

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Genética**



**EFICACIA DE LOS ARRAYS DE CGH EN EL DIAGNÓSTICO  
DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL Y DE LOS  
TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Aránzazu Díaz de Bustamante**

Bajo la dirección del doctor

Juan Cruz Cigudosa

**Madrid, 2013**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética



**EFICACIA DE LOS ARRAYS DE CGH en el diagnóstico de la DISCAPACIDAD INTELECTUAL y de los TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA.**

Memoria para optar al Grado de Doctor

Presentada por **Aranzazu Díaz de Bustamante**

Bajo la Dirección de Dr. Juan Cruz Cigudosa

Madrid, junio de 2012



**EFICACIA DE LOS ARRAYS DE CGH en el diagnóstico de la DISCAPACIDAD INTELECTUAL y de los TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA.**

**Aranzazu Díaz de Bustamante Zulueta**

TESIS DOCTORAL  
Madrid. Junio 2012



***A mi familia***



# Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Director de esta Tesis, Juan Cruz Cigudosa, por haberme iniciado en el camino de los arrays, por trasmitirme su entusiasmo por el trabajo y por su permanente disposición.

A M<sup>a</sup> Jesús Puertas, Catedrática de Genética, por sus consejos, por recordarme con insistencia que tan importante es la forma como el fondo, por sus rápidas respuestas, por su paciencia.

A los excelentes profesionales de genética de NIMGenetics y del INGEMM por su valiosa aportación en los estudios de los CGH arrays.

A José Valencia, del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Móstoles por su ayuda en el tratamiento estadístico.

A todos los neuropediatras del Hospital Universitario de Móstoles, sin los que este trabajo no tendría casos.

A mis compañeras de la Unidad de Genética del Hospital Universitario de Móstoles, especialmente a Mayte Darnaude por su apoyo durante tantos años.

A mis anteriores compañeros de trabajo y genetistas, quienes me han enriquecido y me han aportado experiencia.

A mi familia por estar siempre ahí. A mis amigos.

Y sobre todo a los pacientes y a sus familias por su confianza, por su paciencia, por su agradecimiento.





# **INDICE**

<b>1- Introducción</b>	<b>1</b>
1.1- Discapacidad Intelectual y trastornos del espectro autista: definición, prevalencia y etiología	4
1.2- Consejo Genético	10
1.3- Métodos de detección de anomalías cromosómicas: cariotipo, FISH, CGH y MLPA	13
1.4- Arrays de CGH	21
1.5- Cambios de número de copias: CNVs	38
1.6- Duplicaciones segmentarias	45
1.7- Arrays de CGH: panorámica actual	52
1.8- Eficacia, eficiencia y coste-efectividad	55
<b>2- Justificación del estudio</b>	<b>59</b>
<b>3- Objetivos</b>	<b>63</b>
<b>4- Materiales y Métodos</b>	<b>67</b>
4.1- Sujetos de estudio	69
4.2- Aspectos ético–legales	70
4.3- Estudios de citogenética convencional	70
4.4- Estudios de FISH	71
4.5- Estudios de Arrays	72
4.6- Aspectos metodológicos	73
4.7- Análisis estadístico	75
<b>5- Resultados</b>	<b>77</b>
5.1- Casos con CNVs patológicas	79
5.2- Casos con CNVs de significado incierto	96
5.3- Casos con CNVs benignas	108
5.4- Rendimiento diagnóstico del CGH array	112

5.5- Rendimiento diagnóstico del cariotipo	113
5.6- Estudio de las características genéticas y genómicas de las CNVs identificadas	114
5.7- Estudio comparativo del rendimiento según la plataforma genómica	123
5.8- Estudio de variables clínicas	124
5.9- Coste-efectividad	128
<b>6- Discusión</b>	<b>133</b>
6.1- CNVs descritas en nuestra población	136
6.2- Comparación en términos de rendimiento diagnóstico	137
6.3- Características genéticas y genómicas de las CNVs	148
6.4- Utilidad clínica y consejo genético	151
6.5- Coste-efectividad	165
<b>7- Conclusiones</b>	<b>169</b>
<b>8- Bibliografía y bases de datos on-line</b>	<b>173</b>
<b>9- Tablas, gráficos y figuras.</b>	<b>193</b>

# **1- INTRODUCCIÓN**



## **1.-INTRODUCCIÓN**

La información genética en la discapacidad intelectual es valiosa porque puede establecer una explicación causal. Esta información evita consultas adicionales y muchos tipos de análisis genéticos; permite el acceso temprano a servicios comunitarios que pueden mejorar el trastorno cognitivo o de comportamiento; aporta estimaciones de riesgos de recurrencia para toma de decisiones reproductivas y permite entender el pronóstico y necesidades futuras.

La discapacidad intelectual es un trastorno que se ve con frecuencia en las unidades de genética. El paciente, y sobre todo su familia, vienen demandando estudios genéticos que puedan explicar su causa aunque, por el momento, sólo se puede encontrar un diagnóstico etiológico en la mitad de los casos.

Desde el punto de vista genético, el cariotipo es la técnica que de manera global más casos ha resuelto en este campo, y por eso ha sido considerado la prueba de referencia, el *gold standard*, durante más de 30 años.

En los últimos años las herramientas de análisis genético han sufrido una revolución técnica de enorme calado. Han aparecido sistemas de análisis genómico masivo que permiten analizar en un solo experimento el estado de miles de genes de forma simultánea. Estos sistemas, denominados genéricamente como matrices, *arrays*, *microarrays* o *biochips*, están cambiando nuestra forma de plantear problemas y extraer conclusiones de los experimentos y análisis, ya que nos ofrecen una foto compleja del conjunto del genoma.

En concreto, la tecnología de array de CGH (siglas aceptadas en la comunidad de investigadores que provienen del término inglés *Comparative Genomic Hybridization*) ha supuesto una revolución para los laboratorios de citogenética, para los neuropediatras y para las familias pues brinda la posibilidad de diagnosticar entre un 12-15% de casos, hasta ahora considerados de etiología desconocida.

## **1.1- DISCAPACIDAD INTELECTUAL Y TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA: Definición, prevalencia y etiología**

### 1.1.1. RETRASO MENTAL y RETRASO DEL DESARROLLO

Discapacidad intelectual (DI), según la definición aportada por la Asociación Americana de Discapacidad Intelectual (AAIDD) en 2010 (Schalock RL et al), es una discapacidad caracterizada por limitaciones significativas en el funcionamiento intelectual y en la conducta adaptativa, manifestándose en habilidades prácticas, sociales y cognitivas, que debe debutar antes de los 18 años. Afecta aproximadamente al 2-3% de la población (Leonard H et al 2002).

Aunque las principales clasificaciones de enfermedades (CIE-10, DSM IV) utilizan todavía el término retraso mental (RM), desde todos los ámbitos y siguiendo la corriente norteamericana, se ha optado por utilizar la nueva denominación de discapacidad intelectual cuyo significado es totalmente equivalente al de retraso mental. No obstante en este trabajo aparecerán indistintamente los dos términos, fundamentalmente porque los datos clínicos recogidos en la consulta clínica del hospital se rigen por las nomenclaturas internacionales de clasificación de enfermedades antes mencionadas.

El término retraso de desarrollo normalmente se utiliza para edades menores de 5 años, y el retraso puede alterar funciones motoras, habilidades cognitivas o de lenguaje. A edades tempranas los retrasos del desarrollo catalogados como leves o moderados pueden ser transitorios y carecer de capacidad de predicción respecto al desarrollo de una posterior discapacidad intelectual.

En general se asume que la discapacidad intelectual puede estar causada por factores endógenos como mutaciones en genes únicos, enfermedades complejas con mutaciones en múltiples genes, trastornos genómicos, fundamentalmente anomalías cromosómicas como deleciones, duplicaciones, inversiones y otros reordenamientos; y también por causas ambientales incluyendo infecciones, exposición a teratógenos en la gestación, intoxicaciones infantiles, malnutrición materna durante la gestación o en la infancia, problemas obstétricos, daño cerebral.

Tanto la OMS como la Asociación Americana de Psiquiatría proponen una clasificación, bastante similar, del retraso mental (RM) en ligero, moderado, grave y profundo en función principalmente del cociente intelectual (CI) (tabla 1).

<b>DSM-IV</b>		<b>CIE-10</b>	
<b>1. RM ligero</b>	CI de 50-55 a 70	<b>1. RM ligero (Código F70)</b>	CI entre 50-69
85% de la población con retraso mental			
<b>2. RM moderado</b>	CI entre 35-40 y 50-55	<b>2. RM moderado (F71)</b>	CI entre 35-49
10% de la población con retraso mental			
<b>3. RM grave</b>	CI de 20-25 a 35-40	<b>3. RM grave (F72)</b>	CI entre 20-34
3-4% de la población con retraso mental			
<b>4. RM profundo</b>	CI por debajo de 20-25	<b>4. RM profundo (F73)</b>	CI inferior a 20
1-2% de la población con retraso mental			

Tabla 1.- Clasificación del retraso mental. Fuente: Asociación Americana de Psiquiatría (APA), 1994, y Organización Mundial de la Salud (OMS).

El retraso mental leve o ligero representa el extremo de una distribución normal y resulta de la interacción de muchos genes y de factores no genéticos. Este es sin duda el grupo más complejo desde el punto de vista etiológico. Las formas graves de retraso se cree que son debidas a accidentes perinatales, como anoxia, o infecciones prenatales, y más frecuentemente debidas a causas genéticas específicas incluidos defectos de genes únicos o anomalías cromosómicas. Cuando el paciente presenta además malformaciones o rasgos dismórficos, es más probable que el origen sea cromosómico.

A pesar de conocer estas causas, en aproximadamente el 50% de los casos con discapacidad intelectual aún se desconoce su etiología (Curry et al, 1997), y dada la mayor incidencia en varones que en mujeres, es probable que tengan un componente genético aunque con gran aportación ambiental. Sin duda, la evaluación conjunta del genetista clínico y de los genetistas de laboratorio juega un papel fundamental en la identificación de las causas de la discapacidad intelectual.

El rendimiento etiológico de niños con retraso mental o del desarrollo es altamente variable (del 10% al 81%) debido a las características poblacionales

del muestreo, a la severidad del retraso en los niños estudiados, a la ampliación de las pruebas diagnósticas y la inclusión de los avances tecnológicos recientes. En general las recomendaciones son que, ante un niño con discapacidad intelectual, un clínico experto debería hacer una evaluación diagnóstica para dirigir el estudio hacia un diagnóstico específico. De esta manera ante la sospecha de un síndrome genético conocido se dirige el estudio a secuenciación de genes concretos, o MLPA de regiones sindrómicas. Sin embargo, y es la situación más frecuente, cuando no hay sospecha diagnóstica, se recomiendan, hasta ahora, técnicas de diagnóstico genético consideradas como la primera opción de diagnóstico como el cariotipo, X frágil y MLPA (siglas del inglés *Multiple Ligation Amplification Probe*) de regiones subteloméricas.

Para el cariotipo hay unas indicaciones precisas que quedan resumidas en la figura 1.

**Tabla 3.** Indicaciones para realizar un cariotipo.

<p><b>1) Periodo Prenatal:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad mayor de 35 años.</li> <li>• Ansiedad materna.</li> <li>• Triple screening alterado.</li> <li>• Oligoamnios-polihidramnios.</li> <li>• Retraso de crecimiento intrauterino (CIR).</li> <li>• Arteria umbilical única.</li> <li>• Sospecha ecográfica de cromosomopatía.</li> <li>• Antecedentes de cromosomopatía balanceada en un progenitor.</li> </ul> <p><b>2) Periodo neonatal:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Malformaciones mayores aisladas.</li> <li>• Presencia de 3 o más defectos congénitos menores.</li> <li>• Recién nacido con rasgos dismórficos.</li> <li>• Recién nacido con genitales ambiguos.</li> <li>• Parto con producto muerto de causa inexplicable.</li> <li>• Muerte neonatal de causa inexplicada.</li> </ul> <p><b>3) Periodo de lactancia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niños con dificultades para el aprendizaje.</li> <li>• Niños con rasgos dismórficos.</li> <li>• Niños con retraso psicomotor.</li> </ul>	<p><b>4) Periodos preescolar-escolar:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Trastornos del crecimiento.</li> <li>• Retraso psicomotor.</li> <li>• Rasgos dismórficos.</li> </ul> <p><b>5) Periodo de adolescencia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ginecomastia.</li> <li>• Falta de desarrollo puberal.</li> <li>• Amenorrea primaria o secundaria.</li> <li>• Retraso mental.</li> <li>• Rasgos dismórficos.</li> </ul> <p><b>6) Periodo del adulto:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Padres de niños con anomalías cromosómicas estructurales.</li> <li>• Abortos de repetición.</li> <li>• Infertilidad inexplicable.</li> <li>• Diagnóstico prenatal (líquido amniótico y biopsia de corion).</li> <li>• Rasgos dismórficos.</li> </ul> <p><b>7) En todas las edades:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesos malignos (cariotipo constitucional y tumoral).</li> <li>• Control de trasplantes de médula ósea.</li> </ul>
---	--

Fig.1.- Indicaciones para realizar un cariotipo. Galán Gómez E. [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/)

Las técnicas citogenéticas que se pueden utilizar para detectar anomalías cromosómicas, ó desequilibrios genómicos, se describirán más adelante, y básicamente son: cariotipo, hibridación in situ fluorescente (frecuentemente

denominada mediante la abreviatura FISH del término inglés *Fluorescence in situ Hybridization*), hibridación genómica comparada, MLPA, array de CGH ó aCGH (abreviatura de array de CGH).

Teniendo en cuenta la revisión que hacen Stankiewicz et al en 2007, la tasa de detección de alteraciones genómicas en niños con múltiples anomalías congénitas y/o retraso mental es del 12 al 18%: 3-5% se detectan con un cariotipo, 5-6% se detectan con FISH subtelo mérico pero no cariotipo, y 4-7% con array de CGH pero no cariotipo ni FISH subtelo mérico. Sin embargo, estos datos de efectividad pueden ser conservadores ya que, en uno de los primeros estudios de arrays, en 2008, Stoeva et al encuentran que de 76 pacientes menores de 18 años con retraso mental y malformaciones y rasgos dismórficos, con cariotipo normal, el FISH detecta un 15,8%, el MLPA un 10,6% y aCGH un 30,4%.

#### 1.1.2. TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA

Por su parte, los trastornos del espectro autista (TEA) afectan al neurodesarrollo y están caracterizados por una alteración en la interacción social acompañada de un retraso o falta de lenguaje, con movimientos y comportamiento estereotipados. Se definen como una disfunción neurológica crónica con fuerte base genética que desde edades tempranas se manifiesta por una serie de síntomas basados en una tríada de trastornos en la interacción social, comunicación y falta de flexibilidad en el razonamiento y comportamientos (López Ibor et al, 2002). Se estima que afecta a 1 de cada 100 o de cada 150 niños.

Los trastornos del espectro autista incluyen: el síndrome de Asperger, el autismo, el trastorno desintegrativo infantil, el trastorno generalizado del desarrollo no especificado y el síndrome de Rett.

En cuanto a la afectación de la capacidad cognitiva, según algunos autores, la discapacidad intelectual entre los niños con TEA es del 29,8% (un 67% entre personas con trastorno autista, un 12% en niños con trastorno del desarrollo no especificados y un 0% en niños con Síndrome de Asperger).

Las alteraciones esenciales de estos trastornos se justifican por múltiples anomalías cerebrales, funcionales y/o estructurales, que no son siempre las mismas, dando lugar a distintos fenotipos con distintos grados de intensidad (Just et al, 2004). La complejidad de manifestaciones clínicas sugiere una multicausalidad, con factores genéticos y ambientales implicados.

Se acepta que el autismo es el trastorno más genético de los síndromes neuropsiquiátricos (Alison Mcinnes, 2002). La tasa de recurrencia en hermanos con autismo es del 2,2% y puede llegar al 8% cuando se incluyen todos los TEA, lo que significa 50-75 veces el riesgo de la población general (Folstein et al, 2001). Las anomalías cromosómicas se encuentran presentes en el 5-9% de personas con autismo. Además, en un 5-8% de las personas con autismo se documentan trastornos monogénicos con características fenotípicas específicas (Grupo de Trabajo de la GPC de pacientes con TEA, 2009): síndrome de Aarskog, Angelman, Apert, Cohen, Cowden, Esclerosis tuberosa, Cornelia de Lange, velocardiofacial, fenilcetonuria, Steinert, distrofia muscular progresiva, Duchenne, Headd, hipomelanosis de Ito, Joubert, Lange, Lesch-Nyhan, Lujan-Fryns, Moebius, neurofibromatosis 1, Noonan, Prader Willi, Rett, Rubinsten Taybi, Smith Lemli Opitz, Smith Magenis, Timothy, Sotos, Williams, X-frágil.

Estudios recientes han confirmado este origen genético de los TEA: Neale et al en 2012 encuentran mutaciones exónicas en pacientes con TEA sugiriendo dos genes candidatos para el autismo, CHD8 y KATNAL2, aunque concluyen que los TEA más bien siguen un modelo poligénico. Y en el mismo sentido O' Roak et al, también en 2012, secuenciando el exoma de pacientes con TEA encuentran mutaciones recurrentes además de en CHD8, en NTNG1, GRIN2B, LAMC3 y SCN1A.

Otros estudios han evidenciado que aquellos niños que han presentado algún proceso perinatal que pudiera haber afectado al sistema nervioso (consumo materno de alcohol, fármacos teratógenos, o infecciones como rubéola, haemophilus influenza, citomegalovirus que cursen con meningitis o encefalitis) podrían desarrollar TEA con mayor probabilidad. También la fenilcetonuria no tratada tras el nacimiento, ataques epilépticos en el primer

año de vida, e incluso la edad paterna o materna avanzadas (Croen et al, 2007) son factores de predisposición a TEA.

Hasta hace poco se conocía la etiología sólo en el 10% de los casos: alteraciones cromosómicas incluyendo anomalías de cromosomas sexuales, duplicación del 15q11q12, alteraciones génicas como síndrome de X frágil, síndrome de Rett, esclerosis tuberosa o trastornos metabólicos. Pero en la gran mayoría (90%) se desconoce la causa. El autismo puede aparecer acompañado de rasgos dismórficos, microcefalia o malformaciones cerebrales (autismo complejo), o aislado (autismo esencial) (Miles et al, 2005).

El aumento de la prevalencia de 4-5/10000 en los años 70, a 60/10000 en la actualidad parece debido a cambios en los criterios diagnósticos y un aumento de la sensibilidad de los profesionales hacia estos trastornos (Fombonne, 2003). Pero también se sugiere que se vigilen las cifras en los próximos años para asegurarnos que realmente no existe aumento de la incidencia del autismo (Fombonne, 2005).

En España los datos de un estudio realizado recientemente han puesto de manifiesto que el proceso diagnóstico puede demorarse varios años y que la edad de diagnóstico puede retrasarse hasta los 11 años (Belinchón et al, 2008).

Las ventajas de la detección precoz de los TEA (Grupo de Trabajo de la GPC de pacientes con TEA, 2009) son:

- previenen o rectifican diagnósticos erróneos
- reduce incertidumbre de los padres
- ayuda a la identificación de opciones de educación
- ayuda en la orientación profesional e identifica servicios que faciliten dicha elección.
- Proporciona acceso a recursos apoyos y servicios
- Posibilita el consejo genético a las familias
- Posibilita soporte ambiental adecuado
- Facilita el contacto con otras personas o familiares con TEA
- Ayuda a identificar necesidades de apoyo familiar
- Ayuda a las personas con TEA a entenderse a si mismas y a otras personas

- Previene problemas futuros de co morbilidad
- Reduce el aislamiento
- Orienta la identificación del fenotipo más amplio de TEA en otros familiares.

Avanzar en la etiología del retraso mental y del trastorno del espectro autista, dos problemas de gran envergadura sanitaria y social, es un reto para cualquier investigador y un beneficio para el paciente, la familia y la sociedad.

Profesionales que trabajan directamente con niños autistas han recomendado como línea prioritaria la ampliación de la investigación de la genética del autismo de cara a un consejo genético más completo (Grupo de Trabajo de la GPC de pacientes con TEA, 2009).

## **1.2- CONSEJO GENETICO**

La Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, define y regula por primera vez en nuestro ordenamiento jurídico el consejo genético. Así, éste queda definido como el "procedimiento destinado a informar a una persona sobre las posibles consecuencias para él o su descendencia de los resultados de un análisis o cribado genéticos y sus ventajas y riesgos y, en su caso, para asesorarla en relación con las posibles alternativas derivadas del análisis. Tiene lugar tanto antes como después de una prueba o de un cribado genético e incluso en ausencia de los mismos".

Las personas que acuden a consejo genético en general son: aquellos que padecen una enfermedad genética; los que tienen un familiar afectado; parejas que quieren planificar embarazo o parejas con embarazo en curso que quieren saber la susceptibilidad a enfermedades de su futuro hijo. El consejo genético tiende, cada vez más, a hacerse con unas evidencias diagnósticas que antes la tecnología no permitía. Un claro diagnóstico es esencial para un adecuado consejo genético.

En el contexto de la discapacidad intelectual las pruebas idóneas para tratar de diagnosticarlo son pruebas metabólicas, cariotipo, FISH, estudio de X frágil y otros análisis genéticos que revelen un síndrome mendeliano

sospechado. En ocasiones hay que repetir pruebas porque la resolución o los medios utilizados hace años no pudieron evidenciar una anomalía (Fig.2).

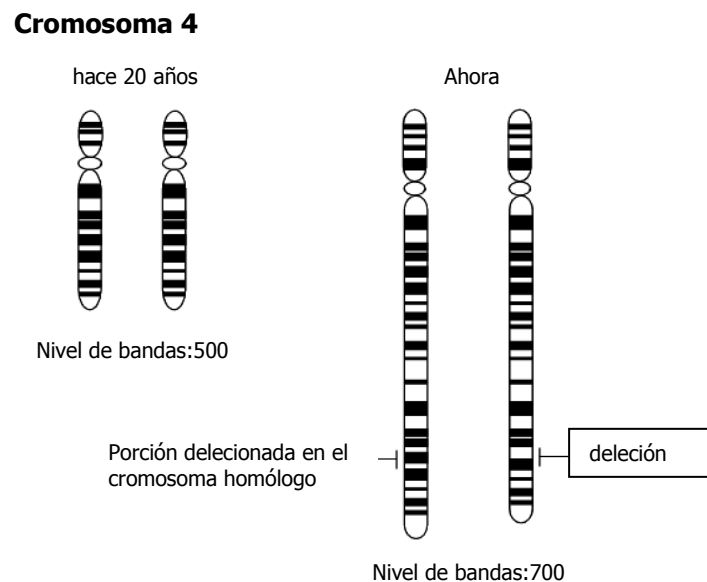


Figura 2.- Delección cromosómica diagnosticada con una resolución de 700 bandas, que no se detectó con resolución de 500 bandas.

Si un determinado análisis genético está disponible y es aplicable en un paciente, éste debe saber porqué se le ofrece y sus implicaciones médicas y psicológicas.

Si el paciente (o padre o tutor) accede al análisis genético después de una clara comunicación, esto constituye el CONSENTIMIENTO INFORMADO.

El consentimiento puede ser oral o escrito (la mayoría de laboratorios requieren un consentimiento escrito). Y debe hacerse antes y después del estudio genético. En este caso hay que dar información acerca de las características del paciente, exploraciones o pruebas complementarias necesarias, revisiones preventivas, fenotipo conductual (patrón característico de anomalías motoras, cognitivas y lingüísticas que se asocian consistentemente con un desorden biológico), posible evolución, programas de salud, riesgos reproductivos, contacto con otros profesionales y con asociaciones de padres,

las causas de la alteración genética, las probabilidades de repetición en la familia y las opciones reproductivas.

Cuando se valora un análisis genético en un paciente con discapacidad intelectual, igual que con cualquier otro trastorno, hay que tener en cuenta, y comentar con la familia diferentes conceptos como la posibilidad de heterogeneidad clínica: diferentes mutaciones pueden causar la misma enfermedad; la penetrancia: el individuo con la alteración genética puede hasta no desarrollar nunca la enfermedad; la expresividad variable: incluso con la misma alteración dos individuos pueden manifestar la enfermedad de diferente manera; y la anticipación: la enfermedad puede ser más severa a medida que pasan generaciones. El aumento significativo en la capacidad de detección en el paciente con retraso mental tiene un impacto importante sobre los cuidados del paciente: el correcto diagnóstico permite derivarle a los especialistas apropiados, posibilita intervenciones terapéuticas para ciertas dificultades de aprendizaje; facilita la búsqueda y detección de otras anomalías; y minimiza el número de procedimientos diagnósticos; disminuye la ansiedad en las familias. Además una de las mayores ventajas aportadas por un diagnóstico genético bien definido permite estimar mejor los riesgos de recurrencia: mientras que el riesgo de recurrencia de una discapacidad intelectual de etiología desconocida es de 3 a 7%, para una microdelección/duplicación de novo detectada por aCGH el riesgo de recurrencia es en general bajo. Un ejemplo ilustrativo de estas ventajas lo constituye la identificación de una translocación críptica desequilibrada en el paciente, que puede señalar la existencia de una translocación equilibrada en uno de los padres, aumentando el riesgo para siguientes embarazos hasta un 25%. Algunos autores, por esto, recomiendan un cariotipo convencional a los padres de niños a los que se les ha hecho array y se ha detectado una alteración en las regiones teloméricas o en una región conocida de microdeleciones, siempre que el tamaño se pueda ver con cariotipo o FISH. El objeto de estos cariotipos a padres es descartar una translocación equilibrada, inversión o inserción que pueda alterar el consejo genético.

### **1.3- METODOS DE DETECCION DE ANOMALIAS CROMOSOMICAS:**

## CARIOTIPO

Desde el descubrimiento por parte de Lejeune en 1959 de que el síndrome de Down estaba producido por una trisomía 21, se han dedicado grandes esfuerzos a relacionar de manera causal anomalías cromosómicas con determinados fenotipos. Las anomalías cromosómicas no sólo son responsables del síndrome de Down, presente en 1 de cada 700 nacimientos, sino también de otros tipos de discapacidad intelectual, dificultades de aprendizaje, malformaciones congénitas, anomalías de crecimiento y abortos: la mayoría de los abortos espontáneos de primer trimestre, el 3,7% de los niños con retraso global del desarrollo, y la mayoría de los procesos oncológicos tienen anomalías cromosómicas.

Todo esto hace que, en los laboratorios de citogenética, se hagan de forma asistencial estudios cromosómicos con bandas G, cariotipos, a pacientes con retraso mental, retraso del desarrollo, defectos congénitos, infertilidad, abortos de repetición y distintos tipos de cánceres.

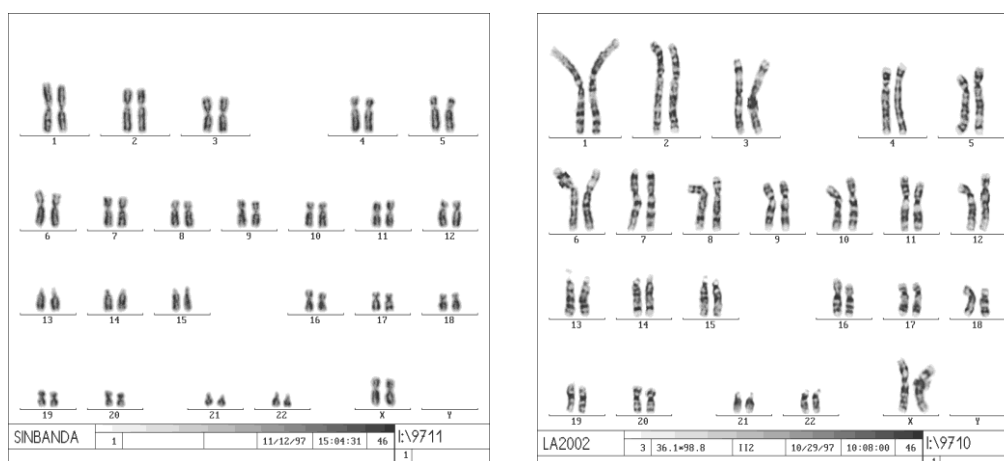


Figura 3.- Cariotipo sin bandas y cariotipo con bandas G.

La identificación de una anomalía cromosómica es importante de cara al manejo clínico del paciente, para anticiparse a potenciales problemas médicos,

y esencial para entender los riesgos de recurrencia para la descendencia y para otros miembros de la familia.

Las aneuploidías, trisomías, monosomías y poliploidías se conocen desde la utilización en los años 70 del cariotipo y el bandeo cromosómico (Fig.3) como técnicas diagnósticas en individuos con retraso y/o malformaciones congénitas. Con estas técnicas se han logrado diagnosticar multitud de pacientes en las unidades de citogenética, pudiendo detectar además, duplicaciones, deleciones, inversiones, translocaciones, etc., con una resolución de bandas por juego haploide de 450 a 850. Las bandas obtenidas con el bandeo G nos muestran el cromosoma con un patrón específico blanco-negro. El análisis de esos patrones de bandas nos permite ver pequeñas alteraciones, pero sólo hasta 3-5Mb. Teniendo en cuenta que los cromosomas varían en tamaño, desde 245 Mb del cromosoma 1, que contiene 2.610 genes, hasta 46 Mb del cromosoma 21 que contiene 337 genes, una deleción de 3Mb puede suponer tanto como el 6.5% de un cromosoma o tan poco como el 1.2% (Mao et al 2005). En los primeros años de la citogenética fueron describiéndose fenotipos asociados a diversas anomalías cromosómicas: síndrome de Patau y trisomía 13, síndrome de Edwards y trisomía 18, síndrome de Turner y monosomía X, etc., para posteriormente describir alteraciones estructurales: deleciones y duplicaciones asociadas a fenotipos ya menos prevalentes. Esto condujo a una revolución en el campo del retraso mental y sus causas, pudiendo ofrecer asesoramiento genético en muchas familias. Se empiezan a intuir los síndromes producidos por microdeleción como el síndrome de Prader Willi (Fig. 4 y 5) o síndrome de Williams, gracias a cariotipos de alta resolución (850 bandas).



Figura 4.- Fenotipo clásico en una niña con síndrome de Prader-Willi.

Figura 5.- Microdeleción 15q11 detectada en cariotipo de alta resolución.

En el contexto de estos primeros estudios cromosómicos, se encontraron variantes normales, entendiendo por ello reordenamientos cromosómicos o diferencias que se observan en la población general sin significado clínico. Estos incluyen inversión pericéntrica del cromosoma 9, variaciones en la tinción de los brazos cortos de acrocéntricos y variaciones en la heterocromatina pericentromérica del 1, 9, 16 e Y. Estos hallazgos produjeron confusión en su interpretación hasta que se asumió que eran polimorfismos cromosómicos sin repercusión fenotípica.

Aparecieron limitaciones en el estudio citogenético convencional, a parte de la resolución, y era la incapacidad de diagnosticar los cromosomas pequeños marcadores, así como para definir reordenamientos cromosómicos complejos. En translocaciones aparentemente equilibradas que aparecen en pacientes con fenotipo patológico, tampoco se puede establecer con seguridad que la alteración no esté influyendo en el fenotipo. De hecho todavía hoy se utilizan las cifras de Warburton del año 1991 con una estimación de riesgo de fenotipo patológico, en portadores aparentemente equilibrados, del 6.1%. Es más, en algunas ocasiones se detectan pacientes con fenotipo patológico portadores de una translocación, aparentemente equilibrada, detectada también en un padre sano, sin poder dar más que unas explicaciones teóricas de mecanismos como una disrupción de un gen en el punto de rotura, efectos de posición, disomía uniparental, que el reordenamiento no sea realmente equilibrado, que en los casos familiares ocurra una segunda alteración en la meiosis o que en el reordenamiento exista un alteración críptica compleja (Patsalis et al, 2004). Tampoco es fácil con citogenética convencional detectar mosaicismos: el número de metafases estudiadas puede ser insuficiente; una sola célula anormal puede interpretarse como anomalía de cultivo; las células aneuploides pueden estar poco representadas en la población de células T circulantes; existe una selección in vivo a favor de las células euploides; las células aneuploides pueden autolisarse durante el manejo o transporte, o pueden no responder a los mitógenos.

## HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

A pesar de las limitaciones del cariotipo, éste sigue utilizándose. Pero, a la vez que la genética molecular aparece en los 90 con el descubrimiento de la tecnología de PCR para el diagnóstico de enfermedades monogénicas, se introduce la tecnología de Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) como ayuda al diagnóstico de síndromes de microdelección. Esta técnica, en la que se hibridan oligonucleótidos fluorescentes con la muestra problema, permite determinar el número y localización de secuencias específicas de ADN tanto en cromosomas metafásicos como en núcleos interfásicos. Se pueden diagnosticar deleciones de síndromes conocidos, translocaciones crípticas conocidas en procesos hematológicos, etc., consiguiendo una resolución de 0,5Mb. Las sondas comercializadas incluyen sondas de secuencia única, de centrómero, de telómero, de cromosoma completo ("painting") (Fig.6). Ejemplos de síndromes asociados a retraso mental, que se pudieron diagnosticar con FISH son: deleción 1p36, Wolf-Hirschorn (4p16), Cri-du-chat (5p15), Williams-Beuren (7q11.23), Smith-Lemli-Opitz (11q12q13), Prader-Willi (15q11q13), Angelman (15q11q13), Rubinstein-Taybi (16p13.3), Smith-Magenis (17p11.2), Miller-Dieker (17p), DiGeorge (22q11.2).

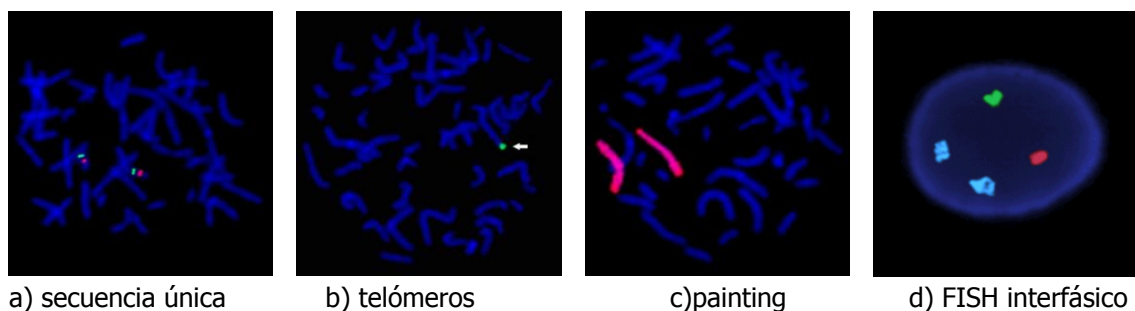


Figura 6.- FISH en metafases con distintos tipos de sondas (a-c). FISH en núcleo interfásico con sondas de centrómero (alfa satélite) de tres cromosomas distintos (d).

Se consiguen con esta técnica tasas de detección del 10%. Surge de nuevo otra revolución en el diagnóstico genético. Sin embargo vuelve a aparecer una limitación, y es que el FISH no permite visualizar el genoma

entero sino sólo aquellas partes para las que se disponga de sondas predeterminadas. Es, por tanto, un análisis dirigido. Es sobre todo en la aplicación de esta técnica donde la genética clínica y la citogenética deben ir de la mano, sospechando primero el clínico para confirmarlo en el laboratorio.

Otras técnicas útiles que se han usado para la identificación de material cromosómico desconocido han sido el cariotipo espectral (SKY) y el FISH multicolor (m-FISH).

## **HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (CGH)**

En este contexto de grandes avances aparece la tecnología denominada Hibridación Genómica Comparada (habitualmente abreviada CGH del inglés *Comparative Genomic Hybridization*), que también está basada en el FISH, para detectar estos cambios. Inicialmente fue descrita por Kallioniemi A et al en 1992 para el análisis citogenético-molecular en tumores sólidos. Con esta técnica, en los mejores casos se conseguían resoluciones de 3Mb, pero en general la resolución es de 5-10Mb. La técnica es apropiada cuando en el cariotipo tenemos material extra no identificado o translocaciones complejas.

En un estudio de pacientes con problemas de aprendizaje y rasgos dismórficos, el 10% tenían duplicaciones y/o deleciones detectadas con CGH y no con el cariotipo (Kirschhoff M et al, 2001).

En la CGH se extrae el ADN de un individuo control con cariotipo normal y del individuo que se quiere analizar. Los dos ADN se marcan con dos fluorocromos diferentes y se aplican a cromosomas metafásicos. Las diferencias entre las intensidades de los fluorocromos nos van a revelar ganancias o pérdidas de material genómico. Los análisis con CGH han sido muy útiles en el estudio de tumores (Fig.7).

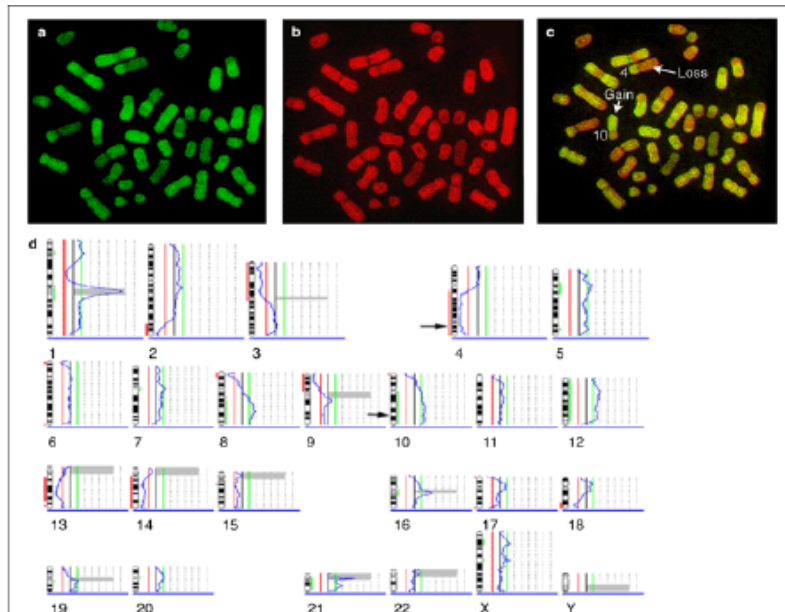


Figura 7.-Hibridación Genómica Comparada (CGH) en carcinoma de células renales. De: "Expert Reviews in Molecular Medicine. 2000. Cambridge University Press".

En el año 1995 y posteriores se describen reordenamientos cromosómicos en regiones subtelo méricas, no visibles con la citogenética convencional, y que son causa de retraso mental con o sin anomalías congénitas. Las regiones subtelo méricas, como las definen Riethman et al en 2005, son los últimos 500kb de cada brazo de cromosoma eucariótico. Los telómeros humanos se caracterizan por tener unidades repetidas de TTAGGG hasta varios miles de veces. Las zonas adyacentes subtelo méricas tienden a tener secuencias adicionales repetidas de ADN y una alta densidad de genes que codifican proteínas. Esas regiones de ADN repetidas son susceptibles de reordenamientos que pueden estar asociados a enfermedades incluido el retraso mental y anomalías fenotípicas. El bandeado G, que se utiliza normalmente en los estudios citogenéticos convencionales, no permite ver bien los finales de los cromosomas, es decir las zonas teloméricas, por ser regiones blancas, G-negativas, por lo que no se pueden detectar estos reordenamientos. El FISH con sondas subtelo méricas se utiliza para estos diagnósticos, registrándose una detección del 6% (Flint et al 1995, De Vries et al 2003).

Estudios posteriores con series más largas de casos no seleccionados (11.688 pacientes) dan unas cifras de detección de 3%, considerando patogénicas sólo el 2,6% (Ravnan et al, 2006).

### **MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)**

En el año 2002 se describe por primera vez una nueva metodología llamada MLPA, que registra la compañía MRC Holland, y que detecta deleciones y duplicaciones en varias enfermedades. Pero sobre todo resulta útil en la detección de reordenamientos subteloméricos en el retraso mental (Koolen et al, 2004; Palomares et al, 2006; Rooms et al 2004), con tasas de detección de alrededor del 5%.

El MLPA es un método que permite llevar a cabo reacciones de PCR multiplex en una muestra de ácidos nucleicos. Con este método pueden detectarse y cuantificarse hasta 45 secuencias específicas, que hibridarán en diferentes puntos de la región de interés, se ligarán 2 a 2 y posteriormente se amplificarán utilizando el mismo par de cebadores (Fig. 8). Mediante el análisis de fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño se podrán identificar pérdidas o ganancias de material genético atendiendo a la normalización de las áreas de cada pico con respecto a un control sano. Esta técnica se ha introducido en muchos laboratorios dado que es una técnica sencilla de manejar y que permite el procesamiento de gran número de casos simultáneamente. Es importante señalar que, al tratarse de una técnica de cuantificación de dosis génica, el MLPA no permite la detección de translocaciones en equilibrio.

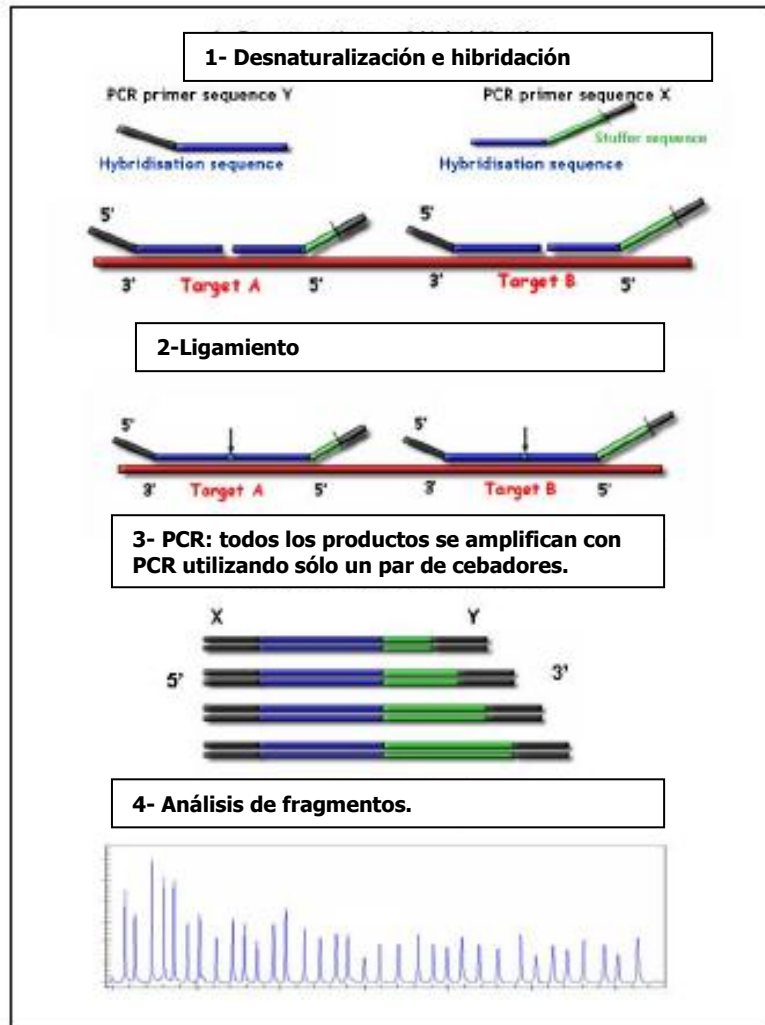


Figura 8.- Procedimiento del MLPA: desnaturalización, hibridación, ligamiento, PCR multiplex y análisis de fragmentos. De: [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)

## 1.4- ARRAYS de CGH

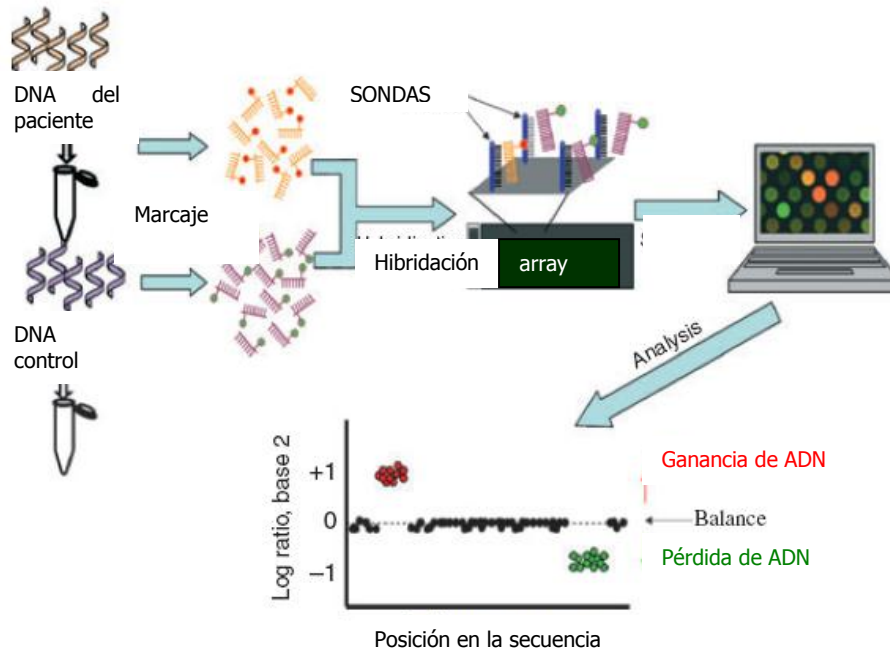


Figura 9.- Procedimiento del array de CGH

La tecnología de aCGH permite buscar alteraciones en el número de copias de ADN a través de cientos o miles de localizaciones genómicas puntuales (Fig. 9): los fragmentos de ADN se encuentran inmovilizados en un soporte (matriz o array) sobre el que se hibridan el ADN del paciente y el de referencia marcados diferencialmente. En condiciones normales, los dos ADN compiten para hibridar sobre las sondas del array de modo que si el paciente no presenta ganancias ni pérdidas de material genético, ambos ADN hibridan por igual y se observa un color amarillo correspondiente a la suma de ambos fluorocromos. Las variaciones en la intensidad de los patrones de hibridación de los ADN en estas sondas se interpretan como diferencias en el número de copias entre el genoma del paciente y el de referencia.

Desde su desarrollo al final de los 90, los arrays basados en hibridación genómica comparada (aCGH) se han utilizado para analizar cambios de número de copias (abreviadas generalmente como CNVs, del inglés *Copy Number Variations*) a lo largo del genoma, con una resolución sin precedentes, proporcionando aproximadamente un 10% más de detección de anomalías causantes de patologías, al 10% ya detectado con cariotipo más FISH. Es una

técnica rápida, de gran cobertura (puede cubrir todo el genoma) y de alta resolución que detecta en definitiva desequilibrios genómicos.

Los primeros microarrays desarrollados fueron de expresión: nos dan información de miles de transcritos de ARN en una muestra. La expresión génica está regulada por el tipo de tejido, por el estado de desarrollo, el estado fisiológico y el estado de enfermedad. Dada esta naturaleza tan dinámica en la expresión de genes y la dificultad de disponer de muestras de cerebro, este tipo de arrays no ha sido muy utilizado en el contexto del retraso mental.

Los microarrays genómicos, en cambio, nos permiten ver cambios físicos cromosómicos, cambios en el número de copias, que se presupone son una causa principal del retraso mental. Se espera que la descripción del defecto molecular en diferentes casos de retraso mental nos lleve a una mejor clasificación, diagnóstico y en último término a estrategias de intervención terapéutica (Mao et al 2005). Actualmente se conocen más de 100 síndromes genéticos causados por una mutación que consiste en una pérdida (deleción) (Fig. 10) o ganancia (duplicación) de regiones concretas y conocidas en el genoma. Especialmente importante es el hecho de que el array de CGH permite diagnosticar duplicaciones pequeñas que con otros métodos pasaban desapercibidas.

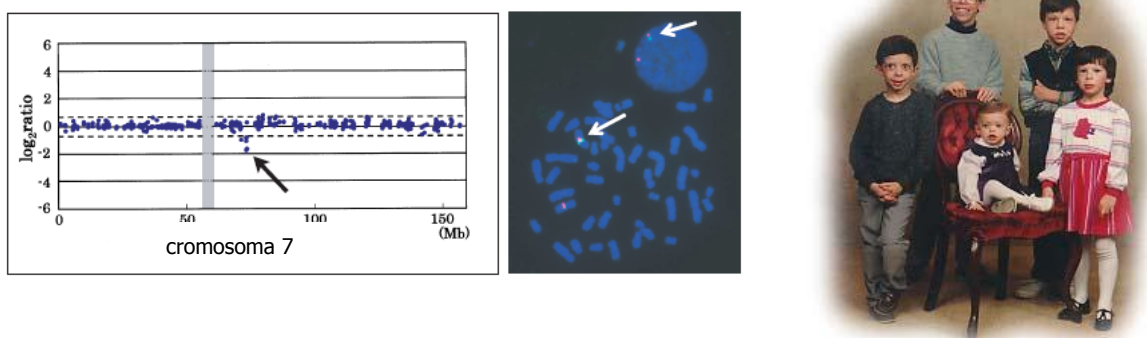


Figura 10.- Deleción 7q11 detectada con aCGH y con FISH, responsable del síndrome de Williams. Fenotipo de varios niños con síndrome de Williams.

Desde el punto de vista de la tecnología, la primera descripción la hicieron Solinas-Toledo et al en 1997 llamándolo CGH basado en matriz, y Pinkel et al en 1998 llamándolo array de CGH.

Es una metodología esencialmente basada en la CGH (hibridación genómica comparada), un método bien establecido. Se extrae ADN genómico del paciente a partir de linfocitos de sangre periférica, fibroblastos de piel o cualquier otro tejido, y se marca con un fluoróforo, normalmente Cyanina 3 en los dinucleótidos de Citosina (dCTPs). El ADN marcado del paciente junto con una cantidad igual de ADN control marcado con otro fluoróforo, normalmente Cy5 en dCTPs, se hibridan simultáneamente en un soporte miniaturizado de plástico, cristal, membrana, etc., con fragmentos genómicos clonados en posiciones conocidas (Fig. 11). Las intensidades de los puntos se miden a 532nm (Cy3) y a 635nm (Cy5). Si las intensidades fluorescentes Cy3 y Cy5 son iguales, la región se interpreta como normal/equilibrada. Si hay un aumento de Cy3 sobre Cy5 por encima de un umbral, se considera duplicación, y si es a la inversa, se considera una delección. Una vez cuantificado el ratio de intensidades de fluorescencia un software especialmente adaptado normaliza los datos con algoritmos de regresión lineal (en escala logaritmo en base 2) y los identifica en el mapa genómico según la localización cromosómica de los fragmentos incluidos en el diseño del array. Todo este desarrollo de arrays genómicos se han podido desarrollar gracias a los datos aportados por el proyecto genoma humano.

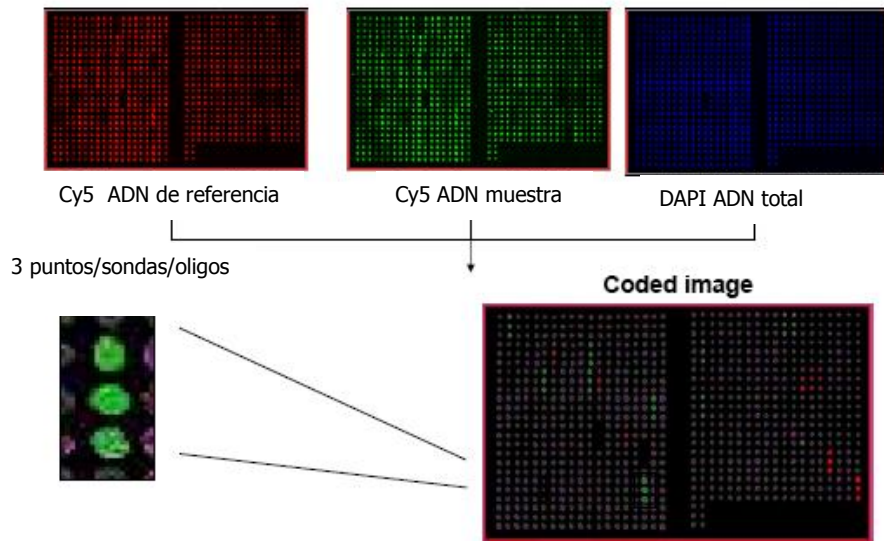


Figura 11.- Principio del aCGH. De: AP112. "Basic Principles of CGH arrays. 2008. College of American Pathologists.

Los clones de fragmentos genómicos que se colocan o imprimen en el soporte físico (habitualmente un cristal) , es decir las sondas, pueden estar en forma de cromosomas artificiales bacterianos (denominados en la literatura como BACs del inglés *Bacterial Artificial Chromosome*) de una longitud de entre 75-200 Kilobases (Kb), cósmidos (30-40kb), fósmidos (40-50kb) u oligonucleótidos (25-85 bases).

Los arrays genómicos se utilizaron inicialmente en tumores para conocer variaciones en número de copia ayudando (como los arrays de expresión) a establecer diferencias en la biología y el pronóstico de los tumores así como su respuesta al tratamiento. El análisis de una alteración nos indica no sólo qué región del genoma está alterada sino también los genes que están implicados en dicha aberración. Otro campo en el que se utilizan los arrays es para la comparación entre especies. Estudios posteriores han utilizado esta tecnología para detectar deleciones o duplicaciones exónicas en enfermedades mendelianas como la fibrosis quística, las sarcoglicanopatías y la distrofia muscular de Duchenne (Saillour et al, 2008).

En 2002 aparece la primera publicación, de Veltman et al, en la que describen la utilización de aCGH en regiones subteloméricas. Enfatizan las grandes ventajas de la técnica: en una sola reacción analizan 77 sondas subteloméricas, y a partir sólo de 500ng de ADN genómico del paciente. En este artículo los autores prevén un profundo impacto del aCGH subtelomérico en el diagnóstico y consejo genético de pacientes con retraso mental, incluso llegan a aventurar que, en un futuro, con esta técnica, se pueda hacer un análisis genómico de número de copias con una resolución sin precedentes y en una sola reacción, para la identificación de genes causantes de enfermedad.

En 2004 Schoumans et al utilizan la tecnología de aCGH en 10 casos de alteraciones cromosómicas crípticas ya diagnosticados con FISH, para confirmar la robustez de la técnica. Utilizan arrays de BACs con resolución de 1MB concluyendo que cuando se introduzca esta técnica en laboratorios de rutina se podrán diagnosticar nuevos desequilibrios y se describirán nuevos síndromes. Además apuntan que para detectar alteraciones más pequeñas, necesitan mejorarse los arrays. Ese mismo año, Shaw-Smith et al publican una serie de 50 pacientes con problemas de aprendizaje y rasgos dismórficos con cariotipo normal, y los analizan con un array genómico de BACs de 1Mb de resolución, encontrando en 24% de ellos anomalías en el número de copias, pero sólo les parece causal la anomalía en el 14%, siendo el resto anomalías heredadas de padres sanos o anomalías no descritas hasta el momento. Discuten que dado el carácter tan novedoso de estas variaciones tan pequeñas en el número de copias, son necesarios estudios sistemáticos en grandes poblaciones para determinar cuales tiene carácter polimórfico. Los análisis de alta resolución que se estaban consiguiendo con los arrays permitían detectar anomalías patogénicas, pero también anomalías de significado incierto, con relevancia desconocida. En este sentido, en 2006 Rosenberg et al definen como anormal un cambio de número de copias no detectado previamente en 100 controles. En su estudio con 81 pacientes encuentran un 25% de alteraciones con un array genómico de BACs de 1Mb. Les parece que encuentran más patología que en otros estudios porque su población además de retraso mental presenta malformaciones. Un 7,4% de sus pacientes presentan anomalías subteloméricas

mientras que encuentran anomalías intersticiales en el 17%, datos similares a otros previamente descritos. En los casos de reordenamientos subteloméricos se encontró que algún padre sano tenía una translocación equilibrada, pudiéndose ofrecer consejo genético apropiado. Sin embargo, los casos de reordenamientos intersticiales heredados de un padre sano suponen una situación nueva en el consejo genético. Encontraron que los casos heredados de padre sano tenían un reordenamiento de menor tamaño, máximo 1,6Mb, que los *de novo*. Las explicaciones que se proponen a la diferencia de expresión son: penetrancia incompleta, factores epigenéticos, *imprinting* y pérdida de heterocigosidad para un gen recesivo, tal como ya se había apuntado para la duplicación del 22q11.2. Esta duplicación, descubierta con cariotipo molecular, constituye una paradoja donde la relación causal entre anomalía cromosómica y fenotipo determinado queda difuminada.

Menten et al en 2006 muestran resultados de arrays de BACs de 1MB en pacientes seleccionados por retraso mental y sospecha de anomalía cromosómica, por tener una o más malformaciones congénitas mayores (cardiopatía congénita, fisura de paladar, malformaciones cerebrales...) o rasgos dismórficos (tres o más anomalías menores), o ambos. Detectaron desequilibrio cromosómico en el 20% de los pacientes. Descartando aquellos heredados de padres normales, y los detectados por cariotipo, FISH y MLPA, el porcentaje de anomalías causales lo estiman en el 8%. Lo interesante de este artículo es que detectan 3 mosaicismos: en uno de los casos detectan que el  $\log_2$  ratio medio de intensidad en uno de los clones patológicos era de 0,38 cuando el ratio de intensidad teórica para una duplicación es  $\log_2 0,58$  ( $3/2$ ). Por tanto la tasa estimada de mosaicismo es  $0,38/0,58 = 65\%$ . Es interesante también su observación de que los mosaicos se detectan mejor con arrays que con FISH, achacándolo a que a los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina y subsiguiente cultivo, se les induce una ventaja selectiva de crecimiento de células normales. Respecto a los mosaicos hay que tener en cuenta un hallazgo posterior en el que se sugería que quizá algunos de los CNVs podrían ser eventos somáticos, sugiriendo mosaicismo en tejidos adultos e incluso fetales. Todo esto nos hace tener en cuenta a los arrays en casos como el síndrome de

Pallister-Killian que presenta una tetrasomía 12p en fibroblastos, pero no detectable en sangre. Es más, como recuerdan Cheung et al en 2007 analizando estudios de embriones parados tras fecundación in vitro, el mosaicismo está presente en el 50% de los embriones en estadio de 8 células y en el 75% de embriones en blastocisto. Ellos detectan un 0,4% de casos con mosaicismo entre sus 2.585 muestras.

Un estudio de Krepischi-Santos en 2006, seleccionando y clasificando pacientes por sus características clínicas detectó alteraciones causales, con un BAC de 1MB, en el 17%. Destacan la importancia del aCGH para establecer la causa del diagnóstico y poder ofrecer consejo genético a las familias. Entre los diferentes grupos de pacientes encuentran más patología en aquellos con cardiopatías congénitas. Thienpont et al en 2007 encuentran hasta un 30% de anomalías genómicas en pacientes con cardiopatías congénitas asociadas a retraso mental y malformaciones. Además en algún paciente encuentran una delección en la que está comprendido el gen NRX1B (Neurexina1), pareciendo un buen candidato al retraso mental del paciente: el gen codifica para una proteína de superficie de la célula neuronal y parece que juega un papel importante en la formación y mantenimiento de las sinapsis.

Froyen et al en 2007, asumiendo que hay un 30% más de varones con retraso mental que de mujeres, y que se conocen más de 60 genes en el cromosoma X ligados al retraso mental, analizan con un array genómico el cromosoma X con una resolución de 80kb. Detectan en su muestra de 108 pacientes un 7.1% de patología en los casos de retraso mental sindrómico mientras que en el grupo no sindrómico se detectó un 1.9%

Tal como vemos, en estos últimos años, esta técnica de aCGH, a la que también se está refiriendo como cariotipo molecular, se ha convertido rápidamente en un método de referencia para el diagnóstico de pacientes con defectos de desarrollo y ha sido un buen instrumento para el descubrimiento de una nueva fuente de polimorfismos en el genoma, llamados CNVs. La resolución de la técnica viene determinada por el tamaño de los clones y la distancia entre ellos. A mayor resolución mayor probabilidad de encontrar alteraciones de significado incierto. También viene determinada por el punto de corte

establecido para la identificación de CNVs, es decir, el número de sondas consecutivas necesarias para definir una región de CNV. Por ejemplo, la mayoría de las plataformas de CGH requieren al menos tres sondas consecutivas para definir una CNV.

Se espera que con esta tecnología se vayan describiendo nuevos síndromes y se establezcan relaciones fenotipo-genotipo con información de todo el genoma. Las bases de datos *on-line* DECIPHER y ECARUCA nos van a ayudar enormemente en la interpretación de los nuevos hallazgos. El objetivo de estas bases de datos es ayudar a mejorar los cuidados médicos de estos pacientes y ayudar en la comprensión de la etiología genética de estos desequilibrios submicroscópicos. Recolectando muchos datos se conseguirá establecer una relación causal cuando se vean recurrentes desequilibrios con un fenotipo determinado.

Esta tecnología está resultando muy útil en la caracterización de síndromes conocidos con retraso mental: permite clasificar pacientes por sus relaciones genotipo-fenotipo dentro de un mismo síndrome, tal como describen Sahoo et al en 2006 para el síndrome de Angelman. En algunos síndromes conocidos se están detectando anomalías adicionales probablemente modificadoras del fenotipo (Prescott et al 2005).

Mientras que para la investigación se requiere la máxima resolución con alta densidad de sondas, para las aplicaciones clínicas la alta resolución, por debajo de 1MB, implica encontrar variaciones de significado incierto, CNVs, no muy útiles en la clínica, confundiendo en la interpretación de los hallazgos. Además es necesario confirmar los resultados de los arrays, cosa no siempre posible en un laboratorio clínico, pues requeriría PCR o FISH de cada alteración encontrada. La evolución y el desarrollo de esta tecnología acabarán resolviendo estas cuestiones.

En general los tipos de arrays varían desde aquellos de baja resolución, genómicos, contruidos con BACs de distintas resoluciones, hasta aquellos contruidos con oligos. Los primeros arrays eran de BACs y tenían resolución de 1Mb. La pega, a parte de la baja resolución, estaba en el hecho de que los clones de BACs en librerías estándar pueden estar mal situados en el mapa y

esto puede llevar a errores de diagnóstico, por lo que es necesario validar los resultados. Cada BAC debe ser propagado en cultivo introduciendo posibles variaciones en los clones e incluso contaminación de ADN. Son arrays más caros y consumen más tiempo.

Los arrays de oligos se sintetizan de manera robotizada in situ, fijan el contenido en GC y la temperatura de fusión por lo que facilita una hibridación uniforme. Además las plataformas de oligonucleótidos se pueden acomodar rápidamente y fácilmente a cambios en la densidad en la que se quiere cubrir el genoma. Son por tanto mucho más flexibles. Fan YS et al 2007 analizan 100 pacientes consecutivos con retraso mental con dos tipos de arrays, uno de 44k y otro de 244k, encontrando 20 CNVs por individuo con el array de más resolución, y 0,72 CNV por individuo en el de 44k, con una tasa de detección del 15%. Proponen que un array de 44k es suficiente para no encontrar excesivas CNVs de significado incierto. Xiang et al en 2010 comparten esta opinión pero resaltan que se necesitan más estudios poblacionales para asegurar la utilidad clínica de la plataforma de 44k.

Koolen et al en 2009 concluyen que los arrays basados en oligonucleótidos tienen una capacidad diagnóstica mayor que los arrays basados en BACs (14,83% frente a 9,76%). Xiang et al en 2010 corroboran estos resultados. En este sentido Neill y col en 2010 hacen la primera comparación sistemática de las dos tecnologías en un entorno clínico con 466 pacientes para determinar que plataforma es la más efectiva en identificar CNVs con significado clínico, y encontraron que la plataforma de oligos tenía una tasa de detección del 15,4% mientras que la de BACs del 10,6%, con una diferencia estadísticamente significativa. Ese 4,8% de diferencia era porque estaba por debajo del límite de resolución del BAC o porque las CNVs caían en los gaps del array de BACs. No encontraron sin embargo diferencias en la detección de CNVs de significado incierto (7% y 7,1%)

Se utilizan en el mercado desde arrays de SNPs (del inglés Single Nucleotide polymorphism), pasando por arrays de oligonucleótidos de 25-85pb, hasta arrays de BACs de 80-200Kb. Los microarrays son capaces de identificar cualquier desequilibrio (aneuploidía, delección, duplicación) de los loci

representados en el microarray. Los arrays de SNP nos permiten además reconocer el origen parental de cada copia y permiten detectar disomías uniparentales.

También se dispone de arrays dirigidos, desarrollados para evitar CNVs, que utilizan el conocimiento de la citogenética clínica para construir arrays útiles para la clínica, incluyendo sólo en el array aquellas regiones genómicas con significado clínico conocido y en ocasiones además las regiones subteloméricas. Sin embargo con estos arrays se minimiza la posibilidad de identificar alteraciones nuevas. Un array dirigido bien diseñado debe conseguir un balance óptimo entre maximizar la detección de anomalías clínicamente relevantes y minimizar el número de FISH confirmativos para evaluar las posibles CNVs (Shaffer et al, 2006). Muchos autores lo señalan como el array ideal para utilizar en diagnósticos prenatales. La utilización de arrays en el diagnóstico prenatal es muy controvertida: tenemos capacidad de detectar alteraciones más severas que el síndrome de Down; las mujeres o parejas pueden decidir no ser informados de riesgos menores o desconocidos, lo que hace que muchas parejas opten por este tipo de diagnósticos. Hay quien sugiere que el diagnóstico prenatal invasivo puede ser eficiente a cualquier edad por lo que debería ser ofrecido a todas las gestantes. Otros autores reservan el aCGH en prenatal cuando hay anomalías ecográficas. Los más contrarios argumentan la cantidad de información que habría que dar a las parejas antes de ofrecer el diagnóstico.

Las diferencias en las tasas de detección de alteraciones patogénicas en pacientes con retraso mental y cariotipo normal son: 6-10% para los arrays dirigidos y 10-15% para los genómicos de 1Mb (Edelmann et al 2009). También existen diferencias en las tasas de detección publicadas porque algunos autores incluyen en los % todas las CNVs incluyendo las de significado incierto: Manolakos et al 2010 en su cohorte de 82 pacientes con retraso del desarrollo describen un 15,8% de anomalías genómicas, pero cuando se refieren a las patogénicas sólo, la tasa disminuye al 3,6%, siendo el 12,2% restante de significado incierto.

A pesar de las ventajas evidentes, algo que no es capaz de detectar el array son los reordenamientos equilibrados o mutaciones de un sólo gen, o incluso reordenamientos desequilibrados en el límite de la resolución del array. Por esto hay que ser cuidadoso a la hora de decidir si los arrays van a sustituir a los métodos tradicionales de cariotipado. Shaffer et al 2007, estudian esta posibilidad, observando que entre sus 1500 casos, el 95% de las anomalías se podrían detectar con su array dirigido, escapándose translocaciones equilibradas (36%), inversiones (38%) y un 26% de duplicaciones o deleciones no incluidas en el array. A este respecto Shao et al en 2008 proponen que cuando un microarray resulta normal y aún así existe sospecha clínica de cromosopatía debe hacerse cariotipo. Es más, en el análisis de aCGH, cuando se detectan duplicaciones no tenemos la información de su posición, de si la duplicación es en tandem o de si está en una nueva posición. Para confirmar esto habría que hacer FISH de la región duplicada.

Lo que sí puede demostrar el array, tal como lo han hecho Sismani et al 2008, es que algunas alteraciones estructurales aparentemente equilibradas en el cariotipo, en pacientes con retraso mental, muestran reordenamientos críticos. Ellos, utilizando un array genómico de 1MB, detectan un 25% de desequilibrios en una muestra de doce casos. Esto resulta interesante además porque va a permitir, realizando sistemáticamente el mapa de los puntos de rotura, la identificación de genes candidatos de retraso mental. Gregori et al en 2007 aplican aCGH en portadores de alteraciones recíprocas y de reordenamientos cromosómicos complejos (CCR) aparentemente equilibrados en pacientes con retraso mental. Lo que en un principio se explicaban como que el fenotipo podría estar causado por rotura de genes dosis-dependientes, o por efecto de posición, es decir, la separación de un gen de sus elementos reguladores en cis provocando una expresión aberrante, posteriormente lo interpretaron de otra manera al confirmar que en un 40% de los pacientes había realmente un desequilibrio. Sorprendentemente detectaron las deleciones no sólo en los puntos de rotura sino en cualquier otro punto del genoma. Respecto a los reordenamientos complejos, detectan desequilibrio en un 23% sin poder establecer una relación entre el fenotipo y el tamaño de la alteración.

Ballarati et al 2008 concluyen en su estudio que aunque el aCGH resulta una herramienta muy útil para la caracterización de los CCR, no hay que olvidar que el cariotipo y el FISH son el segundo paso para conocer la posición de los segmentos cromosómicos implicados en el CCR.

Estos hallazgos son especialmente útiles en diagnóstico prenatal: ante el hallazgo de una alteración estructural aparentemente equilibrada, es imprescindible el aCGH para confirmar que no hay desequilibrio cromosómico. Es interesante la observación de Ballarati et al acerca del origen de los reordenamientos con desequilibrios crípticos. En sus cinco casos encuentran que el origen es paterno: parece que la meiosis paterna es más susceptible de producir translocaciones.

En el año 2007, con toda la experiencia acumulada de arrays, el American College of Medical Genetics, ACMG (Manning et al 2007) hace unas recomendaciones indicando que el uso de los aCGH debe limitarse por el momento a los pacientes que, además de retraso mental, presentan anomalías congénitas. Los factores que deben considerarse en su aplicación son: las limitaciones de la financiación, la posible ambigüedad de los resultados y la disponibilidad de muestras de los progenitores.

Ya con la técnica más afianzada, a partir de 2007 se empiezan a publicar grandes series de pacientes. Este es el caso de Shaffer et al quienes revisan sus 8.789 casos de retraso y/malformaciones, detectando con un array de BACs dirigido, un 12% de anomalías, siendo un 6,9% las que tenían un claro significado clínico, el 1,2% eran benignas y el 3,9% de significado incierto. En 2008 Shao et al aplican aCGH dirigidos a regiones subteloméricas en 5.380 pacientes con retraso mental, rasgos dismórficos, malformaciones congénitas, o trastornos autistas o de comportamiento. Encuentran desequilibrios subteloméricos en 9,3% aunque sólo en 4,4% se interpretan como patogénicos. Detectan mayor número de deleciones que de duplicaciones y lo explican porque los pacientes con duplicaciones, al tener un fenotipo más leve, quizá no vayan a consulta.

También empiezan a aparecer en 2008 estudios investigando su relación con el autismo (Christian et al, 2008), un trastorno con una prevalencia de

1/500 (aunque si añadimos los trastornos del espectro autista la prevalencia llega hasta 1/160). Este grupo encontró en 397 pacientes estudiados con un array genómico de BAC de 19k, un 11,6% de CNVs sin que pudieran precisar si eran o no patogénicas. Un estudio más reciente (Shen et al 2010), de 933 pacientes con trastornos del espectro autista, encontró con aCGH un 7% de alteraciones cromosómicas clínicamente significativas, predominando las deleciones sobre las duplicaciones. En este tipo de pacientes Miller et al en 2009 describen microdeleciones con microduplicaciones en la región 15q13.2q3.3, región de conocida inestabilidad que contiene muchas duplicaciones segmentarias. Sugieren que se tenga en cuenta esta región en el proceso diagnóstico de niños con autismo, alteraciones del lenguaje expresivo o retraso en el desarrollo.

Gracias a los arrays de CGH se están describiendo síndromes clínicamente homogéneos en los que se ha establecido bien la localización de la anomalía cromosómica, haciendo que la lista de nuevos síndromes descubiertos con aCGH siga creciendo. Para otras anomalías, sólo existen algunos casos con fenotipo parecido pero insuficiente como para establecer una relación genotipo-fenotipo, y finalmente para algunos pacientes los arrays descubrirán anomalías cromosómicas nuevas para las que se necesitarán nuevas técnicas para conocer su significado. Ejemplos de esto es la microdelección 1p36.1 que se encuentra en el 1% de los pacientes con retraso mental idiopático (Battaglia et al 2008). Una vez detectado el reordenamiento cromosómico que causa la enfermedad, lo siguiente es establecer las consecuencias funcionales. Las duplicaciones y deleciones posiblemente produzcan cambios en la expresión del gen dosis-dependiente, por lo que la combinación de estudios de ADN genómico y de expresión génica serán útiles para ayudar a definir las consecuencias que produce una alteración cromosómica en la expresión de un gen en una célula particular o en un tipo de tejido.

Los aCGH han facilitado la aproximación "dismorfología reversa" en contraste con la aproximación "el fenotipo primero" que hemos utilizado hasta ahora. Con esta nueva aproximación los aCGH realizados en grandes series de pacientes sirven para definir regiones del cromosoma "críticas" que se han

perdido o duplicado en varios pacientes. Las características fenotípicas de estos pacientes se pueden comparar y estudiar hasta conseguir un fenotipo suficientemente distintivo (Slavotinek A, 2008).

Otros buenos ejemplos de síndromes de microdelección identificados por aCGH (Slavotinek A, 2008): delección y duplicación 17q21.31, que se da en el 1% de los pacientes con retraso mental y contiene genes (MAPT) perfectamente candidatos a trastornos del desarrollo. Como peculiaridad esta región tiene un polimorfismo de inversión que predispone a recombinación homóloga no alélica (NAHR) produciendo en la zona microdelecciones y microduplicaciones. Delección 15q13.3 responsable del 0,3% de los pacientes con retraso mental idiopático. Delección 15q24, también responsable del 0,3% de pacientes con retraso mental y un fenotipo clínicamente reconocible. Delección 16p11p12.1 responsable del 1% de los casos de autismo. Esta región es rica en duplicaciones segmentarias y por tanto predisponen a delecciones/duplicaciones. Delección 1q41q42 podría contener el gen candidato para el síndrome de Fryns. Delección 2p15p16.1, delección 9q22.3 con gen candidato para el síndrome de Gorlin. En este caso parece que su origen no es por NAHR sino por unión de finales no homólogos.

La tecnología de array CGH se está utilizando ya incluso para la detección de cambios exónicos: Boone y col en 2010 diseñaron un array dirigido a 24.000 exones de interés de 1.700 enfermedades mendelianas seleccionadas, con una resolución por debajo de la kilobase.

Se han descrito CNVs con significado patogénico en pacientes con autismo, esquizofrenia, trastorno bipolar, epilepsia, trastorno de déficit de atención con hiperactividad e incluso en dislexia (Girirajan S et al 2011)

Rajcan-Separovic E y col, 2010, utilizaron esta tecnología en el estudio de los abortos de parejas con abortos de repetición, describiendo CNVs y dos posibles genes candidatos por su implicación en el desarrollo embrionario.

En el último año ya se publican experiencias en el análisis de célula única para el diagnóstico preimplantatorio (Gutierrez-Mateo et al 2011).

Dado su alto potencial diagnóstico, la tecnología de aCGH debería incorporarse en los actuales laboratorios de citogenética para la detección de desequilibrios cromosómicos submicroscópicos. El laboratorio de citogenética del futuro tendrá muchos menos microscopios, pero tendrá citogenetistas delante de un ordenador capaces de interpretar los datos que proporcionan los arrays en vez del minucioso análisis de las bandas que actualmente realizamos. El array de CGH tiene como ventaja que no es tan dependiente de la experiencia del genetista como el cariotipo, y gran parte del proceso está automatizada. Es una técnica rápida y que precisa poco material de partida. La elección del array dependerá del coste, de la disponibilidad, y lo más importante, del conocimiento de la variación normal para la plataforma elegida.

Pero antes de poder asumirlo como técnica diagnóstica asistencial debemos resolver algunos aspectos como: tasa de detección, sensibilidad, especificidad, validez y utilidad clínica, validez analítica etc. A este respecto, en Estados Unidos se ha realizado una revisión, a cargo del Centro de Evaluación Tecnológica de Blue Cross en Chicago, en 2009. Realizan una revisión bibliográfica de publicaciones encontradas con Medline, de los tres últimos años, de artículos revisados por pares en los que se había hecho aCGH a pacientes con retraso mental/de desarrollo o autismo con sospecha de anomalías genéticas, pero con cariotipo normal. De este estudio se desprende que tiene una validez analítica: el aCGH tiene un 100% de sensibilidad para anomalías cromosómicas ya conocidas, aunque se detectan falsos positivos (los CNVs de significado incierto). La tasa de detección en pacientes con cariotipo normal está muy influida por la resolución del array y varía entre 5-16,7% para retraso mental/de desarrollo y de 3,4-11,6% en trastornos del espectro autista.

En cuanto a la utilidad clínica, es decir el impacto de la técnica en el paciente y su familia, hacen una valoración de si se han producido cambios en el manejo o en decisiones en estos pacientes gracias a los aCGH. Encuentran que alrededor del 70% de los pacientes se benefician en términos de que acaba para ellos su odisea diagnóstica, consiguen conocer unos riesgos de recurrencia y mejoran su acceso a los servicios comunitarios. Además se puede conseguir

predecir el pronóstico y las complicaciones clínicas o de comportamiento a las que habrá que prestar más atención.

Sin embargo para la validez analítica, entendida por la manera robusta en la que se realizan los diagnósticos, no se ha encontrado mucha información. Solo algunos laboratorios publican un resumen de su proceso de validación analítica, y son muchos los que destacan la complejidad del diseño y validación de los aCGH así como su análisis e interpretación.

Ya se están llevando a cabo análisis de coste efectividad, sugiriendo algunos centros que el coste del aCGH, actualmente mayor que el del cariotipo, pueda seguir abaratándose.

Aunque una de las ventajas del aCGH es que no se requiere un fenotipo clínico para identificar nuevos síndromes, es aún así un reto para los citogenetistas y los clínicos establecer nuevas indicaciones de estudio de arrays, posiblemente distintas a las que tradicionalmente hemos utilizado para cariotipo. En 2001 de Vries et al elaboraron una lista de criterios (Fig.12) para el estudio de deleciones subteloméricas, que es en la que se han basado estudios posteriores. Sin embargo ha pasado algún tiempo y la experiencia acumulada en aCGH nos obliga a revisar dicha lista. La astringencia en los criterios de selección de los pacientes nos va a condicionar la tasa de detección de reordenamientos genómicos.

De Vries et al. 2001	7. Indicaciones para el estudio de deleciones subteloméricas (FISH o MLPA subtelomérico)		
En pacientes con retraso mental moderado o grave si se consigue al menos una puntuación de 3 o más según los siguientes criterios:			
A. Historia familiar de retraso mental y/o pérdidas fetales			
- Herencia mendeliana	1		
- Herencia no mendeliana o fenotipos discordantes	2		
B. Historia prenatal			
- Retraso del crecimiento	2		
- Microcefalia	1		
C. Anomalías de crecimiento posnatales			
- Talla baja	1	Máx. 2	
- Macrocefalia	1		
- Talla alta	1		
D. Dismorfias faciales (deben concurrir al menos dos signos)			
- Hipertelorismo notable	1	Máx. 2	
- Anomalías nasales	1		
- Anomalías de los pabellones auditivos	1		
E. Defectos congénitos estructurales			
- Anomalías en manos y pies	1	Máx. 2	
- Anomalías cardíacas	1		
- Hipospadias ± testes internos	1		

Figura 12.- "Checklist" de de Vries et al de criterios clínicos.

En 2007 aparece la primera guía, europea, para el cariotipo molecular en el diagnóstico genético constitucional (Vermeesch et al 2007) abordando importantes cuestiones como utilidad clínica, diferentes campos de diagnóstico: prenatal, retraso mental, infertilidad, abortos; detección de mosaicismos, validez analítica, resolución, validación, validez clínica, implementación clínica, cuestiones éticas, informes de aCGH...

Aunque este tipo de guías nos aclaran cuestiones y nos ayudan a manejarnos con los arrays, aún quedan dudas que necesitan investigación en el entorno de la discapacidad intelectual de origen desconocido: identificar los pequeños CNVs, establecer relaciones fenotipo-genotipo, penetrancia y expresividad, entender las localizaciones, estructura y frecuencia de las CNVs, moduladores de la expresión...

## 1.5- CAMBIOS DE NÚMERO DE COPIAS: CNVs

Las variaciones en el número de copias (abreviadas generalmente como CNVs, del inglés *Copy Number Variations*) (CNVs) se definen como fragmentos de ADN de una kilobase, o mayores, que normalmente se encuentran en una copia en cada cromosoma, pero que en algunos individuos aparecen duplicados o triplicados.

Su asociación con el fenotipo ya se describió hace 70 años en *Drosophila melanogaster*, al asociar la duplicación Bar con el fenotipo Bar eye. Los CNVs influyen en la expresión génica (el 41% de las CNVs se solapan con genes), en la variación fenotípica y en la adaptación, alterando dosis génicas. También pueden causar enfermedad o conferir riesgo de enfermedades complejas. Estimaciones recientes calculan que un 8% de la población general es portadora de una gran delección o duplicación, de más de 500Kb, que ocurre con una frecuencia alélica <0,05% (Itsara y col, 2009)

Teniendo en cuenta que el 40% de los genes se expresan en el cerebro humano, las CNVs deben contribuir significativamente a variaciones cognitivas, de comportamiento y psicológicas tanto patológicas como dentro de poblaciones normales (Stankiewicz et al, 2007).

Los desequilibrios cromosómicos son una causa conocida de trastornos de aprendizaje y trastornos de desarrollo. Un cariotipo convencional solo puede detectar desequilibrios cromosómicos (delecciones o duplicaciones) mayores de 5Mb, mientras que el aCGH puede detectar desequilibrios cromosómicos críticos indetectables por métodos citogenéticos clásicos. Desde la reciente implementación de la tecnología de aCGH en el diagnóstico clínico se han analizado en todo el mundo largas series de pacientes y se han detectado variaciones en número de copias en 10-15% de esos pacientes con aparente cariotipo normal.

La interpretación de las CNVs como posibles polimorfismos se insinuó desde las primeras descripciones dado que además se conocía la existencia de anomalías citogenéticas visibles, en la eucromatina, en niños con anomalías fenotípicas y padres normales: del(5)(p14.3p14.3), del(7)(q14.3q14.3), del

(11)(q14.3q14.3), del(13)(q14q14), dup(1)(q42.11q42.12), dup(3)(q25q25), dup(4)(q31.3q33.3) y otras. En estos casos se sugiere no penetrancia en el progenitor o imprinting.

En el caso de las CNVs detectadas con arrays, a pesar del hecho de que los desequilibrios heredados pueden producir fenotipos anormales en los hijos afectados mediante mecanismos epigenéticos o de herencia recesiva, parece que las variaciones detectadas en padres sanos no deben ser consideradas como patogénicas (Schoumans et al 2005). La base de datos de variaciones genómicas (*Genome Variation Database*) es de gran ayuda en la interpretación de estas variantes. Parece lógico pensar que si se reconoce una alteración cromosómica de novo en un paciente con fenotipo anormal y la alteración no aparece en las bases de datos de polimorfismos, ésta deba considerarse como la productora del fenotipo del paciente. Por el contrario si aparece en uno de los padres sanos parece que nos decidimos más por asumir que se trata de una variante de la población sin repercusión fenotípica. En estos casos no estamos teniendo en cuenta un aspecto importante: los desequilibrios que se detectan con arrays representan CNVs acumulativas y no alelo específicas (Freeman et al 2006), es decir no conocemos su localización. Esto se podrá resolver cuando dispongamos de ensayos cuantitativos locus específicos y alelo específicos. Igualmente se necesitan estudios que correlacionen niveles de mRNA y proteínas con el número de copias de las CNVs, y tener en cuenta que las CNVs pueden tener efectos sólo en ciertos tejidos y/o en ciertas etapas del desarrollo. Ravel et al en 2007, a este respecto, proponían que el hallazgo de un desequilibrio, con arrays, automáticamente no indica patogenicidad. Razonaban lo siguiente: si el desequilibrio es familiar y no es una CNV benigna conocida, la relación con el fenotipo es incierta; si la alteración en un paciente implica un síndrome de microdelección/duplicación conocido, el desequilibrio se considera patogénico; si el desequilibrio ha ocurrido de novo en el paciente, y especialmente si éste contiene genes con efectos compatibles con los hallazgos clínicos del paciente, esto apoya su patogenicidad pero no es prueba absoluta.

De todo esto se desprende que si utilizamos arrays genómicos, ante la posibilidad de encontrarnos CNVs de significado incierto, debemos disponer de muestra de los padres, incluso confirmando paternidades, para establecer el carácter hereditario o no de la anomalía encontrada.

Es en 2004 cuando aparecen dos importantes estudios que nos revelan que el genoma de la población general, además de las variaciones por SNPs que ya se conocían, tiene también grandes variaciones en el número de copias, como fuente de diversidad (Sebat et al 2004, Iafrate et al 2004). Sebat et al encuentran una media de 11 CNVs por persona y Iafrate 12,4. Ambas cifras están probablemente subestimadas por la baja resolución de las técnicas empleadas y el pequeño número de individuos. En 2005 Tuzun et al identifican 241 CNVs de tamaños entre 8kb y 40kb. Algo que se observó en los tres estudios es que las CNVs se localizaban más frecuentemente que por azar, cerca de duplicaciones segmentarias (DS). Se han asociado las CNVs no sólo a la producción de fenotipos diferentes sino también con la susceptibilidad de los individuos a la enfermedad, tal y como sugieren González et al 2005 en pacientes con sida. También se han publicado estudios de arrays donde encuentran CNVs en un 15-20% de pacientes con esquizofrenia comparado con el 5% del grupo control (Walsh et al 2008). Otros autores relacionan además la severidad de la esquizofrenia con la cantidad de CNVs (Lee et al 2010). En síndromes de sobrecrecimiento se ha publicado una tasa de detección de alteraciones con array de BAC 1Mb del 7,5%, siendo la mitad duplicaciones (Malan et al 2010). Ya hay resultados en fetos con holoprosencefalia (Machado et al 2011).

La variabilidad genómica por tanto, a parte de en SNPs (más de 6 millones según el International Hapmap Consortium) parece que puede estar también presente como VNTR (número variable de repeticiones en tandem), elementos Alu, alteraciones estructurales (deleciones, duplicaciones e inversiones), y ahora también las CNVs. En 2005 se sugiere que dentro del término CNVs se incluya LCVs (variantes de número de copias a gran escala), CNPs (polimorfismos de número de copia) y ISVs (variantes de tamaño intermedio).

Todos los mecanismos que se han propuesto para explicar el origen de las deleciones o duplicaciones están relacionados con la arquitectura del genoma humano, con la presencia de secuencias repetidas de cualquier tipo que son en definitiva la base de su capacidad evolutiva. Los distintos tipos de secuencias repetidas comprenden al menos el 50% del genoma humano e incluyen repeticiones intercaladas cortas y largas (SINEs y LINEs), pseudogenes procesados, genes ribosómicos y duplicaciones segmentarias

Los SNPs parece que se localizan más frecuentemente en telómeros, y dentro de secuencias que son ricas en G y C. Así parece que los SNPs han aparecido por mutación y se han purificado por selección natural, no uniformemente en el genoma humano.

Nguyen et al 2006 encuentran que las CNVs ocurren más frecuentemente en telómeros y centrómeros, son ricas en genes que codifican proteínas pero no tienen alto contenido C+G. Tienen un déficit de genes de enfermedades mendelianas y tienen muchos genes que codifican proteínas de secreción y de inmunidad, es decir genes adaptativos. Funcionalmente los genes ricos en CNVs están relacionados con procesos de adhesión celular, percepción sensorial, olfato, estímulo químico, señalización celular y proliferación. Esto parece indicar que la selección natural ha actuado, no al azar, sino a favor de las CNVs. En ratón parece que la deriva genética preferentemente ha purgado duplicaciones deletéreas neutras y ligeramente adaptativas, mientras que ha fijado, más que en humanos, las duplicaciones fuertemente adaptativas.

Freeman et al publican una revisión en 2006 sobre CNVs proponiendo que si haploinsuficiencia es la condición que resulta cuando al deleccionarse una copia de un gen dosis-dependiente se produce retraso en el desarrollo, entonces habría que usar el término haplosuficiencia para describir deleciones genómicas que no producen enfermedad y que se encuentran en individuos sanos y aparentemente normales.

También se han encontrado CNVs en otras especies. Perry et al en 2006 observan que la variación intraespecífica es común en el chimpancé a un nivel quizá mayor que en humanos. La evolución de las variaciones en el número de

copias es un proceso dinámico, observándose que existen duplicaciones y deleciones que ocurren repetidamente dentro de especies y entre especies. Estas regiones deben ser inestables y sirven como puntos calientes de reordenamientos genómicos estructurales. Existen ya catálogos de CNVs de genoma completo para humanos, ratón, rata, chimpancé, macaco, y *Drosophila melanogaster* (Henrichsen et al, 2009) y recientemente para ganado bovino (Fadista et al 2010).

En la investigación de las CNVs es importante conseguir un atlas en el genoma humano, incluyendo correlación con fenotipo, aspectos mutacionales y evolutivos, comportamiento con otros factores genéticos como control epigenético o desequilibrio de ligamiento. El primer mapa de CNVs lo construyeron Redon et al en 2007 a partir de 270 individuos de cuatro poblaciones diferentes procedentes de Europa, Asia y África. Encontraron 1447 CNVs que ocupaban 360Mb (12% del genoma). Estas CNVs contenían cientos de genes, de loci de enfermedad y de duplicaciones segmentarias. De hecho vieron que tenían más contenido en nucleótidos por genoma que los SNPs. El estudio también reveló variación entre las poblaciones.

Un estudio de 2010 en población sana coreana hace un análisis exhaustivo de las CNVs detectando ciertas particularidades dependientes de su población. Encuentran 144.207, haciendo un total de 40 CNVs por genoma. El tamaño medio es de 18.9kb (entre 0,2 y 5.406kb). Las deleciones son 4,7 veces más frecuentes que las ganancias. El 16% de las CNVs se encontraban en más del 1% de los sujetos y el 24% solapaban con genes OMIM. El 11,9% estaba asociado con duplicaciones segmentarias (Yim et al 2010).

En este mismo año aparece un artículo describiendo la estructura genética de la Población Española a partir del estudio de 800 individuos sanos, caracterizando un mapa de CNVs. Encuentran que es bastante homogénea y similar a la población del norte y oeste de Europa, pero con una estructura haplotípica más diversa (Gayan et al 2010).

El Copy Number Variation Project, un consorcio internacional, trata de descubrir y caracterizar las CNVs en poblaciones humanas siguiendo diversas tecnologías. Como apunta Ropers en 2008, reconocer cambios clínicamente

relevantes, CNVs o SNPs, en un mar de variantes funcionalmente neutras, puede ser todo un reto que sólo se logrará estudiando grandes cohortes de pacientes clínicamente bien reconocidos.

En un reciente estudio Hehir-Kwa et al, 2010 nos presentan un método informático que llaman GECCO (*Genomic Classification of CNVs Objectively*), disponible online, que identifica con precisión CNVs asociadas a retraso mental y CNVs benignas sin necesidad de controles ni de muestras de padres. Está basado en información contenida en las diferentes bases de datos. Si este método se muestra efectivo será útil sobre todo en el diagnóstico prenatal.

En el estudio de Redon et al en 2007 ya encontraron que un 24% de las CNVs estaban asociadas a duplicaciones segmentarias. También se ha detectado que los segmentos de CNVs eran ricos en secuencias con bajo o moderado contenido de SNPs (Cutler et al, 2010). Las CNVs pueden modificar la expresión de los genes vecinos con normal número de copia, como se ha visto en el síndrome de Williams (Merla et al, 2010).

Xiang et al en 2010 introducen unos términos, bastante acertados, para las variaciones de número de copias: utilizan el término "CNC" para describir en general alteraciones en el número de copias de ADN. El término "CNC patogénica" para describir una CNC asociada a un fenotipo anómalo, y el término "CNV" para las CNC benignas. Además introducen unos criterios consensuados de interpretación de CNCs. Se considera una CNC patogénica cuando implica una región conocida que está asociada a un síndrome de microdelección o microduplicación heredada de un progenitor con fenotipo similar; implica genes dosis-dependientes; es un desequilibrio multigénico producto de una segregación de una translocación/inserción o recombinación de una inversión. Se considera CNC benigna cuando es una CNV presente en población normal; se hereda de un progenitor normal; no implica regiones asociadas con síndromes conocidos o genes dosis-dependientes. Se considera "variante de significado incierto" los desequilibrios mayores de 300kb que implican múltiples genes, pero cuyo significado se desconoce basado en el conocimiento actual.

Es, sin embargo el documento consenso del consorcio ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays) el que está resultando más vinculante y más utilizado (Miller et al 2010). Y a nivel nacional probablemente lo sea el documento publicado en 2012 por el Grupo para el Consenso para la implementación de los arrays en la Genética Clínica, promovido por el Instituto Roche.

## 1.6- DUPLICACIONES SEGMENTARIAS

Las duplicaciones segmentarias (DS), conocidas por algunos autores como LCRs (del inglés *low copy repeats*), duplicaciones segmentarias paralogas o duplicones, son bloques de secuencia de los genomas, de tamaño entre 1000 pares de nucleóticos (1 kb) y 400kb y que se encuentran en más de una localización cromosómica, debido a un proceso de duplicación reciente a lo largo del proceso evolutivo. Se distribuyen como duplicaciones inter o intracromosómicas y comparten más del 90% de identidad en su secuencia. Los proyectos de secuenciación de los genomas han puesto de manifiesto la existencia de un número más elevado de estas estructuras del que se creía con anterioridad, constituyendo un 5% del genoma humano. Inicialmente se las reconoció presentes en regiones pericentroméricas o subteloméricas. Y así parece, una tercera parte está concentrada en estas regiones y en el cromosoma Y, pero el resto están intercaladas por toda la eucromatina y en zonas ricas en genes y con alto contenido en CG. Además se ha encontrado que los bordes de las DS está enriquecidos con elementos repetitivos: DNA satélite, LTRs (*long-terminal repeats*) y especialmente repeticiones Alu. (Cheung et al 2003).

Así mismo, al comparar las secuencias de los genomas de distintas especies, se ha observado una gran cantidad de estas estructuras en los lugares cromosómicos en los que se han producido roturas del orden de los cromosomas (sintenia) a lo largo de la evolución. Alrededor del 66% de duplicaciones segmentarias que aparecen en el hombre, también aparecen en el chimpancé, por lo que el resto, 33% (26.5Mb), distribuido a lo largo del genoma, se ha duplicado específicamente en humanos (Cheng et al 2005). Las diferencias entre los genomas humanos y los de chimpancés son aproximadamente del 5%, a costa, no de cambios de una sola base, sino cambios que suponen pequeñas inserciones o deleciones (indels). Analizando diferentes genomas se ha propuesto que las duplicaciones del genoma completo ocurrieron durante la temprana evolución mientras que las duplicaciones segmentarias se han producido más recientemente permitiendo la

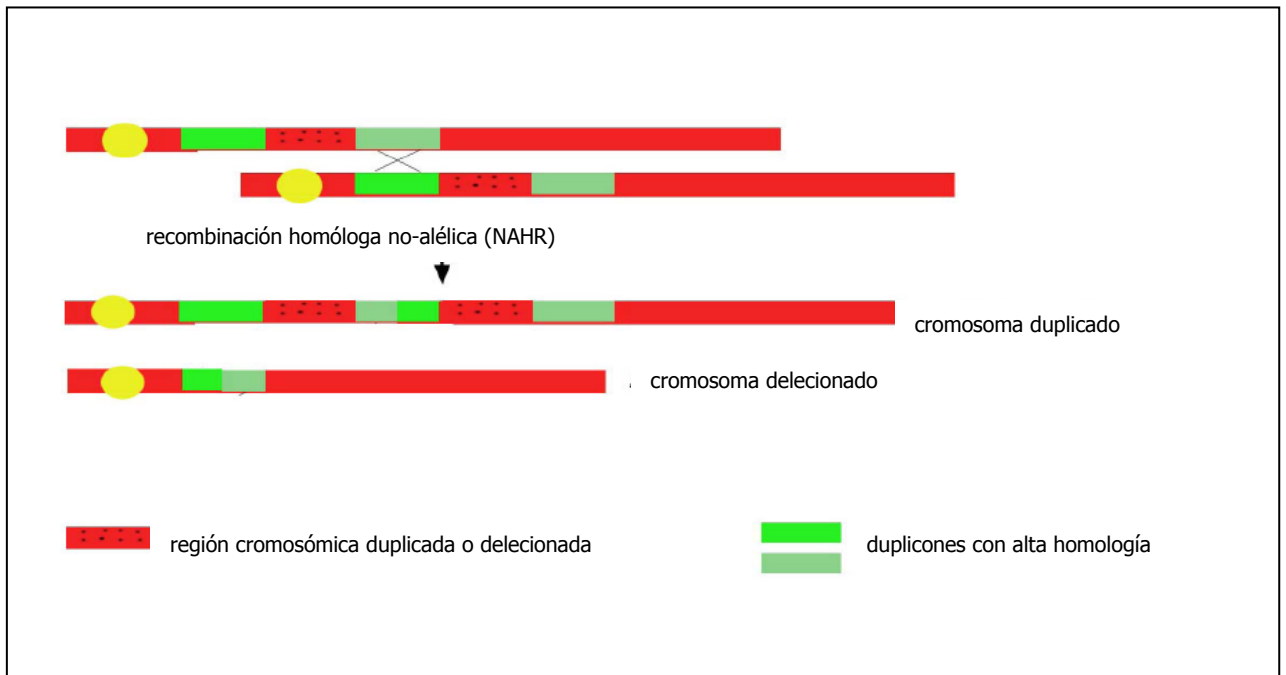
formación de nuevos genes por fusión y/o fisión, y la creación de proteínas con nuevas funciones. Ya en 1970 Ohno propuso que las duplicaciones de genes y genomas eran el motor de generación de nuevos genes y de su evolución adaptativa. Según Bailey et al 2003, la explosión de la actividad de retrotransposición de Alu específica de primates, hace 35-40 millones de años, es la principal causa del reciente boom de DS en el genoma humano. Otro mecanismo conocido de formación de duplicaciones es el sobrecruzamiento desigual. Después de su formación, estos segmentos duplicados se tienen que fijar, es decir expandirse por la población y luego mantenerse (Levasseur et al, 2011). Se calcula que alrededor del 15% de los genes del genoma humano han aparecido por duplicación.

Por su parte Goidts et al en 2006 estudian las CNVs en DS en diferentes poblaciones, encontrando que aunque la frecuencia era similar en las diferentes poblaciones estudiadas, el número de patrones de variación en un determinado *locus* sí era significativamente mayor en población caucásica y asiática que en africanos. A partir de esto concluyen que las variaciones en las DS son debidas a reordenamientos genómicos recientes. Las duplicaciones segmentarias surgen como repeticiones en tándem de un segmento de ADN con el subsiguiente reordenamiento que sitúa a las copias duplicadas en diferentes *loci* cromosómicos. Alternativamente podrían surgir de copiar un fragmento genómico y transponerlo de una localización a otra.

Las duplicaciones genómicas son un mecanismo aceptado de formación de nuevos genes y de diversificación funcional y expansión de familias de genes. La selección natural opera en esas nuevas copias duplicadas, que pueden adquirir una nueva función (neofuncionalización) o modificada (subfuncionalización). Las duplicaciones parciales o incompletas son más frecuentes, y estos segmentos se quedan en el genoma como pseudogenes (Marques-Bonet et al 2009). Aunque los pseudogenes se asume que han perdido las funciones codificantes originales de sus genes parentales mediante formación de codon stop o mutaciones frameshift, hay estudios que indican que puedan tener cierto papel regulador (Sasidharan et al 2008). Se ha observado que la presencia de DS confiere inestabilidad genómica, produciendo

reordenamientos cromosómicos, CNVs, que dan lugar a más del 25% de las denominadas enfermedades genómicas. Otras CNVs se consideran variantes benignas que producen diversidad en la población humana. Parece que las CNVs asociadas con DS se producen por mecanismos de recombinación homóloga no alélicas (abreviada generalmente como NAHR, del inglés *non-allelic homologous recombination*) (Eichler, 2001).

Figura 13.- Recombinación homóloga no-alélica.



La NAHR es un proceso (Fig.13) por el que duplicaciones segmentarias en el mismo cromosoma pueden facilitar cambios en el número de copias de

esas regiones. El alto grado de identidad en la secuencia de las DS favorece un desalineamiento de los cromosomas durante la meiosis haciendo que la recombinación se produzca entre loci parálogos en vez de homólogos. Como consecuencia se producen deleciones, duplicaciones o inversiones en las regiones vecinas de secuencia única, es decir se producen cambios en el número de copias de un gen, o de parte de él, contenido entre las DS. Cuando el fragmento de DNA duplicado se inserta de forma directa sobre la copia progenitora, el resultado de la NAHR serán deleciones y duplicaciones. Si el duplicón se inserta de manera invertida, se formarán inversiones. Si la NAHR se produce entre duplicones intercromosómicos, resultarán translocaciones (Fig.14).

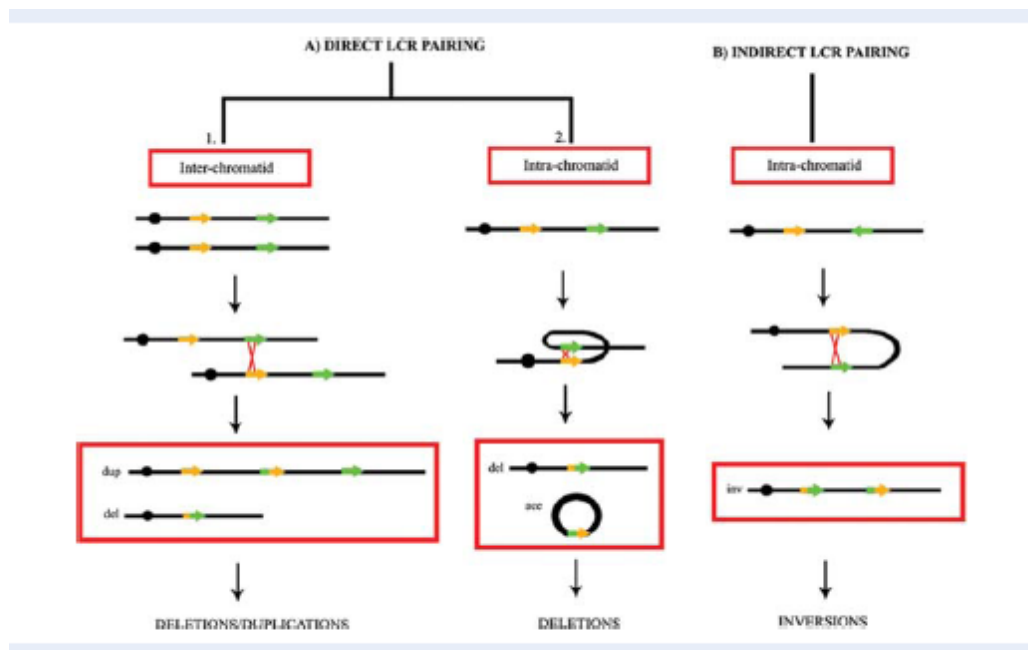


Figura 14 (Molina et al 2010).- Diferentes NAHR según la orientación de las DS

Las NAHR pueden ocurrir también en mitosis dando lugar a mosaicismos. Esto se ha visto en cáncer pero también en personas sanas en las que se han detectado mosaicismos, en sangre, de duplicaciones o deleciones. Gu et al en 2008 en su interesante artículo sobre los mecanismos de los reordenamientos genómicos insiste en la importancia de que exista una gran similitud en la identidad de los LCR. Además concluye que existen puntos calientes para la

mayoría de las NAHR en las duplicaciones segmentarias, siendo diferentes los de meiosis a los de mitosis (Turner et al 2008). También parece que hay otras diferencias: mediante NAHR se producen más deleciones que duplicaciones, y se ha visto en diferentes enfermedades que la frecuencia de NAHR varía según la gametogénesis sea femenina o masculina.

Además de la formación de CNVs en individuos normales, las NAHR pueden resultar en grandes polimorfismos estructurales y reordenamientos cromosómicos que directamente conduzcan a una inestabilidad genómica, o a desórdenes de aparición temprana, altamente penetrantes. La probabilidad de recombinación homóloga aumenta con la similitud de secuencia y el tamaño del duplicón (el síndrome de microdelección más frecuente, Digeorge, 1/3.000, ocurre entre bloques de duplicaciones de más de 300kb con un 99,7% de identidad de secuencia), pero se ha visto que el mínimo segmento necesario para recombinación es de pocos cientos de pares de bases, encontrándose además puntos calientes en los duplicones. Igualmente la frecuencia de NAHR entre duplicaciones segmentarias aumenta a medida que disminuye la distancia entre las DS.

El conocimiento del mecanismo molecular de la NAHR con sustrato en DS ha permitido que se puedan predecir potenciales "sitios calientes" de reordenamientos, a partir de la localización de las DS, descubriendo nuevos síndromes de deleción, y de su recíproca duplicación.

Según Sankaranarayanan 2006, el inicio de la NAHR parece que es similar a como se produce en la Reparación por Recombinación homóloga (HRR, del inglés *homologous recombination repair*) en la que tras producirse una rotura de doble cadena (en el caso de HRR es una rotura programada en profase I para favorecer la recombinación) se inicia el mecanismo de reparación. Este autor, en su artículo sobre el riesgo genético de las radiaciones ionizantes, baraja la hipótesis de que la NAHR en las duplicaciones segmentarias sea el mecanismo más frecuente de producción de deleciones en los ovocitos, mientras que el mecanismo reparador de las roturas de doble cadena (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) produce deleciones en las espermatogonias.

La reparación por NHEJ es uno de los dos principales mecanismos utilizado por las células eucariotas para reparar las roturas de doble cadena (DSB): identifica la rotura, establece un puente molecular entre los dos finales de DNA rotos, los modifica para hacerlos compatibles y los liga. En este mecanismo no se necesita un sustrato de DS, pero igualmente puede producir un desbalance por adición o delección de nucleótidos en los finales. Este mecanismo produciría las CNVs en las regiones subteloméricas, sin necesidad de un sustrato de DS, iniciándose en regiones pobres en CG que son termodinámicamente menos estables y son por tanto mas propensas a las roturas.

Además de NAHR y NHEJ, se ha descrito el tercer mecanismo de producción de reordenamientos genómicos en humanos: FoSTeS (de las siglas *Fork Stalling and Template Switching*). Este mecanismo, que es un error de la replicación basado en la microhomología en las uniones, explicaría reordenamientos complejos como esa aparente duplicación que realmente está interrumpida por fragmentos triplicados y delecionados, encontrada en Xq22 en pacientes con PMD (Pelizaeus-Merzbacher disease) (Lee et al 2007). Las regiones donde se ha detectado Fostes también tienen una arquitectura particular, siendo ricas en Alu y con alto contenido en CG (Fig. 15).

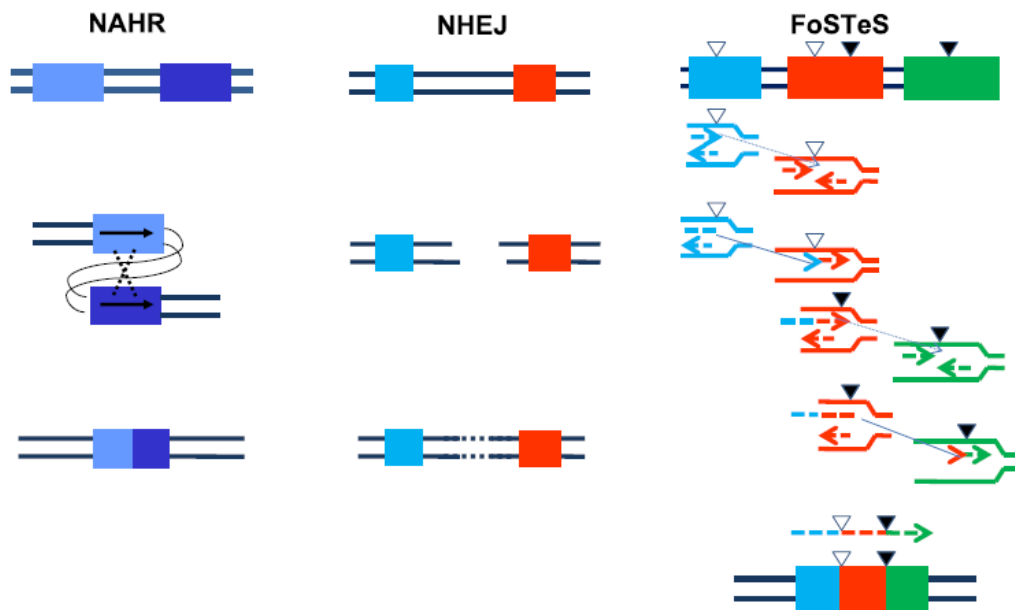


Figura 15.- Mecanismos de producción de reordenamientos genómicos: recombinación homóloga no-alélica (NAHR), unión de finales no-homólogos (NHEJ) y Fostes.

Erdogan et al 2006 estudian las DS en dos grupos de pacientes con retraso mental: uno con reordenamientos cromosómicos desequilibrados y otro con translocaciones equilibradas, y encuentran DS en los puntos de rotura de ambos grupos, pero la similitud de secuencias era muy frecuente en el grupo de desequilibrados respecto al de translocaciones equilibradas, evidenciando que es más común NAHR en los reordenamientos pequeños intracromosómicos, debido probablemente a la cercanía.

Desde el punto de vista evolutivo parece que las regiones ricas en DS son más propensas a generar CNV, que a la larga podrían fijarse en la población resultando en DS. Este fenómeno lo comentan Kim et al en 2008, como "el rico se hace más rico", apoyando la hipótesis de que la formación de DS está mediada por DS preexistentes, que a su vez se originaron mediante Alu. En una época más reciente las CNV aparecen mediadas por DS, y son en definitiva DS jóvenes. Se está produciendo por tanto un cambio en la generación de reordenamientos genómicos.

Sin embargo no todas las CNVs parecen asociadas a DS, solo el 28%. Es posible que algunas, no asociadas a SD, se formen por mecanismos mutacionales basados en no-homología. Estas CNVs parece que son de menor tamaño que las asociadas a DS. Kim et al en 2008 encontraron que las CNVs no muestran una asociación significativa con elementos Alu, por lo que no parece que sea el mecanismo de formación de las actuales CNVs, aunque sí tuvieron su importante papel en el pasado en la formación de DS.

En un estudio reciente de síndrome de Williams y duplicaciones segmentarias los autores (Cuscó et al, 2008) demuestran que grandes CNVs pueden actuar como alelos de susceptibilidad para reordenamientos genómicos, asociados a enfermedad, en la descendencia.

Un cromosoma bien estudiado en cuanto a su composición en DS es el cromosoma 16: es especialmente rico en DS. Durante la reciente evolución de los primates, el 16 tuvo una intensa actividad de formación de duplicaciones segmentarias hasta tal punto que mas del 10% de la región eucromática de su brazo corto tiene complejas LCR, siendo por tanto un excelente candidato para nuevos síndromes de microdelección.

### **1.7- ARRAYS DE CGH: Panorámica actual**

Se estima que en EEUU ya se están haciendo al año más de 10.000 aCGH para diagnóstico clínico. El aCGH está indicado en pacientes con cariotipo normal y un cuadro clínico con retraso mental o del desarrollo idiopático, anomalías congénitas o rasgos dismórficos, trastornos autistas o presentaciones que sugieran un síndrome cromosómico concreto. Además está indicado en pacientes con translocaciones aparentemente equilibradas con un fenotipo clínico anormal; en presencia de duplicaciones o deleciones en el cariotipo para determinar los límites de la región alterada; cuando se identifiquen cromosomas marcadores, para determinar su origen.

De forma general, los aCGH no están sustituyendo al FISH, sino que es una técnica complementaria con sus ventajas de rapidez de resolución y de alta

cobertura, pero mientras tenga limitaciones, el cariotipo y el FISH todavía se seguirán utilizando.

En 2009 Sagoo et al en un meta-análisis de 13.926 pacientes encuentran una tasa de detección de 10%, y concluyen que su estudio de revisión apoya la utilización del aCGH en el diagnóstico del retraso mental, pero terminan diciendo que su uso debe hacerse con precaución dadas las dificultades que pueden surgir en la interpretación, añadiendo que se necesitan más estudios de evaluación.

El grupo francés de Jaillard et al en 2010 propone incluir estudios de aCGH a pacientes independientemente del nivel de retraso mental, así como ofrecerlo al máximo número de pacientes.

La Sociedad Americana de Genética Humana ha establecido un consenso (Miller et al 2010) basado en los resultados de los estudios llevados a cabo por el Consorcio Internacional de Array Citogenético (ISCA) en los que revisaron datos de 21.698 pacientes analizados con arrays: los microarrays cromosómicos es el primer test diagnóstico a realizar en individuos con retraso mental o anomalías congénitas. El cariotipo debe reservarse para pacientes con síndromes obvios, familias con reordenamientos cromosómicos o historia de múltiples abortos. Este consorcio publica ya unas recomendaciones de actuación que se resumen en el siguiente esquema (Fig. 16):

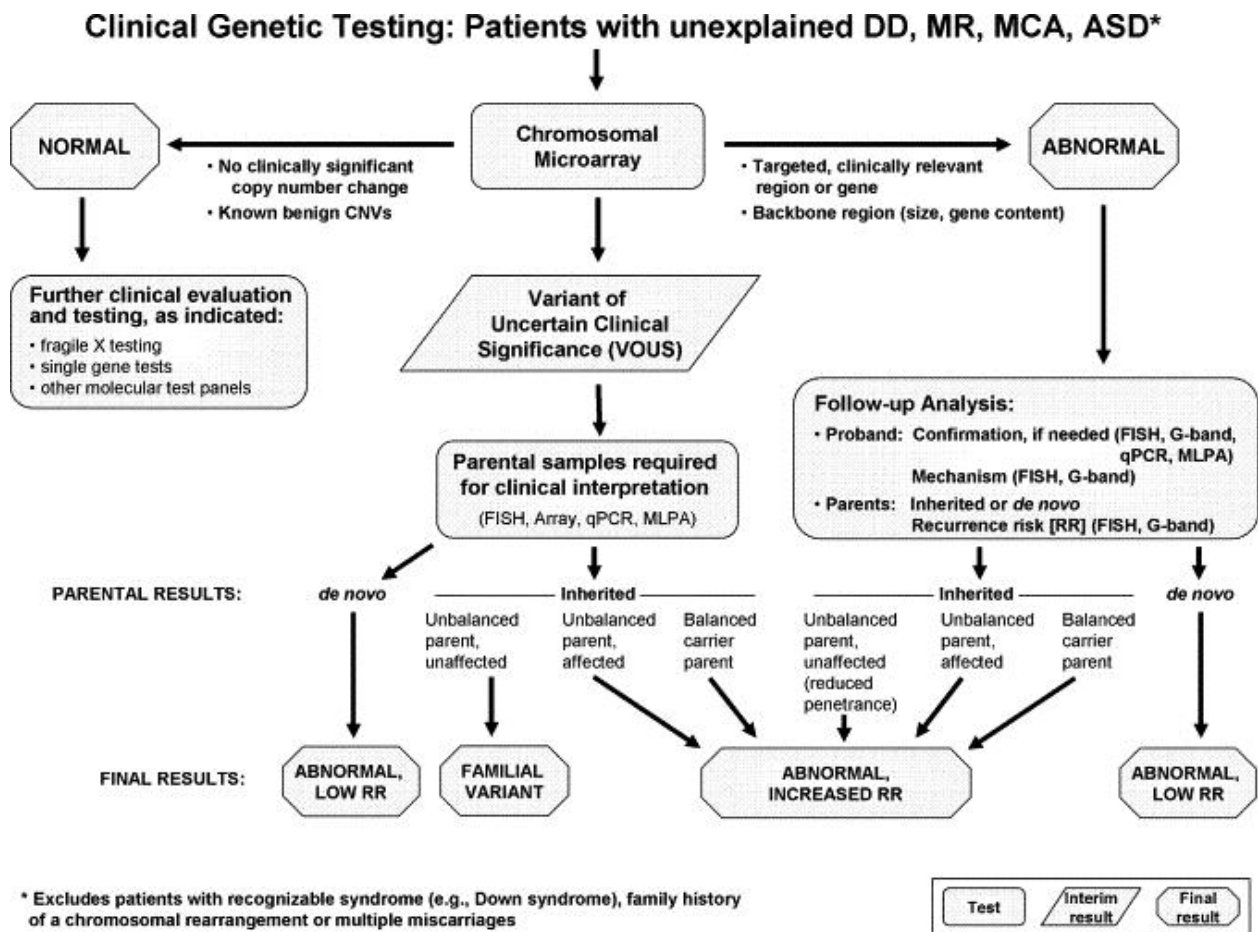


Figura 16.- Algoritmo de estudio genético en individuos con retraso mental, del desarrollo, con múltiples defectos congénitos y con trastornos del espectro autista, según consenso ISCA.

En Reino Unido, introducen en 2009 el array CGH como primer test diagnóstico, antes del cariotipo, en pacientes con sospecha de desequilibrio genómico tras una valoración de coste efectividad (Ahn et al 2010).

En los dos últimos años aparecen publicaciones de grandes series dando sus tasas de detección en todo tipo de pacientes, incluso en diagnóstico prenatal. Evangelidou et al 2010 obtienen una tasa de detección del 12% con una array genómico en una muestra de 25 gestaciones seleccionadas por anomalías ecográficas, aunque si se tiene en cuenta sólo las CNVs patogénicas, la tasa baja al 8%. Concluyen que es una buena herramienta, pero sólo para casos seleccionados con patología. Hacerlo a modo de análisis prenatal rutinario parece que resulta prematuro. Recientemente Hillman et al 2011 hacen una

revisión sistemática y un metanálisis de los aCGH en diagnóstico prenatal concluyendo que es una herramienta potente pero que el significado incierto de muchos hallazgos no recomienda su utilización de forma general en los arrays, pues entre otras cosas, aumentaría el coste por la complejidad del consejo genético. En este mismo área, Armengol et al 2011 presentan los resultados de un estudio multicéntrico de 900 gestaciones concluyendo que es un método adecuado de detección de desequilibrios genómicos en gestaciones de riesgo, encontrando un 6,3% de CNV con significado clínico, y alcanzando el 13,3% en el grupo de gestaciones con hallazgos ecográficos patológicos.

Ya hay datos de grupos que siguen las recomendaciones del Consenso Isca y utilizan el CGH array como primer test tanto prenatal como postnatalmente, con plataforma libre y buenos resultados (Park et al 2011).

Aún así nos queda todavía mucho camino en el aCGH: algunos laboratorios claman por realizar esfuerzos en estandarizar protocolos, definir criterios de calidad y desarrollar guías de informe.

Es importante realizar estudios multidisciplinarios para establecer la precisión, las indicaciones y la eficacia de los aCGH.

Y quizá lo más importante, estudios de funcionalidad de genes para conocer la trascendencia de las alteraciones detectadas.

## **1.8- EFICACIA, EFICIENCIA Y COSTE/EFFECTIVIDAD.**

En el contexto actual de la incorporación de las técnicas genómicas a la práctica clínica y su posible impacto socio sanitario, es también necesario hacer una reflexión sobre los costes derivados de dicha incorporación. Para estudiar este tema con cierto rigor los conceptos básicos son eficacia, eficiencia, y rendimiento diagnóstico.

Así, se entiende por eficacia la capacidad de alcanzar el efecto que se espera o se desea tras la realización de una acción. Eficiencia se refiere al uso racional de los medios para alcanzar un objetivo predeterminado, es decir cumplir un objetivo con el mínimo de recursos disponibles y tiempo. El

rendimiento diagnóstico se calcula como el número de pruebas con resultado informativo de patología, y es la medida de efectividad más útil en las pruebas genéticas (Gutierrez Agulló M 2011).

Entre los resultados de los aCGH podemos encontrarnos CNV benignas, que se consideran resultados normales, CNV de significado clínico, que se consideran patogénicas y CNV de significado incierto que serían los falsos positivos, y no se pueden tener en cuenta en el rendimiento diagnóstico. Las CNVs de significado incierto representan un problema añadido siendo el factor limitante de este tipo de pruebas. Generan incertidumbre y más gasto, pues implica realizar estudios en padres y en ocasiones en hermanos. Por lo tanto el rendimiento diagnóstico, la efectividad, nos la dará el porcentaje de casos con resultado patológico.

El segundo paso del estudio del impacto derivado de la incorporación de estas tecnologías es la comparación o el análisis de los beneficios que la incorporación puede suponer. Dada la dificultad de la medida del beneficio en enfermedades crónicas, donde las medidas tradicionales de la efectividad como las AVAC (años de vida ajustados por calidad) no son útiles, es necesario buscar medidas de utilidad.

Según Gutierrez Agulló 2011, en las pruebas genéticas hay que tener en cuenta no sólo la utilidad clínica sino también la utilidad personal. La utilidad clínica puede considerarse la suma del desenlace del paciente + el impacto de la información para el clínico. La utilidad personal es la suma del impacto de la información para el paciente + establecimiento del riesgo.

El reciente "Consenso para la Implementación de los Arrays en la Genética Clínica" editado por el Instituto Roche en marzo de 2012, en su capítulo de evaluación económica hace una revisión sistemática de coste-efectividad, y se centran finalmente en los estudios de Wordsworth et al 2007 y de Regier et al 2010. En ambos estudios se concluye que es más coste efectivo realizar arrays de CGH como primera línea diagnóstica en pacientes con discapacidad intelectual, en lugar de hacer cariotipo y luego FISH.

Aunque es objetivo de los responsables sanitarios la evaluación económica de las tecnologías sanitarias para tomar decisiones eficientes y que

aseguren la maximización de la salud de la población, en este trabajo se ha pretendido hacer un estudio básico de costes y beneficios de la alternativa diagnóstica al cariotipo como es el CGH array. Trataremos de evaluar si la efectividad adicional compensa sus costes adicionales.



## **2- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



## **2- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

El presente trabajo desarrolla un proyecto de investigación que tiene por objetivo evaluar la eficacia de una prueba diagnóstica, los microarrays basados en la Hibridación Genómica Comparativa (aCGH), de reciente aparición, comparándola con la eficacia del cariotipo en pacientes con discapacidad intelectual y con dificultades en su diagnóstico. Se presenta, además, un estudio descriptivo de sus hallazgos, de las características genéticas de las variantes detectadas así como de las características clínicas de los pacientes.

La evaluación de una prueba diagnóstica antes de generalizar su uso permite: eliminar pruebas inútiles o de poco valor antes de ser aceptadas, mejorar la calidad de la información disponible sobre la aplicabilidad de la prueba, reducir los costes sanitarios, mejorar la asistencia al paciente.

Se trata de un proyecto de relevancia científica y socio-sanitaria pues afecta directamente al diagnóstico de la discapacidad intelectual, a su consejo genético y a la posible descripción de genes candidatos que a largo plazo sean bases de intervenciones terapéuticas.

Dado el impacto que supone en el proceso de diagnóstico del paciente con discapacidad intelectual, creemos necesario este estudio de eficacia en nuestra población antes de que pase a ser una técnica diagnóstica de rutina en la práctica clínica. La variable predictora será el aCGH y la prueba de referencia a utilizar será el cariotipo convencional.

Desde la reciente aparición de esta tecnología hay mucha literatura científica que ofrece resultados primeramente como casos aislados y, en las últimas publicaciones, como series de casos. Los resultados aportados en esos estudios son muy válidos, y nos permitirán hacer comparaciones, pero existen cuestiones que aún están sin resolver, que trataremos en este proyecto y que quedan especificadas en los objetivos.

Las recomendaciones recientes que avalan el mayor rendimiento diagnóstico del array de CGH en niños con retraso, y los estudios de coste efectividad nos van a conducir a una toma de decisiones como es la posibilidad de sustituir el cariotipo, técnica fuertemente afianzada, por el aCGH en estos casos.

Esto nos obliga por tanto a hacer un estudio, en nuestro medio, ya no sólo de la eficacia de la nueva herramienta diagnóstica, sino la valoración de su coste-efectividad.

## **3- OBJETIVOS**



### **3- OBJETIVOS**

**1-** Evaluar la eficacia del aCGH como primera técnica diagnóstica para el estudio genético en aproximadamente 100 niños con discapacidad intelectual y/o trastornos del espectro autista, procedentes del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario de Móstoles que presentan un cariotipo normal. Para ello se analizarán las siguientes variables:

- Determinar la tasa de detección de alteraciones de número de copias (CNVs)
- Comparar el rendimiento diagnóstico de esta tecnología con el método estandarizado de detección de anomalías (cariotipo).
- Describir las características genéticas y genómicas de las CNVs asociadas a patología clínica.
- Coste-efectividad

**2-** Realizar una investigación clínica que, contribuyendo al esclarecimiento de las causas de la discapacidad intelectual, esté centrada en:

- Tras su análisis, clasificar las CNVs en patogénicas y/o benignas atendiendo a criterios publicados, a la biología de la enfermedad, así como al conocimiento recogido en bases de datos públicas, y colaborar con dichas bases de datos proporcionando nuevos hallazgos.
- Caracterizar el tamaño e identificar los genes implicados en las reestructuraciones y proponerlos a la comunidad científica como genes candidatos al retraso mental.
- Estudiar la validez clínica de los hallazgos y eficacia según subgrupos clínicos.
- Describir y caracterizar nuevos síndromes, correlacionando hallazgos clínicos con los de los arrays que permitan definir indicaciones de la prueba genética.
- Mejorar el diagnóstico de la discapacidad intelectual en nuestros pacientes, con todos los beneficios que esto representa para el paciente y su familia incluido un asesoramiento genético más preciso.



## **4- MATERIALES Y MÉTODOS**



## **4- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1- SUJETOS DE ESTUDIO**

Los pacientes seleccionados para este estudio proceden del Servicio de Neuropediatría del Hospital Universitario de Móstoles, remitidos para estudio genético a la Unidad de Genética por presentar discapacidad intelectual de etiología no filiada. Los criterios clínicos de inclusión, ya descritos por Vries et al 2001, incluyen la presencia de retraso mental o de desarrollo, trastornos del espectro autista, rasgos dismórficos y/o anomalías congénitas. La evaluación clínica consiste en la elaboración de la historia clínica de cada paciente junto con la recopilación y análisis de los resultados de otras pruebas diagnósticas ya realizadas; la elaboración de un árbol genealógico de tres generaciones prestando atención especial a la presencia de retraso mental, alteraciones psiquiátricas y la presencia de malformaciones congénitas. Todos los pacientes incluidos en el estudio deben tener cariotipo previo normal, con un nivel de bandas GTL de 500. En caso de que cumplan criterios de sospecha de síndrome X frágil, se procederá a descartarlo antes de realizar el aCGH.

En cualquier caso, y para todos los pacientes hay una primera consulta, otro día de extracción de sangre y firma del consentimiento, y una tercera cita de entrega de resultados y consejo genético.

El número de pacientes que son remitidos habitualmente por Neuropediatría a la Unidad de Genética, para estudios genéticos de retraso mental, son aproximadamente 25 al año, por lo que en estos cuatro años se han podido recoger una muestra de aproximadamente 100 pacientes, adecuada y representativa para poder sacar conclusiones.

Se ha incluido también una población control de 230 pacientes con cariotipo, procedentes de la misma consulta y con características similares.

La muestra elegida es representativa de los pacientes que se atienden en cualquier consulta de neuropediatría. Evitamos la selección de los pacientes más graves, que conduciría a sobreestimar la sensibilidad de la prueba. No

obstante en el análisis de resultados se tratará de agrupar pacientes en función de características clínicas, para establecer comparaciones de eficacia.

#### **4.2- ASPECTOS ÉTICO-LEGALES**

Se solicitó a todos los pacientes o a sus padres/tutores consentimiento informado escrito para la toma de muestra de sangre y de fotografías tal y como requiere la Ley Básica reguladora de la Autonomía de Paciente y de Derechos y Obligaciones en materia de información y documentación clínica (Ley 41/2002, de 14 de noviembre). Se informó a los padres de la posibilidad de no detectar alteraciones, de encontrar alteraciones causales o de detectar alteraciones del número de copias de significado incierto.

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción periférica.

En aquellos casos que lo requirieron se hizo estudio a los padres para descartar herencia de la alteración detectada.

Toda la información clínica y de laboratorio se mantiene con la confidencialidad habitual que requieren los datos de los registros médicos para investigación.

Los padres o tutores de los pacientes tienen la opción de solicitar en cualquier momento que sus datos médicos, fotografías, o material biológico sea retirado de la base de datos creada a partir de este proyecto de investigación.

Especial consentimiento se solicitó a aquellos pacientes que por la relevancia de su patología interesó incluirlos en la base de datos DECIPHER.

#### **4.3- ESTUDIOS DE CITOGENETICA CONVENCIONAL**

El cariotipo de todos los pacientes se realizó, a partir de linfocitos de sangre periférica, en el laboratorio de Genética del Hospital de Móstoles. Se obtienen metafases tras un cultivo de 72 horas con RPMI y fitohemaglutinina, siguiendo los protocolos habituales. Tras el cultivo se utiliza Colcemid para

detener las mitosis en metafase, CLK como choque hipotónico para romper la célula y liberar los cromosomas, y solución carnoy (metanol y ácido acético) para fijar y limpiar el material a extender en portaobjetos.

Se analizan con microscopio un mínimo de 15 metafases por paciente tras un bandeado GTL (Giemsa, Tripsina, Leishman). Se cariotipan al menos 2 metafases con el analizador de imágenes de Metasystems a través de su software Ikaros.

El laboratorio de Genética cuenta con certificación ISO 9001 de gestión de la calidad.

Los informes de los cariotipos se hacen de acuerdo a la nomenclatura internacional (ISCN 2009).

#### **4.4- ESTUDIOS DE FISH**

Se utilizaron técnicas de FISH en aquellos casos en los que clínicamente se sospeche un síndrome de microdelección o como ayuda diagnóstica al cariotipo.

Se utilizaron sondas comercializadas de Vysis. Tras desnaturalización de la sonda marcada con fluoróforo y del portaobjetos con la muestra, se deja hibridar toda la noche a 37°. Se contrastan con DAPI para ver el perfil de los cromosomas.

Se visualizan con microscopio de fluorescencia y las imágenes se procesan con el software Isys también de Metasystems.

En los estudios de confirmación del hallazgo patológico del array, se utilizó el FISH en metafase para localizar en el cromosoma la CNV y descartar translocaciones en progenitores. En estos casos se utilizaron sondas BlueFISH diseñadas para la región de interés, y proporcionadas por Genycell.

#### **4.5- ESTUDIOS DE ARRAYS de CGH**

Los análisis de CGH-arrays se enviaron a un laboratorio externo de referencia para arrays (NIMGENETICS) autorizado por la Comunidad de Madrid. Este laboratorio dispone de la infraestructura, aparatos y personal cualificado para realizar este tipo de técnicas.

Inicialmente se eligió una plataforma de oligos de 44K de Agilent por ser una plataforma equilibrada en cuanto a potencia diagnóstica y detección de CNVs de significado incierto, tal como han apuntado varios autores como Fan et al en 2007. NIMGenetics ha realizado la validación técnica de su plataforma antes de utilizarla como herramienta diagnóstica.

El array utilizado contiene 44.290 sondas de oligonucleótidos de 60 bases incluyendo 42.920 sondas biológicas y 1.370 sondas control internas. Estas sondas de oligos cubren el genoma con una resolución 200 Kb. El 84% de las sondas residen en regiones intragénicas (50% intrones y 50% exones) y el resto son sondas intergénicas. Quedan representados 30.000 genes por al menos una sonda cada, mientras que el resto, 1.100 genes relevantes en cáncer, están representados por dos o mas sondas.

A partir de 2010 se utilizó un array de 60K de Agilent, en el mismo laboratorio, con sondas menos específicas de cancer.

Se hace extracción de ADN genómico de los linfocitos de sangre periférica de los pacientes. Después de la hibridación y el lavado, el soporte se escanea en el Scanner Agilent Microarray. Se utiliza el algoritmo ADM-2 (Aberration Detection Method Algorithms) que identifica los intervalos aberrantes en una muestra dando unos log ratios consistentes altos o bajos en función de un score estadístico.

Se ha preferido utilizar plataforma genómica, y no dirigida, porque abre la posibilidad de identificar nuevas alteraciones.

Se ha definido como tres el numero de sondas juntas que deben aparecer delecionadas para considerarse deleción o duplicación. Con esta

astringencia, aunque se puede perder resolución, se disminuyen los falsos positivos.

En algunos casos se enviaron los estudios al Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital La Paz, donde se ha utilizado primeramente la plataforma de Agilent Karyoarray v2.0 y después la plataforma KaryoArray v3.0 de Agilent, que permite ver pérdidas o ganancias de más de 25Kb en regiones de máximo interés y de más de 400Kb en el resto del genoma.

Para la interpretación de los resultados de los arrays se utilizó en primer lugar la base de datos de variantes genómicas canadiense [http://dgvbeta.tcag.ca/gb2/gbrowse/dgv2\\_hg19/](http://dgvbeta.tcag.ca/gb2/gbrowse/dgv2_hg19/)

Se clasificaron las variantes de acuerdo a los criterios consensuados por ISCA (International Standard Cytogenomic Array Consortium) y publicados por Miller et al 2010. El consorcio Isca es un grupo independiente internacional formado por voluntarios expertos en el campo de los arrays para explorar y mejorar cuestiones sobre estandarización de los arrays, y hacer recomendaciones basadas en la evidencia.

Aquellos casos que tuvieron un resultado de array con significación clínica, ó con significado incierto, se introdujeron en la base de datos DECIPHER previo consentimiento de las familias, con el fin de encontrar fenotipos similares. Dado que DECIPHER exige la introducción de coordenadas genómicas en constructo GRCh37 hg19 para una cohesión en los resultados, se remapearon las coordenadas que estaban mapeadas con el constructo anterior (NCBI36 hg18) utilizando el servicio de remapeo del NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/remap>.

#### **4.6- ASPECTOS METODOLÓGICOS:**

- Se considera poco probable detectar inconsistencia de resultados por ser una muestra homogénea en cuanto a los criterios de captura de los pacientes y a las plataformas de arrays utilizadas.

- Dado que la probabilidad pretest de detección es aproximadamente el 10%, se ha considerado que 100 es un número adecuado de pacientes para encontrar al menos 10 CNVs.

- Se entiende por tasa de detección, o rendimiento diagnóstico, como el número de pacientes con CNVs, detectadas por array de CGH, que se definieron como causales, dividido por el número de pacientes analizados.

- Se considera que la técnica empleada tiene validez clínica cuando aporta mayor información diagnóstica que otras pruebas ya utilizadas.

- La utilidad clínica viene determinada por el impacto que el diagnóstico genético tiene sobre el paciente y su familia.

- La validez analítica la realiza el laboratorio y hace referencia a la especificidad y a la sensibilidad.

- La significación clínica de una variante de número de copia se determina de siguiendo los criterios Isca consensuados y publicados recientemente:

Se considera variante patogénica si se observa que segrega con la enfermedad en la familia; el reordenamiento está asociado ya a algún fenotipo reconocido; porque el tamaño de la variante es tan grande que no parece que no tenga significación clínica; porque sea rica en genes o porque contenga genes OMIM.

Se consideran variantes benignas (no causales) si un padre fenotípicamente normal lleva la misma variante (en estos casos nos aseguramos que los puntos de rotura sean los mismos) o si está descrita en bases de datos de variantes.

- Se entiende por falsos positivos como el número de pacientes que tienen CNVs detectadas por aCGH que se definieron como no causales, o de significado incierto, dividido por el número total de pacientes analizados.

- La comparación con la tasa de detección del cariotipo convencional y FISH se hará con el mismo tipo de pacientes, del propio laboratorio de genética.

#### **4.7- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se realizó análisis estadístico para determinar si alguna de las variables clínicas era un indicador de la presencia de reordenamientos genómicos, mediante Chi cuadrado. Se establecieron tablas de contingencia de 2x2 y análisis mediante prueba de Fisher en los casos que se requirió. Se consideró un nivel de significación estadística  $p < 0,05$ .



## **5- RESULTADOS**



## **5- RESULTADOS**

El número de pacientes analizados con CGH arrays ha sido 96. Todos ellos presentaron cariotipo normal previo.

En 52 casos (54,2%) se encontró algún cambio genómico. Por tanto en 44 no se encontró ninguna CNV (45,8%).

De los 52 casos, en 11 casos se encontró que la CNV era de tipo causal (11,4%): 4 de ellas fueron de novo, 4 heredadas y 3 pendientes de confirmar. Entre las heredadas hubo un paciente con 2 CNVs causales, una del padre y otra de la madre, siendo un ejemplo de "doble hit" que se comentará más adelante.

En 12 casos (12,5%) se detectó alguna CNV de significado incierto (VOUS del *inglés Variant of Uncertain Significance*), 7 de ellas de novo, 3 de origen materno y 2 de origen paterno.

Por tanto el total de casos con CNV no polimórficas fue 23 (24%).

73 fue el número de casos en los que no se encontraron variantes o se encontraron variantes polimórficas, benignas.

Para dar verdadera utilidad clínica a los resultados, se ha tratado de otorgar un valor a las VOUS, asignándoles un significado probablemente benigno o probablemente causal, consiguiendo una reclasificación más útil de las variantes genómicas encontradas.

### **5.1- CASOS CON CNVs PATOLÓGICAS (CNV CAUSALES):**

Los 11 casos con CNVs causales detectadas en la muestra quedan resumidas en la tabla 2.

Tabla 2.- Casos con CNV causales

nº CG	INDICACION ARRAY	SIGNIFICADO ARRAY	del/dup	Here dada	TAMAÑO	LOCALIZACION CROMOSOMICA	GENES OMIM
2579	R.madurativo + nistagmus pendulares + braquicefalia + hipotonia	CAUSAL	del	dn	1,78 Mb	22q13.2	SREBF2, TNFRSF13C, CENPM, SEPT3, WBP2NL, NAGA, NDUFAG, CYP2D6, NFAM1, SERHL, POLDIP3, CYB5R3, PACSIN2, TTL1

2273	RETR.COGNITIVO + Agenesia cuerpo calloso + hipotonía + facies peculiar	CAUSAL	del	?	10,2 Mb	3q13.33	PVRL3, CD96, PHLDB2, GCET2, CD200, BTLA, ATG3, CD200R1, BOC, SIDT1, NAT13, ATP6V1A, DRD3, ZNF80, GAP43, LSAMP, IGSF11, UPK1B, B4GALT4, CDGAP, CD80, ADPRH, PLA1A PPP2R5E, SYNE2, ESR2, MTHFD1, AKAP5, ZBTB25, HSPA2, SPTB, CHURC1, GPX2, FNTB, MAX, FUT8.
2649	RETRASO COGNITIVO + ESFEROCITOSIS. Apendice preauricular izdo+facies peculiar	CAUSAL	del	?	2,84 Mb	14q23.2	
2948	Retraso cognitivo. No dismorfia.	CAUSAL	del	mat	1,6 Mb	15q13.2	FAN1, MTMR10, TRPM1, MIR211, KLF13, OTUD7A, CHRNA7 SFPQ, NCDN, PSMB2, CLSPN, EIF2C4, EIF2C1, EIF2C3, TEKT2, ADPRHL2, COL8A2, TRAPPC3, THRAP3, STK40, C1orf102, MRPS15, CSF3R, GRIK3
2521	RETRASO MADURATIVO + hipotonía + facies peculiar	CAUSAL	del	?	2,04 Mb	1p34.3	
3053	RETRASO PSICOMOTOR+ MENOPAUSIA PRECOZ + fenotipo peculiar+ cardiopatía	CAUSAL	del	dn	2,52 Mb	22q11.21	TBX1 y 37 más s. Phelan Mcdermid
4804	TEA microcefalia TGD. Alteraciones	CAUSAL	del	dn	0,95 Mb	22q13.33	
2541	lenguaje. Retraso madurativo. Afectación sustancia blanca bilateral.	CAUSAL	del	pat	1,42 Mb	22q11.21	TBX1
2791	Hipoacusia izda, estrabismo.	CAUSAL + SI	del dup	dn pat	1,9 Mb 5,13Mb	18q23 6p11	CTDP1 + No genes OMIM TUBCGP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1 + SPANXN1 MTMR15, MTMR10, TRPM1, MIR211, KLF13, OTUD7A, CHRNA7 y UQCRC2, C16orf65, C16orf52, VWA3A, EEF2K, POLR3E, CDR2, RRN3P3
3099	TGD + rasgos dismorficos	CAUSAL+ SI	dup dup	mat mat	0,3 Mb 0,53 Mb	15q11.2 Xq27.3	
2897	RETRASO MADURATIVO + facies peculiar	CAUSALES	del del	mat pat	1,56 Mb 0,48 Mb	15q13.2 16p12.2	

A continuación detallamos cada caso detectado con CNV causal observada.

### Caso- 2579

Niño de 3 años que desde los 14 meses presenta un retraso madurativo, con nistagmus pendulares, braquicefalia e hipotonía.

En el array de 44K se detecta como única patología una **delección en 22q13.2** de 1,78 Mb (Fig. 17) que comprende 30 genes, entre ellos: SREBF2, TNFRSF13C, CENPM, SEPT3, WBP2NL, NAGA, NDUFAG, CYP2D6, NFAM1, SERHL, POLDIP3, CYB5R3, PACSIN2, TTLL1 (fig. 18).

El array realizado a los padres resulta sin cambios. Se trata por tanto de una alteración *de novo*.

Figura 17.- Imagen en detalle del cromosoma 22.

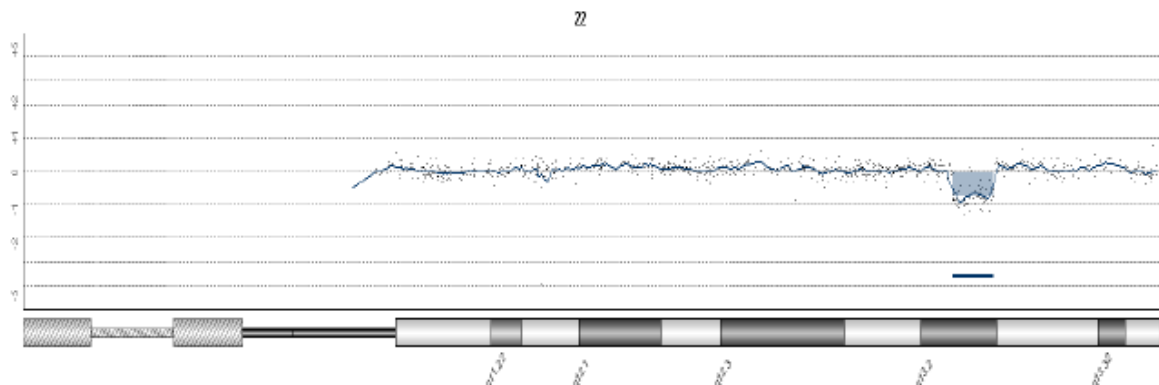


Figura 18 .- **Genes listados en OMIM de la región 22q13.2**

- SREBF2 (\*600481)
- TNFRSF13C (\*606269)
- CENPM (\*610152)
- SEPT3 (\*608314)
- WBP2NL (\*610981)
- NAGA (\*104170)
- NDUFAG (\*602138)
- CYP2D6 (+124030)
- NFAM1 (\*608740)
- SERHL (\*607979)
- POLDIP3 (\*611520)
- CYB5R3 (+250800)
- PACSIN2 (\*604960)
- TTLL1 (\*608955)

A pesar de que se desconoce la naturaleza patológica de los genes incluidos en la deleción, y de no haber encontrado pacientes en las bases de datos consultadas con deleciones que comprendan la misma región, el tamaño de la deleción, que sea *de novo* y que contenga tantos genes le atribuye la categoría de CNV causal. En concreto en la base de datos DECIPHER, aunque no se encontraron síndromes en esta región, sí que aparecen 16 pacientes con deleciones en esta zona, mas o menos variables, que aunque no tienen fenotipo único, comparten retraso mental o de desarrollo.

Se confirmó con FISH, con sonda específica de la región, la deleción en el paciente. Se confirmó con FISH en sus progenitores que se trataba de un evento "de novo" teniendo ambos progenitores las dos copias de 22q12.3 en su ubicación correcta.

En este caso por tanto se pudo informar a la familia el bajo riesgo de repetición en siguiente descendencia, salvo mosaicismo gonadal.

### Caso- 2273

Niña de 11 años, con retraso cognitivo y agenesia completa de cuerpo calloso. La talla está por encima del percentil 90.

El cariotipo resultó normal, con un nivel de 400-500 bandas (Fig. 19).

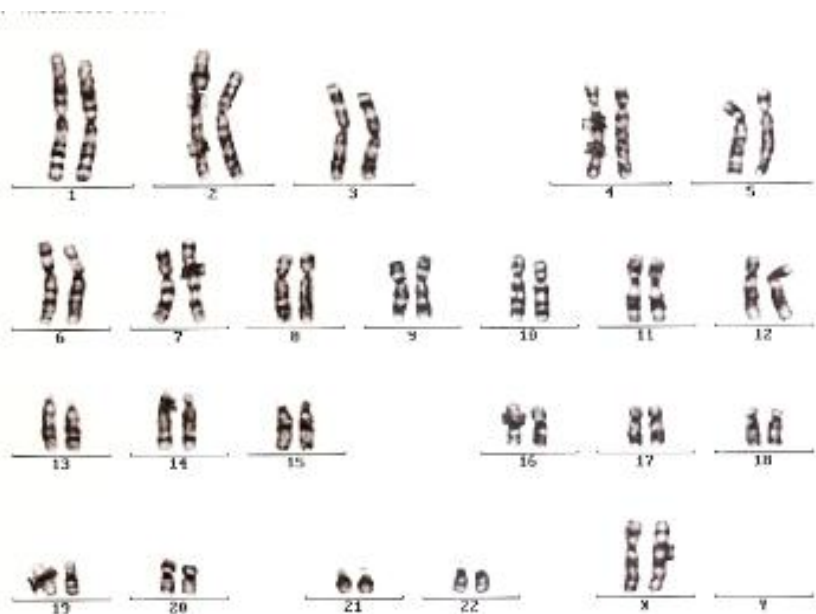


Figura 19.- Cariotipo convencional 46,XX de 500 bandas de resolución.

Sin embargo el análisis con array CGH de 44K evidenció una **delección en 3q13** de 10,26 MB (Fig. 20) y con más de 30 genes OMIM (Fig.21).

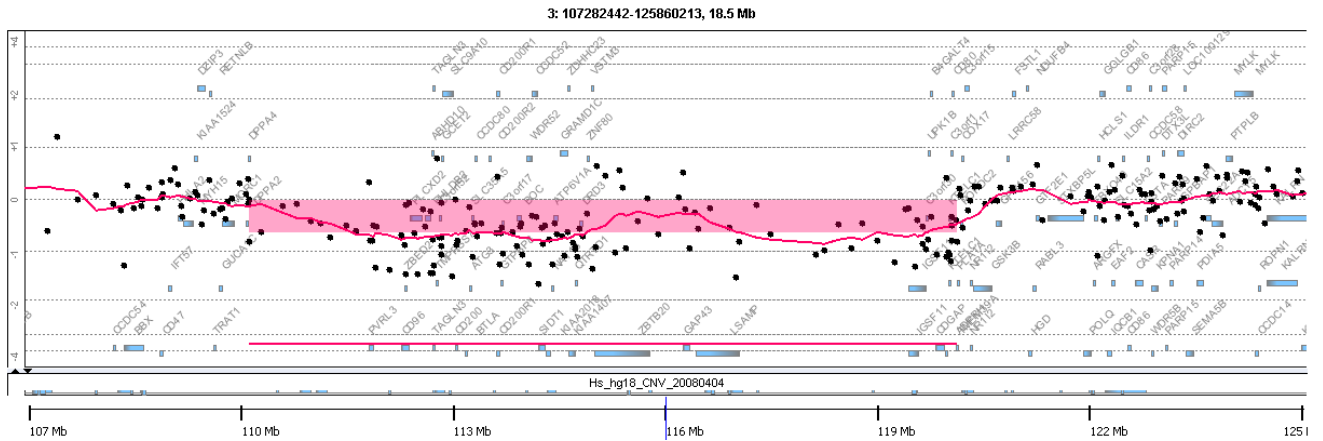


Figura 20.- Imagen en detalle del cromosoma 3.

Figura 21.- Listado de genes con anotación OMIM incluidos en la región 3q13.11q13.33

Inicio	Fin	Gen	OMIM	Descripción
112273555	112335752	PVRL3	*607147	polyvirus receptor related 3
112743618	112853896	CD96	*606037	CD96 molecule
113095500	113177826	PHLDB2	*610298	pleckstrin homology like domain, family B, member 2
113322378	113334807	GCET2	*607792	germinal center expressed transcript 2
113534806	113564349	CD200	*155970	CD200 molecule
113665503	113701098	BTLA	*607925	B and T lymphocyte associated
113734049	113763175	ATG3	*609606	ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)
114124222	114176627	CD200R1	*607546	CD200 receptor 1
114414065	114488956	BOC	*606706	Boo homolog (mouse)
114733908	114831112	SID1	*606816	SID1 transmembrane family, member 1
114920531	114947786	NAT13	*610834	N-acetyltransferase 13
114948598	115013593	ATP6V1A	*607027	ATPase, H <sup>+</sup> -transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A
115330247	115380580	DRD3	*126451	docamine receptor D3
115436168	115436115	ZNF80	*194553	zinc finger protein 80
115825142	116022842	GAP43	*182060	growth associated protein 43
117011832	117647068	LSAMP	*609241	limbic system-associated membrane protein
120102167	120347588	IGSP11	*606351	immunoglobulin superfamily, member 11
120375115	120406880	UPIK18	*602380	uropodin 18
120413279	120442442	B4GALT4	*604015	UDP Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4
120495910	120618254	CDGAP	*610911	Cdc42 GTPase-activating protein
120725830	120781171	CD80	*112263	CD80 molecule
120781213	120791482	ADP4H	*603081	ADP-ribosylarginine hydrolase
120799436	120831342	PIA1A	*607460	phospholipase A1 member A

A pesar de que no se ha podido detectar un único gen causante de este síndrome en la región delecionada, la bibliografía previa sí asocia la existencia

de esta microdelección 3q13 con un fenotipo que tiene relación con las características de la paciente: se han descrito al menos 9 casos con retraso, hipotonía, escoliosis y algunos de ellos con agenesia de cuerpo caloso.

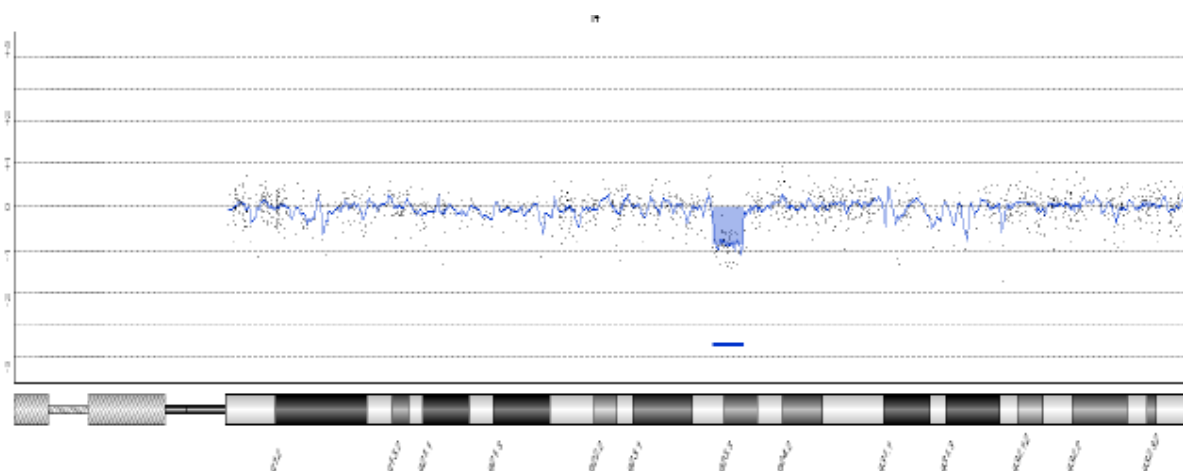
El tamaño de esta deleción obligó a revisar el cariotipo. Aunque no era muy evidente, sí que ahora, conociendo la información del array, se apreciaba en un cromosoma 3 un brazo largo más corto a costa de la región negra por debajo del centrómero.

Se realizó FISH con sonda específica de la región confirmándose la deleción en la paciente. En los padres se pudo descartar una translocación insercional como origen de la deleción.

### Caso- 2649

Niño de 12 años que desde los 6 meses presenta retraso, una facies peculiar, con apéndice preauricular y esferocitosis.

Figura 22.- Imagen en detalle del cromosoma 14.



Con arrays de 44K se detecta una **deleción en 14q23.2** de 2,84Mb (Fig. 22) que comprende los genes PPP2R5E, SYNE2, ESR2, MTHFD1, AKAP5, ZBTB25, HSPA2, SPTB, CHURC1, GPX2, FNTB, MAX, FUT8. En DECIPHER no se han encontrado síndromes en esta región ni fenotipos parecidos.

Las referencias bibliográficas consultadas describen una deleción de 2,1 Mb en coordenadas genómicas similares a las del presente caso, incluyendo los

genes SPTB y PLEKHG3 asignándoles valor patológico. El paciente también presentaba esferocitosis y problemas de aprendizaje.

Se ha confirmado con FISH, no sólo la delección en el paciente si no la presencia en los progenitores de las dos regiones del cromosoma 14 en su posición correcta.

### **Caso- 2948**

Niña de 10 años que desde los 5 años presenta retraso cognitivo aunque no tiene rasgos dismórficos. Tiene una hermana sana, pero un hermano con retraso mental.

En el array, con plataforma Karyoarray 3.0, se detectó una **delección** de 1,6Mb en **15q13.2**, región que comprende los genes FAN1, MTMR10, TRPM1, MIR211, KLF13, OTUD7A, **CHRNA7**. Además se vio una delección de 158Kb en 1q23.3 considerada BENIGNA (genes: FCGR2A, HSPA6, FCGR3A, FCGR2C, HSPA7, FCGR3B, FCGR2B) y cinco dosis de la región 6p11q11.

Esta delección 15q13, aunque rara, es recurrente entre personas con trastornos cognitivos, neuropsiquiátricos sobre todo esquizofrenia, autismo y trastornos de déficit de atención. Además comprende el gen CHNRA7 que es un gen candidato de epilepsia. No obstante se ha descrito una gran variabilidad fenotípica, incluso intrafamiliar. No está claro si las deleciones/duplicaciones en esta zona son debidas a NAHR entre los duplicones B4 y B5 o a las inversiones del gen adyacente que puedan producir microdeleciones.

La misma delección se encontró con arrays en su madre sana y en su hermano también con discapacidad intelectual. Su hermana sana tenía un array normal.

En DECIPHER se describe la delección 15q13.2 como un síndrome de microdelección ya conocido y aparecen 130 pacientes con una delección similar.

### **Caso- 3053**

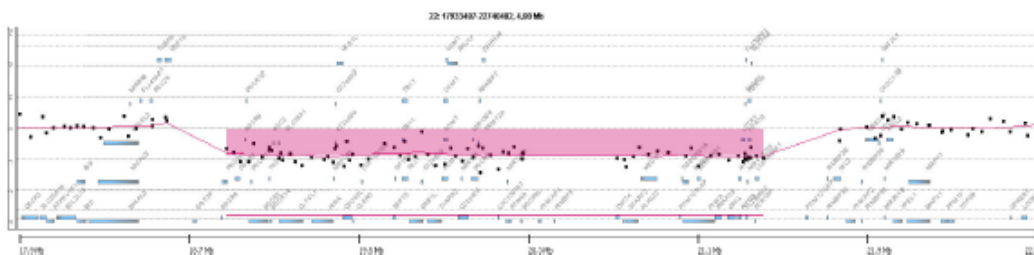
Mujer de 37 años con retraso mental y rasgos dismórficos: orejas de implantación baja, dientes mal implantados, nariz globosa y ancha, miopía, cuello ancho, obesidad, menopausia precoz. La menopausia precoz fue la causa

de derivación de la paciente a la Unidad de Genética para cariotipo. Al ser éste normal y ser la paciente dismórfica y con discapacidad intelectual, se realizaron arrays de CGH.

El resultado del array de 60K fue una **delección en 22q11.2** de 2,52 Mb, con 38 genes implicados entre los que está TBX1 (Fig. 23).

La delección detectada en la paciente es similar a la encontrada en otros pacientes con síndrome de microdelección 22q11.2, que se asocia fenotípicamente con el síndrome de DiGeorge o con el síndrome velocardiofacial. Los pacientes con delección en esta región presentan, entre otros síntomas, defectos cardíacos, deficiencias inmunes, hipocalcemia prenatal, insuficiencia velofaríngea y una apariencia facial distintiva. La mayoría de los pacientes presenta problemas de aprendizaje y trastornos de comportamiento, incluso esquizofrenia en algunos pacientes adultos. La insuficiencia de TBX1 parece ser la principal responsable del fenotipo.

Figura 23.- Imagen en detalle de la delección 22q11.2



Se hizo un FISH con sonda TUPLE1, localizada en la región 22q11.2 y habitualmente utilizada para diagnóstico de pacientes con sospecha de síndrome de Digeorge, que confirmó la delección en la paciente. En el estudio citogenético y con FISH de su padres se confirmó, en metafase, que las señales TUPLE estaban ubicadas en la región 22q11.2, donde corresponde.

### **Caso- 2521**

Niña de 5 años con retraso madurativo, hipotonía y facies peculiar. Con el array CGH de 60K se detecta una **delección en 1p34.3**, de 2,04Mb (Fig.24) que comprende los genes SFPQ, NCDN, PSMB2, CLSPN, EIF2C4, EIF2C1,

EIF2C3, TEKT2, ADPRHL2, COL8A2, TRAPPC3, THRAP3, STK40, C1orf102, MRPS15, CSF3R, GRIK3 (Fig.25). Además presentaba una duplicación 15q11.2 de 1,9Mb, que comprende los genes POTE8 y BCL8 (ahora redenominado NBEAP1 o neurobeachina), descrita en la población general y sin asociación fenotípica.

Figura 24.- Imagen en detalle de la deleción 1p34.3

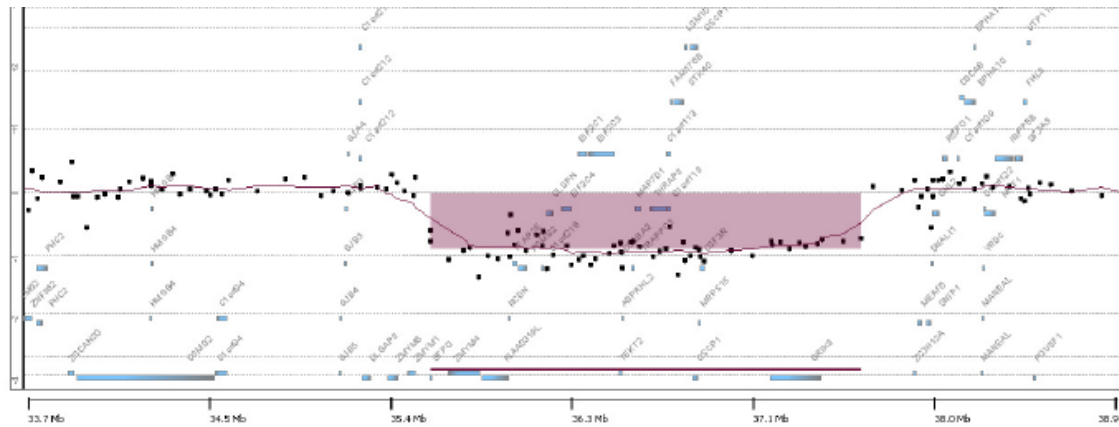


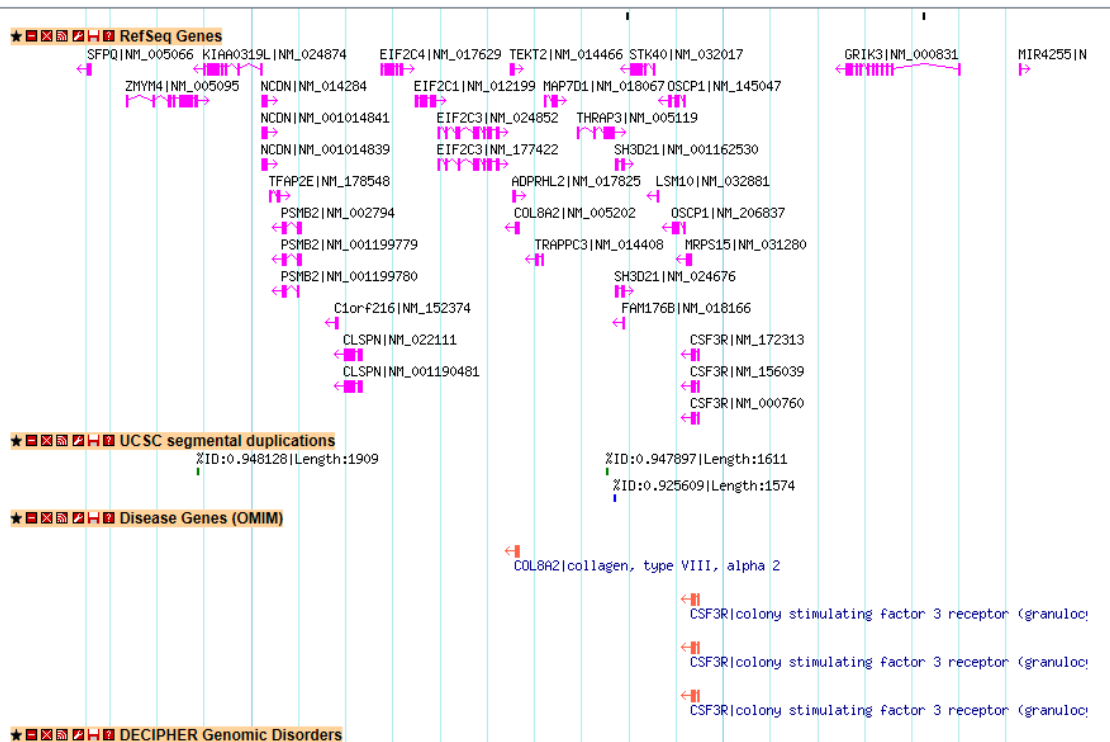
Figura 25.- Genes OMIM incluidos en la deleción 1p34.3 presente en la muestra

Inicio	Fin	Gen	Descripción
35649201	35658743	SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)
36023393	36032380	NCDN	neurochondrin
36068739	36107143	PSMB2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2
36201818	36235551	CLSPN	claspin homolog (Xenopus laevis)
36273828	36321188	EIF2C4	eukaryotic translation initiation factor 2C, 4
36348810	36389899	EIF2C1	eukaryotic translation initiation factor 2C, 1
36396772	36522063	EIF2C3	eukaryotic translation initiation factor 2C, 3
36549676	36553876	TEKT2	tektin 2 (testicular)
36554453	36559533	ADPRHL2	ADP-ribosylhydrolase like 2
36560846	36565850	COL8A2	collagen, type VIII, alpha 2
36602173	36615067	TRAPPC3	trafficking protein particle complex 3
36690017	36770958	THRAP3	thyroid hormone receptor associated protein 3
36805225	36851485	STK40	serine/threonine kinase 40
36883507	36916052	C1orf102	hCG_1787723
36921362	36930040	MRPS15	mitochondrial ribosomal protein S15
36931644	36948509	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
37261128	37499844	GRIK3	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3

Se realizó un estudio bibliográfico de los genes involucrados en la delección, no encontrando asociación alguna con la delección de dichos genes y episodios de retraso madurativo. Sin embargo al consultar la base de datos DECIPHER (Fig.26) se observó un paciente con una del(1)(p34.3) de 2,46Mb. Ese caso presentaba una delección que aunque no era exacta a la del paciente, sí presentaba una concordancia con varios de los genes delecionados en la muestra, y presentaba retraso del lenguaje y del desarrollo y trastornos de alimentación e hipotonía.

El FISH posterior con una sonda incluida en la región confirmó la delección en el paciente y que la localización en sus progenitores era correcta. Se trataba de nuevo de un evento *de novo* y sin riesgo de repetición.

Figura 26.- Genes incluidos en la región según DECIPHER.



### Caso- 4804

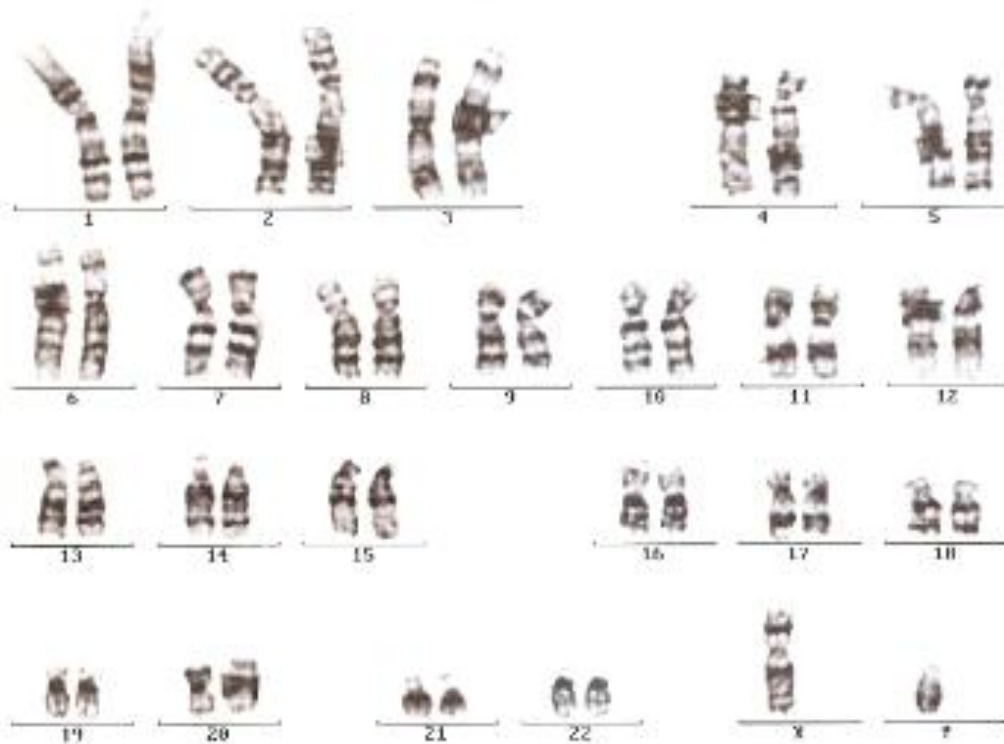
Niña de dos años y medio con microcefalia y rasgos autistas. El arrayCGH de 44K identifica una **delección en 22q13.33** de 0,95Mb, que contiene, entre otros, el gen SHANK3 que es responsable en parte del síndrome Phelan McDermid. Este síndrome se caracteriza por hipotonía neonatal, retraso del desarrollo, sobrecrecimiento y lenguaje muy atrasado o ausente.

Dado que la región tiene una sonda de FISH comercializada (ARSA), se utilizó para confirmar la delección y determinar la presencia y localización en los cariotipos paternos: se vio que era *de novo* y que su localización era correcta, en la región telomérica de los 22.

### Caso- 2541

Niño de 4 años con trastorno generalizado del desarrollo y retraso de lenguaje. El cariotipo fue normal (Fig.27) pero el array de 44Kb detectó una **delección en 22q11.21** de 1,42Mb que contiene, entre otros 20, el gen TBX1.

Figura 27.- Cariotipo masculino normal



La región delecionada en este caso (Fig.28) es similar a la detectada en otros casos con síndrome de DiGeorge, caracterizado por anomalías conotruncales, hipocalcemia, facies peculiar, retraso de desarrollo, trastornos de comportamiento y otros.

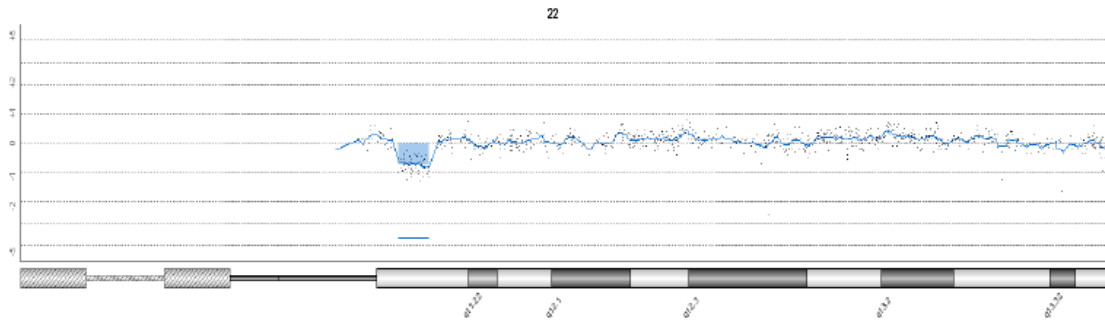


Figura 28.- Imagen en detalle del cromosoma 22.

Se analizó con FISH y se confirmó la deleción. El cariotipo de los padres con FISH puso de manifiesto la misma deleción 22q11.2 en su padre, que aunque en principio sano, sí que tuvo problemas de aprendizaje en su infancia con un retraso en la adquisición del lenguaje.

Se trata por tanto de una deleción heredada, con un 50% de riesgo de repetición en futura descendencia de este hombre.

### Caso- 2791

Niño de dos años con retraso madurativo, afectación de sustancia blanca bilateral, hipoacusia izquierda y estrabismo. El array CGH con plataforma KaryoArray 2.0 detecta tres CNVs: la principal es una **deleción en 18q23** de 1,9Mb. En esta región está el gen CTDP1 cuya mutación se ha descrito en pacientes que muestran cataratas congénitas, neuropatía y facies dismórfica, aunque en algunos pacientes se ha encontrado acompañado de retraso psicomotor y sordera. Esta deleción se confirmó que era *de novo* tras el estudio de arrays en los padres.

Las otras dos CNVs detectadas fueron una repetición 5 veces de la región 6p11, de 5,13Mb, que contiene el gen KHDRBS2 y es heredada del padre, y una deleción en 1p36, de 388Kb, también paterna y que no contiene genes OMIM considerada por tanto benigna.

El padre además presentó una duplicación en 3p13 de 134pb con el gen GPR27 que es un receptor súper conservado que se expresa en cerebro.

Aunque se confirmó por array que la deleción era *de novo*, se hizo un FISH y una vez confirmada la deleción en el niño (Fig.29), se procedió a localizar con FISH en los progenitores la región 18q23: se detectó dos señales normales y correctamente localizadas en el padre (Fig.30). Pero en la madre se encontró (Fig.31) que había una translocación de 18q23 a los brazos cortos de un cromosoma del grupo D, que tras otros FISH se identificó como un cromosoma 14 (Fig.32 y Fig.33). La madre por tanto era portadora de una translocación 14p;18q, y con riesgo de repetición en siguientes embarazos.

Se está procediendo no sólo a descartar la translocación en un hijo sano, si no tambien en los padres y hermanos de la portadora.

Figura 29.- Metafase y núcleo interfásico mostrando una única señal (roja) en 18q23 en el paciente.

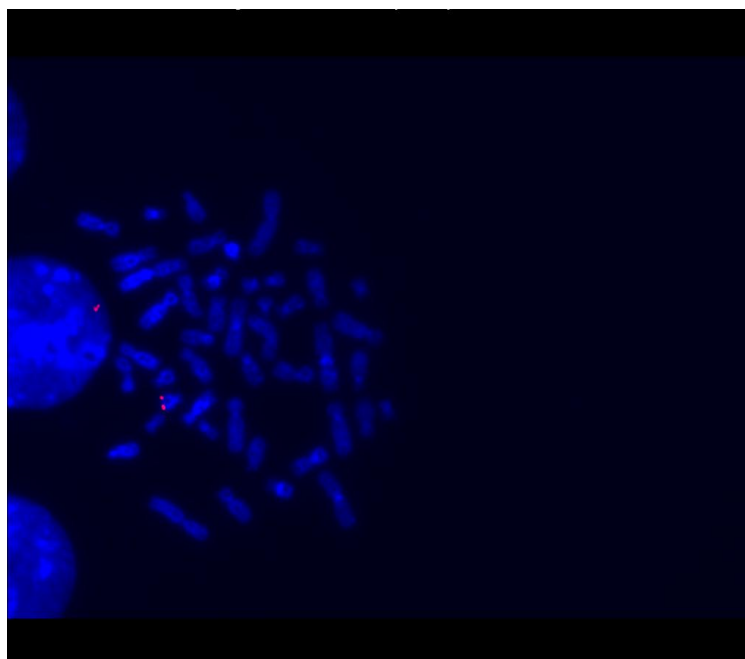


Figura 30.- FISH metafásico en el padre del paciente mostrando dos señales (rojo) en 18q23.

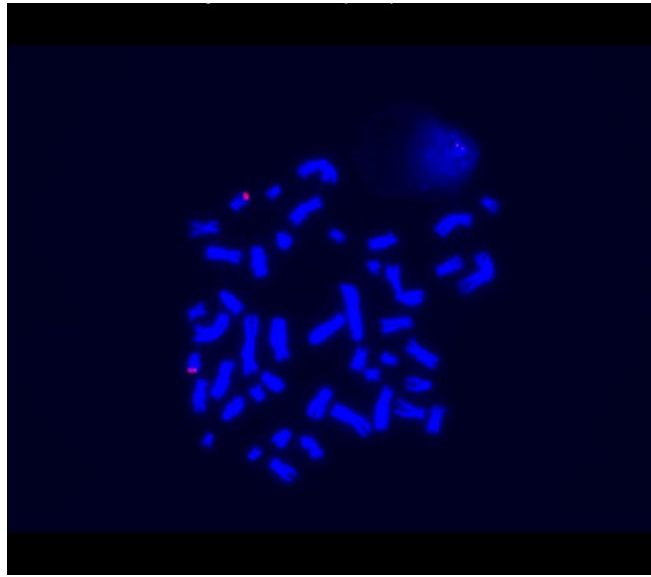


Figura 31.- sonda 18q23 localizada en brazos cortos de un cromosoma del grupo D, en metafase de la madre del paciente.

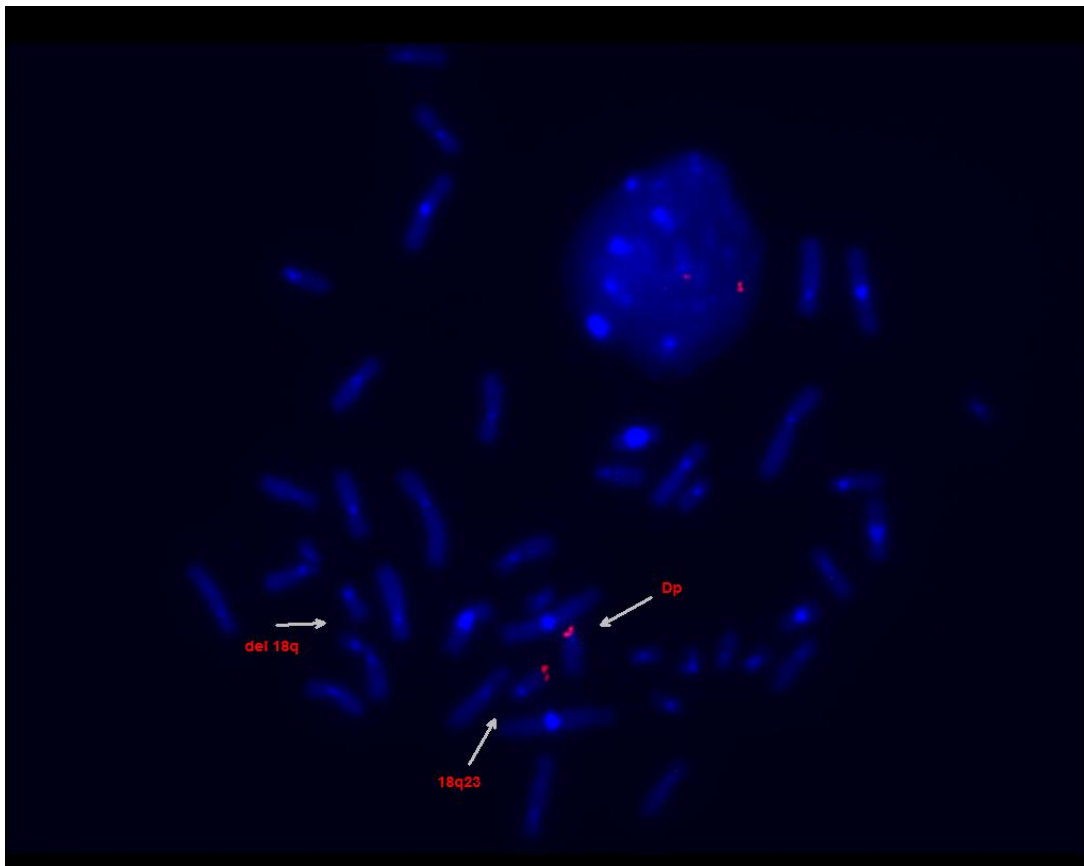


Figura 32.- FISH en metafase usando, además de la sonda en 18q23, sondas para identificar los D: D15S10(rojo) y ARSA (verde) para el 15. LSI 13q14 en rojo. En ninguno de estos D se localiza en su brazo corto la sonda 18q23 (rojo).

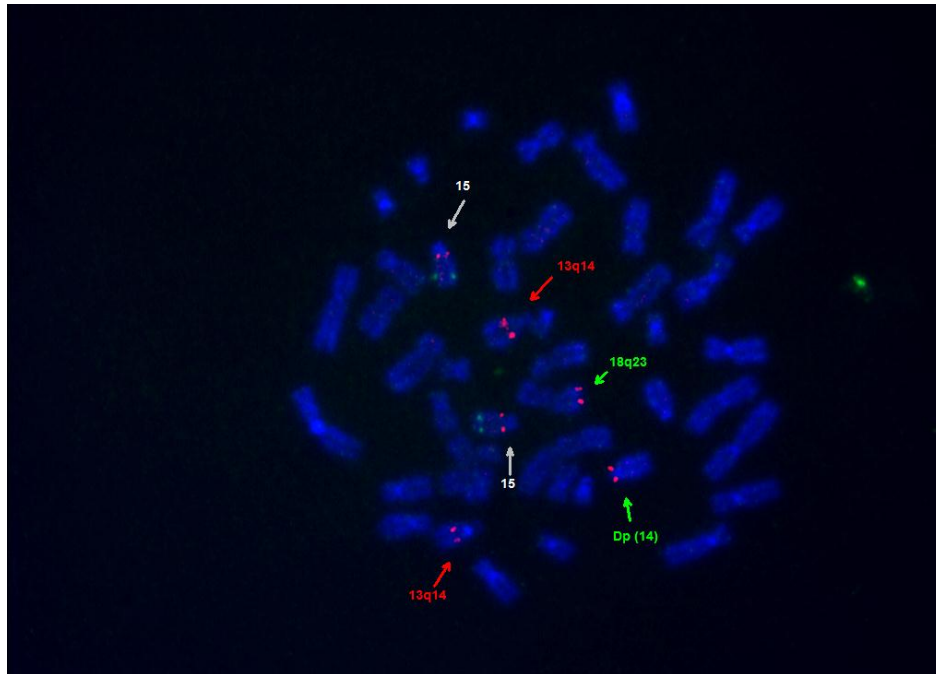
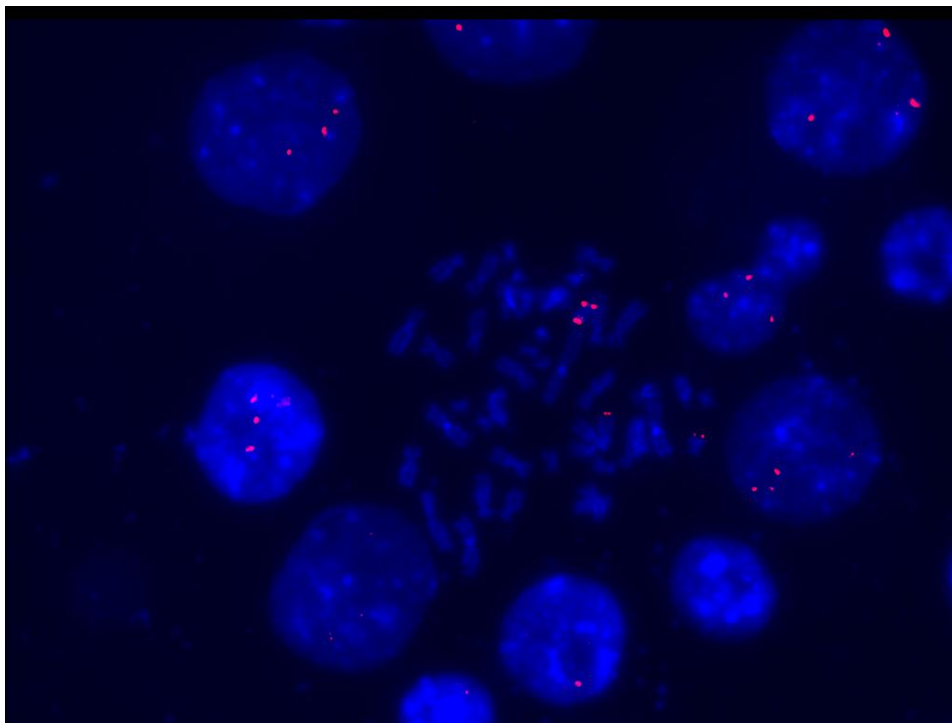


Figura 33.- FISH en metafase con sonda tel14q en rojo y 18q23 en rojo.



### Caso- 3099

Niño de 3 años y medio con trastorno generalizado del desarrollo y rasgos dismórficos. Se detectan en el array de 60K (Fig.34) tres CNVs: una **duplicación en 15q11.2**, de 0,3Mb, presente también en su madre, que contiene los genes TUBCGP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, relacionados con los problemas de comportamiento y trastorno compulsivo en los pacientes con síndrome de Prader Willi. La bibliografía consultada describe la asociación, de duplicaciones idénticas a la región observada en el probando, con un fenotipo variable que puede incluir retraso del desarrollo, problemas motores y comportamentales (déficit de atención, hiperactividad), autismo y otros hallazgos. La mayoría de los pacientes descritos con información de progenitores presentaba la duplicación heredada. Algunos de los progenitores afectados habían presentado hiperactividad o pequeños retrasos en la infancia.

Se identifica otra duplicación, también materna en X27.3 de 0,53 Mb que contiene el gen SPANXN1 que está relacionado con la espermatogénesis.

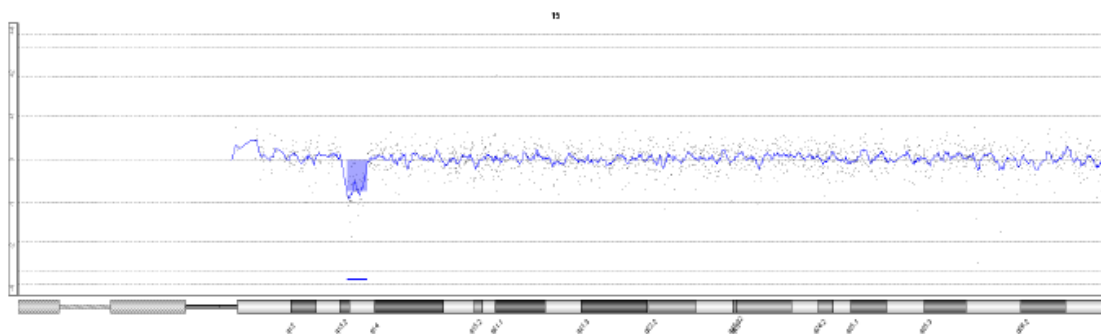
Figura 34.- Imagen representativa del genoma del paciente.



### Caso- 2897

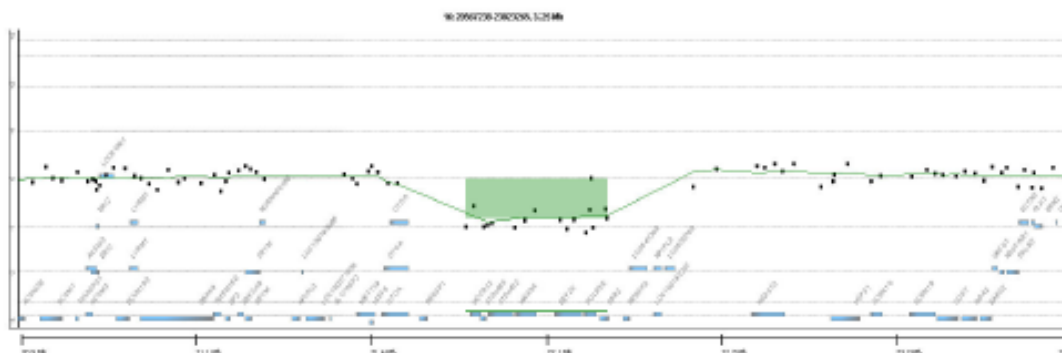
Niña de 4 años con retraso madurativo global y del habla, con dificultades de comprensión y una facies algo peculiar, con hipertelorismo. El Karyoarray 3.0 detectó **dos alteraciones** causales. Por un lado, una **delección 15q13.2** de 1,56 Mb (Fig.35) de origen materno que contiene los genes MTMR15, MTMR10, TRPM1, MIR211, KLF13, OTUD7A, CHRNA7. El más importante de todos es éste último, el CHRNA7 que es un receptor colinérgico que interviene en la transmisión de señal neuronal. Su delección produce un fenotipo variable y difícil de reconocer pero en general consiste en una cara peculiar, retraso psicomotor o problemas de aprendizaje y con frecuencia se acompaña de epilepsia en diversos grados. Su madre, con obesidad mórbida, con un aumento progresivo de peso desde su infancia presenta además crisis epilépticas desde los 13 años.

Figura 35.- Imagen en detalle del cromosoma 15.



Por otro, se detectó en el array de la niña una **delección en 16p12.2** de 485,3 KB, (Fig.36) que se encontró también en el array de su padre y que contiene los genes UQCRC2, C16orf65, C16orf52, VWA3A, EEF2K, POLR3E, CDR2, RRN3P3.

Figura 36.- Imagen en detalle de la región 16p12.2



Su padre, de 25 años, había nacido de embarazo y partos normales, pero empezó a caminar algo tarde y siempre estuvo en centros de educación especial por problemas de aprendizaje.

La deleción 16p12.1 también está descrita asociada a retraso psicomotor y a veces a trastornos neuropsiquiátricos. Igualmente su penetrancia y expresividad son variables, siendo el cuadro más severo cuando va acompañado de otra alteración genómica.

La niña presenta por tanto un cuadro clínico más severo atribuible a la presencia de las dos alteraciones genómicas.

En esta familia se recomendó estudio genómico a los padres de ambos progenitores sin que por el momento hayan querido colaborar.

## 5.2- CASOS CON CNVs DE SIGNIFICADO INCIERTO (VOUS):

Se han detectado 12 pacientes con CNVs de significado desconocido, habitualmente denominadas VOUS (siglas del inglés *Variants Of Unknown Significance*).

Quedan expuestos en la tabla 3 y se detallan a continuación:

Tabla 3.- Casos con CNV de significado incierto.

nº CG	INDICACION ARRAY	SIGNIFICADO ARRAY	del/dup	Heredada	TAMAÑO	LOCALIZACION CROMOSOMICA	GENES OMIM
2766	RETRASO COGNITIVO importante + crisis epilépticas. No dismorfias	SI	dup	pat	490 Kb	15q14 ( en constructo anterior 15.3)	CHRNA7
2992	RETRASO MADURATIVO	SI	dup	dn	445 Kb	2q11.2	REV1 y AFF3
2991	MADURATIVO + facies peculiar: Macrocefalia + hipertelorismo). Melliza sin problemas	SI	del	mat	15,3 Kb	4p16.3	No genes OMIM NFATC3, LYPLA3, SLC7A6, PRTM7, SPMD3 y ZFP90
2980	retraso madurativo + trastorno de conducta + hemangioma parpado inferior y gluteos	SI	dup	dn	430 Kb	16q22	
2239	RETRASO MADURATIVO. Plagiocefalia. Retraso lenguaje.	SI	del	pat		3q25.32	RARRES1
2836	RETRASO MENTAL MODERADO. Fenotipo peculiar. Dificultad de aprendizaje.	SI	del	dn	545 Kb	19q12	No genes OMIM
3104	Retraso mental. Motricidad fina. Fenotipo normal	SI	dup	dn	545 Kb	19q13.4	ZNF444, GALP, ZNF667, ZNF71
3141	Retraso mental+ deficit de atencion + antecedentes familiares: 5 abortos y un RN+	SI	dup	mat	1050 Kb	2p12	REG3G, REG1B, REG1A, REG3A, CTNNA2
2269	Retraso psicomotor severo. Lennox Gastaut	SI	dup	mat	910 Kb	4p15	QDPR, LAP3, MED28, NCAPG
2450	RM NO FILIADO	SI	dup	mat	490 Kb	Xq27	SOX3 y CDR1
3101	Secuencia de Pierre Robin, macroglosia, alt. Lenguaje	SI	dup	dn	495 Kb	16p13.2	ABAT, PMM2, USP7
2875	TGD + retraso psicomotor	SI	dup dup	1/2 nodisp	199 Kb 20Kb	6q13 15q26	KHDC1, DPPAS, C6orf221, OOEP, DDX43 + SLCO3A1

A pesar de que estas CNVs no aparecen en bases de datos de polimorfismos ni asociadas a un fenotipo, por motivos prácticos, no sólo de cara a la presentación de estos resultados, si no, y principalmente, para dar una información clínicamente y personalmente útil al paciente y su familia, hemos **tratado de asignarles un valor** “probablemente causal” ó “probablemente benigno” cuyos argumentos se exponen en el detalle de cada caso.

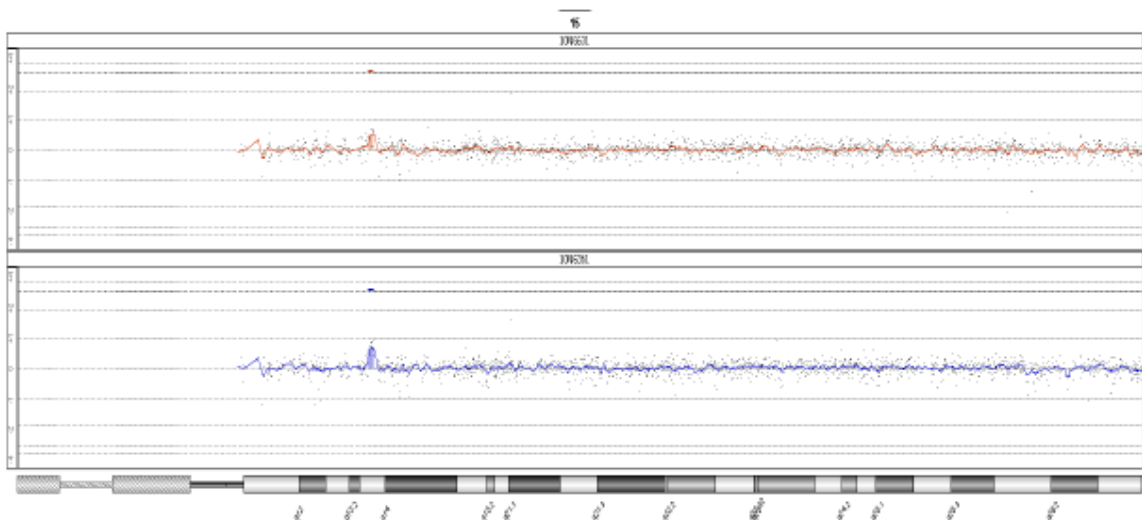
Se trata de una asignación provisional, revisable a medida que avanza el conocimiento, y así se hace saber al paciente y a su familia.

### Caso- 2766

Niña de 11 años con retraso cognitivo importante y crisis epilépticas. No presenta rasgos dismórficos. El array de 60K detectó una **duplicación 15q13.3** de 0,49 Mb (Fig.37), que incluye el gen **CHRNA7**. La duplicación de esta región se ha encontrado en la literatura asociada a casos de retraso mental, microcefalia, estrabismo y fenotipo peculiar. En alguno de los casos la duplicación era heredada de alguno de los progenitores sanos.

Se realizó array a los padres de la probando encontrando en el padre la misma duplicación (Fig.38). Al hacer una reevaluación clínica del padre, éste había presentado en su infancia dificultades de aprendizaje e hiperactividad.

Figura 37 y 38.- Imágenes en detalle de la duplicación en la paciente (arriba) y en su padre (abajo).



Todo esto hace pensar que pueda tratarse de una CNV responsable de la patología del niño, y por tanto sea probablemente causal.

### Caso- 2992

Niño de 14 años con retraso madurativo. El KaryoArray 3.0 detectó una duplicación 2q11.2 de 445,5Kb que contiene los genes REV1 y AFF3. AFF3

pertenece a una familia de factores de transcripción nuclear, que en algún caso se ha considerado como de susceptibilidad a artritis reumatoide.

Al no ser una CNV patogénica conocida ni aparecer en las bases de datos de polimorfismos (DGV y dbVAR) se realizó array a los padres sanos.

En los padres no se encontró dicha duplicación. Se encontró en la madre una CNV considerada benigna: una duplicación 2q37.3, y en el padre una duplicación 13q34 también considerada benigna.

El probando tiene por tanto una **duplicación *de novo* de 2q11.2** de significado incierto, aunque probablemente sea benigna y no tenga relación con su patología.

### **Caso- 2991**

Niña de 6 años con retraso madurativo además de una facies peculiar con macrocefalia e hipertelorismo. Tiene una hermana melliza sin problemas. El KaryoArray 3.0 detectó una **delección 4p16.3** de 15,3Kb que no contiene genes OMIM.

El hallazgo de esa misma pequeña delección en su madre sana, definió la CNV como probablemente benigna.

### **Caso- 2980**

Niño de 4 años y medio que presenta retraso madurativo, importante trastorno de conducta y un hemangioma en párpado inferior y en glúteo. El array de 60K detectó tres CNVs:

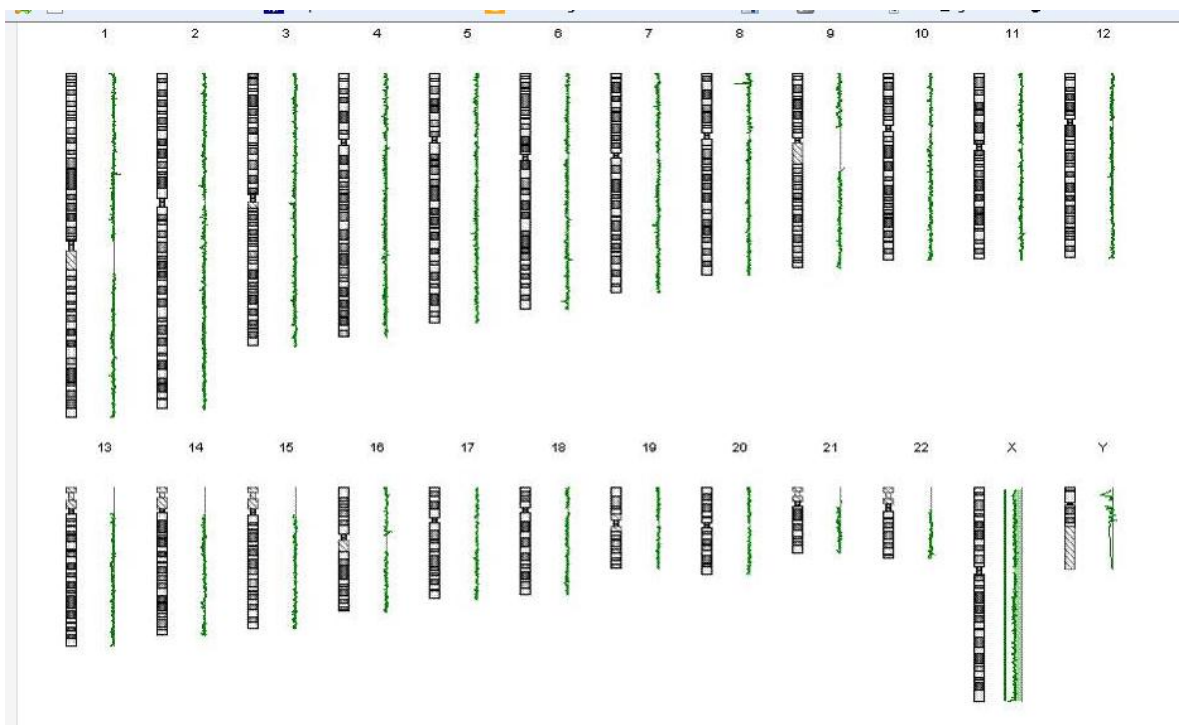
- Una **duplicación 16q22** de 430Kb conteniendo los genes NFATC3, LYPLA3, SLC7A6, PRMTM7, SPMD3 y ZFP90.
- Una delección en 7q11.21 de 380 Kb incluyendo el gen ZNF92.
- Y una duplicación en 15q11.2, de 820Kb incluyendo los genes POTE15, BCL8, que es una variante benigna conocida.

Se hizo array a los padres, identificándose en el padre la misma delección 7q11.21. Por tanto se trata de una duplicación *de novo* de 16q22, probablemente benigna.

Como curiosidad de este caso, se encontró en el array de la madre una deleción completa del cromosoma X, es decir una monosomía X (Fig.39). Ante lo sorprendente del hallazgo (dado que se trataba de una mujer fenotípicamente normal aunque de talla baja, que no había tenido problemas de reglas y de hecho había tenido este hijo) se hizo cariotipo confirmándose la monosomía X en un 88% de las metafases analizadas. El otro 12% tenía una trisomía sexual XXX. Este mosaicismo no pudo ser detectado por el array.

El hecho de que esta mujer haya pasado desapercibida, sin diagnóstico de síndrome de Turner dada su poca expresividad fenotípica, lo podría explicar la presencia de un mosaicismo mas bajo en otros tejidos.

Figura 39.- CGH array de la madre del paciente mostrando una deleción completa del cromosoma X.

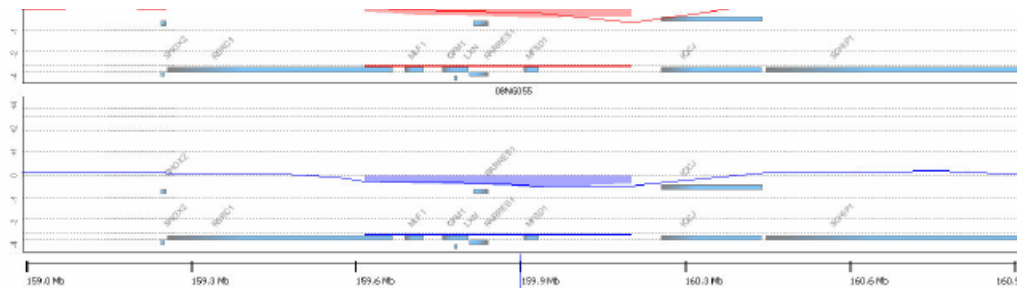


### Caso- 2239

Niño de 2 años con retraso madurativo, retraso del lenguaje y plagiocefalia. El array de 44K detecta una **deleción en 3q25.32** de 105Kb que contiene el gen RARRES1.

El array de los progenitores puso de manifiesto la misma delección en su padre sano (Fig.40).

Figura 40.- Detalle de la delección presentada en 3q25.32 en el padre (rojo) y en su hijo(azul).



A pesar de ser una delección, su pequeño tamaño, el ser heredada de padre sano y que no contenga genes OMIM nos hizo clasificarla como probablemente benigna.

### Caso- 2836

Niño de 14 años, con retraso moderado, dificultades de aprendizaje y fenotipo peculiar. Además del cariotipo normal el probando también tiene un estudio molecular descartando síndrome de X frágil.

El KaryoArray 2.0 detectó una **delección 19q12** de 545Kb que no comprende genes OMIM. También se detectó una variante benigna que consistía en una delección de 10Kb en 15q11.2

Los aCGH de sus padres no encontraron la delección en ellos, aunque en el padre se detectaron cuatro variantes benignas: del4p16.3, dup 6p21.3, del 15q11.2 y dup 15q11.2. La madre tenía la delección benigna 15q11.2 de 10Kb heredada por el hijo.

Debido al gran tamaño observado y su carácter *de novo*, esta delección podría ser considerada como probablemente patogénica.

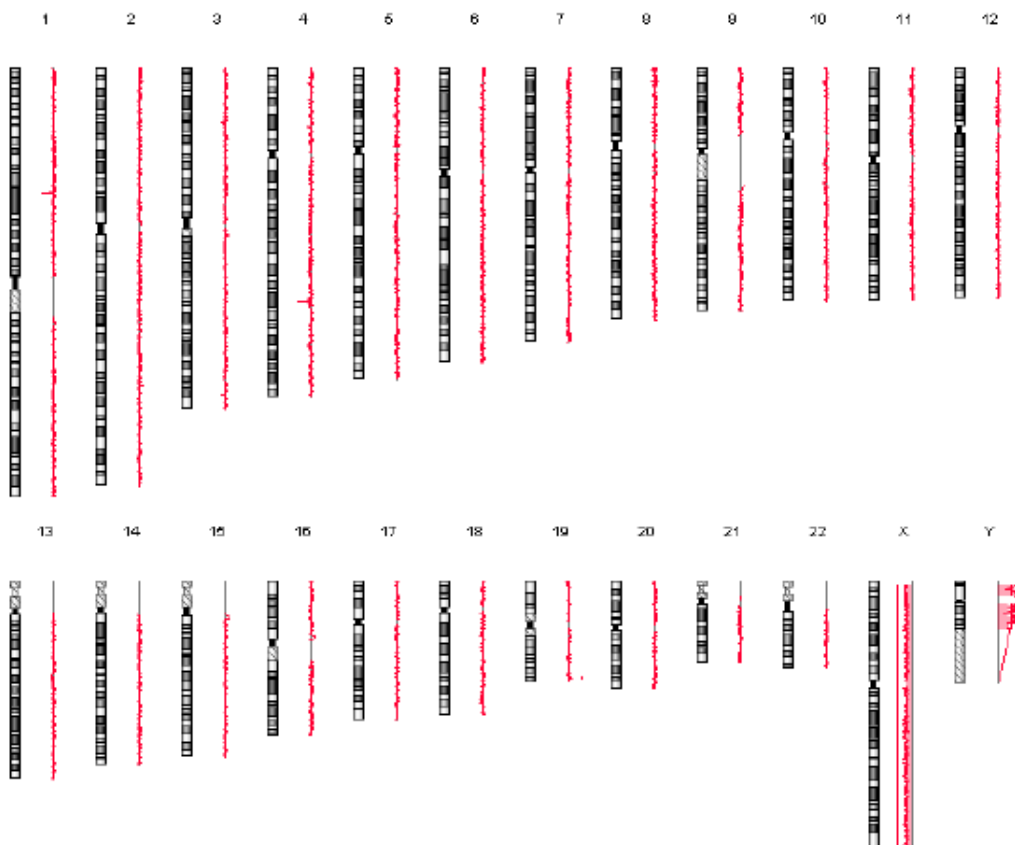
### Caso- 3104

Niño de 13 años, con retraso mental, y trastornos en la motricidad fina, con fenotipo normal. Estudio molecular de X frágil también fue normal.

Con el array de 60K (Fig.41) se detectó una **duplicación en 19q13.4**, de 545 Kb, que incluye los genes ZNF444, GALP, ZNF667 y ZNF71.

No se han descrito evidencias bibliográficas que asocien dicha duplicación con patologías médicas ni con polimorfismos genéticos. Sin embargo aunque no existen polimorfismos descritos similares a la región duplicada en el probando, sí se han descrito polimorfismos, de menor tamaño, que afectan a la región. Debido a que la región no es, por si sola, causante directa de un fenotipo claro, se le asigna un valor de significado incierto, aunque probablemente benigna. Los arrays de los padres resultaron normales.

Figura 41.- CGH array completo del paciente mostrando la duplicación en 19q13.4



### Caso- 3141

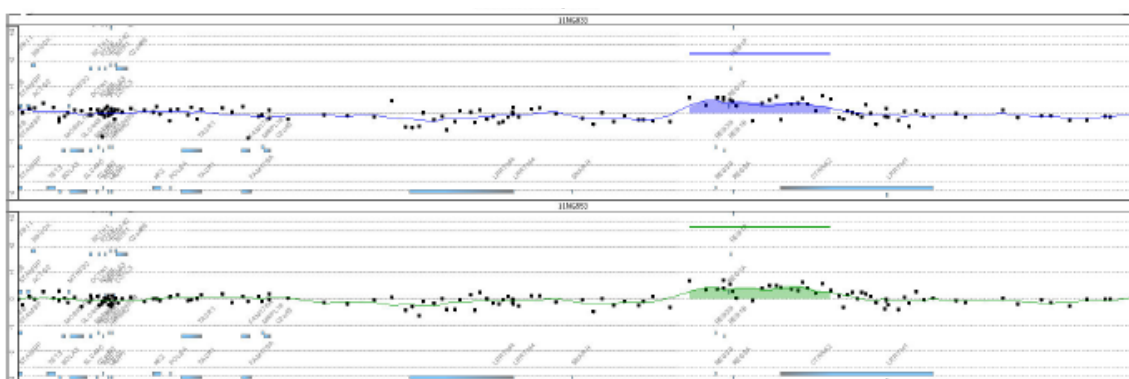
Niño de 14 años con retraso mental y déficit de atención. Es hijo único pues su madre tuvo además cinco abortos y un recién nacido muerto de causa desconocida.

El array de 60K detecta tres CNVs, dos de ellas benignas y una de significado incierto: una **duplicación en la citobanda 2p12**, de 1.05 megabases, que contiene 5 genes incluidos en el listado OMIM: REG3G, REG1B, REG1A, REG3A y parte del gen CTNNA2. En el caso de CTNNA2, se produce una duplicación que trunca el gen, duplicando únicamente los exones 1 al 6 (la duplicación acaba en el intrón 6-7) de un total de 18 exones.

No se ha encontrado ninguna evidencia clara que asocie la duplicación observada con ningún fenotipo de retraso mental ni polimorfismo conocido alguno. Por todo esto no se le puede otorgar una relación clínica a la duplicación localizada en el cromosoma 2 del paciente, dándole un valor de significado incierto. Sin embargo se propone el gen CTNNA2, catenina alfa 2, como un gen candidato de esquizofrenia.

El estudio genómico de los padres identifica que su madre sana tiene la misma duplicación 2p12 que el paciente (Fig.42). Esto nos hace pensar que se trate de una variante probablemente benigna. Además también tiene las dos variantes benignas encontradas en su hijo: del 3p26.1 de 200Kb, sin genes OMIM, y del 15q11.2 de 1,8 Mb que contiene los genes POTE8 y BCL8. En el padre se encuentra la variante benigna deleción 15q11.2 de 1,93 Mb.

Figura 42.- Deleción 2p12 en la progenitora (azul) y en el paciente (verde).



Por ello, se concluye que la duplicación observada en el probando es un evento heredado por vía materna, no pudiendo asignar relación causal directa entre dicha duplicación y el fenotipo observado en el probando.

Es importante señalar que en la bibliografía sobre array CGH se recomienda, en situaciones similares a la descrita en este caso, re-analizar la posible existencia de un fenotipo menos definido en el progenitor portador para descartar completamente una relación de causalidad entre la variación encontrada y el fenotipo del probando.

### Caso- 2269

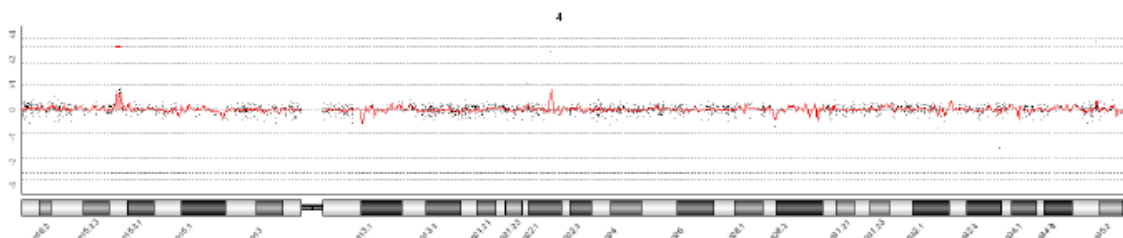
Niño de 11 años con síndrome de Lennox-Gastaut y retraso psicomotor importante. El array de 44K detectó una duplicación en 4p15, de 910 Kb (Fig.43), que comprende los genes QDPR, LAP3, MED28 y NCAPG. El array de los padres, sanos, determinó que era una CNV de origen materno.

Se ha realizado un estudio bibliográfico de los genes involucrados en la duplicación presentada por el paciente y, hasta la fecha, no se han descrito alteraciones psicomotoras asociadas a dichos genes.

Sin embargo, la duplicación de la citobanda 4p15.2, a pesar de no haber sido descrita en un síndrome genético concreto, si aparece frecuente incluida en fenómenos patológicos con duplicaciones de mayor tamaño, como por ejemplo dup(4)(p16p15), dup(4)(p16p14) o dup(4)(16p11).

Debido a la frecuente duplicación de esta zona en diversos síndromes malformativos y de retraso del desarrollo, podría considerarse de significado incierto pero probablemente sea patogénica.

Figura 43.- Imagen del cromosoma 4.



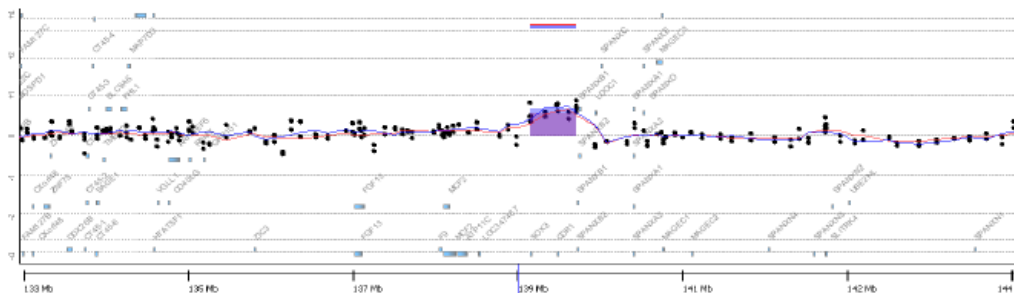
## Caso- 2450

Niña de 10 años con retraso mental. No presentaba rasgos dismórficos. El array de 44K detectó una duplicación en Xq27 de 490 Kb que comprende los genes SOX3 y CDR1.

La duplicación detectada incluye el gen SOX3, cuya duplicación se ha relacionado con el síndrome de retraso mental ligado al X con hipopituitarismo (OMIM #300123). Este desorden ha sido descrito en la literatura como un síndrome ligado al cromosoma X. Stankiewicz et al. (2005) describieron una familia con cuatro mujeres de estatura baja, defectos en el habla y dificultades auditivas asociadas a una duplicación Xq26.2-q27.1 de 7.5Mb, que incluía o rompía el gen SOX3. Por otro lado, también se han descrito casos de portadores asintomáticos de la duplicación Xq27 que incluía el gen SOX3. Sin embargo, la región detectada en este análisis es significativamente más pequeña que la descrita asociada al síndrome de retraso mental.

Por otra parte, se compara la duplicación observada con los registros presentes en la base de datos DECIPHER. Aparece descrita en esta base de datos dos eventos en esta región: una deleción de la misma región genómica en un varón y una duplicación de mayor tamaño (10 megabases) en otro varón, ambos con retraso mental.

Figura 44.- Detalle de la región en la niña y en su madre.



Se decide realizar estudio de arrays a los padres, detectándose la duplicación en su madre sana (fig.44). Ante la posibilidad de que hubiera una

inactivación preferencial del X duplicado en la madre (o del X normal en la niña) que explicara la diferencia de expresividad en ambas, se realizó un estudio de inactivación (de metilación) del X en las dos, encontrándose que no había inactivación preferencial. Por tanto se considera la CNV como de significado incierto aunque probablemente benigna.

### **Caso- 3101**

Niña de dos años y medio que presenta una secuencia de Pierre-Robin con macroglosia y alteraciones del lenguaje. El array de 60K detecta una duplicación en 16p13.2 de 495Kb que contiene los genes ABAT, PMM2 y USP7. Debido a que la probando presenta la secuencia de Pierre-Robin (OMIM 261800), se realizó un estudio en detalle de varias regiones descritas asociadas a dicha secuencia, con el nivel de resolución del array (situadas en 7q21 y 17q24). No se observó delección en el gen (no OMIM) ZNF804B, situado en 7q21. Tampoco se observó delección en la región genómica, de 1.9 megabases, flanqueada por SOX9 (OMIM \*608160) y KCNJ2 (\*600681) y situada en 17q24.1.

Es importante señalar que recientes publicaciones señalan la posible asociación de la secuencia de Pierre Robin con delecciones de muy pequeño tamaño, inferiores al límite de resolución del presente array-CGH, en la región 17q24 anteriormente descrita.

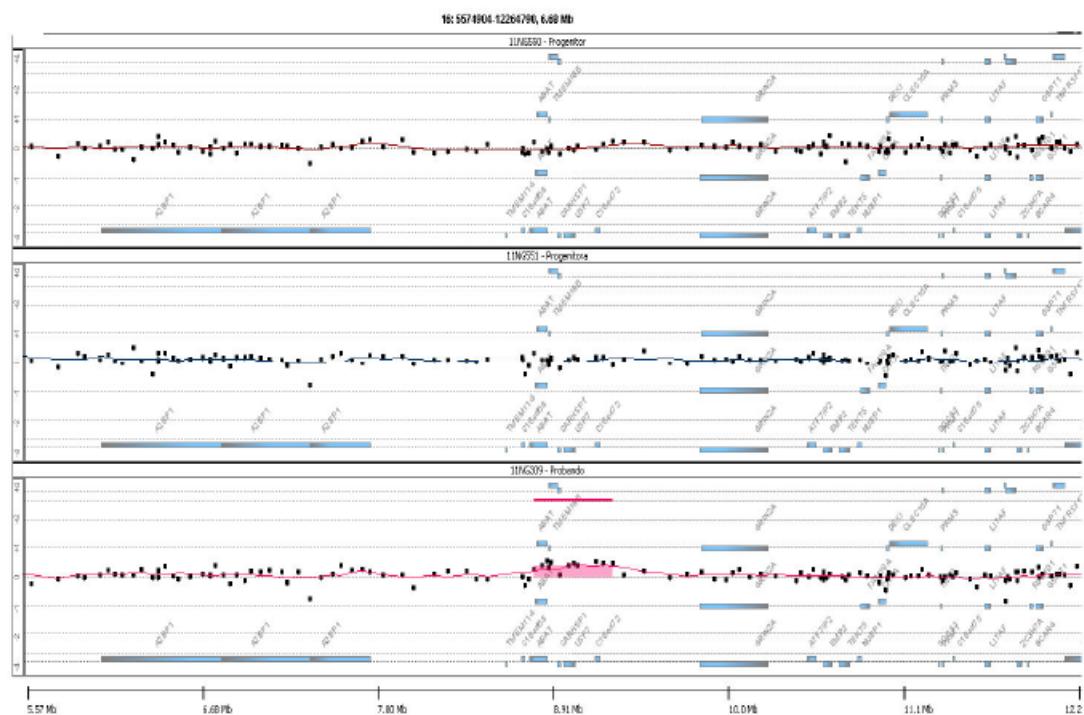
En cuanto a la duplicación 16p13.2 observada, la base de datos DECIPHER describe dos casos clínicos con una duplicación similar. El primero presentaba retraso mental, y no había información genética de los progenitores. El segundo presentaba una duplicación de novo sin fenotipo descrito. Debido a que no se conoce la implicación patológica de la duplicación en el cromosoma 16, se otorga a la misma un valor de significado incierto.

Por otro lado, se sabe que ABAT cataliza la conversión de GABA (un neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central) en succínico semialdehído. La deficiencia de ABAT se ha descrito asociada a retraso psicomotor severo, pero no la duplicación.

En este paciente se confirmó que la duplicación era *de novo* (Fig.45). En su madre se encontró además una duplicación benigna de 150K en 6q27.

Por todo lo expuesto anteriormente, se pensó que quizá pudiera ser probablemente una CNV benigna y que tuviera alguna alteración en SOX9, responsable del Pierre-Robin no sindrómico. El estudio molecular de SOX9 finalmente resultó normal.

Figura 45.- Imagen en detalle de la región 16p13.2 comparando al padre, madre y probando



### Caso- 2875

Niño de 5 años con trastorno generalizado del desarrollo y retraso psicomotor. En su estudio con Karyoarray 2.0 se detectan 4 CNVs:

- Una **duplicación en 6q13** de 199Kb que contiene los genes KHDC1, DPPAS, C6orf221, OOEP y DDX43. En esta región se ha encontrado descrito en DECIPHER una niña, también con TGD pero cuya duplicación era mayor de 7 megabases.
- Una **duplicación 15q26** de 462Kb que contiene el gen SLCO3A1.

- Una delección en 1p36, de 294Kb que no contiene genes OMIM. En DECIPHER aparecen 8 pacientes con deleciones en esa región pero mucho mayores y además no comparten con el probando signos fenotípicos.

- Y una duplicación en 7p15.2 de 2Kb que tampoco contiene genes OMIM. En esta región se ha encontrado descrito en DECIPHER una niña, también con TGD pero cuya duplicación era mayor de 7 megabases.

Para determinar el origen de las CNVs se trató de hacer arrays a los padres, pero el padre no quiso colaborar.

La información que nos dio el array de la madre fue que las dos últimas CNVs (del 1p36 y dup 7p15.2) también las llevaba ella, y además se consideraban benignas por estar ya publicadas en bases de datos de polimorfismos.

La duplicación 15q26 y la duplicación 6q13, aunque no sabemos si pueden ser *de novo*, las funciones de los genes contenidos en ellas no parece que se relacionen con la patología del paciente. Por tanto habría que considerarlas variantes probablemente benignas.

### **5.3- CASOS NORMALES y CASOS CON CNV BENIGNAS (polimorfismos)**

En el resto de los casos (73), los arrays dieron un resultado normal, es decir no se encontraron cambios, o se detectaron unas CNVs consideradas benignas por estar publicadas en la base de datos de variantes de la población general y que no tienen repercusión fenotípica.

Se presenta a continuación un listado (tabla 4) con los casos y su indicación. En el significado del array aparece "normal+v" para identificar aquellos casos considerados normales pero con presencia de una variante benigna.

Tabla 4.- Lista de 73 casos normales: casos sin CNV y casos con CNV benignas.

nº CG	INDICACION ARRAY	SIGNIFICADO ARRAY	VARIANTES BENIGNAS	TAMAÑO VARIANTE	GENES EN LAS VARIANTES
3093	RETRASO PSICOMOTOR+ fístula esofágica + ventriculomegalia. Retraso madurativo + Fenotipo peculiar: ojos grandes, pestañas largas, sinofridia, hipoplasia esmalte dental, hipertelorismo.	NORMAL+V	15q11.2	1.91Mb	BCL8 y POTEB
3408	Retraso intelectual	NORMAL+V	del 14q11.2	170 Kb	No genes OMIM
2907	DESMIELINIZACION GENERALIZADA + dedos largos	NORMAL+V	del 14q32.33	130 Kb	No genes OMIM
3323	Retraso crecimiento+ facies peculiar + microcefalia + CIA + ectasia pielica	NORMAL+V	del 15q11.2	1,93 Mb	BCL8 y POTEB
2835	RETRASO PSICOMOTOR+fenotipo peculiar	NORMAL+V	del 15q11.2	303 Kb	CYFIP1, NIPA1, NIPA2
3451	TGD (Asperger) Retraso cognitivo.	NORMAL+V	del 15q11.2	1,93 Mb	BCL8 y POTEB
3018	Retraso madurativo+ lenguaje+facies peculiar+	NORMAL+V	del 15q11.2	1,91 Mb	BCL8 y POTEB
3061	sobrecrecimiento + torticollis congénita	NORMAL+V	del 15q11.2 del 16p12	10 Kb 81 Kb	BCL8 y POTEB No genes OMIM
2993	SIND. AICARDI: agenesia cuerpo calloso + crisis epilépticas	NORMAL+V	del 1p36.33	36,2 Kb	CDK11B, MMP23A, CDK11A, SLC35E2
2815	TGD	NORMAL+V	del 1p36.33	69,75 Kb	No genes OMIM
2276	RETRASO PSICOMOTOR + macrocefalia + laxitud articular. Retraso lenguaje.	NORMAL+V	del 1q31.3 del 2p22.3	290 Kb	No genes OMIM
2678	TGD	NORMAL+V	del 22q11.23	230 Kb	No genes OMIM
2921	Retraso cognitivo+epilepsia	NORMAL+V	del 2q37.3qter	120 Kb	No genes OMIM
2677	RETRASO COGNITIVO. Lenguaje expresivo mínimo. Agenesia cuerpo calloso	NORMAL+V	del 4q13.2	370 Kb	UGT2B7, UGT2B11, UGT2B28
2483	R. madurativo+ facies peculiar. Esterotipias. GEMELA sana	NORMAL+V	del 5p	250 Kb	PDE10A
3010	Autismo + Retraso severo	NORMAL+V	del 6p21.33 dup 10q26.3	54 Kb 31 Kb	C4A,C4B, CYP21A2, TNXB, TNXA, S TK19 + CYP2E1, SYCE1
2806	RETRASO PSICOMOTOR. A posteriori es diagnosticada de Síndrome de Rett con mutación confirmada en MECP2.	NORMAL+V	del 6p25.3	91,6 Kb	No genes OMIM

2274	RETRASO MENTAL moderado- severo + epilepsia	NORMAL+V	del Xp22.31		VCX
2240	AUSENCIA DE LENGUAJE. Retraso psicomotor. Atracción por agua.	NORMAL+V	del Xq28		BGN, ATP2B3, FAM58A, KRT18P48, LOC1000131652, DUSP9, LOC347544, PNCK, SLC6A8, BCAP31, ABCD1, PLXNB3, SRPK3, IDH3G, SSR4, PDZD4, CYCSP45, L1CAM
3083	Retraso cognitivo, TDAH	NORMAL+V	dup 10q22.2 dup 15q11.2	260 Kb 1,93 Mb	ADK BCL8 y POTEB
2812	TGD. No dismorfia RETRASO MENTAL+ PREMATURIDAD + TDAH + rasgos	NORMAL+V	dup 10q26.3	31 Kb	CYP2E1 y SYCE1
3138	dimórficos RETRASO COGNITIVO + lesiones inespecíficas en sustancia occipital +	NORMAL+V	dup 15q11.2	1,93 Mb	BCL8 y POTEB
3183	torticolis congénita Retraso cognitivo. No	NORMAL+V	dup 15q11.2	1,93 Mb	BCL8 y POTEB
3071	dismorfias	NORMAL+V	dup 15q11.2	1,93 Mb	BCL8 y POTEB
3145	TGD	NORMAL+V	dup 15q11.2	1,93Mb	BCL8 y POTEB
3052	RETRASO MADURATIVO. Sospecha Asperger	NORMAL+V	dup 15q11.2	1,93Mb	BCL8 y POTEB
2874	Encefalopatía severa (Lennox-Gastaut)	NORMAL+V	dup 22q11.1	276 Kb	POTEB
2675	Dificultades escolares+def. atención TGD. No dismorfia. Fue una FIV de embrión congelado de estimulación anterior. Hermano con rasgos	NORMAL+V	dup 5	1,33Mb	COL23A1, CLK4, ZNF354A, GRM6, ADAMTS2, RUFY1, HNRPH1
2767	Asperger	NORMAL+V	dup 6p25.3	88,2 Kb	No genes OMIM
2676	Autismo	NORMAL			
3192	DISCAPACIDAD PSIQUICA ENCEF. PROGRESIVA. Andrea fallece en 2011 con diagnóstico de encefalopatía de sustancia blanca evanescente con 2 mutaciones en	NORMAL			
2658	heterocigosis en EIF2B5 ENCEFALOPATIA NO FILIADA + hemiparesia izda + escoliosis + pies planos valgus + crisis comiciales +	NORMAL			
3103	macrocefalia. ENCEFALOPATIA	NORMAL			
2828	SEVERA + crisis	NORMAL			

	epilépticas+ fenotipo peculiar	
	Encefalopatía severa.	
	Agenesia cuerpo calloso.	
	Síndrome de West	
2475	secundario a Ohtahara	NORMAL
	Gemelar. Retraso madurativo +	
2956	microcefalia. Gemelo con problema similar.	NORMAL
2425	R severo+ microcefalia	NORMAL
	R. psicomotor+facies peculiar	
2543		NORMAL
	RETRASO COGNITIVO +	
2270	facies peculiar	NORMAL
	Retraso cognitivo +	
	facies peculiar + pies	
3191	valgus	NORMAL
	RETRASO COGNITIVO +	
3182	rasgos dimórficos	NORMAL
2565	Retraso Cognitivo.	NORMAL
	Retraso cognitivo.	
3163	Prematura 29s	NORMAL
	RETRASO COGNITIVO+	
2865	LEVES R. DISMORFICOS	NORMAL
	Retraso cognitivo+fenotipo peculiar+ talla baja	
2638	retraso	NORMAL
	cognitivo+hiperactividad	
3180	Retraso generalizado.	NORMAL
	Posible TGD. Hipotonía	
2602	importante	NORMAL
	Retraso importante de maduración motora y cognitiva. Estereotipias y aleteos. Dismorfia. MLPA	
	y secuenciación de	
2275	MECP2-	NORMAL
	Retraso madurativo +	
	microcefalia + crisis	
2404	epilépticas	NORMAL
	Retraso madurativo +	
3322	TGD	NORMAL
	RETRASO MADURATIVO	
2947	GLOBAL	NORMAL
	Retraso madurativo y problemas de relación +	
3100	rasgos dismórficos.	NORMAL
	RETRASO MENTAL	NORMAL
	Retraso mental +	
2773	autismo.	NORMAL
	Retraso mental +	
	fenotipo peculiar. Llega de R.Dominicana a los	
2462	10 años	NORMAL
	RETRASO MENTAL	
	severo + epilepsia +	
	facies peculiar. Hermano	
2272	problema similar.	NORMAL
	RETRASO MENTAL	
	severo + epilepsia.	
	Hermano problema	
2271	similar.	NORMAL

	RETRASO MENTAL SEVERO. Llega de Guinea con 10 años. Paludismo en gestación. Identificación material	
2347	extra en 5p.	NORMAL
2345	RETRASO PSICOMOTOR	NORMAL
	Retraso psicomotor+ rasgos dismórficos + patología cardiaca y	
3081	renal	NORMAL
2465	RM no filiado	NORMAL
	RM no filiado. Déficit de	
2661	atención	NORMAL
	RM SIN FILIAR: retraso psicomotor, del lenguaje	
2662	+ déficit de atención.	NORMAL
	TDAH, CI limite y rasgos dismórficos+ labio y	
2955	fisura palatina= madre	NORMAL
	TDAH. Problema conducta. Hermana	
2566	autista. TGD	NORMAL
3070	TEA	NORMAL
	TEA (hermana gemela con mismo problema)	
2954	TEA + Retraso cognitivo	NORMAL
2368	+ convulsiones	NORMAL
2800	TGD	NORMAL
3144	TGD	NORMAL
2674	TGD (Asperger)	NORMAL
3162	TGD. Asperger	NORMAL
	TRASTORNO LENGUAJE	
	+TDAH + mechón blanco (descartada	
3341	hipoacusia)	NORMAL

A estos casos hemos añadido los 9 “probablemente benignos” reasignados a partir de las VOUS, lo que hace un total de 82 casos normales o con variantes benignas (81,4%).

#### **5.4- RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL CGH array.**

La reclasificación que hemos hecho con las VOUS, asignándoles valor para darles utilidad clínica, nos hace que podamos distinguir ya sólo dos grupos: las CNVs patológicas (causales) y las CNVs benignas (polimórficas), y podamos hacer una descripción más completa y comparativa de los datos obtenidos en este trabajo.

El número de casos estudiados ha sido 96.

Los casos con **CNVs PATOLÓGICAS** han sido **14**: 11 casos de CNVs causales (casos 2579, 2273, 2649, 2948, 2521, 3053, 4804, 2541, 2791, 3099, 2897) + 3 casos de VOUS que probablemente también sean causales (casos 2766, 2836, 2269).

Por tanto para este estudio el resultado sería: 14 pacientes con alteraciones genómicas patogénicas detectadas con CGH array, con las plataformas utilizadas.

Siendo por tanto **el rendimiento diagnóstico del aCGH del 14,6%**.

## **5.5- RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL CARIOTIPO**

Para el cálculo del rendimiento diagnóstico del cariotipo hemos tenido en cuenta los 230 últimos cariotipos realizados en el laboratorio de genética, con indicación retraso mental, retraso del desarrollo, trastorno generalizado del desarrollo o trastornos del espectro autista, con o sin defectos congénitos/rasgos dismórficos. Estos 230 casos lo forman los 96 pacientes con cariotipo normal que pasaron a aCGH, y 134 pacientes a los que se hizo sólo cariotipo, por las mismas indicaciones.

En el total de los 230 se detectaron por cariotipo con ó sin FISH, 7 casos con desequilibrio cromosómico.

Por tanto el **rendimiento diagnóstico del cariotipo del 3%**.

Las anomalías cromosómicas encontradas en este grupo fueron:  
4 casos de trisomía 21: 47,XX,+21 un caso, y 47,XY,+21 tres casos.  
1 caso 47,XYY  
1 caso de translocación desequilibrada 46,XX,t(4;11)  
1 caso de marcador identificado con FISH como idic(15)(pter->q11::q11->pter).

**Por tanto el aCGH es 4 veces más eficaz que el cariotipo.**

## 5.6- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y GENÓMICAS DE LAS CNVs IDENTIFICADAS:

Se analizaron las características de las CNVs para identificar las que están más asociadas a patología clínica.

Se realizó un análisis estadístico para determinar si alguna de las variables clínicas era un indicador de la presencia de reordenamientos genómicos, mediante una X cuadrado. Se establecieron tablas de contingencia de 2x2 y análisis mediante la prueba de Fisher en los casos que se requirió. Se consideró un nivel de significación estadística  $p < 0,05$ .

### 5.6.1- TAMAÑO

Tamaño CNV	CNV benignas n (%)	CNV causales n (%)	VOUS n (%)
< 0,3Mb	16 (55,2)	-	2 (16,7)
≥0,3 y <1Mb	2 (6,9)	2 (18,2)	8 (66,7)
≥1 y <10Mb	11 (37,9)	8 (72,7)	2 (16,7)
≥10Mb	-	1 (9,1)	-
<b>TOTAL</b>	<b>29 (100,0)</b>	<b>11 (100,0)</b>	<b>12 (100,0)</b>

Tabla 5.- tamaño de las CNVs

A partir de la tabla 5 aplicamos el test de Fisher bilateral para comparar los tamaños entre CNVs de <1 Mb y ≥1Mb, tomando como referencia las CNV causales. Observamos una mayor proporción de CNV mayores o iguales a 1 Mb en las CNV causales (82%) que en las CNV benignas (38%) o en las VOUS (17%), siendo ambas diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,031$  y  $p = 0,003$ , respectivamente).

En cambio, el test exacto de Fisher bilateral muestra diferencias no significativas ( $p = 0,276$ ) en el tamaño de las CNV de las VOUS y las CNV benignas.

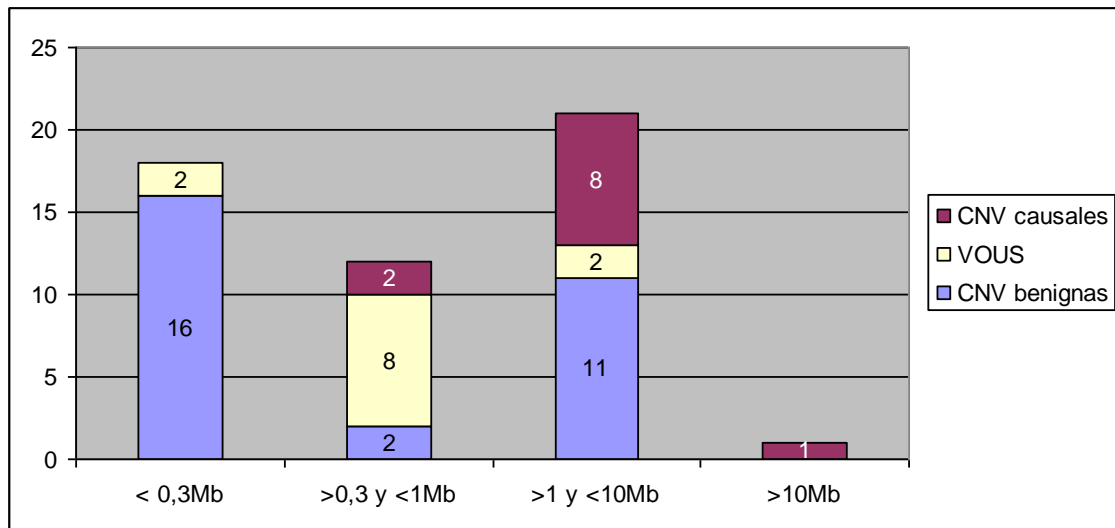


Gráfico 1.- Tipo de CNV según su tamaño.

Cabe destacar, como se muestra en el gráfico 1, que el tamaño de las benignas es fundamentalmente pequeño, menor de 300Kb. En el tamaño de 1 a 10Mb llama la atención que se han encontrado bastantes (11) casos de benignas. Es precisamente a costa de duplicaciones y deleciones recurrentes que se producen en 15q11, por tener esa zona una arquitectura genómica particular, con duplicaciones segmentarias, que confiere susceptibilidad a recombinaciones no homólogas con puntos de rotura específicos. De ahí que el tamaño de estas CNVs, tan presentes en la población general, sea bastante constante, de 1.3-1,9 Mb.

En el grupo de CNVs causales, no se ha encontrado ninguna por debajo de 300Kb, lo que hace por tanto poco probable que tamaños menores tengan significación clínica. La mayoría de las causales tienen tamaños entre 1 y 5 Mb.

Por encima de 5Mb sólo se ha encontrado 1 caso, de 10Mb, responsable de la patología clínica del paciente. Es el único tan grande en todo el grupo de CNVs. Esto parece lógico teniendo en cuenta que es una muestra ya filtrada pues había pasado por un cariotipo anteriormente. Esto nos lleva a pensar que, aunque se ha escapado citogenéticamente esta patología (una deleción de 10Mb en cromosoma 3), estos datos nos han servido como control de calidad citogenético en este laboratorio, dándonos una tasa de falsos negativos para el cariotipo del 1%.

En el grupo de VOUS, los tamaños que se presentan con más frecuencia son entre 300Kb y 1Mb.

### 5.6.2- HERENCIA

En esta variable no tuvimos en cuenta los casos de CNVs benignas, pues en éstos, al tener claro su papel no patogénico, no se amplió el estudio a los progenitores y por tanto desconocemos si son heredadas.

tipo de CNV	CNV causal (%)	VOUS (%)
heredada	50	55
de novo	50	45
TOTAL	100	100

Tabla 6.- Frecuencia de heredadas y de novo en los grupos de CNV causales y VOUS

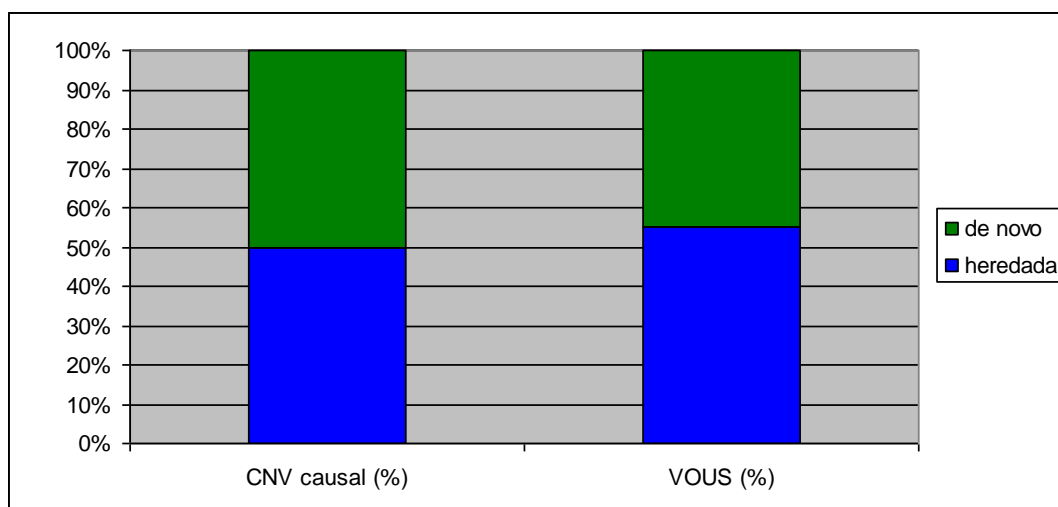


Gráfico 2.- Representación de las CNV heredadas y de novo por grupos de causales y VOUS.

Entre las 11 CNVs causales sólo en 8 casos conocíamos su herencia, siendo la mitad heredadas y la mitad de novo (tabla 6 y gráfico 2). De los 4 casos heredados 2 tenían origen materno, 1 origen paterno, y hubo un caso con dos CNVs, una materna y otra paterna. Éste es el único de los cuatro casos cuyos progenitores también estaban afectados, aunque en menor medida.

Uno de los casos de novo, tras la aplicación de FISH, se vió que consistía en una deleción producida como derivado de una translocación materna equilibrada.

En los casos de VOUS, sólo en un caso desconocíamos la herencia por negativa del padre a colaborar. Casi la mitad fueron de novo. De los 6 casos heredados sólo en uno el padre tenía fenotipo similar, siendo los otros 5 heredados de progenitor sano. El Chi cuadrado= 0,50 muestra una diferencia estadísticamente NO significativa ( $p=0,479$ ) entre la herencia y el tipo de CNVs.

### 5.6.3- TIPO DE ALTERACIÓN (ganancia/pérdida)

<b>Tipo de CNV</b>	<b>CNV causal</b> n (%)	<b>VOUS</b> n (%)	<b>CNV benigna</b> n (%)
DELECIÓN	10 (91)	3 (25)	18 (62)
DUPLICACIÓN	1 (9)	9 (75)	11 (38)
<b>total</b>	<b>11 (100)</b>	<b>12 (100)</b>	<b>29 (100)</b>

Tabla 7.- Deleción o duplicación en los tres grupos de CNVs

Seleccionamos a partir de la tabla 7, la CNV causal como referencia o comparador para aplicar test exacto de Fisher bilateral, observándose en el caso de VOUS una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,003$ ): las deleciones son mucho más frecuentes en las CNV causales que en las VOUS.

Al comparar las benignas respecto a las causales la diferencia resulta estadísticamente no significativa ( $p= 0,124$ ).

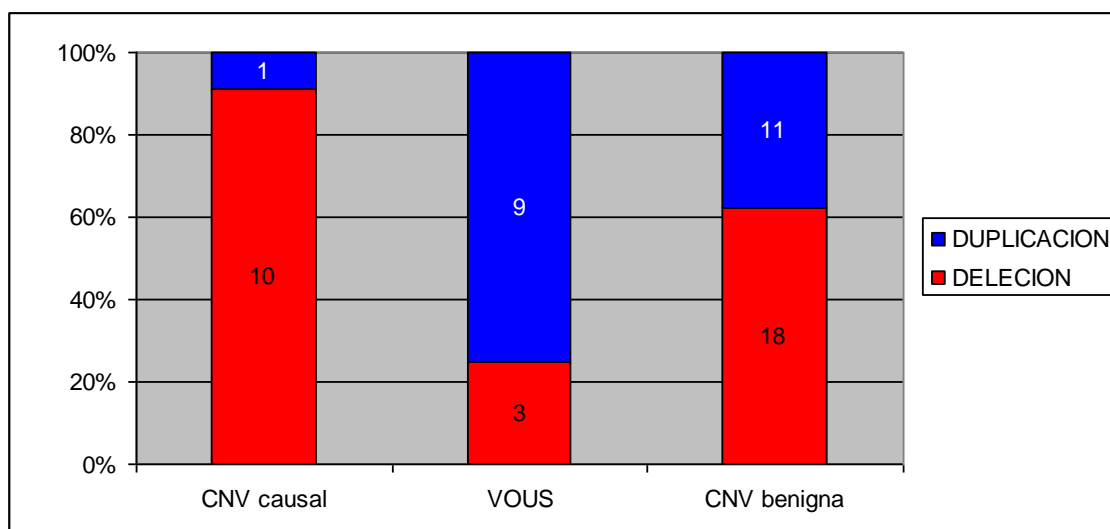


Gráfico 3.-frecuencia de duplicaciones y deleciones por grupo de CNV.

Es evidente, como muestra el gráfico 3, que las CNVs patológicas son fundamentalmente deleciones, cuyos efectos en el fenotipo, como es esperable, han sido mayores. El 91% de las CNV causales son deleciones. En las benignas sólo el 62% fueron deleciones.

#### 5.6.4- LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA

CROMOSOMA	CNV causal n (%)	VOUS n (%)	CNV benigna n (%)
1	1 (7,1)	-	7 (13,5)
2	-	2 (15,4)	2 (3,8)
3	1 (7,1)	1 (7,7)	2 (3,8)
4	1 (7,1)	1 (7,7)	1 (1,9)
5	-	-	2 (3,8)
6	-	2 (15,4)	4 (7,7)
7	-	-	4 (7,7)
10	-	-	3 (5,8)
14	1 (7,1)	-	2 (3,8)
15	4 (28,6)	1 (7,7)	20 (38,5)
16	1 (7,1)	2 (15,4)	1 (1,9)
18	1 (7,1)	-	-
19	-	2 (15,4)	-
22	4 (28,6)	1 (7,7)	2 (3,8)
X	-	1 (7,7)	1 (1,9)
<b>TOTAL</b>	<b>14 (100,0)</b>	<b>13 (100,0)</b>	<b>52 (100,0)</b>

Tabla 8.- Cromosomas implicados y su frecuencia por grupos de CNVs.

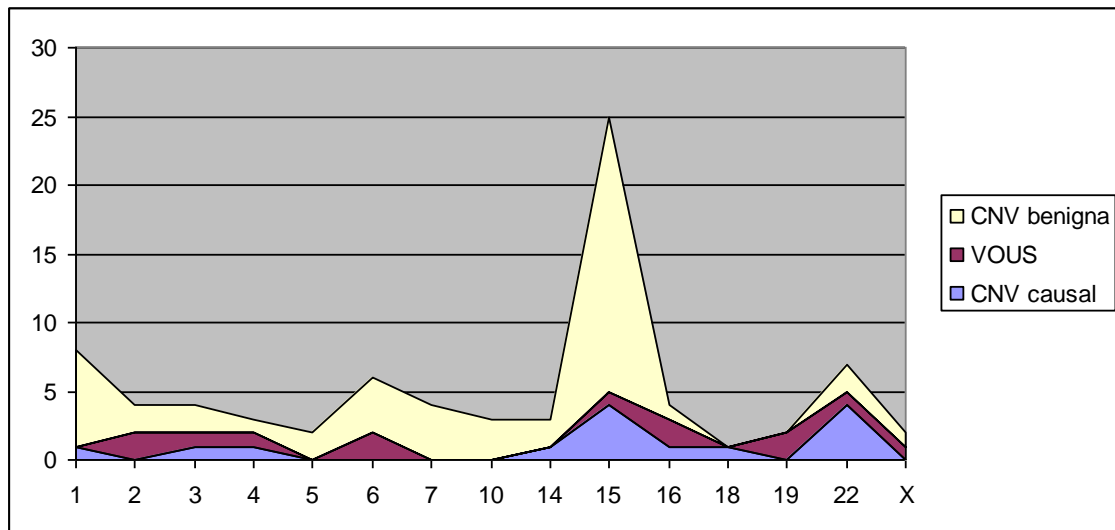


Gráfico 4.- Frecuencia de cromosomas implicados en las diferentes CNVs

El cromosoma más frecuente implicado tanto en las CNV causales como en las benignas es el cromosoma 15, tal y como se observa en la tabla 8 y en el gráfico 4. Las CNVs benignas del 15 se encuentran localizadas en una región concreta 15q11, que comprende los genes POTE8 y BCL8, y se encuentra tanto como deleción como duplicación.

El segundo cromosoma más frecuentemente implicado en las benignas es el cromosoma 1, encontrándose sólo deleciones en 1p36, en 1q31 y en 1q23.

Y en tercer lugar estaría el cromosoma 6 con deleciones y duplicaciones en su brazo corto.

En las causales es frecuente encontrar deleciones en 22.

Cromosomas en los que no se han encontrado CNVs: 8, 9, 11, 12, 13, 17, 20, 21, Y.

#### LOCALIZACION DENTRO DEL CROMOSOMA

La mayoría (82%) de las CNVs en los grupos patogénicos o de significado incierto, estaban localizadas intersticialmente en el cromosoma (tabla 9), y sólo en cuatro casos se localizaba a nivel subtelomérico.

<b>localizacion en el cromosoma</b>	<b>CAUSAL</b> n (%)	<b>VOUS</b> n (%)	<b>TOTAL</b> n (%)
Intersticial	9 (81,8)	10 (83,3)	19 (82,6)
telomérica	2 (18,2)	2 (16,7)	4 (17,4)
<b>TOTAL</b>	<b>11 (100,0)</b>	<b>12 (100,0)</b>	<b>23 (100,0)</b>

Tabla 9.- Frecuencia de anomalías subtelo méricas/intersticiales según grupo de CNV.

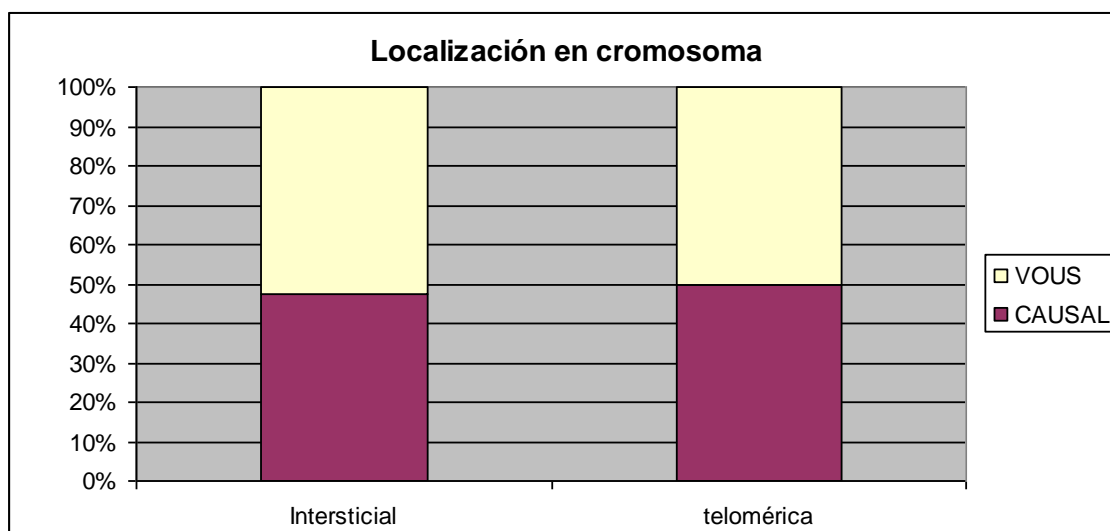


Gráfico 5.- Frecuencia de VOUS y CNV causales en cuanto a localización.

La frecuencia de CNV causales o VOUS en las CNVs localizadas en los telómeros o intersticialmente, fue similar (gráfico 5).

En 4 de los 96 casos se detectaron CNV en localización subtelo mérica (4,2%) y 19 casos tenían anomalías intersticiales (23,2%). La diferencia según el test exacto de Fisher bilateral resulta NO significativa ( $p=1,000$ ).

### 5.6.5- CONTENIDO EN DUPLICACIONES SEGMENTARIAS

El 30,4% de las CNV se localizaban en regiones ricas en DS (tabla 10) y posiblemente el mecanismo NAHR haya producido dichas CNVs. El 69,6% restante no tenía duplicaciones segmentarias próximas por lo que su mecanismo de producción podría ser mecanismos mutacionales basados en no-homología. Si hacemos el intervalo de confianza para estimar la verdadera proporción de CNV en regiones DS obtenemos que, con un 95% de seguridad, la verdadera proporción de CNV con DS se encuentra entre 12 y 49% del total.

Contienen DS	CAUSAL n (%)	VOUS n (%)	TOTAL n (%)
SI	4 (36,4)	3 (25,0)	7 (30,4)
NO	7 (63,6)	9 (75,0)	16 (69,6)
TOTAL	11 (100,0)	12 (100,0)	23 (100,0)

Tabla 10.- Frecuencia de duplicaciones segmentarias según grupo de CNV.

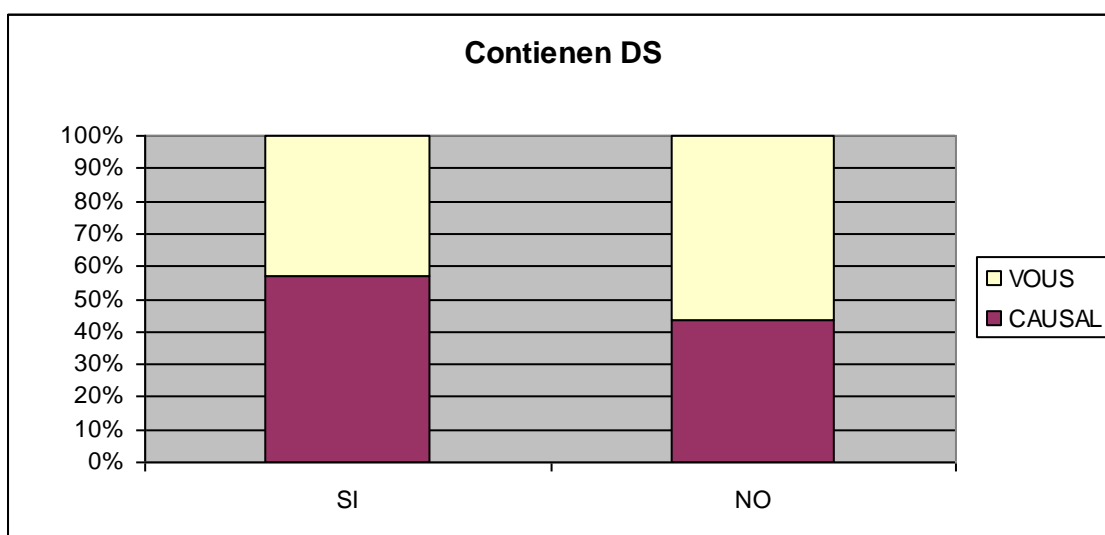


Gráfico 6.- Frecuencia de VOUS y causales según la CNV estuviera o no localizada en región rica en CNVs.

La diferencia en contenido de duplicaciones segmentarias (gráfico 6), entre CNVs causales y VOUS, según el test exacto de Fisher bilateral, resulta no significativa (0,668).

### 5.6.6- NUMERO DE CNVs POR CASO

En este apartado analizaremos el número de CNVs en dos grupos: en el grupo de causales (incluidas las probablemente causales) y en el de benignas (incluidas las probablemente benignas).

En 44 de los 96 pacientes estudiados (45,8%) NO se ha detectado ninguna CNV.

Separando los grupos (tabla 11) observamos que lo más frecuente es encontrar una sólo CNV, tanto en el grupo de patológicos como en el grupo control, aunque en casi la mitad de los casos patológicos se encontró al menos otra CNV asociada (gráfico 7).

La comparación estadística mediante chi cuadrado del número de CNVs en los patológicos respecto a los no patológicos muestra una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ): es más frecuente encontrar más CNVs en los casos patológicos.

Nº de CNVs	Casos patológicos	Casos normales
	n (%)	n (%)
0	0 -	44 (54,0)
1	8 (57,0)	31 (37,0)
≥2	6 (43,0)	7 (9,0)
<b>TOTAL</b>	<b>14 (100,0)</b>	<b>82 (100,0)</b>

Tabla 11.- Número y frecuencia de CNVs en los grupos de casos normales y patológicos.

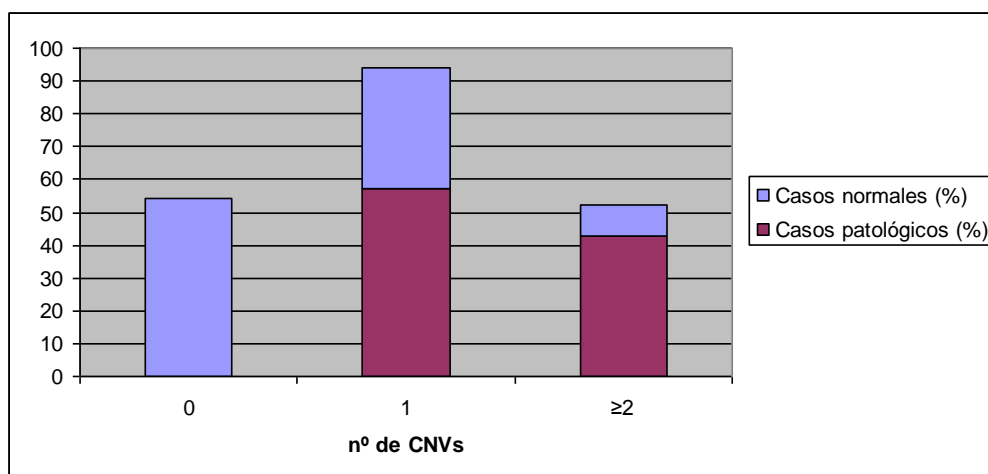


Gráfico 7.- Frecuencia de casos normales y patológicos con 0, 1 o más CNVs

## 5.7- ESTUDIO COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO SEGÚN LA PLATAFORMA GENÓMICA.

Analizando la tabla 12 observamos que la plataforma que consigue mejor equilibrio entre detección de CNVs con significado patológico y aparición de VOUS, es la de 44K. Debemos tener en cuenta no obstante que este hallazgo no es del todo valorable, por dos razones. En primer lugar el escaso número de pacientes analizado con cada plataforma, y en segundo lugar porque no se han utilizado los mismos casos en las distintas plataformas.

PLATAFORMA	CNVs patológicas	VOUS	CNVs benignas	Total CNVs	Total casos estudiados
<b>44K</b>	5 (14,3%)	3 (8,6%)	5 (14,3%)	13 (37,1%)	35
<b>60K</b>	3 (8,3%)	5 (13,9%)	14 (38,9%)	22 (61,1%)	36
<b>KaryoArray 2.0</b>	1 (9,1%)	2 (18,2%)	6 (54,5%)	9 (81,9%)	11
<b>KaryoArray 3.0</b>	2 (14,3%)	2 (14,3%)	4 (28,6%)	8 (57,1%)	14
<b>Total</b>	11 (11,5%)	12 (12,5%)	29 (30,2%)	52 (54,2%)	96

Tabla 12.- Rendimiento diagnóstico para las cuatro plataformas utilizadas.

Si analizamos el rendimiento de las plataformas desde el punto de vista de utilidad clínica, asignando valor a las VOUS, la detección por plataforma queda reflejada en la tabla 13:

<b>Plataforma</b>	<b>CNV causales</b>	<b>CNV benignas</b>	<b>TOTAL casos analizados</b>
<b>44K</b>	6 (17%)	7 (20%)	35
<b>60K</b>	4 (11%)	18 (50%)	36
<b>KaryoArray 2.0</b>	2 (18%)	7 (64%)	11
<b>KaryoArray 3.0</b>	2 (14%)	6 (43%)	14
<b>TOTAL</b>	<b>14 (14,6%)</b>	<b>38 (40%)</b>	<b>96</b>

Tabla 13.- Rendimiento diagnóstico.

Se ha encontrado en general un 14,6% de casos con CNV causal y un 40% de casos con CNV benignas.

## **5.8- ESTUDIO DE VARIABLES CLÍNICAS**

El análisis de variables clínicas nos interesa hacerlo sobre todo en el grupo de casos con CNVs patológicas o probablemente patológicas. Para ello, como hemos explicado anteriormente, hemos añadido al grupo de CNVs patológicas, aquellas VOUS a las que hemos podido otorgar un valor de probablemente causal, haciendo un total de 14 casos con CNV patogénicas.

### **5.8.1- EDAD DE LOS PACIENTES:**

La edad media de los pacientes en el momento de la aparición de sus primeros signos fue de 19 meses.

En el gráfico 8 quedan reflejadas las edades que tenían los pacientes cuando se les hizo el array. La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico con arrays de CGH fue de 117 meses (9,75 años), es decir 9 años y 9 meses.

Por lo tanto el tiempo medio de demora, desde la aparición de los primeros signos de discapacidad hasta el diagnóstico con array fue de **8,2 años (8 años y dos meses)**.

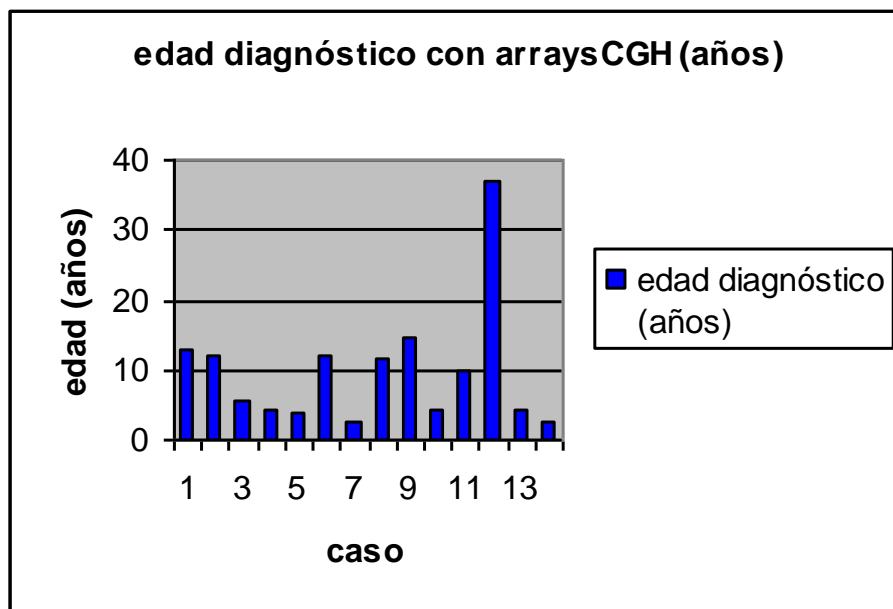


Gráfico 8.- Edades de los pacientes cuando se les realizó el CGH array.

### 5.8.2- SEXO DE LOS PACIENTES:

En la muestra estudiada (tabla 14, gráfico 9), la proporción de sexos es aproximadamente 60M:40F. Esta proporción se mantiene en el grupo donde se encontró alguna CNV benigna. Sin embargo la proporción de CNVs causales es similar en los dos sexos aunque no se puede valorar por el reducido número de casos. Desde el punto de vista estadístico no hay diferencias significativas entre el sexo y la frecuencia de CNV causales o benignas (Chi cuadrado= 0,74 (p bilateral=0,391).

SEXO	Total casos estudiados con array	casos con CNV causal n (%)	casos con CNV benigna n (%)
femenino	38	7 (18,4)	14 (36,8)
masculino	58	7 (12,1)	24 (41,4)
<b>total</b>	<b>96</b>	<b>14 (14,6)</b>	<b>38 (39,6)</b>

Tabla 14.- CNV causales y benignas por sexos.

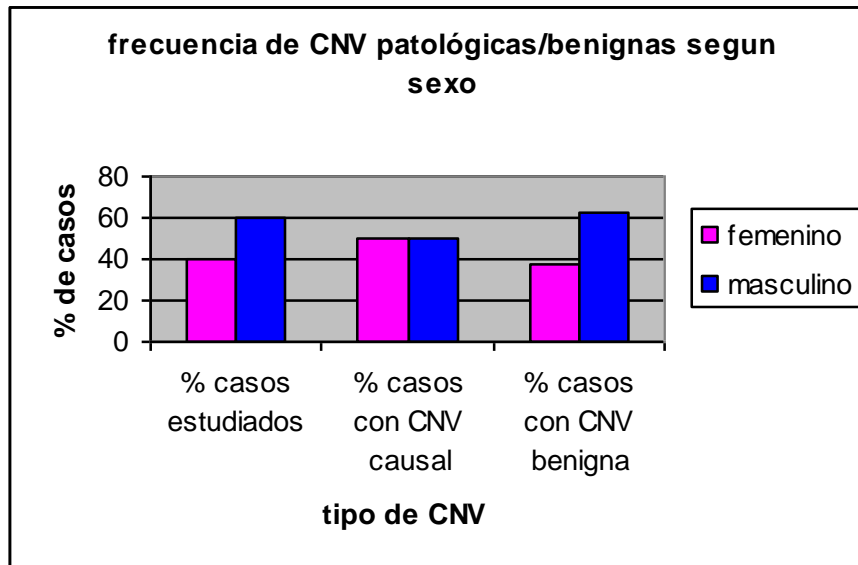


Gráfico 9.- Frecuencia de CNV patológicas/benignas según sexo.

Parece que es igual de frecuente, entre las niñas que entre los niños, que la causa de su discapacidad sea un desequilibrio genómico. Por tanto se quedan sin diagnosticar, tras arrays, un porcentaje mayor de niños que de niñas. Posiblemente entre los varones haya que buscar como factor etiológico mutaciones en genes del cromosoma X.

### 5.8.3- INDICACIÓN CLÍNICA DEL CGH ARRAY

Los casos en los que con más frecuencia se ha solicitado estudio de CGH array (gráfico 10) han sido aquellos que tenían retraso mental y fenotipo peculiar (29%), casos con retraso mental (21%) y casos con trastornos del espectro autista (16%).

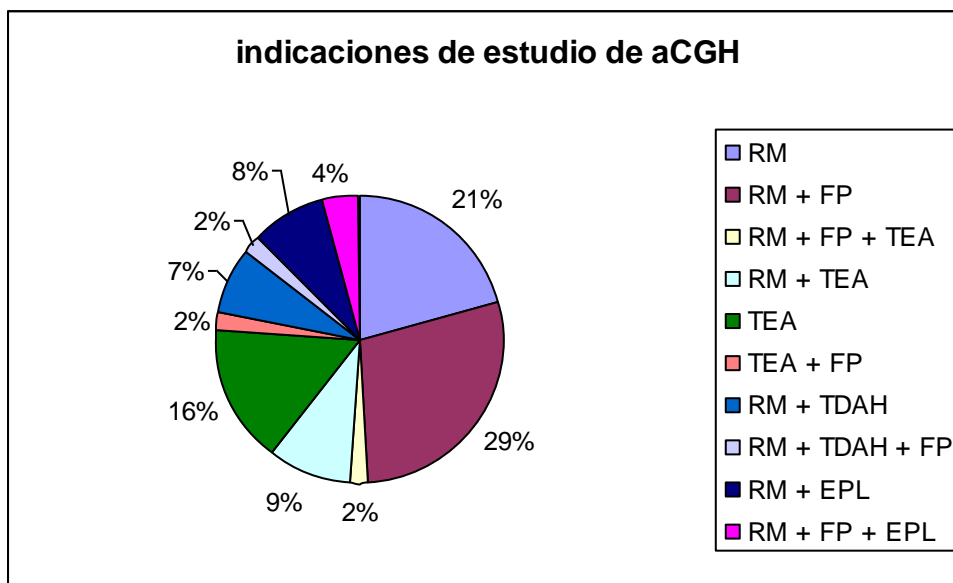


Gráfico 10.- Indicaciones de estudio de array.

Si consideramos las indicaciones y las analizamos en la tabla 15 junto con las indicaciones en las que se encontró CNV causal, observamos que la indicación "fenotipo peculiar" y "epilepsia" son las mejores indicaciones para solicitar CGH array.

Indicación Array	casos estudiados	CNV causal presente (% de casos)
RM	79	11 (14%)
FP	37	8 (22%)
TEA	28	3 (11%)
TDAH	9	-
EPL	12	2 (17%)
total	165	24 (15%)

RM:retraso mental, FP: fenotipo peculiar, TEA: trastornos espectro autista, TDAH: trastorno de deficit de atención hiperactividad, EPL: epilepsia

Tabla 15.-Rendimiento diagnóstico según indicación de estudio.

Analizando la siguiente tabla (tabla 16) encontramos que lo que se ha solicitado con más frecuencia efectivamente es la indicación en la que se ha encontrado más patología. Quizá habría que plantearse si el trastorno de hiperactividad y déficit de atención merece la pena estudiarlo por arrayCGH, pues no se ha detectado patología y por tanto no parece una buena indicación.

Indicación Array	Casos Estudiados	CNV causal presente
	n (%)	n (%)
RM	79 (48)	11 (46)
FP	37 (22)	8 (33)
TEA	28 (17)	3 (13)
TDAH	9 (5)	-
EPL	12 (7)	2 (8)
<b>TOTAL</b>	<b>165 (100)</b>	<b>24 (100)</b>

RM: retraso mental, FP: fenotipo peculiar, TEA: trastornos espectro autista, TDAH: trastorno de déficit de atención hiperactividad, EPL: epilepsia

Tabla 16.- Frecuencia de casos estudiados y casos patológicos según indicación.

## 5.9.- ESTUDIO DE COSTE-EFECTIVIDAD

Para saber si es coste-efectivo el estudio de arrays de CGH tenemos que comparar dos estrategias.

La estrategia actual (estrategia A), en la línea de otros autores, sería hacer el aCGH como primera prueba genética a todos los niños con retraso mental y trastornos del espectro autista. En caso de encontrar CNV causal o VOUS hacer también array a los padres, y sólo en las causales "de novo" hacer cariotipo con FISH a paciente y padres para localizar la CNV.

Vamos a calcular si es coste-efectivo comparado con la estrategia utilizada hasta ahora (estrategia B) que era sólo hacer cariotipo y FISH:

cariotipo a todos los pacientes y hacer además FISH al 20% que son los que habitualmente vienen con sospecha de síndrome de microdelección. Y, en caso de patología, hacer cariotipo y FISH a los padres.

#### Efectividad:

La mejor medida de la efectividad, como ya se ha apuntado anteriormente es el rendimiento diagnóstico.

Según los resultados de este estudio con 96 muestras, el rendimiento del **aCGH es 14,6%** y el **del cariotipo es del 3%**. Es decir, es más de 4 veces más eficaz el array que el cariotipo.

Además de la efectividad somos conscientes que el aCGH aporta unos beneficios adicionales en forma de utilidad clínica y utilidad personal. En general resulta difícil determinar y cuantificar la utilidad de la información genética generada, y hay una falta de estudios poblacionales que evidencien los beneficios clínicos de las pruebas genéticas.

Factores a tener en cuenta para valorar la utilidad son: beneficio de la información, repercusión en los pacientes y en sus familias, el impacto de la información en el clínico, utilidad personal en el paciente, aspectos relacionados con su implantación: equidad y ética.... Sin embargo existe la dificultad de utilizar una medida en la que se pueda englobar todo lo anterior. Los métodos actuales para el análisis de coste-efectividad no contemplan esta posibilidad.

#### Coste:

En una comparación de estrategias lo correcto es calcular el coste por diagnóstico en cada estrategia entendido como la suma de los costes que conlleva cada estrategia, dividido por los casos diagnosticados.

En primer lugar debemos obtener la cifra de gasto total de 100 casos que ha supuesto el aCGH, por un lado, y el cariotipo por otro, como prueba de referencia.

Sabiendo que el rendimiento de cada prueba en nuestra Unidad ha sido del 14,6% para los arrays y del 3% para el cariotipo, dividiendo el coste total por el rendimiento, tendremos el coste por diagnóstico.

### **Estrategia A:**

En el coste total de 100 casos de array debemos incluir:

1 array/caso. Los arrays de estos pacientes se han enviado la mayoría a un laboratorio externo privado que ha facturado 450euros por cada caso realizado, por lo que en ese coste están incluidos todos los gastos: de reactivos, personal, amortización de aparatos...

+ 23 arrays x2 (arrays a los dos progenitores de las CNV causales y VOUS)

+ 7 FISH x3 correspondientes a cariotipos con FISH del paciente con CNV patológica de novo (la mitad) y de sus padres para determinar localización. El coste del cariotipo (185e) y del FISH (88e) se han obtenido de los precios públicos fijados por la comunidad de Madrid por la prestación de servicios y actividades en sus centros, IVA incluido, y publicados en la Orden 629/2009 del BOCM de 10 de septiembre de 2009.

El coste total de 100 casos de arrays se eleva por tanto a:

$45.000 + 20.700 + 5.733 = 71.433$  euros.

Dividido por el rendimiento 14,6%= **4.892 euros coste por diagnóstico con array CGH.**

### **Estrategia B:**

En el caso de mantener la estrategia actual, de sólo hacer cariotipo, y FISH en algunos casos de sospecha:

El coste total por 100 cariotipos:

1 cariotipo/caso (a 185 euros según fuente citada anteriormente)

+ 20 FISH/cada 100 casos (88euros/FISH)

+ 3 cariotipos con FISH x 2 a los padres de los patológicos (185 +88 euros/caso)

El coste total de 100 cariotipos es:

$18500 + 1760 + 1638 = 21.898$  euros

Divido por el rendimiento 3%= **7.299 euros coste por diagnóstico con cariotipo.**

Aunque a priori resulta MAYOR el coste del aCGH que el del cariotipo (el coste de un solo cariotipo son 185 euros, el de un FISH 88 euros y el de un aCGH 450 euros), no podemos olvidar que las pruebas llevan en ocasiones otros gastos derivados de análisis de confirmación, a familiares... por lo que es más real, a la hora de hacer una evaluación económica de la implantación de una tecnología, hacer un cómputo de los costes por diagnóstico según la estrategia utilizada ó a utilizar.

Bajo esta perspectiva, **resulta MENOR el coste por diagnóstico en la estrategia de realizar aCGH como primera herramienta de diagnóstico genético.**



## **6- DISCUSIÓN**



## **6- DISCUSION**

Es evidente el creciente interés científico y clínico por los arrays y las duplicaciones segmentarias, puesto de manifiesto en el incremento en el número de publicaciones que aparecen en la base de datos Pubmed. Haciendo una búsqueda a 10 de enero de 2012, el número de entradas para "segmental duplications" fue de 644 y para "CGH array" fue de 2173, que varían desde 2 artículos en los años iniciales hasta más de 300 en 2011.

Los avances tecnológicos y bioinformáticos son los que han provocado el rápido desarrollo de este área de la genómica. Tecnologías más sencillas, más baratas y eficaces han conseguido que pueda aplicarse en multitud de laboratorios con fines de investigación y últimamente para el diagnóstico clínico. Fruto de ese desarrollo son la cantidad de publicaciones sobre el tema que están consiguiendo que se avance a la velocidad que lo estamos haciendo en el campo de la genómica. Estas cantidades ingentes de datos a procesar, a actualizar, a relacionar, a asociar y a hacerlo de un modo "instantáneo" y de acceso gratuito, no podría jamás haber sido posible sin las tecnologías informáticas.

Además de la base de datos Pubmed utilizada como herramienta para toda la búsqueda bibliográfica, para este trabajo se han utilizado diversas herramientas de información, fundamentalmente las dependientes de NCBI. El NCBI es el Centro Nacional de Información Biotecnológica, creado el 1988 como una división dentro del National Library of Medicine (NLM), de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y que se encarga de crear sistemas automáticos de almacenamiento y análisis de conocimiento en biología molecular. De igual valía son los sistemas hospedados por los Institutos Canadienses de Investigación en salud.

La tecnología de los arrays de CGH aplicada a la discapacidad intelectual tiene ya experiencia. Lo que hace 4 años, cuando se comenzó este proyecto, era una técnica incipiente que parecía muy prometedora para el diagnóstico de deleciones y duplicaciones genómicas causales de patología, se ha convertido en muy poco tiempo en una técnica diagnóstica afianzada.

Los resultados de este estudio confirman una vez más su eficacia en el campo de la discapacidad intelectual, siendo una técnica con una capacidad diagnóstica, sin precedentes, de alteraciones genómicas.

El término trastorno genómico lo acuñó Lupski en 1998 para describir una ganancia o pérdida de una región cromosómica específica asociada a un síndrome clínico que puede presentarse con anomalías congénitas, o con alteraciones en la función neurológica y cognitiva. Tal y como Emanuel et al 2007 resumen, en general se cree que las características clínicas de los trastornos genómicos reflejan los cambios en el número de copias normales, o de las dosis de los genes contenidos en el intervalo (genes haploinsuficientes). De manera menos frecuente el fenotipo puede estar producido por la disrupción de un gen, la creación de un gen de fusión por un efecto de posición o porque se desenmascara una mutación en un gen recesivo.

## **6.1- CNVs DESCRITAS EN NUESTRA POBLACIÓN**

Las 14 CNVs detectadas en esta población y que están produciendo patología a sus portadores se pueden resumir a continuación:

- Hemos observado que en 3 casos la ganancia o pérdida cromosómica es responsable de un síndrome ya descrito:

Casos 3053 y 2541 con una deleción 22q11.2 asociada a Síndrome de DiGeorge.

Caso 4804 con deleción en 22q13.3 asociada a Síndrome de Phelan McDermid.

- En 3 casos se han encontrado casos con patología similar en la base de datos DECIPHER y por tanto se pueden considerar trastornos genómicos conocidos:

Caso 2579 con deleción en 22q13.2

Caso 2273 con deleción en 3q13.33

Caso 2521 con deleción en 1p34.3

- En 3 casos las CNVs contienen genes responsables de patología cognitiva o neuropsiquiátrica:

Casos 2948 y 2897 con deleción en 15q13.2. Este último caso tiene además otra deleción en 16p12 también asociada a retraso y trastornos neuropsiquiátricos.

Caso 3099 con duplicación en 15q11.2

- En 2 casos la CNV está contenida en una región en la que se ha descrito con frecuencia duplicaciones y deleciones que producen patología:

Caso 2766 con duplicación en 15q13.3

Caso 2269 con duplicación en 4p15

- En 2 casos no se han encontrado fenotipos parecidos en DECIPHER, pero sí en publicaciones aisladas los pacientes tienen patología muy similar.

Caso 2649 con deleción en 14q23.2

Caso 2791 con deleción en 18q23.

- En 1 caso no se ha detectado caso con fenotipo similar, pero el tamaño de la CNV es altamente probable que sea responsable de la patología.

Caso 2836 con deleción en 19q12.

Todos estos casos se han incluido en la base de datos de DECIPHER con el fin de ayudar a la comunidad científica en la interpretación de las CNVs. La utilidad de la aplicación de el CGH array se discute más adelante.

## **6.2- COMPARACIÓN EN TÉRMINOS DE RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO.**

**El rendimiento diagnóstico** es una buena medida de efectividad y se calcula como el número de pruebas con resultado informativo de patología.

El rendimiento diagnóstico de los CGH arrays en el campo del retraso mental, retraso del desarrollo, defectos congénitos y trastornos del espectro

autista varía, como ya se ha comentado, dependiendo de la plataforma utilizada, de las características de los pacientes estudiados, y en gran medida también de la interpretación de la CNV detectada.

En general se acepta un rendimiento diagnóstico del 12-15%. Siendo los últimos metanálisis los que nos dan las cifras más acertadas:

Xiang et al 2010 en su estudio multicéntrico de 1.499 pacientes con retraso mental nos aportan los rendimientos expuestos en su tabla (fig.46):

Lab	No. of patients	No. patients with pathogenic CNCs	Diagnostic yield (%)
M	545	74	14
Y	275	38	14
H	319	21	7
T	227	25	11
A	133	19	14
Total	1499	177	12

M, University of Miami Miller School of Medicine; H, Children's Hospital Boston and Harvard Medical School; Y, Yale University School of Medicine; T, Tulane University School of Medicine; and A, University of South Alabama.

Figura 46.- Resultados de array CGH de 5 laboratorios según Xiang et al 2010

Y Miller et al 2010 en la publicación de la revisión de 33 estudios de 21.698 pacientes que hizo el consorcio Isca, dan una estimación de capacidad diagnóstica de los arrays del 15-20%.

El resultado del **presente estudio** nos muestra varias posibilidades de rendimientos diagnósticos:

Partiendo de los 96 estudios de array de CGH:

Una posibilidad inicial es si consideramos 44 casos normales (45,8%) y 52 casos con alguna CNV. Nuestro rendimiento sería **54,2%**, que evidentemente NO es el rendimiento diagnóstico para medir la eficacia en

términos de patogenicidad. Este rendimiento expresa simplemente la capacidad de nuestras plataformas para detectar alguna CNV.

Una segunda posibilidad es aquella en la que no tenemos en cuenta las 29 CNVs benignas: hemos detectado 73 casos normales (76%) y 23 casos con CNVs patogénicas o VOUS, lo que daría un rendimiento del 24%. Este cálculo de rendimiento diagnóstico tampoco parece apropiado pues tampoco se refiere a lo que hemos especificado en el concepto descrito anteriormente de rendimiento diagnóstico (pruebas con resultado informativo de patología).

Y finalmente si descartamos las VOUS, que aunque no descritas como polimorfismos, tampoco nos dan un resultado informativo de patología, el rendimiento en este estudio quedaría en el 11,4%.

A priori puede parecer un rendimiento diagnóstico menor que los anteriormente descritos, pero hay que ser consciente que en la literatura en ocasiones aparecen cifras mayores debido a que se han contabilizado junto a las variantes patogénicas, las de significado incierto. Este es el caso, entre otros, del estudio de Ahn et al 2010 en el que incluyen en su 24% de rendimiento diagnóstico, todas las CNVs potencialmente patogénicas (es decir incluyen VOUS).

La aparición de CNVs de significado incierto es el principal problema con el que nos encontramos al utilizar estos niveles de resolución, y se corresponde con los falsos positivos.

Aunque no existe una regla universal para dar un significado a las CNV, el consenso que el consorcio ISCA publicó en 2010 (Miller et al) nos ofrece una tabla orientativa para asignar patogenicidad a las CNVs, y que en este proyecto hemos utilizado (Fig.47), aunque con alguna variación.

Figura 47.- Asignación de patogenicidad a una CNV según Miller et al 2010

Primary Criteria	Indicates CNV Is Probably	
	Pathogenic	Benign
1. a. Identical CNV inherited from a healthy parent <sup>b</sup>		✓
b. Expanded or altered CNV inherited from a parent	✓	
c. Identical CNV inherited from an affected parent	✓	
2. a. Similar to a CNV in a healthy relative		✓
b. Similar to a CNV in an affected relative	✓	
3. CNV is completely contained within genomic imbalance defined by a high-resolution technology in a CNV database of healthy individuals		✓
4. CNV overlaps a genomic imbalance defined by a high-resolution technology in a CNV database for patients with ID/DD, ASD, or MCA	✓	
5. CNV overlaps genomic coordinates for a known genomic-imbalance syndrome (i.e., previously published or well-recognized deletion or duplication syndrome)	✓	
6. CNV contains morbid OMIM genes <sup>c</sup>	✓	
7. a. CNV is gene rich	✓	
b. CNV is gene poor		✓
<b>General Findings<sup>d</sup></b>		
1. a. CNV is a deletion	✓	
b. CNV is a homozygous deletion	✓	
2. a. CNV is a duplication (no known dosage-sensitive genes)		✓
b. CNV is an amplification (greater than 1 copy gain)	✓	
3. CNV is devoid of known regulatory elements		✓

<sup>a</sup>Single copy-number change.  
<sup>b</sup>An inherited deletion from an unaffected parent could harbor an OMIM morbid gene that is recessive and could be pathogenic in conjunction with a point mutation on the *trans* allele inherited from the other parent.  
<sup>c</sup>CNV should produce the same type of mutation that is known to cause the OMIM disease (e.g., a heterozygous deletion can cause an OMIM disease that is usually caused by a heterozygous inactivating mutation) and the phenotype produced should be that expected for the OMIM disease.  
<sup>d</sup>Exceptions to each case have been seen.

No es deseable manejarse en la incertidumbre de un resultado que no es del todo claro. No es bueno para la familia, que vuelve a enfrentarse a algo "si, pero no", difícil de comprender. Y no es bueno para los clínicos que, limitados por el conocimiento, no pueden ofrecer un adecuado consejo genético.

Es por eso que en este trabajo hemos asignado, aunque sea de manera provisional, un significado, probablemente patológico o probablemente benigno, a todas las VOUS detectadas.

Siguiendo pues este planteamiento idealista, de cara a una utilidad clínica de la información, de las 12 VOUS que se detectaron, 3 nos parecieron probablemente patogénicas (ver resultados), y a las 9 restantes les otorgamos un valor de probablemente benignas.

Por tanto el **rendimiento diagnóstico de este estudio se puede considerar del 14,6%**.

Resulta por tanto una técnica que ha demostrado su eficacia frente al método de detección de anomalías genómicas que se utiliza en este mismo centro, el cariotipo y FISH.

Como se ha explicado en los resultados, el rendimiento diagnóstico del cariotipo es aproximadamente el 3%. Por lo tanto podemos afirmar que en nuestra muestra el aCGH tiene un rendimiento al menos cuatro veces mayor que el cariotipo.

## **6.2.1- VARIABLES QUE AFECTAN AL RENDIMIENTO**

### 6.2.1.1- INCLUSIÓN DE LAS VOUS: Criterios de patogenicidad.

Entre las variables que pueden afectar al rendimiento diagnóstico una de las más relevantes consideramos que sería la inclusión o no de VOUS. El tratar de otorgarles o no un significado clínico es el RETO del futuro, no sólo en el campo del CGH array si no también en cualquier tecnología genómica. Cada vez se van a encontrar más variantes no directamente implicadas en patogenicidad para las que hay que aclarar su función estructural o reguladora y sus relaciones con la multitud de otras variantes o factores epigenéticos.

Las bases de datos de trastornos genómicos son la primera herramienta a utilizar para esta importante tarea. En nuestro estudio se incluyeron los datos en la base de datos DECIPHER.

Se ha postulado como criterio de discriminación, para asignar un valor de probablemente benigna a una VOUS, que la comparta con un progenitor sano. La presencia de padres sanos portadores de la misma CNV que su hijo afectado plantea si la CNV es benigna o patogénica con penetrancia incompleta. Pero ya hay experiencia acumulada, en casos de CNVs bien conocidas como causales, de encontrar en sus padres sanos la misma alteración genómica, por lo que no se puede considerar un dato inequívoco de benignidad.

Otro de los criterios utilizados es que la CNV sea pobre en genes para considerarla probablemente benigna, y así lo hemos hecho en esta serie. Otra vez debemos utilizar este dato con cautela. Se han empezado a describir situaciones en las que grandes regiones ultraconservadas, desiertas en genes, y que están flanqueando a un gen, pueden actuar regulando la expresión de dicho gen.

En este reto de tratar de conocer la naturaleza y las posibles consecuencias clínicas de las VOUS, algunos autores como Martínez et al, 2010 han propuesto que se tengan en cuenta las UCEs (abreviatura del inglés *Ultraconservative elements*) como ayuda para resolver si una CNV puede ser benigna o patogénica: existen en el genoma 481 elementos ultraconservativos (UCEs), definidos como porciones de DNA humano de al menos 200 pares de bases que coinciden idénticamente con las correspondientes regiones del genoma del ratón y la rata. Están ampliamente distribuidos por todo el genoma excepto en el cromosoma 21 y el Y. Los autores analizan las 481 UCEs descritas, entre los reordenamientos genómicos encontrados en sus pacientes, encontrando un enriquecimiento de UCEs en las CNVs patogénicas, y ninguna UCE en las benignas.

Otro posible criterio de patogenicidad podría ser si los genes implicados son haploinsuficientes. Dang et al 2008, identificaron 299 genes haploinsuficientes (genes para los que la delección de una copia funcional, en un organismo diploide, cambia el fenotipo del organismo por un estado de

enfermedad), observando que algunos pueden influir en la susceptibilidad de la persona a la enfermedad o la respuesta a tratamiento: el 21% de los genes haploinsuficientes en el hombre están asociados al cáncer, 15% al retraso mental, 6% con trastornos neurológicos, 4% al retraso del crecimiento y 4% con trastornos del desarrollo. El 50% restante está asociado a inmunodeficiencia, trastornos metabólicos, renales, malformaciones de miembros e infertilidad. En cuanto a su localización, el 59% estaba entre pares de SD del mismo cromosoma, y un 4% dentro de SD. Encuentran además que sólo el 11% de los genes haploinsuficientes se localizan entre SD que estén a una distancia menor de 1Mb, comparado con el 20% para el resto de los genes. Quizá sea un mecanismo de protección contra las NAHR, ya que en esa localización tienen desventaja selectiva.

Estos datos ponen de manifiesto la enorme importancia de conocer las funciones de los genes y de establecer una relación causal basada en un sentido biológico.

#### 6.2.1.2- RESOLUCIÓN DEL ARRAY. Plataformas

Otras variables que también afectan al rendimiento diagnóstico son la resolución del array y su cobertura genómica, y la selección de pacientes. En los primeros estudios los arrays, de BACs, tenían menos densidad de sondas y la resolución era menor (normalmente 1Mb). Con el tiempo se ha ido aumentando la resolución de las plataformas tratando siempre de mantener un equilibrio entre la capacidad de detección de patología con significado clínico y con significado desconocido. Pero lo cierto es que en las revisiones y estudios publicados no se ha encontrado ninguna plataforma que claramente sea superior a las otras desde el punto de vista clínico.

A este respecto, en nuestra muestra hemos utilizado 4 plataformas diferentes, todas diseñadas para ser una combinación de genoma completo y dirigidas (con más densidad de sondas en regiones ricas en genes), con unos rendimientos parecidos en cuanto a detección de CNVs causales, sin poder hacer un análisis estadístico por el pequeño tamaño de los subgrupos. Sin embargo sí se ha observado una diferencia en la detección, cuando se

mantendrían separados los grupos de CNVs benignas, VOUS y causales. En estas circunstancias la plataforma 44K resultó ser la que menos CNVs benignas detectaba, menos VOUS y más CNV causales. Fan YS et al 2007 analizaron 100 pacientes consecutivos con retraso mental con dos tipos de arrays, uno de 44K y otro de 244K, y finalmente proponen que un array de 44K es suficiente para no encontrar excesivas CNVs de significado incierto. Esta precisamente es la plataforma con la que Ahn et al 2010 obtienen mejores resultados al compararla con una de BACs, en su estudio de recomendación de esta tecnología para el Reino Unido. Pero quizá recomendar una plataforma sea encorsetarse, pues están evolucionando mucho (Boone 2010), incluso aparecen combinaciones de array de CGH y SNPs que resultan en un valor añadido a la plataforma para detectar mejor los mosaicismos y las disomías uniparentales parciales (UDP). Las últimas tendencias apuntan a plataformas dirigidas a patologías específicas para conseguir mejores rendimientos.

#### 6.2.1.3- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES. Variables clínicas.

La otra variable que puede influir en las cifras de rendimiento diagnóstico del array de CGH son las características de los pacientes. Es verdad que se han calculado los rendimientos en todo tipo de pacientes: discapacidad intelectual, retraso del desarrollo, epilepsia, autismo, déficit de atención, defectos congénitos, rasgos dismórficos, dislexia, esquizofrenia... Como dicen Xiang et al 2010, en las primeras publicaciones se incluían pacientes reclutados desde salud mental, gabinetes de orientación pedagógica, centros de discapacidad...y probablemente no se puedan comparar bien cifras de rendimiento.

Lo que es una realidad es que el array ya no se aplica siempre con un fenotipo de sospecha (genotipo primero), y que en todos los grupos el rendimiento del array de CGH ha sido mayor que el de cualquier otra técnica empleada con anterioridad. Por lo tanto parece recomendable su utilización en cualquiera de estos grupos, dada su eficacia.

En nuestra muestra la selección de pacientes ha sido bastante homogénea. Todos provienen del servicio de Neuropediatría del hospital, con pocos médicos, bien comunicados, que utilizan los mismos protocolos y que a

su vez están bien coordinados con la Unidad de Genética. Esto hace que sea poco probable una inconsistencia de resultados.

No obstante en esta muestra hemos tratado de comparar la efectividad en los subgrupos clínicos, y obtuvimos un patrón clínico que se asociaba a un mayor rendimiento: el retraso mental con fenotipo peculiar. En este término "fenotipo peculiar" se incluían fundamentalmente los rasgos dismórficos. El mayor nº de CNVs causales se detectó en este grupo (44%). Sorprende en nuestra muestra el bajo rendimiento en el grupo de TEA aunque la posible explicación podría ser la de Bremer et al 2011 que en 223 pacientes autistas encuentran un 8% de CNV patogénicas y un 9% más de significación clínica, concluyendo que las patogénicas son mas frecuentes en el grupo de autismo sindrómico.

En cualquier caso, nos parece de mayor utilidad, y creemos que será la tendencia, no ser muy astringentes en la selección de pacientes, como ya apuntaron Xiang y col 2010.

### **6.2.2- VALIDEZ ANALÍTICA**

La reducción de falsos positivos y negativos garantiza el mejor servicio al paciente y el mejor uso de los recursos económicos, que son factores clave en el entorno clínico. De ahí que la elección de la técnica sea importante.

En la técnica de CGH array se compara un ADN genómico de un paciente con el de un individuo normal, utilizando un microarray de doble canal que contiene fragmentos de ADN del genoma (en nuestro caso oligonucleótidos). Se extraen los DNA del paciente y de referencia, se marcan con dos fluorocromos diferentes se hibridan en el microarray y se escanean en un láser de dos canales. Las aneuploidias se detectan como sondas con una desviación de intensidades del paciente frente a la señal de referencia que es aproximadamente  $\log_2$  de  $1/2$  para las deleciones y de  $3/3$  para la duplicación. Normalmente el experimento se repite con los marcajes intercambiados. Como ADN de referencia también puede usarse en vez de el de un solo paciente control, un pool de ADN de varios individuos, pero para las CNV frecuentes la intensidad disminuye y puede producir problemas de interpretación. Por eso se

ha utilizado en todas nuestras plataformas el ADN de un solo individuo control. Un diseño alternativo, y que han utilizado otros autores, podría ser el diseño en *loop* en el que se hacen tres hibridaciones con tres pacientes, comparando uno con otro (Menten et al 2006). Aunque este diseño ahorra hibridaciones es más complejo a la hora de preparación de los arrays.

Para el análisis estadístico se utilizó el modelo de log ratio que parecía el más adecuado. De hecho, Allemeersch et al en 2009 compararon el modelo lineal de log ratio y el modelo mixto de intensidades de señal absoluta, concluyendo que era más ventajoso el log ratio.

#### Validación de resultados:

Armengol et al en su trabajo de identificación de CNVs en diferentes grupos humanos comentan que en algunos casos no pudieron validar sus hallazgos con MLPA, especialmente aquellos producidos por una única sonda. Y explican que puede ser por varias razones: Primero, que algunas de las observaciones de aCGH sean realmente falsos positivos debido al gran número de regiones analizadas con los arrays (a mayor nº de test, mayor nº de errores tipo I). Segundo, en el caso de las CNV detectadas con una sola sonda no fue siempre posible diseñar la sonda MLPA exactamente en el mismo sitio sino que se diseñaron un Kb alrededor de la sonda. Y tercero también es posible que la variación informada tuviera un nº de copias demasiado grande, conociendo que MLPA sólo detecta variaciones de 0 a 5 copias., y su sensibilidad decrece cuando el nº de copias es mayor. A pesar de esas pegadas, los autores opinan que MLPA es un método eficiente, fácil, y barato para validar CNV en grandes grupos de muestras.

Otros autores han validado los resultados de los arrays con FISH. Rudd et al en 2009, analizaron 2.419 pacientes con retraso del desarrollo, autismo y defectos congénitos y estudiaron las CNVs clínicamente relevantes (19%), con un array de 44k, y su asociación con duplicaciones segmentarias: un 23% de las CNVs detectadas estaban flanqueadas por DS. Todas las CNVs eran deleciones o duplicaciones en heterocigosis y se validaron con FISH, haciéndoselo después a los padres para confirmar la herencia.

Hills et al 2010 recomiendan MLPA como método de confirmación de las CNVs patogénicas detectadas por array, aunque sugieren el FISH para confirmar la posición y descartar reordenamientos equilibrados en los padres. De hecho Kang et al en 2010 detectaron por FISH una translocación insercional. La necesidad de confirmar la existencia de CNVs grandes (aquellas que implican muchas sondas consecutivas) con otros métodos ya no está justificado según ISCA y tampoco para detectar posibles eventos insercionales pues solo ocurren en 1/80.000 recién nacidos (Grati et al 2009). Aunque parece interesante confirmarlo en los padres, fundamentalmente en las CNVs subteloméricas, ya que las duplicaciones segmentarias en estas zonas pueden producir translocaciones recíprocas por mecanismo NAHR, crípticas, y que sean la causa del desequilibrio en la descendencia.

Teniendo en consideración todos estos comentarios acerca de la validación no nos pareció necesario validar resultados. Estimamos que es una técnica con suficiente experiencia acumulada, que ha demostrado ser robusta y que en CNVs grandes, donde son varias sondas las que reflejan el cambio genómico, no es necesario validar con otro método los resultados. Y menos aún en aquellos casos que resultaron ser heredados: la presencia de la misma CNV en un progenitor es en sí mismo un modo de validación del hallazgo del paciente.

Sin embargo sí consideramos relevante en las CNVs de novo, la posibilidad de descartar un posible un evento insercional. A pesar de la baja cifra que han dado algunos autores, creemos que no hay suficientes resultados de FISH en metafases de progenitores. Y la trascendencia es enorme pues cambia de forma radical el riesgo de la pareja para futura descendencia.

Con este propósito se diseñaron sondas FISH adecuadas para los casos de CNVs patológicas de novo (7+ 5), para confirmar primero que en el paciente se puede detectar, y a continuación confirmar su correcta posición en los padres. En uno de los casos, en el que la delección era terminal, se pudo demostrar que derivaba de una translocación equilibrada materna, dando un giro al consejo genético que se dio a la familia.

### **6.3- CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y GENÓMICAS DE LAS CNVs**

Entre los objetivos de este estudio nos propusimos analizar las características de las CNVs para tratar de identificar un perfil mas frecuentemente asociado a patología.

#### **6.3.1- TAMAÑO DE LAS CNVs**

El tamaño de CNV detectado en nuestra cohorte es pequeño, siendo las CNVs benignas menores de 300Kb, a excepción del grupo localizado en 15q11 que son de entre 1,3-1,9Mb. El grupo de CNVs patológicas a excepción de una mayor de 10Mb, el resto están entre 300Kb y 5Mb. En la revisión de Xiang de 2010 un 28% de las CNV eran mayores de 10Mb, dato que resulta sorprendente pues eran pacientes con cariotipo previo. Ellos estiman que 300Kb es un buen equilibrio de resolución y estamos de acuerdo aunque hay excepciones pues ya se ha demostrado en arrays dirigidos a genes de interés, que deleciones del orden de pares de bases pueden producir patología (Boone et al 2010).

Las deleciones o duplicaciones recurrentes que ocurren vía NAHR, flanqueadas por DS generalmente tienen un tamaño fijo. En contraste los reordenamientos no recurrentes varían de tamaño desde megabases hasta duplicaciones o triplicaciones de simples genes o incluso de exones. Estas CNV ocurren por NHEJ o por Fostes. Las alteraciones genómicas causales que hemos detectado flanqueadas por DS efectivamente tienen tamaños fijos similares a los descritos en la literatura. Donde sí se refleja este fenómeno es en las duplicaciones/deleciones benignas que hemos encontrado en 15q11. Efectivamente están asociadas a DS y tienen un tamaño fijo.

#### **6.3.2- HERENCIA**

Ya se ha comentado con anterioridad, pero entre los criterios de asignación de valor patológico a las CNVs hay autores (Miller et al 2010) que opinan que si es heredada de un progenitor sano habría que darle un valor benigno.

Hay que destacar que, entre las CNVs causales, sólo en 8 casos conocíamos su herencia. Cuatro fueron *de novo* y cuatro heredadas. De los 4 casos heredados 2 tenían origen materno y 1 paterno, y 1 hubo un caso con dos CNVs, una materna y otra paterna. Éste es el único de los cuatro casos cuyos progenitores también estaban afectados, aunque en menor medida. Por tanto nuestra experiencia nos hace concluir que heredarla de progenitor sano no la hace benigna. Hay algunos autores que opinan que la delección puede ser considerada patogénica aunque se haya heredado de padre sano, pero que esto no sería aplicable a las duplicaciones (Hannes et al 2009).

En los casos de VOUS, sólo en un caso desconocíamos la herencia por negativa del padre a colaborar. Y de los 6 casos heredados sólo en uno el padre tenía fenotipo similar, siendo los otros 5 heredados de progenitor sano. Y en uno de ellos, por su contenido en genes y por otras características se le dio un valor probablemente patológico.

### **6.3.3- TIPO DE ALTERACIÓN (ganancia/pérdida)**

Aunque mediante NAHR se producen más deleciones que duplicaciones, nuestro grupo de CNV patológicas asociadas a DS (y por tanto formadas mediante NAHR) tienen el mismo número de duplicaciones que de deleciones. Pero considerando todas las CNVs causales sí vemos que el 91% eran deleciones. Hannes et al 2009 en su trabajo ponían en duda el significado clínico de las duplicaciones.

### **6.3.4- LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA**

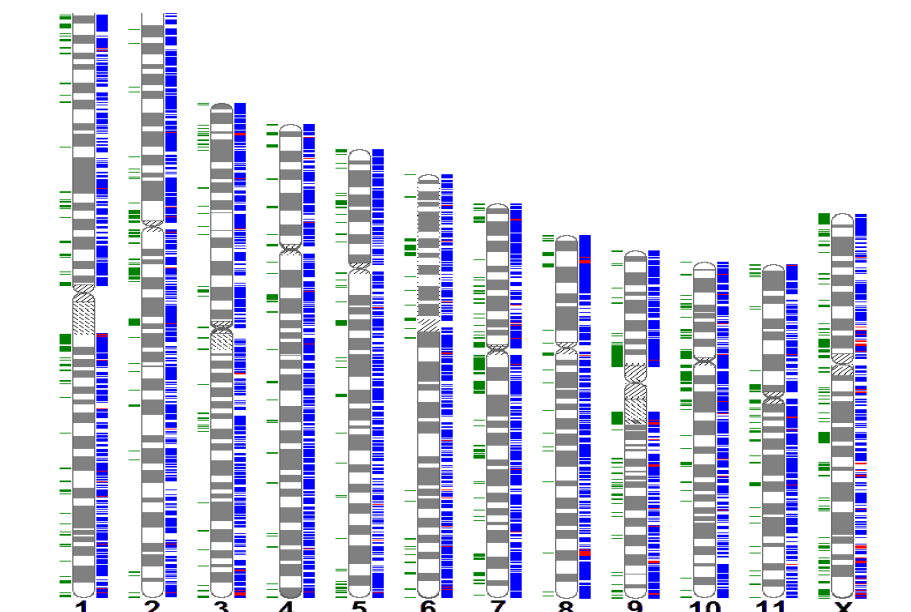
En 4 de los 96 casos se detectaron CNV en localización subtelomérica (4,2%) y 19 casos tenían anomalías intersticiales (23,2%). Ya en 2006 Rosenberg et al encontraron que 7,4% de sus pacientes presentan anomalías subteloméricas mientras que encuentran anomalías intersticiales en el 17%, datos similares a otros previamente descritos. Esto nos hace acordarnos de las primeras técnicas que buscaban anomalías genómicas en las regiones subteloméricas (MLPA y MultiFISH): su rendimiento diagnóstico no podía ser mayor puesto que no hay mayor número de CNVs en los telómeros.

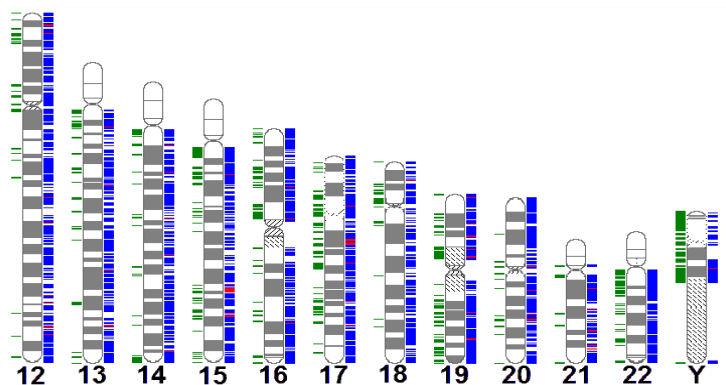
### 6.3.5- CONTENIDO EN DUPLICACIONES SEGMENTARIAS

Revisando la literatura parece que no todas las CNVs están asociadas a DS, solo el 28%. Rudd et al en 2009 encontraron un 23% flanqueadas por duplicaciones segmentarias. Es posible que algunas, no asociadas a SD, se formen por mecanismos mutacionales basados en no-homología. Estas CNVs parece que son de menor tamaño que las asociadas a DS. Kim et al en 2008 encontraron que las CNVs no muestran una asociación significativa con elementos Alu, por lo que no parece que sea el mecanismo de formación de las actuales CNVs, aunque sí tuvieron su importante papel en el pasado en la formación de DS. Miller et al en 2010 hicieron un esquema con la localización de las DS (Fig.48).

En nuestra serie el 31,4% de las CNV se localizaban en regiones ricas en DS, y posiblemente el mecanismo NAHR haya producido dichas CNVs. El 69,6% restante no tenía duplicaciones segmentarias próximas por lo que su mecanismo de producción podría ser a través de mecanismos mutacionales basados en no-homología. No hemos detectado diferencia de tamaño entre ellas.

Figura 48.- Localización de DUPLICACIONES SEGMENTARIAS según Miller et al 2010:





### 6.3.6- NÚMERO DE CNVs

Fan YS et al 2007 en su estudio comparativo de plataformas en 100 pacientes consecutivos con retraso mental encontraron 20 CNVs por individuo con el array de más resolución, y 0,72 CNV por individuo en el de 44k, con una tasa de detección del 15%. En nuestra serie de pacientes se detectaron CNVs en el 54% de los pacientes.

Aunque el 80% de las CNVs patogénicas son microdeleciones o microduplicaciones de un único segmento de ADN, en el 20% restante se encuentran alteraciones en dos o incluso en más segmentos cromosómicos (Xiang et al 2010). En nuestra muestra encontramos dos o más alteraciones en el 45% de los casos patogénicos.

### 6.4- UTILIDAD CLÍNICA y CONSEJO GENÉTICO

En primer lugar queremos insistir en lo inútiles que resultan los falsos positivos (las VOUS) que se detectan con esta tecnología: desde el punto de vista epidemiológico y de investigación tienen su interés, pero no desde el punto de vista clínico pues son una fuente de incertidumbre. Así, consideramos esencial tratar de asignar, como hemos hecho en el trabajo y a la vista del conocimiento, un valor probablemente patológico a las VOUS. Y en aquellas que

no se consiguió, optamos por no considerarlas, y tratarlas como benignas, pues no aportan nada más que ansiedad por la incertidumbre generada. Su omisión, además, no es perversa, siempre y cuando se respete el compromiso de reevaluación permanente. De esta manera damos utilidad a una técnica en la que no solo tenemos en cuenta la utilidad clínica, si no también la utilidad personal.

Se considera que la aplicación de esta tecnología, con su buen rendimiento, tratando de eliminar los falsos positivos, y dando la información adecuada, es UTIL. Hemos conseguido responder a una necesidad de los padres, cuidadores e individuos de entender porqué se ha producido la discapacidad; el alivio de la incertidumbre con respecto a la causa; el alivio de la culpa de que la familia y los factores sociales hayan sido la causa del retraso mental; el enfoque hacia el futuro; el potencial para la identificación y pertenencia a un grupo de apoyo; la ampliación a la familia entera del consejo genético apropiado; los riesgos para otros miembros de la familia de la condición recurrente en su descendencia; el posible tratamiento de condiciones específicas; la identificación y prevención de complicaciones.

Este concepto de **reevaluación continua** de los casos, aunque se ha utilizado siempre con el objetivo de seguir la evolución del paciente para realizar modificaciones en hábitos de vida, tratamientos, intervenciones o terapias, va a entrar de lleno en la genética clínica. Los rápidos avances en el conocimiento y la información genómica masiva que se está consiguiendo hacen necesario reasignar el alcance del perfil genómico en muchos pacientes. Y probablemente esto provoque una multiplicación de la demanda de servicios genéticos de revisión, desde las propias unidades de genética.

En los últimos cuatro años, desde la utilización de la tecnología de CGH array, se están describiendo alteraciones genómicas asociadas a clínica definida, constituyendo nuevos síndromes. Pero también están apareciendo otras anomalías recurrentes que aparecen en individuos con fenotipos similares pero que presentan una mucha mayor diversidad fenotípica (16p11 o 15q13). Como proponen Mefford y Eichler en 2009, se requiere una alta calidad en las

correlaciones genotipo-fenotipo donde deben estar implicados el paciente y su familia, el clínico y el investigador.

El haber reconocido el factor etiológico en 14 de los 96 casos estudiados nos ha permitido, en algunos de ellos, dar una información muy precisa a la familia sobre la alteración genómica pues se trata de un síndrome conocido.

Este es el caso de la delección 22q11 asociada al síndrome velocardiofacial o DiGeorge, la delección 22q13 asociada al síndrome de Phelan-McDermid o el síndrome de microdelección 15q13.3.

El síndrome de delección 22q11 aparece en la base de datos DECIPHER asociado en muchos pacientes a defectos cardíacos del tracto de salida, deficiencia inmune, hipocalcemia neonatal transitoria, insuficiencia velofaríngea y un fenotipo peculiar. La mayoría de los pacientes tienen problemas de aprendizaje y trastornos de la conducta incluida la esquizofrenia en adultos. Algunos tienen ausencia de timo y una severa hipocalcemia neonatal (secuencia DiGeorge). La mayoría de los defectos son resultado de un desarrollo anormal del aparato faríngeo. El gen responsable del fenotipo parece ser TBX1 que es un factor de transcripción. Otro gen, el CRKL se postula como modificador del fenotipo.

Las microdelecciones de 22q11.2 generalmente comprenden 3Mb de ADN genómico detectable con FISH. Hay varias duplicaciones segmentarias en el cromosoma 22 (LCR22) y las que flanquean esta región podrían facilitar la delección. Algunos pacientes tienen otra delección, de 1,5Mb. El 94% de las delecciones son *de novo*, siendo un 6% heredadas.

El síndrome de microdelección 22q13 ó síndrome de Phelan McDermid. Todos los pacientes tienen severo retraso del lenguaje expresivo, trastornos de comportamiento como hiperactividad , e hipotonía que suele ser adquirida, no neonatal. Los rasgos faciales son sutiles y variables, y se ha descrito sobrecrecimiento. SHANK3 , también llamado ProSAP2, incluido en esta región regula la organización estructural de las espinas dendríticas y tiene un patrón

de unión con las neuroliginas (los genes que codifican para las neuroliginas están mutados en autismo y en Arperger) y función de las espinas dendríticas. Mutaciones en SHANK3 parece que pueden producir trastornos del lenguaje o de la comunicación social.

El tamaño de la deleción se ha descrito entre 160Kb y 9MB sin que exista diferencia fenotípica clara según el tamaño, aunque parece que la mayor responsabilidad fenotípica reside en los últimos 100Kb de 22q.

El síndrome de microdeleción 15q13.3 se caracteriza por un retraso de desarrollo con trastornos de aprendizaje leve o moderado, crisis y una dismorfia facial sutil, que hacen de él un síndrome poco reconocible fenotípicamente. Las crisis varían desde crisis de ausencia hasta epilepsia mioclónica, e incluso resistente al tratamiento. La deleción contiene CHRNA7, una proteína de canal iónico implicada en la transmisión de la señal neuronal. Esta región del 15 es rica en duplicaciones segmentarias, de forma que la típica deleción entre los duplicones BP4 y BP5 es la que provoca la típica deleción de 1,5Mb. Estos duplicones se encuentran en orientación invertida en muchos individuos de la población general, facilitando la recombinación no-homóloga. Este síndrome se ha estimado que ocurre en 1 de 40.000 individuos.

A parte de estos tres síndromes conocidos, tanto ECARUCA como DECIPHER acumulan ya evidencias para unos cuantos casos más.

Todos los casos patológicos y CNVs de significado incierto se han introducido en la base de datos de DECIPHER.

En el siguiente esquema (Fig.49) de Ecaruca se ve el número de patologías descritas asociadas a deleciones y duplicaciones:

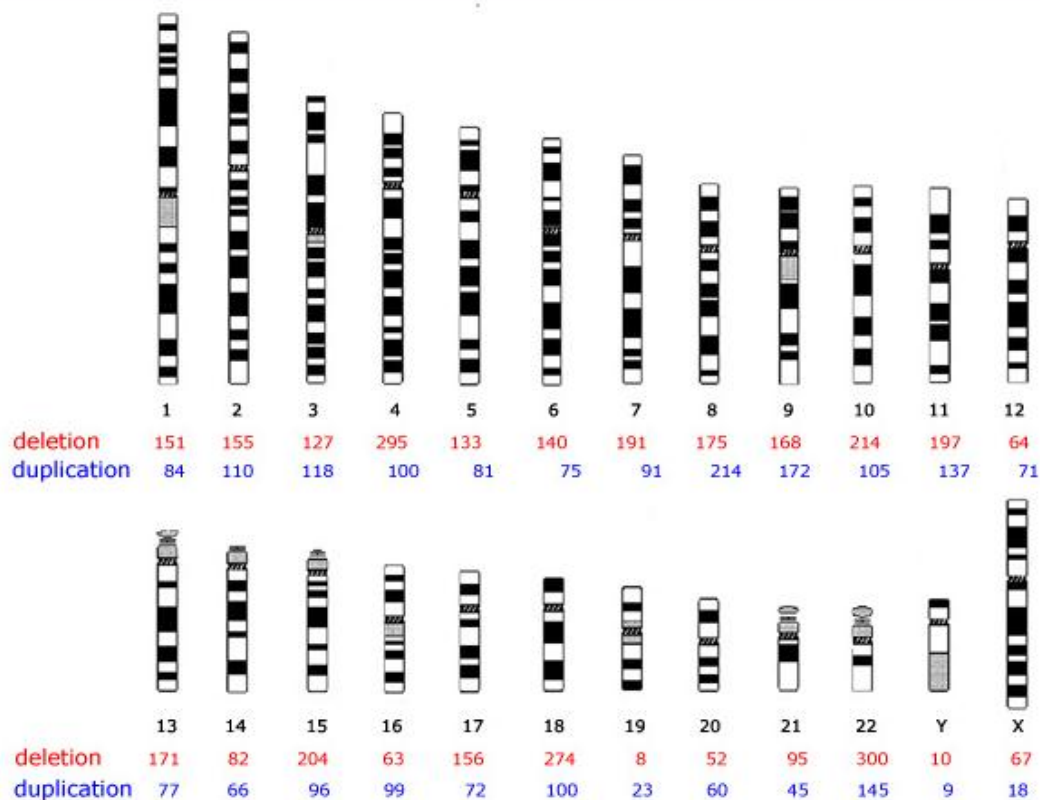


Figura 49.- Número de casos descritos con deleción/ duplicación en los 24 cromosomas.

Se necesitan analizar grandes cohortes de pacientes para valorar la patogenicidad de las CNV más raras, especialmente las no flanqueadas por duplicaciones segmentarias.

En estos casos en los que la CNV de nuestros pacientes estaba asociada a un síndrome definido, hemos podido ser útiles. Además haciendo array a los padres, o un FISH, hemos podido dar un consejo genético adecuado. Aquellos casos que han resultado ser heredados de progenitor nos han permitido dar un 50% de riesgo de repetición para siguientes embarazos, y hacer además estudios a otros familiares de riesgo.

Sin embargo, al enfrentarnos a situaciones de expresividad variable y/o penetrancia incompleta nos hemos encontrado igual que otros muchos autores. Esto vuelve a complicar el consejo genético. La primera recomendación sería

una evaluación clínica del progenitor con la CNV patológica para descartar algún rasgo.

En nuestra serie nos hemos encontrado 4 pacientes con CNVs patológicas y heredadas. Efectivamente en dos de ellos se ha encontrado una expresión del síndrome en menor grado: en un niño con delección 22q11, síndrome DiGeorge, se encontraron en su padre, aparentemente sano con la misma delección, unas dificultades de aprendizaje. En otra niña se detectó delección 15q13 heredada de su madre, quien tuvo problemas de aprendizaje y tiene epilepsia. Este caso resulta doblemente interesante porque la paciente tiene una segunda alteración genómica, una delección 16p heredada de su padre, quien tras su reevaluación se confirmó que tenía discapacidad intelectual. Casos como el presente, de tener dos anomalías genómicas ya se han descrito en la llamada teoría del "doble hit" que ofrece una explicación a la mayor expresión fenotípica en la niña respecto a sus padres. Y otro caso es el de un niño con dup 15q13 cuyo padre también con la misma duplicación había tenido dificultades de aprendizaje e hiperactividad.

En otros tres casos encontramos CNVs patogénicas, también presentes en un progenitor sano. Detectamos una duplicación 4p compartida con su madre sana; una duplicación 15q11.2 también en madre sana, y una delección 15q13 presente en su madre sana pero también presente en un hermano con discapacidad intelectual. En estos casos la anomalía genómica es la productora de la enfermedad pero su expresividad clínica viene determinada por otros modificadores, genéticos epigenéticos y ambientales.

En algunos de nuestros casos heredados, hay otra CNV que podría explicar la expresividad variable: la distinta expresión fenotípica en la misma familia puede estar modulada por CNVs benignas en uno u otro de los familiares. Las CNVs pueden incluso inducir una expresión alterada de genes localizados en la frontera de la CNV e incluso su efecto puede estar tan lejos como a 2-7Mb del punto de rotura (Merla et al 2006). Otra explicación es que la presencia de la CNV heredada, especialmente delecciones, esté descubriendo un alelo recesivo heredado del otro progenitor. Incluso el imprinting es un

mecanismo que potencialmente podría explicar la presencia de estos reordenamientos en familiares sanos.

Pagnamenta et al 2011 a este respecto proponen que las variaciones en la copia no delecionada pueden potencialmente explicar los fenotipos no concordantes.

Cuando la anomalía no se ha detectado en los padres, es decir ha sido *de novo* y se ha descartado con FISH una translocación, el riesgo de repetición se puede considerar mínimo, salvo un mosaicismo bajo no detectado. Sin embargo la anomalía puede ser un derivado de una translocación equilibrada en un progenitor, volviendo a suponer un riesgo alto de repetición.

En un reciente trabajo Molina et al 2010 no encontraron diferencias en la frecuencia de deleciones /duplicaciones en edad paterna avanzada, por lo que no debemos esperar un mayor riesgo de repetición en progenitores mayores.

Mención especial tienen los casos de CNVs asociados a duplicaciones segmentarias. En general se consideran trastornos recurrentes por su predisposición, tomando como sustrato las duplicaciones segmentarias, a recombinación homóloga no alélica y por tanto producción de desequilibrios genómicos. Es interesante conocer si el haber tenido un hijo con un reordenamiento recurrente, *de novo*, aumenta o no el riesgo para siguientes embarazos. Molina et al en 2010 profundizan en el consejo genético de las alteraciones genómicas haciendo un estudio novedoso de alteraciones genómicas en espermatozoides de padres de síndrome de Prader Willi por deleción, región rica en duplicaciones segmentarias: encuentran mayor frecuencia de deleciones y duplicaciones en la región 15q11 que en los controles. Por tanto en estos padres el riesgo a priori del 0,5% de repetición (Gardener y Sutherland 2004) parece que es mayor.

Molina et al 2010 justifican la realización de su trabajo al considerar que hay pocos datos epidemiológicos que nos ayuden a estimar los riesgos de recurrencia porque la mayoría de las alteraciones genómicas son poco

frecuentes o incluso únicas; porque no se han publicado todos los casos de recurrencia o porque las familias con un hijo afectado deciden no tener otro.

Explican la mayor frecuencia de reordenamientos, producidos por NAHR intercromátida, por tratarse de una zona especialmente propensa a roturas (DSB). Estas roturas se producen de manera programada para facilitar el remodelamiento de la cromatina que tiene lugar durante la elongación de las espermátidas. Deberían repararse por HRR, pero por alguna razón en los padres de Prader Willi (quizá haplotipos específicos que predisponen a esa región a NAHR) lo hacen por NAHR. Y en caso de que lo hicieran por HRR, que suele producirse en las primeras etapas embrionarias y producirían Disomías Uniparentales (UDP) parciales, dando igualmente Prader-Willi.

Queda clara la utilidad clínica y personal que tenemos con esta técnica, al poder dar un consejo genético apropiado a mayor número de pacientes.

El que un hospital medio como el nuestro pueda utilizar esta herramienta como primera prueba diagnóstica resulta muy práctico. Hospitales con este perfil, sin demasiada especialización, van a encontrar en los arrays un método diagnóstico adecuado a muchos pacientes.

En caso de que el resultado del array fuera negativo, sería entonces cuando entrara en acción el clínico con el papel de "fenotipo primero" y dirigir estudios posteriores, basados en una sospecha clínica.

Dos ejemplos de esto son dos pacientes de esta muestra cuyos resultados de array fueron normales, y en los que la evolución del propio paciente y la evaluación clínica más minuciosa consiguieron unos resultados diagnósticos:

### **Caso- 2658**

Niña de 6 años con una encefalopatía progresiva, que las pruebas de imagen posteriores y su pérdida de funciones cognitivas permiten diagnosticarla de leucodistrofia de sustancia blanca evanescente, enfermedad autosómica recesiva. Se secuencian uno de los genes responsables: EIFB5 donde se

encuentran dos mutaciones responsables. La niña fallece poco después del diagnóstico.

### **Caso- 2806**

Niña de 3 años con retraso psicomotor y con rasgos de espectro autista. Tras el cariotipo y el array normal (se detectó una variante BENIGNA consistente en una deleción 6p25.3 de 91,6Kb y sin contener genes OMIM), se sospechó un síndrome de Rett (ligado al X) que se confirmó con el estudio molecular del gen MECP2.

El planteamiento que se está evaluando, de utilizar el aCGH como prueba de filtro, aunque pudiera parecer despilfarrador, es el que hemos utilizado durante años para el cariotipo, aún sabiendo su limitado rendimiento diagnóstico: inicialmente se realizaba cariotipo a pacientes polimalformados o con unas indicaciones muy precisas, y con el tiempo las indicaciones se han ido relajando, hasta el punto que en esta Unidad de Genética se han realizado en los últimos cuatro años (para una población asignada de 300.000 habitantes aproximadamente, y con unos 3.500 partos al año), 1.965 cariotipos postnatales, de los cuales 560 fueron con indicación de retraso mental, rasgos dismórficos, TEA.

Parece que los fenotipos más sugerentes, polimalformados, síndromes clásicos... ya sabemos cómo diagnosticarlos, sabemos dirigir sus estudios, pero son minoritarios. Nos enfrentamos ahora a una parte mas ancha del iceberg que está saliendo a flote, que es mucho mas frecuente y que resulta clínicamente difícil de reconocer. Es para este gran grupo de pacientes para quien los arrays van a resultar útiles, pero otra vez, como el cariotipo, con rendimiento limitado. La experiencia de estos años con arrays nos permite pensar que su rendimiento ya no va a dar mucho más de sí. El resto de pacientes ahora sin diagnóstico tendrá que esperar a que la secuenciación masiva u otras técnicas genómicas y la bioinformática den un nuevo salto en el diagnóstico de enfermedades complejas multifactoriales.

A pesar de todo, bienvenidos sean los arrays pues nos han permitido dar un paso de gigante en el conocimiento etiológico de la discapacidad intelectual.

Similar a lo que Jacobs et al describían en 1992 cuando afirmaban que el 44,4% de las anomalías cromosómicas estructurales desequilibradas y el 43% de las equilibradas no se hubieran podido detectar utilizando cariotipado sin bandeado cromosómico.

Otra de las grandes ventajas del aCGH, que le va a dar una utilidad añadida a la prueba, es la rapidez con que vamos a dar una respuesta a la familia. No sólo en el sentido de tiempo de respuesta analítico, desde que se pide el estudio hasta que se tiene el resultado, que indudablemente es un tiempo corto. Si no que el cambio en el algoritmo diagnóstico va a producir que a los pacientes en los inicios de sus signos clínicos les sea solicitado el aCGH, y muchos puedan beneficiarse de la prontitud diagnóstica. Es importante en este sentido, la formación de los clínicos en estas tecnologías, que los servicios clínicos conozcan su utilidad y que aparezca en las carteras de servicios de las unidades de genética. En Australia ya están dando sus pasos en formación, y han publicado una guía para pediatras (Palmer et al 2012).

La Convención de Naciones Unidas sobre los derechos de las personas con discapacidad, de 2006, en su artículo 24.2 sobre salud dice **(A/RES/61/106):**

*"24- Los Estados Partes reconocen que las personas con discapacidad tienen derecho a gozar del más alto nivel posible de salud sin discriminación por motivos de discapacidad. Los Estados Partes adoptarán las medidas pertinentes para asegurar el acceso de las personas con discapacidad a servicios de salud que tengan en cuenta las cuestiones de género, incluida la rehabilitación relacionada con la salud. En particular, los Estados Partes:*

*2.- Proporcionarán los servicios de salud que necesiten las personas con discapacidad específicamente como consecuencia de su discapacidad, incluidas la pronta detección e intervención, cuando proceda, y servicios destinados a prevenir y reducir al máximo la aparición de nuevas discapacidades, incluidos los niños y las niñas y las personas mayores".*

En nuestra población de estudio encontramos pacientes que no tenían diagnóstico etiológico hasta con 37 años, cuando habían comenzado sus signos clínicos en la primera infancia.

En nuestra serie la media de demora entre la aparición de sus primeros signos y su diagnóstico ha sido más de 8 años. Confiamos que en el momento que se universalice el uso de los arrays, los pacientes tengan un diagnóstico mucho más precozmente, y la curva de edad al diagnóstico representada en gráfico 11 se desplace y coincida con la curva de las edades de los primeros signos clínicos.

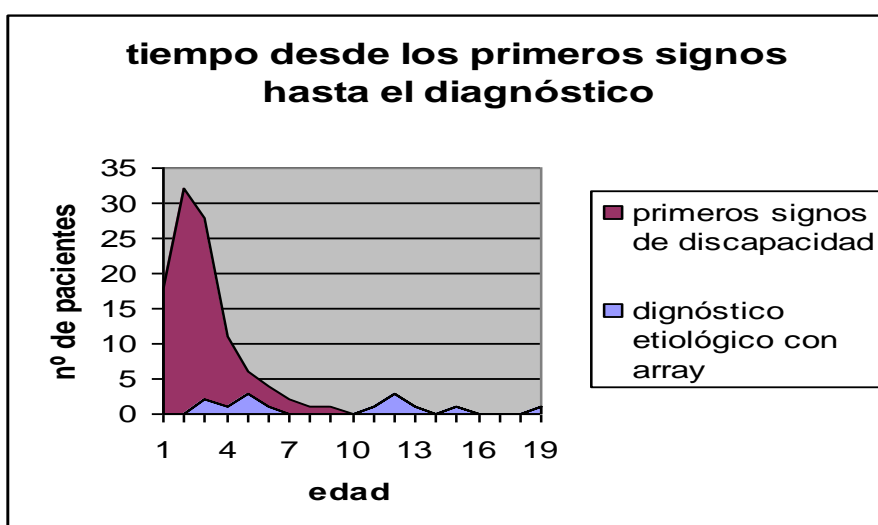


Gráfico 11.- Representación de las edades de aparición de los primeros signos y las edades al diagnóstico.

#### OTRAS UTILIDADES del aCGH:

Entre los casos normales, ó solo con variantes benignas se encontraban 2 casos cuyos cariotipos no eran rigurosamente normales antes del aCGH.

#### **Caso- 2345**

Se trata de una niña de 10 años que presenta retraso psicomotor, hija única de padres sanos, jóvenes y no consanguíneos. El estudio citogenético realizado cuando tenía dos años reveló un cariotipo complejo aparentemente equilibrado (Fig.50), de novo:

46,XX,t(3q;4q;12p;5q)(3pter->3q23::5q15->5qter, 4pter->4q25::3q23->3qter; 4qter->4q25::12p11.2->12qter; 5pter->5q15::12p11.2->12pter)dn.

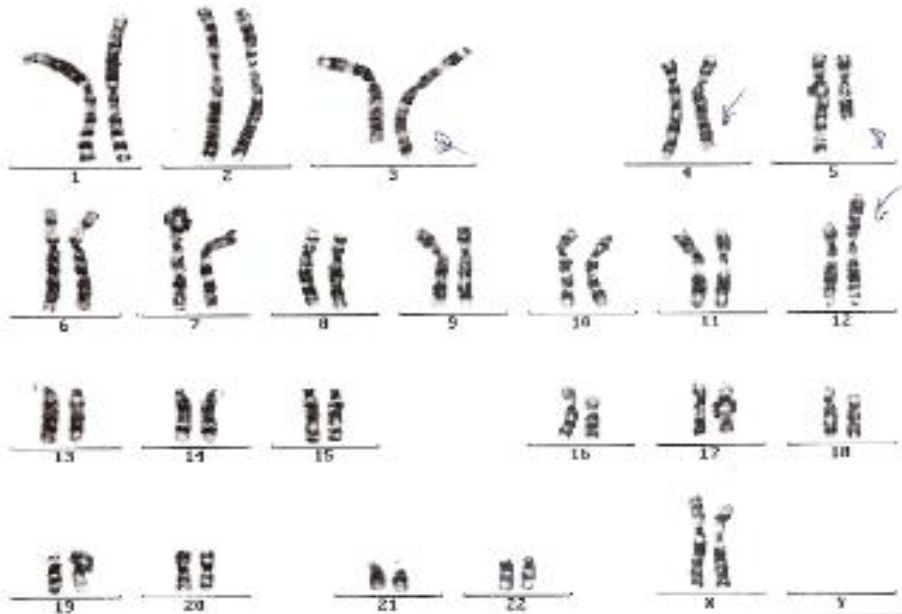


Figura 50.- Cariotipo complejo: t(3q;4q;12p;5q)

Aunque la translocación parecía equilibrada, el hecho de haber 4 puntos de rotura implicados nos hacía pensar que pudiera existir en éstos una pequeña pérdida de material genético o un efecto de posición que fuera el causante del retraso en la niña. Sin embargo las técnicas citogenéticas y de FISH no nos permitieron demostrarlo.

Se realizó por tanto un aCGH con la intención de descubrir algún desequilibrio ya que entre las ventajas del aCGH es que puede diagnosticar desbalances en lo que citogenéticamente se creían alteraciones equilibradas.

El 40% de las translocaciones aparentemente equilibradas en pacientes con fenotipo anormal, son realmente desequilibradas tras el aCGH.

Esto NO ha ocurrido con nuestro único caso de translocación compleja: el array NO detectó ningún cambio de número de copia con la plataforma 44K empleada. Por tanto en este caso sigue pareciendo que la alteración cromosómica no es la responsable del retraso del paciente, aunque faltaría por

confirmar (técnicas que no están a nuestro alcance) que en los genes implicados en los puntos de rotura no se ha producido una inactivación, ni ningún cambio por efecto de posición.

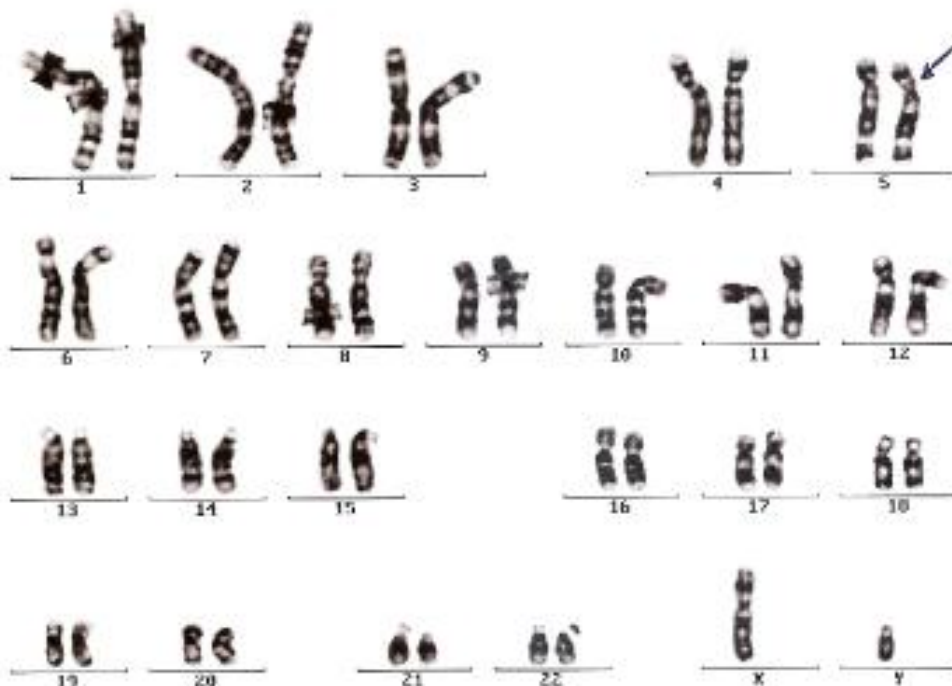
**Caso- 2347:**

Se trata de un niño de 11 años, procedente de Guinea Ecuatorial, con retraso mental severo, hijo de pareja sana y no consanguínea, aunque ella, de 44 años en el momento del nacimiento del niño, refiere paludismo durante el embarazo.

El cariotipo mostraba un cromosoma 5 aparentemente con material extra en el brazo corto (Fig.51), sin poder precisar el origen con las técnicas de bandas y FISH utilizadas. Igual que en el caso anterior, aunque parecía tratarse de una inversión equilibrada, el retraso mental de niño nos hacía sospechar que realmente hubiera un desequilibrio cromosómico.

El estudio con arrays nos confirmó que NO había variaciones en el número de copia con la resolución de la plataforma de 44K utilizada. Por lo tanto se descartó que hubiera anomalía cromosómica que fuera responsable del fenotipo del paciente.

Figura 51.- Cariotipo mostrando la anomalía en 5p.



Cuestiones importantes que ya se han abordado con anterioridad son los posibles falsos negativos. Podríamos considerar las **inversiones y las translocaciones equilibradas, los mosaicismos bajos y la ubicación de las CNVs en el cromosoma**, unos falsos negativos pues no se pueden detectar con arrays. Realmente no es así puesto que esta tecnología está diseñada únicamente para detectar cambios en el número de copias.

A este respecto Ahn et al 2010 revisan 36.663 muestras recibidas en su laboratorio en 10 años y sólo detectan 4 reordenamientos balanceados de novo (0,0001%). Esta cifra contrasta con la aportada por el ISCA de 0,05% o 1/2000. La cuestión es si resulta tan importante detectar reordenamientos equilibrados en la población que nos ocupa de discapacidad intelectual. En caso de que verdaderamente interesara no habría más remedio que hacer cariotipo a continuación. No creemos que sea necesario. Sólo en aquellos casos de CNV causal de novo, habría que hacer cariotipo y FISH al paciente y a los padres para localizar la CNV y descartar translocaciones. Por supuesto sí sería necesario en otros grupos de pacientes como los hematológicos, donde hay efectos de posición, y en parejas con problemas de fertilidad.

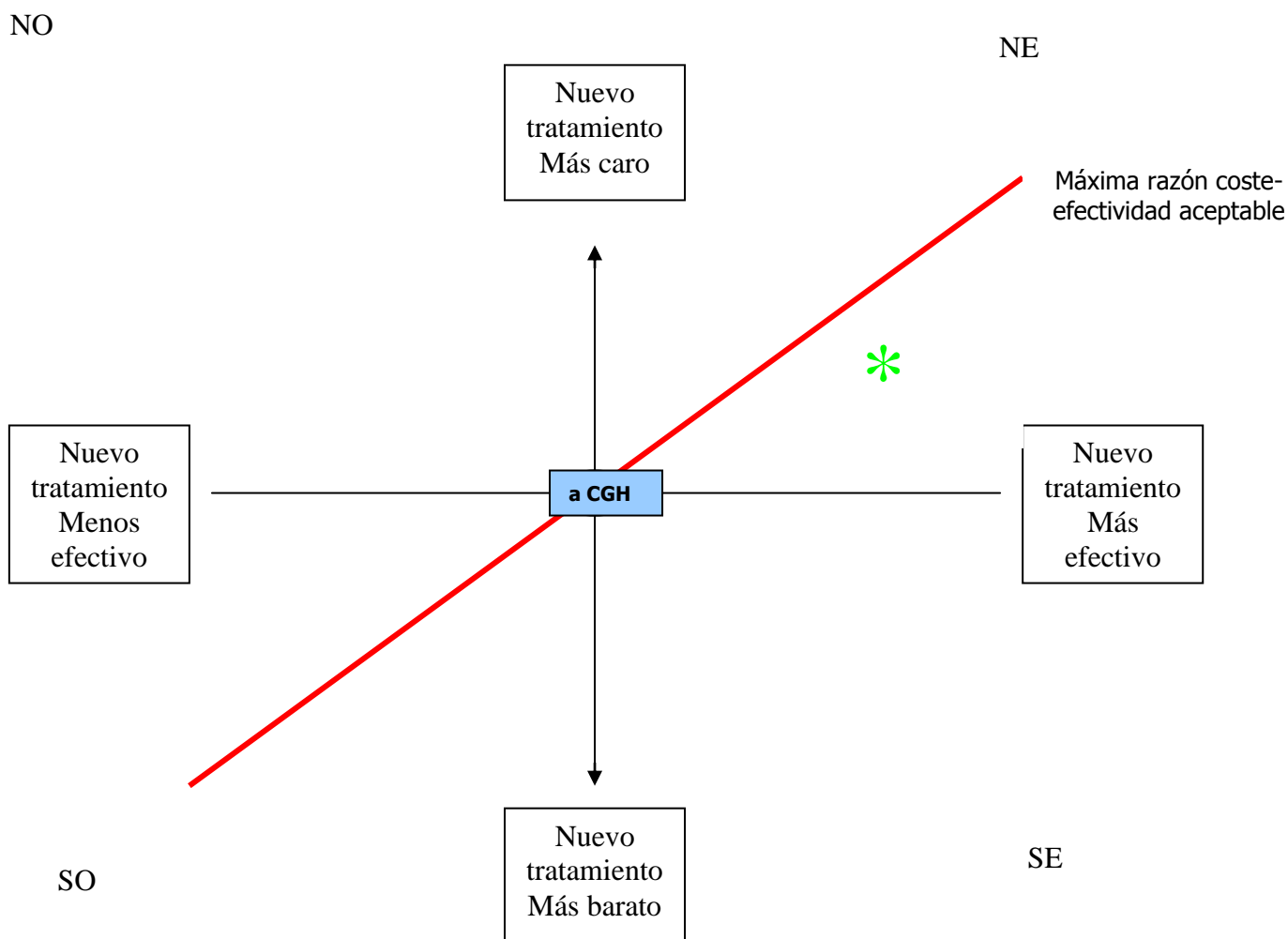
Tampoco se detectan mosaicos menores del 20%. En general los arrays de BAC son más hábiles en detectar mosaicismos (hasta menos del 20%), mientras que los oligos detectan un 30% o más. La habilidad de una plataforma de aCGH para detectar mosaicos también depende de la efectividad del software utilizado para analizar los datos, pues la inspección visual es insuficiente. Con el cariotipo sin embargo se obtiene una mayor resolución, del orden del 14%.

En nuestra serie no hemos detectado ningún mosaicismo con aCGH. El único caso es la madre de uno de los casos, en la que de forma casual detectó una deleción total de cromosoma X. Al hacer el cariotipo para confirmar, se encontró que en un 12% de las células había una trisomía XXX, en mosaico con la monosomía X en el 88%. Este mosaicismo no se detectó con el array.

## 6.5- COSTE-EFECTIVIDAD

No es la razón principal de este estudio la evaluación económica de los arrays de CGH, ya que son los responsables sanitarios los que deben tomar las decisiones en la incorporación de nuevas tecnologías sanitarias. Y aunque en España todavía no existe una obligatoriedad de adoptar el análisis coste-efectividad como herramienta para negociar las nuevas prestaciones sanitarias, nos ha parecido oportuno, dado el buen rendimiento de esta tecnología, hacer una evaluación básica.

Siguiendo los principios económicos fundamentales y trasladando los cálculos al plano coste-efectividad adaptado por Luengo-Fernández et al en 2011 podemos calcular si la efectividad adicional de los arrays compensa sus costes adicionales.



Debemos calcular la diferencia en costes dividida entre la diferencia en efectividad de las dos alternativas (el array y el cariotipo) siendo el resultado la **razón coste-efectividad incremental** (RCEI).

$$\text{RCEI} = (450-185)/(14,6-3) = 22,84$$

Si representamos gráficamente el RCEI éste quedaría en el noreste (\*) poniendo en evidencia que es una tecnología más cara pero mas eficiente comparada con el origen, y ésta probablemente debería adoptarse ya que se va a conseguir maximizar la salud de más población, siendo la línea roja diagonal la máxima RCEI aceptable.

Tal y como comentan Luengo-Fernández et al 2011, en España no existe consenso sobre cual es la máxima razón coste efectividad aceptable. Por hacernos una idea podemos utilizar la cifra del NICE (National Institute for Health and clinical excellence) que para 2010 se estableció en de 20.000 libras. Todo aquello que tuviera una RCEI menor de 20.000 libras, se podía considerar coste-efectivo.

Ahn y col 2010, que proponen en el Reino Unido la utilización de los arrays como prueba de primera línea para el diagnóstico de la discapacidad, calculan que el array que utilizan de 44k, con sus tests confirmativos y familiares, sale al mismo coste que un cariotipo.

Queremos dejar claro que nuestros resultados son a partir de una muestra postnatal de pacientes con discapacidad y que habría que verificarlo en otro tipo de pacientes. En la literatura se encuentran todavía discrepancias. Recientemente Hillman et al en 2011 hicieron una revisión sistemática y un metanálisis de los aCGH en diagnóstico prenatal concluyendo que es una herramienta potente pero que el significado incierto de muchos hallazgos no recomienda su utilización de forma rutinaria pues entre otras cosas aumentaría el coste por la complejidad del consejo genético.

La complejidad del consejo genético en los casos de discapacidad intelectual, postnatales, probablemente se vea reducida con los arrays a costa de la primera consulta. En esta primera consulta es donde se diseña la estrategia de estudio. Esta consulta quedaría reducida ya que no hace falta una

sospecha clínica antes de realizar el test. De hecho es una realidad actual que la mayoría de los pacientes no tienen suficiente historia clínica o características físicas que hagan sospechar una causa, genética o no, específica.

Dada la buena tasa de detección de esta tecnología y su utilidad, es probable que se introduzca ya, también en nuestro entorno, en el diagnóstico de la discapacidad intelectual y los trastornos del espectro autista, a pesar de que se necesitan más estudios de variaciones genéticas y epigenéticas para entender mejor las bases moleculares, mejorar el diagnóstico y desarrollar adecuadas dianas terapéuticas.

Pero no se puede dejar de mencionar, tal y como lo hacen Mitra et al en 2009, a las técnicas de secuenciación de next-generation y las alternativas que proporcionan a los arrays de CGH. Con esta nueva tecnología de secuenciación se detectan las CNV sin las limitaciones de medidas de intensidad características de las técnicas de array. Sin embargo Haraksingh et al 2011 creen que, aunque efectivamente la disminución de los costes en las técnicas de ultrasecuenciación y su aumento en la capacidad de detección permitirá sustituir a los arrays en el futuro, las dificultades de interpretación en la secuenciación hará que todavía en el futuro inmediato se continúe usando el CGH array en el entorno clínico, en la investigación médica y biológica y en la validación de datos de secuenciación de CNVs.

Hay una reflexión interesante de Singleton 2011 que nos puede ayudar a tomar la decisión de si incorporar los arrays ya o esperar a los resultados de la secuenciación: *“Mi visión es simple, no podemos permitirnos esperar. Estamos en una carrera para curar enfermedades. Sabemos que la secuenciación del exoma funciona y es abordable. Cuanto antes realicemos hallazgos genéticos antes podremos empezar a integrar estos descubrimientos en la comprensión del proceso de la enfermedad”*.



## **7- CONCLUSIONES**



## **7-CONCLUSIONES**

- 1- Los arrays de CGH han resultado ser eficaces para el diagnóstico de niños con discapacidad intelectual y trastornos del espectro autista. El rendimiento diagnóstico en esta muestra ha sido del 14,6%.
- 2- Comparado con el 3% de rendimiento diagnóstico del cariotipo, resulta cuatro veces más eficaz.
- 3- La plataforma 44K ha sido la que ha conseguido mayor equilibrio entre rendimiento y falsos positivos, aunque todas han tenido buen rendimiento.
- 4- Aunque de manera no significativa, el perfil de CNV más asociado a patología es: menor de 300Kb, de novo, delección, intersticial, y no asociada a DS.
- 5- La asignación "probable" a todas las VOUS para conseguir mayor utilidad clínica debe revisarse y reevaluarse a medida que aumenta el conocimiento.
- 6- Se han incluido todas las CNVs patológicas y las VOUS en la base de datos de DECIPHER con el fin de ayudar a la comunidad científica en la comprensión de estas alteraciones.
- 7- El grupo de pacientes en el que se ha obtenido mayor rendimiento ha sido el de casos con retraso mental y fenotipo peculiar.
- 8- En el grupo de casos con trastornos del espectro autista, el rendimiento diagnóstico ha resultado del 7,1%.

- 9- Se ha conseguido dar una información de la patología y un consejo genético adecuado en los casos diagnosticados.
- 10- Es necesario realizar FISH en los casos patológicos *de novo* para descartar translocaciones en los progenitores.
- 11- En los casos de CNV causal heredada es recomendable una evaluación clínica de los progenitores para otorgar valor a la CNV.
- 12- La implantación de esta tecnología como primer análisis en los pacientes con discapacidad intelectual hará que disminuyan los más de 8 años que en este estudio han tardado en ser diagnosticados.
- 13- El análisis de coste efectividad ha demostrado que realizando el aCGH como prueba de primera línea diagnóstica, el coste por diagnóstico resulta menor que si se hace primero el cariotipo.

## **8- BIBLIOGRAFÍA**



## **8- BIBLIOGRAFÍA Y BASES DE DATOS ON-LINE**

### **Bases de datos:**

Chromosome Anomaly Collection <http://www.ngri.org.uk/wessex/collection>  
Genome Variation Database <http://www.projects.tcag.ca/variation>,  
[http://dgvbeta.tcag.ca/gb2/gbrowse/dgv2\\_hg19/](http://dgvbeta.tcag.ca/gb2/gbrowse/dgv2_hg19/)  
DECIPHER <http://www.sanger.ac.uk/postgenomics/decipher>  
ECARUCA <http://www.ecaruca.net>  
OMIM <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>  
Entrez Gene <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>  
GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>  
Autism chromosome rearrangement database <http://projects.tcag.ca/autism/>  
Human Genome Segmental Duplication database <http://projects.tcag.ca/humandup>  
Pub Med <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>  
KEGG pathway Database <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway>  
Human Segmental Duplication Database  
<http://humanparalogy.gs.washington.edu/build36/build36.html>  
<http://genome.ucsc.edu/>  
ISCA <http://isca.genetics.emory.edu>  
Unique, rare chromosome disorders support group. <http://www.rarechromo.org/html/home.asp>  
Convención de Naciones Unidas sobre los derechos de personas con discapacidad  
(A/RES/61/106):  
<http://daccess-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N06/500/82/PDF/N0650082.pdf?OpenElement>

## Referencias

Ahn JW, Mann K, Walsh S, Shehab M, Hoang S, Docherty Z, Mohammed S, Ogilvie CM. 2010. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Molecular Cytogenetics*;3:9.

Alison Mcinnes L. 2002. Una revisión de la genética del autismo. *Rev Asoc Esp Neuropsiq*; 84:13-24.

Allemeersch J, Van Vooren S, Hannes F, De Moor B, Vermeesch JR, Moreau Y. 2009. An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberration by array CGH. *BMC Bioinformatics*;10:380.

Armengol L, Villatoro S, González JR, Pantano L, García-Aragonés, Rabionet R, Caceres M, Estivill X. 2009. Identification of copy number variants defining genomic differences among major human groups. *Plos One* ;4:9.

Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FM, García-Aragonés M, Villa O, Mansilla E, Preciado C, Fernandez L, Mori MA, García-Perz L, Lapunzina PD, Perez-Jurado LA. 2011. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet*. Oct 6 [Epub ahead of print].

Bailey JA, Liu G, Eichler EE. 2003. An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet* 73:823-834.

Ballarati L, Racalcati MP, Bedeschi MF, Lalatta F, Valtorta C, Bellini M, Finelli P, Larizza L, Giardino D. 2009. Cytogenetic, FISH and array-CGH characterization of a complex chromosomal rearrangement carried by a mentally and language impaired patient. *Eur J Med Genet*: 218-223.

Ballif BC, Theisen A, Rosenfeld JA, Traylor RN, Gastier-Foster J, Thrush DL, Astbury C, Bartholomew D, McBride KL, Pyatt RE, Shane K, Smith WE, Banks V, Gallentine WB, Brock P, Rudd MK, Adam MP, Keene JA, Phillips III JA, Pfothenauer JP, Gowans GC, Stankiewicz P, Bejjani BA, Shaffer L. 2010. Identification of a recurrent microdeletion at 17q23.1q23.2 flanked by segmental duplications associated with heart defects and limb abnormalities. *Am J Hum Genet*; 86:454-461.

Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, William CA, Braley LL et al. 2008. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics*. 121:404-410.

Belinchón M, Hernández JM, Sotillo M. 2008. *Personas con síndrome de Asperger. Funcionamiento, detección y necesidades*. Madrid

Boone PM, Bacino CA, Shaw CA, Eng PA, Hixson PM, Pursley AN, Kang AL, Yang Y, Wiszniewska, Nowakowska BA, Gaudio D, Xia Z, Simpson-Patel G, Immken LL, Gibson JB, Tsai ACH, Bowers JA, Reimschisel TE, Schaaf CP, Potocki L, Scaglia F, Gambin T, Sykulski M, Bartnik M, Derwinska K, Wisniowiecka-Kowalnik B, Lalani SR, Probst FJ, Bi W, Beaudet L, Patel A, Lupski JR, Cheung SW, Stankiewicz P. 2010. Detection of clinically relevant exonic copy-number changes by array CGH. *Hum Muta*; 31(12): 1326-1342.

Brenner A, Giacobini M, Eriksson M, Gustavsson P, Nordin V, fernell E, Gillberg C, Nordgren A, Uppstromer A, Anderlid BM, Nordenskjold M, Schoumans J. 2011. Copy number variation characteristics in subpopulations of patients with autism spectrum disorders. *Am J Med genet B*;156(2):115-124.

Brunet A, Armengol L, Heine D, Rosell J, Gracia-Aragonés M, Gabau E, Estivill X, Guitart M. 2009. BAC array CGH in patients with Velocardiofacial syndrome-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1. *BMC Medical Genetics* 10:144.

Cheng Z, Ventura M, She X, Khaitovich P, Graves T, Osoegawa K, Church D, de Jong P, Wilson RK, Paabo S, Rocchi M, Eichler EE. 2005. A genomic-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature* 437:88-93.

Cheung J, Estivill X, Khaja R, MacDonald JR, Lau K, Tsui LC, Scherer SW. 2003. genome-wide detection of segmental duplications and potential assembly errors in the human genome sequence. *Genom Biol*; 4:R25.

Cheung SW, Shaw CA, Scott DA, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Pursley A, Li J, Erickson R, Gropman AL, Miller AT, Seashore MR, Summers AM, Stankiewicz, P, Chinault AC, Lupski JR, Beaudet AL, Sutton VR. 2007. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *AM J Med Genet* 143A:1679-1686.

Christian SL, Brune CW, Sudi J, Kumar RA, Liu S, KaraMohamed S, Badner JA, Matsui S, Conroy J, McQuaid D, Gergel J, Hatchwell E, Gilliam TC, Gershon ES, Nowak NJ, DobynsWB, Cook EH.

2008. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry*. 63.12:1111-1117.

CIE-10. En <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>

Croen L, Najjar DV, Fireman B, Grether JK. 2007. Maternal and paternal age and risk of autism spectrum disorders. *Arch Pediatr Adolesc Med*; 161:334-340.

Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J. 1997. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72:468-477.

Cuscó I, Corominas R, Bayes M, Flores M, Rivera-Brugues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA. 2008. Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Research* 18:683-694.

Cuscó I, Medrano A, gener B, Vilardell M, Gallastegui F, Villa O, Gonzalez E, Rodriguez Santiago B, Vilella E, Del Campo M, Perez Jurado LA. 2009. Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamergic synapse in the etiology of the disorder. *Hum Molec Genet* 18,10:1795-1804.

Cutler DJ, Jensen JD. 2010. To pool or not to pool. *Genetics* 186:41-43

Dang VT, Kassahn KS, Marcos AE, Ragan MA. 2008. Identification of human haploinsufficient genes and their genomic proximity to segmental duplications. *Eur J Hum Genet*; 16:1350-1357.

De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera MA, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. 2007. Cryptic deletions are common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* 44: 750-762.

De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. 2001. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38:145-150.

De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. 2003. Telomeres: a diagnostic at the end of the chromosome. *J Med Genet* 40:385-398.

Edelmann L, Hirschhorn K. 2009. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann NY Acad Sci* 1151:157-166.

Emanuel BS, Saitta SC. 2007. From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. *Nat Rev Genet*; 8(11):869-883.

Eichler EE. 2001. Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome. *Trends Genet* 17: 661-669.

Erdogan F, Chen W, Kirchhoff M, Kalscheuer VM, Hultschig C, Muller I, Schulz R, Menzel C, Bryndorf T, Ropers HH, Ullmann R. 2006. Impact of low copy repeats on the generation of balanced and unbalanced chromosomal aberrations in mental retardation. *Cytogenet Genome Res* 115:247-253.

Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C, Koumbaris G, Kallikas I, Georgiou I, Velissariou V, Patsalis PC. 2010. Clinical application of whole-genome array CGH Turing prenatal diagnosis: study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparent balanced structural aberrations. *Molecular Cytogenetics*; 3:24.

Fadista J, Thomsen B, Holm LE, Bendixen C. 2010. Copy number variation in the bovine genome. *BMC Genomics* 11:284.

Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, Carver V, Benke P, Mundy P, Elsas LJ. 2007. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mut* 29,11:1124-1132.

Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-40.

Folstein SE, Rosen-Shidley B. 2001. genetics of autism: complex aetiology for heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet*; 2:943-955.

Fombonne E. 2003. The prevalence of autism. *JAMA*; 289:87-89.

Fombonne E. 2005. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry* 66:3-8.

Foster MW, Mulvihill JJ, Sharp RR. 2009. Evaluating the utility of personal genomic information. *Genet Med* 11,8:570-574.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. 2006. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 16:949-961.

Froyen G, van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SGM, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P. 2007. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high resolution X array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Human mutation* 28,10:1034-1042.

Galán Gómez E. "Indicaciones del estudio genético" [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/)

Gardner RJM, Sutherland GR. 2004. Chromosomal abnormalities and genetic counselling. New York: Oxford University Press.

Gayán J, Galán JJ, González-Pérez A, Saez ME, Martínez-Irrad MT, Zabena C, Rivero MC, Salinas A, Ramírez-Lorca R, Morón FJ, Royo JL, Moreno-Rey C, Velasco J, Carrasco JM, Molero E, Ochoa C, Ochoa MD, Gutiérrez M, Reina M, Pascual R, Romo-Astoga A, Susillo-González JL, Vázquez E, Real LM, Ruiz A, Serrano-Ríos M. 2010. Genetic structure of the Spanish Population. *BMC Genomics* 11.1:326.

Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Vives L, Vu TH, Safer N, Bernier R, Ferrero GB, Silengo M, Warren ST, Moreno CS, Fichera M, Romano C, Raskind WH, Eichler EE. 2011. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *Plos Genetics*;7;11.

Glusman G, Yanai I, Rubin I, Lancet D. 2001. The complete human olfactory subgenome. *Genome Res*;11:685-702.

Goidts V, Cooper DN, Armengol L, Schempp W, Conroy J, Estivill X, Nowak N, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H. 2006. Complex patterns of copy number variation at sites of segmental duplication: an important category of structural variation in the human genome. *Hum Genet* 120: 270-284.

Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell RJ, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja MK. 2005. The influence of CCL3LI gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307:1434-1440.

Grupo para el Consenso para la Implementación de los arrays en la genética clínica. 2012. ISBN: 978-84-15010-13-5.

Grati FR, Lesperance MM, de Toffol S, Chunetti S, Selicorni A, Emery S, Grimi B, Dulcetti F, Malvestiti B, Taylor J et al. 2009. Pure monosomy and pure trisomy of 13q21.2-31.1 consequent to a familial insertional translocation: exclusion of PCDH9 as the responsible gene for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1). *Am J Med Genet A*, 149A:906-9013.

Gu W, Zhang F, Lupski JR. 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*;1, 4.

Gutierrez Agulló M. 2011. Analisis de la actividad de la Unidad de Genética del Hospital General Universitario de Alicante: estudio de costes derivados y repercussion en diferentes procesos diagnósticos. *Gestión y Evaluación de Costes sanitarios*;12;1:89-114.

Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-garcía J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munné S. 2011. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*;95(3): 953-958.

Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, Ravel T, Ruivenkamps CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A, Stewart H, Hennekam RC, Cooper GM, Regan R, Knight SJL, Eichler EE, Vermeesch JR. 2009. recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet*; 46:223-232.

Haraksingh RR, Abyzov A, Gerstein M, Urban AE, Snyder M. 2011. genome-Wide mapping of copy number variations in humans: comparative analysis of high resolution array platforms. *Plos One*;6,11.

Hehir-Kwa JY, Wieskamp N, Webber C, Pfundt R, Brunner HG, Gilisen C, de Vries BBA, Ponting AP, Veltman JA. 2010. Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. *Plos computational biology* 6.4.e1000752.

Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. 2009. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet* 18. Review Issue 1.

Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy, McMullan DJ, Davison EV, Maher ER, Kilby MD. 2011. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 37:6-14.

Hills A, Ahn JW, Donaghue C, Thomas H, Mann K, Ogilvie CM. 2010. MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. *Molec Cytogenet*;3:19.

Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listerwnik ML, Donahae PK, Qi Y, Scheres SW, Lee C. 2004. Detection of large –scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9):949-951.

Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss RM, Myers RM, Ridker PM, Chasman DI, Mefford H, Ying P, Nickerson DA, Eichler EE. 2009. Population análisis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet*; 84:148-161.

Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. 1992. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet*; 29:103-108.

Jaillard S, Drunat S, Bendavid C, Aboura A, Etcheverry A, Journal H, Delahaye A, Pasquier L, Bonneau D, Toutain A, Burglen L, Guichet A, Pipiras E, Gilbert-Dussardier B, Benzacken B, Martin-Coignard D, Henry C, David A, Lucas J, Mosser J, David V, Odent S, Verloes A, Dubourg C. 2010. Identification of gene copy number variations in patients with mental retardation using array-CGH: Novel syndromes in a large French series. *Eur J Med Genet* 58:66-75.

Just MA, Cherkassky VL, Keller TA, Minshew NJ. 2004. Cortical activation and synchronization during sentence comprensión in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain*; 127:1811-1821.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*.30;258(5083):818-21.

Kang SH, Shaw C, Ou Z, Eng PA, Cooper ML, Pursley AN, Sahoo T, Bacino CA, Chinault AC, Stankiewicz P, Patel A, Lupski JR, Cheung SW. 2010. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am J Med Genet* 152A:1111-1126.

Kim PM, Lam HYK, Urban AE, Korbelt JO, Affourtit J, Grubert F, Chen X, Weisman S, Snyder M, Gerstein MB. 2008. Analysis of copy number variants and segmental duplications in the human genome: evidence for a change in the process of formation in recent evolutionary history. *Genome Research*; 18: 1865-1874.

Kirschhoff M, Rose H, Lundsteen C. 2001. High resolution comparative genomic hybridization in clinical genetics. *J Med Genet* 38:740-744.

Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sisterman EA. 2004. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 41: 249-255.

Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BB. 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat* 30:283-292.

Krepischi-Santos ACV, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai K, Sloobs W, Mazzeu JF, Kok F, Cheroki C, Otto PA, Mingroni-Netto, Varela M, Koffmann C, Kim CA, Bertola DR, Pearson PL, Rosenberg C. 2006. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet genome Res* 115:254-261

Lee JA, Carvalho JM, Lupski JR. 2007. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*; 131:1235-1247.

Lee CH, Liu CM, Wen CC, Chang SM, Hwu HG. 2010. Genetic copy number variants in sib pairs both affected with schizophrenia. *Journal Med Science*;17:2.

Lejeune J, Gautier M, Turpin R. 1959. Etudes des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Acad Sci* 248:11:1721-1722.

Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: Challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;(8):117-34

Levasseur A, Pontarotti P. 2011. The role of duplications in the evolution of genomes highlights the need for evolutionary-based approaches in comparative genomics. *Biology Direct*; 6:11.

López Ibor JJ, Valdés M, editores. DMS-IV-TR. 2002. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Texto revisado. Barcelona: Masson.

Luengo-Fernández R, Hernandez Quesada C, Rivero Arias O. 2011. Evaluación económica de las tecnologías sanitarias: una introducción para médicos. *Rev Neurol* 53,2:107-115.

Lupsky JR. 1998. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*; 14:415-420.

Machado IN, Heinrich JK, Barini R. 2011. Genomic imbalances detected through array CGH in fetuses with holoprosencephaly. *Arq Neuropsiquiatr*; 69(1):3-8.

Malan V, Chevallier S, Soler G, Coubes C, Lacombe D, Pasquier L, Soulier J, Morichon-Delvallez N, Turleau C, Munnich A, Romana S, Vekemans M, Cornier-Daire V, Colleaux L. 2010. Array-based comparative genomic hybridization identifies a high frequency of copy number variations in patients with syndromic overgrowth. *Eur J Hum Genet*;8:227-232.

Manning M, Hudgins L. 2007. Use of array-based technology in the practice of medical genetics. *Genet Med* 9:650-653.

Manolakos E, Vetro A, Kefals K, Rapti SM, Louizou E, Garas A, Kitsos G, Vasileiadis L, Tsoplou P, Eleftheriades M, Peitsidis P, Orru S, Liehr T, Petersen MB, Thomaidis L. 2010. The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay. *Molecular Genetics* ;3:22.

Mao R, Pevsner J. 2005. The use of genomic microarrays to study chromosomal abnormalities in mental retardation. *Mental retardation and Developmental Disabilities. Research Reviews* 11:279-285.

Marques-Bonet T, Girirajan S, Eichler EE. 2009. The origins and impact of primate segmental duplications. *Trends Genet*;25(10):443-454.

Martínez F, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Blesa D, Quiroga R, Mayo S, Orellana C. 2010. Enrichment of ultraconserved elements among genomic imbalances causing mental delay and congenital anomalies. *BMC Medical Genomics*;3:54.

Mefford HC, Eichler EE. 2009. Duplication hotspots, rare genomic disorders and common disease. *Curr Opin Genet Dev*; 19(3):196-204.

Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns J-P, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR. 2006. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 43: 625-633.

Merla C, Howald C, Henrichsen CN, Lyle R, Wyss C, Zobot MT, Antonarakis SE, Raymond A. 2010. Submicroscopic deletions in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of nonhemizygous flanking genes. *Am J Hum Genet* 79:332-341

Miles JH, et al. 2005. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet* 135A:171-180.

Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, Bridgemohan C, Cox GF, Dickinson H, Gentile J, Harris DJ, Hedge V, Hundley R, Khwaja O, Kothare S, Luedke C, Nasir R, Poduri A, Prasad K, Raffalli P, Reinhard A, Smith SE, Sobeih MM, Soul JS, Stoler J, Takeoka M, Tan W-H, Thakuria J, Wolff R, Yusupov R, Gusella JF, Daly MJ, Wu BL. 2009. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet* 46:242-248.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kosk K, Kranyz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. 2010 Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86.5:749-764.

Mitra A, Liu G, Song J. 2009. A genome-wide analysis of array-based comparative genomic hybridization (CGH) data to detect intra-species variations and evolutionary relationships. *Plos One*;4,11.

Molina O, Blanco J, Vidal F. 2010. Deletions and duplications of the 15q11-q13 region in spermatozoa from Prader-Willi syndrome fathers. *Molec Hun Reprod*; 16, 5:320-328.

Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V, Polak P, Yoon S, Maguire J, Crawford EL, Campbell NG, Geller ET, Valladares O, Schafer C, Liu H, Zhao T, Cai G, Lihm J, Dannenfelser R, Jabado O, Peralta Z, Nagaswamy U, Muzny D, Reid JG, Newsham I, Wu Y, Lewis L, Han Y, Voight BF, Lim E, Rossin E, Kirby A, Flannick J, Fromer M, Shakir K, Fennell T, Garimella K, Banks E, Poplin R, Gabriel S, DePristo M, Wimbish JR, Boone BE, Levy SE, Betancur C, Sunyaev S, Boerwinkle E, Buxbaum JD, Cook EH Jr, Devlin B, Gibbs RA, Roeder K, Schellenberg GD, Sutcliffe JS, Daly MJ. 2012. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. 2012 Apr 4;485(7397):242-5.

Neill NJ, Torchia BS, Bejjani BA, Shaffer LG, Ballif BC. 2010. Comparative analysis of copy number detection by whole-genome BAC and oligonucleotide array CGH. *Molecular Cytogenetics*;3:11

Nguyen DQ, Webber C, Ponting CP. 2006. Bias of selection on human copy-number variants. *Plos genet* 2:2:e20.

Ohno S. 1970. *Evolution by gene duplication*. Springer, Berlín.

O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD, Turner EH, Stanaway IB, Vernot B, Malig M, Baker C, Reilly B, Akey JM, Borenstein E, Rieder MJ, Nickerson DA, Bernier R, Shendure J, Eichler EE. 2012. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*. 2012 Apr 4;485(7397):246-50.

Pagamenta AT, Khan H, Walker S, Gerrelli D, Wing Kirsty, Bonaglia MC, Giorda R, Berney T, Mani E, Molteni M, Pinto D, Le Couteur A, Hallmayer J, Sutcliffe JS, Szatmari P, Paterson AD, Scherer SW, Vieland VJ, Monaco AP. 2011. Rare familial 16q21 microdeletions under a linkage Peak implicate cadherin 8 (CDH8) in susceptibility to autism and learning disability. *J Med Genet*;48:48-54.

Palmer EE, Peters GB, Mowat D. 2012. Chromosome microarray in Australia: a guide for paediatricians. *Journ Pediatr Child Health* 48, E59-E67.

Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Aminoso C, Arcas J, Martinez BA, Fernandez L, Lopez Pajares I. 2006. MLPA vs mutiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet* 69, 228-233.

Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C. 2004. Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocations reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *Eur J Hum Genet* 12.8:647-653.

Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Ko JM, Kim HJ, Cheon CJ, Hwang SH, Kang HY. 2011. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molec Cytogenet*;4:12.

Perry GH, Tchinda J, McGrath SD, Zhang J, Picker SR, Caceres AM, Iafrate AJ, Tyler-Smith C, Scherer SW, Eichler EE, Stone AC, Lee C. 2006. Hotspots for copy number variation in chimpanzees and humans. *PNAS* 103:21:8006-8011.

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. 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211.

Prescott K, Woodfine K, Stubbs P, et al. 2006. A novel 5q11.2 deletion detected by microarray comparative genomic hybridization in a child referred a a case of suspected 22q11 deletion syndrome. *Human Genet* 116:83-90.

Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, Fawcett C, Kalousek D, Philipp T, Sommerville MJ, Stephenson MD. 2010. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction*; 25(11): 2913-2922.

Ravel TJL, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. 2007. What's new in karyotyping?. The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Ped* 166:637-643.

Ravnan JB, tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. 2006. Subtelomere FISH analysis of 11.688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478-489.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Flieger H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, 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, Zhan J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 7118: 444-454.

Regier DA, Friedman JM, Marra CA. 2010. Value for money? Array genomic hybridization for diagnostic testing for genetic causes of intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 14; 86(5): 765-772.

Riethman H, Ambrosini A, Paul S. 2005. Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Research* 13: 505-515.

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

Ropers HH. Genetics of intellectual disability. 2008. *Current Opinion in genetics and Development* 18:241-250.

Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Ottito PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos ACV, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ. 2006. Array CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 43:180-186.

Rudd MK, Keene J, Bunke B, Kaminsky EB, Adam MP, Mulle JG, Ledbetter DH, Martin CL. 2009. Segmental duplications mediate novel, clinically relevant chromosome rearrangements. *Hum Molec Genet*; 18,16: 2957-2962.

Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JPT, Burton H. 2009. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *genetics in Medicine* 11, 3:139-146.

Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, Glaze DG, German JR, Bird LM, Barbieri-Welge R, Bichell TJ, Beaudet AL, Bacino CA. 2006. Microarray based comparative genomic hybridization testing in

deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 43:512-516.

Saillour Y, Cossée M, Leturcq F, Vasson A, Beugnet C, Poirier K, Commere V, Sublemontier S, Viel M, Letourneur F, Barbot JC, Deburgrave N, Chelly J, Biennu T. 2008. Detection of exon copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-base comparative genomic hybridization-array method. *Human Mutation* 29 (9): 1083-1090.

Sankaranarayanan K. 2006. Estimation of the genetic risks of exposure to ionizing radiation in humans: current status and emerging perspectives. *J Radiat Res*; 47 Suppl B57-B66.

Sashidaran R, Gerstein M. 2008. genomics: proteína fossils live on as RNA. *Nature*; 453:729-731.

Scottish Intercollegiate Guidelines Network. A guideline developers' handbook (publication n° 50)[monografía en internet]. Edinburgh:SIGN:2001. Disponible en: URL: <http://www.sign.ac.uk/guidelines/fulltext/50/index.html>.

Schalock ER, Borthwick-Duffy BA, Bradley VJ, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM, Gomez SC, Lachapelle Y et al. 2010. Intellectual disability: definition, classification and systems of support. AAIDD, ISBN: 978-1-935304-04-3

Schoumans J, Anderlid BM, Blennow E, Teh BT, Nordenskjöld M. 2004. The performance of CGH array for the detection of cryptic constitutional chromosome imbalances. *J Med Genet* 41:198-202.

Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. 2005. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genome hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 42:699-705.

Sebat J, Lakshmi B, Trage 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, Zelterberg A, Wigler M. 2004. Large scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305 (5683):525-528.

Shaffer LG, Bejjani BA. 2006. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genom Res* 115:303-309.

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

Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Li Y, Neill S, Pursley AN, Chinault AC, Patel A, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW. 2008. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,389 cases. *Am J Med Genet A*.146A.17:2242-2251.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willat L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. 2004. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 4:241-248.

Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB et al. 2010. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 125:727-735.

Singleton AB. 2011. Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol*; 10:942-946.

Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E, Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis PC. 2008. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Molecular Cytogenetics* 1:15.

Slavotinek AM. 2008. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet* 124:1-17.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407.

Stankiewicz P, Lupski JR. 2002. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet*; 18:74-82.

Stankiewicz P, Beaudet AL. 2007. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay and idiopathic mental retardation. *Current Opinion in Genetics and Development* 17:182-192.

Stoeva RE, Grozdanova LI, Vermeesch JR, Kirchhoff M, Fryns JP, Ivanov IS, Patcheva IH, Dimitrov BI, Krastev TB, Linev AJ, Stefanova MT. 2008. Clinical and molecular-cytogenetic studies of cryptic chromosome aberrations in individuals with idiopathic mental retardation and multiple congenital malformations. *Folia Medica* 50(4):55-62

Tecnology Evaluation Center. Special report: aCGH for the genetic evaluation of patients with developmental delay/mental retardation or autism spectrum disorders. *Assesment Program* 2009. 23:10.

Thienpont B et al. 2007. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by aCGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* 28: 2778-2784.

Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME. 2008. Germline rates of de novo deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet*; 40:90-95.

Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D et al. 2005. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 37:727-732.

Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. 2002. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 70:1269-1276.

Veltman JA, Brunner HG. 2010. Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes. *Nat Genet* ;42:192-193.

Vermeesch JR, Fiegler H, Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. 2007. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genetics*;15:1105-1114.

Walsh et al. 2008. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 320:539-543.

Warburton D. 1991. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 49:995-1013.

Wordsworth S, Buchanan J, Regan R, Davison V, Smith K, Dyer S, Campbell C, Blair E, Maher E, Taylor J, Knight SJ. 2007. Diagnosing idiopathic learning disability: a cost-effectiveness analysis of microarray technology in the National Health Service of the United Kingdom. *Genomic Med.* 1(1-2):35-45.

Xiang B, Zhu H, Shen Y, Miller DT, Lu K, Hu X, Andersson HC, Narumanchi TM, Wang Y, Martinez JE, Wu BL, Li P, Li MM, Chen TJ, Fan YS. 2010. Genomic-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation. A multicenter experience of 1499 clinical cases. *J Mol Diagn* 12:204-212.

Yim SH, Kim TM, Hu HJ, Kim JH, Kim BJ, Lee JY, Han BG, Shin SH, Jung SH, Chung YJ. 2010. Copy number variations in East-Asian population and their evolutionary and functional implications. *Hum Molecular Genetics* 19.6:1001-1008.

## **9- TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS.**



## **9- TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS:**

### **TABLAS**

**Tabla 1.-** Clasificación del retraso mental. Fuente: Asociación Americana de Psiquiatría (APA), 1994, y Organización Mundial de la Salud (OMS).

**Tabla 2.-** Casos con CNV causales.

**Tabla 3.-** Casos con CNV de significado incierto.

**Tabla 4.-** Lista de 73 casos normales: casos sin CNV y casos con CNV benignas.

**Tabla 5.-** Tamaño de las CNVs.

**Tabla 6.-** Frecuencia de heredadas y de novo en los grupos de CNV causales y VOUS.

**Tabla 7.-** Deleción o duplicación en los tres grupos de CNVs.

**Tabla 8.-** Cromosomas implicados y su frecuencia por grupos de CNVs

**Tabla 9.-** Frecuencia de anomalías subteloméricas/intersticiales según grupo de CNV.

**Tabla 10.-** Frecuencia de duplicaciones segmentarias según grupo de CNV.

**Tabla 11.-** Número y frecuencia de CNVs en los grupos de casos normales y patológicos.

**Tabla 12.-** Rendimiento diagnóstico para las cuatro plataformas utilizadas.

**Tabla 13.-** Rendimiento diagnóstico.

**Tabla 14.-** CNV causales y benignas por sexos.

**Tabla 15.-** Rendimiento diagnóstico según indicación de estudio.

**Tabla 16.-** Frecuencia de casos estudiados y casos patológicos según indicación.

### **GRÁFICOS**

**Gráfico 1.-** Tipo de CNV según su tamaño.

**Gráfico 2.-** Representación de las CNV heredadas y de novo por grupos de causales y VOUS.

**Gráfico 3.-** Frecuencia de duplicaciones y deleciones por grupo de CNV.

**Gráfico 4.-** Frecuencia de cromosomas implicados en las diferentes CNVs.

**Gráfico 5.-** Frecuencia de VOUS y CNV causales en cuanto a localización.

**Gráfico 6.-** Frecuencia de VOUS y causales según la CNV estuviera o no localizada en región rica en CNVs.

**Gráfico 7.-** Frecuencia de casos normales y patológicos con 0, 1 o más CNVs.

**Gráfico 8.-** Edades de los pacientes cuando se les realizó el CGH array.

**Gráfico 9.-** Frecuencia de CNV patológicas/benignas según sexo.

**Gráfico 10.-** Indicaciones de estudio de array.

**Gráfico 11.-** Representación de las edades de aparición de los primeros signos y las edades al diagnóstico.

## FIGURAS

**Figura 1.-** Indicaciones para realizar un cariotipo. Galán Gómez E. [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/)

**Figura 2.-** Deleción cromosómica diagnosticada con una resolución de 700 bandas, que no se detectó con resolución de 500 bandas.

**Figura 3.-** Cariotipo sin bandas y cariotipo con bandas G

**Figura 4.-** Fenotipo clásico en una niña con síndrome de Prader-Willi.

**Figura 5.-** Microdeleción 15q11 detectada en cariotipo de alta resolución.

**Figura 6.-** FISH en metafases con distintos tipos de sondas (a-c). FISH en núcleo interfásico con sondas de centrómero (alfa satélite) de tres cromosomas distintos (d).

**Figura 7.-** Hibridación Genómica Comparada (CGH) en carcinoma de células renales. De: "Expert Reviews in Molecular Medicine. 2000. Cambridge University Press".

**Figura 8.-** Procedimiento del MLPA: desnaturalización, hibridación, ligamiento, PCR multiplex y análisis de fragmentos. De: [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)

**Figura 9.-** Procedimiento del array de CGH

**Figura 10.-** Deleción 7q11 detectada con aCGH y con FISH, responsable del síndrome de Williams. Fenotipo de varios niños con síndrome de Williams.

**Figura 11.-** Principio del aCGH. De: AP112. "Basic Principles of CGH arrays. 2008. College of American Pathologists.

**Figura 12.-** "Checklist" de **de Vries et al** de criterios clínicos.

**Figura 13.-** Recombinación homóloga no-alélica.

**Figura 14.- (Molina et al 2010):** diferentes NAHR según la orientación de las DS.

**Figura 15.-** Mecanismos de producción de reordenamientos genómicos: recombinación homóloga no-alélica (NAHR), unión de finales no-homólogos (NHEJ) y Fostes.

**Figura 16.-** Algoritmo de estudio genético en individuos con retraso mental, del desarrollo, con múltiples defectos congénitos y con trastornos del espectro autista, según consenso ISCA

**Figura 17.-** Imagen en detalle del cromosoma 22.

**Figura 18.-** Genes listados en OMIM de la región 22q13.2.

**Figura 19.-** Cariotipo convencional 46,XX de 500 bandas de resolución.

**Figura 20.-** Imagen en detalle del cromosoma 3.

**Figura 21.-** Listado de genes con anotación OMIM incluidos en la región 3q13.11-3q13.33.

**Figura 22.-** Imagen en detalle del cromosoma 14.

**Figura 23.-** Imagen en detalle de la deleción 22q11.2

**Figura 24.-** Imagen en detalle de la deleción 1p34.3

**Figura 25.-** Genes OMIM incluidos en la deleción 1p34.3 presente en la muestra.

**Figura 26.-** Genes incluidos en la región según DECIPHER.

**Figura 27.-** Cariotipo masculino normal.

**Figura 28.-** Imagen en detalle del cromosoma 22.

**Figura 29.-** Metafase y núcleo interfásico mostrando una única señal (roja) en 18q23 en el paciente.

**Figura 30.-** FISH metafásico en el padre del paciente mostrando dos señales (rojo) en 18q23.

**Figura 31.-** sonda 18q23 localizada en brazos cortos de un cromosoma del grupo D, en metafase de la madre del paciente.

**Figura 32.-** FISH en metafase usando, además de la sonda en 18q23, sondas para identificar los D: D15S10 (rojo) y ARSA (verde) para el 15. LSI 13q14 en rojo. En ninguno de estos D se localiza en su brazo corto la sonda 18q23 (rojo).

**Figura 33.-** FISH en metafase con sonda tel14q en rojo y 18q23 en rojo.

**Figura 34.-** Imagen representativa del genoma del paciente.

**Figura 35.-** Imagen en detalle del cromosoma 15.

**Figura 36.-** Imagen en detalle de la región 16p12.2

**Figura 37.-** Imagen en detalle de la duplicación en la paciente.

**Figura 38.-** Imagen en detalle de la duplicación en el padre.

**Figura 39.-** CGH array de la madre del paciente mostrando una deleción completa del cromosoma X.

**Figura 40.-** Detalle de la deleción presentada en 3q25.32 en el padre (rojo) y en su hijo (azul).

**Figura 41.-** CGH array completo del paciente mostrando la duplicación en 19q13.4

**Figura 42.-** Deleción 2p12 en la progenitora y en el paciente.

**Figura 43.-** Imagen del cromosoma 4.

**Figura 44.-** Detalle de la región en la niña y en su madre.

**Figura 45.-** Imagen en detalle de la región 16p13.2 comparando al padre, madre y probando

**Figura 46.-** Resultados de array CGH de 5 laboratorios según Xiang et al 2010

**Figura 47.-** Asignación de patogenicidad a una CNV según Miller et al 2010

**Figura 48.-** Localización de DUPLICACIONES SEGMENTARIAS según Miller et al 2010.

**Figura 49.-** Número de casos descritos con deleción/ duplicación en los 24 cromosomas.

**Figura 50.-** Cariotipo complejo: t(3q;4q;12p;5q)

**Figura 51.-** Cariotipo mostrando la anomalía en 5p.