d'anomalies cromosòmiques, i d'aquestes, el 40% es van identificar en nadons que presentaven trets dismòrfics amb o sense indicació clínica addicional. En diagnòstic prenatal hi ha divergències respecte les freqüències de detecció d'anomalies cromosòmiques en fetus amb cariotip normal: en un estudi realitzat per Shaffer i col (2008), únicament es van identificar anomalies en un 1.3% dels 151 fetus amb cariotip normal analitzats; en canvi, Sahoo i col (2006) i més recentment, Van de Veyver i col (2009), aconseguien detectar-ne al 5% de 300 mostres de

vellositats corials i líquid amniòtic estudiades. Aquests autors suggereixen que la discrepància en l'eficiència dels aCGH entre els casos prenatals i els postnatals podria ser deguda al fet que un cariotip normal en fetus no es considera un embaràs de risc i per tant no es deriva a anàlisis posteriors amb aCGH, i això sumat al fet que molts trets dismòrfics passen desapercebuts per ecografia, creuen que fa disminuir molt la freqüència de detecció (Shaffer i col, 2008). Aquests mateixos autors, l'any 2007 van publicar un estudi realitzat a 8789 pacients amb cariotip normal però que presentaven una àmplia varietat d'anomalies clíniques –retard de desenvolupament, trets dismòrfics, retard mental, convulsions, etc- i van detectar variacions en el nombre de còpia en un 12% dels individus, de les quals el 6.9% corresponien a anomalies cromosòmiques clínicament significatives, l'1.2% eren benignes i del 3.9% no se'n va poder esbrinar la seva rellevància clínica (Shaffer i col. 2007b).

D'acord amb els nostres resultats, tot i haver aplicat la tècnica a molt poques mostres, encara que molt seleccionades, l'aCGH ha demostrat una eficiència molt elevada, ja que ha detectat desequilibris potencialment patogènics al 50% dels pacients analitzats. Tot i no tenir una freqüència de detecció d'anomalies gaire més elevada que l'aplicació conjunta de la FISH o MLPA de regions subtèlomèriques i de la CGH/HR-CGH, l'avantatge de l'aCGH és principalment que amb l'aCGH s'analitzen tant regions intersticials com terminals. No obstant això, el gran inconvenient d'aquesta tècnica rau en l'anàlisi dels resultats, ja que els citogenetistes clínics han de saber diferenciar entre els CNVs benignes dels CNVs potencialment patogènics; a més a més, cal comprovar sempre els resultats obtinguts per FISH o PCR de la regió afectada i avui dia té encara un elevat cost econòmic (Lee i col, 2007).

A la Taula 14, es recull la incidència de detecció de desequilibris diagnosticats com a cariotip normal en utilitzar diferents metodologies.

Taula 14. Incidència de detecció de desequilibris prèviament diagnosticats de cariotip normal segons la literatura.

Casos (tots amb cariotip normal)		CGH/ RH-CGH	subtel FISH	MLPA	aCGH
Diagnòstic Postnatal	Nens/Adults sense RM ni dismòrfies	-	1.34% (Joyce, 2001)	-	11.4% (Shaffer, 2008)
	Nounats/nens amb RM i/dismòrfies o malformacions	7% (Erjavek-Skerget, 2006)	2.5-10% (Bocian, 2004; Erjavek-Skerget, 2006; Ravnán, 2006; Mihçi, 2009)	1.4% (Sismani, 2006; 10% (Erjavek-Skerget, 2006)	4.56% (Shaffer, 2008)
	Adults amb RM i/dismòrfies o malformacions	10-42% (Ness, 2002; Kirchoff, 2001; Kirchoff, 2004; Joly, 2001)	0-23% (Lamb, 1999; Ballif, 2000; Riegel, 2001; Joyce, 2001; Kirchoff, 2004)	4.3-10% (Koolen, 2004; Kirchoff, 2005; Lam, 2006)	5.6-40% (Shaffer, 2007)
Diagnòstic Prenatal	Fetus amb marcadors ecogràfics/malformacions	9.8% (Lapierre, 2005)	4% (Gignac, 2004)	(3/3) (Faas, 2008)	1.3% (Shaffer, 2008) 5% (Van de Veyver, 2009)
	Fetus amb malformacions avortats al primer trimestre	48% (Daniely, 1998) 33.4% (Tabet, 2001)	-	37% (Diego-Alvarez, 2007)	8.2% (LeCaignec, 2005) 57.7% (Benkhalifa, 2005) 5.3% (Shimokawa, 2006)

D'acord amb les dades exposades anteriorment i resumides a la Taula 14, proposem el següent ordre d'utilització d'aquestes tècniques tenint en compte la relació cost/benefici:

- Si el pacient és una persona adulta amb cariotip normal i presenta retard mental, trets dismòrfics i/o malformacions congènites, aconsellem una aplicació conjunta de les tècniques de MLPA i CGH/HR-CGH. En cas de no haver-hi limitació econòmica, aleshores recomanem l'estudi de la mostra mitjançant l'aplicació de l'aCGH.
- De la mateixa manera, si el pacient és un nounat amb cariotip normal però que presenta algun tipus de retard en el desenvolupament, trets dismòrfics i/o anomalies congènites, també aconsellem en aquest cas una aplicació conjunta de les tècniques de MLPA i CGH/ HR-CGH. Com al cas anterior, si no hi ha limitacions econòmiques, aleshores recomanem l'estudi de la mostra mitjançant l'aplicació de l'aCGH.
- Finalment, si es tracta d'un cas de diagnòstic prenatal en què el fetus té un cariotip normal però es detecten marcadors ecogràfics i/o algun tipus de malformació fetal, aleshores aconsellem l'aplicació conjunta de les tècniques de MLPA i CGH/HR-CGH, comprovant sempre que les alteracions identificades no siguin heretades. En cas de no haver-hi cap limitació econòmica, l'aplicació de l'aCGH com a única tècnica també seria possible.

S'ha de tenir present que l'inconvenient més gran que té l'aCGH és el temps d'interpretació dels resultats: s'ha de comprovar que cada alteració en el nombre de còpies identificada és potencialment patològica o benigne, cosa que fa endarrerir el resultat. Aquest fet, si bé no és un factor limitant en diagnòstic postnatal, en diagnòstic prenatal sí que ho és i s'ha de tenir present.

5.2. GRUP B. PACIENTS BARONS 46,XX

Els individus barons amb cariotip 46,XX representen una condició genètica poc freqüent en la població: tenen una incidència de 1:24000 nounats barons (De la Chapelle i col, 1981; Minor i col, 2008). A la majoria dels pacients, el fenotip masculí és conseqüència de la presència del gen SRY en un dels dos cromosomes X (Boucekkine i col, 1994). A la meiosi paterna, els dos cromosomes sexuals s'aparellen i durant el procés de recombinació meiótica, les dues regions pseudoautosòmiques dels cromosomes sexuals (XPAR1, YPAR1 i YPAR2) intercanvien material genètic (Rappold, 1993; Margarit i col, 1998); si es produeix algun error durant aquest procés, com per exemple, que regions homòlogues però normalment no recombinants intercanviïn material genètic, aleshores pot produir-se una transferència de material del cromosoma Y que normalment no és transferit –inclòs el gen SRY– al cromosoma X (Rigola i col, 2002; Minor i col, 2008). Aquest fragment de cromosoma Y contindria factors que estimularien la formació de testicles generant, conseqüentment, característiques sexuals masculines en un individu 46,XX (Margarit i col, 1998).

Tot i que la majoria de barons 46,XX són portadors d'una translocació X;Y, diversos estudis han posat de manifest que aproximadament al 10% d'aquests pacients no hi ha presència de material del cromosoma Y, inclòs el gen SRY, a cap dels cromosomes X (Abbas i col, 1990; Margarit i col 1998). Aquests pacients acostumen a tenir genitals ambigus, però s'ha vist que hi ha excepcions. En aquests casos, la presència d'una mutació en algun dels gens que controlen el desenvolupament dels òrgans sexuals podria permetre la diferenciació testicular en absència del gen SRY (Margarit i col, 1998; Valetto i col, 2004; Rajender i col, 2006; Minor i col, 2008). Una altra possible explicació seria la presència d'una segona línia cel·lular en mosaic confinada a teixit testicular que tingués material del cromosoma Y, determinant, també, el desenvolupament de caràcters sexuals masculins (Abbas i col, 1990; Margarit i col, 1998; Minor i col, 2008).

L'alta variabilitat fenotípica és molt característica dels barons 46,XX: s'han detectat individus amb els genitals masculins interns i externs normals, altres amb genitals ambigus, hipogonadisme i característiques sexuals secundàries anormals (Minor i col, 2008) i d'altres, com a hermafrodites vertaders (Quiapo i col, 2002). Els pacients ho solen detectar quan arriben a l'edat adulta a causa de problemes d'infertilitat deguda a azoospermia (absència de cèl·lules germinals). En aquests individus, l'absència del braç llarg del cromosoma Y -regió on es localitzen els gens AZF relacionats amb l'espermatogènesi/azoospermia- genera aquesta infertilitat.

A la nostra minisèrie, tots els individus estudiats van acudir a la consulta dels serveis genètics per problemes d'infertilitat, on se'ls va diagnosticar azoospermia. Els pacients dels casos 91, 92 i 98 presentaven genitals masculins interns i externs normals, mentre que els pacients dels casos 93-97, hipogonadisme però sense ambigüitats sexuals. Tots ells s'han d'incloure en el grup més majoritari de barons 46,XX, ja que el seu estudi molecular ha permès identificar el gen SRY i altres seqüències específiques del cromosoma Y a tots ells. Els fenotips que presenten són també consistents amb les dades publicades a la literatura sobre els barons 46,XX positius pel gen SRY (Rigola i col, 2002; Margarit E i col, 1998).

S'han publicat diverses hipòtesis que intenten explicar el perquè d'aquesta alta variabilitat fenotípica dels barons 46,XX positius pel gen SRY. Una d'elles seria per diferències en el patró d'inactivació del cromosoma X entre els pacients i per variacions en la quantitat de material del cromosoma Y transferit al cromosoma X, de manera que és esperable un fenotip més masculí quan el gen SRY escapa del patró d'inactivació i quan la quantitat de material del cromosoma Y translocat és més gran (McElreavey i col, 2001; Minor i col, 2008). Recentment, s'ha postulat la hipòtesi de *l'efecte posició*: si el gen SRY està molt a prop del punt de trencament de la translocació i es produeixen, també, reordenaments críptics, això pot afectar l'expressió del gen i originar ambigüitat als genitals i hermafroditisme vertader (Sharp i col, 2005).

D'altra banda, el nostre grup ha publicat, també, la possible influència de la pèrdua o no de material de la regió pseudoautosòmica del cromosoma X durant el procés de recombinació com a efecte contributiu a la variabilitat fenotípica. Així, Rigola i col (2002) van detectar un baró 46,XX amb tres regions PAR1 (dues al cromosoma X i una al Y), suggerint que la presència de fragments del cromosoma Xp de mides diferents podrien contribuir al fenotip del pacient. Amb l'objectiu d'analitzar més detalladament la possible pèrdua o no de material de la regió XPAR1, es van aplicar les tècniques de CGH/HR-CGH i de MLPA en aquells casos de la nostra minisèrie en què encara no havien estat aplicades. Dels 8 casos analitzats, la CGH va detectar pèrdua de material de la regió Xpter corresponent a la regió XPAR1 en tres casos (91, 96 i 97), pèrdua que no ha estat confirmada per MLPA. L'aplicació de la FISH amb sondes subtelomèriques del braç p del cromosoma X tampoc va confirmar la pèrdua de material d'aquesta zona. Els nostres resultats fan pensar que la pèrdua de material no és tant a nivell subtelomèric sinó més intersticial, cosa que explicaria perquè ni la MLPA ni la FISH amb sondes subtelomèriques la identifiquessin. Els nostres resultats semblen reforçar, doncs, la hipòtesi de l'existència de fragments del cromosoma X de mides diferents en aquests pacients que n'explicarien la variabilitat fenotípica.

5.3. GRUP C. PACIENTS AMB ANOMALIA CROMOSÒMICA “APARENTMENT” EQUILIBRADA

Per tal de caracteritzar més acuradament les anomalies cromosòmiques estructurals aparentment equilibrades que ja havien estat prèviament detectades i/o parcialment identificades mitjançant tècniques de citogenètica convencional, s’ha procedit a aplicar diferents tècniques de citogenètica molecular. En primer lloc, en tots aquells casos de què es disposava de material per extreure ADN, s’ha realitzat l’estudi amb CGH/HR-CGH per tal de descartar possibles desequilibris. En segon lloc, s’ha aplicat la MFISH a tots els casos per descartar possibles implicacions d’altres cromosomes que haguessin passat desapercubudes per bandes G. Finalment, s’han utilitzat sondes BAC en aquells casos en què ha estat possible per tal de redefinir els punts de trencament d’aquestes translocacions.

La introducció de noves tècniques de citogenètica molecular al diagnòstic clínic és cada vegada més freqüent. Però per a qualsevol laboratori, a més d’aconseguir l’optimització d’aquestes tècniques, és imprescindible conèixer-ne els seus avantatges i limitacions. En línies generals, l’ús de sondes BAC ha demostrat ser molt eficient a l’hora de redefinir els punts de trencament de les translocacions analitzades (Tapia-Páez i col, 2000; Tumer i col, 2004; Mahjoubi i col, 2005). Tanmateix, el fet que hi hagi pocs estudis publicats on s’utilitzi exclusivament la FISH amb sondes BAC per identificar els punts de trencament de translocacions equilibrades és un indicatiu dels desavantatges que presenta la tècnica.

El principal avantatge de la FISH amb sondes BAC és que permet caracteritzar alteracions cromosòmiques amb una resolució molt més alta que altres tècniques de citogenètica molecular; així, mentre la HR-CGH té una resolució entre 3 i 5 Mb, els BACs permeten arribar a 100-300 kb de resolució. Altres avantatges són l’alta especificitat de les sondes i la rapidesa de detecció visual. D’altra banda, presenta una sèrie de limitacions a nivell metodològic que fa que sigui una tècnica poc adequada per l’ús rutinari en un laboratori de diagnòstic clínic. Si bé es tracta d’una metodologia altament sensible i específica, és també molt laboriosa i requereix personal altament qualificat, cosa que n’impossibilita l’automatització. D’altra banda, el fet de requerir estudis citogenètics previs i adequats a cada cas que guiïn l’elecció de les sondes BAC a hibridar, fa que la tècnica vagi necessàriament acompanyada d’una lentitud en donar resultats, fins i tot després d’haver-la posat a punt. Això fa que l’ús d’aquest tipus de sondes estigui més estès en àmbits de recerca, com poden ser la seqüenciació de genomes, la clonació posicional o la creació de ratolins transgènics, entre altres (Shizuya H i Kouros-Mehr, 2001; Heintz, 2001).

La lentitud i laboriositat dels protocols de cultiu, d'extracció, de quantificació i de marcatge fa que es trigui a donar un resultat en diagnòstic clínic rutinari. Aquest fet encara s'agreuja més quan l'objecte d'estudi és una translocació i s'han d'acotar els punts de trencament, ja que el nombre de sondes BAC a utilitzar s'incrementa molt. A més, en totes aquestes etapes hi ha diverses variables que poden afectar la qualitat dels BACs obtinguts, entre les quals les més importants són: 1) la possible contaminació dels clons durant el cultiu i l'extracció de concentracions massa baixes de sonda BAC i 2) una vegada es té la sonda marcada, la qualitat de les hibridacions dependrà, com en qualsevol altre tipus de FISH, de l'estat de les preparacions metafàsiques, del temps i temperatura de desnaturalització i d'hibridació, i dels rentats de posthibridació.

Com a conseqüència de la laboriositat de la tècnica, només es van aplicar aquestes bateries de sondes BAC en 3 dels 9 casos amb translocacions "aparentment" equilibrades (casos 101, 102 i 105). Els dos primers eren gestants portadores de translocacions cromosòmiques els fetus de les quals van ser avortats per un quadre polimalformatiu. En ambdós casos es van definir els punts de trencament per tal de poder establir una correlació genotip-fenotip entre els cromosomes derivatius heretats pels fetus i la clínica que presentaven. El darrer cas, el 105, es tractava d'un pacient que havia estat diagnosticat amb retard mental i microcefàlia primària. Aquest cas era molt interessant perquè aquesta síndrome està associada al locus 19q13.1q13.2 (Roberts i col, 1999), una regió molt pròxima a la zona de trencament de la translocació de la qual el nostre pacient n'era el portador.

Als casos 101 i 102, es van poder redefinir els punts de trencament del cromosoma 15 implicat en les translocacions de les dues dones com a banda 15q15.1. El quadre de malformacions congènites que presentaven els fetus era conseqüència de la presència d'un cromosoma 15 derivatiu extra, cosa que generava una trisomia parcial de la regió 15pter-15q15.1 als seus cariotips. Aquest cromosoma derivatiu extra era conseqüència de la segregació 3:1 de la translocació materna, situació que es produeix molt freqüentment quan un dels cromosomes derivats de la translocació és molt més petit que la resta. Aquesta regió triplicada 15q11q13, que inclou les bandes cromosòmiques associades a la síndrome de *Prader-Willi/Angelman*, és una zona altament inestable ja que conté un nombre molt elevat de seqüències repetitives que afavoreix l'alta freqüència de reorganitzacions cromosòmiques en aquesta regió (cromosomes marcadors derivatius del cromosoma 15, translocacions, etc), amb una elevada heterogeneïtat clínica. A més, és important fer estudis de disomia uniparental (UPD) en aquests pacients tenint en compte que aquesta regió està subjecte a processos d'imprompta (Battaglia i col, 2008). Recentment, s'ha descrit un efecte de dosi genètica dels

gens d'aquesta regió, evidenciant un agreujament de la clínica dels pacients amb la presència de tetrasomies parcials d'aquesta zona respecte als que tenen trisomies parcials (Redaelli i col, 2005; Battaglia i col, 2008).

Segons la Refseq, hi han més de 300 gens a la regió 15cen-15q15.1. De tots els gens localitzats més pròxims a la regió PWS/AS, cal destacar-ne dos: el gen GABRG3 (OMIM 600233, GAMMA-AMINOBTYRIC ACID RECEPTOR, GAMMA-3) a la banda 15q11.2q12 i el gen SLC12A6 (SOLUTE CARRIER FAMILY 12 (SODIUM/CHLORIDE TRANSPORTER), MEMBER 6), localitzat a la banda 15q13q14. L'àcid gamma-aminobutíric (GABA) és el neurotransmissor inhibidor més important del sistema nerviós central i actua unint-se a receptors GABA; alteracions en gens que codifiquen per aquests receptors podrien explicar algunes de les manifestacions clíniques de les síndromes associades a marcadors derivatius del cromosoma 15, com per exemple, convulsions, hiperactivitat, agressivitat (tant característica de la síndrome de *Prader-Willi*) i desordres autístics (Battaglia i col, 2008). Respecte al gen SLC12A6, que codifica per una proteïna que intervé en el transport de ions a través de la membrana plasmàtica i que s'expressa en un gran nombre de teixits (Battaglia i col, 2008), s'ha vist que mutacions en aquest gen causen la síndrome d'*Andermann*, caracteritzada per una agenèsia del cos callós associada amb defectes de desenvolupament i neurodegeneratius i trets dismòrfics (Uyanik i col, 2006). Alguns dels trets clínics dels fetus avortats dels casos 101 i 102 podrien quedar explicats per aquesta síndrome, com la fàcies dismòrfica, la displàsia multiquística del ronyó dret, l'urèter filiforme a la meitat proximal, la dilatació de l'aurícula dreta, el canell esquerre en flexió anterocubital, la comunicació anterocubital tipus *ostium secundum* i l'agenèsia d'una artèria umbilical.

L'altre pacient estudiat, cas 105, presentava microcefàlia primària (MCPH), una síndrome autosòmica recessiva que provoca una alteració del desenvolupament del sistema nerviós central. Aquesta síndrome es caracteritza per dos elements principals: presència de microcefàlia al naixement i de retard mental no progressiu a diferència de la microcefàlia secundària, que sí que cursa amb un procés neurodegeneratiu (Woods i col, 2005). Fins a l'actualitat, s'han descrit com a mínim 6 loci relacionats amb aquesta síndrome, dels quals s'han identificat 4 gens: locus MCPH1 (8p22pter, gen *microcephalin*); locus MCPH2 (19q13.1q13.2, gen desconegut); locus MCPH3 (9q34, gen CDK5RAP2); locus MCPH4 (15q15q21, gen desconegut); locus MCPH5 (1q31, gen ASPM) i locus MCPH6 (13q12.2, gen CENPJ)(Roberts i col, 1999; Woods i col, 2005). El nostre pacient era portador d'una translocació *de novo* "aparentment" equilibrada entre els braços llargs dels cromosomes 16 i 19, i era molt probable que els punts de trencament afectessin al locus MCPH2, ocasionant una disfunció d'un gen o varis. Per tal de localitzar el gen/gens al locus MCPH2 implicats en la síndrome, es va aplicar una bateria de 10

sondes BAC corresponents a les bandes 19q13.11 (316I4), 19q13.12 (38C1, 45P2, 359H23 i 841J24), 19q13.2 (374A11), 19q13.32 (43N16 i 691H23), 19q13.33 (79A3) i 19q41 (158G19), que van permetre definir més acuradament els punts de trencament a la banda 19q13.32, entre les sondes BAC 43N16 i 691H23 (Fig. 29).

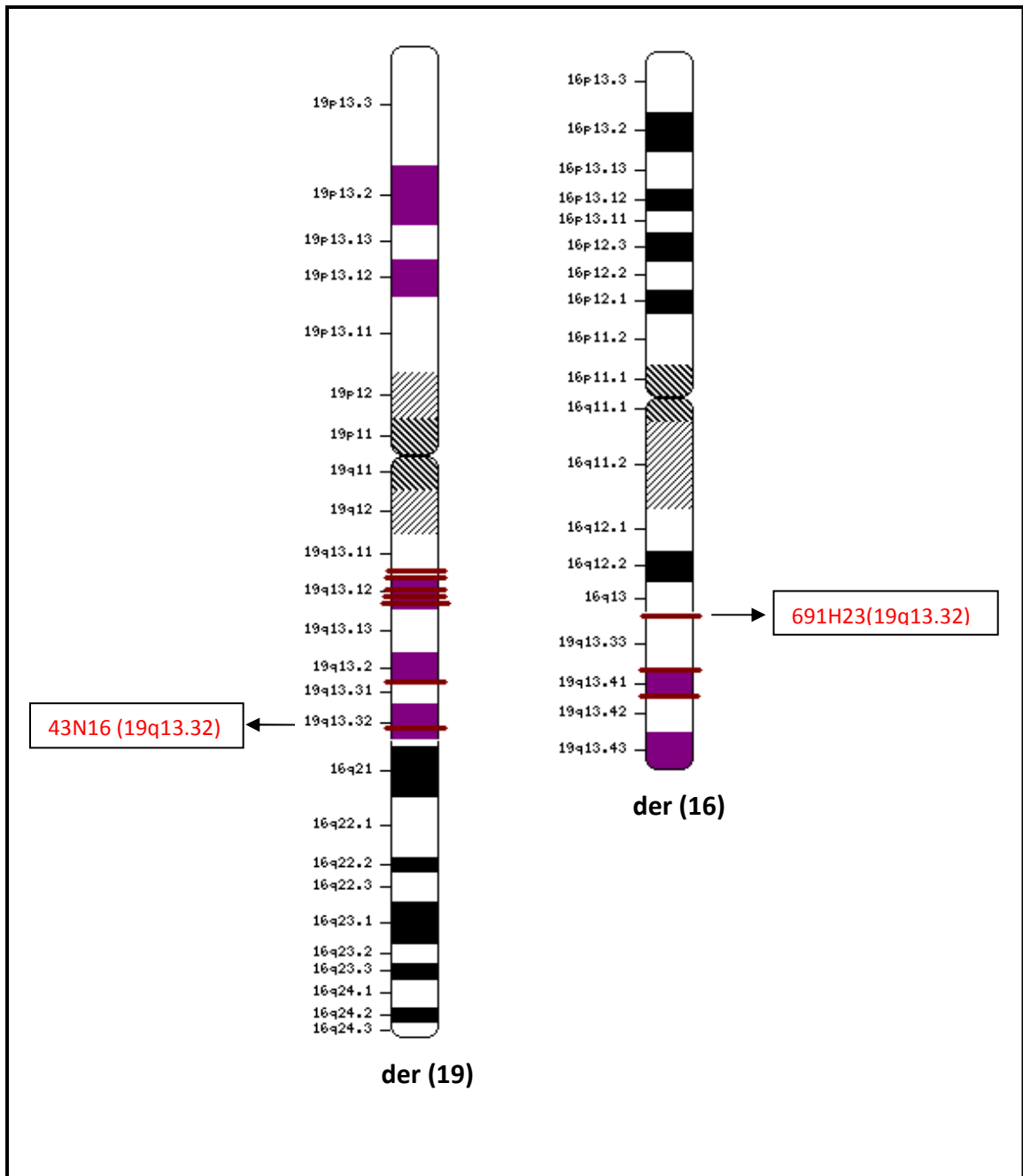


Figura 29. Ideograma dels cromosomes derivatius 19 i 16 on es pot veure el punt de trencament de la translocació situat a la banda 19q13.32, entre les sondes BAC 43N16 i 691H23.

La banda 19q13.32, tot i ser molt pròxima al locus MCPH2, no hi coincideix exactament; aquest fet ens fa pensar que podria haver-hi hagut un error en el diagnòstic de microcefàlia primària del nostre pacient tenint en compte que aquest és molt difícil: com proposen Woods i col. (2005), cal descartar abans altres possibles causes de la microcefàlia, com podrien ser l'abús del consum d'alcohol durant la gestació, la infecció per toxoplasma o bé, la síndrome de *Rubistein-Taiby*.

En resum, el nostre estudi evidencia que les sondes BAC permeten identificar les regions exactes implicades en alteracions cromosòmiques estructurals equilibrades o no, i també les que es troben en mosaicisme, essent una metodologia molt útil per a l'establiment de correlacions genotip-fenotip (Knegt i col, 2003; Roberts i col, 2003; Tumer i col, 2004; Mahjoubi i col, 2005). D'altra banda, tenint en compte les limitacions anteriorment esmentades, són poc adequades per al diagnòstic rutinari, tant prenatal com postnatal.

5.4. GRUP D. PACIENTS AMB TRISOMIES O MONOSOMIES PARCIAIS

En aquest treball, s'ha estudiat un total de 18 pacients que presentaven monosomies i/o trisomies parcials en el seu cariotip amb l'objectiu de redefinir aquestes anomalies cromosòmiques per tal de poder establir correlacions genotip-fenotip tenint en compte la clínica manifestada. Des que Carey i Viskochil, l'any 2002, van actualitzar el mapa humà de malformacions s'ha produït un avenç espectacular en incrementar-se molt el nombre de gens identificats que, en mutar-se, causen malformacions/síndromes (Carey i Viskochil, 2007). Actualment és possible elaborar un llistat de malformacions/síndromes amb els gens i els seus loci respectius que s'ha demostrat que hi estan associats, com per exemple, els gens associats a holoprosencefàlia, a displàsies ectodèrmiques o a condrodisplàsies (Epstein i col, 2004; Superti-Furga i col, 2007). En total, hi ha com a un mínim 359 loci identificats i 298 gens clonats involucrats en el desenvolupament de fins a 271 fenotips diferents de malformacions i síndromes (Carey i Viskochil, 2007). En aquest procés d'identificació de loci i de gens responsables dels diferents tipus de malformacions congènites/síndromes, ha estat de gran importància el desenvolupament de les noves tècniques de citogenètica molecular (CGH/HR-CGH, FISH, MLPA, aCGH), ja que ha permès la caracterització d'anomalies cromosòmiques a una resolució molt elevada, facilitant posteriorment la identificació del gen -o gens- causants del fenotip anormal.

S'estima que la freqüència de monosomies i trisomies parcials en cromosomes autosòmics detectables per tècniques de citogenètica convencional és de 1:7000 nounats aproximadament (Jacobs i col 1992). Quan l'anomalia cromosòmica ha estat prèviament detectada per bandes G, és més fàcil pels genetistes moleculars acabar de caracteritzar-la, ja que poden redirigir les tècniques moleculars més adients per a cada anomalia. El nostre estudi d'aquests 18 pacients ha evidenciat la utilitat de la CGH/HR-CGH, ja que en un 94.5% dels casos estudiats s'ha definit la regió cromosòmica implicada mitjançant aquesta tècnica. En tots els casos en què va ser possible, aquests resultats van ser confirmats per altres tècniques, com la FISH i la MLPA. Sempre s'ha de realitzar aquesta confirmació: d'una banda, per descartar possibles falsos positius –sobretot si els desequilibris genòmics involucren regions problemàtiques per a l'anàlisi de la CGH/HR-CGH (regions telomèriques, pericentromèriques, properes als blocs d'heterocromatina dels cromosomes 1, 9 i 16, o bé, els cromosomes 19 i 22); de l'altra, per acabar de redefinir la zona d'eucromatina implicada en el desequilibri genòmic. La FISH amb sondes BAC ha estat molt útil, gràcies a la seva elevada resolució, per redefinir amb molta més precisió la zona cromosòmica implicada. La MLPA s'ha aplicat en aquells casos en què no estava clara la implicació de les regions subteloemèriques i no es

disposava de sondes BAC per confirmar-ho. El nostre treball ha demostrat, doncs, que el protocol d'actuació en aquests casos –és a dir, quan ja es coneix, o se sospita, de la regió amb el desequilibri del genoma- ha de passar per l'aplicació de la CGH/HR-CGH en primer lloc, ja que permetrà redefinir les bandes implicades i, posteriorment, comprovar-ne el resultat mitjançant la FISH o la MLPA. Contràriament, en cas de pacients amb cariotip “aparentment” normal i retard mental mental i/o malformacions congènites, el protocol d'actuació ha de variar, ja que el nostre treball ha demostrat que l'aplicació de la CGH/HR-CGH no és la millor primera opció (veure protocol d'actuació de l'apartat 5.1.2).

Les regions cromosòmiques que s'han vist implicades en les monosomies i trisomies parcials estudiades a la nostra sèrie estan representades a la figura 30.

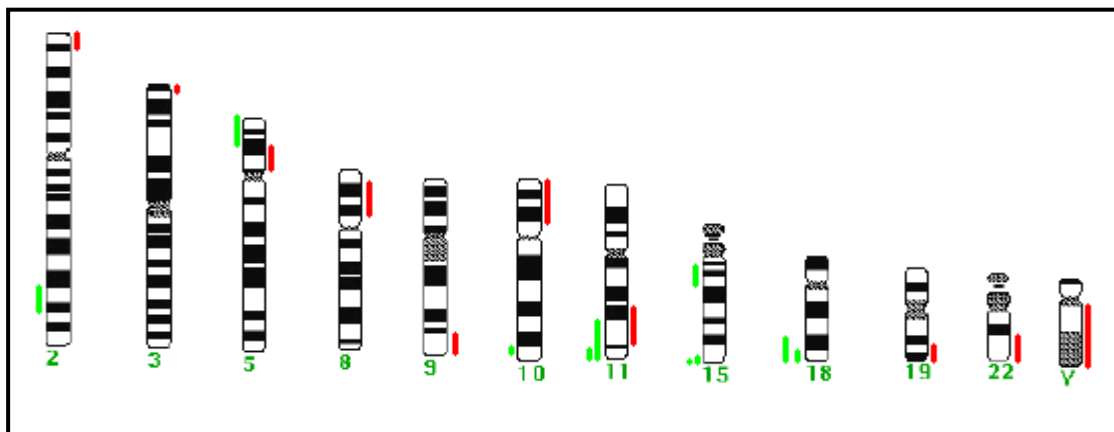


Figura 30. Cromosomes més afectats per monosomies (en verd) i les trisomies (en vermell) parcials detectades a la nostra sèrie.

Els cromosomes amb més nombre d'alteracions han estat el 2, 5, 10, 11, 15 i 18, cosa que sembla indicar que aquests cromosomes tenen una major inestabilitat o una major viabilitat en estat de desequilibri de dosi gènica.

Les regions cromosòmiques que estan involucrades amb les trisomies parcials detectades, en línies generals coincideixen també amb el mapa de duplicacions cromosòmiques elaborat per Brewer i col. (1999). Brewer i col. (1999) detallen 47 tipus de malformacions congènites associades a duplicacions parcials autosòmiques aïllades sense mosaicisme (Fig. 2). Nosaltres hem trobat que un 75% (6/8) d'aquestes trisomies parcials han estan prèviament descrites per aquests autors (descartant les trisomies que anaven acompanyades de monosomies). Aquest fet reforça la idea que aquestes trisomies, en ser viables, són també freqüents a la població. Les dues úniques bandes que hem trobat que no estaven descrites a l'estudi de Brewer i col (1999) són la 9q34 (cas 116) i la 19q13.3qter (cas 123). Al mapa de malformacions humanes actualitzat per Carey i Viskochil (2007), la banda

9q34 està associada a diversos síndromes, entre les quals destaquen la microcefàlia primària (9q34.1), concretament el locus 3 (MCPH 3), en què s'hi ha identificat el gen CDK5RAP2 (CDK5 REGULATORY SUBUNIT ASSOCIATED PROTEIN, MIM 604804), i també, la síndrome de *Walker-Warburg* (9q34.1, WWS; MIM 236670), amb la identificació del gen POMT1 (POMT1 PROTEIN O-MANNOSYL TRANSFERASE, MIM 607423). Tanmateix, el pacient del cas 116 no tenia sospita diagnòstica de cap d'elles, de manera que els tres dismòrfics que presenta podrien ser conseqüència d'una correlació genotip-fenotip que encara no hagi estat descrita. Respecte la regió 19q13.3qter, els autors l'associen a microcefàlia (19q13.3), a l'anèmia *Diamond-Blackfan* (19q13.4, DBA; MIM 205900) i a distròfia miotònica (19q13.4, DM; MIM 160900). No obstant això, al nostre cas quedarien descartats, ja que aquesta regió està implicada en una inversió duplicació i la clínica que presenta el pacient seria conseqüència d'aquesta trisomia parcial 19qter.

Respecte les regions cromosòmiques que nosaltres hem trobat implicades en monosomies parcials, cal dir que també coincideixen en línies generals amb el mapa de delecions cromosòmiques elaborat per Brewer i col (1998). En aquest cas, els autors van aconseguir identificar 137 regions cromosòmiques associades a alguna de les 47 malformacions congènites estudiades (Fig. 1). Comparant les nostres dades amb les d'aquests autors hem observat que un 80% (8/10 casos) havien estat ja descrits (s'han descartat les monosomies que anaven acompanyades de trisomies). Aquest fet, com al cas anterior, suggereix que es tracta de monosomies viables i que, per tant, són freqüents a la població. Els dos únics pacients amb monosomies no descrites afecten a la mateixa banda 15q26 i són cromosomes en anell. Al mapa de malformacions humanes actualitzat per Carey i Viskochil (2007), no hi ha cap referència a la síndrome del cromosoma 15 en anell descrita per Tumer i col (2004). Aquesta síndrome està causada bàsicament per la deleció del gen IGF1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 RECEPTOR GENE, MIM 147370), ubicat a la banda 15q26.3. L'anell present al cariotip dels dos pacients (casos 125 i 126), en presentar la deleció d'aquesta banda, explicaria la clínica que manifesten. Carey i Viskochil (2007) únicament fan referència a la síndrome *disostosi espondilicostal*, desordre provocat per la presència de mutacions al gen MESP2 (MESODERM POSTERIOR GEN, MIM 605195), situat a la banda 15q26.1; cap dels dos cromosomes en anell presenten, però, deleció d'aquesta banda.

5.4.1. Reorganització cromosòmica complexa del cromosoma 5 (cas 110)

Es tracta d'una pacient que en néixer presentava una reorganització cromosòmica complexa al braç curt del cromosoma 5. L'aplicació de les tècniques moleculars es va permetre determinar que aquesta reorganització cromosòmica incloïa una inversió duplicació de la regió 5p13.1p14.2, una duplicació de la banda 5p12 i una deleció de les bandes 5p14.2pter. La pacient manifestava característiques fenotípiques de les dues síndromes relacionades amb el braç p del cromosoma 5: *Cri du Chat* i *trisomia 5p*, i va morir al cap de 3 mesos d'haver nascut a causa d'una insuficiència respiratòria.

La síndrome de *Cri du Chat* va ser descrita per primera vegada per Lejeune i col (1963) i es caracteritza per un crit que recorda al miol d'un gat, per anomalies craniofacials (microcefàlia, fàcies rodona, micrognàtia, hipertelorisme, pont nasal prominent i fissures palpebrals horitzontals i estretes), per hipotonia generalitzada i per retard mental i de parla (Mainardi i col, 2006). Aquestes delecions poden ser intersticials o terminals i ocasionalment tenen lloc dins del context d'un cariotip citogenèticament complex (Wang i col, 2008). Les regions crítiques que s'han descrit d'aquesta síndrome són, per un costat, la banda 5p15.3, la responsable del crit de miol de gat, i de l'altre, la banda 5p15.2, responsable de les dismorfies i del retard mental (Mainardi i col 2001). Les manifestacions clíniques dependran de quines són les bandes delecionades (Church i col, 1995).

La duplicació parcial o completa del braç petit del cromosoma 5 va ser descrita per primera vegada per Lejeune i col (1964). Les manifestacions clíniques depenen també de les bandes implicades en la duplicació, però s'ha identificat una regió crítica, la 5p10p13.1, que causa el fenotip més sever: macrocefàlia amb un os occipital prominent, hidrocefàlia, ventricles cerebrals dilatats, fissures palpebrals prominents amb hipertelorisme i *epicanthus*, pont nasal deprimat, hipoplàsia facial, micrognàtia, orelles anòmales i displàsiques, coll curt, hipoplàsia dels músculs abdominals i defectes cardíacs. Els pacients poden patir insuficiències respiratòries, poden necessitar alimentació sondada, hipotonia, convulsions, retard psicomotor i mort prematura (Lorda-Sánchez i col, 1997).

El nostre pacient (cas 110) presentava manifestacions clíniques de les dues síndromes a causa d'una reorganització cromosòmica complexa que implicava una deleció de la regió crítica associada a la síndrome de *Cri du Chat* i, simultàniament, una duplicació de la també regió crítica associada a la síndrome de la trisomia 5p.

L'aplicació conjunta de les tècniques de CGH/HR-CGH, de la FISH amb sondes BAC i de l'aCGH va permetre definir la reorganització cromosòmica complexa com una duplicació invertida de la regió 5p13.1p14.1, que donava lloc a una deleció de la regió 5p14.2pter i una duplicació de la banda 5p12. Aquesta reorganització cromosòmica complexa constitucional (CCR) havia d'involucrar com a mínim dos punts de trencament per poder entendre el seu mecanisme de formació. Tot i que aquest tipus de reorganitzacions són poc freqüents, les inversions duplicacions associades a delecions (inv dup del) s'han descrit sobretot als extrems finals dels cromosomes (Leclercq i col. 2009). El mecanisme de formació d'aquesta reorganització complexa que els autors proposem a l'article està representat a la Figura 31.

D'acord amb els resultats de l'aCGH i de l'orientació del segment duplicat obtingut gràcies a la FISH amb sondes BAC, s'haurien produït 3 punts de trencament: un situat a unes 24.34Mb aproximadament (5p14.2), l'altre a unes 45.09Mb (5p12) i un tercer estaria localitzat entre les bandes 5p12 i 5p13.1 (RP11-760E4 i 507F11). En primer lloc, dos trencaments de doble cadena (DSBs) tenen lloc a nivell de les bandes 5p13.1 i 5p14.2. A continuació, es repara el trencament per fusió dels extrems 3' d'una cadena i 5' d'una altra, generant un cromosoma amb el fragment 5p13.1p14.2 invertit i la regió 5p14.2pter delecionada. Aquest mecanisme de reparació dels trencaments de doble cadena ha tingut lloc a través d'un procés de NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) o qualsevol altre mecanisme que no involucri seqüències repetitives de baix número de còpies (LCR), ja que no es van detectar duplicacions segmentàries a cap dels dos punts de trencament. Després de la replicació de l'ADN, les dues cromàtides germanes tenen extrems terminals molt inestables, de manera que es produeix una fusió d'aquestes cromàtides germanes per el mecanisme NHEJ, generant un cromosoma dicèntric. Finalment, aquest cromosoma dicèntric es trenca per la banda 5p12 donant lloc al derivatiu del cromosoma 5 de la pacient.

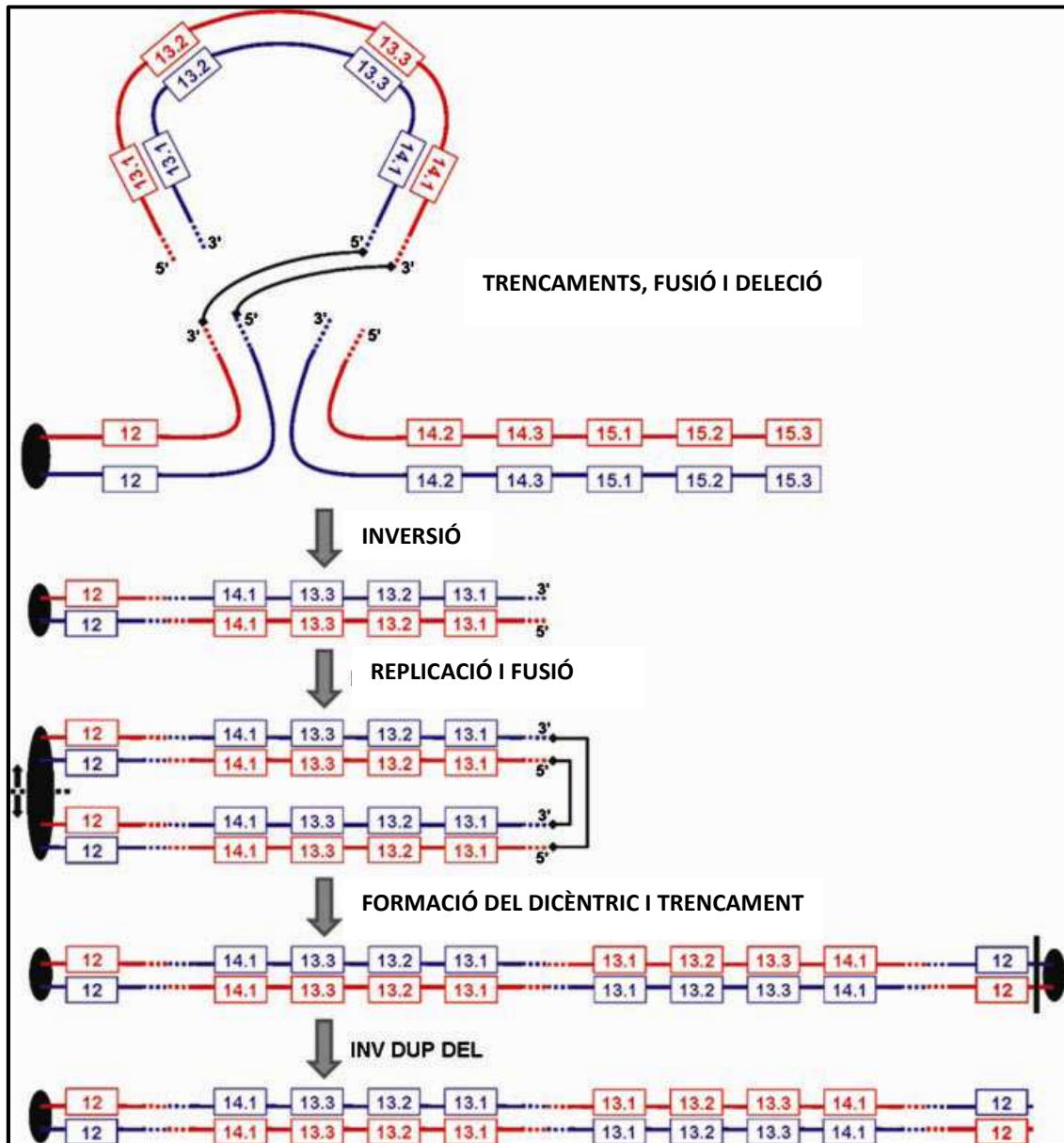


Figura 31. Esquema del mecanisme proposat per la formació de la CCR.

Amb aquest model es pot visualitzar perfectament com a través de la formació d'aquesta reorganització cromosòmica complexa, queden afectades les regions crítiques de les dues síndromes, les corresponents al *Cri du Chat* per un costat (deleció de les bandes 15p15.3 i 15p15.2), i les corresponents a la trisomia 5p per l'altre (duplicació de les bandes 5p12p13.1). La duplicació d'aquesta regió podria explicar la severitat del fenotip de la pacient resultant amb una mort prematura, ja que aquesta banda conté els gens *GDNF* (GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR) i *FGF10* (FIBROBLAST GROWTH FACTOR)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El primer regula la sinapsi neuromuscular (Wang CY i

col, 2002), i el segon està involucrat en una gran varietat de processos biològics, com el desenvolupament embrionari, el creixement cel·lular, la morfogènesi i la reparació de teixits; a més, models animals han demostrat que aquest gen és essencial per al desenvolupament del cervell, les extremitats i els pulmons durant l'embriogènesi (Sekine K i col, 1999; Umemori H i col, 2004). És possible, doncs, que la duplicació d'aquests gens sigui la responsable de la severitat del fenotip de la síndrome de la trisomia 5p, tot i que al nostre cas és difícil establir una correlació genotip-fenotip perquè altres factors com la disrupció de gens, la fusió de gens o canvis en la posició d'aquests gens durant la formació d'aquesta reorganització cromosòmica complexa, podrien estar influint en la clínica de la pacient.

5.4.2. Cromosoma 19 recombinant (cas 123).

El pacient (cas 123), portador d'un cromosoma derivatiu del 19, presentava un retard de creixement intrauterí i, en néixer, se li va diagnosticar microcefàlia, fàcies dismòrfica, defectes congènits cardíacs, hipoplàsia del cos callós i retard psicomotor. La mare era portadora d'una inversió pericèntrica del cromosoma 19 amb un fenotip normal. L'aplicació de les tècniques moleculars va permetre caracteritzar a la mare la inversió que involucrava la regió 19p13.3q13.3 i definir el cromosoma derivatiu present al fill com una forma recombinant del 19 amb una duplicació de la banda 19q13.3qter i una deleció de 19p13.3pter. La FISH amb les sondes subtelomèriques 19q confirmaven la duplicació i les sondes subtelomèriques 19p confirmaven la deleció, mentre que a la mare eren normals. La CGH detectava la duplicació a nivell 19q13.3qter però no la deleció de 19pter, cosa que sembla indicar que la regió delecionada és inferior a les 5Mb, mentre que la duplicada estaria al voltant de les 17Mb.

El mecanisme de formació de la inversió pericèntrica materna i del recombinant està representat a la Figura 32.

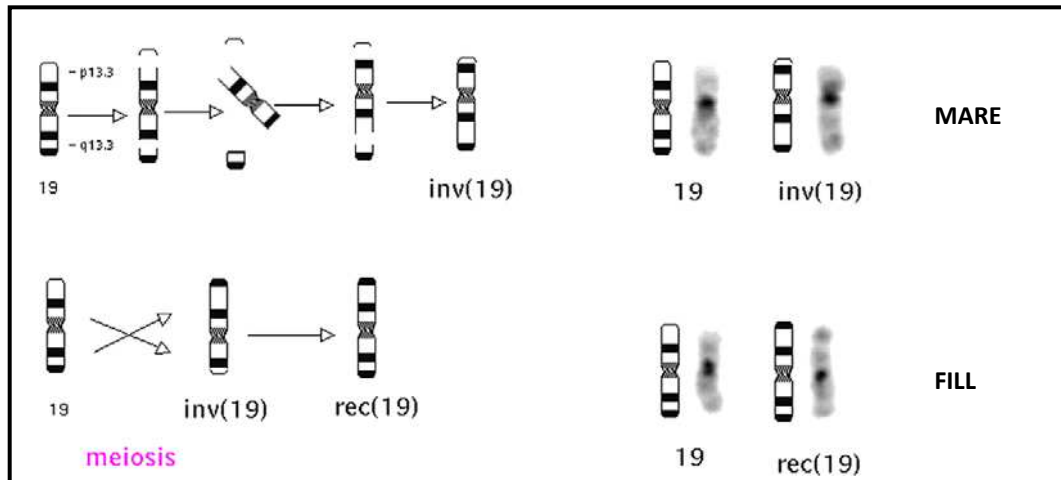


Figura 32. Representació esquemàtica i de la inversió del 19 i del seu derivatiu.

Les inversions pericèntriques són un tipus de reorganització cromosòmica poc freqüent en la població –entre un 0.12 i un 0.7%– que té tendència a produir-se en certs cromosomes i en certs punts de trencament (Gardner i Sutherland, 1996). Concretament, les inversions pericèntriques del cromosoma 19 són anomalies molt rares i hi ha molt pocs casos publicats a la literatura. Les diferents manifestacions clíniques del nostre pacient serien conseqüència de la combinació dels dos desequilibris genòmics, la trisomia 19qter i la deleció 19pter. De fet, molts dels trets característics de la trisomia distal 19qter són presents al nostre pacient, com per exemple, retard de creixement, cabells bastos, fàcies característica, defectes cardíacs i un retard psicomotor sever (Rombout i col, 2004). Únicament s’han publicat dos casos de deleccions *de novo* de la regió 19p13pter, segurament a causa de la dificultat en la detecció de l’anomalia. El primer cas presentava microcefàlia, dismorfies menors, espasmes, sordesa i anomalies a la retina; el segon cas, fissura palatina, dificultats d’oïda, malformacions cardíques congènites, desregulació del sistema immunitari i dificultats en l’aprenentatge (Hurgoiu i col, 1984; Archer i col, 2005). El nostre pacient no tenia problemes auditius ni oculars, ni presentava desregulacions del sistema immunitari, fissura palatina, ni espasmes.

En famílies sense historial de recombinants, el risc estimat de tenir un fill amb fenotip anòmal conseqüència d’una inversió recombinant és d’un 1%; en canvi, per famílies que hagin tingut ja algun fill amb fenotip patològic, el risc s’incrementa fins d’un 5% a un 15% (Gardner i Sutherland, 1996). Fins a l’actualitat, ser portador d’una *inv(19)* s’havia considerat com a un fet

innocu, i el nostre estudi revela que hi ha un risc de tenir descendència amb un rec(19). De tota manera, encara és aviat per fer un càlcul dels riscos reals.

Aquest seria el primer cas en què una inversió pericèntrica del 19 ha estat detectada com a conseqüència de la identificació d'un cromosoma recombinant del 19 durant un diagnòstic prenatal. Aquest treball creiem que ajudarà en un futur a calcular el risc de progenitors portadors d'una inversió pericèntrica del 19 i oferir, així, un millor consell genètic.

5.4.3. Anells del cromosoma 15 (casos 125 i 126).

La freqüència a la població dels cromosomes 15 en anell és molt baixa (Schinzel, 2001). Majoritàriament es transmeten per via materna (Nikitina i col, 2003) i presenten una àmplia variabilitat clínica associada, que dependrà del grau de mosaïcisme, de la mida de la regió delecionada com a conseqüència de la formació de l'anell, de l'origen parental i, també, de la seva inestabilitat mitòtica (Glass i col, 2006). Tot i això, Tumer i col (2004) van associar un fenotip als cromosomes 15 en anell, conegut com la *síndrome dels cromosomes 15 en anell*, caracteritzada per retard de creixement, fàcies triangular, microcefàlia, braquidactília i retard mental variable. També s'hi ha associat peu equí, sindactília dels dits dels peus i malformacions urogenitals. El retard de creixement que afecta aquests pacients seria conseqüència de la delecio de la banda 15q26.3, una banda que conté el gen IGF1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 RECEPTOR GENE, MIM 147370) (Tumer i col, 2004).

En els dos pacients, no emparentats, de la nostra sèrie (casos 125 i 126), presentaven un cromosoma 15 en anell, *de novo* a totes les metafases analitzades i de mida semblant a nivell de citogenètica convencional. La similitud de la clínica entre aquests dos pacients és evident, sobretot pel que fa referència als trets dismòrfics lleus com la fàcies triangular i la micrognàtia. Tots dos pateixen, també, un retard de creixement molt important, especialment al segon cas, que va acompanyat de malformacions a les extremitats. Tumer i col (2004) van descriure la variabilitat en el grau de retard mental dels pacients afectats per la síndrome dels cromosomes 15 en anell. Pel que fa a la icterícia patològica del primer cas i la dificultat en la parla del segon, es tracta de variants fenotípiques que, tot i no ser majoritàries, també ha estat descrites (Tumer i col. 2004, cas 2). Per tant, podem concloure que tots dos casos s'ajusten a la clínica de la síndrome dels cromosomes 15 en anell.

Tenint en compte que en tots dos casos la formació de l'anell ha tingut com a conseqüència la delecio de la mateixa regió cromosòmica (la banda 15q26.3), quedaria justificada la gran similitud de la clínica entre aquests dos pacients. Tanmateix, el fet que

DISCUSSIÓ

l'estudi amb HR-CGH hagi detectat una pèrdua de material únicament al primer cas, és un indicatiu que la banda delecionada en aquest primer cas és major de 3Mb, mentre que al segon cas, ha de ser inferior a les 3Mb per haver passat desapercebuda. Aquesta diferència de la mida del material delecionat podria justificar el fet que la clínica d'aquests dos pacients no sigui exactament la mateixa.

5.5. GRUP E. PACIENTS AMB CROMOSOMES MARCADORS SUPERNUMERARIS

Els cromosomes marcadors supernumeraris (sSMC) han estat definits recentment com a cromosomes estructuralment anormals que no poden ser caracteritzats sense ambigüitat mitjançant tècniques de citogenètica convencional i que tenen una mida inferior a un cromosoma 20 de la seva mateixa metafase (http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm). El recent treball revisió de Liehr i col. (2007), on s'han recopilat dades de 132 estudis publicats sobre sSMC, ha permès estimar la seva incidència al 0.075% dels casos prenatals, al 0.044% dels nounats, al 0.288% dels pacients amb retard mental, al 0.204% dels fetus amb marcadors ecogràfics i al 0.125% de pacients infèrtils.

Tot i que el desenvolupament de les tècniques de citogenètica molecular ha representat un gran avenç en la identificació i caracterització d'aquests cromosomes marcadors, encara avui dia es coneixen molt pocs sSMC correlacionats amb alteracions o síndromes clíniques (Liehr i col, 2004). Es calcula que entre el 30% i el 50% dels embarassos en què es diagnostica la presència d'un sSMC són avortats, evidenciant que encara hi ha molt de camí per recórrer per poder oferir un consell genètic millor i més acurat (Liehr i col, 2007).

Al nostre treball s'ha estudiat una sèrie de 19 casos en què es va detectar la presència d'un o múltiples cromosomes marcadors per bandes G. L'aplicació de la bateria de diferents tècniques de citogenètica molecular (CGH/HR-CGH, MFISH, cen i subcenMFISH i BACs) ha permès una identificació més precisa de l'origen del cromosoma marcador en un 94.7% (18/19) dels pacients estudiats; només en únic cas, el 128, no s'ha pogut determinar amb exactitud l'origen del material genètic contingut al marcador per manca de suficient material fixat, encara els resultats obtinguts indicaven que podia tractar-se d'una invdup13, 14, 21 ó 22. S'ha requerit dos tècniques, com a mínim, per a la caracterització de cada sSMC analitzat.

El 64.8% dels marcadors estudiats a la nostra sèrie tenen un origen *de novo*, mentre que un 15.8% són d'herència materna; del 19.4% restant, ha resultat impossible saber-ne l'origen. D'acord amb les dades recopilades per Liehr i col. (2007), la freqüència de sSMC *de novo* respecte els d'origen familiar és aproximadament 2:1 tant en cèl·lules coriòniques, cèl·lules amniòtiques com limfòcits de sang perifèrica. Concretament, en líquid amniòtic, la proporció és d'un 72% *de novo* vs un 28% heretat, i en sang, d'un 69% *de novo* vs un 31% heretat aproximadament. Comparant aquestes dades amb les del nostre estudi, es pot observar com les freqüències de marcadors *de novo* identificats tant en líquid amniòtic com en sang perifèrica són superiors al doble de les freqüències de marcadors d'origen familiar (5:1 en LA i 8:2 en SP).

Aquest fet podria explicar-se pel número reduït de mostres estudiades. Respecte els casos d'herència familiar, la forma de transmissió més comuna dels sSMC d'acord amb la literatura és per via materna, cosa que sí que s'ha acomplert al nostre treball, ja que tots els casos d'origen familiar estudiats són de transmissió materna.

S'ha publicat que el 76% dels casos amb sSMC d'origen familiar no presenten anomalies clíniques, mentre que el 75% dels *casos de novo* sí que en manifesten (Liehr i col, 2006). Al nostre estudi, tots els pacients en què es va diagnosticar un cromosoma marcador *de novo* en sang perifèrica presentaven alguna alteració fenotípica; a més a més, en aquests pacients, s'ha pogut observar una relació directa entre la presència de material eucromàtic al marcador i anomalia clínica. En un únic pacient (cas 142) s'ha confirmat la correlació entre absència d'eucromatina i absència de fenotip anormal, ja que els altres tres pacients (casos 138, 143 i 145), tot i no haver detectat material eucromàtic als marcadors, presentaven trets dismòrfics, oligozoospermia i un fenotip similar al de *Prader-Willi*, respectivament. Aquest fet podria explicar-se per no haver detectat eucromatina en aquests marcadors amb les diferents tècniques utilitzades quan realment sí que en tenien, encara que no pot descartar-se que s'origini per un efecte de disomia uniparental o que la clínica sigui conseqüència d'una alteració cromosòmica críptica o gènica no detectada. Respecte als pacients amb sSMC detectats en sang perifèrica amb herència familiar, és interessant destacar que tots dos (casos 131 i 143) presentaven anomalies clíniques. Al primer cas, el quadre polimalformatiu del fetus avortat podria explicar-se perquè la mare és portadora d'una translocació equilibrada entre els cromosomes 10 i 15, i el marcador detectat al fill és el derivatiu del cromosoma 15 que ha estat originat en la gametogènesi de la mare; el segon cas, està àmpliament discutit a l'apartat 5.5.2. Pel que fa als sSMC identificats en líquid amniòtic, únicament es va detectar material eucromàtic als dos únics casos que presentaven marcadors ecogràfics –casos 139 i 141. A la resta de casos, els marcadors estaven constituïts per material heterocromàtic i no presentaven marcadors ecogràfics. Aquests resultats s'ajusten amb les dades publicades a la literatura (Liehr i col, 2006).

A l'ideograma de la Figura 33, es detallen les regions eucromàtiques detectades en la composició dels sSMC estudiats en la nostra sèrie.

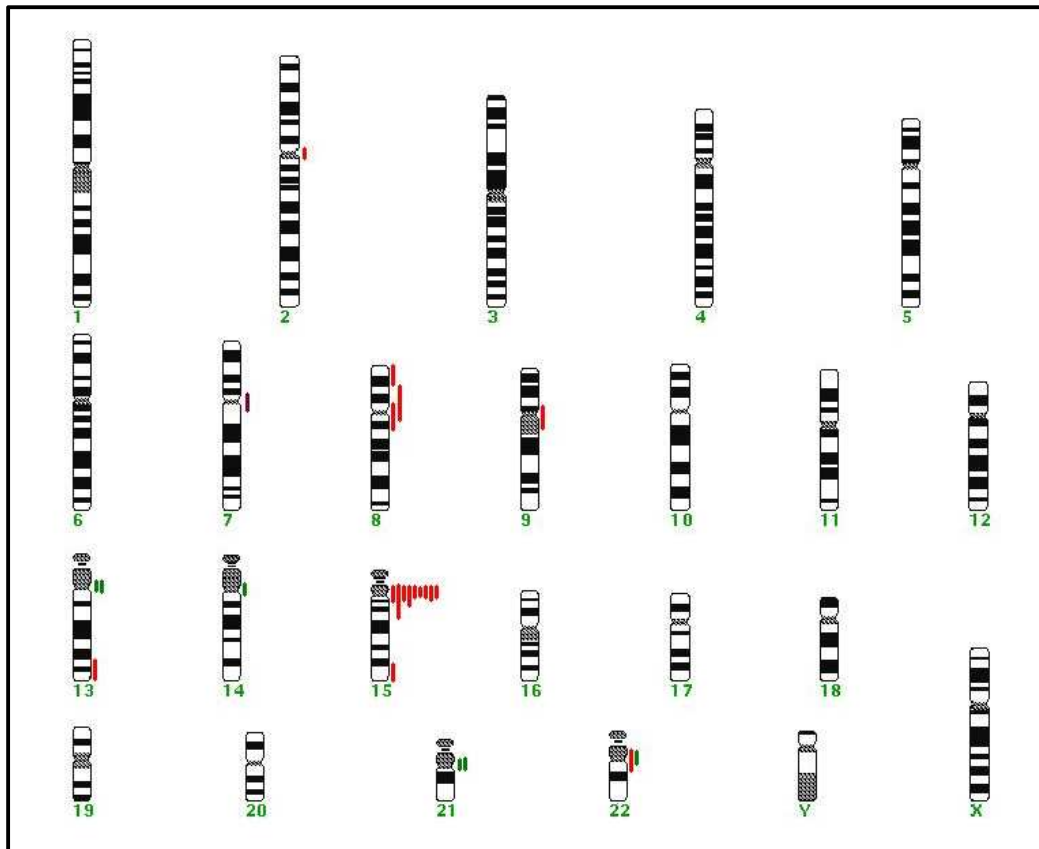


Figura 33. Ideograma on es mostren les regions d'euromatina implicades en la composició dels marcadors estudiats en la nostra sèrie. Es marquen en verd aquells casos en què no s'ha pogut aclarir si l'origen del cromosoma marcador és del 13/21 o 14/22. En lila està marcat el cas en què s'ha pogut esbrinar que l'origen del marcador és del cromosoma 7 però no s'ha pogut saber-ne exactament la banda implicada.

Dels 19 marcadors caracteritzats, únicament en 5 ocasions -casos 132, 136, 137, 141 i 146- els sSMC es trobaven en mosaic. Segons la literatura, la distribució del mosaicisme varia molt depenent de l'origen cromosòmic del marcador (Crolla i col, 2005). Així, és més freqüent trobar sSMC d'origen no acrocèntric en mosaic que no pas sSMC derivatius de cromosomes acrocèntrics, amb una diferència de pràcticament el doble (Warbuton i col, 1991; Crolla i col, 2005). Comparant aquestes dades amb els nostres resultats, podem observar com en 3 dels 5 casos els marcadors deriven de cromosomes no acrocèntrics -132, 136 i 137-, mentre que als 2 casos restants d'acrocèntrics. Per tant, tot i no arribar a ser el doble, aquesta distribució s'ajusta bastant amb les dades publicades. Tanmateix, segons Crolla i col (2005), dins dels sSMC acrocèntrics, els sSMC derivatius dels cromosomes 15 i 22 són els que menys freqüentment es troben en mosaic, essent els sSMC derivatius del 13/21 els majoritaris (un 50% respecte el 20%). Aquestes dades no s'ajusten amb la nostra sèrie, ja que els dos casos amb sSMC acrocèntrics que es troben en mosaic deriven dels cromosomes 22 i 15 -casos 141 i 146 respectivament.

L'origen genòmic més comú dels marcadors estudiats a la nostra sèrie ha estat el cromosoma 15, ja que en un 52.63% dels casos, els sSMC derivaven d'aquest cromosoma. Aquestes dades coincideixen amb la literatura, en què diversos autors han confirmat que els sSMC derivatius del cromosoma 15 són els més freqüents en humans (Fuster i col, 2004; Crolla i col, 2005; Liehr i col, 2007). Una dada interessant és que la majoria dels sSMC (15) no es troben en mosaic, cosa que suggereix un origen meiòtic. De fet, diversos autors han associat l'edat materna avançada i l'aparició de sSMC (15) *de novo* donat que una edat materna avançada incrementa la probabilitat de produir una no disjunció dels cromosomes 15 durant la meiosi, amb la consegüent formació d'un sSMC (15) en cas d'un rescat incomplet de la trisomia (Robinson i col, 1998; Crolla i col, 2005). A la nostra sèrie, només un dels cromosomes marcadors derivatius del cromosoma 15 es troba en mosaic (cas 146). El segon material cromosòmic més comú dels sSMC de la nostra sèrie ha estat el cromosoma 8: un 15.8% dels sSMC estudiats deriven d'aquest cromosoma. En canvi, a la literatura s'ha publicat que els cromosomes marcadors més freqüents en humans després dels derivatius del cromosoma 15 són els derivatius del cromosoma 22, que es troben en un 10% dels casos estudiats (Crolla i col, 2005). Nosaltres només hem trobat un sol cas de cromosoma marcador derivatiu del 22 (que representa un 5.26% del total); aquesta divergència podria ser deguda al nombre reduït de mostres estudiades en aquest treball. El tercer tipus de sSMC més comú en la nostra sèrie ha estat els derivatius dels cromosomes 13/21 i 14/22 (amb una freqüència del 10.52%, coincidint amb aquests autors. Finalment, s'han identificat sSMC derivatius dels cromosomes 2, 7 i 9 en la mateixa proporció (un 5.26% cadascun).

5.5.1. Protocol d'actuació davant d'un diagnòstic de sSMC

L'aplicació de diferents tècniques de citogenètica molecular (CGH/HR-CGH, MFISH, cen i subcenMFISH i BACs) ha estat clau en la caracterització d'aquests 19 casos de cromosomes marcadors. Tanmateix, es tracta de tècniques avui dia encara molt cares i laborioses, cosa que fa difícil la seva aplicació rutinària al diagnòstic clínic, sobretot en cas de requerir un diagnòstic prenatal, en què el retard diagnòstic és un factor molt limitant. Per aquesta raó, l'Associació Espanyola de Genètica Humana (AEGH), el maig del 2008, va proposar un protocol d'actuació pel diagnòstic de sSMC.

Breument, el protocol de l'AEGH és el següent. En primer lloc, s'ha de caracteritzar el millor possible el marcador mitjançant mètodes de citogenètica convencional: bandes G, C, DAPI i NOR per comprovar si conté heterocromatina centromèrica i satèl·lits. En aquest punt, cal fer especial atenció a la presència de zones de tinció clara amb les bandes C, ja que significarà

presència de material eucromàtic. Paral·lelament, s'ha de realitzar el cariotip dels pares per comprovar si el marcador és *de novo* o heretat. En aquest darrer cas, si un dels pares és portador del marcador i fenotípicament normal, el pronòstic és molt favorable i es pot assumir que, en cas de no haver-hi marcadors ecogràfics, el fetus no tindrà un risc augmentat de presentar anomalies fenotípiques (Brondum-Nielsen i Mikkelsen, 1995; Gardner i Sutherland, 2004). Si un dels progenitors presenta el marcador en mosaic, aleshores la predicció del risc per al fetus és més complexa, ja que el marcador podria ser potencialment patogènic però el progenitor podria estar protegit per una distribució del marcador en teixits concrets. Per a cada cas s'ha de realitzar una avaluació individualment, ja que s'han publicat casos de marcadors en mosaic sense anomalies fenotípiques –per exemple, der(16)- i casos en què existeixen alteracions a nivell clínic –per exemple, idic(22)- (Gardner i Sutherland, 2004). Un dels aspectes en què s'ha de fer especial atenció en aquest punt és descartar que el marcador no sigui un derivatiu d'una translocació equilibrada d'un dels progenitors –heretat pel fetus a causa d'una mala segregació 3:1-, ja que en aquests casos sí que hi ha un risc augmentat d'anomalies clíniques per al fetus (Stamberg i Thomas, 1986; Gardner i Sutherland, 2004). En resum, tant si el marcador heretat es presenta en mosaic al fetus com si és *de novo*, cal esbrinar l'origen del SMC per poder oferir un consell genètic més acurat. En cas que la morfologia del marcador suggereixi la presència d'un centròmer, s'hauria de realitzar una FISH centromèrica per als cromosomes 15, 13/21 i 14/22, ja que representen l'origen més freqüent dels sSMC; en cas que aquesta doni un resultat negatiu, s'hauria d'aplicar les sondes corresponents als centròmers dels cromosomes X/Y. El protocol de la AEGH acaba aquí.

Considerant l'experiència acumulada en aquest treball, proposem una continuació del protocol d'actuació a partir d'aquest punt en cas que les FISH centromèriques hagin donat un resultat negatiu, tenint en compte el cost de les diferents tècniques de citogenètica molecular. A la Figura 34 es resumeix aquest protocol d'actuació.

Si la morfologia del marcador suggereix presència d'eucromatina –zones clares a la tinció de bandes C- ja sigui a totes les cèl·lules analitzades o en un mosaic superior al 20% i, a més a més, no es tracta de *minute*, recomanem fer una anàlisi amb CGH per tal de conèixer l'origen del cromosoma marcador. Pensem que és una tècnica molt útil i al mateix temps relativament barata en comparació amb d'altres (la MFISH, l'aCGH o la cenMFISH). Actualment, en països com Dinamarca, hi ha diversos laboratoris privats o públics que ho fan tant a nivell de diagnòstic postnatal com prenatal. A més a més, amb aquesta tècnica s'aconsegueix informació no tan sols de l'origen del marcador, sinó també de les bandes cromosòmiques implicades, cosa que facilitaria molt el consell genètic posterior.

En canvi, en cas que el marcador es trobi en un mosaic inferior al 20% i sembli contenir eucromatina, aleshores proposem una anàlisi per MFISH. Es tracta d'una tècnica més cara que la CGH però molt ràpida i ens donaria una idea de l'origen del cromosoma marcador. A diferència de la CGH/HR-CGH, l'inconvenient d'aquesta tècnica és que no tindriem informació sobre les bandes implicades en la formació del sSMC, ja que les bandes DAPI són molt poc útils en aquests casos. Un cop conegut l'origen cromosòmic del marcador, es podria intentar realitzar una FISH amb aquelles sondes comercials relacionades amb síndromes conegudes contingudes en aquell cromosoma. Nosaltres no recomanem l'aCGH en aquest punt ja que encara té poca resolució amb les alteracions cromosòmiques que es presenten en un mosaic inferior al 20% (Sahoo i col, 2008).

En cas que el marcador es tenyeixi negativament per eucromatina i sigui un derivatiu molt petit (*minute*) d'un cromosoma acrocèntric, aleshores el risc d'anomalies fenotípiques per al fetus és molt petit (Gardner i Sutherland, 2004). Si es detectessin marcadors ecogràfics i es volgués assegurar l'absència d'eucromatina, tant si es troba en mosaic com si no, l'única manera d'identificar l'origen del sSMC seria mitjançant una anàlisi per cenMFISH, ja que en aquests casos la CGH/HR-CGH podria no detectar el material del cromosoma marcador i amb la MFISH podríem tenir dificultats en la interpretació dels resultats d'hibridació. En resum, en aquells casos de marcadors *minute*, on l'eucromatina es pugui trobar molt pròxima a les regions centromèriques, tant la CGH/HR-CGH com la MFISH no són útils. En canvi, per a la cenMFISH i subcenMFISH això no suposa cap problema, ja que les sondes BAC/YAC que utilitzen cobreixen les bandes immediatament pròximes als centròmers. Els inconvenients més importants per la utilització d'aquestes tècniques són el seu elevat cost i trobar un laboratori de referència.

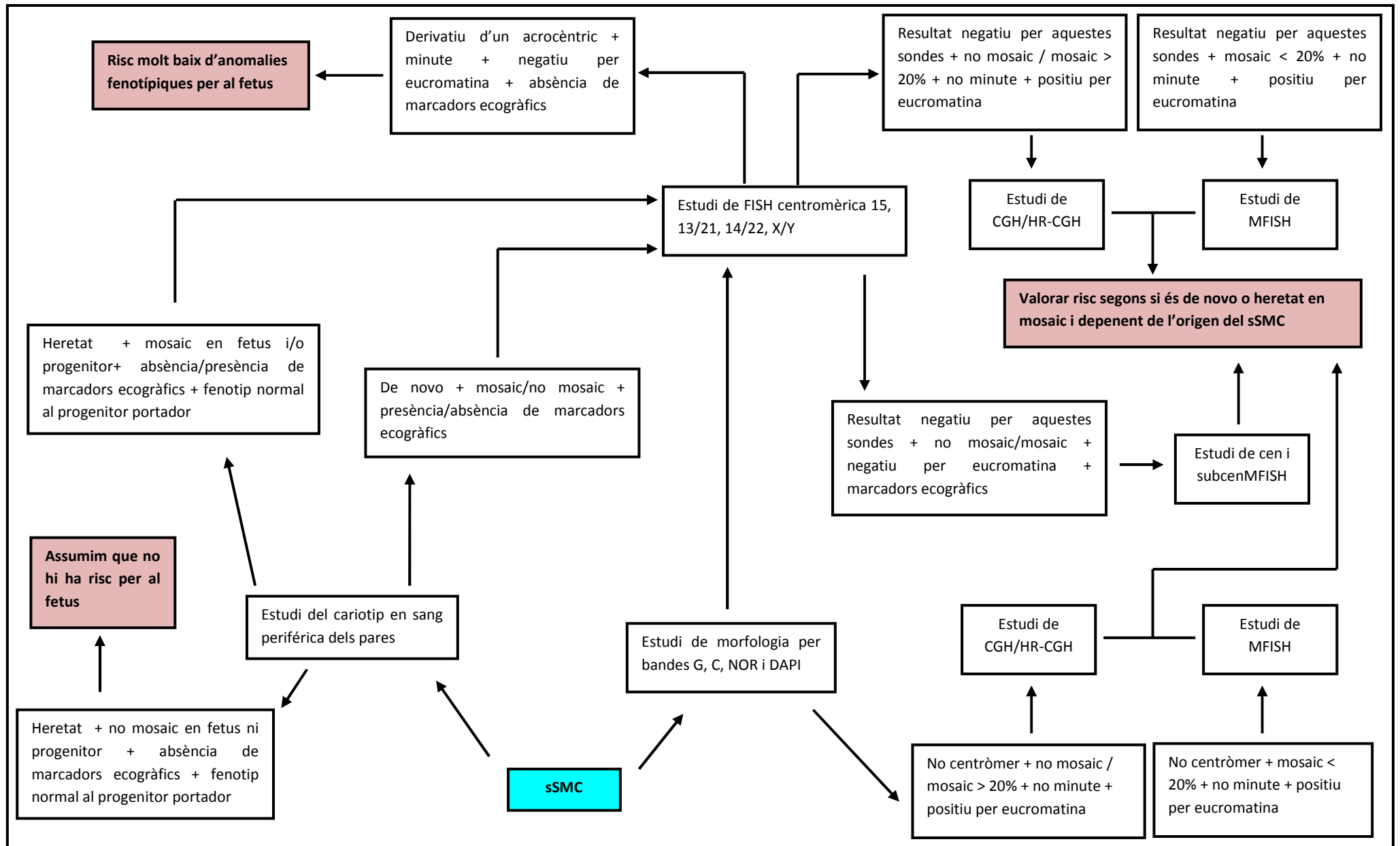


Figura 34. Esquema del protocol d'actuació davant d'un sSMC en diagnòstic clínic.

5.5.2. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 15 (casos 129, 131, 133, 134, 138, 142, 143, 144, 145 i 146)

Els marcadors derivatius del cromosoma 15 són els més freqüents en la població, amb una incidència de 1/5000 nounats i representant entre el 30% i el 40% dels cromosomes marcador (Paoloni-Giacobino i col, 1998; Liehr i col, 2006). Coincidint amb aquestes dades, a la nostra sèrie aquest tipus de sSMC ha estat el més comú: dels 19 casos estudiats, 10 eren derivatius del cromosoma 15, representant una freqüència del 52.63% (Taula 15). Aquests marcadors són generalment dicèntrics i bisatel·litzats –es coneixen com a *inv dup(15)*- i inclouen les regions pericentromèriques (Schinzel i Niedrist, 2001). Els que són més petits que el braç q del cromosoma 21 no tenen generalment conseqüències fenotípiques per a l'individu; en canvi, els que són més grans i contenen la regió Prader-Willi/Angelman (PW/A, 15q12q13) sí que són patogènics i alguns d'ells han estat associats a problemes de disomia uniparental (Eggermann i col, 2002; Gardner i Sutherland, 2004). Es transmeten majoritàriament per via materna i normalment no es troben en mosaic (Warburton i col, 1991; Crolla i col, 2005). Aquestes dues últimes característiques també es compleixen a la nostra sèrie, ja que únicament el cas 146 es troba en mosaic i els dos casos de sSMC (15) que no són *de novo* s'han heretat per via materna (casos 131 i 143). A la Taula 15 es detalla la clínica i l'origen cromosòmic dels diferents tipus de sSMC (15) analitzats al present estudi.

S'ha detectat presència d'eucromatina al 50% dels marcadors derivatius del cromosoma 15 estudiats (casos 129, 131, 134, 144 i 146). Tots ells presenten alteracions fenotípiques; els casos 129, 134 i 144, es tracta d' *inv dup(15)* que contenen la regió Prader-Willi/Angelman (PW/A); el cas 131 es tracta d'un *der(15)* heretat d'una translocació equilibrada (10;15) materna, mentre que l'últim cas, es tracta d'una *inv dup(15)* constituïda per la regió distal 15q (aquest cas serà discutit a l'apartat 5.5.9). Els casos 129, 134 i 144 són exemples clars de la síndrome coneguda com a *idic(15) syndrome* o *invdup(15) syndrome*, caracteritzada per hipotonia, retard de desenvolupament i intel·lectual, epilèpsia i comportament autístic (absència de llenguatge, escassa interacció social, etc) (Varela i col, 2005; Battaglia i col, 2008). En efecte, el cas 129 es tracta d'un pacient amb tractament anticomicial, testicles petits i absència de llenguatge; el cas 134 presenta un retard psicomotor important i el cas 144 es tracta d'un nadó afecte d'una hipotonia axial, malformacions cardíques i testicles petits -la presència de defectes cardíacs i genitourinaris han estat descrits en el 25% i 50% respectivament dels pacients amb aquesta síndrome (Battaglia i col, 2008). Aquestes alteracions fenotípiques són conseqüència de la tetrasomia 15p i de la tetrasomia parcial 15q originades per la presència d'aquest cromosoma marcador amb una *inv dup(15)*. Generalment, els *idic(15)(q12 o q13)*

deriven dels cromosomes 15 homòlegs de la mare a la meiosi, i estan associats a edat materna avançada (Battaglia i col, 2008). És convenient realitzar estudis de disomia uniparental per esbrinar l'origen del *idic(15)*, ja que la regió Prader-Willi/Angelman (PW/A) està subjecte a impromta genètica. Nosaltres no hem pogut comprovar l'origen d'aquests sSMC.

A l'altre 50% restant de marcadors derivatius del cromosoma 15 –casos 133, 138, 142, 143 i 145- no s'hi va detectar eucromatina. Excepte el cas 138, es tracta d'*inv dup(15)* però que no contenen la regió crítica de Prader-Willi/Angelman (PW/A), sinó que són marcadors metacèntrics o submetacèntrics, més petits o similars que un cromosoma del grup G, constituïts per heterocromatina i amb la regió 15q11.1 duplicada. Aquest tipus d'*inv dup(15)* constitueix l'altre gran grup d' *idic(15)* que ha estat identificat, amb unes conseqüències fenotípiques molt diferents a les descrites anteriorment. Poden ser familiars o *de novo* i constitueixen el 70% de marcadors detectats (Battaglia i col, 2008). Normalment no van acompanyats d'alteracions fenotípiques, encara que hi ha excepcions descrites a la literatura. Una d'aquestes excepcions la representaria el cas 145: es tracta d'una dona adulta amb un fenotip similar al del Prader-Willi i amb un cromosoma marcador constituït per una *invdup(15)(q11.1)*. Un cas similar a aquest ha estat descrit per Borelina i col (2004), en què es va estudiar una nena de 13 anys que havia desenvolupat un fenotip Prader-Willi característic i presentava un sSMC (15) petit que no contenia la regió crítica per a aquesta síndrome, es a dir la 15q11q13. Estudis moleculars van permetre als autors identificar una disomia uniparental del cromosoma 15, i van concloure que possiblement fos aquesta la causa del fenotip de la nena. Amb el cas 145 podria passar el mateix, encara que no ho podem confirmar ja que no s'han pogut realitzar aquests estudis. Respecte el cas 138, tot i no ser un *idic(15)(q11.1)* sinó un *r(15)(p11q11.1)*, cal dir que els trets dismòrfics que presenta podrien quedar explicats també per una disomia uniparental del cromosoma 15; en aquest cas tampoc s'han pogut realitzar aquest estudi molecular.

Una altra excepció estaria representada per el cas 143, en què el pacient presenta dos *idic(15)(q11.1)* heretats per via materna que pateix oligozoospermia, mentre que la seva mare, el cas 142, no presenta cap alteració fenotípica ni problemes de fertilitat. Aquesta divergència en l'expressió de fenotips entre sexes ja ha estat descrita; de fet, se sap que els SMC (15) d'origen familiar poden expressar un fenotip diferent en cadascun dels sexes, essent el sexe femení el que més freqüentment presenta el fenotip normal (Martin-Lucas i col, 1986). S'ha descrit una alta incidència d'*idic(15)(q11.1)* en homes amb oligozoospermia a la literatura (Buckton i col, 1985; Cotter i col, 2000; Eggermann i col, 2002). Nosaltres creiem que la infertilitat del nostre pacient pot ser deguda a l'hexasomia parcial originada per la presència dels dos marcadors supernumeraris idèntics, que podria interferir a nivell meiòtic degut a l'excés

DISCUSSIÓ

d'activitat NOR (Martin-Lucas i col, 1986), la qual podria provocar un error en el procés de maduració de les cèl·lules germinals a causa d'un excés d'heterocromatina (Gentile i col. 1993; Vulcani-Freitas i col, 2006) o bé, també podria provocar algun tipus de selecció contra les cèl·lules germinals anòmales als homes durant l'espermatogènesi originant l'oligozoospèrmia (Cotter i col. 2000; Vulcani-Freitas i col, 2006).

Respecte el cas 133, es tractava d'un diagnòstic prenatal i no s'han pogut aconseguir dades sobre la clínica del fetus.

Taula 15. Diferents tipus de sSMC derivatius del cromosoma 15 analitzats en aquest estudi.

	Clínica	Tipus de sSMC (15)
Cas 129	quadre clínic	invdup(15)(q13.1)
Cas 131	quadre clínic	der(15)(q15.1)
Cas 133	diagnòstic prenatal per ansietat materna	invdup(15)(q11.1)
Cas 134	retard psicomotor i displàsia ectodèrmica	invdup(15)(q13.2)
Cas 138	trets dismòrfics	r(15)(p11q11.1)
Cas 142	fenotip normal (mare del cas 143)	invdup(15)(q11.1)
Cas 143	oligozoospèrmia	invdup(15)(q11.1)x2
Cas 144	quadre clínic	invdup(15)(q13.1)
Cas 145	fenotip similar a la síndrome de <i>Prader-Willi</i>	invdup(15)(q11.1)
Cas 146	quadre clínic	invdup(15)(q26.1q26.3)

5.5.3. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 8 (casos 130, 132 i 137)

A la nostra sèrie, aquest tipus de sSMC ha representat el segon origen més comú després dels derivats del cromosoma 15, fet que no coincideix amb la literatura, ja que s'ha publicat que els marcadors derivatius del cromosoma 8 són poc freqüents i, especialment, els que presenten una morfologia en anell (SRC) (Blennow i col, 1993; Demori i col, 2004). Dels tres casos caracteritzats al nostre estudi, dos d'ells, els casos 132 i 137, presentaven una estructura d'anell i es trobaven en mosaic; el cas 130, (que es discutirà més endavant a l'apartat 5.5.9), no es trobava en mosaic i no es va poder comprovar la morfologia d'anell. De tots els casos de marcadors derivatius del cromosoma 8 que el laboratori del Dr. Liehr té publicats a la seva pàgina web (http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm), el 76% han estat correlacionats amb anomalies clíniques i, d'acord amb aquestes dades s'ha observat una correlació entre presència de certes bandes als sSMC derivatius del cromosoma 8 i desenvolupament d'anomalies fenotípiques. Per exemple, la regió pericentromèrica 8p11.21q11.21 estaria associada a fenotip normal, mentre que la presència de qualsevol de les regions 8p11.22p21 i 8q11.22q12 sí que estarien correlacionades amb anomalies clíniques.

L'aplicació de la subcentromèrica FISH ens va permetre caracteritzar el marcador del cas 132 com un r(8)(p11.2q12) i el del cas 137 com un r(8)(p21q11.21). Tots dos contenen bandes que han estat associades a anomalies clíniques: la banda 8q12 al primer cas i la banda 8p21 al segon (Demori i col, 2004; de Die-Smulders i col, 1995). Així, les anomalies fenotípiques observades a aquests dos pacients han de correlacionar-se amb la presència d'eucromatina en aquests cromosomes marcador. Al primer cas, el noi presenta retard mental, hipoacúcia, miopia important i peus plans valgs intervinguts. La fàcies la té allargada, les dents les té mal implantades i les orelles grans. Presenta també escoliosi amb deformitat de pit i d'esquena, absència de ròtules i una limitació en l'extensió de les extremitats. És molt longilini, amb el coll llarg i amb els dits també allargats i contrets en flexió. Loeffler i col (2003) van publicar un cas d'una pacient amb un r(8)(p12q12) en mosaic que presentava retard mental, anomalies facials menors, escoliosi, hipoplàsia del sacre, coxis absent i anomalies renals. Tot i que s'observen similituds entre els dos fenotips –el retard mental i l'escoliosi, hi ha divergències importants, que podrien explicar-se per la diferència entre sexes, la diferència entre el grau de mosaicisme (un 84% vs un 70%) o un efecte de disomia uniparental (Anderlid i col, 2001). Malauradament, no es va poder descartar un efecte de UPD en cap d'aquests dos casos.

Respecte el cas 137, el marcador derivatiu del cromosoma 8, es troba en una de les tres línies cel·lulars conjuntament amb un altre sSMC derivatiu del cromosoma 9. Creiem que

la presència de la trisomia parcial 8p21q11.21 en mosaic seria la responsable de les anomalies fenotípiques que presenta al pacient, ja que el sSMC (9) està constituït per la regió pericentromèrica 9p12q12, que ha estat associada a fenotip normal (Barber i col, 2005). De fet, la trisomia 8p en mosaic és una síndrome coneguda i que ha estat àmpliament descrita (Riccardi i col. 1977; Schinzel i col. 1983; Demori i col, 2004). Està caracteritzada per un retard mental de lleu a moderat, trets dismòrfics facials –com front prominent, ulls enfonsats, pont nasal ample, orelles de baixa implantació, anomalies a les extremitats, plecs palmars prominents, defectes esquelètics, renals i cardíacs. Tanmateix, hi ha encara pocs casos en què s’ha pogut definir amb exactitud el segment d’euromatina involucrat en aquests anells del cromosoma 8, amb la qual cosa encara no s’han pogut establir correlacions clares entre genotip i fenotip. A la revisió feta per Demori i col (2004) de tots els casos de r(8) publicats a la literatura fins al moment, es pot observar com tots els marcadors que contenen les bandes 8p12, 8p21 i 8q12 presenten anomalies fenotípiques.

5.5.4. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 13/21 ó 14/22 (casos 128 i 140)

Segons la web del Dr. Liehr, aproximadament el 80% dels cromosomes marcador derivatius dels cromosomes 13/21 no presenten anomalies clíniques i són, per tant, compatibles amb un fenotip normal. La majoria d’aquest sSMC publicats a la literatura tenen un origen *de novo* (Santos, 2007). En canvi, a la nostra sèrie, el cas 140 és d’herència materna. El marcador del cas 128 no ha estat possible determinar si es tracta d’un derivatiu dels cromosomes 13/21 o 14/22 per manca de suficient material fixat; en qualsevol cas, és d’origen *de novo*.

El fet que no es pogués aclarir si aquests sSMC derivaven del cromosoma 13 o del 21 s’explica perquè no s’hi va detectar presència d’euromatina i per tant, com que les seqüències centromèriques d’aquests dos cromosomes comparteixen un 99.7% de similitud, resulta impossible diferenciar-los a nivell metodològic (Maratou i col, 1999; Santos, 2007).

Al cas 140, l’anàlisi a través de la cenMFISH revelava que es tractava d’una invdup(13)(q11.1) ó invdup(21)(q11.1) present a totes les cèl·lules analitzades. L’absència d’euromatina sumat al fet que es tractés d’un sSMC d’origen matern, que el fetus no presentés marcadors ecogràfics i que la mare tingués un fenotip normal, fa pensar en un desenvolupament completament normal del fetus després del naixement. Tanmateix, hi ha casos publicats a la literatura d’inv dup(13/21) sense euromatina en mosaic associats a anomalies clíniques (Langer i col 2001); d’invdup(13/21)(q10) amb retard mental i trets dismòrfics; i també invdup(13/21)(q11), en un mosaic del 46% en un pacient que presentava braquicefàlia, fissures palpebrals invertides i llavis fins (Plattner i col. 1993). D’altra banda, hi ha

autors que han descrit casos de sSMC derivatius dels cromosomes 13/21 sense eucromatina en pacients de sexe masculí amb problemes d'infertilitat (Buckton i col, 1985; Manenti i col, 1992).

Davant de tots aquests casos, es pot afirmar que oferir un consell genètic acurat davant d'un sSMC d'aquest tipus és bastant difícil, especialment si és un marcador es *de novo*, tot i que les conseqüències clíniques descrites pels autors citats en alguns casos no són severes.

En referència al cas 128, va ser impossible esbrinar si el marcador era un derivatiu dels cromosomes 13/21 o 14/22 i tampoc es van aconseguir dades sobre els resultats ecogràfics de l'embaràs ni de la clínica del fetus o del nadó si va arribar a néixer .

5.5.5. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 2 (cas 136)

Aquest tipus de cromosoma marcador és poc freqüent a la literatura. Fins ara només s'han descrit 17 casos (Giardino i col, 2007). La majoria d'aquests sSMC (2) publicats presenten una morfologia d'anell (13/17casos), i alguns autors han suggerit que aquest fet podria ser conseqüència de la presència de duplicacions segmentàries a la regió pericentromèrica del cromosoma 2 (Mrasek i col, 2005), tal i com s'ha descrit pels sSMC del 10 i 12 (Vermeesch i col, 2003). També s'ha publicat que la majoria de marcadors derivatius de cromosomes no acrocèntrics presenten aquesta morfologia d'anell; i que 14 dels 17 casos descrits estan associats a mosaïcisme (Giardino i col, 2007). Si comparem aquestes dades amb les del nostre cas, veiem com el nostre marcador es troba també en mosaic –en un 7% de les metafases analitzades- i no presenta morfologia d'anell.

L'anàlisi mitjançant la subcenMFISH ha permès caracteritzar el nostre marcador com a min(2)(p11.1q11.1). D'acord amb les dades publicades, s'ha vist una correlació molt clara entre presència de certes bandes als sSMC derivatius del cromosoma 2 i desenvolupament d'anomalies clíniques. Així, la regió pericentromèrica compresa entre les bandes 2p11 i q11.2 ha estat associada a fenotip normal, mentre que la presència de qualsevol banda a partir de les regions 2p11.2 i 2q12.1 (incloses) sí que han estat correlacionades a anomalies clíniques (Ostroverkhova i col, 1999; http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm). El nostre cas es tracta d'un cas de diagnòstic prenatal per angoixa materna; d'acord amb les dades anteriorment citades i tenint en compte el fet que el fetus no presenta marcadors ecogràfics i que el marcador està en un percentatge de mosaïcisme molt petit, podem assumir un risc molt baix o pràcticament inexistent d'anomalies fenotípiques per al fetus.

5.5.6. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 7 (cas 139)

Com la resta de marcadors derivatius de cromosomes no acrocèntrics, aquest tipus de SMC (7) és poc freqüent a la població. En una revisió de Velagaleti i col (2002), es descriuen set casos amb marcadors derivatius del cromosoma 7, la majoria dels quals es trobaven en mosaic i en forma d'anell. Els cromosomes marcador petits en anell derivatius de les regions pericentromèriques de cromosomes no acrocèntrics han estat sovint associats a un risc elevat de presentar anomalies fenotípiques, tot i que la seva rellevança clínica no és gaire clara pel nombre tan reduït de casos publicats (Chantot-Bastaraud i col, 2004). De fet, dels 21 sSMC(7) publicats a la web de Thomas Liehr (http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm), el 80% han estat associats a anomalies clíniques. Un dels factors més importants a tenir en compte a l'hora d'avaluar el risc d'anomalies clíniques en aquests casos és el factor de disomia uniparental (UPD), ja que s'ha detectat en 10% dels casos de cromosomes marcadors en anell (Chantot-Bastaraud i col, 2004).

El marcador del cas 139 no va poder ser caracteritzat totalment per manca de material fixat suficient. Després d'obtenir resultats negatius amb la FISH amb sondes centromèriques per als cromosomes 15, 13/21, 14/22; del X i del Y, únicament es va poder realitzar l'estudi per MFISH, el qual va indicar que el sSMC, present al 100% de les metafases analitzades, derivava del cromosoma 7. Aquest es un dels pocs casos de sSMC (7) *de novo* i no mosaic identificat, que va ser caracteritzat per Velagaleti i col (2002) primer cop. D'acord amb les dades publicades, la regió pericentromèrica compresa entre les bandes 7p11.1 i q11.1 ha estat associada a fenotip normal, mentre que la presència de bandes més distals ha estat correlacionada amb desenvolupament d'anomalies clíniques (http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm). Tenint en compte que al nostre cas el marcador hibridava amb la sonda de MFISH, s'ha d'assumir presència de material eucromàtic, ja que en cas contrari, no s'hauria vist senyal d'hibridació. Conseqüentment, en ser un marcador *de novo*, al 100% de les cèl·lules analitzades i un cas de diagnòstic prenatal, el risc que té el fetus de tenir anomalies fenotípiques està molt incrementat i és de molt difícil pronòstic. Alguns exemples d'anomalies fenotípiques associades a aquest tipus de marcadors són: retard mental lleu, dificultats en la parla, absència de retard de creixement postnatal a la majoria de casos i presència de trets dismòrfics que poden ser molt diversos -des de fàcies triangular, micrognàtia, prognàtia i pont nasal elevat fins a problemes dentals i orelles mal implantades, entre altres- (Chantot-Bastaraud i col, 2004). Desconeixem l'evolució de la gestació i si va arribar a néixer.

5.5.7. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 9 (cas 137)

Els casos de sSMC derivatius del cromosoma 9 publicats a la literatura es poden trobar tant com a única alteració cromosòmica (Liehr i col, 2005; Paulis i col, 2006; Santos i col, 2007) com en combinació amb altres sSMC (Starke i col, 2003; Hall i col, 2005). El nostre cas és un exemple d'aquests darrers, ja que es tracta d'un pacient amb tres línies cel·lulars: una amb un sSMC derivatiu del cromosoma 9, una altra amb dos sSMC –un derivatiu del cromosoma 9 i l'altre del cromosoma 8- i una tercera línia cel·lular normal. L'anàlisi de CGH/HR-CGH havia detectat un guany de material a nivell pericentromèric dels cromosomes 8 i 9, però en ser regions tan pròximes al centròmer, calia fer la comprovació per FISH. Aquesta tècnica va ser essencial per acabar de caracteritzar el material euromàtic contingut als cromosomes marcador identificats prèviament per citogenètica convencional.

Resulta interessant destacar que dels 22 casos de sSMC (9) publicats a la web del Dr. Liehr, la majoria d'ells, el 78%, està associada a fenotip normal, mentre que només el 22% s'ha correlacionat amb anomalies fenotípiques (http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm). D'acord amb aquestes dades publicades, la regió pericentromèrica compresa entre les bandes 9p12 i 9q12 ha estat associada a fenotip normal, mentre que la presència de bandes més distals ha estat correlacionada amb desenvolupament d'anomalies clíniques. De fet, Barber i col (2005) van descriure que variacions en el número de còpia de la banda 9p12 no tenen efectes fenotípics, i autors com Starke i col (2002) i Santos i col (2007) suggerien que aquesta regió no és veritablement ni euromatina ni heterocromatina. Tanmateix, s'han descrit excepcions, com la descrita per Blennow i col (1995) on publiquen un cas de marcador amb anell del cromosoma 9 constituït per la regió 9p12q10 que presentava retard mental i de parla moderat. D'altra banda, també s'ha associat la presència d'aquests sSMC (9) amb infertilitat, especialment en homes (Buckton i col, 1985; Manenti i col, 1992) suggerint que l'excés d'heterocromatina podria estar interferint en l'aparellament correcte dels cromosomes, afavorint la formació de gàmetes desequilibrats (Santos, 2007).

El nostre cas de SMC(9) es tracta d'un *minute* constituït per la regió 9p12q12, cosa que, d'acord amb les dades publicades, no hauria de tenir conseqüències fenotípiques greus. Tot i que no hem pogut saber exactament la indicació diagnòstica del pacient –només que presentava trets dismòrfics- podem assumir que, en tot cas, aquesta estaria provocada majoritàriament per la presència del sSMC (8) que presenta en una de les tres línies cel·lulars, ja que en aquest marcador el contingut d'euromatina detectat és molt major i implica bandes que han estat correlacionades amb anomalies fenotípiques (veure apartat 5.5.3).

5.5.8. Cromosomes marcador derivatius del cromosoma 22 (cas 141)

S'ha publicat que el segon origen més comú dels cromosomes marcador en humans després dels derivatius del cromosoma 15 són els SMC(22), que es troben en un 10% dels casos estudiats (Crolla i col, 2005). Una correcta caracterització d'aquest tipus de sSMC és molt important per comprovar la presència de la banda 22q11 al marcador, ja que tres síndromes han estat correlacionades amb alteracions en la dosi gènica d'aquesta banda: la síndrome de *Velocardiofacial (VCFS)/DiGeorge(DGS)*(MIM 192430; MIM 601362) –associada a una única dosi, la síndrome *Cat-eye (CES)*(MIM 115470) –associada a tres i quatre còpies- i la síndrome *der(22)t(11;22)* (Heather i col, 2002; Gardner i Sutherland, 2004).

L'únic sSMC (22) identificat a la nostra sèrie es tracta d'un cas de diagnòstic prenatal en què el marcador es troba en mosaic, la tinció de bandes C indica que és dicèntric (un centròmer funcional tenyit més fosc i un pseudocentròmer tenyit més subtilment) i que té material eucromàtic (apareixien zones de tinció clara), les bandes NOR indiquen que està bisatel·litzat i és *de novo*. L'estudi mitjançant la CGH/HR-CGH no va detectar cap desequilibris en el genoma, mentre que l'aplicació de la MFISH indicava que es tractava d'un derivatiu del cromosoma 22. La FISH amb les sondes LSI corresponents a la síndrome de DiGeorge/VCFS confirmen aquest resultat i detecten que es tracta d'un idic(22) que conté la banda 22q11.2, resultant en una trisomia parcial d'aquesta regió que es troba al 78% de les metafases analitzades. Aquest tipus d'anomalia cromosòmica comporta un fenotip que pot variar des de la normalitat fins a la síndrome *Cat-eye* (Crolla i col, 1997; Gardner i Sutherland, 2004).

La regió crítica d'aquesta síndrome està situada més centromèricament respecte la regió de deleció corresponent a la de VCFS/DGS (Heather i col, 2002). La majoria de les reorganitzacions cromosòmiques que donen lloc a les síndromes VCFS/DGS i CES són conseqüència de processos de recombinació homòloga entre seqüències de repetició baixes (Heather i col, 2002). Aquest mecanisme és el que explicaria la formació del nostre sSMC (22) i, en trobar-se en mosaic, s'hauria produït post-zigòticament. La clínica associada a aquesta síndrome inclou coloboma ocular, atrèsia anal, defectes cardíacs, malformacions renals, anomalies craniofacials, anomalies genitals masculines, defectes esquelètics i retard mental entre lleu i moderat (Berends i col, 2001). La severitat de la clínica va fer que l'embaràs fos interromput un cop les anàlisis citogenètiques van ser conclouents.

5.5.9. Cromosomes marcador amb neocentròmers (casos 130, 135 i 146)

La majoria dels cromosomes marcador s'originen de les regions pericentromèriques dels cromosomes acrocèntrics i es tenyeixen positivament mitjançant bandes C (Pater i col, 2005). L'any 1992, els grups de Callen i col i Crolla i col van identificar un tipus de sSMC estable mitòticament, amb constricció centromèrica, sense ADN alfa-satèl·lit i, per tant, negatiu en la tinció de bandes C. Aquests cromosomes marcador contenen el que es coneix com a *neocentròmer*, és a dir, un centròmer completament funcional que es forma als fragments acèntrics que es generen a causa de reorganitzacions citogenètiques en zones no centromèriques de l'ADN (Choo, 2001). Representen un mecanisme per aconseguir l'estabilitat mitòtica d'aquests fragments acèntrics, ja que si no en tinguessin, es perdrien (Ventura i col, 2003; Spiegel i col, 2003). De fet, els cromosomes marcador neocèntrics es poden trobar tant en mosaic com al 100% de totes les cèl·lules analitzades (Pater i col, 2005). Fins ara, hi ha publicats més de 70 casos de cromosomes neocèntrics (Warburton, 2004). Tot i que es poden observar en qualsevol cromosoma, s'han detectat tres regions molt propenses a la formació de neocentròmers. 3q, 13q i 15q (Warburton, 2004). Dues d'aquestes regions –la 13q i la 15q– coincideixen amb els casos 135 i 146 respectivament que hem analitzat en aquest treball, mentre que el cas 130 seria un cas de sSMC amb un neocentròmer que s'hauria format a la regió 8p22p23; tot i no ser un dels punts calents en la formació de neocentròmers.

Per confirmar la presència de neocentròmers es pot realitzar assajos d'immunofluorescència mitjançant anticossos contra proteïnes centromèriques (CENPs) (Warburton, 2000). Nosaltres no hem aplicat aquesta tècnica però el que sí que hem fet ha estat realitzar una FISH amb sondes centromèriques als casos 135 i 146 per demostrar l'absència de senyal d'aquestes sondes als sSMC i, consegüentment, demostrar l'absència de centròmer. No es va obtenir cap senyal al hibridar amb la sonda centromèrica 13/21 al cas 135 ni amb la sonda centromèrica del 15 al cas 146. Al cas 130 no es va poder realitzar aquest estudi amb FISH.

Segons Warburton (2004), les duplicacions invertides (*inv dup*) de la zona distal d'un dels braços del cromosoma representen el tipus més freqüent de cromosomes neocèntrics i resulten en una tetrasomia de la regió duplicada. A dos dels tres casos analitzats (135 i 146), l'anàlisi amb FISH mitjançant sondes BAC ha corroborat l'estructura d'*inv dup*, mentre que al cas 130 no ha estat possible l'estudi per manca de suficient material fixat. 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. 35).

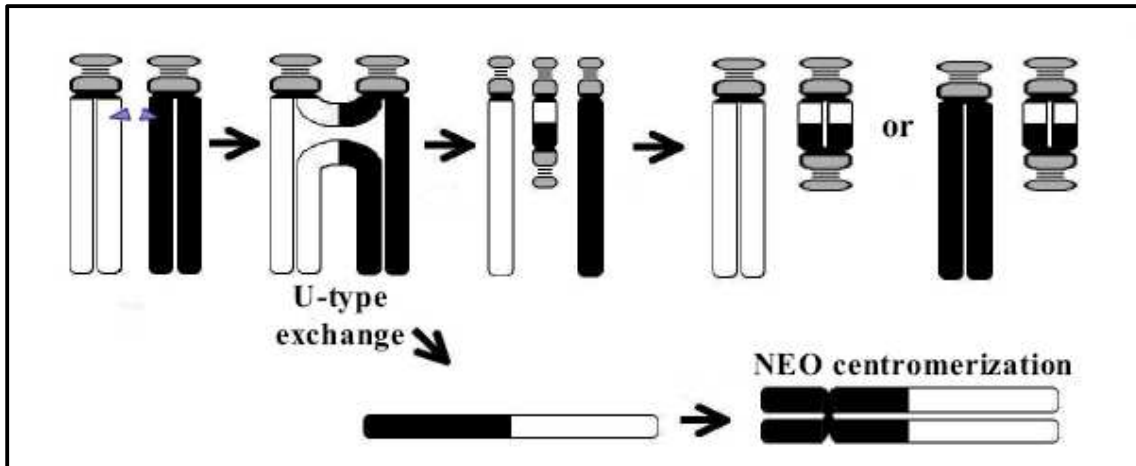


Figura 35. Esquema de la formació d'un sSMC amb neocentròmer després d'un trencament de dues cromàtides de cromosomes homòlegs seguit per un intercanvi U-type i d'una activació del neocentròmer (http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/MOL_ZYTO/sSMC.htm).

S'ha publicat que la regió 13q és altament propensa a la formació de neocentròmers en comparació amb altres cromosomes, fet que podria explicar-se per la viabilitat de les trisomies 13 (Warburton i col, 2000). Aquests autors van descriure tres punts calents de formació de neocentròmers a les bandes 13q21, 13q31 i 13q32. El cas 135 contindria un d'aquests punts calents, ja que s'ha aconseguit caracteritzar el marcador com a una *invdupdel* a zona 13q32.3qter, de manera que el neocentròmer podria estar situat en aquesta banda. Les anomalies fenotípiques que més freqüentment es troben associades a duplicacions de la regió terminal del cromosoma 13 inclouen microftàlmia o altres defectes oculars, hemangioma i sordesa (Warburton i col, 2000). Aquests autors van poder comprovar com els pacients amb les tetrasomies més distals (13q32qter) també presentaven aquestes alteracions, suggerint que la duplicació més distal d'aquesta regió és suficient per al desenvolupament d'aquesta clínica. El fenotip de la nostra pacient -tretos dismòrfics, sordesa i microftàlmia- encaixaria perfectament amb les dades publicades.

Els resultats obtinguts en analitzar el marcador del cas 146 amb BACs van revelar que es tractava d'una *inv dup*, en mosaic, de la regió 15q26.1q26.3. A la literatura hi ha descrits més de 10 casos de tetrasomies de la regió distal 15q degudes a una duplicació invertida d'aquesta regió (Battaglia i col, 1997; Spiegel i col, 2003; Chen, 2004; Roggenbuck i col, 2004; Mahjoubi i col, 2005). Aquesta anomalia cromosòmica es coneix com la *síndrome de la tetrasomia 15q*, i està associada a craniosinostosi, nas bulbós, pont nasal ample, filtre llarg, orelles de baixa implantació, micrognàtia, aracnodactília, anomalies genitals, retard en el desenvolupament i mental i distròfia de còrnea (Mahjoubi i col, 2005). El nostre pacient presenta, d'aquestes

característiques fenotípiques, craniosinostosi i retard en el desenvolupament psicomotriu; aquesta diferència en la clínica respecte els altres casos de tetrasomia 15q podria deure's al grau de mosaïcisme del nostre marcador –i per tant, a diferències en la distribució del marcador als diferents teixits del pacient respecte als altres casos- i, també, a les bandes implicades en la tetrasomia parcial, tot i que s'ha publicat que la mida del marcador no sembla influir en la severitat clínica de la síndrome (Rowe i col, 2005). L'origen parental del cromosoma marcador també s'hauria de tenir en compte en tractar-se d'un derivatiu del cromosoma 15 (Santos, 2007).

L'estudi per CGH/HR-CGH del cas 130 va revelar que el marcador era un derivatiu del braç curt del cromosoma 8; concretament, la presència del marcador resultava en una trisomia de la regió 8p22p23 a la pacient. L'estudi de bandes C indicava que no contenia seqüències d'ADN alfa-satèl·lit, suggerint que s'hi havia activat un neocentròmer ja que el marcador es troba al 100% de les metafases analitzades. Tot i que aquesta regió no és un punt calent per a la formació de neocentròmers, hi ha altres casos publicats a la literatura, com el de De Pater i col (2005). Aquests autors fan una revisió de les trisomies parcials del braç curt del cromosoma 8 originades per la presència de marcador, i conclouent que, les trisomies de les bandes 8p23.1 i 8p23.2 son variants benignes (Engelen i col, 2000; Harada i col, 2002), i les que inclouen la regió 8p22p23 han estat associades a retard mental lleu, hipertelorisme i retard de creixement, però presenten unes funcions adaptatives i reproductives normals (Engelen i col, 1995; Sklower Brooks i col, 1998). Les tetrasomies parcials d'aquesta regió, en canvi, sí que han estat correlacionades amb anomalies fenotípiques severes (Le Bris i col, 2003). Un exemple es el cas publicat per Voullaire i col (2001), en què van identificar un marcador en mosaic constituït per una invdup(8)(p23.1pter) en un pacient que presentava retard de creixement i de desenvolupament, retard mental, trets dismòrfics facials i problemes de comportament.

El cas que presenten De Pater i col (2005), amb una trisomia parcial de la regió 8p22p23 en mosaic, no manifesta cap alteració fenotípica. La nostra pacient presenta únicament com a indicació diagnòstica un retard mental lleu, cosa que s'adequaria a aquestes dades publicades. En canvi, l'afectació de la banda 8p21 en duplicacions distals del braç curt del cromosoma 8 sí que ha estat associada a un quadre clínic sever i a un retard greu en el desenvolupament psicomotor (de Die-Smulders i col, 1995), amb la qual cosa és molt important una caracterització molt precisa de l'eucromatina present al cromosoma marcador en, sobretot, diagnòstic prenatal.

5.5.10. Recopil·lació de les dades relacionades amb el genotip i fenotip obtingudes de l'estudi dels sSMC

La informació derivada de l'estudi d'aquests 19 casos de cromosomes marcador es resumeix a la Taula 16 amb l'objectiu no només de facilitar-ne la comprensió, sinó que, també, serveixi com a eina de consulta a l'hora de predir si un sSMC determinat té probabilitats o no de desenvolupar un fenotip alterat.

Taula 16. Relació entre origen del sSMC, mosaïcisme i clínica.

Origen del sSMC	Bandes implicades	Mosaïcisme/No mosaïcisme	Clínica esperada
2	min(2)(p11.1q11.1)	7% cèl·lules	risc baix de fenotip alterat
7	min(7)(p?q?)	100% cèl·lules	risc alt de fenotip alterat
8	r(8)(p21q11.21)	81% cèl·lules	quadre clínic, efecte disomia uniparental
8	der(8)(p22p23)	100% cèl·lules	retard mental lleu, risc baix d'alteracions fenotípiques severes
9	min(9)(p12q12)	?% cèl·lules	risc baix de fenotip alterat
13	invdup(13)(q32.3)	100% cèl·lules	trets dismòrfics, sordesa i microftàlmia
13/21 ó 14/22	invdup(13/21)(q11.1) ó invdup(14/22)(q11.1)	100% cèl·lules	possible clínica alterada, depenent de si és <i>de novo</i> o heretat
15	invdup(15)(q11.1)	100% cèl·lules	risc d'oligozoospermia (XY), fenotip normal (XX) exceptuant disomia uniparental
15	invdup(15)(q13.1) invdup(15)(q13.2)	100% cèl·lules	síndrome d'invdup(15), fenotip similar PW/A segons disomia uniparental
15	invdup(15)(q26.1q26.3)	35% cèl·lules	síndrome de la tetrasomia 15q
22	der(22)(q11.2)	78% cèl·lules	síndrome VCFS/DGS i CES

5.6. ANÀLISI DELS PUNTS DE TRENCAMENT

S'ha identificat un total de 121 punts de trencament (Fig. 36), localitzats en 87 bandes cromosòmiques, dels quals 38 estan implicats en translocacions, 16 en duplicacions, 23 en delecions, 8 en inversions, 32 en la formació de cromosomes marcador i 4 en la formació de cromosomes en anell.

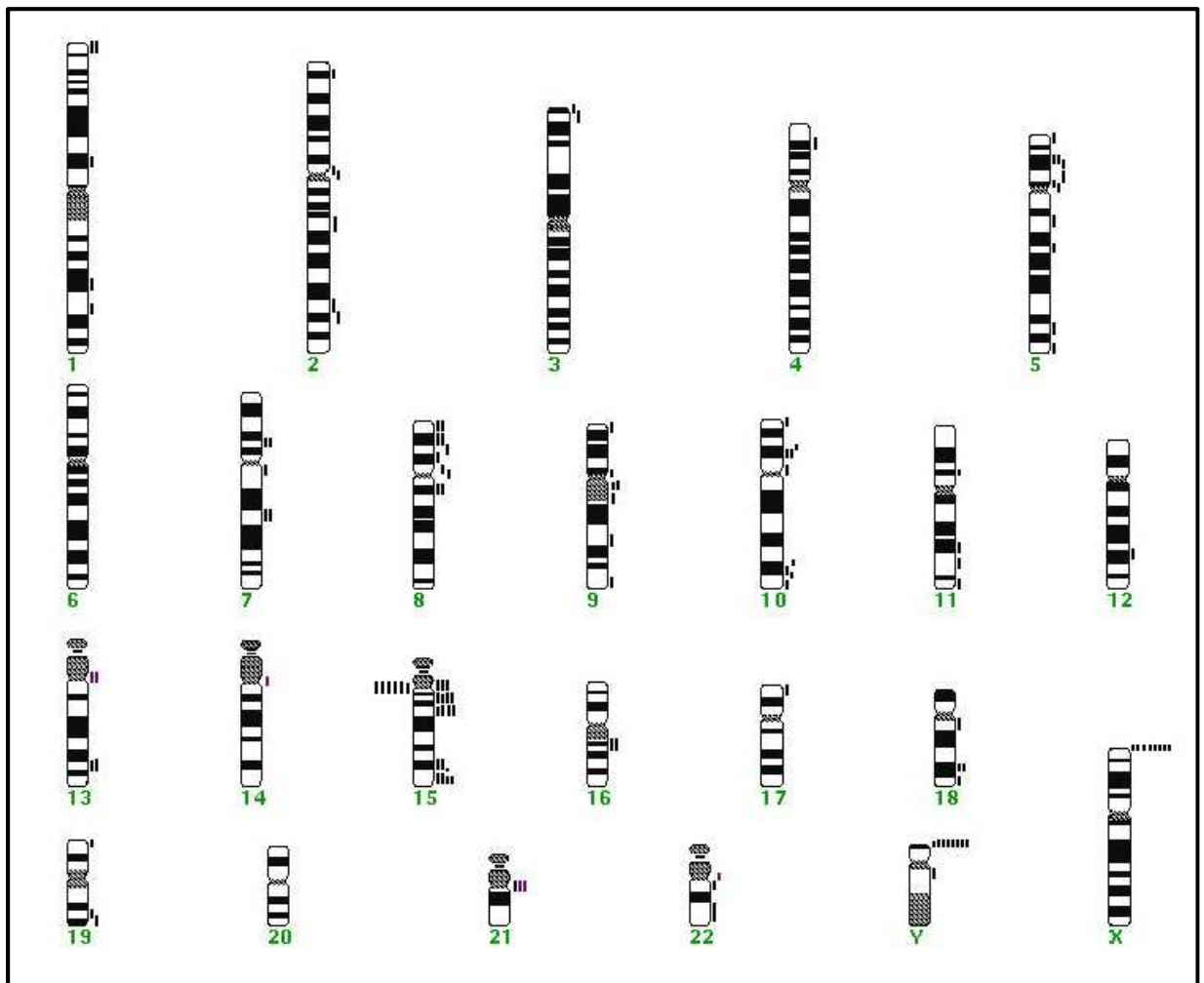


Figura 36. Ideograma en què estan representats els punts de trencament implicats en tots els casos d'aquest estudi (negre). S'ha indicat en lila els punts corresponents a les regions 13q11.1/21q11.1 i 14q11.1/22q11.1 (casos 128 i 140).

Per a cadascuna de les 87 bandes implicades en els punts de trencament identificats, s'han recollit les següents dades: el seu patró de bandes G –si és clara o fosca, la seva mida, el número de gens identificats fins al moment continguts en aquesta regió, la densitat gènica, el grau de coincidència amb un lloc fràgil, la presència o absència de duplicacions segmentàries i de regions CNVs i, finalment, el tipus d'anomalia cromosòmica associada a cada punt de trencament. Tota aquesta informació està recollida a la Taula 17.

La base de dades *NCBI Map Viewer* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=) ha estat consultada per obtenir informació sobre el número de gens identificats a cadascuna de les bandes implicades als diferents punts de trencament; el grau de coincidència amb un lloc fràgil (FS) s'ha buscat a la revisió de *Lukusa i Fryns* (2007) i al *Human Gene Mapping (HGM,1991)*. Pel que fa a la presència o absència de duplicacions segmentàries (DS) i de regions CNVs, s'ha consultat la base de dades *Human Genome Segmental Duplications* (<http://projects.tcag.ca/humandup/>).

L'ideograma de la Figura 36 evidencia que, d'una banda, els cromosomes 6 i 20 no han estat implicats en cap alteració cromosòmica en aquesta sèrie de 146 pacients i, de l'altra, que els punts de trencament identificats no es troben distribuïts a l'atzar, sinó que hi ha cromosomes que presenten una freqüència més elevada que altres de punts de trencament. Així, els cromosomes més implicats en alteracions cromosòmiques han estat: 15, 8, 10, Y, 9 i X.

La participació de les bandes cromosòmiques en les diferents alteracions tampoc ha tingut lloc a l'atzar: les que més freqüentment s'hi han vist implicades han estat la Xp22.3 (8 casos), la Yp11.3 (8 casos), la 15q11.1 (5 casos), la 15q26 (5 casos) i la 15q15 (4 casos).

L'anàlisi de la distribució del patró de bandes G indica que hi ha una prevalença de bandes clares –un 61%– respecte les bandes fosques –un 39%– als punts de trencament (per fer aquest càlcul, no s'ha tingut en compte les bandes constituïdes per heterocromatina). Aquesta major predisposició de les bandes clares a patir trencaments ja ha estat observada prèviament per altres autors (Savage,1977; Bauchinger i Gotz, 1979; Tanaka i col. 1983; Fuster i col. 1989; Barrios et al. 1989; Hernando, 2005; Santos, 2007). Swansbury (2003) i molts altres autors han suggerit que les bandes clares, en ser més riques en gens que les fosques, són més actives transcripcionalment, per tant cal pensar que els trencaments en aquest tipus de bandes tenen una major probabilitat de produir disruptcions gèniques i de generar, consegüentment, més alteracions clíniques que si afecten a bandes fosques. Les bandes clares amb més densitat gènica implicades en els punts de trencament detectats al nostre estudi han estat: 9q34.3, 17p13, 19p13.3, 19q13.3, 22q11.2 i Yq11.23.

S'ha analitzat el grau de coincidència dels punts de trencament de la nostra sèrie amb la presència en aquestes regions del genoma de FS, DS i CNVs per veure si la major inestabilitat genòmica d'aquestes regions s'associa amb punts de trencament detectats. En relació als FS no s'ha trobat cap correlació ja que únicament s'estableix concordança en un 22% dels casos semblant al que trobaríem per atzar (118 llocs fràgils en les 400 bandes). Aquest fet no s'ajusta amb la literatura, ja que s'han publicat coincidències entre la localització de llocs fràgils i els

punts de trencament implicats en reorganitzacions cromosòmiques i malformacions congènites (Fuster i col. 1989; Penny i col 1995; Dekbacker i Kooy, 2007). El nombre relativament petit de pacients estudiats a la nostra sèrie podria ser-ne una explicació.

Respecte l'estudi de coincidència dels punts de trencament amb DS, sí que hem trobat una associació entre ells ja que un 83% de les bandes amb punts de trencament contenen duplicacions segmentàries i, d'aquestes, 12 presenten una gran densitat de duplicacions segmentàries: 7q11.2, 8p23, 9p12, 10p12.1, 13q11, 14q11.1, 15q25.2, 15q26.3, 22q11.2, Xp22.3, Yp11.3 i Yq11.23. Aquests resultats sí que coincideixen amb la literatura, ja que darrerament s'ha relacionat les DS amb la presència d'alteracions cromosòmiques mitjançant el mecanisme de recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR) (Christian i col, 1999; Inoue i col. 2002; Antonell i col, 2005; Hernando, 2005; Santos, 2007). Així doncs, els nostres resultats corroboren la hipòtesi que les bandes cromosòmiques que contenen DS podrien estar més freqüentment implicades en els punts de trencament de les anomalies cromosòmiques.

Finalment, l'estudi de coincidència dels punts de trencament amb CNVs també ha donat associació ja que al 96.5% de les bandes amb trencaments s'hi han descrit regions CNVs, i la majoria d'aquestes bandes presenten una gran densitat de CNVs. Aquests resultats coincideixen plenament amb els descrits a la literatura segons els quals els CNVs situats en regions crítiques de síndromes de microdeleció o microduplicació o en regions de rellevància clínica significativa –com per exemple, les regions subtelomèriques- tenen més probabilitats de ser patogènics (Lee i col. 2007; Edelman i col. 2009).

En consultar la *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER, <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>), hem observat que un 16% (14/87) de les bandes cromosòmiques on es localitzen els punts de trencament detectats al nostre estudi són considerades com a “regions crítiques riques de CNVs”. Aquestes bandes són: 1p36.3 (síndrome de microdeleció 1p36), 2q33 (síndrome de microdeleció 2q33.1), 5p15.3 (síndrome *Cri du Chat*), 5q35 (síndrome de *Soto*), 7q11.2 (síndrome de *Williams-Beuren*), 8p23.1 (síndrome de *microdeleció 8p23.1*), 9q34.3 (síndrome de *deleció subtelomèrica 9q*), 15q13.1-15q13.2 (síndrome de *Prader-Willi/Angelman*), 15q26.1-15q26.2-15q26.3 (síndrome de sobrecreixement 15q26), 17p13 (síndrome de *Mieller-Dieker*), 22q11.1-22q11.2 (síndrome *Velocardiofacial/DiGeorge*), 22p11.1q11.1 (síndrome *Cat-Eye*), Xp22.3 (discondrostosi Leri-Weill (LWD)/deleció SHOX) i Yq11.23 (infertilitat causada per azoospermia/severa oligospermia (AZFb, AZFc)). Per aquest motiu totes aquestes regions CNVs

DISCUSSIÓ

les hem de considerar com a potencialment patogèniques, tal com ha estat discutit als apartats anteriors.

Taula 17. Característiques de les bandes cromosòmiques implicades als punts de trencament de la nostra sèrie.

Banda Citogenètica	Patró de bandes G	Mida de la banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc fràgil	Duplicacions segmentàries	CNVs	Típus d'alteració cromosòmica
1p36.3	C	7.1Mb	169	23.8	-	+	+	del
1p21	F	12.5Mb	75	6	+	+	++	t
1q31	F	23.8Mb	146	6.1	+	+	++	t
1q32	C	9.6Mb	113	11.8	-	+	+	t
2p24	F	11.1Mb	46	4.1	+	+	++	t
2p11.1	H	2.3Mb	15	6.5	-	+	++	mar
2q11.1	H	2.4Mb	12	5	-	+	+	mar
2q21	C	7Mb	109	15.6	+	+	++	t
2q33	C	12Mb	139	11.6	+	+	+	del
2q34	F	6Mb	23	3.8	-	+	+	del
3p26	F	8.7Mb	34	3.9	-	+	++	del
3p25	C	6Mb	93	15.5	-	+	++	dup
4p15.32	C	3.2Mb	29	9	-	+	++	dup
5p15.3	C	8.2Mb	59	7.2	-	+	+	del
5p14.2	C	1.4Mb	6	4.3	+	+	+	del

Banda Citogenètica	Patró de bandes G	Mida de la banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc fràgil	Duplicacions segmentàries	CNVs	Tipus d'alteració cromosòmica
5p14.1	F	4.6Mb	9	1.9	+	+	+	dup
5p13.1	C	3.9Mb	31	7.9	+	-	++	dup
5p12	F	3.4Mb	31	9.1	-	-	+	dup
5p11	H	1.9	0	0	-	-	++	del
5q13	C	9.9Mb	135	13.6	-	+	++	t
5q15	C	5.4Mb	44	8.1	+	-	+	del
5q33	C	12.7Mb	138	10.9	-	+	++	t
5q35	C	13.5Mb	238	17.6	+	+	+	t
7p13	C	3.3Mb	66	20	+	+	++	t
7q11.2	C	16.3Mb	242	14.8	+	++	++	inv
7q22	C	9.3Mb	190	20.4	+	+	+	inv
8p23	C	12.7Mb	223	17.5	-	++	++	t, mar
8p22	F	6.4Mb	42	6.6	-	+	+	dup, mar
8p21	C	10.6Mb	117	11	-	+	++	dup, mar
8p12	F	8.8Mb	70	7.9	-	+	++	dup
8p11.2	C	4.7Mb	54	11.5	-	+	++	mar
8q11.2	C	7.5Mb	56	7.5	-	+	++	mar
8q12	F	10.5Mb	62	5.9	-	+	++	mar
8q12.1	F	6.1Mb	38	6.2	-	+	+	dup

DISCUSSIÓ

Banda Citogenètica	Patró de bandes G	Mida de la banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc fràgil	Duplicacions segmentàries	CNVs	Tipus d'alteració cromosòmica
8q12.3	F	3.7Mb	20	5.4	-	-	++	dup
9p24	C	9Mb	78	8.7	-	+	+	del
9p23	F	5.1Mb	17	3.3	-	-	+	del
9p12	F	2.2Mb	30	13.6	-	++	++	inv
9q12	H	9.7Mb	70	7.2	-	+	+	inv
9q13	C	500kb	11	22	-	+	+	inv
9q22.32	F	2.6Mb	36	13.8	-	+	+	del
9q34.3	C	3.67Mb	105	28.6	-	+	+	dup
10p15	C	6.7Mb	64	9.5	-	+	++	dup
10p12	F	11Mb	90	8.2	-	+	+	dup
10p12.1	F	4.2Mb	33	7.8	-	++	+	del
10p11.23	C	3.1Mb	27	11.9	-	+	+	dup
10q25.2	C	3.1Mb	25	8	+	-	++	del
10q25.3	F	4.2Mb	42	10	-	-	++	del, t
10q26	C	16.3Mb	154	9.4	+	+	++	t
10q26.1	C	8.3Mb	90	10.8	+	+	++	del
11p12	F	7Mb	16	2.3	-	+	+	t
11q22	F	13.3Mb	85	6.4	-	+	+	t
11q23	C	10.7Mb	171	15.9	+	+	+	del

Banda Citogenètica	Patró de bandes G	Mida de la banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc fràgil	Duplicacions segmentàries	CNVs	Tipus d'alteració cromosòmica
11q24.3	F	2.9Mb	26	8.9	-	+	++	t
12q22	C	3.6Mb	29	8	-	-	++	del
12q23	F	12.7Mb	129	10.2	-	+	++	del
13q11	H	2.4Mb	0	0	-	++	++	mar
13q32.3	C	2.4Mb	27	11.2	+	-	+	del, mar
14q11.1	H	3.5Mb	0	0	-	++	++	mar
15p11.1	H	2.9Mb	0	0	-	-	-	mar, r
15q11.1	H	18.4Mb	0	0	-	-	+	mar
15q13.1	C	2.3Mb	10	4.3	-	+	+	mar, del
15q13.2	F	1Mb	17	17	-	+	+	mar, del
15q15	C	4.8Mb	83	17.3	-	+	++	del
15q15.1	C	2.8Mb	28	10	-	+	++	mar, t
15q25	F	10.8Mb	175	16.2	-	++	++	del
15q25.1	F	3.4Mb	56	16.5	-	+	++	del
15q25.2	C	3.5Mb	52	14.8	-	++	+	del
15q26.1	C	5.2Mb	77	14.8	-	+	+	del, mar
15q26.2	F	4.2Mb	26	6.2	-	-	++	r, mar
15q26.3	C	4Mb	25	6.2	-	++	+	del, r, mar
16q13	C	2.2Mb	34	15.4	-	-	+	t

DISCUSSIÓ

Banda Citogenètica	Patró de bandes G	Mida de la banda	Número de gens	Densitat gènica	Lloc fràgil	Duplicacions segmentàries	CNVs	Tipus d'alteració cromosòmica
17p13	C	11.2Mb	326	29.1	-	+	++	t
18q11.2	C	6Mb	43	7.2	-	+	++	t
18q22	F	11.5Mb	45	3.9	-	+	+	t, dup
18q23	C	4.8Mb	25	5.2	-	+	+	del
19p13.3	C	6.9Mb	257	37.2	-	+	+	inv
19q13.3	C	9.8Mb	523	53.4	-	+	+	inv
19q13.32	F	3.8Mb	195	51.3	-	+	+	t
19q13.43	F	2.4Mb	126	52.5	-	+	+	dup
21q11.1	H	900kb	0	0	-	-	-	mar
22q11.1	H	4.5Mb	8	1.7	-	+	+	mar
22q11.2	C	8Mb	339	42.4	-	++	++	mar
22q13	C	13.8Mb	266	19.3	-	+	++	t
Xp22.3	C	9.5Mb	67	7	+	++	++	t
Yp11.3	F	3.3Mb	29	8.8	-	++	-	t
Yq11.23	C	1.8Mb	49	27.2	-	++	+	t

5.6.1. UTILITAT DE L'ANÀLISI DELS PUNTS DE TRENCAMENT PER A LA GENÈTICA CLÍNICA

En aquest darrer apartat s'ha volgut analitzar el grau de coincidència de les bandes implicades als punts de trencament d'inversions/translocacions aparentment equilibrades i de monosomies i trisomies parcials autosòmiques i gonosòmiques de tots els casos estudiats pel nostre grup des de l'any 2002 al 2010 amb la presència o absència de duplicacions segmentàries (DS) i de regions CNVs.

A l'ideograma de la Figura 37, s'indica la localització dels 280 punts de trencament estudiats pel nostre grup. Com es pot observar, tots els cromosomes es troben implicats en alguna alteració cromosòmica; tanmateix, els punts de trencament identificats no es troben distribuïts a l'atzar, sinó que hi ha cromosomes que presenten una freqüència més elevada que altres de punts de trencament. Així, els cromosomes més implicats en alteracions cromosòmiques han estat: 15, X, Y, 8, 10, 9, i el 5.

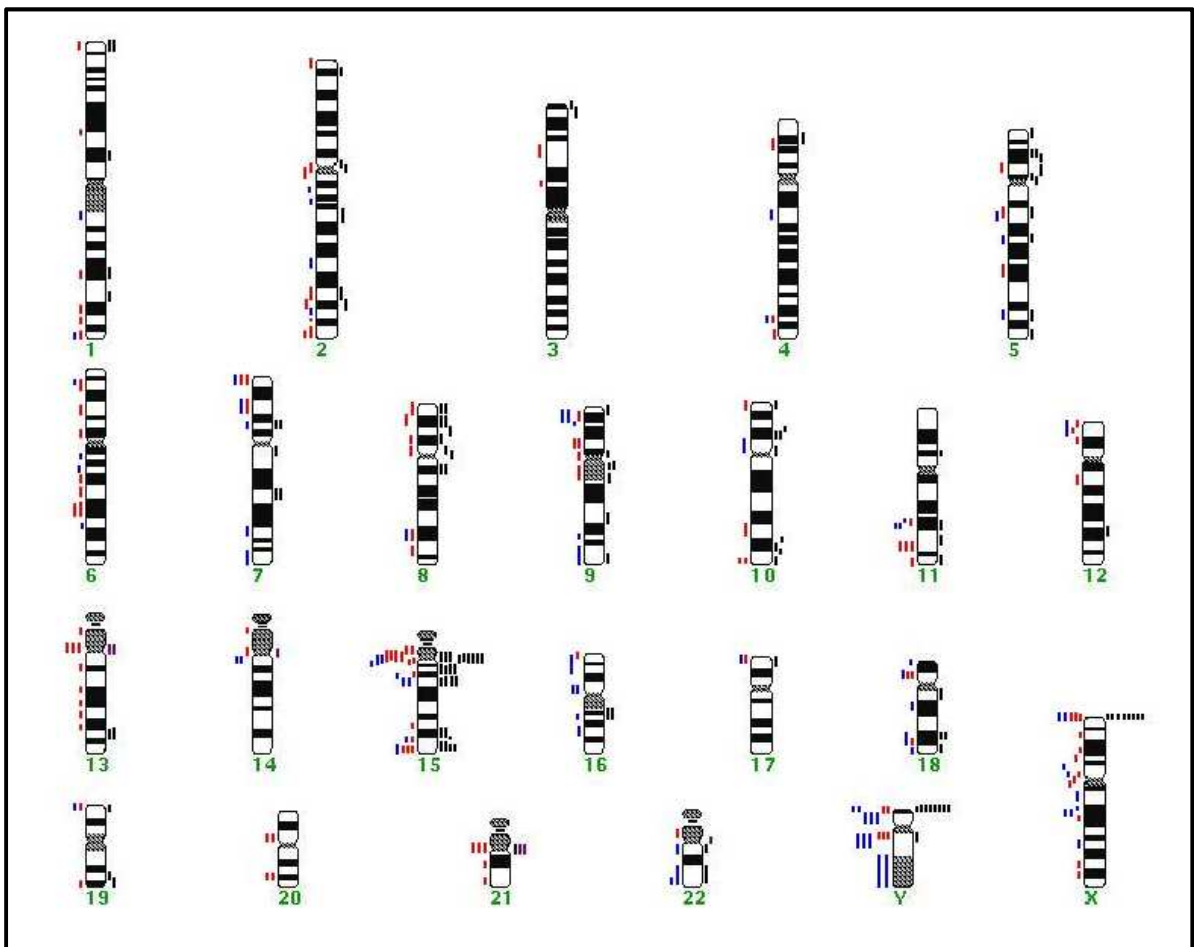


Figura 37. Ideograma en què estan representats tots els punts de trencament implicats en els treballs del nostre grup. En blau, s'indiquen els punts trobats a la tesi de Cristina Hernando (2005); en vermell, els identificats a la tesi de Mònica Santos (2007) i, finalment, en negre i lila, els estudiats al present treball.

Els 280 punts de trencament s'han agrupat en tres taules diferents: la primera (Taula 18), inclou aquells que estan implicats en translocacions/inversions aparentment equilibrades; la segona (Taula 19), els que intervenen en monosomies i trisomies parcials autosòmiques i finalment, la tercera (Taula 20), inclou aquells punts que participen en monosomies i trisomies parcials gonosòmiques. A cadascuna d'elles, s'han recollit les següents dades: el número de cas, la fórmula cromosòmica corresponent, les bandes implicades en l'anomalia cromosòmica, el fenotip del pacient i, finalment, la presència o absència de duplicacions segmentàries i de regions CNVs.

Com a l'apartat anterior, la base de dades *Human Genome Segmental Duplications* (<http://projects.tcag.ca/humandup/>) ha estat consultada per esbrinar la presència o absència de duplicacions segmentàries (DS) i de regions CNVs per cada punt de trencament.

5.6.1.1. Anàlisi dels punts de trencament implicats en translocacions i/o inversions aparentment equilibrades.

S'ha recollit informació d'un total de 19 casos amb translocacions i/o inversions aparentment equilibrades. En aquest grup d'anomalies cromosòmiques estructurals, s'han vist implicades 49 bandes cromosòmiques; d'aquestes, únicament 9 –la 19p13.3, 19q13.3, 10q25.3, 1p21, 21q11.1, 4p15.2, 21q22.3, 12p13 i 12p13.1- participen exclusivament als 6 casos que no presenten una clínica alterada o que són de diagnòstic prenatal sense marcadors ecogràfics (casos M-54, MS-147, 100, 101, 103 i 107); per últim, d'aquestes 49 bandes, n'hi ha 4 –la 7p13, 7q22, 2q21 i 15q15.1- que es troben implicades tant en casos patològics com normals.

Sense tenir en compte la clínica del pacient, el grau de coincidència d'aquestes 49 bandes amb la presència de duplicacions segmentàries és del 83.7% (41/49); d'altra banda, el grau de coincidència d'aquestes 49 bandes amb la presència de regions CNVs és inferior, un 75.5% (37/49).

Si es tenen en compte només els casos amb el fenotip alterat, aleshores el grau de coincidència de les bandes amb presència de duplicacions segmentàries augmenta i esdevé del 88.9% (32/36); contràriament, respecte al grau de coincidència amb regions CNVs, el percentatge no varia i es manté al 77.8% (28/36). (Per fer aquests càlculs, no s'han tingut en compte les 4 bandes que estan implicades tant als casos amb clínica alterada com normal).

Finalment, si s'analitzen únicament els casos que presenten un fenotip normal, el grau de coincidència baixa considerablement tant en el cas de les duplicacions segmentàries i com en el cas de les regions CNVs respecte els valors anteriors. En efecte, respecte les DS, de les 9 bandes cromosòmiques que participen únicament en les alteracions dels casos amb fenotip normal, s'han identificat DS en 5 d'elles, cosa que fa que el grau de coincidència sigui del 55.6% (5/9); pel que fa a les regions CNVs, el percentatge és del 66.7% (6/9).

D'acord amb la base de dades *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER, <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>), cap de les 6 bandes que contenen regions CNVs i que estan implicades en els punts de trencament de les translocacions i/o inversions dels casos amb fenotip normal han estat associades a síndromes clíniques definides a la literatura i, per tant, variacions en el nombre de còpies en aquestes regions no caldria considerar-les com a potencialment patogèniques; concretament, es tracta de les bandes 19p13.3, 19q13.3, 10q25, 1p21, 12q13 i 12p13.1.

D'altra banda, pel que fa a les 28 bandes que contenen regions CNVs i que estan implicades als punts de trencament de les translocacions i/o inversions dels casos amb el fenotip alterat, cal dir que 5 bandes -un 17.8% (5/28)- han estat associades a síndromes clíniques i es consideren "punts calents" quan es troben alteracions cromosòmiques que afecten aquestes regions. Concretament, es tracta de les bandes següents: 1q21 (el locus 1q21.1 es considera un locus de susceptibilitat per a desordres de desenvolupament del sistema nerviós i també ha estat associat a la síndrome de TAR -*Thrombocytopenia-Absent Radius*); la 22q13.3 (associada a la síndrome de deleció 22q13 -*Phelan-Mcdermid syndrome*), la 7q11.2 (associada a la síndrome de duplicació 7q11.23), la 16p11.2 (associada a les síndromes de microduplicació/microdeleció 16p11.2p12.2) i, finalment, la 5q35 (associada a la síndrome de Sotos). Conseqüentment, aquestes cinc bandes sí que s'haurien de considerar com a potencialment patogèniques i s'hauria de realitzar un estudi més exhaustiu mitjançant aCGH d'aquestes regions, ja que la presència d'alteracions en el nombre de còpies *de novo* en aquestes bandes podria ser patològica i explicar el fenotip alterat dels pacients.

Taula 18. Casos amb translocacions i inversions equilibrades estudiats pel nostre grup des de l'any 2002-2009.

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
M-7*	46,X,der(X)(Xpter→Xq21::?p12::2q32→2qter), der(2)(2pter→2q32::Xq21→Xqter)	2q32, Xq21	amenorrea secundària	+,+	+,+
M-17*	46,X,der(1)t(1;6)(q43;q15),der(4)t(4;11)(q21;q22), der(6)t(6;11;4;1;4)(p21.3q15;q22;q2133;q43;q33), der(11)t(6;11)(p21.3;q22)	1q43, 4q21, 4q33, 6p21.3, 6q15, 11q22	torticolis paroxismal	+,+,+ +,-,-	-,+,+ -,+,+
M-24*	46,X,der(X)t(22;X;2)(q13.3;p11.21q24;q31), Der(2)t(2;11;X)(q21;q22.2;q24),der(11)ins(11;2) (q22.1;q21q31),der(22)t(X;22)(p11.21;q13.3)	2q21, 2q31, 11q22.1, 11q22.3, 22q13.3, Xp11.21, Xq24	amenorrea primària	+,+,-, +,+ +,+	++,+,-, -,+ +,+
M-36*	46,XX,der(7)inv(7)(13q32)ins(15;7) (q15;q36.1q36.3),t(14;15)(q11.2;q15)	7p13, 7q32, 7q36, 14q11.2, 15q15	atròfia cortical congènita, subluxació de cristal·lins, miopia magna bilateral	+,+,+ +,+	+,+,-, -,+
M-37*	46,XY,t(1;6;16)(q21;q13;p11.2)	1q21, 6q13, 16p11.2	avortaments de repetició	+,+,++	+,-,+
M-54*	46,XX,t(12;19)(p13;p13.3)mat	12p13, 19p13.3	normal	+,+	+,+
M-65*	46,XY,der(5)inv(5)(q13q33)ins(7;5) (p15;q13q15),der(7)ins(7;5)	5q13, 5q15, 5q33, 7p22	retard psicomotor, no sensació de por	+,-,+ +	++,+,+ +
MS-117**	46,XY,t(6;19)(p21.3;q13.4)mat	6p21.3, 19q13.4	quadre clínic	+,++	-,+

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
MS-118**	46,XX,t(5;6)(q13;p23)	5q13, 6p23	retard psicomotor	+,-	++,+
MS-147**	46,XY,t(4;21;12)(p15.2;q22.3;p13.1)	4p15.2, 21q22.3, 12p13.1	diagnòstic prenatal	-,+ -	-,- +
100 (A-42)	46,XX,t(1;21)(p21;q11.1)	1p21, 21q11.1	diagnòstic prenatal	+,-	++,-
101 (A-44)	46, XX, t(10;15)(q25.3;q15.1)	10q25.3, 15q15.1	normal	-,+	++,++
102 (A-46)	46, XX, t(11;15)(p12;q15.1)	11p12, 15q15.1	avortament anterior per fetus amb malformacions	+,+	+,++
103 (A-49)	46,XX,der(7)inv(7)(p13q22) t(2;7)(q21;p13)	7p13, 7q22, 2q21	diagnòstic prenatal, angoixa materna	+,+,+	+,+,++
104 (A-79)	46, XX inv(7)(q11.2q22)	7q11.2, 7q22	alçada baixa	++,+	++,+
105 (A-92)	46,XY,t(16;19)(q13;q13.32)	16q13, 19q13.32	Microcefàlia tipus II i retard mental lleu	-,+	+,+
106 (A-100)	46,XY,t(5;18)(q13;q11.2)	5q13, 18q11.2	Trets dismòrfics	+,+	++,++

DISCUSSIÓ

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
107 (A-148)	46,XX,inv(19)(p13.3q13.3)	19p13.3, 19q13.3	normal	+,+	+,+
108 (A-163)	46,XX,der(1)ins(5;1)(q35;q32q31), der(5)t(5;10)(q33;q26),der(10)t(5;10) ins(5;1)	5q35, 1q32, 1q31, 5q33, 10q26	avortaments de repetició	+,+,+, +,+	+,+,+, ++,++

*casos estudiats a la tesi de Cristina Herando (2005)

**casos estudiats a la tesi de Mònica Santos (2007)

5.6.1.2. Anàlisi dels punts de trencament implicats en monosomies i trisomies parcials autosòmiques.

En aquest grup s'ha recollit informació d'un total de 75 casos amb monosomies i/o trisomies parcials autosòmiques, en els quals s'han vist implicades un total de 104 bandes cromosòmiques (Taula 19). D'aquestes, únicament dues bandes -8p11.2 i 12q13- participen en les alteracions cromosòmiques identificades als dos casos amb fenotip normal (M-48 i MS-77); de les 102 bandes restants, n'hi ha tres –la 9p24, 13q12 i 18p11.2- que estan implicades tant en casos amb clínica alterada com als dos casos amb fenotip normal.

Sense tenir en compte el fragment cromosòmic implicat en la monosomia parcial o trisomia parcial ni la clínica dels pacients, el grau de coincidència de duplicacions segmentàries en aquestes 104 bandes és del 84.6% (88/104), mentre que el grau de coincidència amb regions CNVs és del 76% (79/104). És interessant destacar que aquests valors són molt semblants en comparació amb els seus homòlegs de l'apartat anterior.

Si es calculen aquests graus de coincidència tenint en compte únicament els 73 casos en què els pacients presenten un fenotip alterat –excloent-ne els de diagnòstic prenatal sense marcadors ecogràfics, els valors disminueixen una mica: el grau de coincidència de duplicacions segmentàries és del 83.8% (83/99) i el de regions CNVs és del 76.7% (76/99). (Per fer aquest càlcul s'han exclòs les tres bandes que participen tant en casos amb clínica alterada com als que no).

Finalment, si es consideren les úniques dues bandes -8p11.2 i 12q13- que només estan implicades als punts de trencament dels dos casos que no presenten una clínica alterada, els graus de coincidència tant amb duplicacions segmentàries com amb regions CNVs és del 100% (2/2). A més, totes dues bandes són riques en regions CNVs.

Segons la base de dades DECIPHER, cap de les 2 bandes -8p11.2 i 12q13- implicades en els punts de trencament de les monosomies i trisomies parcials autosòmiques dels casos amb fenotip normal han estat associades a síndromes clíniques definides a la literatura i, per tant, variacions en el nombre de còpies en aquestes regions no caldria considerar-les com a potencialment patogèniques.

Contràriament, pel que fa a les 76 bandes que contenen regions CNVs i que estan implicades als punts de trencament de les monosomies i trisomies parcials autosòmiques dels casos amb el fenotip alterat, cal dir que 15 bandes -un 19.7% (15/76)- han estat associades a síndromes clíniques i es consideren "punts calents" quan es troben alteracions cromosòmiques

que afecten aquestes regions. Concretament, es tracta de les bandes següents: 1p36.3 (associada a la síndrome de microdeleció 1p36), 2q33 (associada a la síndrome de deleció 2q33.1), 2q37.3 (associada a la monosomia 2q37), 5p15.3 (associada a la síndrome de *Cri du Chat*), 8p23 (associada a la síndrome de deleció 8p23.1), 9q34.3 (associada a la síndrome de deleció subtelomèrica 9q), 15q13 (associada a la síndrome de microdeleció 15q13.3), 15q26.2 (associada a la síndrome de sobrecreixement), 16p11.2 (associada a les síndromes de microduplicació/microdeleció 16p11.2p12.2), 16p13p13.3 (locus de susceptibilitat de desordres neurocognitius -16p13.11- i associat a la síndrome de *Rubinstein-Taybi* -16p13.3), 17p13 (associada a la síndrome *Miller-Dieker (MDS)*), 21q21 (locus de desenvolupament prematur de l'*Alzheimer* amb angiopatia amiloide cerebral), 22q13 (associada a la síndrome de deleció 22q13 -*Phelan-Mcdermid syndrome*), Xp22.2 (locus de la deficiència de sulfatasa d'esteroïdes (STS)) i, finalment, la banda Yq11.23 (associada a azospèrmia -AZF_b i AZF_c). Aquestes quinze bandes, si no tenim en compte les monosomies o trisomies parcials associades, podrien ser potencialment patogèniques per sí mateixes i caldrà estudiar-les amb molta més cura amb aCGH en un futur ja que la presència d'alteracions en CNVs *de novo* en aquestes regions podrien ser patològiques.

Taula 19. Casos amb trisomies i/o monosomies parcials autosòmiques estudiats pel nostre grup des de l'any 2002-2009.

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
M-3*	46,XY,del(16)(p11.2)	16p11.2	quadre clínic	++	+
M-15*	46,XX,der(18)t(8;18)(q22.3;q22)	8q22.3, 18q22	quadre clínic	-,+	++,+
M-18*	46,XY,r(18)(p11.2q22)	18p11.2, 18q22	quadre clínic	+,+	+,+
M-22*	46,XX,del(2)(q32.2q35)	2q32.2, 2q35	quadre clínic	-,+	+,+
M-36*	46,XX,der(7)inv(7)(p13q32)del(7)(q36),t(14;15)(q11.2;q15)	7p13, 7q32, 7q36, 14q11.2, 15q15	retard maduratiu	+,+,+, +,+	++,+,+,-, -,++
M-40*	46,XX,der(17)t(5;17)(?;p13)	17p13	quadre clínic	+	+
M-41*	46,XX,del(9)(q22.3q32)	9q22.3, 9q32	quadre clínic	+,+	+,-
M-43*	46,XX,inv(9)(p11q12),dup(16)(q12.1q22.1)	16q12.1, 16q22.1	quadre clínic	+,+	+,-
M-47*	46,XY,der(16)t(9;16)(?;p13)	16p13	alterat	+	+

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
M-48*	46,XX,del(9)(p24)	9p24	diagnòstic prenatal, oligoamnios	+	+
M-59*	46,XX,der(18)t(18;18)(q12;q23)	18q12, 18q23	avortament diferit	+,+	+,-
M-66*	46,XY,der(9)del(9) (p23pter)t(2;9)(p11;p11)	9p23, 2p11, 9p11	fetus amb dolicocefàlia	-,+,+	+,+,+
MS-44**	46,XX,der(2)dup(2)(q34q37.2) del(2)(q37.3)	2q34, 2q37.3	quadre clínic	+,+	+,+
MS-45**	46,XX,t(1;14)(p22.3;p11.2) del(1)(p22.3p22.3)	1p22.3, 14p11.2	quadre clínic	+, -	+,-
MS-46**	46,X,der(X;20) t(X;20)(p11.2;p11.2)	Xp11.2, 20p11.2	quadre clínic	++,+	+,++
MS-54**	46,XY,del(7)(p21p21)	7p21	quadre clínic	+	+
MS-55**	46,XX,dup(5)(p13.3p15.3)	5p13.3, 5p15.3	marcadors ecogràfics	+,+	-,+
MS-65**	46,XY,der(10)t(10;20)(q26;q13.2)	10q26, 20q13.2	quadre clínic	+,+	++,-

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
MS-70**	46,XY,dup(8)(p12p22)	8p12, 8p22	retard psicomotor	+,+	++,+
MS-71**	46,XX,der(13)t(9;13)(p13.2;p11.2)	9p13.2, 13p11.2	quadre clínic	+,-	+,-
MS-72**	46,XX,der(22)t(9;22)(p13.3;p11.2)	9p13.3, 22p11.2	quadre clínic	+,-	+,-
MS-76**	46,XX,der(10)t(10;20)(q26;q13.2)	10q26, 20q13.2	quadre clínic	+,+	+,-
MS-77**	46,XY,t(8;18)(p11.2;p11.2)del(18)(p11.2)t(12;13)(q13;q12)	8p11.2, 18p11.2, 12q13, 13q12	diagnòstic prenatal	+,+,+, ++	++,+,+, ++
MS-79**	46,XX,del(17)(p13.3)	17p13.3	quadre clínic	+	-
MS-88**	46,XY,der(8)t(7;8)(p22.3;p23.2)	7p22.3, 8p23.2	quadre clínic	+,+	-,-
MS-96**	46,XX,dup(20)(p11.2p13)	20p11.2	quadre clínic	+	++

DISCUSSIÓ

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
MS-105**	46,XY,tru(13)(q21.1q21.33)	13q21.1, 13q21.33	quadre clínic	+,-	-,-
MS-105G**	46,XY,dup(13)(q21.1q21.33)	13q21.1, 13q21.33	hipoacúsia	+,-	-,-
MS-111**	46,XX,der(2)t(2;3)(q33;p21), der(3)t(2;3)inv(3)(q36q2?3) del(2)(q36)	2q33, 3p21, 2q36	quadre clínic	+,+,+	+,+,+
MS-120**	46,XX,r(13)(q12q31)[33]/ 45,XX,-13[6]	13q12, 13q31	fetus amb malformacions múltiples	++,+	++,+
MS-129**	46,X,der(X)t(X;12)(p22.2;p12.3)	Xp22.2, 12p12.3	estenosi anal, camptodactília i cara peculiar	+,-	++,++
MS-130**	46,XX,del(18)(p11.2)	18p11.2	quadre clínic	+	+
MS-137**	46,XY,del(15)(q11.2q13.?)	15q11.2	quadre clínic	++	-
MS-140**	46,XY,der(16)t(9;16)(p23-24;p13.3)	9p23, 16p13.3	quadre clínic	-,+	-,+

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
MS-145**	46,XY,dup(6)(p12p12)	6p12	quadre clínic	+	++
MS-153**	46,XX,del(2)(q37)	2q37	quadre clínic	+	++
MS-154**	46,XX,dup(1)(q41q42)	1q41, 1q42	retard mental i malformacions	+,+	++,+
MS-155**	46,XY,der(12)t(12;19)(?;p13.3)	19p13.3	retard mental i malformacions	+	+
MS-157**	46,XX,del(8)(q23.3q24.1)	8q23.3, 8q24.1	quadre clínic	-,+	-,+
MS-159**	46,XX,del(11)(q23.3)	11q23.3	síndrome de Jacobsen	+	++
MS-161**	46,XX,del(11)(q24)	11q24	síndrome de Jacobsen	+	++
MS-163**	46,XY,del(3)(p13-14.2)	3p13	quadre clínic	+	+
MS-166**	46,XX,del(11)(q22.3q23.3)	11q22.3, 11q23.3	quadre clínic	+,+	-,++
MS-170**	46,XX,dup(12)(p13)	12p13	quadre clínic	++	+

DISCUSSIÓ

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
MS-172**	46,XY,del(4)(q33q35.2)	4q33, 4q35.2	quadre clínic	+,+	+,-
MS-179**	46,XX,r(15)(p11.2q26.3)	15p11.2, 15q26.3	quadre clínic	-,+	-,-
MS-181**	46,XY,der(15)t(7;15)(p22.3;q26.3)	7p22.3, 15q26.3	quadre clínic	+,+	-,-
MS-185**	46,XX,del(1)(q31q31)	1q31	quadre clínic	+	++
MS-187**	46,XY,del(6)(q21-22)	6q21, 6q22	quadre clínic	+,+	-,+
MS-194**	46,XX,der(10) t(5;10)(q33-34;q26)	5q33, 10q26	malformacions	+,+	++,++
MS-196**	46,XY,dup(21)(q21q21)	21q21	quadre clínic	+	++
34 (A-59)	46,XX,dup(8)(q12.1q12.3)	8q12.1, 8q12.3	retard mental i trets dismòrfics	+,+	-;++
39 (A-73)	46,XY,der(9)t(9;18)(p24;q22)	9p24, 18q22	trets dismòrfics	+,+	+,+
41 (A-95)	46,XX,del(1)(p36.3)	1p36.3	retard mental greu i síndrome polimalformativa	+	+

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
46 (A-104)	46,XX,dup(4)(p15.32)	4p15.32	trets dismòrfics i retard de creixement	+	++
47 (A-141)	46,XY,del(5)(q15)	5q15	retard mental i trets dismòrfics amb alteracions de caràcter	-	+
48 (A-142)	46,XX,del(1)(p36.3)	1p36.3	retard mental i trets dismòrfics	+	+
51 (A-145)	46,XX,del(12)(q22q23)	12q22, 12q23	retard mental i trets dismòrfics	-,+	++,++
109 (A-9)	46,XY del(2)(q33q34)	2q33, 2q34	retard mental sever	+,+	+,+
110 (A-15)	46,XX,invdup(5)(13.1p14.1)del(5)(p14.2pter)dup(5)(p12)	5p13.1, 5p14.1, 5p14.2, 5p12	quadre clínic	-,+,+ -	++,+,+ +
111 (A-29)	46,XX,dup(3)(p25),del(3)(p26)	3p25, 3p26	Retard mental sever i trets dismòrfics	+,+	++,++
112 (A-38)	46,XY,r(18)del(18)(q23)	18q23	Trets dismòrfics	+	-
113 (A-43)	46,XY,der(18)t(Y;18)(q11.23;q22)	Yq11.23, 18q22	trets dismòrfics	++,+	+,+
114 (A-47)	46,XY,invdup(8p12p22)	8p12, 8p22	Retard mental sever i trets dismòrfics	+,+	++,+
115 (A-61)	46,XX,der(17)t(17;22)(p13;q13)	17p13, 22q13	Trets dismòrfics i retard psicomotor	+,+	+,++

DISCUSSIÓ

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
116 (A-75)	46,XX,dup(9)(q34.3)	9q34.3	Trets dismòrfics	+	+
117 (A-76)	46,XX,del(11)(q23)	11q23	Trets dismòrfics	+	+
118 (A-80)	46,XY,der(8)t(2;8)(p24;p23)	2p24, 8p23	Malformacions congènites i retard mental	+,++	++,++
119 (A-93)	46,XY,der(11)t(11;11)(q24.3;q22)	11q24.3, 11q22	Retard mental associat a malformacions oculars i facials	+,+	++,+
120 (A-96)	46,XX,del(10)(q25.2q26.1)	10q25.2, 10q26.1	Síndrome dismòrfica, retard mental i absència d'úter	-,+	++,++
121 (A-98)	46,XX,del(15)(q13q15)	15q13, 15q15	Retard mental i trets dismòrfics	+,+	+,++
122 (A-103)	46,XY,dup(10)(p12p15)	10p12, 10p15	fenotip anormal	+,+	+,++
123 (A-147)	46,XY, rec (19)dup(19q)inv(19)(p13.3q13.3)mat	19p13.3, 19q13.3	quadre clínic	+,+	+,+
125 (M71)	46,XX,r(15)(p11.1q26.2)	15p11.1, 15q26.2	quadre clínic	-,-	-,,+
126 (M74)	46,XX,r(15)(p11.1q26.2)	15p11.1, 15q26.2	quadre clínic	-,-	-,,+

*casos estudiats a la tesi de Cristina Herando (2005)

**casos estudiats a la tesi de Mònica Santos (2007)

5.6.1.3. Anàlisi dels punts de trencament implicats en monosomies i trisomies parcials gonosòmiques.

Aquest grup està constituït per 22 casos amb monosomies i/o trisomies parcials gonosòmiques, en els quals s'han vist implicades un total de 12 bandes cromosòmiques (Taula 20). D'aquestes, 11 participen en alteracions cromosòmiques de casos amb clínica alterada i només 2, als casos considerats com a fenotip normal.

Sense tenir en compte el fragment cromosòmic implicat en la monosomia o trisomia parcial ni la clínica dels pacients, el grau de coincidència de duplicacions segmentàries en aquestes 12 bandes és del 83.3% (10/12), mentre que el grau de coincidència amb regions CNVs és considerablement inferior: un 75% (9/12). És interessant destacar que aquests valors són molt semblants als seus homòlegs dels apartats anteriors.

Si es calculen aquests graus de coincidència tenint en compte únicament els 19 casos en què els pacients presenten un fenotip alterat, els valors són els següents: el grau de coincidència de duplicacions segmentàries és del 81.8% (9/11) i el de regions CNVs és del 72.7% (8/11).

Finalment, si es consideren els 3 casos considerats com a fenotip normal -en ser casos de diagnòstic prenatal sense marcadors ecogràfics, els graus de coincidència tant de bandes amb duplicacions segmentàries com amb regions CNVs és del 50% (1/2). Les dues úniques bandes que participen en aquests 3 casos són: Xq11 i Yq12.

Segons la base de dades DECIPHER, la banda Xq11, implicada en els punts de trencament d'un dels dos casos de monosomies i trisomies parcials gonosòmiques amb fenotip normal, no ha estat associada a cap síndrome clínica definida a la literatura i, per tant, variacions en el nombre de còpies en aquesta regió no caldria considerar-les com a potencialment patogèniques.

Contràriament, pel que fa a les 8 bandes que contenen regions CNVs i que estan implicades als punts de trencament de les monosomies i trisomies parcials gonosòmiques dels casos amb el fenotip alterat, cal dir que 2 bandes -un 25% (2/8)- han estat associades a síndromes clíniques i es consideren "punts calents" quan es troben alteracions cromosòmiques que afecten aquestes regions. Concretament, es tracta de les bandes següents: Xp22.3 (associada a la síndrome de discondrostosi *Leri-Weill* (LWD)/deleció SHOX) i Yq11.2 (associada a les síndromes d'azoospermia AZF_a, AZF_b i AZF_c). Conseqüentment, aquestes dues bandes, si no tenim en compte les monosomies o trisomies parcials associades, s'haurien de considerar com a

DISCUSSIÓ

potencialment patològiques per sí mateixes i caldrà estudiar-les amb molta més cura mitjançant aCGH en un futur, ja que la presència d'alteracions en CNVs *de novo* en aquestes bandes podria ser patològica.

Taula 20. Casos amb trisomies i/o monosomies parcials gonosòmiques estudiats pel nostre grup des de l'anv 2002-2009.

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
M-1*	46,X,der(Y)del(Y)(q11.2qter)	Yq11.2	diagnòstic prenatal, edat materna avançada	++	+
M-10*	45,X[11]/46,X, idic(Y)(q11.2)[16]	Yq11.2	fetus amb agenèsia renal unilateral	++	+
M-12*	45,X,inv(9)(p12q13)[30]/46,X,der(Y)t(Y;Y)(p11.3;q11.2)[70]	Yp11.3, Yq11.2	amenorrea primària	+,++	++,+
M-34*	46,X,der(X)t(X;X)(q21.2;p11.23)	Xq21.2, Xp11.23	trastorns ovàrics	+,+	+,-
M-52*	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.1)	Xp22.3, Yq11.1	alteracions ginecològiques	++, -	++, -
M-57*	45,X[58]/46,X, idic(X)(q21.1)[42]	Xq21.1	retard de creixement, trastorns ovàrics	+	++
M-68*	45,X[15]/46,X,del(X)(q11)[85]	Xq11	diagnòstic prenatal	+	+
M-70*	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)	Xp22.3, Yp11.3	baró XX	++,++	++, -
MS-21**	46,XX,del(X)(p22.3)	Xp22.3	alçada baixa i deformitat de Madelung	++	++
MS-56**	46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.3;p11.3)	Xp22.3, Yp11.3	diagnòstic prenatal, antecedent d'anomalia cromosòmica	++,++	++, -
MS-91**	45,X,del(Y)(q11.2q12)dn, der(14;15)(q10;q10)pat	Yq11.2, Yq12	esterilitat	++, -	+,-

Cas	Fórmula cromosòmica	Bandes implicades	Fenotip	Absència (-) o presència (+) de DS	Absència (-) o presència (+) de regions CNVs
MS-97**	46,XX,der(X)del(X)(p11.4p22.3) dup(X)(q27q28)	Xp11.4, Xp22.3, Xq27	quadre clínic	+,+,+	+,+,+
MS-183**	46,XY,idelic(Y)(q11.1-11.2)	Yq11.1, Yq11.2	retard mental	-,++	-,+
MS-184**	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)	Xp22.3, Yp11.3	baró XX, esterilitat	++,++	++,-
MS-197**	46,XY,der(15)t(Y;15)(q11.2;p11.2)	Yq11.2	diagnòstic prenatal, angoixa materna	++	+
91 (A-197)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)	Xp22.3, Yp11.3	baró XX, esterilitat	++,++	++,-
93 (10)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)	Xp22.3, Yp11.3	baró XX, hipogonadisme, atròfia testicular, azoospermia	++,++	++,-
94 (1041)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2)	Xp22.3, Yp11.2	baró XX, esterilitat, hipogonadisme, atròfia testicular, azoospermia	++,++	++,+
95 (1155)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2)	Xp22.3, Yp11.2	baró XX, atròfia testicular, azoospermia	++,++	++,+
96 (1389)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2)	Xp22.3, Yp11.2	baró XX, atròfia testicular, azoospermia, obesitat, ginecomàstia	++,++	++,+
97 (3607)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2)	Xp22.3, Yp11.2	baró XX, esterilitat, azoospermia	++,++	++,+
98 (9805-493)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2)	Xp22.3, Yp11.2	baró XX, esterilitat, azoospermia	++,++	++,+

*casos estudiats a la tesi de Cristina Herando (2005)

**casos estudiats a la tesi de Mònica Santos (2007)

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1- L'aplicació de diferents tècniques de citogenètica molecular per a la detecció i identificació d'anomalies cromosòmiques en pacients amb malformacions congènites o infertilitat i cariotip "aparentment" normal ha permès concloure que:

- S'ha confirmat la presència d'anomalies cromosòmiques al 7.8 % (7/90) dels pacients en aplicar conjuntament diferents metodologies (CGH/HR-CGH, MLPA, FISH, aCGH).
- Els desequilibris detectats en utilitzar una determinada metodologia han de ser sempre confirmats amb, com a mínim, una altra tècnica.
- S'han detectat més anomalies cromosòmiques críptiques mitjançant MLPA (62.5%; 5/8) que amb CGH/HR-CGH (17.78%; 16/90).
- La tècnica de MLPA s'ha d'aplicar quan es sospita de l'existència d'un determinat tipus d'alteració críptica –ja sigui subtelomèrica o intersticial, mentre que la CGH/HR-CGH es pot aplicar quan no es té cap sospita sobre el tipus d'alteració que presenta el pacient, ja que detecta desequilibris de qualsevol part genoma.
- La MLPA i la CGH/HR-CGH han de ser tècniques complementàries per a l'estudi d'aquests pacients, ja que aquest treball ha demostrat que aquest tipus de pacients presenten tant alteracions críptiques subtelomèriques com intersticials.
- S'ha proposat un protocol d'actuació en un laboratori de Diagnòstic Clínic en aquests tipus de pacients.

2- Respecte els pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques "aparentment" equilibrades, podem concloure que:

- Tots els casos estudiats presenten un cariotip equilibrat –absència de desequilibris genòmics superiors a les 3Mb- d'acord amb els resultats de la CGH/HR-CGH.
- La posada a punt de la tècnica de FISH amb sondes BAC ha permès caracteritzar els punts de trencament implicats en les reorganitzacions amb una resolució molt més elevada en un 33% (3/9) d'aquests casos.

CONCLUSIONS

- L'aplicació conjunta de diferents tècniques de citogenètica molecular ha permès caracteritzar amb una major precisió l'anomalia cromosòmica detectada per bandes G en un 55.56% (5/9) dels casos.
- 3-** L'anàlisi amb HR-CGH i MLPA dels pacients barons 46, XX ha evidenciat l'existència d'heterogeneïtat de material corresponent a la regió pseudoautosòmica del X (XPAR1) que podria contribuir a la variabilitat fenotípica que presenten aquest pacients.
- 4-** L'estudi del grup de pacients portadors de trisomies i/o monosomies parcials autosòmiques mitjançant l'aplicació de diferents tècniques de citogenètica molecular ha permès caracteritzar l'origen cromosòmic implicat en aquestes anomalies en tots els casos. A més a més, podem concloure que:
- La tècnica de CGH/HR-CGH ha estat molt útil per a l'estudi d'aquest tipus de pacients ja que ha permès definir la regió cromosòmica implicada al 94% (17/18) dels casos.
 - L'aplicació de la MLPA, de la FISH o de l'aCGH ha confirmat fins al moment el desequilibri genòmic identificat per la CGH/HR-CGH en un 77.8% (14/18) dels casos.
 - L'elevada resolució de la FISH amb sondes BAC ha permès redefinir els punts de trencament implicats en l'anomalia cromosòmica en tots els casos en què ha estat aplicada.
- 5-** Respecte als pacients portadors de cromosomes marcador supernumeraris, la combinació de diferents tècniques de citogenètica convencional i molecular (CGH/HR-CGH, MFISH, cen i subcenMFISH i BACs) ha permès una identificació de l'origen cromosòmic del sSMC al 94.7% (18/19) dels pacients i ha estat confirmat, com a mínim, amb un altra tècnica. El nostre estudi ha revelat que:
- L'origen cromosòmic més comú del cromosoma marcador ha estat el cromosoma 15, un 52.63% (10/19), seguit dels derivats dels cromosomes 8 (3 casos), 13/21 ó 14/22 en dos pacients i dels cromosomes 2 , 7 , 9 i 22 en un sol pacient cadascun.

- S'han identificat marcadors amb neocentròmers en tres pacients.
 - S'ha proposat un protocol d'actuació en un laboratori de Diagnòstic Clínic per aquests tipus de situacions.
- 6-** La combinació de tècniques de citogenètica molecular ens ha permès establir diferents correlacions fenotip-genotip, tant associades a alteracions autosòmiques com gonosòmiques.
- 7-** L'anàlisi dels 121 punts de trencament implicats en les anomalies cromosòmiques estudiades en 146 pacients mostra que:
- Les bandes cromosòmiques més implicades han estat: Xp22.3 (8 casos), Yp11.3 (8 casos), 15q11.1 (5 casos), 15q26.3 (5 casos), 15q15 (4 casos).
 - La seva distribució al genoma no és a l'atzar, ja que la majoria es localitzen en les bandes clares (un 61%), que corresponen a regions amb major densitat gènica.
 - Majoritàriament, els punts de trencament coincideixen amb bandes riques en duplicacions segmentàries (DSs), ja que el 83% es localitzen en aquestes regions del genoma.
 - S'ha trobat també una coincidència entre la localització dels punts de trencament i les regions on s'han descrit variacions en el número de còpies (CNVs).
- 8-** La comparació de l'anàlisi dels punts de trencament anterior amb d'altres realitzats pel nostre grup permet concloure que, en pacients amb malformacions congènites o infertilitat, les bandes implicades coincideixen amb bandes riques en DSs i CNVs. A més a més, ha revelat que:
- En 19 casos de translocacions i/o inversions aparentment equilibrades, el grau de coincidència d'aquestes bandes amb la presència de DSs i de regions CNVs és considerablement superior als casos que presenten una clínica alterada respecte els que tenen un fenotip normal.

CONCLUSIONS

- En 75 casos de monosomies i/o trisomies parcials autosòmiques, el grau de coincidència d'aquestes bandes amb la presència de DSs i de regions CNVs és molt similar entre els pacients amb clínica alterada i fenotip normal.
- I finalment, en 22 casos estudiats amb monosomies i/o trisomies parcials gonosòmiques, el grau de coincidència d'aquestes bandes amb la presència de DSs i de regions CNVs és considerablement superior en pacients que presenten un fenotip anormal.

7. BIBLIOGRAFIA

A

Abbas NE, Toublanc JE, Boucekkine C, Toublanc M, Affara NA, Job JC, Fellous M. A possible common mechanism of “Ynegative” human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet.* 1990; 84: 356–60.

Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Bioessays* 1995 Jul; 17(7): 661-664.

Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 2003 Oct 15; 12 (Spec No 2): R145-52.

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): 223-33.

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.

Archer HL, Gupta S, Enoch S, Thompson P, Rowbottom A, Chua I, Warren S, Johnson D, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Williams P, Pilz DT. Distinct phenotype associated with a cryptic subtelomeric deletion of 19p13.3-pter. *Am J Med Genet* 2005; 136A: 38–44.

Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair (Amst)* 2006 Sep; 5(9-10): 1126-35.

Azim E, Shnider SJ, Cederquist GY, Sohur US, Macklis JD. Lmo4 and clm1 progressively delineate cortical projection neuron subtypes during development. *Cereb Cortex* 2009 Jul; 19 (Suppl 1): i62-9.

B

Bailey JA, Kidd JM, Eichler EE. Human copy number polymorphic genes. *Cytogenet Genome Res* 2008; 123 (1-4): 234-43.

Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina U, Doco-Fenzy M, de Rademaeker M, Mortier G, Kooy F, van Den Ende J, Devriendt K, Fryns JP, Speleman F, Vermeesch JR. Subtelomeric Imbalances in Phenotypically Normal Individuals. *Human Mutation* 2007; 28(10): 958-967.

Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1356–1359.

Barber JC. Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. *J Med Genet* 2005 Aug;42(8):609-629.

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.

Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, et al. The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *J Med Genet* 2006;43:203–10.

Basel-Vanagaite L. Clinical Approaches to Genetic Mental Retardation. *IMAJ* 2008;10:821–826.

Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 2008 60(2):201-14.

Battaglia A, Gurrieri F, Bertini E, Bellacosa A, Pomponi MG, Paravatou-Petsotas M, Mazza S, Neri G. The inv dup(15) syndrome: a clinically recognizable syndrome with altered behavior, mental retardation, and epilepsy. *Neurology* 1997 Apr; 48(4): 1081-6.

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; 82(1): 60-66.

Battaglia, A. The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3: 30.

Battaglia A, Hoyme EH, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey L, Zuberi SM, Carey JC. Further Delineation of Deletion 1p36 Syndrome in 60 Patients: A Recognizable Phenotype and Common Cause of Developmental Delay and Mental Retardation. *Pediatrics* 2008; 121: 404-410.

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.

Bedeschi MF, Novelli A, Bernardini L, Parazzini C, Bianchi V, Torres B, Natacci F, Giuffrida MG, Ficarazzi P, Dallapiccola B, Lalatta F. Association of syndromic mental retardation with an Xq12q13.1 duplication encompassing the oligophrenin 1 gene. *Am J Med Genet* 2008; 146A: 1718-1724.

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.

Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi M, Tachdjian G, Demiroglu A, Gurgan T, Fiorentino F, Mohammed M, Qumsiyeh MB. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow *in vitro*. *Prenat Diagn* 2005; 25: 894–900.

Berends MJ, Tan-Sindhunata G, Leegte B, van Essen AJ. Phenotypic variability of Cat-Eye syndrome. *Genet Couns* 2001; 12(1): 23-34.

Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Crollius HR, Carrie A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 1998; 392: 923-926.

Blennow E, Anneren G, Bui TH, Berggren E, Asadi E, Nordenskjold M. Characterization of supernumerary ring marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1993 Aug; 53(2): 433-42.

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.

Bocian E. Future of prenatal cytogenetic studies: rapid aneuploidy testing or full karyotype. *Ginekol Pol* 2007 Nov; 78(11): 881-7.

Boormans EM, Birnie E, Oepkes D, Galjaard RJ, Schuring-Blom GH, van Lith JM; MLP and Karyotyping Evaluation (M.A.K.E.) Study Group. Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and karyotyping in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol*. 2010 Feb; 115:297-303.

Borelina D, Esperante S, Gutnisky V, Ferreira V, Ferrer M, Giliberto F, Frechtel G, Francipane L, Szijan I. Supernumerary marker 15 chromosome in a patient with Prader-Willi syndrome 2004 Mar; 65(3): 242-3.

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): 267-75.

Bottani A, Pardo B, Bouchardy I, Schoumans J, Toutain A, Conrad B. No major contribution of the TGFBR1- and TGFBR2-mediated pathway to Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 2006; 140A: 903-905.

Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Chaabouni S, Ouahid S, Semrouni M, Jaubert F, Toublanc M, McElreavey K, Vilain E, Fellous M. Clinical and anatomical spectrum in XX sex reversed patients: relationship to the presence of Y specific DNA sequences. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40: 733–42.

Brewer C, Holloway S, Zawalnyski 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, Zawalnyski 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): 615-9.

Buckton KE, Spowart G, Newton MS, Evans HJ. Forty four probands with an additional "marker" chromosome. *Hum Genet* 1985;69(4):353-370.

C

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.

Carey JC, Viskochil DH. Status of the human malformation map: 2002. *Am J Med Genet* 2002 Dec 30;115(4):205-220.

Carey JC, Viskochil DH. Status of the human malformation map: 2007. *Am J Med Genet.* 2007 Part A 143A:2868-2885.

Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 1970; 30(2): 215-227.

Caqueret A, Boucher F, Michaud JL. Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Dev Biol* 2006 Oct; 298(1): 95–106.

Cetin Z, Berker Karazum 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.

Chang BS, Piao X, Bodell A, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyys WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Grant PE, Barkovich AJ, Walsh CA. Bilateral frontoparietal polymicrogyria: clinical and

radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann Neurol* 2003 May; 53(5): 596-606.

Chantot-Bastarud S, Muti C, Pipiras E, Routon MC, Roubergue A, Burglen L, Siffroi JP, Simon-Bouy B. Clinical findings and cytogenetic analysis of small supernumerary ring chromosomes 7: report of two new cases. *Ann Genet* 2004 Jul-Sep; 47(3): 241-9.

Chen CP, Lin CC, Li YC, Chern SR., Lee CC, Chen WL, Lee MS, Wang W, Tzen CY. Clinical, cytogenetic, and molecular analyses of prenatally diagnosed mosaic tetrasomy for distal chromosome 15q and review of the literature. *Prenat Diagn* 2004 Oct; 24(10): 767-73.

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.

Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *Korean J Lab Med* 2009 Feb; 29(1): 71-6.

Choo KH. Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev Cell*. 2001 Aug; 1(2): 165-77.

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.

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.

Church DM, Bengtsson U, Nielsen KV, Wasmuth JJ, Niebuhr E. Molecular definition of deletions of different segments of distal 5p that result in distinct phenotypic features. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1162-1172.

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* 2004Nov; 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.

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; 89: 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.

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, Youngs S A, Ennis S Jacobs PA. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur J Hum Genet* 2005 Feb; 13(2): 154-60.

D

Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 1998; 13: 805-9.

Davies DP, Evans DJR. Clinical dysmorphology: understanding congenital Abnormalities. *Current Paediatrics* 2003; 13: 288-297.

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.

Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human disease. *Hum Mol Genet* 2007 Oct; 16 Spec No. 2: R150-8.

de Brouwer AP, Yntema HG, Kleefstra T, et al. Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. *Hum Mutat* 2007;28:207–8.

de Die-Smulders CE, Engelen JJ, Schrandt-Stumpel CT, Govaerts LC, de Vries B, Vles JS, Wagemans A, Schijns-Fleuren S, Gillessen-Kaesbach G, Fryns JP. Inversion duplication of the short arm of chromosome 8: clinical data on seven patients and review of the literature. *Am J Med Genet* 1995 Nov 20; 59(3): 369-74.

De la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 1981; 58: 105-16.

de Pater JM, Kroes HY, Verschuren M, van Oppen AC, Albrechts JC, Engelen JJ. Mosaic trisomy (8)(p22 -> pter) in a fetus caused by a supernumerary marker chromosome without aliphoid sequences. *Prenat Diagn.* 2005 Feb; 25(2): 151-5.

Demori E, Devescovi R, Benussi DG, Dolce S, Carrozzi M, Villa N, Miertus J, Amoroso A, Pecile V. Supernumerary ring chromosome 8: clinical and molecular cytogenetic characterization in a case report. *Am J Med Genet A* 2004 Oct 15; 130A(3): 288-94.

Devries S, Nyante S, Korkola J, Segraves R, Nakao K, Moore D, Bae H, Wilhelm M, Hwang S, Waldman F. Array-based comparative genomic hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors. *J Mol Diagn* 2005 Feb; 7(1): 65-71.

Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, Lorda-Sanchez I. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn* 2007 Aug; 27(8): 765-71.

Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* 2007; 41: 169-92.

E

Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci* 2009 Jan; 1151: 157-66.

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.

Engelen JJ, de Die-Smulders CE, Sijstermans JM, Meers LE, Albrechts JC, Hamers AJ. Familial partial trisomy 8p without dysmorphic features and only mild mental retardation. *J Med Genet* 1995 Oct; 32(10): 792-5.

Engelen JJ, Moog U, Evers JL, Dassen H, Albrechts JC, Hamers AJ. Duplication of chromosome region 8p23.1-->p23.3: a benign variant? *Am J Med Genet* 2000 Mar 6; 91(1): 18-21.

Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris A. *Inborn Errors of Development.* New York, NY: Oxford University Press 2004.

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; 143(2): 172-178.

F

Faas BH, Nillesen W, Vermeer S, Weghuis DO, de Leeuw N, Smits AP, van Ravenswaaij-Arts CM. Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *Eur J Med Genet* 2008 Nov-Dec; 51(6): 511-9.

Fassunke J, Majores M, Tresch A, Niehusmann P, Grote A, Schoch S, Becker AJ. Array analysis of epilepsy-associated gangliogliomas reveals expression patterns related to aberrant development of neuronal precursors. *Brain* 2008 Nov; 131(Pt 11): 3034-50.

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.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006 Feb; 7(2): 85-97.

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 9:132-140.

Freudenreich CH. Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences. *Front Biosci* 2007; 12: 4911-24.

Friedman JM. High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2009; 29: 20-28.

Fritz B, Aslan M, Kalscheuer V, Ramsing M, Saar K, Fuchs B, Rehder H. Low incidence of UPD in spontaneous abortions beyond the 5th gestational week. *Eur J Hum Genet* 2001 Dec; 9(12): 910-6.

Frohling S, Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 2008 Aug; 359 (7): 722-34.

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, Rigola MA, Egozcue J. Human supernumeraries: are they B chromosomes? *Cytogenet Genome Res* 2004; 106(2-4):165-172. Review.

G

Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling, Oxford University Press, New York, Oxford, 1996.

Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling, Oxford University Press, New York, Oxford, 2004.

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.

Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Vestergaard Larsen G, Kjaergaard S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis-experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn* 2008 Dec; 28(12):1119-25.

Giardino D, Valtorta E, De Canal G, Corti C, Valtorta C, Finelli P, Varde C, Iandolo M, Marchese C, Larizza L. Prenatal diagnosis of a small chromosome 2-derived supernumerary marker, and review of the reported cases. *Am J Med Genet A* 2007 Sep 15; 143A(18): 2200-3.

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): 2768-75.

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.

Glover TW, Stein CK. Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites, *Am. J. Hum. Genet.* 41 (1987) 882–890.

Glover TW, Stein CK. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *Am J Hum Genet* 1988 Sep; 43(3): 265-73.

Glover TW. Instability at chromosomal fragile sites, *Recent Results Cancer Res* 1998 154; 185–199 Review.

Glover TW. Common fragile sites. *Cancer Lett* 2006 Jan; 232(1): 4-12.

Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nature Neurosci* 2004; 7: 364-372.

Guzauskas GF, Ukadike K, Rimsky L, Srivastava AK. tSNP-based identification of allelic loss of gene expression in a patient with a balanced chromosomal rearrangement. *Genomics* 2007;89:562–5.

H

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).

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.

Harada N, Takano J, Kondoh T, et al. Duplication of 8p23.2: a benign cytogenetic variant? *Am J Med Genet* 2002; 111: 285–288.

Heintz N. BAC to the future: the use of BAC transgenic mice for neuroscience research. *Nature Reviews* 2001; 2: 861-870.

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.

Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP. A mutation in a novel ATP-dependent L on protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* 2004;63:1927–31.

Hirsch B. Sister chromatid exchanges are preferentially induced at expressed and nonexpressed common fragile sites. *Hum Genet* 1991 Jul; 87(3): 302-6.

Hoffman JD, Zhang Y, Greshock J, Ciprero KL, Emanuel BS, Zackai EH, Weber BL, Ming JE. Array based CGH and FISH fail to confirm duplication of 8p22-p23.1 in association with Kabuki syndrome. *J Med Genet* 2005; 42: 49-53.

Human gene mapping 11. London Conference. Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping. London, UK, August 18-22, 1991. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 58: 1-984.

Hurgoiu V, Suci S. Occurrence of 19p- in an infant with multiple dysmorphic features. *Ann Gene* 1984; 27: 56-57.

I

Iafate 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): 949-51.

Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2002; 3: 199-242.

J

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.

Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Lorentx CP, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenuer R, Anderson MH, Michels VV. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 2003; 5: 28-34.

Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana SP, VekemansM, Turleau C. Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 2001; 60: 212-219.

Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet.* 2001 Oct;109(4): 440-51.

K

Kallen K, Robert E, Mastroiacovo P, Castilla EE, Kallen B. CHARGE association in newborns: a registry-based study. *Teratology* 1999; 60: 334-343.

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; 258(5083): 818-821.

Kasri NN, Nakano-Kobayashi, A, Malinow R, Li B, Van Aelst L. The Rho-linked mental retardation protein oligophrenin-1 controls synapse maturation and plasticity by stabilizing AMPA receptors. *Genes Dev* 2009; 23: 1289-1302.

Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, Bick DP, Sherins R J, Walker SL, Shi Y, Gusella JF, Layman LC. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 511-519.

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; 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* 2001 May 13; 38: 40-744.

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, Gerdes T, Brunebjerg S, Bryndorf T. Investigation of Patients With Mental Retardation and Dysmorphic Features Using Comparative Genomic Hybridization and Subtelomeric Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification. *Am J Med Genet* 2005; 139A: 231-233.

Knegt AC, Li S, Engelen JJM, 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; 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; 354: 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): 250-62.

Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merckx GFM, Knoers NVAM, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CMA, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BBA, Sistermans EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004; 41: 892-899.

Korenberg JR. Human genome anatomy: BACs integrating the genetic and cytogenetic maps for bridging genome and biomedicine. *Genome Res* 1999 9: 994-1001.

Kotaka M, Lau YM, Cheung KK, Lee SM, Li HY, Chan WY, Fung KP, Lee CY, Wayne MM, Tsui SK. Elfin is expressed during early heart development. *J Cell Biochem* 2001; 83(3): 463-72.

Kuniba H, Tsuda M, Nakashima M, Miura S, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Moriuchi H, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Kinoshita A, Yoshiura K, Niikawa N. Lack of C20orf133 and FLRT3 mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan. *J Med Genet* 2008; 45: 479-480.

L

Lapierre JM, Cacheux V, Luton D, Collot N, Oury JF, Aurias A, Tachdjian G. Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. *Prenat Diagn* 2000; 20: 123-31.

Lam ACF, Lam STS, Lai KKS, Tong TMF, Chau TC. High rate of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem* 2006; 39: 196-202.

Lamb A, Lytle C, Aylsworth A, Powell C, Rao K, Hendrickson M, Carey J, Opitz J, Viskochil D, Leonard C, Brothman C, Stephan M, Bartley J, Hackbarth M, McCarthy D, Proffitt J. Low proportion of subtelomeric rearrangements in a population of patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Hum Genet* 1999; 65(Suppl): A169.

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.

Lautrup CK, Kjaergaard S, Brøndum-Nielsen K, Fagerberg C, Hertz JM, Petersen OB, Jørgensen MW, Vogel I. Testing for 22q11 microdeletion in 146 fetuses with nuchal translucency above the 99th percentile and a normal karyotype. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87(11): 1252-5.

Le Bris MJ, Marcorelles P, Audrezet MP, Parent P, Heren P, Le Guern H, Herry A, Morel F, Collet M, Ferec C, De Braekeleer M. Prenatal diagnosis of mosaic tetrasomy 8p. *Am J Med Genet A* 2003 Jul 1; 120A(1): 44-8.

Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 2005; 42: 121–128.

Leclercq S, Maincent K, Baverel F, Tessier DL, Letourneur F, Lebbar A, Dupont J-M. Molecular cytogenetic characterization of the first reported case of inv dup del 20p compatible with a U-type exchange model. *Am J Med Genet Part A* 2009; 149A: 437-445.

Ledbetter DH. Cytogenetic technology-genotype and phenotype. *N Engl J Med.* 2008 Oct; 359(16): 1728-30.

Lee C, Lafrate JA, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Get* 2007 Jul; 39: S48-S54.

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.

Lemke J, Chudoba I, Senger G, Stumm M, Loncarevic IF, Henry C, Zabel B, Claussen U. Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multicolour banding. *Hum Genet* 2001; 108: 478–483.

Lestou VS, Lomax BL, Barrett IJ, Kalousek DK. Screening of human placentas for chromosomal mosaicism using comparative genomic hybridization. *Teratology* 1999; 59: 325–330.

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, 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.

Liehr T, Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med* 2007; 19 (5): 719-731.

Loeffler J, Soelder E, Erdel M, Utermann B, Janecke A, Duba HC, Utermann C. Muellierian aplasia associated with ring chromosome 8p12q12 mosaicism. *Am J Med Genet* 2003; 116A: 290-294.

Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, Kalousek DK. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1516-21.

Lopez-Exposito I, Guillen-Navarro E, Bafalliu JA, Bernabe MC, Escalona A, Fuster C. Duplication 19q13-qter and deletion 19p13-pter arising from an inversion (19)(p13.3q13.3) of maternal origin. *Eur J Med Genet* 2006 Nov-Dec; 49(6): 511-5.

Lorda-Sánchez I, Urioste M, Villa A, Carrascosa MC, Vázquez MS, Martínez A, Martínez- Frías ML. Proximal partial 5p trisomy resulting from a maternal (19;5) insertion. *Am J Med Genet* 1997; 68: 476-480.

Loryn N, Sellner, Graham R. Taylor. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. *Human Mutation* 2004 23:413-419.

Lukusa T, Fryns JP. Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007 Dec; 3-16.

Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 2005 Dec; 1(6): e49.

M

Maas NMC, de Putte TV, Melotte C, Francis A, Schrandt-Strumpel CTRM, Sanlaville D, Genevieve D, Lyonnet S, Dimitrov B, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. The C20orf133 gene is disrupted in a patient with Kabuki syndrome. *J Med Genet* 2007; 44: 562-569.

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.

Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli FD. Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 2001; 38: 151-158.

Mainardi PC, Pastore G, Castronovo C, Godi M, Guala A, Tamiazzo S, Provera S, Pierluigi M, Bricarelli FD. The natural history of Cri du Chat Syndrome. A report from the Italian Register. *Eur J Med Genet* 2006; 49: 363-383.

Manenti E. Two extra inv dup(15) chromosomes and male infertility: second case. *Am J Med Genet* 1992;42,402-403.

Maratou K, Siddique Y, Kessling AM, Davies GE. Novel methodology for the detection of chromosome 21-specific alpha-satellite DNA sequences. *Genomics* 1999 May 1;57(3):429-432.

Margarit E, Soler A, Carrio A, Oliva R, Costa D, Vendrell T, Rosell J, Ballesta F. Molecular, cytogenetic, and clinical characterisation of six XX males including one prenatal diagnosis. *J Med Genet* 1998; 35: 727-730.

Martin-Lucas MA, Perez-Castillo A, Abrisqueta JA. Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes. *Hum Genet* 1986 73,133-136.

McDermid HE, Morrow BE. Genomic Disorders on 22q11. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1077-1088.

McElreavey K, Salas-Cortes L. X-Y translocations and sex differentiation. *Semin Reprod Med.* 2001; 19: 133-9.

Mihçi E, Ozcan M, Berker-Karaüzüm S, Keser I, Taçoy S, Hapsolat S, Lüleci G. Subtelomeric rearrangements of dysmorphic children with idiopathic mental retardation reveal 8 different chromosomal anomalies. *Turk J Pediatr* 2009 Sep-Oct; 51(5): 453-9.

Milunsky JM, Huang XL. Unmasking Kabuki syndrome: chromosome 8p22-8p23.1 duplication revealed by comparative genomic hybridization and BAC-FISH. *Clin Genet* 2003; 64: 509-516.

Minor A, Mohammed F, Farouk A, Hatakeyama C, Johnson K, Chow V, Ma S. Genetic characterization of two 46,XX males without gonadal ambiguities. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 547-552.

Miyake N, Harada N, Shimokawa O, Ohashi H, Kurosawa K, Matsumoto T, Fukushima Y, Nagai T, Shotelersuk V, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. On the reported 8p22-p23.1 duplication in Kabuki make-up syndrome (KMS) and its absence in patients with typical KMS. *Am J Med Genet* 2004; 128A: 170-172.

Molinari F, Rio M, Meskenaite V, et al. Truncating neurotrophin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 2002;298:1779-81.

Molinari F, Romano S, Foulquier F, et al. Oligosaccharyltransferase subunits mutations in non-syndromic mental retardation [abstract 118]. Presented at the annual meeting of The American Society of Human Genetics, 23-27 October 2007, San Diego, California.

Monfort S, Rosello M, Orellana C, Oltra S, Blesa D, Kok K, Ferrer I, Cigudosa JC, Martinez F. Detection of known and novel genomic rearrangements by array based comparative genomic hybridisation: deletion of ZNF533 and duplication of CHARGE syndrome genes. *J Med Genet* 2008 Jul; 45(7): 432-7.

Moreno Garcia M, Fernandez Martinez FJ, et al. Phenotypic consequences of chromosome abnormalities. *An Pediatr (Barc)* 2004 61(3):236-41.

Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, et al. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007;81: 792-8.

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.

N

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.

Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update* 2004 Nov-Dec; 10(6): 541–548.

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 (cenMFISH). *Hum Genet* 2001 Mar; 108(3): 199-204.

Niikawa N, Kuroki Y, Kajii T, Matsuura N, Ishikiriyama S, Tonoki H, Ishikawa N, Yamada Y, Fujita M, Umemoto H, Iwama Y, Kondoh I. Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: a study of 62 patients. *Am J Med Genet* 1988; 31: 565-589.

Nikitina NV, Bushueva OA, Nikolaeva EB, Pavlov GV, Lurie IW. Maternal transmission of a ring chromosome 15. *Genet Couns* 2003;14(2):181-186.

Nowakowska B, Stankiewicz P, Obersztyn E, Ou Z, Li J, Chinault AC, Smyk M, BorgK, Mazurczak T, Cheung SW, Bocian E. Application of Metaphase HR-CGH and Targeted Chromosomal Microarray Analyses to Genomic Characterization of 116 Patients With Mental Retardation and Dysmorphic Features. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2008; 146A: 2361–2369.

O

Ostendorff HP, Tursun B, Cornils K, Schlüter A, Drung A, Güngör C, Bach I. Dynamic expression of lim cofactors in the developing mouse neural tube. *Dev Dyn* 2006 Mar; 235(3):786–91.

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.

Overhauser J, Huang X, Gersh M, Wilson W, McMahon J, Bengtsson U, Rojas K, Meyer M, Wasmuth JJ. Molecular and phenotypic mapping of the short arm of chromosome 5: sublocalization of the critical region for the cri-du-chat syndrome. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 247-252.

P

Pagon RA, Graham JM Jr, Zonana J, Young SL. Coloboma, congenital heart disease, and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association. *J Pediatr* 1981; 99: 223-227.

Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Aminoso 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.

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.

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):60-5.

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.

Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998 Oct; 20(29): 207-11.

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): 215-23.

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.

Q

Quiapo G, Zenteno JC, Pena R, Nieto K, Radillo A, Dorantes LM, Erana L, Lieberman E, Soderlund D, Jimenez AL, Ramon G, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. *Hum Genet.* 2002; 111: 278–83.

R

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): 341-6.

Raoul CM Hennekam. Rubinstein–Taybi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006 Jul 26; 14: 981-985.

Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex. *Hum Genet* 1993; 92: 315–24.

Rassool FV, McKeithan TW, Neilly ME, van Melle E, Espinosa RD, Le Beau MM. Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: an approach to cloning fragile sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991; 88:6657–6661.

Redaelli S, Sala E, Roncaglia N, Colombo C, Crosti F, Villa N, Tagliabue P, Cappellini A, Dalpra L. Severe intrauterine growth restriction and trisomy 15 confined placental mosaicism: a case report and review of literature. *Prenat Diagn* 2005 Feb; 25(2): 140-7.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol LI, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006 Nov; 444(7118): 444–454.

Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I. Nonsyndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol* 2005;204:8–20.

Riccardi VM. Trisomy 8: An international study of 70 patients. *Birth defects Orig Artic Ser* 1977; 13(3C): 171–184.

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): 353-61.

Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 2001; 109: 286–294.

Rigola MA, Carrera M, Ribas I, Egozcue J, Miró R, Fuster C. A comparative genomic hybridization study in a 46,XX male. *Fertil Steril* 2002 Jul; 78(1): 186-8.

Roberts E, Jackson AP, Carradice AC, Deeble VJ, Mannan J, Rashid Y, Jafri H, McHale DP, Markham AF, Lench NJ, Woods CG. The second locus for autosomal recessive primary microcephaly (MCPH2) maps to chromosome 19q13.1-13.2. *Eur J Hum Genet* 1999 Oct-Nov; 7(7): 815-20.

Roberts SE, Maggouta F, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. Molecular and fluorescence in situ hybridization characterization of the breakpoints in 46 large supernumerary marker 15 chromosomes reveals an unexpected level of complexity. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1061-1072.

Robinson WP, Kuchinka BD, Bernasconi F. Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15: dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1011– 1021.

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.

Rombout S, Sartenaer D, Parmentier B, Dugauquier C, Gillerot Y. A rare case of de novo distal 19q trisomy prenatally diagnosed. *Prenat Diagn* 2004; 24: 822–827.

Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, van den Ende J, van Bever Y, Kooy RF. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 2004; 23: 17-21.

Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, van den Ende J, Biervliet M, Eyskens F, van Goethem G, Laridon A, Ceulemans B, Courtens W, Kooy RF. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet* 2006; 69(1): 58-64.

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.

S

Sahoo T, Cheung SW, Ward P, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med* 2006; 8: 719–727.

Santos M. Aplicació de la citogenètica molecular a la genètica mèdica: malformacions congènites i infertilitat. Tesi doctoral, 2007.

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.

Savage JR. Assignment of aberration breakpoints in banded chromosomes. *Nature*. 1977 Dec 8;270(5637):513-4.

Schinzl A. Catalog of unbalanced chromosome aberrations in man. Berlin: Walter de Gruyter and Co. 1983; 1–7.

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.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004 Jul; 305 (5683): 525-8.

Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 1999; 21: 138-141.

Shaffer LG, Bui TH. Molecular Cytogenetic and Rapid Aneuploidy Detection Methods in Prenatal Diagnosis. *Am J Med Genet* 2007; 145C: 87–98.

Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007b 145C: 335–345.

Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, Torchia BA, Theisen A, Ballif BC, Bejjani BA. Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn* 2008; 28: 789–795.

Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005 Jul; 77(1): 78-88.

Sharp A, Kusz K, Jaruzelska J, Tapper W, Szarras-Czapnik M, Wolski J, Jacobs P. Variability of sexual phenotype in 46,XX (SRY) patients: the influence of spreading X inactivation versus position effects. *J Med Genet.* 2005; 42: 420–7.

Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington, MW, Sutherland GR, Turner G, Watson M. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 69: 289–299.

Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay. *Neurology* 2003; 60:367–380.

Shimokawa O, Harada N, Miyake N, Satoh K, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N. Array Comparative Genomic Hybridization Analysis in First-Trimester Spontaneous Abortions With 'Normal' Karyotypes. *Am J Med Genet* 2006; 140A: 1931–1935.

Shizuya H and Kouros-Mehr H (2001). The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J Med* 50(1): 26-30.

Sklower Brooks S, Genovese M, Gu H, Duncan CJ, Shanske A, Jenkins EC. Normal adaptive function with learning disability in duplication 8p including band p22. *Am J Med Genet* 1998; 78: 114–117.

Spiegel M, Hickmann G, Senger G, Kozlowski P, Bartsch O. Two new cases of analphoid marker chromosomes. *Am J Med Genet A* 2003 Jan 30; 116A(3): 284-9.

Spranger J, Benirschke JG, Hall W et al. Errors of morphogenesis: concepts and terms. Recommendations of an International Working Group. *J Paediatr* 1982; 100: 100–165.

Stamberg J, Thomas GH. Unusual supernumerary chromosomes: types encountered in a referred population, and high incidence of associated maternal chromosome abnormalities. *Hum Genet* 1986 Feb; 72(2): 140-4.

Stankiewicz P and Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Current Opinion in Genetics & Development* 2007; 17:182–192.

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.

Stegmann APA, Jonker LMH, Engelen JJM. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet* 2008; 51: 91-105.

Storbeck CJ, Wagner S, O'Reilly P, McKay M, Parks R, Westphal H, Sabourin LA. The Idb1 and Idb2 transcriptional co-factors interact with the ste20-like kinase slk and regulate cell migration. *Mol Biol Cell* 2009 Aug.

Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 3rd edition. Garland Science, London and New York. 2004.

Superti-Furga A, Unger S, the Nosology Group of the International Skeletal Dysplasia Society. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A:1-18.

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, Richards RI. Fragile sites-cytogenetic similarity with molecular diversity. *Am J Hum Genet*. 1999 Feb;64(2):354-359.

Swansbury J. Introduction to the analysis of the human G-banded karyotype. *Methods Mol Biol.* 2003;220:259-269.

T

Tabet AC, Aboura A, Dauge MC, Audibert F, Coulomb A, Batallan A, Couturier-Turpin MH, Feldmann G, Tachdjian G. Cytogenetic analysis of trophoblasts by comparative genomic hybridization in embryo-fetal development anomalies. *Prenat Diagn* 2001; 21: 613–618.

Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, Schuetz JD, Swoboda KJ, Ptacek LJ, Rosier M, Dean M, Allikmets R. Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* 2001 Jul 25; 273(1): 89-96.

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.

Tapia-Páez I, O'Brien KP, Kost-Alimova M, Sahlén S, Kedra D, Bruder CEG, Andersson B, Roe BA, Hu P, Imreh S, Blennow E, Dumanski JP. Fine mapping of the constitutional translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 2000; 106 : 506–516.

Tijo H, Levan A. The chromosomes of man. *Hereditas* 1956; 42: 1-6.

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.

U

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.

Umemori H, Linhoff MW, Ornitz DM, Sanes JR. FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell* 2004; 118: 257-270.

Uyanik G, Elcioglu N, Penzien J, Gross C, Yilmaz Y, Olmez A, Demir E, Wahl D, Scheglmann K, Winner B, Bogdahn U, Topaloglu H, Hehr U, Winkler J. Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology* 2006 Apr 11; 66(7): 1044-8.

V

Valetto A, Bertini V, Rapalini E, Baldinotti F, Di Martino D, Simi P. Molecular and cytogenetic characterization of a structural rearrangement of the Y chromosome in an azoospermic man. *Fertil Steril* 2004 May; 81(5): 1388-90.

Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang S, Simovich MJ, Ward PA, Darilek S, Johnson A, Neill SA, Bi W, White LD, Eng CM, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn* 2009; 29: 29-39.

Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet* 2005 Jan; 67(1): 47-52.

Velagaleti GV, Jalal SM, Kukolich MK, Lockhart LH, Tonk VS. De novo supernumerary ring chromosome 7: first report of a non-mosaic patient and review of the literature. *Clin Genet* 2002 Mar; 61(3): 202-6.

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.

Vera-Carbonell A, Bafalliu JA, Guillen-Navarro E, Escalona A, Ballesta-Martinez MJ, Fuster C, Fernandez A, Lopez-Exposito I. Characterization of a de novo complex chromosomal rearrangement in a patient with cri-du-chat and trisomy 5p syndromes. *Am J Med Genet A* 2009 Nov; 149A(11): 2513-21.

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.

Villa A, Rodríguez Martínez L. Portadores de alteraciones cromosómicas balanceadas con fenotipo anómalo. Boletín del ECEMC: Revista de dismorfología y epidemiología 1998;IV:21-7.

Vissers LELM; van Ravenswaaij CMA, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BBA, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EHLP, de Jong PJ, Hamel BCJ, Schoenmakers EFPM, Brunner HG, Veltman JA, Geurts van Kessel A. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. Nature Genet 2004; 36: 955-957.

Voullaire L, Saffery R, Earle E, et al. Mosaic inv dup(8p) marker chromosome with stable neocentromere suggests neocentromerization is a post-zygotic event. Am J Med Genet 2001; 102: 86–94.

Vulcani-Freitas TM, Gil-da-Silva-Lopes VL, Varella-Garcia M, Maciel-Guerra AT. Infertility and marker chromosomes: application of molecular cytogenetic techniques in a case of inv dup(15). J Appl Genet 2006; 47(1): 89-91.

W

Wang YH, Gellibolian R, Shimizu M, Wells RD, Griffith J. Long CCG triplet repeat blocks exclude nucleosomes: a possible mechanism for the nature of fragile sites in chromosomes. J Mol Biol 1996 Nov; 263(4): 511-6.

Wang CY, Yang F, He XP, Je HS, Zhou JZ, Eckermann K, Kawamura D, Feng L, Shen L, Lu B. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. J Biol Chem 2002; 277: 10614-10625.

Wang JC, Coe BP, Lomax B, MacLeod PM, Parslow MI, Schein JE, Lam WL, Eydoux P. Inverted duplication with terminal deletion of 5p and no cat-like cry. Am J Med Genet Part A 2008; 146A: 1173-1179.

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 D. Comparative Genomic Hybridization: FISH and Chips in our Future? Teratology 1999; 59: 321–322.

BIBLIOGRAFIA

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.

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.

Winter RM. Dubowitz syndrome. *J Med Genet* 1986 Feb; 23(1); 11-3.

Woods CG, Bond J, Enard W. Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): A Review of Clinical, Molecular, and Evolutionary Findings. *Am. J. Hum. Genet.* 76:717–728, 2005.

Wu Y, Yin G, Fu K, Wu D, Zhai Q, Du H, Huang Z, Niu Y. Gene diagnosis for nine Chinese patients with DMD/BMD by multiplex ligation-dependent probe amplification and prenatal diagnosis for one of them. *J Clin Lab Anal* 2009; 23(6): 380-6.

Z

Zahir F, Friedman JM. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clin Genet* 2007 Oct; 72(4): 271-87.