

***CARACTERIZACIÓN
DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS
EN DIAGNÓSTICO PRENATAL Y POSTNATAL
MEDIANTE TÉCNICAS
DE CITOGENÉTICA MOLECULAR***

Cristina Hernando Davalillo

Tesis doctoral - 2005

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR	5
1.1.1	HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE CONVENCIONAL (FISH CONVENCIONAL)	5
1.1.1.1	Tipos de sondas utilizadas en FISH convencional	6
1.1.2	TÉCNICAS DERIVADAS DE LA FISH CONVENCIONAL	8
1.1.2.1	Técnicas de FISH multicolor basadas en el uso de sondas de pintado cromosómico	10
1.1.2.2	Otras técnicas más recientes basadas en FISH multicolor	11
1.1.2.3	Hibridación genómica comparada (CGH)	16
1.1.3	OTRAS TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR	18
1.1.3.1	Hibridación genómica comparada en micromatrices (CGH – Array)	18
1.1.3.2	PCR Cuantitativa Fluorescente	21
1.1.3.3	Estudio molecular para la detección de disomías uniparentales.	22
1.2	APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS CONSTITUCIONALES ESTRUCTURALES	24
1.2.1	CARACTERIZACIÓN DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS CRÍPTICAS	25
1.2.1.1	Microdeleciones	26
1.2.1.2	Microduplicaciones	29
1.2.1.3	Inversiones crípticas	31
1.2.1.4	Translocaciones crípticas	33
1.2.1.5	Inserciones crípticas	34
1.2.1.6	Deleciones, duplicaciones y reorganizaciones crípticas en regiones subteloméricas	34
1.2.2	CARACTERIZACIÓN DE DICÉNTRICOS, ISOCROMOSOMAS Y CROMOSOMAS EN ANILLO	36
1.2.2.1	Cromosomas dicéntricos y acéntricos	36
1.2.2.2	Isocromosomas	37
1.2.2.3	Cromosomas en anillo	38
1.2.3	CARACTERIZACIÓN DE REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS COMPLEJAS	40
1.2.4	CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES SUPERNUMERARIOS	42
1.3	CONTRIBUCIÓN DE LA CITOGENÉTICA MOLECULAR AL ESTABLECIMIENTO DE CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO	45
2	OBJETIVOS	49
3	MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1	PACIENTES	53
3.2	TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR	62
3.3	TÉCNICAS DE BANDEO CROMOSÓMICO	68
3.4	HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)	71
3.4.1	FISH convencional	71
3.4.1.1	FISH locus específica	71
3.4.1.2	FISH subtelómero específica	73

3.4.1.3	FISH de pintado cromosómico	74
3.4.2	FISH multicolor	76
3.4.2.1	Multipintado (M-FISH)	76
3.4.2.2	FISH multicolor centrómero específica (CenM-FISH)	79
3.5	EXTRACCIÓN DE ADN	80
3.6	VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN EXTRAÍDO	84
3.7	HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA	86
3.7.1	HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA DE ALTA RESOLUCIÓN	90
3.8	PCR CUANTITATIVA FLUORESCENTE (QF-PCR)	91
3.9	NOMENCLATURA	93
4	RESULTADOS	97
4.1	MONOSOMÍAS Y TRISOMÍAS AUTOSÓMICAS PARCIALES	99
4.2	MONOSOMÍAS Y TRISOMÍAS PARCIALES EN CROMOSOMAS SEXUALES	109
4.3	CROMOSOMAS MARCADORES SUPERNUMERARIOS	118
4.4	REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS “APARENTEMENTE” EQUILIBRADAS	133
4.5	ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS CRÍPTICAS NO CARACTERIZADAS	141
5	DISCUSIÓN	147
5.1	ASPECTOS METODOLÓGICOS DE INTERES	147
5.1.1	M-FISH	147
5.1.1.1	Optimización del protocolo: modificaciones introducidas	147
5.1.1.2	Limitaciones de la M-FISH	148
5.1.1.3	Aplicabilidad de la M-FISH al diagnóstico pre y post-natal	151
5.1.2	CGH	153
5.1.2.1	Optimización del método de extracción de ADN a partir de diferentes tejidos	153
5.1.2.2	Optimización del protocolo de CGH: modificaciones introducidas	154
5.1.2.3	Limitaciones de la CGH	154
5.1.2.4	HR-CGH	157
5.1.2.5	Comparación de perfiles obtenidos por CGH y HR-CGH	159
5.1.2.6	Aplicabilidad de la CGH al diagnóstico pre y post -natal	159
5.2	CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO	166
5.2.1	MONOSOMÍAS PARCIALES AUTOSÓMICAS	166
5.2.1.1	Monosomías parciales por deleción y translocación	166
5.2.1.2	Monosomías parciales por formación de anillos	168
5.2.2	TRISOMÍAS PARCIALES AUTOSÓMICAS	171
5.2.3	CROMOSOMAS MARCADORES SUPERNUMERARIOS	172
5.2.4	ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES	178
5.2.4.1	Anomalías cromosómicas estructurales del cromosoma X	179
5.2.4.2	Anomalías cromosómicas estructurales del cromosoma Y	181

5.2.5	REORGANIZACIONES “APARENTEMENTE” EQUILIBRADAS	184
5.2.5.1	Reorganizaciones cromosómicas crípticas	184
5.2.5.2	Reorganizaciones cromosómicas complejas	186
5.3	ANÁLISIS DE LOS PUNTOS DE ROTURA IMPLICADOS EN LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ANALIZADAS	189
6	CONCLUSIONES	197
7	BIBLIOGRAFIA	201
	ANEXO I	221

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

Las anomalías cromosómicas están implicadas en la aparición de muchas enfermedades hereditarias, siendo también la principal causa de retraso mental y de pérdidas gestacionales. Dichas anomalías cromosómicas se observan en el 0,3%-1% de los nacidos vivos, en el 50% de los abortos espontáneos de primer trimestre y en el 20% de segundo trimestre (Buckton y col., 1985; Queisser-Luft y col., 2002).

Aunque a mitad del siglo XVIII ya era posible visualizar cromosomas al microscopio, no fue hasta 1950, cuando la aparición de nuevas técnicas de cultivo mejoró su visualización al conseguir una máxima condensación y separación (Hsu, 1953). Todo ello permitió la elaboración de cariotipos y por tanto la detección de alteraciones numéricas y estructurales. Si bien, la determinación del número de cromosomas no presentaba dificultad, muchas anomalías estructurales como reorganizaciones equilibradas o pequeñas deleciones pasaban inadvertidas.

Hasta los años 70 se utilizó orceína y otros colorantes con elevada afinidad por la cromatina para teñir uniformemente los cromosomas humanos. Esta tinción permitía la detección de aneuploidías, no obstante, hacía difícil o imposible la detección y posterior caracterización de anomalías cromosómicas estructurales. Desde entonces, se han desarrollado un gran número de técnicas de bandeo, dividiéndose en dos tipos: aquellas que producen un patrón alternativo de bandas a lo largo de todo el cromosoma, creando un patrón único para cada par de cromosomas homólogos y aquellas que tiñen selectivamente una determinada región de algunos o de todos los cromosomas.

La primera técnica de bandeo, bandas Q, se obtuvo con quinacrina (Caspersson y col., 1970). Sin embargo, en la actualidad, dicha metodología no se utiliza habitualmente, ya que este tipo de bandas tienen una corta duración y además para su observación es necesario un microscopio de fluorescencia.

Actualmente, el método de bandeo más usado, conocido como bandas G, se obtiene mediante una digestión enzimática, seguida de una tinción con Giemsa (Drets y Shaw, 1971). Con este método, se obtiene un patrón de 400 bandas para cada genoma haploide si se ha realizado un cultivo estándar y entorno a 850 bandas en el caso de un cultivo de alta resolución. Cada una de estas bandas corresponde aproximadamente a 8.000 Kb de ADN. Las bandas oscuras son regiones ricas en A-T (adenina-timina) de replicación tardía, mientras las bandas claras son regiones ricas en C-G (citosina-guanina) de replicación temprana. Las bandas claras tienen un mayor significado biológico ya que se consideran regiones genéticamente muy activas mientras las bandas oscuras poseen muy pocos genes activos. El patrón de bandas claras y oscuras es específico de cada cromosoma.

Con una resolución de 400-550 bandas, es posible detectar deleciones o duplicaciones de un tamaño superior a 5-8 Mb, mientras que con una resolución de 800 bandas es posible detectar anomalías de 3-5 Mb (Shaffer y col., 2004).

El bandeo reverso, conocido como bandas R, genera un patrón de bandas contrario al de las bandas G, y es especialmente útil para detectar alteraciones en regiones teloméricas al teñir los extremos distales de los cromosomas (Dutrillaux y Lejeune, 1971).

Paralelamente, se han ido desarrollando otras técnicas de bandeo más específico, tales como las bandas C (Sumner, 1972) y las bandas NOR (Matsui y Sasaki, 1973).

Las bandas C tiñen selectivamente la heterocromatina constitutiva. Las bandas C positivas comprenden las regiones alrededor de los centrómeros, que contienen secuencias altamente repetitivas de ADN α -satélite de replicación tardía y las áreas ampliamente polimórficas presentes en los cromosomas 1, 9, 16 y región distal del brazo largo del cromosoma Y. Estas bandas son especialmente útiles para la caracterización de cromosomas dicéntricos (o pseudodicéntricos) y también para la determinación de heterocromatina en cromosomas marcadores.

Las bandas NOR tiñen selectivamente las regiones organizadoras del nucleolo (*Nucleolar Organizer Regions*) localizadas en las regiones tallo (*stalks*) y los satélites de los cromosomas acrocéntricos. Estas regiones contienen RNA de origen ribosomal y se tiñen con nitrato de plata. Teóricamente, hay 10 regiones NOR por célula, una por cada cromosoma acrocéntrico, sin embargo solo se tiñen aquellas que están activas. Las bandas NOR son útiles en la identificación de cromosomas marcadores, reorganizaciones cromosómicas y polimorfismos en los cuales estén involucrados los cromosomas acrocéntricos.

Todas las técnicas de bandeo cromosómico anteriormente descritas, requieren que las células estén en división y detectan anomalías a nivel de una única célula, permitiendo identificar la existencia de heterogeneidad celular (mosaicismos cromosómicos). Los métodos clásicos de bandeo cromosómico han sido durante muchos años la única herramienta para la detección de anomalías cromosómicas tanto numéricas como estructurales. Gracias a todas estas técnicas se han podido identificar muchas anomalías cromosómicas asociadas a diferentes malformaciones congénitas, síndromes o cánceres colaborando eficazmente en la comprensión de la etiología de dichas patologías. Desde su inicio, hacia 1980, las técnicas de citogenética molecular basadas en la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y sus variantes tecnológicas (entre ellas la hibridación genómica comparada y la FISH multicolor) han permitido la detección e identificación precisa de un gran número de anomalías cromosómicas, que hasta ese momento pasaban desapercibidas, como las microdeleciones, las reorganizaciones cromosómicas complejas y las reorganizaciones crípticas. Esta técnica de hibridación se basa en la capacidad de una hebra

sencilla de ADN (sonda), para unirse o hibridar con su secuencia complementaria en la extensión metafásica o interfásica. La sonda se conjuga con nucleótidos modificados que permitirán visualizarla con luz ultravioleta una vez hibridada.

Paralelamente, otras técnicas moleculares han permitido también identificar polimorfismos de ADN en progenitores y en su descendencia, lo cual ha posibilitado la identificación del origen parental del cromosoma implicado en la anomalía (impronta).

En Genética Clínica es fundamental la caracterización precisa de las anomalías cromosómicas para conocer su implicación en la etiología de las diferentes patologías hereditarias. La aplicación combinada de todas estas metodologías de citogenética clásica y molecular se muestra sumamente eficaz en la obtención de un diagnóstico más preciso de las alteraciones genéticas tanto prenatales como postnatales.

1.1 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR

Las alteraciones cromosómicas de un tamaño < 3-5 Mb o las reorganizaciones complejas son muy difíciles de identificar mediante las técnicas de bandas convencionales. Las modernas técnicas de citogenética molecular, basadas en la FISH y que combinan la citogenética convencional con la genética molecular, intentan paliar dicha limitación.

1.1.1 HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE CONVENCIONAL (FISH CONVENCIONAL)

A finales de 1980, las tecnologías de clonaje y el aumento en la sensibilidad de los anticuerpos, facilitaron el rápido desarrollo de las metodologías basadas en hibridación *in situ* fluorescente (FISH), permitiendo así el estudio de células interfásicas y posibilitando una caracterización más precisa de determinadas anomalías cromosómicas.

La FISH es una técnica en la cual cromosomas enteros o porciones de estos son marcados con sondas fluorescentes que reconocen secuencias específicas en cromosomas metafásicos o núcleos celulares fijados. Hoy en día, las técnicas de FISH se encuentran en pleno auge tanto en el campo de investigación básica como en el diagnóstico clínico.

1.1.1.1 Tipos de sondas utilizadas en FISH convencional

Se distinguen cuatro tipos de sondas, en función de las estructuras que son capaces de detectar en el núcleo celular o en metafase: sondas específicas de gen o locus, sondas centroméricas, sondas subteloméricas y sondas de pintado cromosómico.

En la actualidad hay un gran número de sondas comerciales disponibles, ofreciendo todas ellas un resultado rápido y fiable en la caracterización de determinadas anomalías cromosómicas.

1.1.1.1.1 Sondas locus específico

Estas sondas hibridan con una secuencia única de ADN, es decir, son específicas para un locus determinado. Se conocen como sondas LSI (*locus specific identifier*). En función de su diana, tienen un tamaño de 1-10 Kb (plásmidos) o son vectores más largos 80 Kb -1 Mb (*Bacterial artificial chromosomes* -BACs, *Yeast artificial chromosomes*-YACs).

Las sondas de secuencia única permiten detectar reordenamientos estructurales de genes o de regiones cromosómicas concretas e identificar deleciones y duplicaciones submicroscópicas de hasta 3 Mb (Ledbetter y Ballabio, 1995). No obstante, su aplicación requiere conocer *a priori* la región que se desea estudiar (Fig.1a).

1.1.1.1.2 Sondas centroméricas

Identifican los centrómeros, los cuales a pesar de ser prácticamente idénticos para todos los cromosomas, se distinguen en 2-3% de su secuencia, lo que permite que la mayor parte de los centrómeros individuales puedan ser distinguidos a excepción de los centrómeros de los cromosomas 13 y 21, y de los centrómeros de los cromosomas 14 y 22.

Permiten detectar cromosomas concretos e identificar alteraciones de tipo numérico, especialmente monosomías, trisomías y otras aneuploidías en metafases y también en núcleos interfásicos. Se conocen como sondas CEP (*chromosome enumeration probe*) (Fig. 1b).

1.1.1.1.3 Sondas subteloméricas

Son sondas de ADN que identifican regiones cromosómicas próximas a los telómeros, que contienen secuencias únicas que son específicas de cada cromosoma (Fig. 1c). Poseen una alta resolución que varía según la medida de la sonda utilizada (30-100 Kb). Han demostrado ser una herramienta muy útil para la detección de muchas anomalías cromosómicas que implican las regiones teloméricas (Krasprzak y col., 1998). Dicha identificación es importante dado que estas regiones subteloméricas contienen gran cantidad de genes.

1.1.1.1.4 Sondas de pintado cromosómico

Con la sonda de pintado cromosómico simple correspondiente a un determinado cromosoma se consigue pintar sólo los cromosomas homólogos correspondientes, permitiendo así detectar de forma rápida, alteraciones numéricas y estructurales intercromosómicas que afecten a ese cromosoma específico.

Son sondas complejas de ADN, generadas a partir de cromosomas microdisecionados que se amplifican por DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primer-Polymerase Chain Reaction*), se marcan e hibridan con múltiples secuencias del cromosoma, con excepción de las regiones centroméricas y teloméricas (Cremer y col., 1988). Así, tras la hibridación aparece pintado uniformemente todo el cromosoma (Fig. 1d). Estas sondas, también conocidas como sondas WCP (*whole chromosome painting*) sirven fundamentalmente para detectar translocaciones difíciles de identificar con las técnicas de citogenética convencional, así como para identificar el origen de material adicional presente en un cromosoma derivativo o en pequeños marcadores supernumerarios. Si bien se pueden utilizar en interfase, se aconseja su uso sobre metafases.

Los principales inconvenientes de la utilización de estas sondas son la no detección de inversiones paracentroméricas y su baja resolución, que impide detectar pequeñas deleciones, duplicaciones y translocaciones (< 2-3 Mb).

Con el pintado cromosómico múltiple se consigue pintar de forma simultánea todos los cromosomas pero en metafases independientes. Esta variante de FISH se realiza utilizando el *Kit* comercial *Chromoprobe-M Multiprobe System*, (Cytocell Ltd, UK).

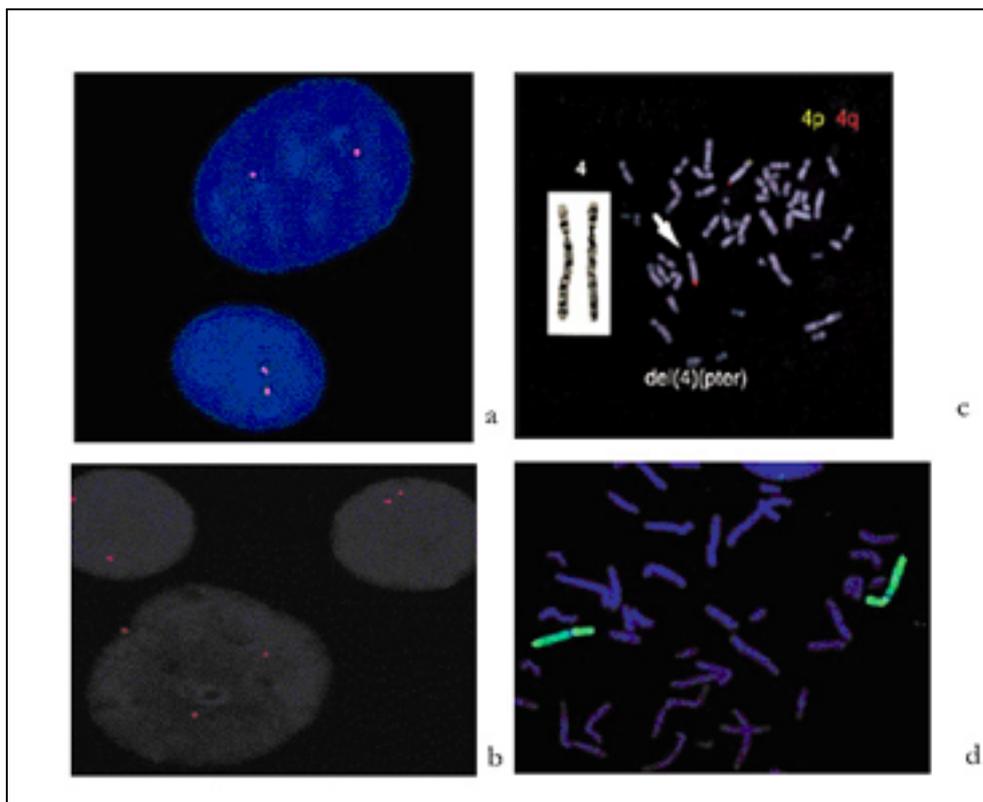


Figura 1. Diferentes tipos de sondas utilizadas en FISH convencional. a) Sonda locus específica con fluorocromo naranja, LSI 13/RB1 (13q14) *SpectrumOrange* (Vysis), b) Sonda centromérica específica del cromosoma 12 en color naranja, CEP 12 *SpectrumOrange* (Vysis), c) Sonda subteloamérica del cromosoma 4p y 4q (Vysis), d) Sonda de pintado del cromosoma 6 en color verde, WCP 6 *SpectrumGreen* (Vysis).

1.1.2 TÉCNICAS DERIVADAS DE LA FISH CONVENCIONAL

Recientemente han aparecido nuevas tecnologías de FISH, que resuelven las carencias de las sondas “convencionales” y aportan una mayor información que permite una completa caracterización del cariotipo. Dichas metodologías comprenden entre otras, la técnica de Hibridación Genómica Comparada (CGH), FISH-*Multicolor* (M-FISH), *Spectral Karyotyping* (SKY), *Multibanding-FISH* (M-BAND) y más recientemente los microchips de ADN. Todas ellas son herramientas muy útiles para su aplicación en diagnóstico citogenético. Sin embargo, hay que tener en cuenta el elevado coste que supone realizar estos análisis, la complejidad de la interpretación de los resultados, las dificultades en la estandarización, el control de calidad y la necesidad de personal especializado para el uso de unas técnicas, que en la mayoría de los casos, no sustituyen a los estudios citogenéticos clásicos sino que los amplían y complementan.

En la Tabla 1 se resumen algunas técnicas de citogenética molecular basadas en FISH, su resolución y el tipo de anomalía cromosómica que detectan, así como las principales ventajas e inconvenientes que presentan.

Tabla 1. Principales ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de FISH

	Ventajas	Inconvenientes
FISH convencional	<p>Permite estudiar anomalías en metafase y en interfase</p> <p>Rapidez</p> <p>Análisis de un gran número de células</p> <p>Alta sensibilidad y especificidad</p> <p>Aplicable a muestras congeladas o con pocas células</p>	<p>Es necesario sospechar de una diana previa</p> <p>Restringido a la disponibilidad de las sondas comerciales</p> <p>Sólo estudia una o pocas alteraciones en un experimento</p> <p>No permite estudiar material en parafina</p>
M-FISH / SKY	<p>Permiten obtener información de todos los cromosomas</p> <p>Muy útiles para descifrar cariotipos complejos y reorganizaciones crípticas</p>	<p>Requieren células en división</p> <p>No detectan alteraciones estructurales intracromosómicas</p> <p>No detectan alteraciones estructurales < 1 Mb</p> <p>No permiten determinar las bandas cromosómicas exactas implicadas en la reorganización</p>
cenM-FISH	<p>Permite estudiar anomalías en metafase y en interfase</p> <p>No requiere competidor de ADN durante la hibridación</p> <p>Tiempo de hibridación corto (0,5-2h)</p> <p>Eficaz en portas bandeados</p>	<p>No permite distinguir los centrómeros de los cromosomas 13 y 21</p> <p>No detecta cromosomas marcadores que no contengan secuencias alfa-satélite</p> <p>No identifica neocentrómeros</p>
CGH/HR-CGH	<p>No requieren células en división</p> <p>Requieren poca cantidad de ADN</p> <p>Permiten estudiar material congelado o en parafina</p> <p>Permiten detectar ganancias y pérdidas de ADN de todo el genoma en un único experimento</p>	<p>No detectan alteraciones citogenéticas equilibradas</p> <p>No dan información de ploidía ni de la localización de las secuencias reorganizadas responsables del cambio en el número de copias</p> <p>No detectan desequilibrios < 3 Mb</p>
CGH - array	<p>Alta resolución (depende del tamaño y el espacio de los clones utilizados en el <i>array</i>)</p> <p>No precisa dianas específicas</p> <p>Detecta desequilibrios 45 Kb-1 Mb</p>	<p>No detecta reorganizaciones equilibradas</p> <p>Detección de falsas anomalías (polimorfismos)</p>

1.1.2.1 Técnicas de FISH multicolor basadas en el uso de sondas de pintado cromosómico

La aplicación rentable de las sondas de FISH convencional requiere un conocimiento o sospecha previa de los *loci* o cromosomas involucrados en la anomalía. Esta limitación queda subsanada por la FISH multicolor (conocida como *multitarget*, *multifluor*, *multicolor*, múltiple-FISH o M-FISH). Desarrollada por Speicher y col., (1996), permite la visualización de todos los cromosomas de una misma metafase, de forma simultánea, pintando cada pareja de cromosomas homólogos de un color distinto, es decir, permite el análisis directo de todos los cromosomas en un único experimento de FISH (Fig. 2a).

La técnica de citogenética molecular múltiple-FISH (M-FISH) emplea simultáneamente un cóctel de 24 sondas de pintado cromosómico que hibridan todos los cromosomas de una misma metafase, permitiendo una rápida identificación de las 22 parejas homólogas de autosomas y los cromosomas sexuales. Se obtiene un cariotipo en colores que permite detectar y clasificar, de forma rápida, alteraciones numéricas y estructurales inter cromosómicas que provocan un cambio en el patrón característico de pintado de cada cromosoma.

El cóctel de sondas de 24 colores que se utiliza habitualmente es comercial. Para la obtención de estos cócteles se siguen protocolos específicos en la extracción y marcaje del ADN. El método de extracción de ADN más utilizado se basa en *kits* de columnas con resinas, con los que se obtiene un ADN de gran pureza. Una vez obtenido el ADN se marca con una gran variedad de fluoróforos y sistemas de marcaje (*nick translation*, DOP-PCR o *random primer*).

La M-FISH mejora la eficacia de otras técnicas de FISH convencional multicolor, como la Multiprobe, ya que a diferencia de ésta, permite la visualización de todas las sondas de pintado cromosómico en una misma metafase simultáneamente, y en una única hibridación, agilizando así el análisis. Además requiere una menor cantidad de muestra. Esta técnica permite la rápida identificación de translocaciones e inserciones crípticas y/o complejas, aneusomías y cromosomas marcadores.

Paralelamente, Schröck y col., (1996) desarrollaron una metodología similar a la M-FISH, que permitía obtener el denominado cariotipo espectral (*Spectral Karyotyping*, SKY). Ambas técnicas tienen una resolución ~1 Mb (Schröck y col., 1996; Jalal y Law, 1999). La diferencia entre ambas técnicas radica en el modo de adquisición y análisis de las imágenes. Mientras la M-FISH utiliza filtros ópticos específicos para la captura de cada fluorocromo en particular, el SKY, haciendo uso de un interferómetro, realiza una interpretación basándose en el espectro *píxel a píxel* a lo largo de todo el cromosoma.

En la técnica de M-FISH, se realiza un análisis digital de las imágenes adquiridas separadamente para cada uno de los cinco fluorocromos, usando una cámara CCD (*charge couple device*). Estas imágenes son analizadas por un *software* específico, generando una imagen compuesta, en la cual cada cromosoma es pseudocoloreado en función de su combinación de fluorocromos.

El SKY combina el uso de una cámara CCD con la espectroscopía de Fourier. Un interferómetro origina un espectro fluorescente según las longitudes de onda de cada *píxel* a lo largo de cada cromosoma y un *software* prediseñado, aplica una clasificación algorítmica y como resultado se obtiene la imagen de los 24 cromosomas pseudocoloreados.

Cada uno de estos sistemas cuenta con sus ventajas y desventajas. Mientras la técnica de SKY requiere una única exposición a la luz fluorescente, la M-FISH requiere una secuencia de imágenes, adquiridas mediante el cambio de los filtros ópticos específicos para cada fluorocromo, que posteriormente son alineadas, de forma que coincidan en el espacio las distintas capturas. Este último procedimiento, al realizar capturas separadas para cada fluorocromo, permite ajustar los parámetros del *software* al resultado de cada experimental en concreto (variando los tiempos de exposición a la luz fluorescente de uno o determinados fluorocromos). La principal desventaja del SKY, es que tras una única pero larga exposición a la luz fluorescente (aproximadamente 1 minuto), los fluorocromos pueden llegar a perder su intensidad.

Estas técnicas tienen la gran ventaja de combinar la sensibilidad de la FISH con una visión global de las alteraciones cromosómicas presentes en un único experimento (característica del análisis citogenético convencional). Sin embargo, estas tecnologías no permiten el reconocimiento de algunos puntos de rotura, como aquellos asociados con deleciones, inserciones, y translocaciones de pequeño tamaño (inferiores a 500-1.500 Kb), para los cuales es necesario utilizar sondas locus específico.

1.1.2.2 Otras técnicas más recientes basadas en FISH multicolor

En los últimos años han ido apareciendo técnicas de FISH multicolor más específicas que permiten la visualización de determinadas regiones cromosómicas de una misma metafase de forma simultánea.

1.1.2.2.1 FISH multicolor centrómero específica (cenM-FISH)

La FISH multicolor centrómero específica (cenM-FISH o CM-FISH) es una variante de FISH multicolor que utiliza un cóctel específico de sondas y permite la visualización simultánea de los centrómeros de cada pareja de cromosomas homólogos en un color distinto y en una misma metafase (excepto los centrómeros de los cromosomas 13/21). Así los cromosomas pueden ser

identificados a partir del color de su centrómero, obtenido de la combinación de uno a cinco fluorocromos (Fig. 2b).

Descrita a principios de este siglo (Nietzel y col., 2001; Henegariu y col., 2001), la cenM-FISH utiliza simultáneamente sondas formadas por secuencias repetitivas de regiones alfa-satélite de los cromosomas humanos, específicas de regiones cromosómicas centroméricas. Es una técnica muy útil para la detección de determinadas anomalías, como aneuploidías y para la identificación de cromosomas marcadores. Debido a la naturaleza repetitiva de las sondas el tiempo de hibridación es corto, generalmente inferior a una hora y el análisis puede realizarse con un *software* de FISH multicolor.

Paralelamente, se ha desarrollado una variación de la técnica que permite hibridar sobre interfases (iCM-FISH) (Henegariu y col., 2001). A diferencia de la cenM-FISH, en la cual se marcan las sondas centroméricas humanas por marcaje combinatorio, se mezclan todas juntas y se hibridan sobre una misma preparación, en la iCM-FISH las sondas centroméricas se dividen en tres grupos que se hibridan sobre tres áreas independientes de la misma preparación.

Entre sus ventajas destacan que no requiere un competidor de ADN durante la hibridación y que se observan señales muy intensas a partir de pequeñas cantidades de ADN marcado. Además puede llevarse a cabo sobre portaobjetos previamente bandeados.

1.1.2.2.2 FISH multicolor telómero específica (telM-FISH)

La identificación de reorganizaciones de un tamaño y patrón de bandas parecido resulta difícil o imposible mediante bandas G. La M-FISH puede ser muy útil en estos casos, sin embargo, cuando las regiones cromosómicas reorganizadas son regiones subteloméricas, esta se encuentra limitada, ya que frecuentemente las regiones subteloméricas están poco representadas en las sondas de pintado cromosómico, observándose un marcaje débil en estas zonas.

En 1997, Knight y col., describieron una técnica en la cual subdividiendo el portaobjetos en 24 campos de hibridación era posible visualizar las regiones subteloméricas de todos los cromosomas humanos sobre metafases diferentes de una misma preparación, pero para ello eran necesarias 24 hibridaciones independientes. En el año 2000, Granzow y col., publican una técnica que permite (usando 3 baterías de sondas) colorear las regiones distales de ocho pares de cromosomas distintos en una única hibridación, reduciendo por tanto el número de hibridaciones a tres (Fig. 2c). Poco después, Brown y col. (2001) redujeron el número de hibridaciones a 2 permitiendo el análisis simultáneo de los telómeros de 12 cromosomas. Finalmente, Henegariu y col., (2001b) consiguieron el análisis simultáneo de todos los telómeros tras una única hibridación multicolor. Esta técnica se basa en la utilización de una batería de

sondas que incluye 41 clones cosmid/PAC/P1 localizados a 100 Kb-1 Mb del extremo de los cromosomas.

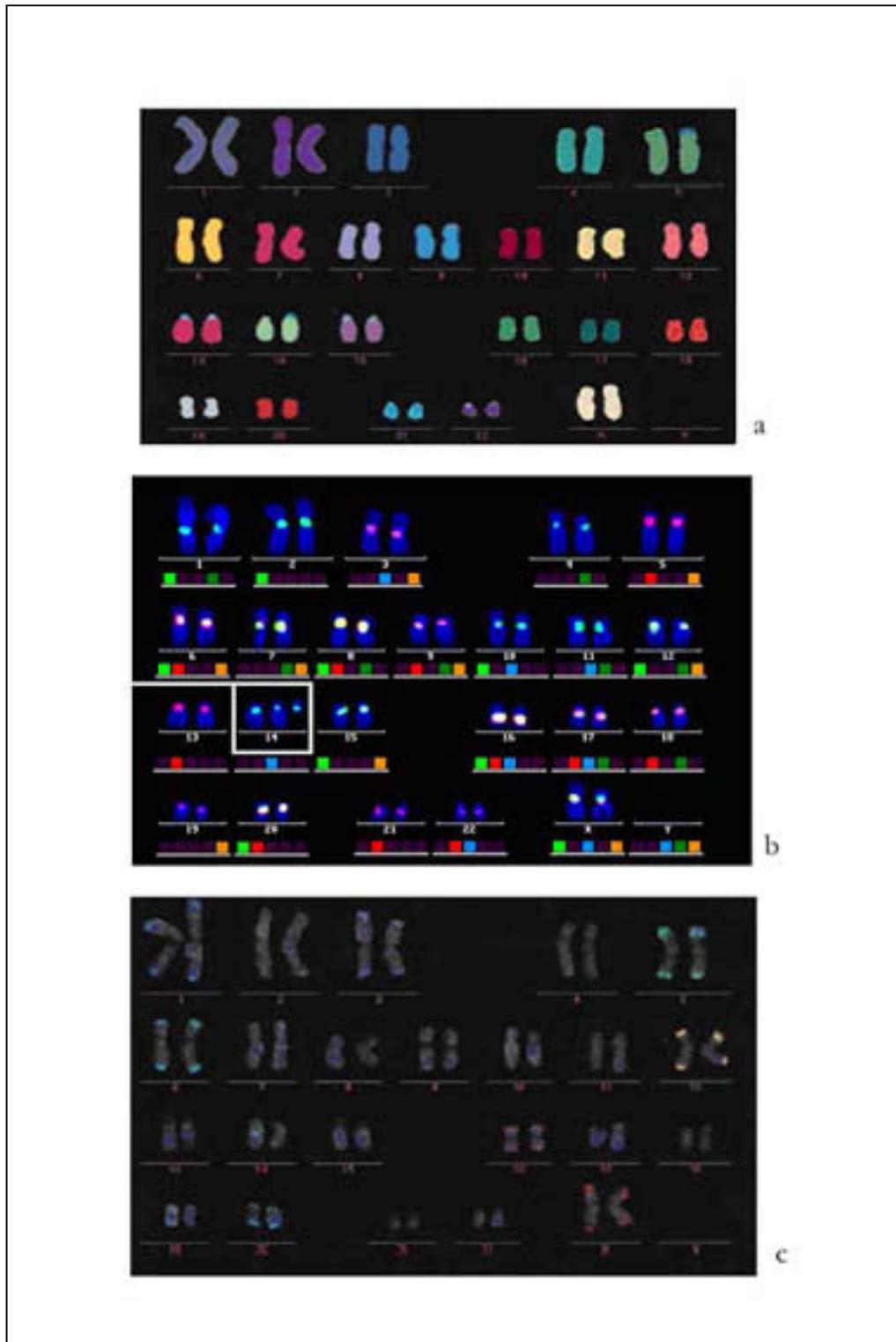


Figura 2. Técnicas de FISH multicolor. a) Múltiple-FISH; b) FISH multicolor centrómero específica (Nietzel y col., 2001); c) FISH multicolor subtelómero específica (Henegariu y col., 2001b).

1.1.2.2.3 FISH multicolor específica de cromosomas acrocéntricos (AcroM-FISH)

Contiene una mezcla de sondas centroméricas y de pintado cromosómico para todos los cromosomas acrocéntricos: 13/21, 14/22 y 15 y una sonda específica para rADN, todas ellas marcadas con una combinación específica de fluorocromos (Fig. 3a). Sin embargo, esta técnica no permite distinguir cromosomas marcadores originados por centrómeros 13/21 o 14/22 de contenido únicamente heterocromático. Desarrollada a mitades de 2001 (Langer y col.), esta técnica es capaz de identificar el 80% de los cromosomas marcadores.

1.1.2.2.4 FISH multicolor específica de brazos cromosómicos (Chromosome arm-specific M-FISH)

Esta variante de la M-FISH permite la detección de anomalías cromosómicas con un nivel de resolución de brazos cromosómicos. Desarrollada por Karhu y col. (2001), esta M-FISH de 42 colores es un *kit* formado por una batería de sondas que pintan de colores distintos los brazos p y q de los cromosomas humanos con la excepción del brazo p de los cromosomas acrocéntricos y del cromosoma Y. Esta técnica se lleva a cabo en 2 pasos, en primer lugar se realiza una M-FISH convencional y a continuación se aplica un *kit* que permite averiguar cuales son los brazos cromosómicos involucrados (Fig. 3b).

1.1.2.2.5 RX-FISH

La técnica de “*cross species color banding*” (RxFISH) descrita por Muller y col. (1998), es similar a la M-FISH o al SKY pero genera un patrón de bandas de distintos colores para cada par de cromosoma homólogos (Fig. 3c). Dicha metodología se basa en las homologías genómicas que existen entre la especie humana y diferentes especies de primates. La ventaja que ofrece respecto a la M-FISH y el SKY es que permite la identificación de alteraciones estructurales dentro de un mismo cromosoma (reorganizaciones intracromosómicas) y en que los puntos de rotura de los posibles reordenamientos pueden ser localizados con mayor exactitud. Así mismo, permite caracterizar cariotipos complejos y cromosomas derivativos o marcadores no identificables con las técnicas de bandas G; no obstante, tiene la misma limitación que la M-FISH y el SKY, es decir, requiere la obtención de células en división. Esta técnica no detecta alteraciones estructurales menores de 500-1500 Kb.

1.1.2.2.6 Bandeo multicolour (High resolution multicolour Banding (M-BAND))

Descrita por Chudoba y col. (1999) permite la diferenciación de regiones cromosómicas específicas a nivel de banda cromosómica. Se basa en ensayos individuales para cada par de cromosomas homólogos, permitiendo detectar inversiones y reorganizaciones intracromosómicas. Independientemente de la condensación cromosómica, la resolución, obtenida hoy día con esta técnica es de 500 bandas (Fig. 3d).

Esta técnica facilita el mapaje de los puntos de rotura y permite identificar inversiones pericéntricas y paracéntricas, sin embargo, en general, no detecta microdeleciones.

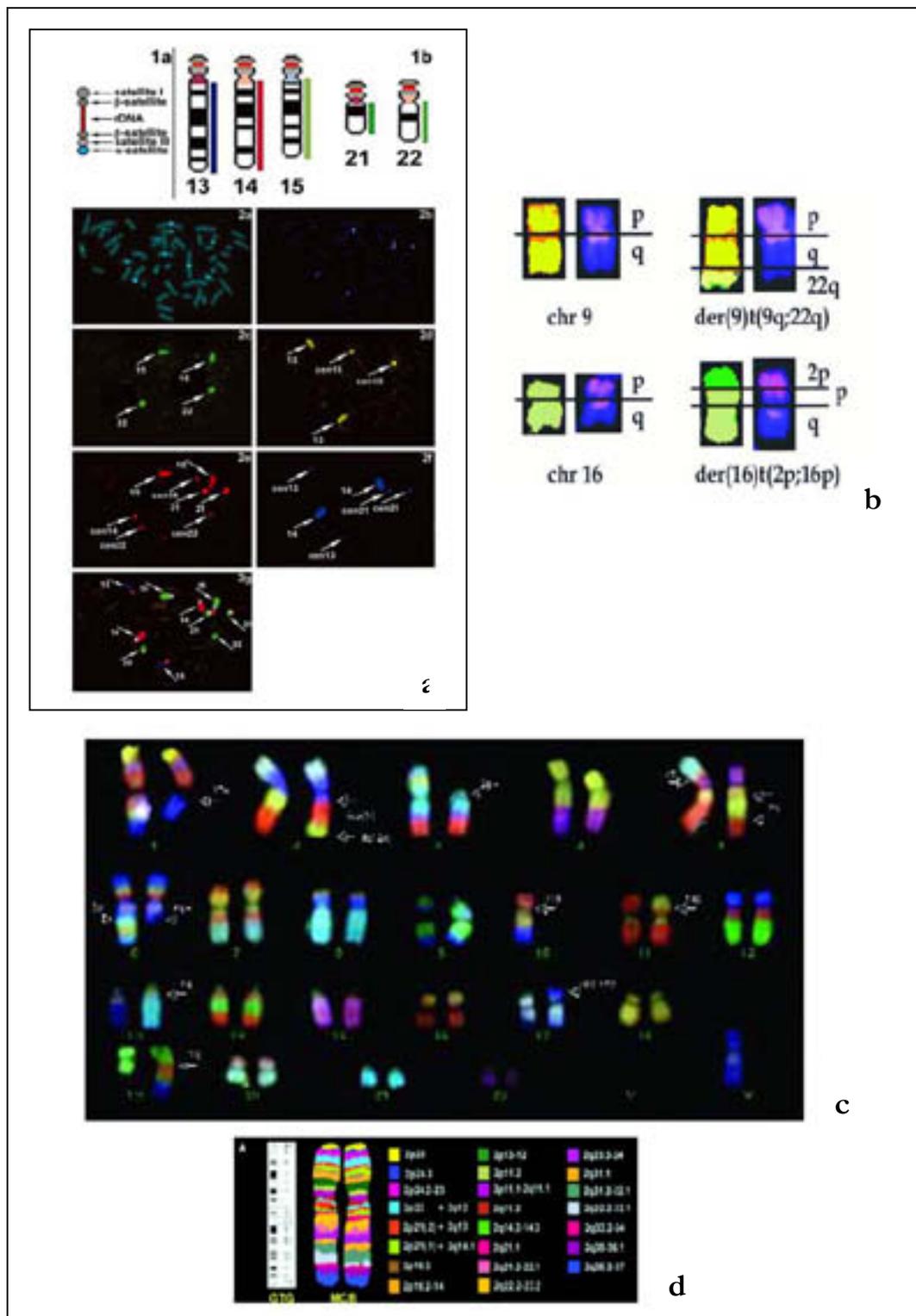


Figura 3. Técnicas de FISH multicolor. a) Acro-MFISH (Langer y col., 2001), b) Chromosome specific arm FISH (Karhu y col., 2001), c) RX-FISH (Espinet y col., 2004) d) M-BAND (Weise y col., 2002).

1.1.2.3 Hibridación genómica comparada (CGH)

La técnica de CGH permite el rastreo de desequilibrios globales presentes en el genoma en una única hibridación y sin necesidad de obtener células en división (Kallionemi y col., 1992). Ha sido la primera técnica combinada de citogenética e hibridación *in situ* fluorescente que ha permitido realizar un análisis global del genoma. Aunque inicialmente se describió como una valiosa técnica para el análisis de desequilibrios en el número de copias de ADN en tumores (Kallionemi y col., 1994; James, 1999; Gray y Collins, 2000), en la actualidad es de gran utilidad para el análisis de desequilibrios cromosómicos constitucionales a partir de cualquier tipo de muestra.

Básicamente, la técnica consiste en marcar los ADNs genómicos de la muestra problema y de un individuo control con fluorocromos distintos y cohibridarlos en presencia de ADN Cot-1 sobre una preparación cromosómica de un individuo normal. Las señales fluorescentes son detectadas y analizadas mediante análisis digital haciendo uso de un *software* específico (Fig. 4). De este modo podemos analizar las regiones de copia única de cada cromosoma. A partir del análisis de un mínimo de 10-12 metafases se obtiene el valor promedio y se generan los perfiles de ganancias y pérdidas (por encima del umbral 1.25 se considera ganancia y por debajo del 0,75 pérdida).

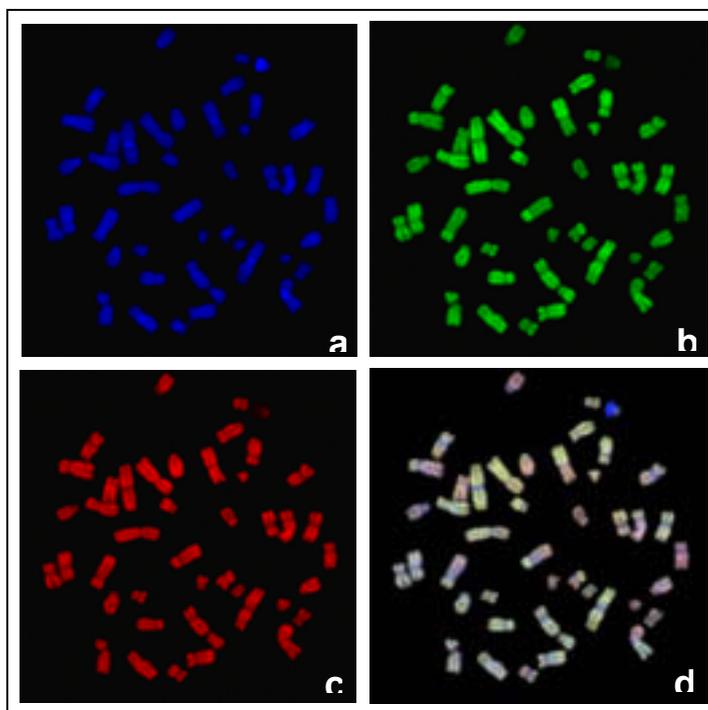


Figura 4. Imágenes secuenciales de una metafase capturadas mediante la cámara de microscopio fluorescente dotado de filtros para: a) fluoresceína (verde), b) rodamina (rojo) y c) DAPI (azul). La normalización del cociente entre el color verde/rojo por el *software* de CGH permite detectar los desequilibrios del genoma (d)

Con esta técnica pueden detectarse un amplio rango de desequilibrios del genoma, incluyendo duplicaciones y deleciones a nivel de banda o sub-banda cromosómica en una única hibridación y con muy poca cantidad de ADN (200 ng-1 µg). Si bien algunos autores (Joos y col., 1993) han podido detectar con esta técnica amplificaciones de hasta 2 Mb, en general se acepta que la sensibilidad de este método para la detección de ganancias y pérdidas oscila entre 10-20 Mb (Bentz y col., 1998). La ventaja principal de la aplicación de esta técnica es la identificación de pequeños desequilibrios genéticos sin la necesidad de obtener metafases.

Entre las limitaciones que presenta esta técnica destaca la imposibilidad de detectar anomalías cromosómicas equilibradas (como translocaciones o inversiones) o aquellas que afectan a regiones pericentroméricas, teloméricas o ricas en heterocromatina (Kallioniemi y col., 1994). También hay problemas de identificación en aquellos casos en los que el desequilibrio cromosómico se presenta como un mosaicismo inferior al 30 % (Lomax y col., 1998; Lestou y col., 1999). Estas limitaciones evidencian la necesidad de combinar la utilización de la CGH con las técnicas citogenéticas clásicas y FISH.

Las principales ventajas e inconvenientes de esta técnica se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Ventajas e inconvenientes de la técnica de CGH

Ventajas	Inconvenientes
No requiere células en cultivo	No permite detectar reorganizaciones cromosómicas equilibradas
Precisa muy poca cantidad de ADN (200 ng-1 µg)	No permite detectar los niveles de ploidía (haploide, triploide, tetraploide)
Es posible el análisis de una única célula, tras una amplificación mediante DOP-PCR o PCR inespecífica	No permite la identificación de mosaicos inferiores al 30%
Permite el análisis de grupos celulares obtenidos por microdissección	No detecta desequilibrios cromosómicos <10-20 Mb
Permite el análisis de muestras frescas y parafinadas	Presenta regiones conflictivas: regiones centroméricas, teloméricas, regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9, 16 e Y, y los cromosomas 19 y 22
	La localización exacta de la anomalía no es siempre posible debido a la limitación de resolución espacial (estiramiento no lineal de los cromosomas y longitud variable de estos)

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

Tal como se ha comentado anteriormente, la CGH alcanza una resolución similar a la citogenética convencional de alta resolución. La modificación del *software*, CGH de alta resolución (HR-CGH), ha permitido aumentar dicha resolución pudiendo identificar desequilibrios cromosómicos de hasta 3 Mb (Kirchhoff y col., 1999).

En la HR-CGH, las anomalías son detectadas en base a la utilización de un intervalo dinámico de referencia estándar creado a partir de la media del análisis de 15-20 casos control. Este intervalo es especialmente amplio en aquellas regiones donde los valores de CGH son generalmente conflictivos. Así se obtiene un perfil característico para cada cromosoma, el cual se desvía en algunas regiones cromosómicas sin por ello representar un desequilibrio cromosómico.

Se considera que una región cromosómica esta en desequilibrio cuando el intervalo de los perfiles obtenidos a un nivel de confianza del 99,5% o 99,9%, en función del número de metafases analizadas, no se sobrepone con el intervalo dinámico de referencia estándar.

La técnica de HR-CGH se aconseja como estudio de rutina en individuos dismórficos con retraso mental y cariotipo normal y es probable que contribuya a la definición de nuevos síndromes por microdelección o microduplicación.

1.1.3 OTRAS TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR

1.1.3.1 Hibridación genómica comparada en micromatrices (CGH-array)

En los últimos años, se han ido obteniendo clones derivados de cromosomas humanos (BAC/PAC) que colocados en portaobjetos de vidrio dan lugar a matrices o “*arrays*” permitiendo el análisis de cromosomas enteros (Albertson y col., 2003; Bruder y col., 2001), de porciones de cromosomas (Yu y col., 2003), de regiones específicas (p.ej. regiones subteloméricas; Veltman y col., 2003) y del genoma entero (Snijders y col., 2001; Veltman y col., 2003; Vissers y col., 2003).

Los *microarrays* o micromatrices genómicos han sido diseñados para su aplicación en CGH (Solinas-Toldo y col., 1997; Pinkel y col., 1998), mejorando la resolución de la CGH convencional y la HR-CGH, ofreciendo así la posibilidad de valorar la presencia de ganancias y/o pérdidas submicroscópicas en todo el genoma.

Los *microarrays* de CGH se basan en el mismo principio de una CGH convencional pero los cromosomas metafásicos son sustituidos por fragmentos de ADN clonados (100-200 Kb), de los cuales se conoce su localización exacta. Puede tratarse de cromosomas artificiales de

bacterias (*BAC-array*) pero también se utilizan como dianas de hibridación: secuencias generadas por PCR, clones cADN y oligonucleótidos. La relación (*ratios*) entre los dos genomas marcados se compara en imágenes computerizadas mediante un *software* específico.

El *CGH-array* de todo el genoma da un único perfil en el que se representan todos los cromosomas. Sin embargo, tiene una limitación importante, ya que si las deleciones no se encuentran localizadas en un clon determinado no se detectan.

Esta técnica posee una elevada resolución, de 45 Kb a 1 Mb, dependiendo de la densidad del *array*, limitada únicamente por la distancia entre los clones inmovilizados en el *array* y su medida, y se lleva a cabo con una sencilla hibridación de 16-18 h. y sin requerir ningún conocimiento *a priori* de la región genómica involucrada (Fig. 5). La utilización de BACs (>8000 BACs, asociados a dianas conocidas) permite asociar directamente las alteraciones detectadas a marcadores genéticos/genómicos y por lo tanto a regiones cromosómicas muy específicas (Cheung y col., 2001).

Los *arrays* de oligonucleótidos pueden llegar a un nivel de resolución de gen permitiendo la detección de mutaciones producidas por deleciones y duplicaciones a nivel de bases (Salman y col., 2004).

Esta técnica es una de las más prometedoras ya que proporciona el denominado “cariotipo molecular”. El *CGH-array* ofrece varias ventajas respecto a la citogenética convencional y a la FISH ya que, además de no requerir cultivo celular, no precisa tampoco una diana y posee una alta resolución, sensibilidad y rapidez. Sin embargo, al igual que la CGH no permite detectar alteraciones equilibradas.

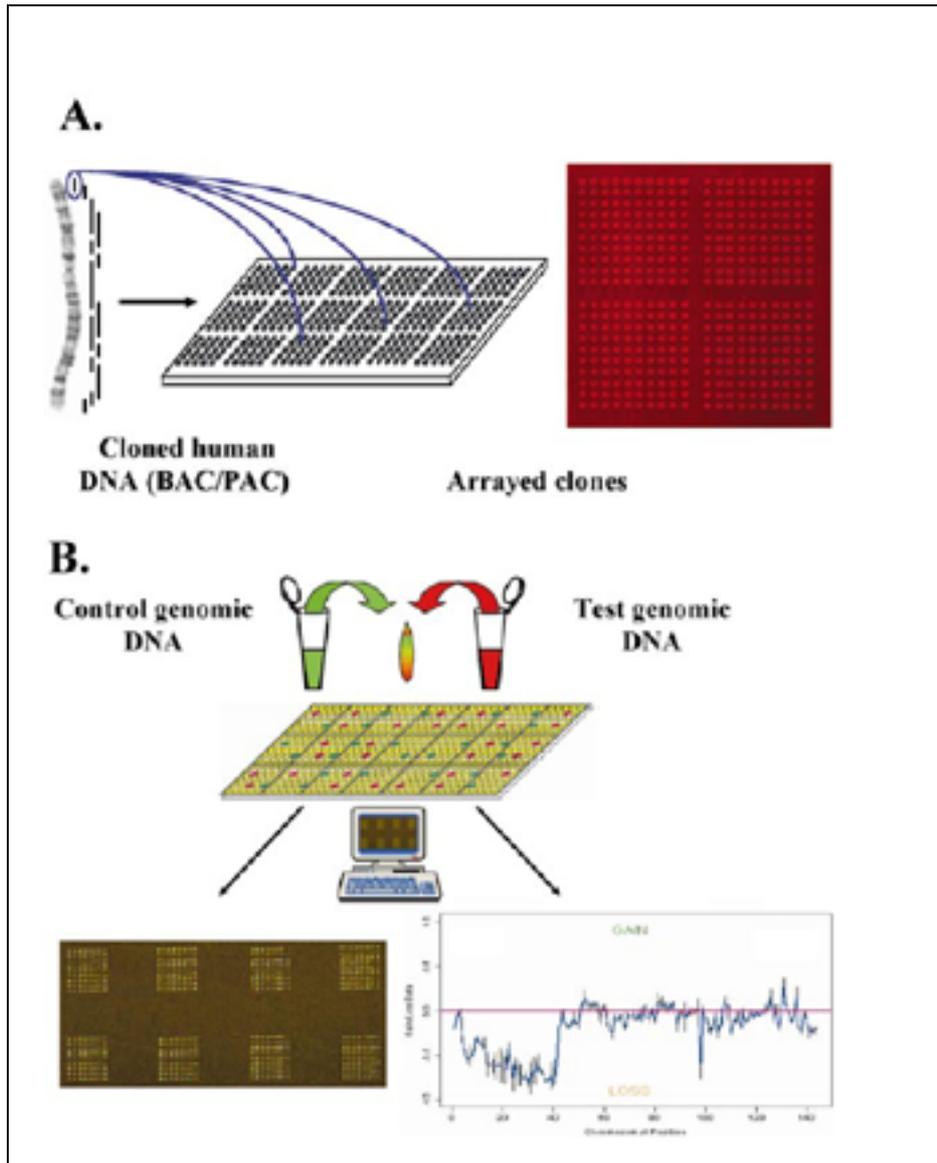


Figura 5. A) Clones derivados de cromosomas humanos introducidos en un portaobjetos de vidrio (seriados). El *array* se tiñe para mostrar la morfología y localización de cada pocillo de ADN clonado. B) Las muestras de ADN genómico procedentes de un individuo control (izquierda) y del paciente (derecha) se marcan con dos fluorocromos distintos, se mezclan y se introducen en el microarray. Tras la hibridación podemos observar en la imagen computerizada un color amarillo en aquellos pocillos en los que hay clones que se encuentran en igual cantidad en el paciente y en el individuo control. Aquellos clones no presentes en el ADN del paciente se observaran en color verde y aquellos clones que se encuentran en exceso se observaran en color rojo. En el gráfico se reflejan las diferencias de dosis, visualizándose una desviación de cero. (Shaffer y Bejjan, 2004).

1.1.3.2 PCR Cuantitativa Fluorescente

La técnica denominada PCR Cuantitativa Fluorescente (*Quantitative Fluorescent PCR* o QF-PCR) permite un diagnóstico rápido de aneuploidías utilizando la amplificación por PCR de secuencias de ADN altamente polimórficas, conocidas como microsatélites (Mansfield, 1993). Estas secuencias altamente polimórficas denominadas STRs (*Short Tandem Repeats*) están constituidas por dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos que se repiten varias veces. Los STRs se pueden analizar mediante amplificación por PCR ya que la mayoría de los individuos presentan, en un determinado locus, dos alelos con un número de repeticiones diferente (heterocigotos), que pueden ser separados por tamaño mediante electroforesis.

La QF-PCR se basa en el principio de que durante la fase exponencial de amplificación se genera una cantidad de producto que es directamente proporcional a la cantidad presente inicialmente en la muestra (PCR cuantitativa). La incorporación de una molécula fluorescente en la reacción de amplificación permite una medición exacta de la cantidad del producto amplificado mediante un secuenciador automático de ADN, con ello es posible determinar el número de copias de cada cromosoma analizado. Así, en una muestra heterocigota normal los dos alelos producen dos productos con la misma fluorescencia es decir presenta patrones resultantes de la electroforesis caracterizados por dos picos de fluorescencia con relación de 1:1, las muestras monosómicas presentan un único pico mientras las muestras trisómicas presentan tres picos con relación 1:1:1 o dos picos con relación 2:1 (Adinolfi y col., 1997) (Fig. 6).

Gracias a esta técnica, aplicada frecuentemente en diagnóstico prenatal, se pueden detectar las aneuploidías totales (y algunas trisomías y monosomías parciales) de los cromosomas 21, 13, 18, X e Y de forma rápida, fácil y sin necesidad de realizar cultivos celulares (Pertl y col., 1999; Cirigliano y col., 2001; 2002; 2004; Brun y col., 2004). Sin embargo, esta técnica no detecta anomalías cromosómicas en mosaico por debajo del 30%.

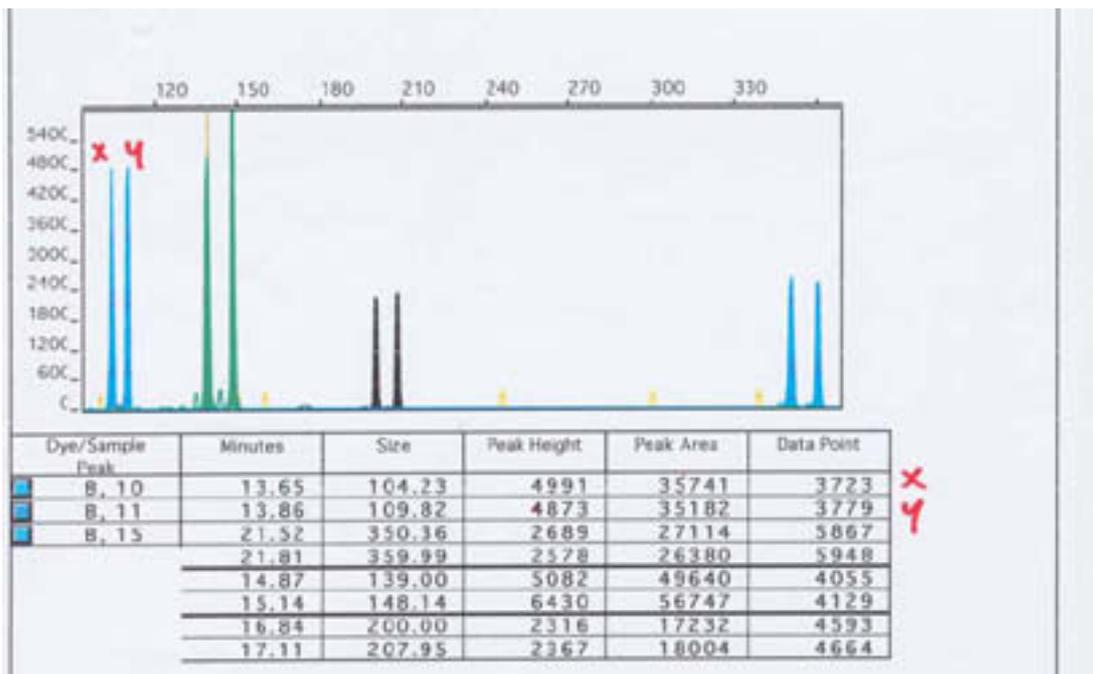


Figura 6. Electroforetograma de QF-PCR donde no se observan aneuploidías (proporción 1:1) para los cromosomas sexuales X,Y (picos en azul de la izquierda), ni para los autosomas 18 (picos en verde), 13 (picos en negro) y 21 (picos en azul de la derecha). Imagen cedida por Vincenzo Cirigliano.

1.1.3.3 Estudio molecular para la detección de disomías uniparentales.

En algunos genes la expresión fenotípica difiere según sea el alelo que se exprese de origen paterno o materno, ya que pueden expresarse preferencialmente, al menos durante el desarrollo temprano. Si el alelo perdido en una delección es el que normalmente se encuentra activo, el gen resultará funcionalmente ausente, aunque la otra copia se encuentre presente. Este fenómeno se conoce como *imprinting* o impronta genómica (Moore y Haig, 1991; Constanza y col., 1998). Los genes con impronta están metilados en algunas regiones CpG, sugiriendo que la metilación puede estar involucrada en la supresión de la actividad de las regiones con impronta.

Los efectos del *imprinting* se conocieron en humanos a través del estudio de individuos afectados de Fibrosis Quística que tenían además un retraso severo en el crecimiento y desarrollo. Se descubrió que habían heredado la mutación del gen de la Fibrosis Quística, junto con otros genes del cromosoma 7, sólo de uno de sus padres. Este fenómeno se conoce como disomía uniparental. Se cree que la disomía uniparental se debe a la pérdida de un cromosoma de un estado trisómico. Si las copias restantes provienen del mismo progenitor resulta un estado de disomía uniparental, que puede tener consecuencias fenotípicas, si el cromosoma incluye genes con impronta (Hall 1990; Ledbetter y Engel, 1995).

Los efectos del *imprinting* también pueden detectarse en síndromes debidos a microdelección. El síndrome de Prader-Willi y el de Angelman son enfermedades diferentes asociadas con deleciones en la misma región del cromosoma 15. Si la deleción ocurre en el 15 paterno el fenotipo da lugar al síndrome de Prader-Willi, mientras que si la deleción tiene lugar en el cromosoma 15 materno, el resultado es un fenotipo característico de síndrome de Angelman. En algunos pacientes con estos síndromes, no se observa deleción, pero en cambio se detecta la presencia de disomía del cromosoma 15 paterno en el caso de expresar un fenotipo de Angelman y disomía del 15 materno si el fenotipo corresponde a Prader-Willi; lo que sugiere la presencia de genes con impronta en esta región, algunos de los cuales se expresan en el cromosoma 15 paterno y otros en el 15 materno (Nicholls y col., 1989; Malcom y col., 1991; Mascari y col., 1992).

En los portadores de translocaciones e inversiones la probabilidad de presentar disomía uniparental es baja, pero no ocurre lo mismo en el caso de individuos portadores de translocaciones Robertsonianas cuando intervienen dos cromosomas imprintados (como el 14 o 15) en los que existe un riesgo mayor (Robinson y col., 1993).

Básicamente, la técnica consiste en estudiar la segregación de marcadores polimórficos en el paciente y en sus progenitores y las diferencias en el patrón de metilación (Lerer y col., 1994).

En resumen, todas las técnicas descritas son útiles. La información cromosómica proporcionada por la FISH, CGH o la QF-PCR, entre otras, se considera parcial, y por consiguiente debe ser completada y confirmada mediante el análisis del cariotipo obtenido mediante bandas G. Así pues las técnicas citogenéticas convencionales y las moleculares no son excluyentes, sino complementarias.

1.2 APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES CONSTITUCIONALES

El intercambio de material genético entre cromátidas hermanas y/o cromosomas homólogos es un fenómeno que ocurre normalmente en las células somáticas y germinales. Estos intercambios aseguran la mezcla del *pool* génico, pero cuando se dan de forma errónea son la causa de la aparición de anomalías cromosómicas estructurales.

Teniendo en cuenta, que teóricamente las roturas cromosómicas pueden ocurrir en cualquier punto del genoma humano y que los cromosomas afectados pueden recombinar de infinitas maneras, el número potencial de reorganizaciones resultantes es inmenso, no obstante en la práctica, se ha observado que existen ciertas regiones genómicas (p.ej. secuencias de ADN repetitivo o puntos frágiles) con mayor propensión a sufrir reorganizaciones que otras (Warburton D, 1991; Cohen y col., 1996; Glover, 1998; Arlt y col., 2003; Matsuyama y col., 2004).

Cuando la anomalía cromosómica estructural presente en un individuo se debe a un error meiótico (producido en la gametogénesis de uno de sus progenitores) todas sus células presentan dicha alteración y el individuo es portador de una anomalía cromosómica “homogénea”, mientras que si la anomalía es debida a un error mitótico post-concepción, el individuo presenta células normales y células con la anomalía cromosómica, siendo portador de una anomalía cromosómica “en mosaico”.

Las anomalías cromosómicas estructurales se clasifican en dos grupos principales: equilibradas y desequilibradas. Están presentes en el 4.3% y el 4% de los nacidos vivos respectivamente (Gardner y Sutherland, 1996). Las anomalías cromosómicas equilibradas no conllevan una ganancia o pérdida de material genético apreciable y en general los portadores presentan un fenotipo normal (90-95% de los casos). Por el contrario, las anomalías cromosómicas desequilibradas tienen como consecuencia la ganancia o pérdida de material genético y los portadores presentan con frecuencia un fenotipo anormal. En la tabla 3 se detallan los riesgos asociados a diferentes tipos de anomalías cromosómicas estructurales.

Tabla 3. Frecuencia de las diferentes anomalías cromosómicas estructurales y riesgos asociados en el individuo portador de la anomalía y en su descendencia.

Anomalía cromosómica	Frecuencia	Riesgo propio ¹	Riesgo de descendencia con fenotipo anómalo ²
<u>Cromosoma en anillo</u>	0,03-0,016 ‰	?	?
<u>Cromosoma marcador</u>	0,14-0,72 ‰	13%	?
<u>Delección</u>	0,14 ‰	?	—
<u>Duplicación</u>	0,14 ‰	?	—
<u>Inserción</u>	0,02 ‰	?	10-50%
<u>Inversión</u>	pericéntrica	0,12-0,7 ‰ *	5-10 ‰
	paracéntrica	0,1-0,5 ‰ *	0,1-0,5%
<u>RCC</u>	de novo	Muy baja	90%
<u>Translocación</u>			
desequilibrada			
equilibrada	recíproca	0,2 ‰	6-9 ‰
	robertsoniana	0,1 ‰	3,7 ‰

RCC, Reorganización cromosómica compleja. ¹ Riesgo estimado según Warburton 1991. ² Riesgo estimado según Gardner y Sutherland, 1996. * Frecuencia estimada excluyendo variantes polimórficas

1.2.1 CARACTERIZACIÓN DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS CRÍPTICAS

Diferenciar entre una anomalía cromosómica equilibrada y una desequilibrada resulta muchas veces imposible si tan sólo se dispone de las técnicas de citogenética convencional. La aparición de nuevas técnicas de citogenética molecular, que combinan técnicas de genética molecular con las de citogenética convencional, ha permitido un gran avance en la detección e identificación de muchas de estas anomalías. Algunas de estas técnicas de citogenética molecular son la hibridación *in situ* fluorescente convencional (FISH), la FISH multicolor (M-FISH) y la hibridación genómica comparada (CGH).

En estos últimos años la mejora de las técnicas de citogenética molecular ha mostrado que las reorganizaciones cromosómicas crípticas son una causa significativa de retraso mental. El

retraso mental profundo tiene una etiología conocida en el 50% de los casos, desconocida pero con una base clínica (p.ej. epilepsia) en el 30% de los casos, y totalmente desconocida en el 20% restante. El retraso mental medio tiene causa genética en el 5-10% de los casos, de los que un 10% de los casos se asocia a un síndrome genético conocido.

La aplicación de nuevas técnicas de citogenética molecular (HR-CGH y FISH con sondas subteloméricas) ha mostrado en individuos con retraso mental y dismorfías que presentaban inicialmente un cariotipo normal (Ness y col., 2002; Kirchhoff y col., 2004), una mayor incidencia de anomalías cromosómicas intersticiales crípticas, y más deleciones que duplicaciones.

1.2.1.1 Microdeleciones

Los síndromes por microdeleción autosómica son las anomalías cromosómicas de mayor significación clínica tras las tres trisomías autosómicas más frecuentes, 13, 18 y 21. Entre ellos se encuentran el Síndrome de Cri-du-chat (deleción distal del brazo corto del cromosoma 5) y el Síndrome de Wolf-Hirschhorn (deleción terminal del brazo corto del cromosoma 4).

La citogenética convencional, gracias al bandeo de alta resolución, permite identificar deleciones de un tamaño >5 Mb (máximo nivel de resolución obtenido con cromosomas prometáfásicos bandeados). La combinación de técnicas de bandeo de alta resolución y de FISH ha permitido caracterizar un conjunto de entidades clínicas causadas por deleciones de regiones cromosómicas muy pequeñas. Por esta razón, la detección de una microdeleción debe realizarse mediante FISH utilizando una sonda de específica para la región implicada. Sin embargo, esto obliga a sospechar de antemano de una determinada región cromosómica. En ocasiones se hallan indicios como el hallazgo ecográfico de una cardiopatía conotruncal que puede hacer sospechar de la presencia de una microdeleción de la banda 22q11.2 responsable del síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial.

En la Tabla 4 se detallan algunos síndromes debidos a microdeleción.

Tabla 4. Síndromes debidos a microdelección.

SÍNDROME	DELECIÓN	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	INCIDENCIA	CITAS
Angelman	15q11-q13	Retraso mental, ataxia, risa incontrolada	1/15.000-20.000	Angelman H. 1965 Guerrini y col., 2003
Aniridia/Wilms tumor	11p13	Retraso mental, aniridia, predisposición a tumor de Wilms, genitales anómalos	1/250.000	Miller y col., 1964 Crolla y Heyningen, 2002
Cri-du-chat	5p15.2	Microcefalia, orejas malformadas y retraso en el desarrollo	1/20.000	Lejeune y col., 1963 Chen y col., 2004
DiGeorge	22q11.2	Características faciales, paladar hendido, defectos cardíacos	1/5.000	DiGeorge 1968 Yamagishi y Srivastava, 2003
Langer-Giedion	8q24.11-q24.13	Características faciales, pelo escaso, exostosis, retraso mental de grado variable	—	Langer y col., 1984 Ludecke y col., 1999
Miller-Dieker	17p13.3	Lisencefalia, rasgos faciales característicos	—	Miller 1963 Cardoso y col., 2003
Prader-Willi	15q11-13	Retraso mental, talla baja, obesidad, hipotonía, rasgos faciales característicos, pies pequeños	1/10.000-15.000	Prader y col., 1956 Cassidy, 1997
Rubinstein-Taybi	16p13.3	Retraso mental, pulgares anchos y pies enormes, rasgos faciales característicos, anomalías vertebrales y de esternón, estenosis pulmonar.	1/300.000	Rubinstein, Taybi. 1993 Wiley y col., 2003
Smith-Magenis	17p11.2	Retraso mental, hiperactividad, rasgos dismórficos, comportamiento auto-destructivo.	1/25.000	Smith y col., 1986 Greenberg y col., 1996
Williams-Beuren	7q11.2	Fallo en el desarrollo, rasgos faciales característicos, estenosis supra valvular aórtica.	1/20.000	Beuren 1972 Brondum-Nielsen y col., 1997
Wolf-Hirschhorn	4p16.3	Frente prominente y retraso mental	1/50.000	Battaglia y col., 1999

Un ejemplo de síndrome de microdelección es el síndrome de Prader-Willi. Aunque éste se describió alrededor de 1950, no fue hasta 1981 cuando el desarrollo de las técnicas de bandeo permitió detectar una pequeña delección entre las bandas 15q11-q13 en el 50% de los pacientes afectados. Actualmente, la aplicación de la técnica de FISH utilizando sondas locus específicas (p.ej. *LSI SNRPN/PML/CEP 15 dual color ADN probe*) permite una detección fácil y rápida de esta microdelección (Fig. 7).

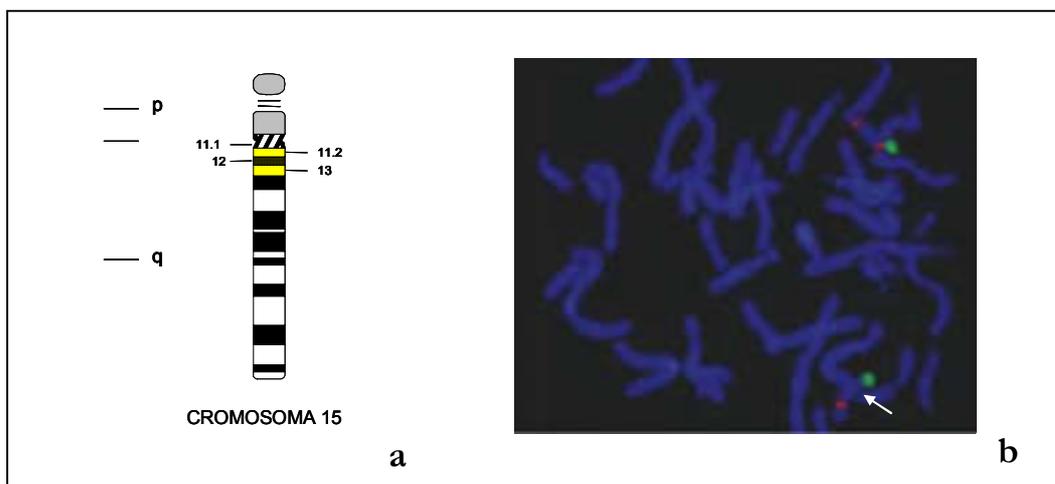


Figura 7. a) Ideograma del cromosoma 15 humano mostrando, en amarillo, las bandas implicadas en síndrome de Prader-Willi b) Metafase tratada mediante la técnica de FISH con sonda locus específica del gen *PW* (*LSI SNRPN SpectrumOrange/CEP 15 (D15Z1) SpectrumGreen/PML SpectrumOrange*) donde se observa la delección en uno de los cromosomas 15 (flecha).

La mayoría de las veces (75%) estos síndromes se deben a una microdelección de un tamaño del orden 3-5 Mb (L'Hermine y col., 2003). Debido a la presencia de genes imprintados en esta región, la delección confiere unas características fenotípicas distintas según afecte al cromosoma de origen paterno o materno, conociéndose como síndrome de Prader-Willi y Angelman respectivamente. El resto de casos con síndrome de Prader-Willi se deben a disomía uniparental o a mutaciones de *imprinting*, mientras que en el síndrome de Angelman se deben más frecuentemente a mutaciones en un único gen. La disomía uniparental es mucho más frecuente en el síndrome de Prader-Willi (25%) que en el Angelman (1-5%). En un 5% de pacientes con síndrome de Prader-Willi y un 25% con síndrome de Angelman que no tienen microdelección ni disomía uniparental se han detectado mutaciones de metilación. Por último, los reordenamientos cromosómicos son otra causa, aunque poco frecuente, de síndromes por

microdelección. Se han observado repeticiones flanqueantes a las regiones delecionadas en estos síndromes (Potocki y col., 2000; Estivill y col., 2002).

1.2.1.2 Microduplicaciones

Las duplicaciones suelen tener consecuencias más leves sobre el fenotipo que las deleciones. Por el momento, pocas duplicaciones se han descrito asociadas a síndromes clínicos bien definidos.

Con la utilización de técnicas de citogenética molecular se han podido identificar algunas microduplicaciones asociadas a diversas patologías, entre ellas, la microduplicación de 3q26.1 asociada a la aparición de algunas características fenotípicas similares al síndrome Cornelia de Lange (Rizzu y Baldini, 1994), la microduplicación de la región 11p15 asociada al síndrome Beckwith-Wiedemann (Brown y col., 1992) y la microduplicación 17p11.2 asociada al síndrome de Charcote-Marie-Tooth (Lupski y col., 1992).

Por último, se han descrito microduplicaciones de regiones asociadas con síndromes de microdelección. Así, se han publicado varios casos de pacientes con duplicaciones del brazo largo proximal del cromosoma 15, abarcando la región delecionada en los síndromes de Prader-Willi/Angelman (Cook y col., 1997; Browne y col., 1997), microduplicaciones de 22q11.2 asociadas a la aparición de algunas características fenotípicas similares al síndrome DiGeorge/Velocardiofacial (Ensenauer y col., 2003). Estas observaciones sugieren, una vez más, la existencia de un mismo mecanismo de formación de deleciones y duplicaciones.

Con la aplicación del CGH-*array* (Fig. 8), se han descrito microdeleciones y microduplicaciones de muy pequeño tamaño: <1 Mb (Vissers y col., 2003).

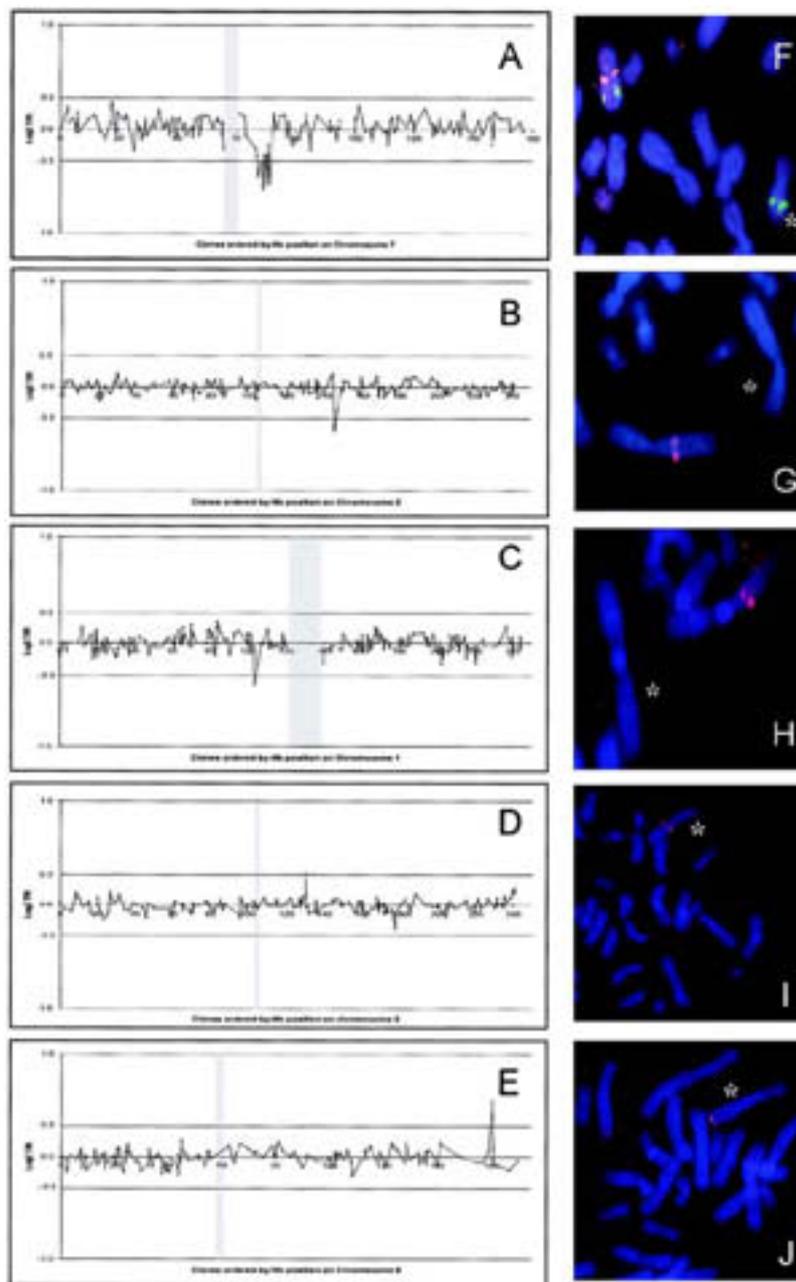


Figura 8. Perfiles obtenidos mediante la técnica de CGH-*array* (derecha) y validación por FISH (izquierda) de cinco pacientes que presentaban retraso mental y en los cuales se identificaron microdeleciones y microduplicaciones. Los paneles de la A-E representan los perfiles individuales de los cromosomas afectados en cada caso, con los clones ordenados de pter a qter (UCSC genome browser, Noviembre 2002). La región centromérica está representada como una franja gris y las líneas horizontales indican los umbrales de detección de ganancia en el número de copias (\log_2 T/R valor 0,3) y de detección de pérdidas de número de copias (\log_2 T/R valor -0,3). Los paneles F-J muestran la validación por FISH usando los clones identificados mediante CGH-*array*. Los cromosomas afectados se indican con un asterisco. A) Deleción en 17 clones, correspondientes a 8 Mb de 7q11.21-q11.23, B) Microdeleción de 3 clones, correspondientes a 2 Mb, 2q22.3-q23.2 C) Microdeleción de un solo clon, <1 Mb en 1p21 D) Microduplicación de un solo clon, <1 Mb en 2q21.2, E) Microduplicación de un solo clon, <1 Mb en 6q25.3q26 (Vissers y col., 2003).

1.2.1.3 Inversiones crípticas

Las inversiones son reorganizaciones intracromosómicas “aparentemente” equilibradas. No obstante, en algunos casos, pueden ser la causa de un fenotipo anómalo debido a la disrupción de genes o cambios de la actividad génica por efectos de posición (Lacombe y col., 1992; Maraia y col., 1991; Pettenati y col., 1993). El efecto fenotípico de una inversión depende de la longitud del segmento invertido, del número de quiasmas producidos (lo cual influye en el modelo de recombinación que tendrá lugar) y del contenido génico de los segmentos flanqueantes (Gardner y Sutherland 1996).

Algunas inversiones pericéntricas recurrentes observadas en los cromosomas 1, 9 y 16 se consideran polimorfismos. También son frecuentes otras inversiones: inv(2)(p11q13), inv(3)(p11-13-q11-12), inv(5)(p13q13), inv(10)(p11.2q21.2), inv(Y)(p11q13), e inversiones en los brazos cortos de los cromosomas 3 y 6 y los brazos largos de los cromosomas 7, 11 y 14, todas ellas sin efecto fenotípico. Sin embargo, un grupo de investigadores (Djalali y col., 1986) describieron un riesgo aumentado de abortos en portadores de la inv(2)(p11q13). Esta inversión, es la más frecuente en humanos, que no involucra región heterocromática centromérica, según Gardner y Sutherland, (1996).

La aplicación de las técnicas de FISH ha permitido detectar inversiones crípticas que con las técnicas de bandas G pasaban desapercibidas o resultaban imposibles de identificar (Fig. 9) (Biesecker y col., 1995; Bailey y col., 1996; Engels y col., 2003; Kline y col., 2004). Es importante detectar e identificar correctamente este tipo de alteraciones, para poder comprender mejor su efecto fenotípico o las repercusiones en la aparición de abortos espontáneos o descendencia afectada.

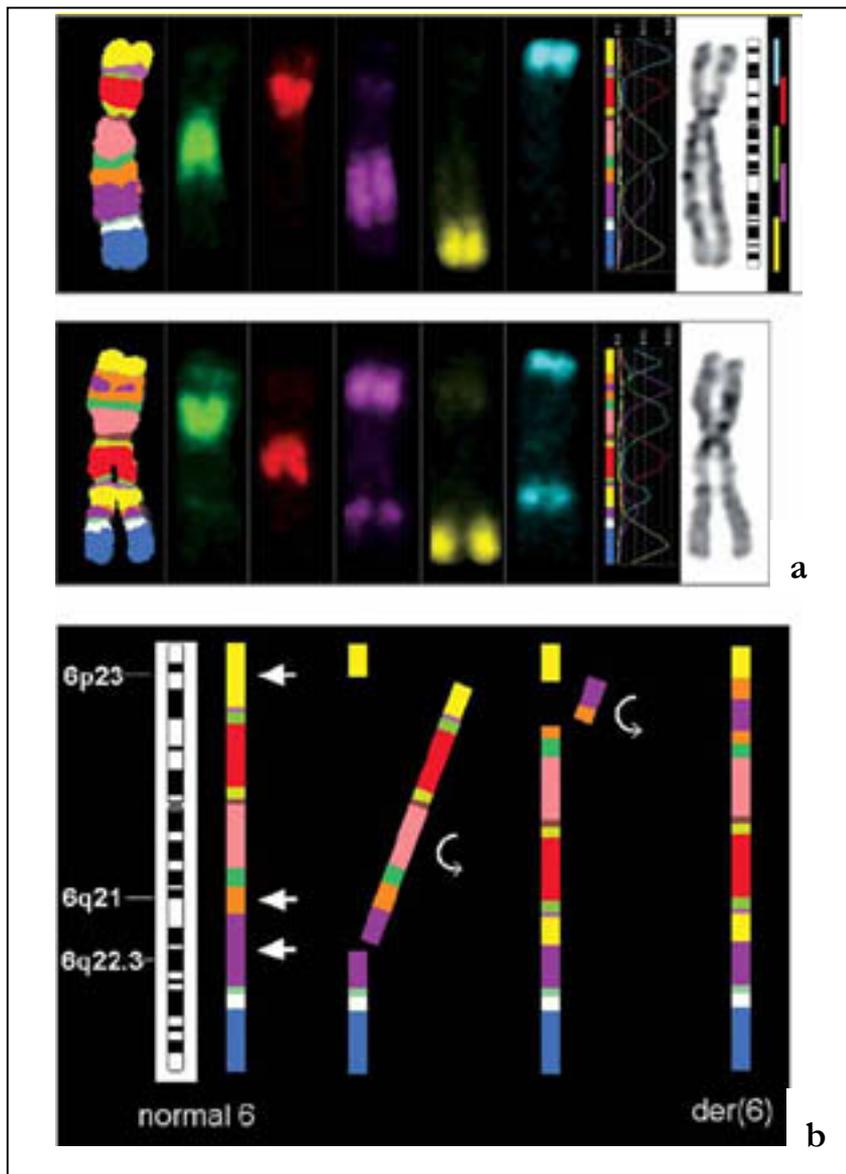


Figura 9. a) Caracterización mediante la técnica de M-Band de un cromosoma 6 normal y un cromosoma 6 derivativo portador de dos inversiones, una de ellas críptica. b) Representación esquemática mostrando las dos inversiones que han tenido lugar (Kline y col., 2004).

1.2.1.4 Translocaciones crípticas

Los individuos portadores de translocaciones equilibradas suelen tener fenotipo normal ya que desde el punto de vista genético son “aparentemente” equilibrados. No obstante, al igual que ocurre en las inversiones, en algunos casos pueden ser la causa de un fenotipo anómalo debido a la disrupción de genes o cambios por efectos de posición.

Gracias a la aplicación de la técnica de FISH, se han podido detectar e identificar translocaciones crípticas que con las técnicas de bandeado cromosómico convencional pasaban inadvertidas o no podían llegar a ser caracterizadas (Fig. 10) (De Die-Smulders y col., 1999; Bacino y col., 2000; Rodríguez-Revenga y col., 2004).

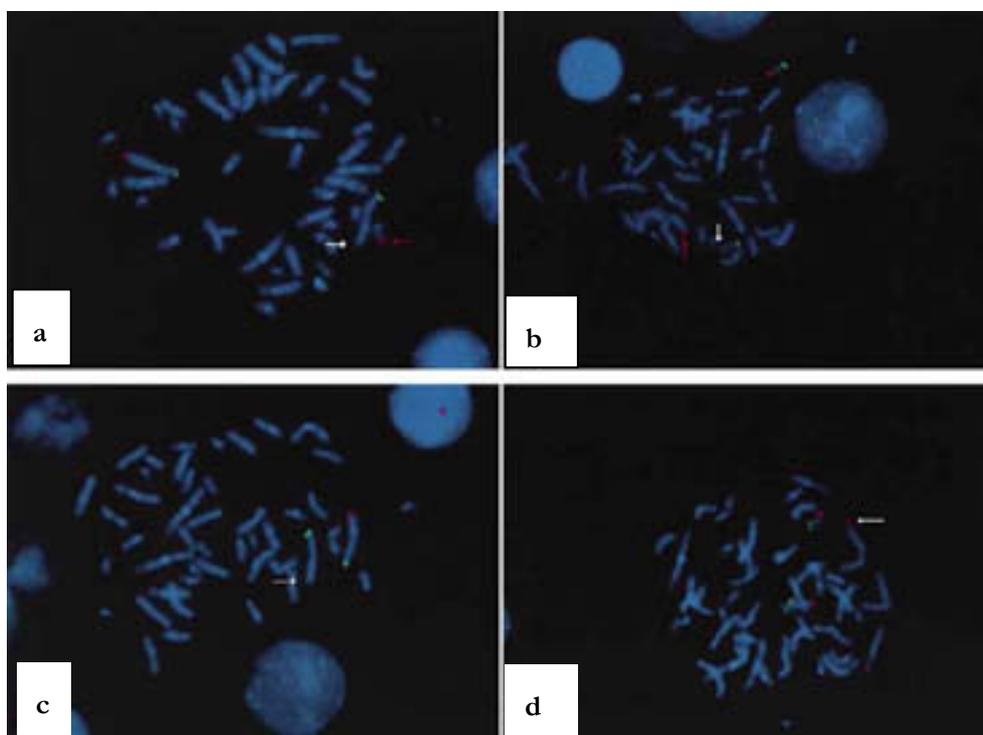


Figura 10. Caracterización de una $t(2;17)$ críptica mediante técnicas de FISH utilizando sondas subtélomero específicas de los cromosomas 2 y 17. Las sondas de los brazos largos contienen fluorocromo rojo, mientras las de los brazos cortos contienen fluorocromo verde. a) Hibridación con sonda telómero específica del cromosoma 2 del padre de la paciente. b) Hibridación con sonda telómero específica del cromosoma 17 del padre de la paciente. c) Hibridación con sonda telómero específica del cromosoma 2 de la paciente. d) Hibridación con sonda telómero específica del cromosoma 17 de la paciente. En esta se observan tres señales de hibridación para 17q, dos en el cromosoma 17 y una adicional en la región distal del brazo largo del cromosoma 2, indicado por la flecha (Bacino y col., 2000).

1.2.1.5 Inserciones crípticas

Las inserciones requieren un mínimo de tres roturas, que provocan la escisión de una porción de un cromosoma y su inserción en otro, siendo por tanto mucho menos frecuentes (Madan y Menko, 1992). Los individuos con cariotipos “aparentemente” equilibrados portadores de inserciones suelen tener fenotipo normal. No obstante, en algunos casos (como ocurre en el caso de las inversiones y translocaciones) pueden ser la causa de un fenotipo anómalo debido a la interrupción de genes o cambios por efectos de posición.

La utilización de las técnicas de FISH han permitido detectar e identificar inserciones crípticas que pasaban inadvertidas con las técnicas de bandeado cromosómico (Fig.11) (Senger y col., 1997; Kaiser-Rogers y col., 2000; Starke y col., 2001; Vermeulen y col., 2004).

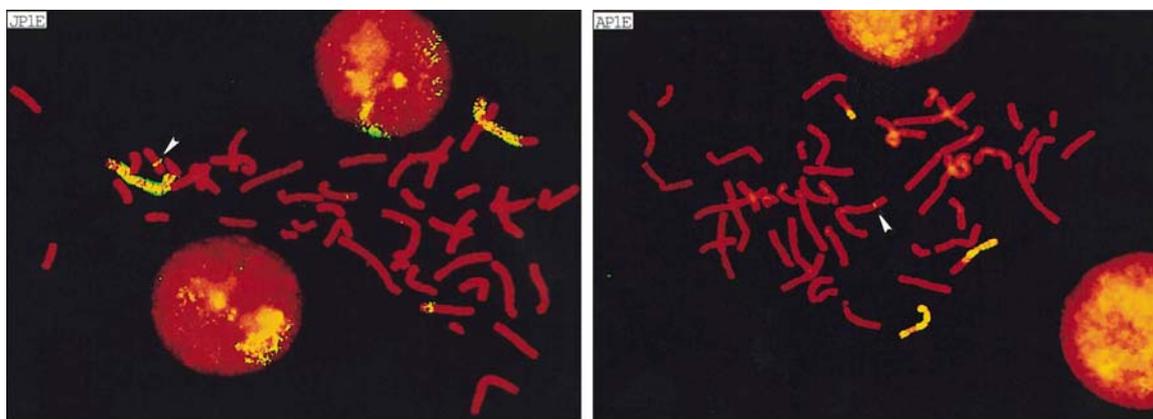


Figura 11. Caracterización de una inserción críptica mediante técnicas de FISH. Inserciones crípticas (flechas) detectadas en un paciente con un cariotipo complejo desequilibrado, visualizadas con sondas de pintado cromosómico para los cromosomas 2 (izquierda) y 11 (derecha) (Kaiser-Rogers y col., 2000).

1.2.1.6 Deleciones, duplicaciones y reorganizaciones crípticas en regiones subteloméricas

Las regiones cromosómicas próximas a los telómeros (regiones subteloméricas) se caracterizan por una gran densidad génica (Saccone y col., 1992). En consecuencia las reorganizaciones, deleciones y duplicaciones de material genético de estas regiones conllevan frecuentemente la aparición de diversas patologías. Se estima que hasta un 5% de los casos de malformaciones y retraso mental de causa desconocida están causados por reorganizaciones subteloméricas (Flint y col., 1995; Knight y col., 1999; De Vries y col., 2003). También han sido identificadas en parejas con abortos de repetición y problemas de fertilidad (Knight y col., 2000; Codina-Pascual y col., 2004).

Gracias a la técnica de FISH con el empleo de sondas subtelo­méricas (Fig. 12) es posible detectar este tipo de anomalías cromosómicas (Anderlid y col., 2002; Clarkson y col., 2002). Actualmente, se pueden detectar translocaciones que afecten a distintos cromosomas de forma simultánea mediante la utilización de la técnica de telM-FISH (Henegariu y col., 2001b).

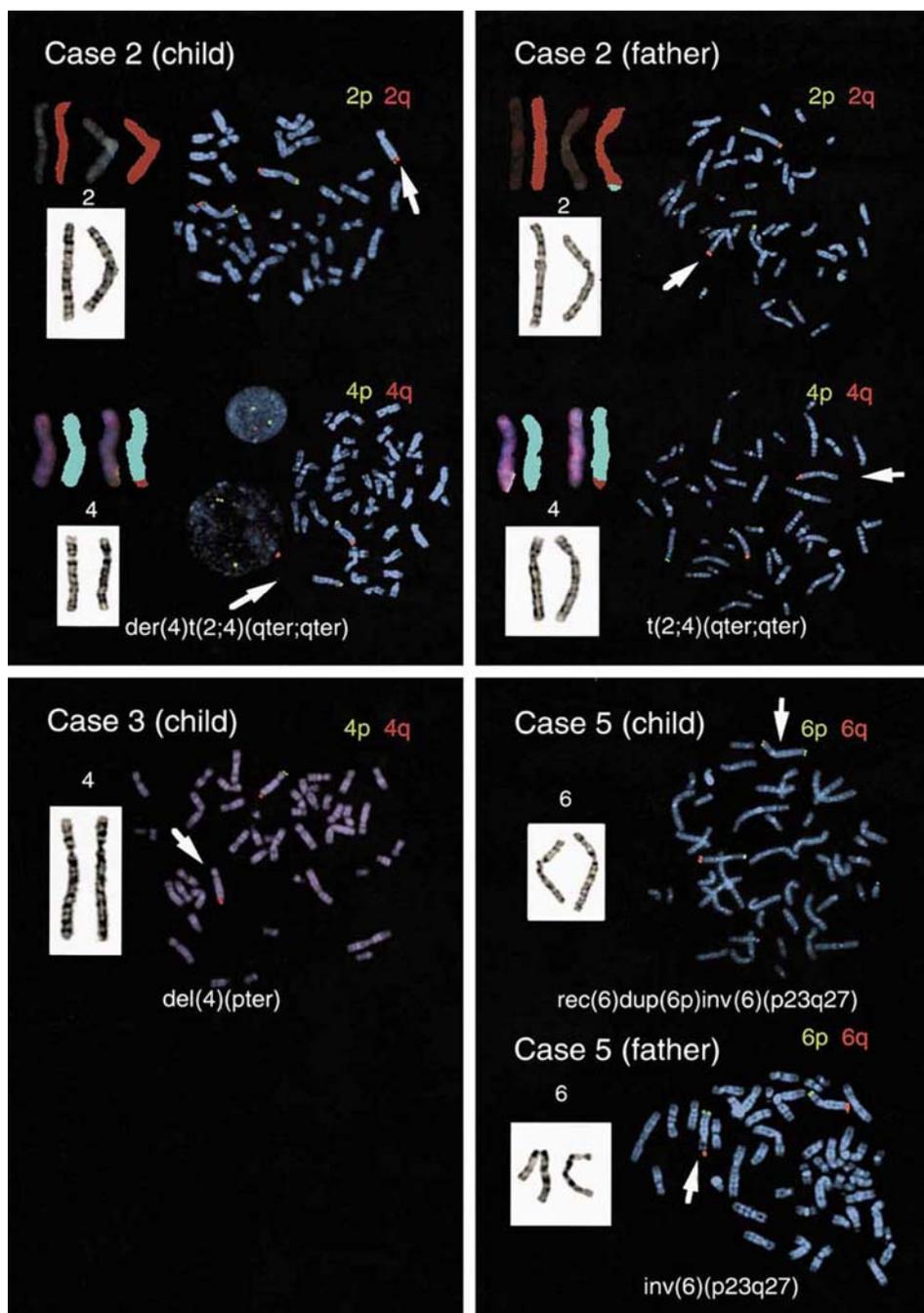


Figura 12. Caracterización de distintas reorganizaciones crípticas subtelo­méricas mediante técnicas de FISH con sondas subtelo­méricas. Los brazos p están marcados con fluorocromo verde y los q en rojo. Las flechas indican las señales teloméricas alteradas. También se muestra la imagen de los cromosomas implicados en bandas G y SKY (Anderlid y col., 2002).

1.2.2 CARACTERIZACIÓN DE DICÉNTRICOS, ISOCROMOSOMAS Y CROMOSOMAS EN ANILLO

1.2.2.1 Cromosomas dicéntricos y acéntricos

Los cromosomas **dicéntricos** son el resultado de un intercambio cromosómico que da lugar a la formación de un cromosoma recombinante con dos centrómeros. Los dicéntricos derivan frecuentemente de translocaciones Robertsonianas, pero también pueden originarse por recombinación dentro del bucle (*loop*) de una inversión paracéntrica. Debido a la presencia de dos centrómeros, estos cromosomas suelen presentar una alta inestabilidad. No obstante, cuando los dos centrómeros están muy próximos se mantiene estable a lo largo de las divisiones celulares debido a que se comportan como un único centrómero, pasándose a considerar en este caso cromosomas pseudodicéntricos.

Las técnicas de FISH, en especial la utilización de sondas centroméricas, permiten la caracterización precisa de este tipo de anomalías cromosómicas que resultaba muchas veces imposible al utilizar únicamente bandas G (Fig. 13).

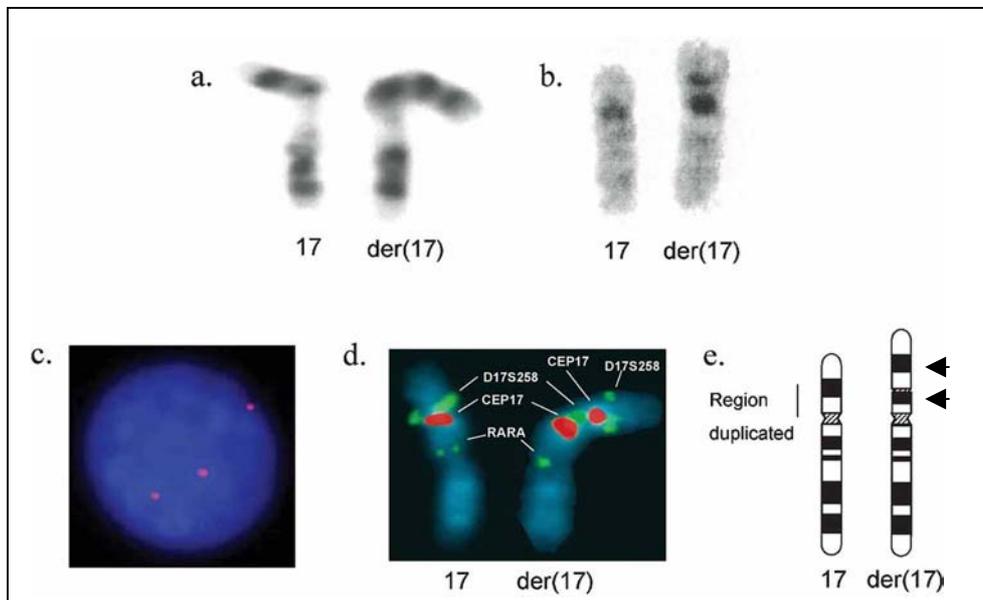


Figura 13. Caracterización de un cromosoma dicéntrico mediante técnicas de FISH: a) El análisis mediante bandas G revela la duplicación de 17p10-p12; b) Las bandas C muestran la presencia de un cromosoma derivativo 17 dicéntrico; c) en la FISH con la sonda RP11-849N15 se observan dos señales en el der(17); d) La FISH con utilización simultánea de las sondas RARA, CEP 17 y D17S258 evidencia que el dicéntrico se ha originado por una duplicación en tándem; e) ideograma mostrando la región duplicada (Shaw y col., 2004).

Los cromosomas **acéntricos** se originan por un intercambio cromosómico que da lugar a la formación de un cromosoma recombinante que carece de centrómero. Al carecer del mismo, son mitóticamente inestables, ya que el centrómero es un elemento esencial para una correcta segregación de los cromosomas. Por tanto, sólo se observan de forma aislada nunca en un cariotipo constitucional. No obstante, pueden ser estables si presentan formas atípicas de centrómeros conocidos como neocentrómeros (Voullaire y col., 1993; Blennow y col., 1994; Osashi y col., 1994; Choo, 1997; Warburton 2004). Estos centrómeros se encuentran localizados en regiones no centroméricas y solo interaccionan con un subtipo de proteínas centroméricas que típicamente se unen a centrómeros activos. Además no reaccionan a las tinciones específicas de heterocromatina centromérica ni hibridan con sondas centroméricas. Su detección es posible mediante inmunofluorescencia con anticuerpos de proteínas centroméricas (Voullaire y col., 1999; Levy y col., 2000). Estos neocentrómeros, a pesar de que parecen funcionar durante la división celular, muchas veces no funcionan tan bien y el cromosoma se pierde, así aparecen asociados a casos de alto mosaicismo. Se ha especulado que estos centrómeros atípicos podrían ser antiguos centrómeros que han sido reactivados a consecuencia de una reorganización cromosómica (Voullaire y col., 1993; Du Sart y col., 1997).

La técnica de CGH permite detectar desequilibrios debidos a la presencia de cromosomas dicéntricos y acéntricos.

1.2.2.2 Isocromosomas

Un isocromosoma esta formado por dos copias del mismo brazo cromosómico, pudiendo presentar un centrómero o dos. En este último caso, recibe el nombre de cromosoma isodicéntrico. Se ha evidenciado molecularmente, que gran parte de los isocromosomas están formados por brazos cromosómicos idénticos, no homólogos, sugiriendo por tanto, un mecanismo de formación predominante, basado en el intercambio de cromátidas hermanas (Callen y col., 1987; Harbison y col., 1988; Robinson y col., 1994). Los individuos portadores de un isocromosoma son monosómicos para los genes localizados en el brazo cromosómico ausente y trisómicos para los genes presentes en el isocromosoma.

Los isocromosomas más frecuentemente observados son los del cromosoma X; en especial el iso(Xq) presente en individuos con rasgos de síndrome de Turner (en muchas ocasiones en mosaico con una línea celular 45,X). Los isocromosomas de la mayoría de autosomas son letales.

Si bien el bandeo cromosómico permite la identificación de isocromosomas, son las técnicas de citogenética molecular las que en muchos casos facilitan una caracterización precisa de este tipo de anomalías cromosómicas (Fig.14) (Reichenbach y col., 1999; Guzé y col., 2004; Tabet y col., 2004).



Figura 14. Caracterización de un isocromosoma 22 mediante FISH, con la sonda TUPLE 1/ARSA (Guzé y col., 2004).

1.2.2.3 Cromosomas en anillo

Los cromosomas en anillo se suelen formar como resultado de la rotura de ambos brazos de un mismo cromosoma con la consiguiente fusión de los extremos y pérdida de los segmentos distales. Una de las características principales de los cromosomas en anillo es la inestabilidad mitótica que presentan. Como consecuencia de ésta se genera un mosaico formado por células normales, células que presentan nuevas estructuras en anillo (más grandes o más pequeños) y células en las cuales el anillo se ha perdido. Este proceso se denomina mosaicismo dinámico (Gardner y Sutherland, 1996). Sin embargo, no todos los cromosomas en anillo presentan inestabilidad ni en el mismo grado.

Cuando el cromosoma en anillo reemplaza a uno de los cromosomas homólogos representa una monosomía para los genes distales de ese cromosoma, mientras que si el cromosoma en anillo es supernumerario el individuo presentará una trisomía parcial. Se han descrito cromosomas en anillo para todos los cromosomas. El fenotipo de individuos portadores de cromosomas en anillo puede verse condicionado por el mosaicismo y por la potencial aparición de células con disomía uniparental. Sin embargo, en aquellos individuos portadores de un cromosoma en anillo se observa un fenotipo recurrente conocido como Síndrome del cromosoma en anillo (Cote y col., 1981) caracterizado por un retraso severo en el crecimiento y malformaciones menores.

Como en los casos anteriores, actualmente las técnicas de FISH y en especial la FISH multicolor (Fig. 15) permiten la caracterización precisa de los cromosomas en anillo (Daniel y Malafiej, 2003; Beverstock y col., 2003).

La CGH también permite identificar cromosomas en anillo.

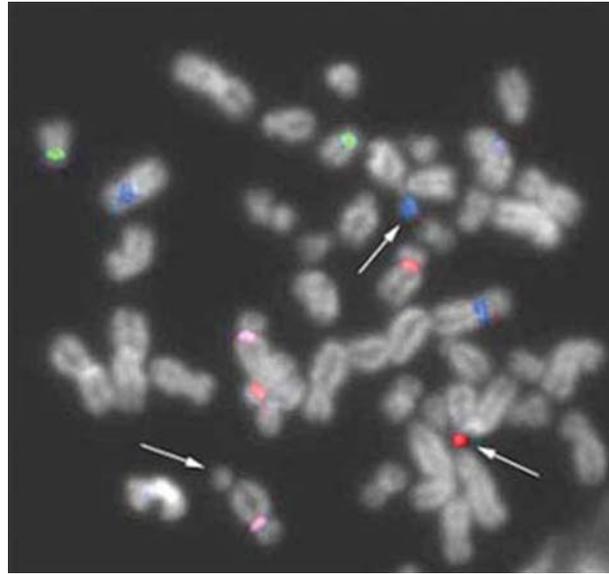


Figura 15. Caracterización de cromosomas en anillo mediante FISH multicolor centrómero específica. Se pueden observar tres señales para los cromosomas 6 (azul) y 12 (rojo). Las flechas señalan los cromosomas en anillo con material del cromosoma 12, $r(12)$, del cromosoma 6, $r(6)$, y de origen cromosómico desconocido $r(?)$. (Beverstock y col., 2003).

1.2.3 CARACTERIZACIÓN DE REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS COMPLEJAS

Se denominan reorganizaciones cromosómicas complejas (RCCs) a aquellos reordenamientos en los cuales están involucrados dos o más cromosomas y hay al menos, tres puntos de rotura. En general, cuanto más compleja es la reorganización, más grande es la probabilidad de que genes críticos estén interrumpidos y de que en su formación haya habido pérdida o duplicación de material genético. La mayoría se originan *de novo* en espermatogénesis y las heredadas, menos frecuentes, parecen ser transmitidas mayoritariamente por vía materna (Batista y col., 1994).

La mayor parte de pacientes portadores de una RCC *de novo* han sido identificados por presentar un fenotipo alterado, por la existencia de una descendencia con fenotipo anormal o de abortos recurrentes, y en ocasiones por infertilidad. Gracias a estos estudios se ha puesto de manifiesto que las RCCs familiares tienden a transmitirse vía materna y que tienen menos puntos de rotura que las *de novo* (Rothlisberger, 1999). Se estima que un individuo portador de una translocación *de novo*, “aparentemente” equilibrada, tiene un riesgo aumentado de aproximadamente el 6% de desarrollar múltiples anomalías congénitas y/o retraso mental (Warburton, 1991; Fryns y col., 1991). La existencia de microdeleciones y/o la disrupción física o inactivación de gen(es) en los puntos de rotura pueden ser en parte, o totalmente, responsables del efecto fenotípico observado (Tommerup 1993).

Es muy importante determinar, de forma precisa, los puntos de rotura implicados en una RCC, no sólo para poder establecer una correlación genotipo-fenotipo, sino también para facilitar el mapaje de genes.

La caracterización de una RCC basándose únicamente en técnicas de citogenética convencional ha resultado en la mayor parte de los casos imposible. La utilización de las técnicas de citogenética molecular ha permitido la identificación y caracterización de muchas RCCs (Fig. 16) Hasta el momento se han descrito más de un centenar de RCCs, la mayoría de ellas *de novo* (Fuster y col., 1997; Uhrig y col., 1999; Batanian y col., 1998; Rothlisberger y col., 1999; Kaiser-Rogers y col., 2000; Kotzot y col., 2001; Borck y col., 2001; Houge y col., 2003; Vermeulen y col., 2004; Lespinasse y col., 2004).

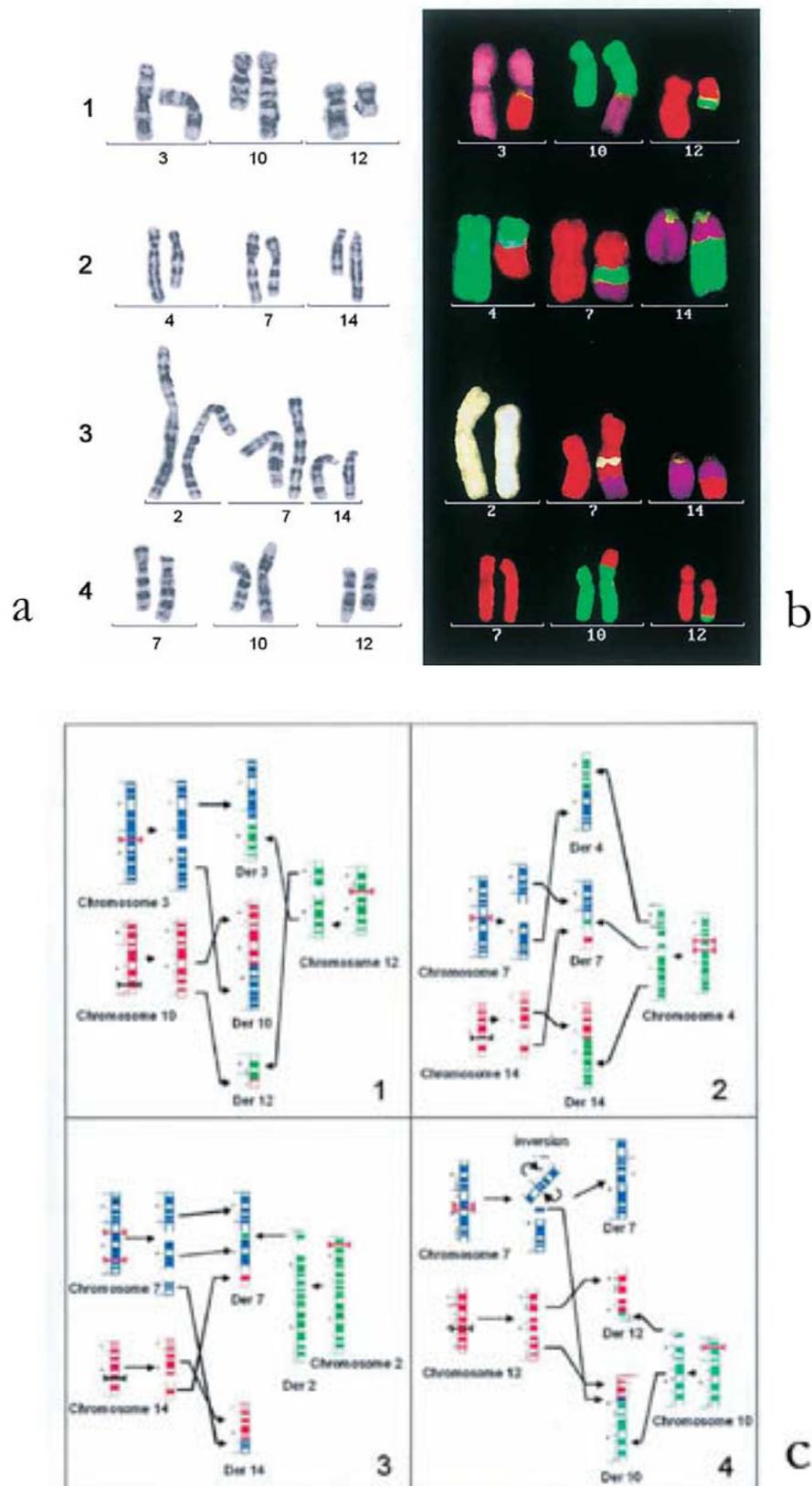


Figura 16. Caracterización de una RCC. a) Cariotipo parcial con bandas G; b) Cariotipo parcial multicolor (M-FISH); c) Representación esquemática de la RCC. (Vermeulen y col., 2004).

1.2.4 CARACTERIZACION DE MARCADORES SUPERNUMERARIOS

Los cromosomas supernumerarios humanos (HSCs) o *extra structural abnormal chromosomes* (ESACs), constituyen un grupo muy heterogéneo respecto al tamaño, morfología, origen del material cromosómico y repercusiones clínicas. Su caracterización tiene un elevado interés clínico ya que, en el futuro, aportará una información adicional muy valiosa para el pronóstico (Fig. 17).

Los primeros casos de HSCs fueron descritos en 1970 (Weber y col.). Las primeras series de HSCs prenatales se publicaron en los años 80 (Warburton, 1984; Sachs y col., 1987). En 1997, Crolla y col. propusieron una definición según la cual los HSCs son “pequeños cromosomas estructuralmente anormales que ocurren en adición a los 46 cromosomas habituales”.

La incidencia de los HSCs es de 0,14-0,72 por cada 1.000 en recién nacidos (Warburton, 1991) y de 0,4-0,8 en 2.500 diagnósticos prenatales (Hook y Cross, 1987). Dichas frecuencias han sido confirmadas posteriormente aplicando las técnicas de FISH. (Blennow y col., 1994; Marchina y col., 2003).

Los HSCs pueden tener distintos tamaños pero, en general, los detectados más frecuentemente corresponden a pequeños fragmentos constituidos por heterocromatina céntrica denominados también *small supernumerary marker chromosomes* (SMCs) (Warburton, 1991). Liehr y col. (2004) han definido estos pequeños marcadores supernumerarios (*small supernumerary marker chromosomes*-sSMCs) como aquellos que tienen un tamaño menor o igual al de los cromosomas 20 presentes en la misma metafase.

Recientemente, Fuster y col. (2004) han clasificado los HSCs en seis tipos (Tabla 5): *Tipo I*: Pequeños marcadores acrocéntricos de origen familiar. Los pacientes portadores de este tipo de marcadores presentan fenotipo normal. Se han detectado mayoritariamente mediante diagnóstico prenatal. En este grupo se encuentran: los pequeños der(15) y los der(22). *Tipo II*: Grandes marcadores acrocéntricos originados “de novo”. Los pacientes tienen un riesgo muy elevado de presentar anomalías fenotípicas. En este grupo encontramos los grandes der(15) asociados a fenotipo anormal. *Tipo III*: HSCs no acrocéntricos, generalmente originados “de novo”. Se incluyen en este grupo marcadores no acrocéntricos de pequeño tamaño con un riesgo moderado de tener alteraciones fenotípicas y los isocromosomas 12p y 18p asociados a un fenotipo severamente afectado. *Tipo IV*: HSCs en anillo, la mayoría originados *de novo* y con riesgo elevado de asociarse a alteraciones fenotípicas. *Tipo V*: HSCs originados por una segregación anómala en la meiosis de uno de los progenitores portador de una reorganización cromosómica equilibrada. Los pacientes con este tipo de marcadores presentan con frecuencia alteraciones fenotípicas y *Tipo VI*: HSCs neocéntricos. Se trata de un nuevo grupo de HSCs que no contienen heterocromatina centromérica detectable, y que permanecen estables durante la

división celular lo que evidencia la existencia de centrómeros funcionales. En general, las características fenotípicas y la severidad de las anomalías fenotípicas causadas por estos marcadores neocéntricos dependen del grado de mosaicismo y del tipo de aneuploidía.

Tabla 5. Clasificación de los HSCs según Fuster y col. (2004)

Tipos de HSCs	Frecuencia	Morfología	Composición cromatina	Origen cromosómico	Riesgo de fenotipo anómalo
<u>Tipo I:</u> acrocéntricos pequeños	> 50%	acrocéntrico (1 centrómero; puede ser bisatelizado)	heterocromatina	en general 15 y 22	bajo/ alto en Síndrome Cat eye
<u>Tipo II:</u> acrocéntricos largos	?	acrocéntrico bisatelizado y dicéntrico	eucromatina	el más común inv dup (15)	alto
<u>Tipo III:</u> no acrocéntricos	25 %	no acrocéntrico	heterogénea	todos los cromosomas excepto el 5	30-100%
<u>Tipo IV:</u> anillos	10 %	anillo	heterogénea	todos los autosomas excepto 5, 11 y 22	Heterogéneo
<u>Tipo V:</u> derivados de translocaciones	?	heterogénea	eucromatina	el más común der(22)t(11;22)	alto
<u>Tipo VI:</u> neocéntricos	?	heterogénea sin centrómero detectable	eucromatina	los más frecuentes 3q, 13q y 15q	alto

Se han descrito cromosomas marcadores de todos los cromosomas. El cromosoma supernumerario más frecuente es el del cromosoma 15 (60% del total), en concreto, una inversión y duplicación de la región pericentrométrica del cromosoma 15, inv dup(15). Los puntos de rotura son los mismos que los encontrados en las microdelecciones de los síndromes de Prader-Willi y Angelman, por lo que probablemente en esta región cromosómica existan puntos calientes que predisponen a la rotura.

La posibilidad de disomía uniparental (UPD) es un aspecto a tener en cuenta en el contexto de los cromosomas marcadores (Kotzot y col., 2002; Shaffer y col., 2001; Starke y col., 2003), así los individuos portadores de HSCs tienen un mayor riesgo de ser uniparentalmente disómicos para los homólogos normales del HSC. La UPD no está siempre asociada a consecuencias clínicas en HSCs (Von Eggeling y col., 2002), pero sí se han descrito casos para los cromosomas 6, 7, 11, 14, 15 y 20 (Chudoba y col., 1999; Shaffer y col., 2001; Kotzot y col., 2002).

En resumen, la presencia de HSCs puede tener o no repercusiones en el fenotipo y/o retraso mental dependiendo de varios factores: la presencia o ausencia de eucromatina y satélites, el tipo cromosoma del que deriva, del tamaño, de si se encuentra o no en estado de mosaico, del tejido específico donde se distribuye, de su origen “de novo” o familiar, y a veces incluso de su origen parental materno o paterno (impronta) (Paolini-Giacobino y col., 1998). Por ello, resulta de sumo interés la identificación exacta de estos marcadores tanto si se detectan prenatal o postnatalmente porque puede ayudar a explicar la clínica de un paciente (Blennow y col., 1995). Además, la caracterización de estos marcadores permitirá obtener información muy valiosa sobre qué regiones del genoma humano son genéticamente inactivas y cuales están asociadas a malformaciones congénitas específicas.

La mayoría de los HSCs permanecen sin identificar debido a la enorme dificultad o imposibilidad de hacerlo con las técnicas de citogenética clásica. Cuando los marcadores son bastante grandes y presentan un patrón de bandas característico pueden llegar a ser caracterizados mediante la técnica de bandas G, pero cuando son de pequeño tamaño, resulta muy difícil o incluso imposible llegar a caracterizarlos. La aplicación de las nuevas técnicas de FISH (en especial M-FISH, AcroM-FISH, cenM-FISH), CGH y el análisis mediante polimorfismos de microsátelites permite, en muchos casos, su identificación (Bryndorf y col., 1995; Ning y col., 1999; Levy y col., 2000; Langer y col., 2001; Nietzel y col., 2001; Yaron y col., 2003; Fuster y col., 2004).

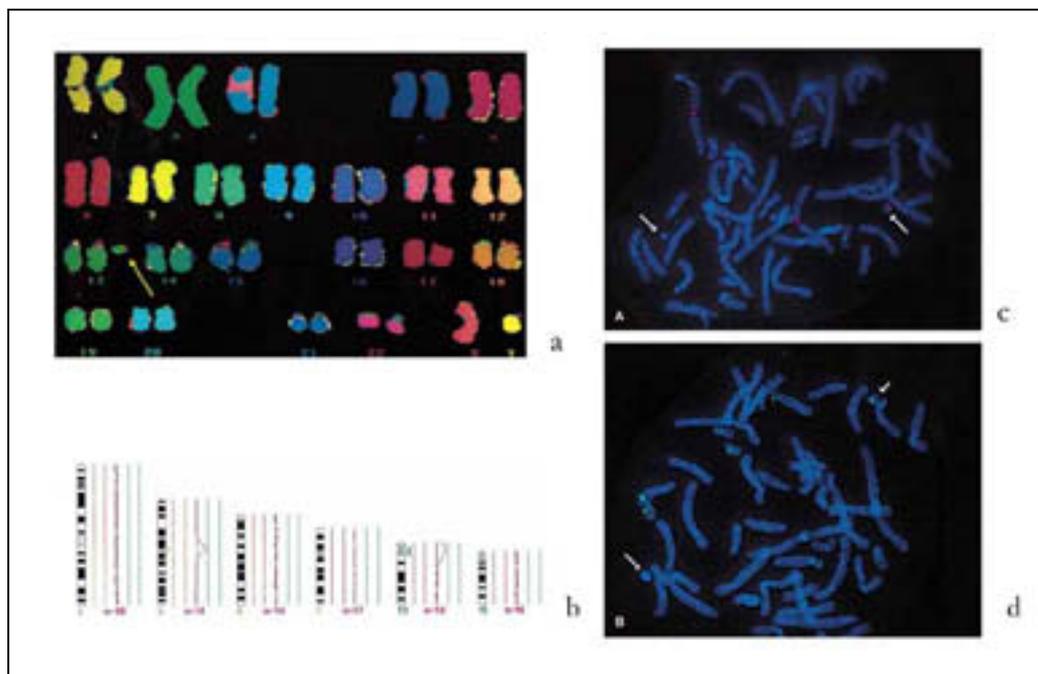


Figura 17. Caracterización de dos HSCs similares pero de diferente origen céntrico mediante técnicas de FISH. a) Cariotipo multicolor (M-FISH) mostrando el cromosomas marcador, b) Ideogramas parciales de CGH mostrando la ganancia de material centromérico del los cromosomas 3 y 13, c y d) FISH con sondas centroméricas del cromosoma 3 y 13/21 (Levy y col., 2002).

1.3 CONTRIBUCIÓN DE LA CITOGENÉTICA MOLECULAR AL ESTABLECIMIENTO DE CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO

Las malformaciones congénitas, son en muchos casos el resultado de la acumulación de múltiples cambios genéticos. La pérdida o ganancia de segmentos cromosómicos de un tamaño similar pueden tener distintas consecuencias, dependiendo del número y función de los genes que contiene el fragmento. Cada vez se hace más patente la colaboración entre biólogos moleculares y genetistas clínicos para la elucidación del mapado e incluso, en ocasiones, del clonado de genes implicados en diversas patologías. La identificación de anomalías cromosómicas en pacientes con malformaciones congénitas ha permitido acotar las regiones del genoma en donde buscar los genes responsables de dichos desórdenes. Carey y Viskochil (2002) han publicado una revisión de las asociaciones genotipo-fenotipo conocidas hasta ese momento.

Si la citogenética convencional ha permitido identificar anomalías cromosómicas microscópicas, el desarrollo de las técnicas de FISH, y otras técnicas moleculares, ha permitido la identificación de anomalías submicroscópicas. La aparición de la CGH, HR-CGH y más recientemente de la de CGH-*array* ha aportando innumerables ventajas en la identificación precisa de muchas alteraciones cromosómicas por su alta resolución, automatización, rapidez y sensibilidad. Por otro lado, aquellas alteraciones cromosómicas que no conllevan un cambio en el número de copias y que por tanto no pueden detectarse mediante CGH se detectan con frecuencia mediante la combinación de técnicas de bandeado cromosómico y de FISH.

La aplicación de todas estas técnicas de citogenética convencional y molecular ha permitido profundizar en el papel que juegan determinadas alteraciones cromosómicas crípticas en la aparición de malformaciones congénitas específicas. Así por ejemplo, Jalal y col., 2003 utilizando la técnica FISH con sondas subteloméricas han descrito anomalías crípticas en un 23% de pacientes con retraso mental idiopático. Asimismo, la aplicación de la técnica de HR-CGH ha evidenciado la existencia de desequilibrios cromosómicos crípticos, en su mayoría intersticiales, en el 11% de estos pacientes (Kirchhoff y col., 2000).

Objetivos

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido profundizar en el papel que desempeñan regiones cromosómicas específicas, que al alterarse, originan fenotipos concretos mediante la aplicación conjunta de diferentes técnicas de citogenética molecular (CGH y FISH) y de citogenética convencional. Para ello, ha sido necesario:

1. La puesta a punto y/o optimización de las técnicas de extracción de ADN, CGH y FISH multicolor para su aplicación al diagnóstico citogenético Prenatal y Postnatal.
2. Determinar las limitaciones en la detección de las anomalías cromosómicas constitucionales tanto de las técnicas en sí, como del *software* que analiza las imágenes.
3. Caracterizar distintos tipos de anomalías cromosómicas constitucionales, previamente detectadas, aunque no identificadas por bandas G.
4. El establecimiento de asociaciones genotipo – fenotipo.

Material y métodos

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Este estudio se ha llevado a cabo en pacientes en los cuales las técnicas de citogenética convencional (bandas G, C y NOR) han resultado insuficientes en la detección y/o caracterización de una determinada anomalía cromosómica. Se han estudiado un total de 54 pacientes remitidos por los Servicios de Genética de cinco hospitales públicos y de siete centros privados. En la Tabla 6 se detallan los distintos centros que han colaborado en este estudio.

Tabla 6. Centros colaboradores.

Hospitales públicos	Centros Privados
Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron (8 casos)	Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal. (6 casos)
Hospital Sant Joan de Deu (1 caso)	Centre Immunològic de Catalunya / Laboratorio Bioclínic (Málaga) (2 casos)
Hospital Universitari de Sant Joan de Reus (1 caso)	Clínica Girona (2 casos)
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (2 casos)	Laboratorio de Análisis Clínicos CERBA (26 casos)
Hospital Mútua de Terrassa (1 caso)	Laborario Dr. Miquel Duran Bellido (1 caso)
	Laboratorio General Lab (3 casos)
	Prenatal Genetics (1 caso)

En el presente estudio se han analizado diferentes tipos de muestras: sangre periférica (SP- 38 casos), líquido amniótico (LA- 13 casos) y vellosidad corial (CV- 3 casos) requiriéndose, en todos los casos, la realización de los cultivos celulares correspondientes.

Las muestras estudiadas, se han clasificado en los siguientes grupos según el tipo de anomalía cromosómica que presentaban en el estudio citogenético convencional previo:

Grupo I. Confirmación / identificación de deleciones o adiciones autosómicas (18 casos).

Grupo II. Confirmación / identificación de deleciones o adiciones de cromosomas sexuales (13 casos).

Grupo III. Cromosomas marcadores supernumerarios (15 casos).

Grupo IV. Reorganizaciones cromosómicas complejas y/o crípticas (8 casos)

Las características de los casos estudiados en cada grupo se detallan en las Tablas 7-10.

Tabla 7. Grupo de pacientes candidatos de ser portadores de monosomías y trisomías parciales autosómicas.

<u>Caso</u>	<u>Cariotipo</u>	<u>Sexo/ edad</u>	<u>Indicación diagnóstica</u>	<u>Tipo de muestra</u>
M-3	46,XY,del(16)(p?)	V/RN	Mortinato malformado	SP
M-15	46,XX,add(18)(q23)	M/6a	Cuadro clínico	SP
M-18	46,XY,r(18)	V/RN	Cuadro clínico	SP
M-22	46,XX,del(2)(q32.2q35)	M/RN	Mortinato malformado	SP
M-36	46,XX,der(7)inv(7)(p13q32)del(7)(q36), t(14;15)(q11.2;q15)	M/11a	Retraso madurativo	SP
M-40	46,XX,add(17)(p13)	M/10a	Cuadro clínico	SP
M-41	46,XX,del(9)(q?)	M/12sg	Feto malformado	LA
M-43	46,XX, inv(9)(p11q12), ins(16;?) (q22.3;?)	M/2a	Cuadro clínico	SP
M-45	46,XX,add(22)(q13)	M/12sg	DP– edad materna avanzada	CV/LA
M-47	46,XY,add(16)(p13)	V/RN	Fenotipo anómalo	SP
M-48	46,XX,del(9)(p23?)	M/22sg	DP– Oligoamnios y RCI	LA
M-54	46,XX,add(12)(p13)	M/15sg	DP– edad materna avanzada	LA
M-59	46,XX,add(18)(p11.32?)	M/6sg	Aborto diferido	CV
M-62	46,XX,add(9)(q34)	M/RN	Fenotipo peculiar	SP
M-66	46,XY,der(9)del(9)(p22?) t(2;9)(p11;p11)	V/16sg	DP - feto malformado	LA
M-71	46,XX,r(15)(p11q26)	M/18m	Cuadro clínico	SP
M-74	46,XY,r(15)(p11q26)	V/13a	Cuadro clínico	SP
M-75	46,XY	V/n	Sospecha Síndrome DiGeorge	SP

Abreviaciones. **a**, años; **DP**, diagnóstico prenatal; **CV**, vellosidad corial; **LA**, líquido amniótico; **m**, meses; **M**, mujer; **n**, niño; **sg**, semanas de gestación; **RCI**, retraso de crecimiento intrauterino; **RM**, retraso mental; **RN**, recién nacido; **SP**, sangre periférica; **V**, varón.

Tabla 8. Grupo de pacientes candidatos de ser portadores de monosomías y trisomías parciales de cromosomas sexuales.

<u>Caso</u>	<u>Cariotipo</u>	<u>Sexo/ edad</u>	<u>Indicación diagnóstica</u>	<u>Tipo de muestra</u>
M-1	46,X,+mar	V/18sg	DP- edad materna avanzada	LA
M-10	45,X[11]/46,X,+mar[16]	V/16sg	Feto con agenesia renal unilateral.	LA
M-12	45,X,inv(9)(p11q12)[30]/ 46,X,idel(Y)(p11.3?), inv(9)(p11q12)[70]	M/15a	Amenorrea primaria	SP
M-34	46,X,add(X)(q21.2?)	M/21a	Fallo ovárico precoz	SP
M-35	46,X,+mar[22]/46,XY[28]	V/3a	Retraso psicomotor y de lenguaje	SP
M-51	46,X,add(Y)(q12)	V/21sg	DP-feto malformado	LA
M-52	46,X,add(X)(p22.3)	M/?	Alteraciones ginecológicas	SP
M-53	46,X,+mar	V/42a	Azoospermia	SP
M-57	45,X[58]/46,X,idel(X)(q21?) [42]	M/12a	Retraso de crecimiento Fallo ovárico	SP
M-68	45,X[15]/46,X,del(X)(q11?) [85]	M /?	DP - ?	LA
M-69	45,X[30]/46,X,r(Y) [70]	V/n	Hijo con cromosopatía	SP
M-70	46,XX	V/21sg	Fenotipo varón	SP
M-73	45,X,add(15)(p11.2)	V/37a	Infertilidad	SP

Abreviaciones. a, años; **DP**, diagnóstico prenatal; **LA**, líquido amniótico; **M**, mujer; **n**, niño; **sg**, semanas de gestación; **SP**, sangre periférica; **V**, varón.

Tabla 9. Grupo de pacientes portadores de cromosomas marcadores supernumerarios.

<u>Caso</u>	<u>Cariotipo</u>	<u>Sexo/ edad</u>	<u>Indicación diagnóstica</u>	<u>Tipo de muestra</u>
M-13	47,XX,+mar	M/ad	Hijo con cromosopatía (M14)	SP
M-14	48,XY,+2mar	V/37a	Oligozoopermia	SP
M-20	47,XY,+mar	V/3m	Cuadro clínico	SP
M-27	47,XY,+mar	V/2a	Cuadro clínico	SP
M-39	47,XY,+mar	V/?	DP – edad materna avanzada	LA
M-42	47,XX,+mar	M/ad	Fenotipo similar PW	SP
M-44	48,XY,+2mar[7]/ 47,XY,+mar[32]/ 46,XY[14]	V/ad	Pareja con abortos de repetición	SP
M-46	47,XY,+mar	V/15sg	DP – edad materna avanzada	LA
M-58	47,XX,+mar	M/n	Hermana con S. de Marfan.	SP
M-60	47,XX,+mar	M/?	DP – edad materna avanzada	CV
M-61	47,XX,+mar	M/?	DP – edad materna avanzada	LA
M-64	47,XY,+mar	V/RN	Cuadro clínico	SP
M-67	47,XY,+mar	V/?	Feto malformado	LA
M-72	47,XY,+mar	V/30a	Paciente procedente de ICSI	SP
M-76	47,XY,+mar	V/4a	Fenotipo similar PW	SP

Abreviaciones. **a**, años; **ad**, adulto; **CV**, vellosidad corial; **DP**, diagnóstico prenatal; **ICSI**, inyección de esperma intracitoplasmática; **LA**, líquido amniótico; **M**, mujer; **m**, meses; **n**, niña; **PW**, Síndrome de Prader-Willi; **SP**, sangre periférica; **V**, varón.

Tabla 10. Grupo de pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas complejas y/o crípticas.

Caso	Cariotipo	Sexo/ edad	Indicación diagnóstica	Tipo de muestra
M-7	46,X,t(X;2;?)	M/28a	Amenorrea secundaria	SP
M-16	46,XY,ins(13;?)(q21.2;?)	V/n	Retraso mental	SP
M-21	46,XX,?inv(1)(q41?)	M/?	Hermana con enfermedad de Gaucher	LA
M-17	46, XX,-1,-4,-6,-11, +mar1+mar2+mar3+mar4	M/2a	Cuadro clínico	SP
M-24	46, X,-2,-11,-22,-X, +mar1+mar2+mar3+mar4	M/36a	Amenorrea primaria	SP
M-37	46,XY,t(1;6;16)(q21;q13;p11.2)	V/ad	Infertilidad	SP
M-49	45,XX,der(21;22)(q10?;q10?)	M/16a	Amenorrea	SP
M-65	46,XY,der(5)inv(5) (q13q33)t(5;7)(q13q15;p22)	V/1a	Retraso psicomotor No sensación de miedo	SP

Abreviaciones. **a**, años; **ad**, adulto; **LA**, líquido amniótico; **M**, mujer; **n**, niño; **SP**, sangre periférica; **V**, varón.

En la siguiente tabla se detallan las **características clínicas** de dieciséis pacientes que presentaban cuadro clínico:

Tabla 11. Descripción de los pacientes con cuadro clínico.

<i>Caso</i>	<i>Fenotipo</i>
M-3	46,XY,del(16)(p?) Mortinato malformado con facies dismórfica: microretrognatia, facies plana, blefarofimosis, nariz corta con hipoplasia de las alas y puente nasal ausente, orejas displásicas, glosoptosis y paladar hipoplásico. Tetralogía de Fallot con atresia pulmonar. Malformaciones esqueléticas: limitación articular, desviación cubital de ambas manos, talipes varus y hemivértebra a nivel L1. Agenesia renal unilateral (riñón derecho) y criptorquidismo. Coloboma y corioretinitis unilateral (ojo derecho)
M-15	46,XX,add(18)(q23) Artrogriposis múltiple, dismorfia craneofacial, hipoplasia bilateral de costillas, CIA-OS, vena cava superior izquierda persistente que drena a seno coronario, hipertensión pulmonar, marcada hipodensidad de sustancia blanca, blefarosimosis bilateral, incoordinación motora ocular externa, agenesia de ambos conductos auditivos externos, úvula bífida, tronco corto, miembros delgados con dedos largos y delgados, retraso mental.
M-17	46, XX,-1,-4,-6,-11,+mar1+mar2+mar3+mar4 Fenotipo peculiar. Facies sindrómica con piel hipopigmentada, cara redonda y ligeramente plana, frente prominente, puente nasal ancho y deprimido con narinas antevertidas, orejas de implantación baja, hipertelorismo, hendiduras palpebrales ascendentes con pliegues del epicanto, boca pequeña con finos labios y filtrum largo. Antecedentes patológicos de tortícolis paroxístico benigno. Desarrollo psicomotor normal.
M-18	46,XY,r(18) Recién nacido con malformaciones congénitas varias, entre ellas, labio leporino.
M-20	47,XY,+mar Facies levemente dismórfica. Hipotonía axial con tendencia a hipertonia de extremidades superiores. Comunicación interventricular muscular pequeña, medio septal y hemodinámicamente restrictiva. Testes pequeños.

Caso	Fenotipo
<p>M- 22</p>	<p>46,XX,del(2)(q32.2q35)</p> <p>Recién nacido de 7 días, fruto de una tercera gestación sin diagnóstico prenatal citogenético. El TPAL es 3013 (tres partos, ninguno prematuro, un aborto y tres niños vivos). Por ecografía a las 30 semanas se observa oligoamnios y retraso de crecimiento de 3 y 4 semanas. Nace por cesárea a las 37 semanas de gestación. El peso es 1950 gr., altura 44 cm. y PC 30 cm. y APGAR 6/7/9. Su fenotipo se caracteriza por oblicuidad antimongoloide y posible hipertelorismo, nariz pequeña con alas pequeñas, orejas ligeramente bajas con antihelix prominente y trago pequeño, barbilla puntiaguda, fisura del paladar blando, luxación de caderas, genitales normales. Coloboma del ojo derecho. Comunicación interauricular (CIA). Hipotonía axial.</p>
<p>M-27</p>	<p>47,XY,+mar</p> <p>Niño prematuro afecto de cardiopatía congénita, atresia anal y rasgos dismórficos faciales. Síndrome de Treacher-Collins.</p>
<p>M-40</p>	<p>46,XX,add(17)(p13)</p> <p>Retraso psíquico, talla baja y fenotipo peculiar sin diagnóstico sindrómico específico: labios finos, anquilogloma en reposición, paladar alto, filtrum largo, nariz bulbosa y antevertida con raíz nasal ancha, frente amplia, orejas bajas, pequeñas y mal modeladas, fosita coccigea ciega, clinodactilia 5 dedo y genitales normales con surco labial subtotal.</p>
<p>M-41</p>	<p>46,XX,del(9)(q?)</p> <p>Feto en el cual la ecografía rutinaria muestra la presencia de hídrops. Tras interrupción voluntaria del embarazo se realiza anatomía patológica en la cual se observa: hipertelorismo, hendiduras palpebrales estrechas, nariz corta y ancha con raíz deprimida, microretrognatia, glosptosis, paladar hendido, orejas displásicas y rotadas posteriormente. Cuello ancho con edema nual. Tórax ancho con una implantación velamentosa del cordón umbilical. Braquidactilia, campodactilia en el segundo dedo de ambas manos. Dedos superpuestos. Sindactilia parcial cutánea en pie izquierdo de los dedos 2-3-4. Falange distal hipoplásica del tercer dedo del pie izquierdo. Clítoris pequeño, posición anterior del ano con esfínter externo prominente. Ventriculomegalia moderada y dilatación renal bilateral pielocalicial, más acentuada en pelvis derecha.</p>
<p>M-43</p>	<p>46,XX, inv(9)(p11q12), ins(16;?)(q22.3;?)</p> <p>Niña nacida a las 38 semanas de gestación en la que se había detectado retraso de crecimiento intrauterino y braquicardia. Presentó bajo peso al nacer e hipertonia durante el primer año de vida. A los 4 meses de edad requirió atención pediátrica por llanto inconsolable (80% del día. Presenta rasgos dismórficos leves: orejas displásicas, imperforación del lacrimal, fosita preauricular izquierda y pies deformes (<i>metatarsus adductus</i>). También retraso psicomotor y de lenguaje. Sin embargo, lo que ha centrado la clínica de esta paciente son sus problemas de comportamiento: además del llanto inconsolable presenta problemas para conciliar y mantener el sueño (con fase REM casi inexistente) y un serio déficit de atención.</p>

<i>Caso</i>	<i>Fenotipo</i>
M-51	46,X,add(Y)(q12) Feto en el cual la ecografía de alta resolución muestra la presencia de tres marcadores de aneuploidia: quistes de plexos coroideos, ectasia piélica y derrame pericárdico.
M-64	47,XY,+mar Neonato con atresia anal, orejas dismórficas y anemia.
M-66	46,XY,der(9)del(9)(p22?)t(2;9)(p11;p11) Feto en el cual la ecografía rutinaria muestra marcada dolicocefalia e hiperrefringencia intestinal. Diámetro biparietal de 27 mm., perímetro craneal 124 mm., longitud de fémur 20 mm. Y circunferencia abdominal de 104 mm.
M-67	47,XY,+mar Feto en el cual la ecografía rutinaria muestra defecto de tubo neural a nivel sacro (meningocele), ventriculomegalia y signo del limón.
M-71	46,XX,r(15)(p11q26) Recién nacida con distrés respiratorio y retraso de crecimiento intrauterino. Muestra una falange distal del pulgar de la mano derecha bífida, displasia de caderas, ictericia patológica. Al año y medio de vida muestra retraso en el crecimiento pero un desarrollo neurológico normal. Presenta rasgos dismórficos leves: micrognatia, cara triangular y pelo mechado
M-74	46,XY,r(15)(p11q26) Niño de 13 años de edad, al que se le realiza cariotipo por un aparente enanismo congénito. Se sabe que presentó bajo peso al nacer. En su infancia ha tenido problemas de alimentación, talla baja y un retraso psicomotor severo. Coeficiente intelectual de 46. Lenguaje muy limitado. Extremidades del lado derecho más cortas con cojera al caminar y torpeza en mano derecha. Rasgos dismórficos leves: micrognatia, orejas prominentes y cara triangular.

3.2 TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

El estudio de cromosomas mediante las técnicas de citogenética convencional y algunas técnicas de FISH, requiere la presencia de células en división. Únicamente durante la división celular, especialmente en metafase, los cromosomas pueden ser identificados individualmente al microscopio. Cualquier tejido que contenga células en división puede utilizarse para un estudio citogenético convencional. Los cromosomas metafásicos se suelen obtener *in vivo*, a partir de muestras que tienen un alto índice de división mitótica (vellosidades coriales, médula ósea, tumores sólidos, etc.), e *in vitro* induciendo químicamente la división celular (linfocitos de sangre periférica, biopsias de tejido y células de líquido amniótico) mediante la realización de cultivos celulares.

La realización de cultivos celulares, se ha llevado a cabo en condiciones estériles y con material previamente esterilizado, con el objetivo de prevenir posibles contaminaciones que pudiesen afectar a la viabilidad celular.

TÉCNICA DE CULTIVO DE SANGRE PERIFÉRICA

En primer lugar, cabe destacar que es importante obtener una muestra fresca de sangre periférica (SP), para asegurarnos de que ésta contiene células vivas capaces de dividirse. Se extraen entre 1 y 5 ml de SP con una jeringa estéril, y se traspasan a un tubo estéril comercializado que contiene heparina sódica al 1% (*Rovi*) como anticoagulante. Para un óptimo crecimiento del cultivo se recomienda el uso de heparina sódica y no de litio.

Cultivo estándar

La muestra de SP puede sembrarse al cabo de varios días de haber sido extraída, sin embargo, para la obtención de un cultivo óptimo, la siembra debe realizarse dentro de las primeras 24 horas tras la extracción. La muestra debe mantenerse a temperatura ambiente o a 4°C hasta su procesamiento, evitando en cualquier caso temperaturas extremas.

Las células se hacen crecer en un medio de cultivo acuoso. Se siembran 0,6 ml de muestra en un tubo cónico que contiene 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (*Gibco*). En el caso de tratarse de sangre periférica procedente de un neonato se siembra la misma cantidad de muestra en un falcon que contiene 10 ml de medio RPMI-1640.

El medio de cultivo contiene una solución salina consistente en un sistema tamponado encargado de mantener el pH y se suplementa con:

- 20 % Suero fetal bovino (FCS- Fetal calf serum) (*Biological Industries*), el cual contiene factores esenciales para un buen crecimiento celular.
- 2% L-glutamina (*Biological Industries*), aminoácido esencial para el crecimiento celular.
- 2% Penicilina /Estreptomina (100U/ml) (*Biological Industries*), antibióticos que retrasan el crecimiento de microorganismos evitando contaminaciones del cultivo. Los fungicidas sólo se usan en caso estrictamente necesario, ya que tienen el inconveniente de que retrasan el crecimiento celular.
- 4% Fitohematoglutinina (PHA) (10µg/ml) (*Gibco*), mitógeno que estimula la proliferación de los linfocitos T.

Tras la siembra, el cultivo se mantiene en una estufa a 37°C y con una atmósfera del 5% de CO₂, el cual asegura el mantenimiento del pH del medio de cultivo entre 7,2-7,4. El cultivo se mantiene en el incubador con el tubo inclinado y el tapón medio abierto hasta alcanzar el pico máximo de crecimiento exponencial celular, lo cuál tiene lugar a las 72 horas de cultivo. En este momento, se inicia la extracción del cultivo añadiendo 0,1 ml de Colcemid (*IrvineScientific*) a una concentración final de 0,04 µg/ml, y se incuba a 37°C durante 30 min. Este antimitótico, análogo de la colchicina, se une a una proteína conocida como tubulina, impidiendo la despolimerización del huso mitótico. De este modo, al impedir la separación de las cromátidas hermanas en anafase, las células quedan bloqueadas en estado de metafase. Una exposición demasiado prolongada al antimitótico, si bien aumenta el número de células en metafase, también aumenta la condensación cromosómica lo cual dificultará posteriormente la detección de anomalías cromosómicas.

A continuación, se centrifuga a 1.800 rpm durante 8 min., se decanta el sobrenadante y se somete la suspensión celular a un choque hipotónico añadiendo 7 ml de una solución de Cloruro Potásico (KCl 0,075M) (*Scharlab*), dejándola actuar durante 20 min. en baño maría a 37°C. Esta solución hipotónica, al contener una menor concentración de sales que el citoplasma de la célula, provoca la entrada de agua en la célula por un fenómeno de ósmosis haciendo que ésta se hinche. Se considera que el choque hipotónico es un paso crítico del cual dependerá más tarde la obtención de buenas extensiones cromosómicas. Conviene controlar muy bien el tiempo, ya que si la exposición es demasiado prolongada la célula podría lisarse, en cambio una exposición demasiado corta no hincharía suficientemente las células, lo cuál dificultaría la obtención de buenas extensiones.

Seguidamente, se centrifuga a 1.800 rpm durante 8 min., se decanta el sobrenadante y se añade la solución fijadora (Carnoy), recién preparado, mezclando metanol y ácido acético en proporción 3:1 (*Scharlab*). Esta solución se añade en un principio gota a gota, por la pared del

tubo y posteriormente en agitación haciendo uso de un rotor hasta alcanzar los 8 ml/tubo, de este modo se consigue detener la acción de la solución hipotónica y fijar las células. El metanol precipita la cromatina y el ácido acético lisa las distintas estructuras membranosas de la célula sin precipitarlas. Posteriormente, se realizan lavados adicionales con Carnoy para eliminar los restos celulares, siendo necesarios unos 3-4 lavados para obtener un material limpio. En estos lavados, se disminuye el tiempo y la velocidad de centrifugación (6 min. a 1.600 rpm). Es importante añadir Carnoy fresco, es decir, recién preparado, ya que éste absorbe rápidamente agua de la atmósfera, lo cual afecta posteriormente de forma negativa a la calidad de los cromosomas que se obtienen. En el último lavado, se decanta y se resuspende el botón manualmente añadiendo 2-3 ml de Carnoy. De este modo, puede conservarse el material fijado a 4°C hasta el momento de realizar la extensión.

Finalmente, la suspensión celular fijada se extiende sobre un portaobjetos previamente desengrasado con metanol absoluto a -20°C durante 20 min. y secado manualmente con papel de celulosa, para su posterior tinción y análisis. La concentración de suspensión celular se debe ajustar añadiendo más o menos Carnoy hasta obtener un resultado satisfactorio. Una buena preparación debe tener un número suficiente de metafases bien extendidas, con el menor número de solapamientos posibles y libres de citoplasma. Existen numerosas variantes que afectan a la obtención de buenas extensiones, entre ellas: temperatura ambiente, humedad y el propio tratamiento hipotónico. La alta temperatura y la humedad favorecen la obtención de buenas preparaciones. Otras variables son la altura desde la que se realiza la extensión y el uso de portaobjetos humedecidos con agua destilada.

El material fijado sobrante se puede conservar a -20° C, durante 5-6-años.

Cultivo de alta resolución

De forma rutinaria, los cromosomas se analizan en estado de metafase, estado en el que dicho material alcanza el máximo grado de condensación. Aunque la resolución obtenida (400-550 bandas) es suficiente, puede ocurrir que pequeñas anomalías estructurales pasen inadvertidas. Ello aconseja que, en ocasiones, sea necesario obtener cromosomas más largos, menos condensados, conocidos como prometafásicos (en los que se alcanza una resolución de aproximadamente 850 bandas).

La obtención de cromosomas prometafásicos se realiza mediante una sincronización celular y realizando algunos cambios respecto al cultivo estándar. El tiempo total de cultivo es de 96 h. A las 72h. de incubación, se añade al cultivo metotrexato (MTX) (*Sigma*), a una concentración final de 10⁻⁶ M. El MTX es un antagonista del ácido fólico que bloquea la síntesis del ADN en la fase S, bloqueando por tanto, el ciclo celular. Transcurridas 17-19 h., las células se desbloquean haciendo un lavado con medio RPMI-1640. A continuación se añade timidina (*Sigma*) a una

concentración final de 10^{-5} M, la cual induce la síntesis de ADN, reactivando así la división celular. De este modo, se consigue sincronizar el cultivo. A las 5 h. de haber añadido la timidina, se añaden 0,1 ml de colcemid a una concentración de 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dejándolo actuar durante 2 h., continuando con el proceso como en el caso del cultivo estándar.

TÉCNICA DE CULTIVO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO.

La amniocentesis es una técnica de diagnóstico prenatal invasiva que se suele realizar alrededor de la semana 16 de gestación e implica un riesgo de aborto del 0,5-1%. Para su realización es necesaria la obtención, en condiciones estériles, de 10-20 ml de líquido amniótico (LA) (se aconseja extraer 1 ml por semana de gestación como máximo). Su posterior transporte debe realizarse protegido de la luz y a temperatura ambiente, nunca en nevera, ya que temperaturas extremas perjudican seriamente la viabilidad del cultivo.

Cultivo estándar

La muestra de LA contiene distintos tipos celulares procedentes de la piel del feto, del aparato urinario y gastrointestinal y del amnios, células conocidas como amniocitos. La mayoría de estos tipos celulares son células viejas o muertas, no útiles para un cultivo celular.

Si el volumen de muestra lo permite, esta se divide en dos o incluso tres tubos, obteniendo así posteriormente 2 o 3 líneas de cultivo. Estos se centrifugan durante 8 min. a 1.800 rpm con el fin de recuperar en el botón aquellas pocas células viables para cultivarlas. Paralelamente, y a partir del sobrenadante obtenido se pueden realizar distintos tipos de pruebas bioquímicas, entre ellas la α -fetoproteína y la acetilcolinesterasa. Así pues, una vez resuspendido el botón se siembra en falcons, en los cuales previamente se han añadido 3 ml de medio de cultivo específico (*AmnioMAXTM-C100*), el cuál contiene sales, hormonas, vitaminas, glucosa y un pH y presión osmótica controlados. Este medio se suplementa con un 20% de suero fetal bovino (FCS), 2% Penicilina-Estreptomicina y un 2% L-glutamina.

El cultivo se mantiene en una estufa a 37°C y al 5% de CO₂, con el tapón medio abierto. Durante este proceso de incubación debe llevarse a cabo un control del crecimiento celular. El primer cambio de medio de cultivo se realiza aproximadamente al sexto día. El medio de cultivo, de un color rosáceo, contiene un indicador de pH que vira hacia un color amarillento cuando este agota sus nutrientes. Al observar al microscopio óptico invertido la formación de una monocapa (11-13 días) se procede a la extracción del cultivo. Se añaden 0,3 ml de Colcemid a una concentración final de 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incuba a 37°C durante 2 h. Pasado este tiempo se observa al microscopio óptico invertido el número de divisiones presentes en el cultivo, células de aspecto redondo y refringente. Se retira el medio de cultivo y se lavan los falcons con 3 ml de

solución salina (*Gibco*), eliminando así restos de medio que podrían interferir posteriormente. Se añaden 2 ml de tripsina-EDTA 0,25% (*Gibco*), proteasa que se encarga de romper las uniones intercelulares, dejando que actúe durante 2 min. a 37°C. Se observa al microscopio si las células se han desenganchado y a continuación se añade medio de cultivo para neutralizar la acción de la tripsina. Se colocan los falcons en posición vertical para poder recoger mejor su contenido, el cuál se traspasa a un tubo cónico. Se centrifuga 5 min. a 1.000 rpm. Se decanta el sobrenadante y se añaden 7 ml de solución hipotónica (KCl 0,075M) gota a gota, incubando los tubos a 37°C durante 15 min. Se centrifuga 5 min. a 1.000 rpm y se decanta de nuevo el sobrenadante. Se fija la suspensión celular con Carnoy, añadiendo fijador primero gota a gota y por la pared del tubo y posteriormente de forma continua enrasando a 8 ml. Se centrifuga, se decanta y se repite este proceso de fijación tres veces más, añadiendo 1 ml menos de Carnoy en cada lavado. En el último lavado, se decanta y se resuspende el botón manualmente añadiendo 2-3 ml de Carnoy. De este modo, puede conservarse el material fijado a 4°C hasta el momento de realizar la extensión.

Finalmente, las células fijadas se extienden sobre un portaobjetos previamente desengrasado en metanol al 70% a -20°C durante 20 min. para su posterior tinción y análisis.

El material fijado sobrante se puede conservarse a -20° C, durante 5-6-años.

TÉCNICA DE CULTIVO DE VELLOSIDAD CORIAL

Para obtener un buen resultado en el procesamiento de muestras de vellosidad corial (CV), estas se transportan en un medio estéril específico (RPMI, 1% heparina, 2% L-glutamina y 2% penicilina-estreptomicina) o en su defecto en suero fisiológico estéril. En este caso especialmente, es muy importante sembrar la muestra lo antes posible tras su extracción para garantizar la viabilidad del cultivo.

Cultivo corto de vellosidad corial

Se preparan tres cápsulas de Petri. En una de ellas, se introducen 1,5 ml de solución salina (*Gibco*) donde se efectuará la separación del material materno y la disgregación del material fetal. En las otras dos cápsulas se añaden 2 ml de medio de cultivo (una se utilizará para el cultivo corto o semidirecto y la otra para el cultivo largo). El medio de cultivo es el mismo que el utilizado para el cultivo de LA. Con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se recogen las vellosidades del tubo de transporte y se introducen en la placa que contiene solución salina. Se valora bajo la lupa la cantidad y calidad de las vellosidades presentes. Se separa el tejido materno (vellosidades de color gris y menos ramificadas) del fetal. Se traspasan las vellosidades fetales a las placas con medio de cultivo. Una vez se ha confirmado, bajo la lupa, que no queda ningún

resto de material materno, se incuban a 37°C y 5% CO₂ durante 48 h. Para la extracción de cultivo, se añaden 0,2 ml de Colcemid, dejándolo en la estufa aproximadamente 1 h. Con la ayuda de una pipeta se traspara la vellosidad a un tubo cónico de cristal. Se añaden 5 ml de una solución hipotónica (citrato sódico al 1%) a 37°C. Se incuba a 37°C durante 30 min. Se añaden, con pipeta Pasteur, 6 ml de solución fijadora (ácido acético-etanol en proporción 4:1) gota a gota y golpeando suavemente con el dedo. Se tapa el tubo y se deja que actúe la solución fijadora a 4°C durante 20 min. Se retira el fijador y se añaden 5 ml de solución fijadora fresca, dejándola actuar a temperatura ambiente durante 20 min. Se repiten los pasos anteriores añadiendo esta vez 4 ml de solución fijadora. Se incuba a 4°C por lo menos 2 h. antes de realizar la extensión, la cual se realiza del modo habitual. No obstante, se aconseja calentar los portaobjetos en estufa o directamente sobre la plaza calefactora a 42-45°C.

El material fijado sobrante se puede conservarse a -20° C, durante 5-6-años.

Cultivo largo de vellosidad corial

Bajo la lupa y con la ayuda de dos agujas, se fragmentan las vellosidades lo más pequeñas posibles. Se traspasa mediante una pipeta Pasteur a un tubo de centrífuga. Se dejan sedimentar las vellosidades por sí solas. Se añade 1 ml de tripsina y se incuba a 37°C inclinando el tubo unos 45° durante al menos 15 min. Se coloca el tubo en posición vertical y se dejan sedimentar las vellosidades. Se retira la tripsina con la ayuda de una pipeta Pasteur y se añade 1 ml de Colagenasa. Se incuba a 37°C durante 20 min. y se centrifuga a 1.800 rpm, 8 min. Se retira el sobrenadante y se resuspenden las vellosidades con 3 ml de medio de cultivo. Se reparten las vellosidades en 2 falcons distintos, incubándolos con el tapón medio abierto en estufa a 37°C y 5% CO₂. El resto de protocolo (seguimiento, extracción, lavados, etc.) es el mismo que se aplica en las muestras de LA.

El material fijado sobrante se puede conservarse a -20° C, durante 5-6-años.

3.3 TÉCNICAS DE BANDEO CROMOSÓMICO

Para la identificación individualizada de los cromosomas se han utilizado diferentes métodos.

BANDAS G.

Las bandas G se pueden obtener indistintamente mediante dos protocolos distintos, (en ambos casos es necesario envejecer las preparaciones en estufa a 65°C durante 14h o durante 3 días a temperatura ambiente):

1. **Bandeo GTG** (Bandas G obtenidas con Tripsina y Giemsa). Los cromosomas son tratados enzimáticamente con tripsina, que desnaturaliza su contenido proteico, y teñidos con colorante Giemsa o Leishman. Los tiempos se establecen en función del tipo de muestra y de las condiciones particulares de cada laboratorio.

2. **Bandeo G con colorante Wright.** Es el protocolo más utilizado. En éste se introducen las preparaciones durante 1 min. en una solución salina de 2xSSC (Citrato trisódico (*Merck*), disuelto en NaCl 0,3M), a 65°C, así se abre la hebra de ADN. Se lava la preparación con agua destilada y se seca al aire. A continuación, se tiñe con una solución de colorante Wright al 0,25% (*Sigma*) (2,5 gr. colorante + 1000 ml metanol disuelto en agitador magnético 45 min., filtrado y envejecido a temperatura ambiente una semana, o bien, 3 días a 37°C) y tampón Sörensen (*Merck*) en proporción 1:3 durante 2-3 min. El tampón Sörensen es una mezcla de solución A (KH_2PO_4 , 9,08 g/l) y solución B (Na_2HPO_4 , 12,88 g/l) en una proporción (1:1 en volumen) y ajustada a pH 6,8. Se lavan con agua y se dejan secar (Fig. 18a). Los tiempos se establecen en función del tipo de muestra y de las condiciones particulares de cada laboratorio.

BANDAS C.

También denominadas como bandas CBG (bandas C obtenidas con hidróxido Bárico usando Giemsa), no obstante en nuestro caso en lugar de Giemsa se ha utilizado colorante Leishman (Fig. 18b).

El método consiste en introducir las preparaciones en una cubeta con HCl 0,02N (2ml HCl+100 ml H₂O destilada) a temperatura ambiente durante 10 min. Se lava con agua y se dejan secar al aire. A continuación, se introducen las preparaciones en una cubeta a 60°C con Ba(OH)₂ saturado (100 ml H₂O+304 g de Ba(OH)₂) durante 1 min. El hidróxido de bario despuriniza y desnaturaliza el ADN. Se realizan dos lavados con agua destilada y metanol para eliminar restos de bario. Se dejan secar las preparaciones y se incuban en 2xSSC a 65°C durante 15 min. Se lavan las preparaciones y se dejan secar. Se tiñen con colorante Leishman al 20% o Giemsa durante 5-10 min.

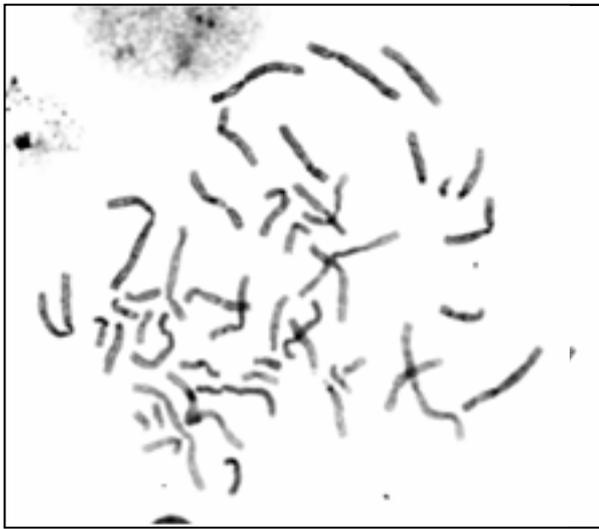
Hay que tener en cuenta, que ésta técnica degrada un 50% del material cromosómico, lo cual dificulta la posterior aplicación de otras técnicas. La heterocromatina constitutiva resiste a la degradación y es por tanto el único material que queda teñido.

BANDAS NOR

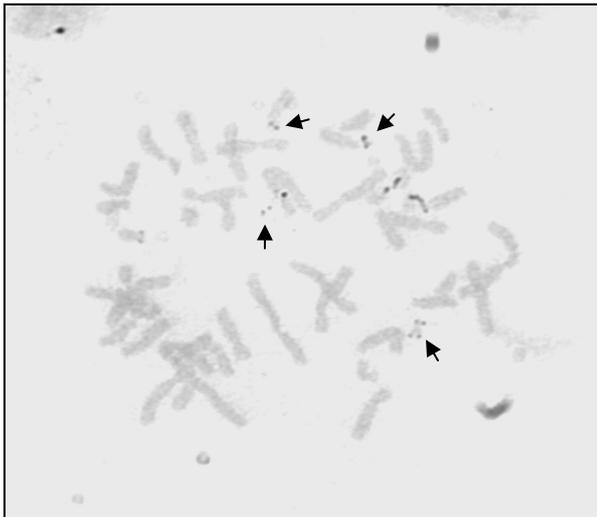
Para la obtención de unas bandas NOR (Fig. 18c) se requiere una solución de nitrato de plata al 50% (0,5 g $AgNO_3$ +1 ml de agua destilada/miliQ) que debe filtrarse. Se añaden 0,2 μ l. de esta solución sobre la preparación y además 6-8 gotas de una solución de formaldehído al 0,3% (en agua destilada/miliQ) que acelera la tinción. Se incuba a 37°C durante 24 h. protegido de la luz.



a



b



c

Figura 18. Metafasas correspondientes al paciente M-72 tratadas con diferentes técnicas de bandeado: a) bandas G con colorante Wright, b) bandas C y c) bandas NOR.

3.4 HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

La preparación de las extensiones metafásicas es común a todos los protocolos de FISH. Al igual que en citogenética convencional, es muy importante conseguir una buena preparación cromosómica (cromosomas largos, bien extendidos y libres de restos citoplasmáticos) a partir de la suspensión celular. Por ello, y antes de realizar cualquier protocolo de hibridación debe evaluarse la calidad de la preparación observándola en un microscopio de contraste de fases. Los cromosomas deben presentar un color grisáceo y no refringente. También debe determinarse la cantidad de citoplasma que contiene para más tarde ajustar los tiempos de los tratamientos enzimáticos (siempre que estos sean necesarios) en función de lo limpia que se encuentre la extensión.

En algunos casos es necesario envejecer la preparación, ya que con ello adquiere una mayor resistencia a los tratamientos enzimáticos. El envejecimiento se puede realizar indistintamente durante 3 días a temperatura ambiente, a 65 °C 16-18 h. o a 90°C durante 10 minutos. En cualquier caso, una vez envejecida la preparación se realiza un lavado con 2xSSC (pH 7,4) a 37°C durante 30-60 min. Se deshidrata la extensión en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100% a temperatura ambiente, 1 min. en cada uno y se deja secar la preparación. Para conservar la preparación una vez envejecida, ésta debe mantenerse a -20°C hasta su posterior utilización.

3.4.1 FISH convencional

Se ha aplicado esta técnica de FISH, en algunos casos, con el fin de confirmar los resultados obtenidos con otras metodologías. Para ello, se han utilizado sondas comerciales específicas de: locus (LSI), centroméricas (CEN), subteloméricas y de pintado cromosómico (WCP).

3.4.1.1 FISH locus específica

Las sondas locus específicas utilizadas en este trabajo han sido las aplicadas de rutina para el diagnóstico citogenético de determinados síndromes por microdelección.

Síndrome de Prader-Willi: LSI *Síndrome Prader-Willi/Angelman Dual Color probe (SNRPN SpOr/CEP 15 SpGr/PML SpOr) (Vysis).*

Sonda que identifica el locus SNRPN, localizado en la región 15q11-q13 del cromosoma 15. Las sondas CEP 15 (D15Z1) *SpectrumGreen* y LSI PML *SpectrumOrange* son controles internos 15p y 15q (Fig. 19).

Síndrome de DiGeorge: LSI Síndrome DiGeorge/VCFS Dual Color probe (TUPLE 1 SpectrumOrange / ARSA SpectrumGreen) (Vysis).

La sonda Síndrome DiGeorge/VCFS (TUPLE 1 SpectrumOrange/ ARSA (22q13.3) SpectrumGreen Control Probe) permite identificar deleciones de la banda 22q11.2 encontradas en los síndromes de DiGeorge y Velocardiofacial (VCFS) (Fig. 19).

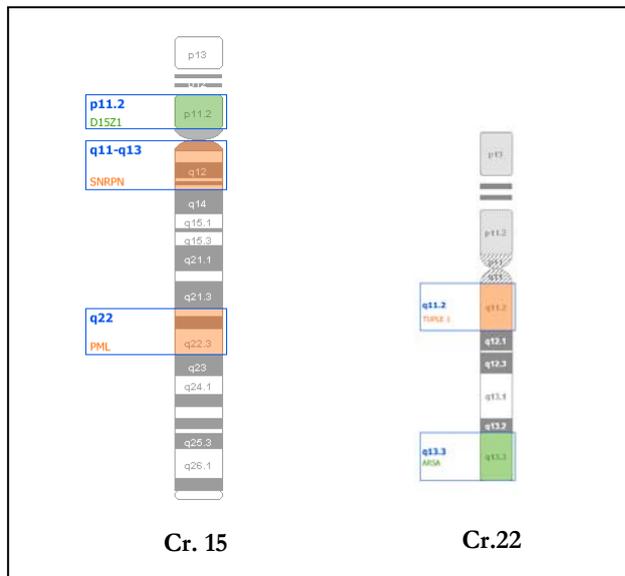


Figura 19. Ideogramas de los cromosomas 15 y 22 humanos donde se indican las bandas que hibridan con las sondas locus específicas de las regiones involucradas en el síndrome de Prader Willi/Angelman (SNRPN) y DiGeorge (ver texto).

Protocolo

Se deja descongelar la sonda y el tampón correspondiente, suministrado por la casa comercial, y se centrifugan a 1.800 rpm durante 1 min. A continuación, se mezclan 1 µl de sonda ,7 µl de tampón y 2 µl de agua destilada. Se centrifuga a 1.800 rpm durante 1 min. Se depositan los 10 µl de la mezcla en el área de la preparación a hibridar. Se sella con un cubreobjetos y con parafilm y se coloca la preparación en hibridador *Hybrite* (Vysis), dejándola hibridar durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se procede a retirar con cuidado el parafilm y el cubreobjetos de la preparación y a realizar los lavados con el fin de eliminar la hibridación inespecífica y la sonda no incorporada. Para ello, se lava la preparación en una solución 0,4xSSC/0,3% NP-40 a 73°C durante 2 min. y a continuación, se realiza otro lavado de 3 min. en 2xSSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente. Se deja secar la preparación y se añaden 10 µl de contratinción DAPI II

(125 ng 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) /ml *antifade*)(*Vysis*) Se puede conservar a 4°C hasta su análisis.

Las señales se visualizan con un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros específicos correspondientes. Las imágenes se obtienen a través de una cámara CCD y con la ayuda de un *software* específico (*Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK*).

Para cada caso se visualizan entre 5-10 metafases.

3.4.1.2 FISH subtelómero específica

Esta técnica se ha aplicado utilizando una sonda comercial (*TeVysion ADN probes, Vysis*).

Protocolo

Se lava la preparación en 1xPBS durante 5 min. a temperatura ambiente. Se deshidrata en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100%, a temperatura ambiente, 1 min. en cada uno, dejando secar. A continuación, se introduce la preparación en una solución de pepsina a 37°C durante 6 min. Se realizan 2 lavados de 5 min. en 2xSSC a temperatura ambiente.

Se introduce la preparación en una solución fijadora de formaldehído al 1% (en PBS /50 mM MgCl₂) a temperatura ambiente durante 4 min. Se realizan 2 lavados en 1xPBS a temperatura ambiente de 5 min. de duración. Se deshidrata la preparación en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100% a temperatura ambiente, 1 min. en cada uno y se deja secar.

Una vez finalizado este pre-tratamiento, se desnaturaliza la preparación en una solución de formamida al 70% a 73°C durante 3 min. Se deshidrata en una serie de etanoles fríos al 70%, 85% y 100%, 1 min. en cada uno, dejando secar.

Paralelamente, se desnaturalizan 5 µl de sonda (*TeVysion ADN probes, Vysis*) en baño a 73°C durante 5 min. Finalmente, se aplican 5 µl de sonda sobre el área seleccionada para ser hibridada. Se coloca el cubreobjetos y se sellan los contornos. Se incuba en una cámara húmeda, a temperatura a 37°C 16-18 h.

Transcurrido este tiempo, se retira el cubreobjetos con cuidado y se introduce la preparación durante 2 min. en una cubeta con 0,4xSSC/0,3% NP40, previamente calentada a 73°C, agitándolo durante los primeros segundos. Se lava de nuevo durante 2 min., sumergiéndola en una cubeta con 2xSSC/0,1% NP40 a temperatura ambiente. Se deja secar en la oscuridad y finalmente, se añaden 12 µl de una dilución DAPI ¼ (0,032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield).

Las señales se visualizan con un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros específicos correspondientes. Las imágenes se obtienen a través de una cámara CCD y con la ayuda de un *software* específico (*Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK*).

Para cada caso se visualizan entre 5-10 metafases.

3.4.1.3 FISH de pintado cromosómico

3.4.1.3.1 Pintado cromosómico simple

En esta técnica se ha aplicado utilizando una sonda comercial (*STAR*FISH chromosome paints, Cambio*).

Protocolo

Se desnaturalizan 5 µl de sonda (*STAR*FISH chromosome paints, Cambio*) en baño a 65°C durante 10 min. Seguidamente se deja la sonda desnaturalizada a 37°C, durante un máximo de 60 min. Se lava la preparación en 1xPBS durante 5 min. a temperatura ambiente. Se deshidrata en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100%, a temperatura ambiente, 1 min. en cada uno, dejando secar. A continuación, se introduce la preparación en una solución de pepsina a 37°C durante 5 min. Se realizan 2 lavados de 5 min. en 2xSSC a temperatura ambiente. Se introduce la preparación en una solución fijadora de formaldehído a temperatura ambiente durante 2 min. (si esta solución no está recién preparada, se debe alargar el tiempo de fijación hasta 4 min.). Se realizan 2 lavados en 1xPBS a temperatura ambiente de 5 min. de duración. Se deshidrata la preparación en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100% a temperatura ambiente, 1 min. en cada uno y se deja secar.

Una vez finalizado este pre-tratamiento, se desnaturaliza la preparación en una solución de formamida al 70% a 73°C durante 5 min. (tiempo variable en función del tipo de muestra, así para muestras de SP se desnaturaliza durante 5 min. mientras que para muestras de LA Y CV se reduce el tiempo a 4 min.). Se deshidrata en una serie de etanoles fríos diluidos al 70%, 85% y 100%, 1 min. en cada uno, dejando secar.

Finalmente, se aplican 5 µl de sonda sobre el área seleccionada para ser hibridada. Se coloca el cubreobjetos y se sellan los contornos con goma para prevenir la evaporación de la sonda durante la hibridación. Se incuba en una cámara húmeda, atemperada a 37°C 16-18 h.

Transcurrido este tiempo, se retira el cubreobjetos con cuidado y se introduce la preparación durante 2 min. en una cubeta con 0,4xSSC/0,3% NP40, previamente calentada a 73°C, agitándolo durante los primeros segundos. Se lava de nuevo durante 2 min., sumergiéndola en una cubeta con 2xSSC/0,1% NP40 a temperatura ambiente. Se deja secar en la oscuridad y finalmente, se añaden 12 µl de una dilución DAPI ¼ (0,032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield).

Se puede conservar a conservar a -20°C hasta su análisis.

Las señales se visualizan con un microscopio de fluorescencia dotado de los filtros específicos correspondientes. Las imágenes se obtienen a través de una cámara CCD y con la ayuda de un *software* específico (*Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK*).

Para cada caso se visualizan entre 5-10 metafases.

3.4.1.3.2 Pintado cromosómico múltiple

A diferencia de la M-FISH, con el pintado cromosómico múltiple se consigue pintar todos los cromosomas pero en metafases independientes. Esta variante de FISH se ha realizado utilizando el *kit* comercial *Chromoprobe-M Multiprobe System, (CytoCell Ltd, UK)*.

Protocolo

El portaobjetos comercial esta dividido en 24 áreas, en cada una de ellas se visualizará de forma fluorescente una pareja de cromosomas homólogos distinta. Se introducen 2 µl de suspensión celular en cada área de hibridación.

Por otro lado, el *kit* contiene un soporte multisonda con 24 pocillos que contienen sonda marcada con Cy3 de un cromosoma distinto en cada pozo. Se introducen 2 µl de tampón de hibridación precalentado a 37°C en cada pocillo.

A continuación, se monta la hibridación haciendo coincidir portaobjetos con la muestra cargada y el soporte multisondas. Se precalienta en una placa calefactora a 75°C durante 5 min. Posteriormente, se incuba a 37 °C en una cámara húmeda 16-18 h. Se retira el soporte y se lava el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con 0,4xSSC /0,3 NP-40 a 73°C durante 2 min. y a continuación, en una cubeta con 2xSSC /0,1-1% NP-40 a temperatura ambiente durante 3 min. agitando durante los primeros segundos en ambos lavados. Se deja secar al aire y se realiza la contratinción con DAPI.

Se puede conservar a -20°C hasta su análisis.

Las señales se visualizan con un microscopio de fluorescencia dotado de los filtros específicos correspondientes. Las imágenes se obtienen a través de una cámara CCD y con la ayuda de un *software* específico (*Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK*).

Para cada caso se visualizan entre 5-10 metafases.

3.4.2 FISH multicolor

La utilización de un cóctel de 24 sondas de colores distintos permite la visualización simultánea en la misma metafase de todos los cromosomas. Las sondas pueden ser de pintado cromosómico (M-FISH), centroméricas (cenM-FISH) o subteloméricas (telM-FISH), en este trabajo se han utilizado las dos primeras.

3.4.2.1 Multipintado (M-FISH)

La técnica de M-FISH se ha aplicado utilizando una sonda cóctel comercial (*SpectraVision Assay, Vysis*). El set de fluorocromos utilizados está compuesto por DAPI usado como contratinción del ADN, Fluoresceína (FITC) y colorantes de cianina: Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7. En la Figura 20 se detalla el marcaje característico de cada par de cromosomas homólogos según el *kit* de sondas utilizado.

Protocolo

Previamente a la hibridación se lleva a cabo un tratamiento post-fijación. Para ello, se lava la preparación en 1xPBS durante 5 min. a temperatura ambiente. Se deshidrata en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100%, 1 min. en cada uno a temperatura ambiente. Dependiendo de lo limpia que esté la preparación, se aplican 20 µl de RNAsa 100 µg/ml sobre la gota de material a hibridar. Se cubre con un cubreobjetos de 20 x 20 mm. y se incuba a 37°C en cámara húmeda durante 30 min. Se retira el cubreobjetos y se realizan 2 lavados en 2xSSC a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se sumerge la preparación en una solución de pepsina 0,05 µg/ml (*Sigma P-7000*) (49,5 ml H₂O mili Q + 0,5 ml HCl 1 M + 25 µl pepsina stock solution (100mg/ml)), previamente calentada a 37°C durante 5 min. Es importante destacar que la pepsina debe añadirse en el último momento y que el tiempo de tratamiento varía en función del tipo de muestra a analizar y de lo limpia que esté. Se realizan 2 lavados de 5 min. en 2xSSC a temperatura ambiente. Se introduce la preparación en una solución fijadora de formaldehído (41,14 ml H₂O+2,5 ml MgCl₂1M+5 ml 10xPBS + 1,35 ml Formaldehído 37%) a temperatura ambiente durante 2 min. (en el caso de que esta solución no se haya preparado el mismo día se debe aumentar en 1 o 2 min. el tiempo de actuación). Se realizan 2 lavados en 1xPBS a temperatura ambiente durante 5 min. Se deshidrata la preparación en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100% a temperatura ambiente, 1 min. en cada uno y se deja secar.

Antes de iniciar la hibridación, se procede a comprobar si la preparación está en condiciones de ser hibridada observándola al microscopio de contraste de fases. El área de la preparación que deseamos hibridar se delimita, en la cara posterior, con un lápiz de diamante. También es útil en

este punto, escoger las coordenadas de algunas metafases, para posteriormente localizarlas más rápidamente.

Se desnatura la preparación en una solución de formamida al 70% (14 ml H₂O mili Q + 7 ml 20x SSC pH 5,3 + 49 ml de formamida) a 73°C durante 5 min. Este tiempo varía en función del tipo de muestra, así para muestras de SP se desnatura durante 5 min. mientras que para muestras de LA y CV se reduce el tiempo a 3-4 min. Se deshidrata en una serie de etanoles fríos diluidos al 70%, 85% y 100%, 1 min. en cada uno, dejando secar. Mientras tanto, se corta el cubreobjetos a la medida deseada (aproximadamente 20 x 20 mm.). A continuación, se añaden 4-6 µl de sonda SpectraVysion (Vysis) en un tubo de microcentrífuga y se desnatura la sonda en baño a 72°C durante 5 min. Finalmente, se aplica la sonda sobre el área seleccionada para ser hibridada. Se coloca el cubreobjetos y se sellan los contornos con goma para prevenir la evaporación de la sonda durante la hibridación. Se incuba en una cámara húmeda, atemperada a 37°C 16-18 h.

A continuación, se realizan lavados para eliminar la hibridación inespecífica y aquellos restos de sonda que no hayan hibridado. Existen dos opciones de lavado:

a) *Lavado corto*: Se retira el cubreobjetos con cuidado y se introduce la preparación durante 2 min. en una cubeta con 0,4xSSC/0,3% NP40, previamente calentada a 73°C, agitándolo durante los primeros segundos. Se lava de nuevo, durante 2 min., sumergiéndola en una cubeta con 2xSSC/0,1% NP40 a temperatura ambiente. Se deja secar en la oscuridad y finalmente, se añaden 12 µl de una dilución DAPI ¼ (0,032 ng/µl en antifade) (Vectashield).

b) *Lavado largo*: Se introduce la preparación en formamida al 50% a 45°C durante 10 min. A continuación se sumerge en 2xSSC a 45°C durante 10 min. Seguidamente, se sumerge durante 5 min. en 4xSSC/0,05% Tween-20 a 45°C. Se deshidrata en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100%, 2 min. en cada uno. Finalmente, se realiza la contratinción, añadiendo 12 µl de una dilución DAPI ¼ (0,032 ng/µl en antifade) (Vectashield).

Para la **captura de imágenes** se ha utilizado un microscopio epifluorescente de alta calidad Olympus BX-60 (Olympus Optical CO., Hamburg, Germany), dotado con una rueda de filtros específicos para el set de cinco fluorocromos utilizados (SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold, SpectrumRed y SpectrumFRed) además de un filtro triple banda (FITC/PI/DAPI). Dicho microscopio tiene acoplados una cámara CCD de alta sensibilidad refrigerada (Photometrics Sensys), un sistema de captura Smartcapture (Vysis) y un analizador de imágenes computerizado de imágenes digitales dotado de un *software* específico para M-FISH (Quips SpectraVysion software, Vysis).

El **análisis de las imágenes** resultantes de la hibridación se basa en que cada cromosoma se marca con una combinación específica de fluorocromos (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7) captada mediante los filtros específicos correspondientes.

El marcaje combinatorio multi-fluorocromo requiere el análisis de señales espectrales obtenidas para cada sonda por separado (Fig. 20). El análisis se realiza tras la asignación booleana de un espectro para cada sonda la cual permite visualizar el material hibridado de cada sonda cromosómica. Paralelamente, la contratinción facilita la identificación de los cromosomas.

Para cada caso se analizan entre 5-10 metafases.

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

Figura 20. Esquema de los cócteles de fluorocromos empleados en la técnica de M-FISH para el marcaje específico de cada par cromosómico.

3.4.2.2 FISH multicolor centrómero específica (CenM-FISH)

Debido a que el cóctel de sondas centroméricas no está todavía comercializado, esta técnica sólo se pudo aplicar en el análisis de una de las muestras (caso M-27) en colaboración con la Dra. Oliver-Bonet (de nuestro laboratorio) y del Dr. Liehr (*Institut für Humangenetik und Anthropologie*, Jena, Alemania), siguiendo el protocolo descrito por Senger y col. en 1998.

Protocolo

Básicamente, consiste en obtener una mezcla o cóctel de ADN centromérico de todos los cromosomas, marcados con una combinación específica de fluorocromos (Fig. 21). Los fluorocromos utilizados han sido: Spectrum Orange (SO), Spectrum Green (SG), Spectrum Red (SR), Cy5 (BIO) y dietilaquamarine (DAC). Este cóctel se alícuota a volúmenes iguales y se añaden 25 µg de T-RNA y 2 µg de COT1-ADN (evita hibridación cruzada entre centrómeros distintos) para precipitar el ADN. Se deja secar el producto precipitado y se mantiene a -20°C hasta su utilización.

Una vez obtenido el cóctel de sondas se procede a realizar la hibridación. Se lava la preparación envejecida en 4xSSC/0,005%Tween20 unos pocos segundos. Se desnaturaliza en 70% formamida en 2xSSC a 70°C durante 2 min., se deshidrata y se deja secar a temperatura ambiente. Se resuspende el cóctel de sondas en 10 µl de tampón de hibridación (20% dextrano sulfato en 50% formamida/2xSSC) y se desnaturaliza durante 5 min. a 75°C. Por último, se pre-hibrida 10 min. a 37°C y seguidamente se hibrida en cámara húmeda a 37°C 16-18 h.

Se realizan los lavados post-hibridación sumergiendo la preparación en 0,4xSSC a 70°C durante 2 min. y a continuación en 4xSSC/0,005%Tween20 a temperatura ambiente durante 1 min. Se incuba la preparación en cámara húmeda a 37°C durante al menos 40 min. con una dilución 1:80 de estreptavidina anti-biotina conjugada con Cy5 en solución de bloqueo (este paso permitirá visualizar aquellos centrómeros marcados con biotina). Se lava la preparación en 4xSSC/0,005%Tween20 a temperatura ambiente durante 10 min., se aclara la preparación con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente. Por último, se realiza la contratinción con una dilución DAPI 1/4 (0,032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield).

La captura y análisis de las imágenes resultantes, se han realizado mediante un microscopio epifluorescente Olympus AX60 (Olympus Optical CO., Hamburg, Germany) equipado con una rueda de filtros específicos para Aqua, FarRed, Gold, FITC, TRICT, DAPI y un filtro triple banda (FITC/PI/DAPI) acoplado a un *software* específico (*Smartcapture, Vysis, Digital Scientific; Cambridge, UK*).

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

Figura 21. Esquema de los cócteles de fluorocromos, empleados en la técnica de cenM-FISH para el marcaje específico del centrómero de cada par cromosómico.

3.5 EXTRACCIÓN DE ADN

Para determinados estudios moleculares es necesario realizar una extracción de ADN a partir de la muestra original. Existen diferentes métodos de extracción de ADN: los convencionales, descritos hace años, más lentos y laboriosos y aquellos basados en la utilización de *kits* comerciales que permiten realizar la extracción en un plazo mucho más corto de tiempo.

En el presente trabajo no se han utilizado *kits* comerciales ya que estudios preliminares habían evidenciado que la pureza del ADN obtenido no resultaba idónea para la aplicación posterior de la técnica de CGH.

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para la extracción de ADN genómico a partir de una muestra de sangre periférica (SP) es aconsejable partir de ≥ 5 ml de muestra recogida en anticoagulante, preferentemente EDTA (1 mM). Se ha seguido el protocolo estándar (Miller y col., 1988) con algunas pequeñas modificaciones.

Se recomienda empezar a procesar la muestra lo antes posible una vez realizada la extracción, hasta ese momento se debe conservar la muestra a 4°C. Si esto no es posible, es imprescindible lavarla durante las 24 h. posteriores a la extracción y guardarla a -20°C.

Protocolo

La sangre periférica se pasa a un tubo cónico de 50 ml y se enrasa con suero fisiológico (NaCl 0,9%). Se centrifuga a 2.500 rpm durante 10 min. a 4°C. Se elimina el sobrenadante aspirando en círculos con una pipeta Pasteur para no ejercer presión sobre un mismo punto. Se intenta recoger el máximo de sobrenadante sin mover la suspensión celular. En el caso de que esto ocurra se procede a centrifugar de nuevo. En la parte inferior del tubo queda la capa de eritrocitos y sobre ella una fina capa de leucocitos.

En este punto, es posible congelar la muestra a -20°C, no obstante, se aconseja no hacerlo hasta haber realizado la lisis de eritrocitos, para que la extracción quede mas limpia.

A continuación, se añade *tampón de lisis de eritrocitos* (solución extemporánea: 5 ml Tris 2M pH 7,5 + 2,5 ml MgCl₂ 1M + c.s.p 500 ml H₂O) enrasando a 50 ml. Se mezcla con suavidad por inversión y se deja en hielo de 15 min. a 1h. Si no tenemos hielo, se deja la muestra a temperatura ambiente, no superando los 10 min., sin embargo, la extracción queda mejor usando hielo. Se centrifuga a 4°C durante 15 min. a 3.000 rpm. Se decanta el sobrenadante sin miedo, de una vez, dejando escurrir las paredes del tubo sobre un papel secante. Se repiten los pasos anteriores 2-3 veces hasta observar un botón blanco de leucocitos, disminuyendo el volumen de tampón de lisis de eritrocitos a 25 ml. En este momento, si se desea se puede congelar la muestra y seguir el proceso otro día.

El tamaño de la suspensión celular obtenida, correspondiente a leucocitos, varía en función de la cantidad inicial de muestra. Una vez valorado dicho tamaño, si es el habitual se añaden 3 ml de *tampón de lisis de leucocitos* (2,5 ml Tris 2M pH 8,2 + 40 ml NaCl 5M + 4 ml EDTA (titriplex) 0,25M + c.s.p. 500 ml H₂O). A continuación, se procede a una digestión enzimática de proteínas celulares añadiendo 500 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) (*Boheringer M*) y 200 μ l de detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% (*Gibco*). Se observa la consistencia del contenido, si es demasiado compacta se van añadiendo los reactivos anteriores proporcionalmente hasta observar una suspensión suficientemente fluida que se desliza con facilidad por las paredes del

tubo. A continuación, se dejan los tubos en estufa a 37°C y en agitación 16-18 h. En el caso de obtener un botón muy pequeño de leucocitos, se añade solamente 1 ml de tampón de lisis y la cantidad proporcional de proteinasa K y SDS y se deja en incubación tan sólo 4h.

Transcurrido el tiempo correspondiente, se añade 1 ml de NaCl (5,5-6M). En el caso de haber añadido una cantidad superior a 3 ml de tampón de lisis de leucocitos se añade 1 ml y un 5% más del volumen total, pero nunca más de 2 ml totales. Se agita enérgicamente de 15 a 20 seg. hasta obtener una emulsión completa. Se centrifuga a 3.400 rpm durante 15 min. a 4°C. Se recupera el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Se centrifuga nuevamente a 3.500 rpm durante 15 min. a 4°C. Si tras este paso se observan cuerpos brillantes en suspensión volver a centrifugar. Se añade el doble de volumen de etanol absoluto frío (*Merck*). Se mezcla con suavidad hasta observar la formación de una medusa de ADN. Se recoge la medusa con una pipeta Pasteur acabada en gancho, se seca con cuidado y se lava en etanol al 70%. Finalmente, se disuelve en tampón Tris-EDTA 10/0,2 mM (TE) (200-500 µl en función de su tamaño) incubando 2 h. a 37°C en agitación. Si no se observa medusa, se centrifuga y se escurre el tubo y se añaden 100 µl de TE, se remueve con la pipeta y se traspasa el contenido a otro tubo más pequeño. Es posible que al recuperar de este modo la medusa de ADN, queden sales precipitadas que posteriormente interferirán.

Se aconseja conservar el ADN obtenido sellando el tubo de microcentrífuga con parafilm a 4°C o congelado a -20°C.

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CÉLULAS CULTIVADAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO Y VELLOSIDADES CORIALES

El protocolo para la extracción de ADN a partir de muestras de líquido amniótico (LA) y de vellosidades coriales (CV) es el mismo. Para la extracción de ADN en amniocitos se requiere realizar previamente de 4-5 subcultivos del cultivo original en falcons de 40 ml. Generalmente, estos subcultivos se hacen a partir del falcon de reserva que sobra tras realizar el análisis citogenético a partir de dos líneas celulares distintas.

Protocolo

Para realizar los subcultivos, se tripsiniza el cultivo original. Cuando se observa sobrecrecimiento, se desenganchan las células con tripsina y se extrae el subcultivo sin adicionar Colcemid, pasando el contenido del falcon a un tubo cónico de 10 ml. Se centrifuga a 3.000 rpm durante 6 min. Si se desea proseguir la extracción en otro momento, se deja aproximadamente 1 ml de sobrenadante. En este paso del proceso, es posible congelar la muestra.

En el caso de continuar con la extracción de ADN, se aspira todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Se añade 1 ml de fosfato salino tamponado (1xPBS a pH 7) y se mezcla bien. Se traspara el contenido a un tubo de microcentrífuga, centrifugando a 8.000 rpm durante 5 min. a 4°C y se descarta el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur. Se añaden 400 µl de *tampón de lisis nuclear* (5 ml Tris 2M pH 8 + 80 ml NaCl 5M +4 ml EDTA (titriplex) 0,5 M pH 8 + c.s.p. 1 l. H₂O, Ajustar pH 7) y se resuspende el botón. A continuación, se añaden 10 µl de proteinasa K (1 mg/ml) (*Boehringer M*). Se añaden también 15 µl de SDS al 10% (*Gibco*) y se mezcla bien el contenido. Se incuba a 37°C 16-18 h. o a 55°C durante 3-4 h. Es preferible dejar los tubos en incubación 16-18 h., pues se obtiene una mayor cantidad de ADN. Se añaden 130 µl de solución saturada NaCl 5,5M y se mezcla vigorosamente por inversión durante 30 seg. Se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifuga a 4.500 rpm 10 min. a 4°C. Si tras este paso no se obtiene un botón celular compuesto por el precipitado de proteínas, sales y *debris*, se repite la lisis nuclear. A continuación, se traspara el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga, utilizando una pipeta Pasteur, volviendo a centrifugar si es necesario. Se añade un volumen equivalente de isopropanol (*Merck*). A continuación, se homogeneiza suavemente por inversión hasta que aparezca un precipitado de ADN en forma de medusa. Si al llegar a este punto no se obtiene un precipitado visible, se dejan los tubos a -80°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 14.000 rpm 15 min. a 4°C para compactar el precipitado de ADN y no perder nada en el sobrenadante. Se decanta el sobrenadante y se seca la boca del tubo con un poco de papel. Se añade etanol 70% hasta la mitad del tubo y se mezcla el contenido por inversión. Se centrifuga 15.000 rpm 5 min. a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se seca al máximo la boca y las paredes del tubo con papel. Se incuba a temperatura ambiente hasta secarse por completo las paredes del tubo (aproximadamente 1 h.) o bien se deja secar en estufa 37°C durante 30 min. Se añaden 100 µl de tampón Tris-EDTA 10/0,2 mM. Si el botón es muy pequeño o se han tenido problemas a la hora de precipitar el ADN, se añaden únicamente 25 µl de tampón Tris-EDTA. Por último, se incuba a 37°C en agitación 16-18 h. y se traspara el contenido de los tubos correspondientes a una misma muestra a un único tubo de microcentrífuga.

3.6 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN EXTRAÍDO

El ADN que se utiliza en la técnica de hibridación genómica comparada, debe haber sido cuantificado de forma muy precisa y además requiere que esté libre de proteínas, es decir, con un alto grado de pureza.

FLUORÍMETRO

En los primeros ADN analizados en este trabajo, la concentración de las muestras se determinó mediante el uso de un fluorímetro TKO-100 Mini-Fluorimeter (*Hoefler*). Éste consta de una lámpara de xenón que emite fluorescencia, un selector de longitudes de onda y un detector. Es necesaria la realización de una recta patrón. A continuación, se realiza una dilución de la muestra en una solución específica. Para la medición se usa una cubeta de cuarzo específica con una capacidad de 2 ml.

Solución de dilución utilizada para medición en fluorímetro:

10 ml 10xTNE tampón (100mM Tris, 10 mM EDTA, 1M NaCl, pH 7,4)
90 ml agua destilada/miliQ
10 ml de Hoechst 0,1 µg/ml

ESPECTROFOTÓMETRO

La valoración de la concentración y grado de pureza del ADN extraído, se ha llevado a cabo en la mayoría de casos mediante un espectrofotómetro (*Biotech Photometer UV1101*). En estos casos, se realiza una dilución 1/10 de la muestra de (10 µl + 90 µl TE). Se ajusta la línea base utilizando un blanco como control con 100 µl de agua destilada. Se mezcla bien la dilución de la muestra y se introduce en la cubeta. Con la ayuda de un *software* específico (*Cary Win UV*) se obtiene un espectro que nos permite medir la densidad óptica a 260 nm (longitud de onda donde absorbe el ADN de doble cadena) y a 280 nm (longitud de onda en la que absorben las proteínas) (Fig. 22).

Para calcular la **concentración de la muestra**, se multiplican las unidades de absorbancia a 260 nm por 50 (factor del ADN de doble cadena, ya que la absorbancia (abs) de una solución a una concentración de 50 µg/ml es 1 a 260 nm) y posteriormente se multiplica el resultado por 10

(factor de dilución). No se deben aceptar nunca absorbancias mayores de 2000, si se obtienen estas cifras se procede a diluir más la muestra, haciendo una dilución 1/20.

Para calcular el **grado de pureza** de la muestra, se dividen las unidades de absorbancia obtenidas a 260 nm por aquellas obtenidas a 280 nm. Para la utilización del ADN en la técnica de CGH es imprescindible obtener una pureza 1,6-1,9. Valores más pequeños indican un alto contenido de RNA en la muestra y valores más altos, por el contrario, indican una alta presencia de proteínas.

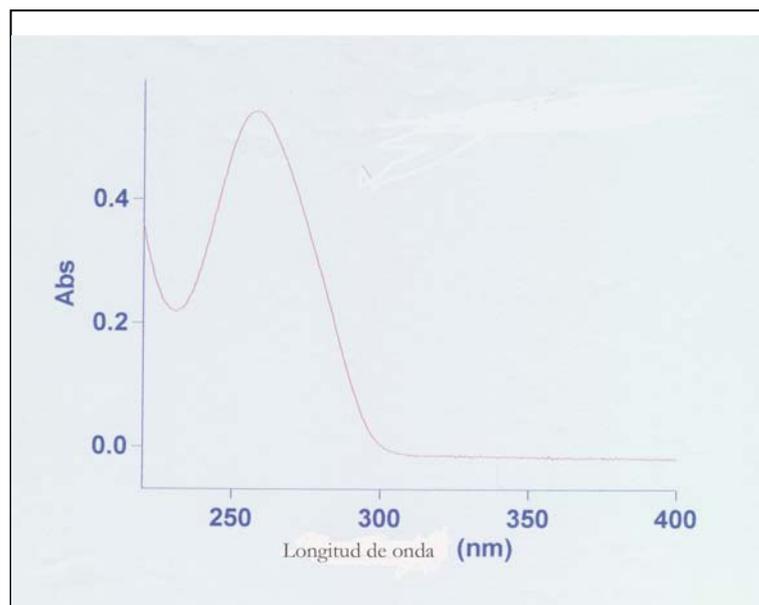


Figura 22. Espectro de absorción resultante de la lectura de la absorbancia en función de la longitud de onda correspondiente al caso M-10.

GELES

Para observar el grado de degradación de una determinada muestra de ADN, dado que éste no se observa con las lecturas espectrofotométricas, se ha procedido a realizar una electroforesis en gel de agarosa (*Ecogen*) al 1% (4 ml 10xTBE + 40 ml agua destilada + 4 mg de agarosa, 40 µl de EtBr (0,001%)). La electroforesis se realiza a 80V durante 40 min. Si bien los geles permiten el cálculo de la concentración y el grado de pureza de la muestra de ADN, es un método lento y subjetivo, por lo que resulta desaconsejable cuando, como ocurre en el caso de la CGH, son necesarias cuantificaciones muy precisas.

3.7 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA

Esta técnica permite la detección de pérdidas o ganancias del genoma obviando la necesidad de disponer de células en crecimiento. Se basa en la hibridación competitiva simultánea de dos ADN's (problema y control), marcados con distintos fluorocromos, sobre cromosomas metafásicos de un individuo normal.

Protocolo

Esta técnica de hibridación basada en fluorescencia requiere una zona de trabajo con poca luminosidad.

- Marcaje del ADN por NICK TRANSLATION

Una vez extraídos el ADN-problema y el ADN-control y habiendo determinado su concentración exacta y su grado de pureza, se procede a realizar un marcaje diferencial con nucleótidos que incorporan fluorocromos: Fluoresceína FITC (verde) y Texas Red TR (rojo). En este trabajo se ha estandarizado el marcaje del ADN problema con Texas Red y el ADN control con Fluoresceína.

Se marcan 700 ng de ADN genómico del paciente y 700 ng de ADN genómico de un individuo control del mismo sexo, siguiendo el protocolo de utilización para el CGH *Nick Translation Kit* (*Vysis*).

El marcaje de los ADN problema y control se ha realizado añadiendo a un tubo de microcentrífuga: 5 µl de 0,1 mM dTTP + 5 µl de 10X tampón (500 mM Tris-Cl pH 7,2; 100 mM MgSO₄; 1 mM DDT) + 10 µl de 0,1 mM dNTP (dATP; dCTP, dGTP) + (22,5 µl-X) de agua libre de nucleasas, siendo X los µl de ADN correspondientes a 700 ng de la muestra problema +5 µl de enzima (ADN polimerasa I, ADNasa I en 50% glicerol; 50 mM Tris-Cl pH 7,2; 10 mM MgSO₄; 0,1 mM DDT; 0,5 mg/ml nucleasa libre de albúmina sérica bovina). En el tubo de microcentrífuga que contiene el ADN control se añaden 2,5 µl de 0,2 mM dUTP-FITC y 2,5 µl de 0,2 mM dUTP-Texas Red.

Se mezcla todo el contenido del tubo y se deja en baño a 15°C durante 1 h. y 15 min. protegido de la luz, para que tenga lugar la reacción enzimática. Es importante respetar el tiempo de la reacción, ya que si se sobrepasa se obtienen fragmentos de ADN demasiado pequeños. Transcurrido este tiempo se para la reacción, incubando los tubos a 70°C durante 10 min., desnaturalizando así los enzimas y evitando la degradación del ADN.

- Comprobación del marcaje

Para comprobar que la reacción de marcaje ha funcionado y que tenemos la longitud de fragmentos adecuada (300-3.000 pb), se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (4 ml 10xTBE + 40 ml agua destilada + 4 mg de agarosa, 40 µl de EtBr (0,001%)) con 1 µl de muestra. La electroforesis se realiza a 80V durante 40 min. En cada migración es necesario utilizar un fragmento marcador del cual se conoce la longitud. Para la observación de la medida de los fragmentos, se coloca el gel sobre un transiluminador UV. Mientras tanto, se mantiene el resto de muestra en hielo.

Una vez estandarizado el protocolo de marcaje a las condiciones propias de laboratorio y de las muestras, no es necesario realizar siempre esta comprobación.

- Hibridación

A continuación se mezclan 700 ng de ADN control y problema marcados y se añaden 5-10 µl de ADN Cot-1. El enzima ADN Cot-1 se encarga de bloquear las secuencias altamente repetitivas, regiones heterocromáticas (centrómeros, satélites y constricciones heterocromáticas) que al presentar un alto grado de polimorfismo entre la población son excluidas del análisis ya que podrían dar lugar a falsos positivos.

Se precipita añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M por la pared del tubo y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcla por inversión y se deja en el congelador a -20°C un mínimo de 30 min. para que precipite el ADN. En este punto podemos parar el proceso y reanudarlo cuando sea conveniente. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 30 min. en una microcentrífuga, se decanta el sobrenadante todo de una vez y se dejan secar las paredes del tubo en la estufa de 37°C unos 10 min. para evaporar los restos de etanol que podrían interferir posteriormente en la desnaturalización del ADN.

Mientras tanto, se procede a descongelar un portaobjetos comercial y a desnaturalizarlo en formamida 70% a 73°C durante 5 min. Se deshidrata en una serie de etanoles diluidos al 70%, 85% y 100%, dejándolo 1 min. en cada uno de ellos, y se deja secar la preparación.

Se resuspende el contenido del tubo de microcentrífuga (ya totalmente seco) con 15 µl de tampón de hibridación (50% de formamida desionizada + 50% Máster Mix: 20% dextrano sulfato : 2 g dextrano sulfato + 1 ml 20xSSC, +9 ml de agua miliQ) y se desnaturaliza a 73°C durante 8 min.

Una vez desnaturalizados la preparación y la mezcla con los dos ADNs marcados, abriendo así las hebras de ADN, se procede a iniciar la hibridación, aplicando la sonda en un área de la

preparación. Inmediatamente, se cubre con un cubreobjetos, eliminando las posibles burbujas de aire que se forman. Se sella con goma y se deja en cámara húmeda y oscura a 37°C entre 48-72h.

- Lavados post-hibridación

Con los lavados se pretende eliminar la hibridación inespecífica y la sonda no incorporada. Para ello, se retira con mucho cuidado el cubreobjetos y la cola de sellado y se lava la preparación, sumergiéndola en una cubeta con 0,4xSSC/0,3% NP-40 a 73°C durante 2 min. A continuación, se realiza otro lavado en 2xSSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente durante 2 min. Se deja secar la preparación y se realiza la contratinción con 10-15 µl de una dilución 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ¼ (0,032 ng/µl) disuelto en una solución *antifade* (*Vectashield*) en cada área de hibridación, conservándola a 4°C hasta su posterior análisis.

- Análisis e interpretación de resultados

Para la captura se ha utilizado un microscopio de epifluorescencia Olympus AX-70 (*Olympus Optical CO., Hamburg, Germany*) equipado con los siguientes filtros específicos: U-MNIBA (FITC), U-MWIY (Texas Red) y U-MNU (contratinción DAPI), acoplado a una cámara digital CCD de alta sensibilidad (*Photometrics Sensys/ Olympus U-SPT*) conectada a un sistema computerizado de análisis de imágenes dotado de un *software* específico para CGH (*Applied Imaging, Sunderland, UK*).

De acuerdo con los criterios propuestos por Kallionemi y col. (1994), para el análisis de una determinada muestra se han analizado 10-15 metafases de condensación cromosómica parecida (400-500 bandas), bien extendidas (con cromosomas lo menos solapados y doblados posible), sin restos citoplasmáticos ni ruido de fondo, con un patrón de hibridación uniforme no granuloso y una intensidad de fluorescencia equivalente para los dos fluorocromos (Du Manoir, 1995).

Cada metafase es captada de forma secuencial en DAPI, Fluoresceína y Texas Red. Las señales captadas se muestran gráficamente en perfiles de medias de hibridación para cada cromosoma. Las imágenes se analizan con la ayuda de dos *softwares* específicos para CGH convencional y de alta resolución (*Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, UK*). La aplicación de la contratinción con DAPI nos permite cariotipar las metafases captadas.

El sistema de análisis reduce al máximo el ruido de fondo e integra las intensidades de fluorocromo verde y rojo a lo largo de todo el cromosoma. La relación (*ratio*) de fluorescencia verde/roja se calcula para cada cromosoma desde el telómero del brazo corto a brazo largo. Ya que la intensidad de fluorescencia absoluta depende de múltiples factores es necesario realizar una normalización, intentando igualar las intensidades medias de ambos fluorocromos para

todas las metafases captadas, igualando la proporción verde/rojo corregida aproximadamente a 1.0. Cada perfil de CGH muestra la proporción verde/rojo a lo largo de cada cromosoma (Fig. 23 y Fig. 24a). Las regiones cromosómicas equilibradas presentan valores de 1.0. Los valores obtenidos por encima de 1,25 se consideran como ganancia de esa región cromosómica, mientras que los inferiores a 0,75 como pérdida. Se ha utilizado un intervalo de confianza del 95% cuando se han analizado un número de metafases inferior a 15 y un intervalo de confianza del 99% cuando se han analizado 15 o más metafases.

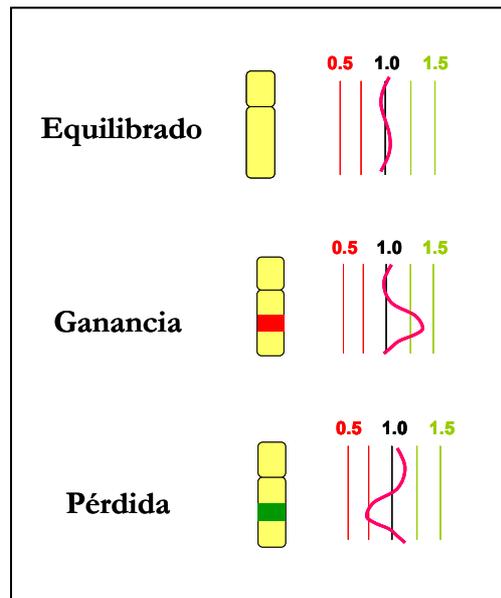


Figura 23. Esquema representativo de los diferentes perfiles de CGH.

Se ha tenido en cuenta que los artefactos del marcaje pueden favorecer la aparición de falsos positivos en las regiones cromosómicas ricas en citosina y guanina como 1p32-pter, 19 y 22, por lo que se han descartado los desequilibrios detectados en estas regiones.

3.7.1 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA DE ALTA RESOLUCIÓN

Con la mejora en el *software*, hibridación genómica comparada de alta resolución (HR-CGH) (Cytovision System, *Software* de análisis CGH de alta resolución, Versión 2.7 *Applied Imaging, Newcastle, UK*), se incrementa la especificidad y la sensibilidad de la técnica, permitiendo detectar ganancias y pérdidas de material genético más pequeñas así como desequilibrios en regiones cromosómicas que con la técnica de CGH convencional se excluían.

Básicamente, las diferencias radican en el modo de análisis de las imágenes, de su interpretación y del perfil obtenido (Fig. 24). En este caso, el propio sistema se encarga de corregir automáticamente las intensidades no reales de fluorocromo, determinando así que regiones deben ser excluidas del análisis.

Los perfiles de CGH obtenidos se comparan con el intervalo dinámico estándar de referencia basado en la media de casos controles (Kirchhoff y col., 1998). Este intervalo es más amplio en aquellas regiones conflictivas. Se han aplicado los intervalos de confianza del 99,5% y 99,9% en función del número de metafases analizadas en cada caso, si éste ha sido menor o mayor a 15 respectivamente.

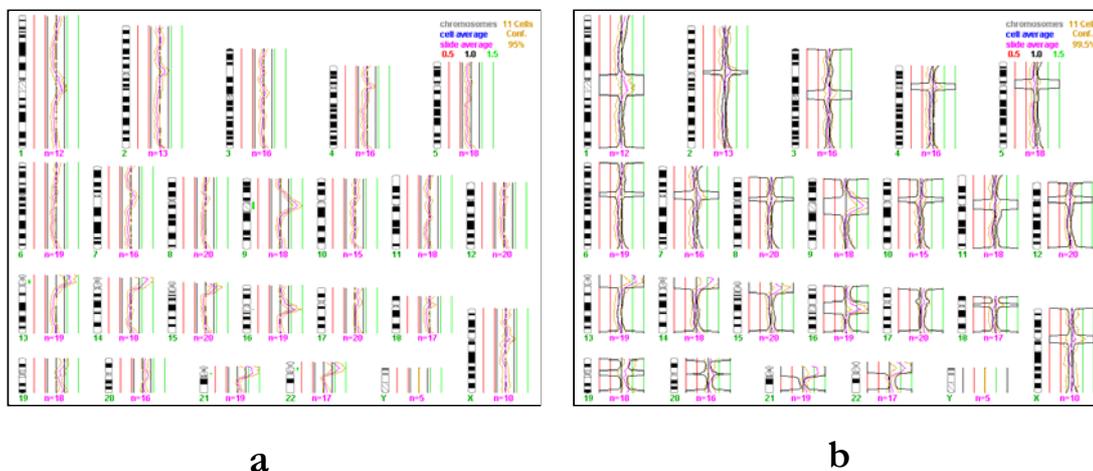


Figura 24. Comparación de los perfiles obtenidos mediante los dos *softwares*. a) CGH; b) HR-CGH.

3.8 PCR CUANTITATIVA FLUORESCENTE (QF-PCR)

Durante la fase exponencial de amplificación, se genera una cantidad de producto que es directamente proporcional a la cantidad de ADN inicialmente presente en la muestra. La incorporación de una molécula fluorescente en la reacción de amplificación permite una medición precisa de la cantidad del producto amplificado mediante un secuenciador automático de ADN. Por tanto, los STRs amplificados con esta técnica permiten determinar el número de copias de esa región cromosómica, así, para una muestra heterocigota normal los dos alelos producen dos productos de igual fluorescencia.

En el presente estudio, hemos utilizado esta técnica para la comprobación de determinados resultados obtenidos mediante CGH o M-FISH. La mayoría de estas muestras presentaban alteraciones gonosómicas (casos M-1, M-10, M-12, M-35, y M-70), pero también se ha utilizado esta técnica para valorar una anomalía del cromosoma 18 (M-67).

Los STRs empleados han sido los que se usan de rutina para la detección de aneuploidías de los cromosomas 18, X e Y en diagnóstico prenatal. La localización de estos STRs se muestra en la figura 25.

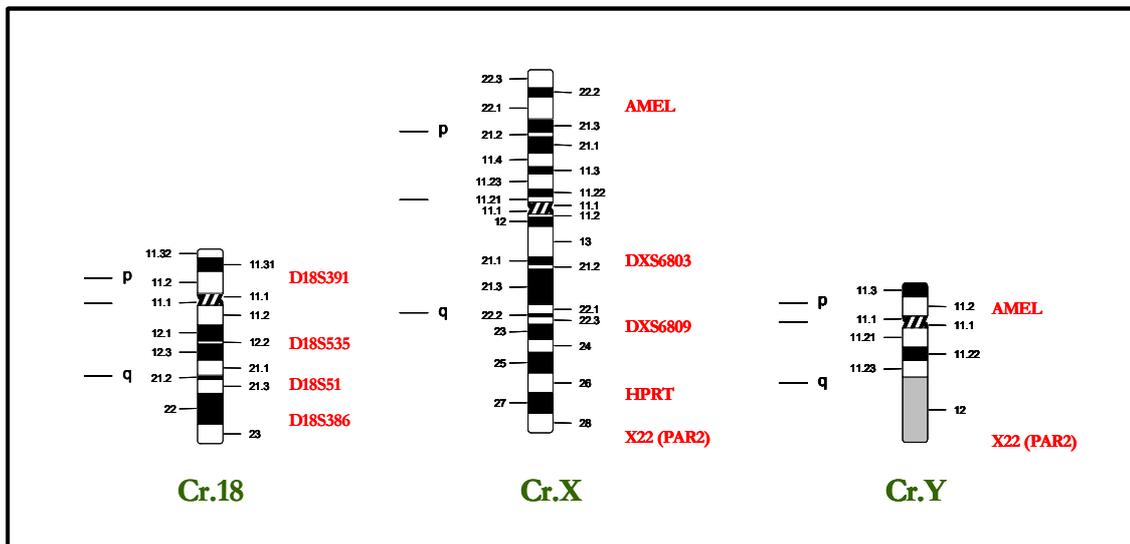


Figura 25. Localización de los microsatélites utilizados para la determinación de alteraciones en los cromosomas 18, X e Y.

Protocolo

Esta técnica se ha llevado a cabo en colaboración con V. Cirigliano, siguiendo el protocolo descrito por el mismo (Cirigliano y col. (1999;2001)).

- Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de la muestra puede llevarse a cabo siguiendo la metodología anteriormente descrita (apartado 3.5), o de un modo más rápido mediante la utilización de un *kit* comercial (*Qiagen*) que garantiza la extracción en cantidades mínimas de muestra. Este *kit* es habitualmente utilizado en los análisis de QF-PCR.

En la utilización del *kit* comercial, se centrifugan 200 µl de suspensión celular (LA, SP o CV) a 14.000 rpm durante 3 min. A continuación, se añaden 200 µl de Chelex-100 y se incuba a 70°C durante 8 min., se agita y se incuba 4 min. a 95°C.

- Amplificación de ADN mediante QF-PCR

Para la amplificación del ADN se utilizan los STRs que interese en cada caso. Estas secuencias se marcan con diferentes fluorocromos que permiten la determinación de la medida y cantidad del producto de PCR correspondiente.

En condiciones estrictamente estériles, se mezclan 5 µl de ADN, 200 µmol dNTP (*Promega*), 4-35 pmol de cada primer (*Roche*), 1 U de Taq polimerasa (*Promega*), en tampón 1x (2 mM MgCl₂), obteniendo un volumen de mezcla final de 25 µl. Se desnaturaliza esta mezcla a 95°C durante 5 min. Seguidamente, se inicia la reacción de amplificación mediante PCR en un termociclador GeneAmp 9700 (*Perkin Elmer*), programando 25 ciclos de PCR “Hot Start” de 30 seg. a 94°C, 35 seg. a 58°C y 35 seg. a 72°C, con una extensión final de 15 min. a 60°C.

A continuación, se mezcla 1 µl de producto de PCR fluorescente con 0,3 µl del indicador de tamaño molecular GeneScan 500 TAMRA (*Applied Biosystems*) y 12 µl de formamida. Una vez desnaturalizados se cargan en el secuenciador automático de ADN, ABI PRISM 310 (ABI310) (*Applied Biosystems*) para la electroforesis capilar.

Por último, se analizan los electroforetogramas obtenidos con la ayuda del *software* GeneScan 3.1 (*Applied Biosystems*). Las muestras normales heterocigotas se caracterizan por presentar patrones de electroforesis en los que se observan dos picos con fluorescencia en relación 1:1. Sin embargo, las muestras monosómicas presentan un único pico, mientras que las muestras trisómicas presentan tres picos con relación 1:1:1 o dos picos con relación 2:1.

3.9 NOMENCLATURA

La descripción de los cariotipos caracterizados mediante técnicas de citogenética convencional y molecular se ha realizado siguiendo las instrucciones descritas por el ISCN (*International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 1995*).

Resultados

4 RESULTADOS

En este trabajo, hemos identificado (o confirmado) mediante la aplicación de las técnicas de CGH y/o FISH, un 94,4% (51/54) de las anomalías cromosómicas analizadas. Estas habían sido previamente detectadas por bandas G. Únicamente en tres casos no se ha podido caracterizar la anomalía críptica observada (M-16, M-21 y M-62), ya que las técnicas aplicadas no han sido lo suficientemente resolutivas en estos casos y no ha sido posible aplicar otras técnicas (al no disponer del tipo de muestra adecuada). Éste, es uno de los grandes problemas en esta clase de estudios, ya que con frecuencia, no se cuenta con la colaboración deseada e indispensable para poder completar el estudio.

Aproximadamente, un 50% de las anomalías cromosómicas analizadas, han precisado la utilización conjunta de las técnicas de FISH y CGH para su caracterización, siendo los casos más evidentes, los cromosomas marcadores y las RCCs.

En la tabla 12 se resumen los tipos de anomalías cromosómicas identificadas en relación al tipo de técnica utilizada para su caracterización.

En algunos casos, los resultados obtenidos tras aplicar estas técnicas, nos han obligado a clasificarlos en otro grupo con respecto al que pertenecían antes de ser analizados:

- Así, los casos M-45, M-36, M-54 y M-62 inicialmente incluidos dentro del grupo de pacientes posibles portadores de monosomías y trisomías parciales autosómicas (tabla 7 del apartado de material y métodos) se han clasificado finalmente en el grupo de reorganizaciones aparentemente equilibradas (M-45, M-54 y M-36) (tabla 16 de resultados) y el caso M-62, al no haber podido ser completamente caracterizado, dentro del grupo de anomalías cromosómicas crípticas no caracterizadas (tabla 17 de resultados).
- El caso M-51 inicialmente incluido dentro del grupo de pacientes con monosomías y trisomías parciales gonosómicas (tabla 8 de material y métodos) se ha clasificado finalmente dentro del grupo de pacientes con monosomías y trisomías parciales autosómicas (tabla 13 de resultados).
- Por último, el caso M-49 inicialmente incluido en el grupo de pacientes con sospecha de anomalía cromosómica críptica (tabla 10 de material y métodos) se ha clasificado finalmente en el grupo de reorganizaciones “aparentemente” equilibradas (tabla 16 de resultados).

Tabla 12. Tipos de anomalías detectadas y técnicas utilizadas para su detección.

	Total	CGH	FISH	CGH y FISH	Éxito diagnóstico (% caracterizado)
Monosomías / Trisomías autosómicas	15	8	3	4	100
Monosomías / Trisomías cromosomas sexuales	12	5	2	5	100
Cromosomas marcadores supernumerarios	15	-	3	12	100
Reorganizaciones cromosómicas	9	1	2	6	100
Anomalías crípticas no caracterizadas	3	-	-	-	-
TOTAL	54	14 (25,9%)	10 (18,5%)	27 (50%)	94,4%

4.1 MONOSOMÍAS Y TRISOMÍAS AUTOSÓMICAS PARCIALES

En la Tabla 13 se detallan los resultados obtenidos para este tipo de muestras, al emplear una o ambas técnicas, así como la fórmula cromosómica final.

Se han identificado 10 **monosomías parciales**, de las cuales:

- 4 casos corresponden a deleciones: 3 intersticiales (M-3, M-22 y M-41) y 1 terminal (M-48)
- 3 casos a cromosomas en anillo: uno del cromosoma 18 (M-18) y dos del cromosoma 15 (M-71 y M-74)
- 1 caso a una microdelección (M-75)
- 2 casos a una translocación desequilibrada *de novo* (M-15 y M-66).

De las 5 **trisomías parciales** caracterizadas, una corresponde a una duplicación intersticial (M-43) y las restantes a translocaciones desequilibradas originadas *de novo* (M-40, M-47, M-51 y M-59).

En un único caso, se detectó la presencia simultánea de una **monosomía y una trisomía parcial** causada por la presencia de una translocación desequilibrada que la paciente había heredado de su madre (M-15).

De estas 15 anomalías cromosómicas, 8 han podido llegar a ser identificadas únicamente por CGH (cabe destacar que en 6 casos sólo se disponía de ADN), 3 con FISH (en 2 casos sólo se disponía de extensiones cromosómicas) y el resto han requerido el empleo de ambas metodologías.

Tabla 13. Monosomías y trisomías autosómicas parciales.

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	CGH	HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosómica final
M-3 ^a	46,XY,del(16)(p?)	<i>de novo</i>	ADN	dim(16p11.2)	dim(16p11.2p13.1)	–	–	46,XY,del(16)(p?).rev ish dim(16p11.2)
M-15	46,XX,add(18)(q23)	mat (t.equilib.)	ADN	enh(8q23qter) dim(18q23)	enh(8q22.3qter) dim(18q22qter)	–	–	46,XX,add(18)(q23).rev ish der(18)t(8;18) (q22.3; q22)enh(8q22.3qter)dim(18q22qter)mat
M-18	46,XY,r(18)	<i>de novo</i>	ADN	<i>dim(18p11.3)</i> dim(18q22qter)	dim(18p11.2pter) dim(18q22qter)	–	–	46,XY,r(18).rev ish dim(18p11.3,18q22qter)
M-22	46,XX,del(2)(q32.2q35)	<i>de novo</i>	ADN	dim(2q32.3q35)	dim(2q32.2q36)	–	–	46,XX,del(2)(q32.2q35).rev ish dim(2q32.3q35)
M-40	46,XX,add(17)(p13)	<i>de novo</i>	MET	–	–	der(17)t(5;17) (?:p13)	wcp5+ D17S2199-	46,XX,add(17)(p13).ish der(17)t(5;17)(?:p13) (wcp5+,D17S2199-)
M-41	46,XX,del(9)(q?)	<i>de novo</i>	ADN	dim(9q22.3q32)	dim(9q22.1q33)	–	–	46,XX,del(9)(q?).rev ish dim(9q22.3q32)
M-43 ^b	46,XX, inv(9)(p11q12), ins(16;?)(q22.3;?)	<i>de novo</i>	ADN/MET	enh(16q12.1q22.1)	enh(16q12.2q22.1)	–	wcp16+	46,XX,inv(9)(p11q12),ins(16;?)(q22.3;?) .ish dup(16)(wcp16+).rev ish enh(16q12.1q22.1)
M-47	46,XY,add(16)(p13)	<i>de novo</i>	MET	–	–	der(16) t(9;16)(?:p13)	wcp9+	46,XY,add(16)(p13).ish der(16)t(9;16)(?:p13) (wcp9+)
M-48	46,XX,del(9)(p23?)	<i>de novo</i>	ADN/MET	dim(9p23pter)	dim(9p23pter)	–	305J7-T7 -	46,XX,del(9)(p23?).ish del(9)(p24)(305J7-T7-) .rev ish dim(9p23pter)
M-51	46,X,add(Y)(q12)	pat (t.equilib.)	ADN	enh(10p11.2pter)	enh(10p11.2pter)	–	–	46,XY,add(Y)(q12).rev ish der(Y)t(Y;10) (q12;p11.2pter)enh(10p11.2pter)pat
M-59	46,XX,add(18)(p11.32?)	<i>de novo</i>	ADN/MET	enh(18q12pter) enh(18q23)	enh(18q12pter) enh(18q23)	der(18) t(18;18)	–	46,XX,add(18)(p11.32?) .ish der(18)t(18;18)(wcp18+) .rev ish enh(18q12pter,18q23)

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	CGH	HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosómica final
M-66	46,XY,der(9)del(9)(p22?)t(2;9)(p11;p11)	<i>de novo</i>	ADN/MET	dim(9p23pter)	dim(9p23pter)	t(2;9)	–	46,XY,der(9)del(9)(p22?)t(2;9)(p11;p11).ish t(2;9)(wcp9+,wcp2+;wcp2+,wcp9+).rev ish dim(9p23pter)
M-71	46,XX,r(15)(p11q26)	<i>de novo</i>	ADN/MET	<i>dim(15q26.2qter)</i>	dim(15q26.2qter)	–	–	46,XX,r(15)(p11q26).rev ish dim(15q26.2qter)
M-74	46,XX,r(15)(p11q26)	<i>de novo</i>	ADN/MET	<i>dim(15q26.3)</i>	<i>dim(15q26.3)</i>	–	–	46,XX,r(15)(p11q26).rev ish dim(15q26.3)
M-75	46,XY	<i>de novo</i>	ADN/MET	equilibrado	equilibrado	–	D22S553-	46,XY.ish del(22)(q11.2q11.2)(D22S553-)

Abreviaciones. **dim**, relación (*ratio*) de intensidad de fluorescencia disminuida (delección); **D17S2199**, locus localizado en la región subtelomérica del cromosoma 17p; **D22S553**, locus localizado en la región 22q11.2 del cromosoma 22 (Región crítica síndrome de DiGeorge); **enh**, relación (*ratio*) de intensidad de fluorescencia aumentada (duplicación); **mat**, Herencia materna; **M.D.** Tipo de material disponible para el estudio; **MET**, Preparación cromosómica metafásica; **pat**, Herencia paterna; **subtel**, sonda subtelomérica; **wcp**, sonda de pintado cromosómico, **305J7-T7**, locus localizado en la región subtelomérica del cromosoma 9p.

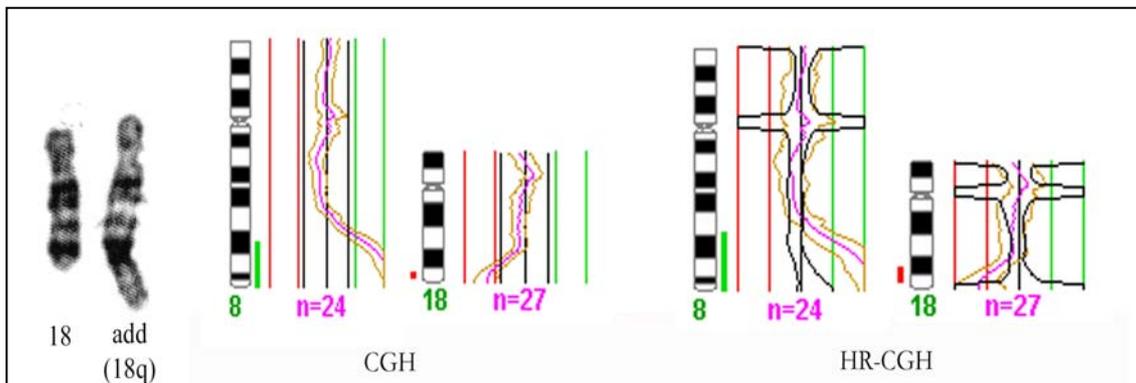
En *color gris*, ganancia o pérdida no detectada por el *software* pero que muestra desviación del perfil normal.

^aCaso publicado en Journal of Medical Genetics (2002); 39 (5): 24-6.

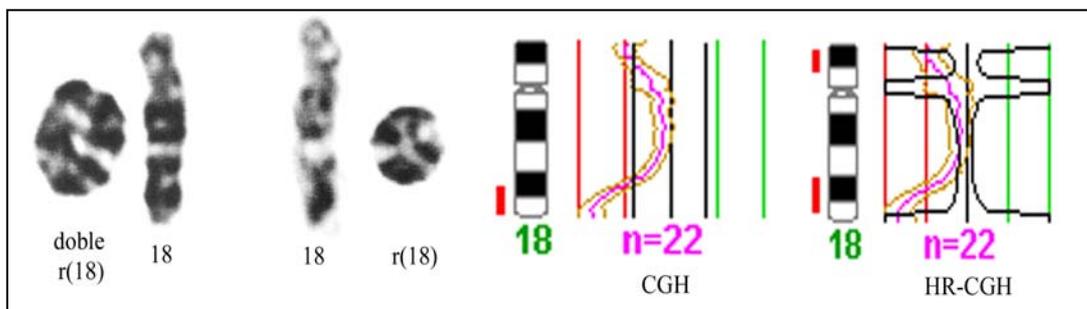
^bCaso enviado para publicación.

IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CASOS CON MONOSOMÍAS Y TRISOMÍAS AUTOSÓMICAS PARCIALES

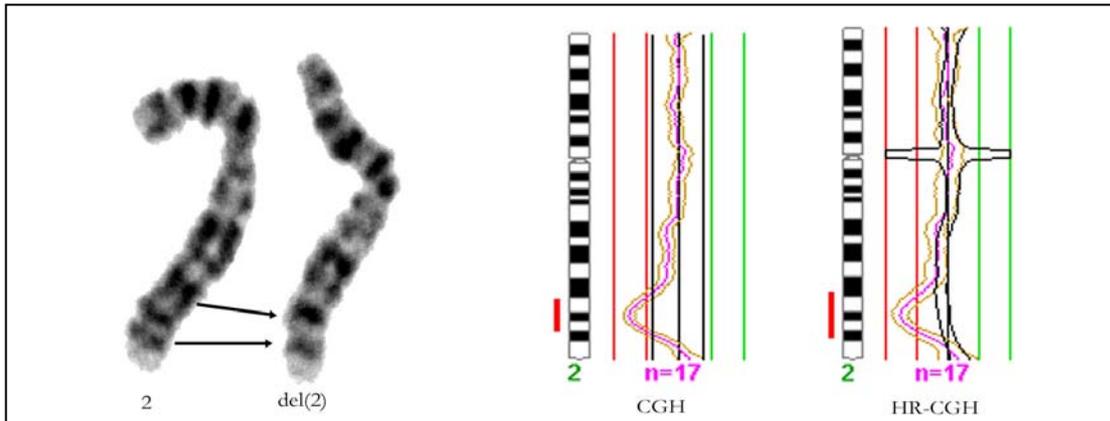
Caso M15. Mediante CGH convencional se ha observado la ganancia de 8q23-qter y la pérdida de 18q23, mientras que con HR-CGH la ganancia abarcaba 8q22.3-qter y pérdida de la región 18q22-qter. El análisis retrospectivo del cariotipo con bandas G, muestra una mayor coincidencia con los perfiles observados en la HR-CGH.



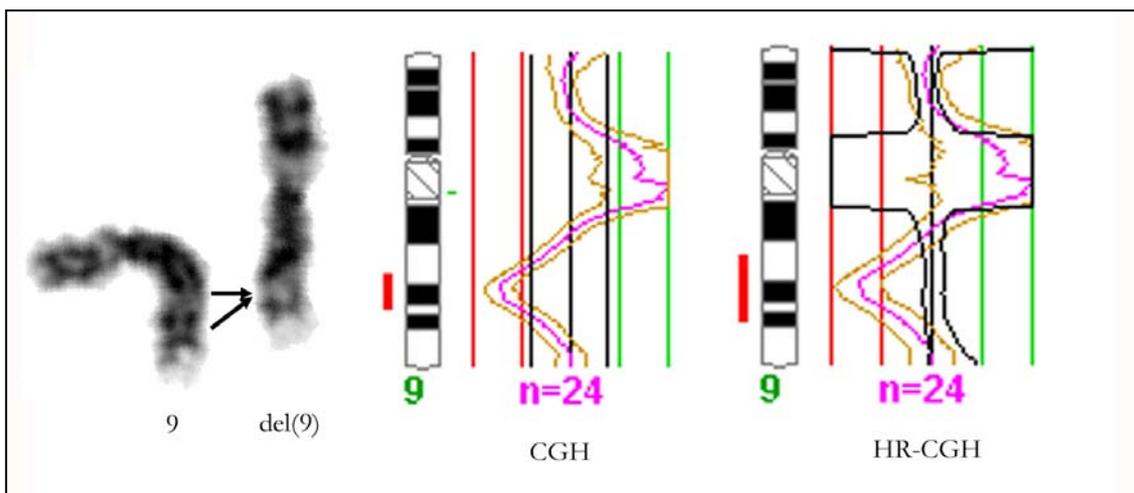
Caso M18. En el estudio de este anillo mediante CGH convencional se observa la pérdida de la región 18q22-qter, además de intuirse la pérdida de la banda 18p11.3, cabe destacar, que pese a observarse una desviación del perfil significativa en dicha región, ésta pérdida no es detectada por el *software* incluso aplicando el nivel de confianza más bajo (95%). Con la utilización de la HR-CGH se han observado pérdidas de mayor tamaño.



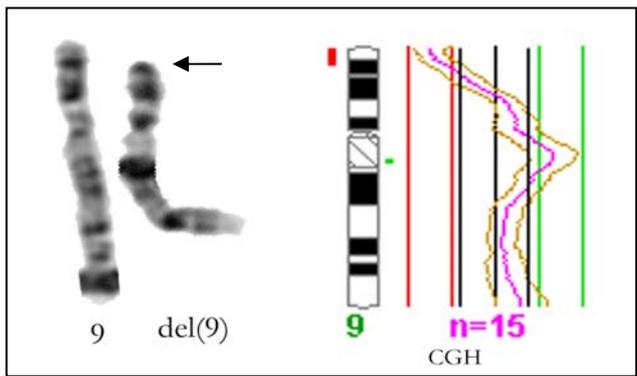
Caso M22. Los perfiles de CGH convencional han mostrado la deleción de las bandas 2q32.3-q35, mientras que los de HR-CGH muestran una pérdida de mayor tamaño. El análisis retrospectivo del cariotipo con bandas G, ha permitido aceptar como válido el resultado obtenido mediante CGH convencional.



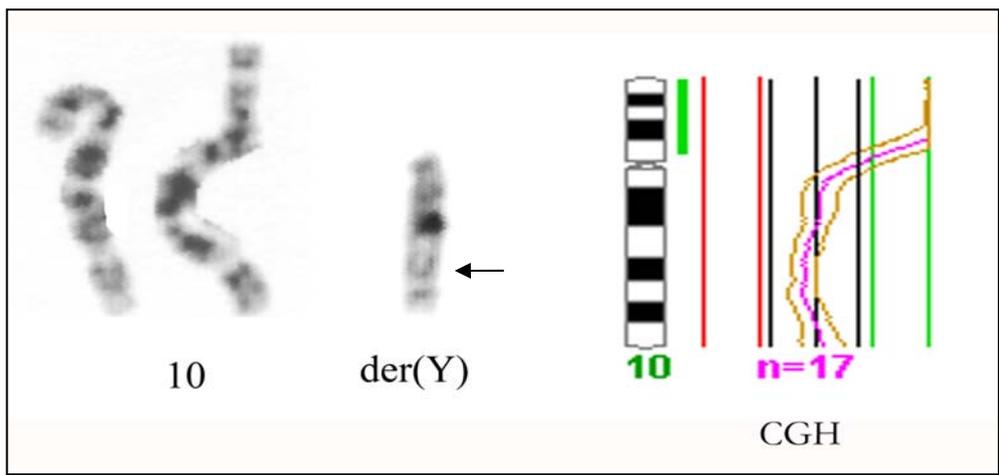
Caso M41. La técnica de CGH convencional ha detectado la pérdida de las bandas 9q22.3-q32, mientras que con la HR-CGH la pérdida observada ha sido mayor. El análisis retrospectivo del cariotipo con bandas G, ha confirmado como válido el resultado obtenido mediante CGH convencional.



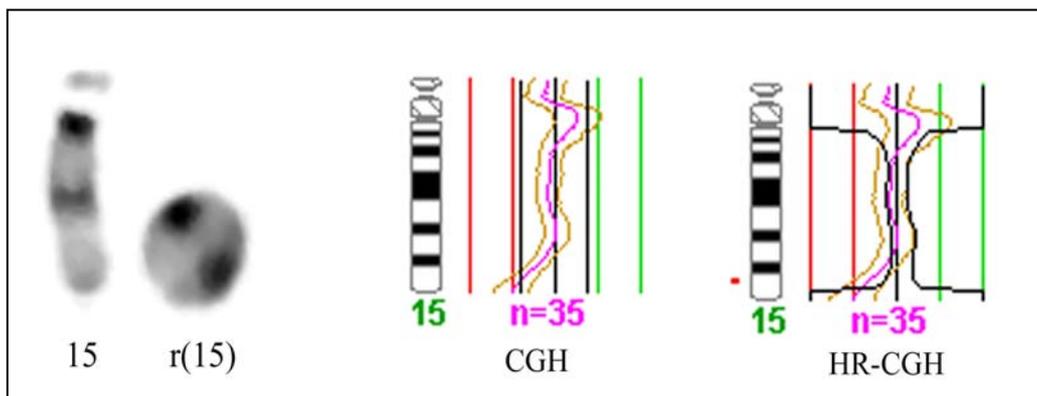
Caso M48. La técnica de CGH ha confirmado la deleción de las bandas 9p23-pter sospechada previamente mediante citogenética convencional. En este caso, los perfiles de HR-CGH muestran el mismo resultado. La aplicación de FISH con sonda subteloamérica del brazo corto del cromosoma 9 (305J7-T7) ha confirmado esta deleción terminal.



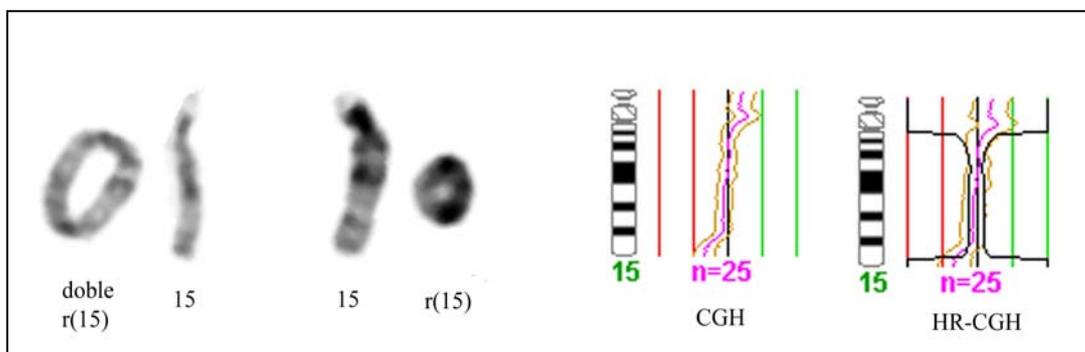
Caso M51. El estudio mediante CGH convencional ha permitido identificar el material adicional translocado en el brazo largo del cromosoma Y, como todo el brazo corto del cromosoma 10. Con HR-CGH se ha observado el mismo resultado.



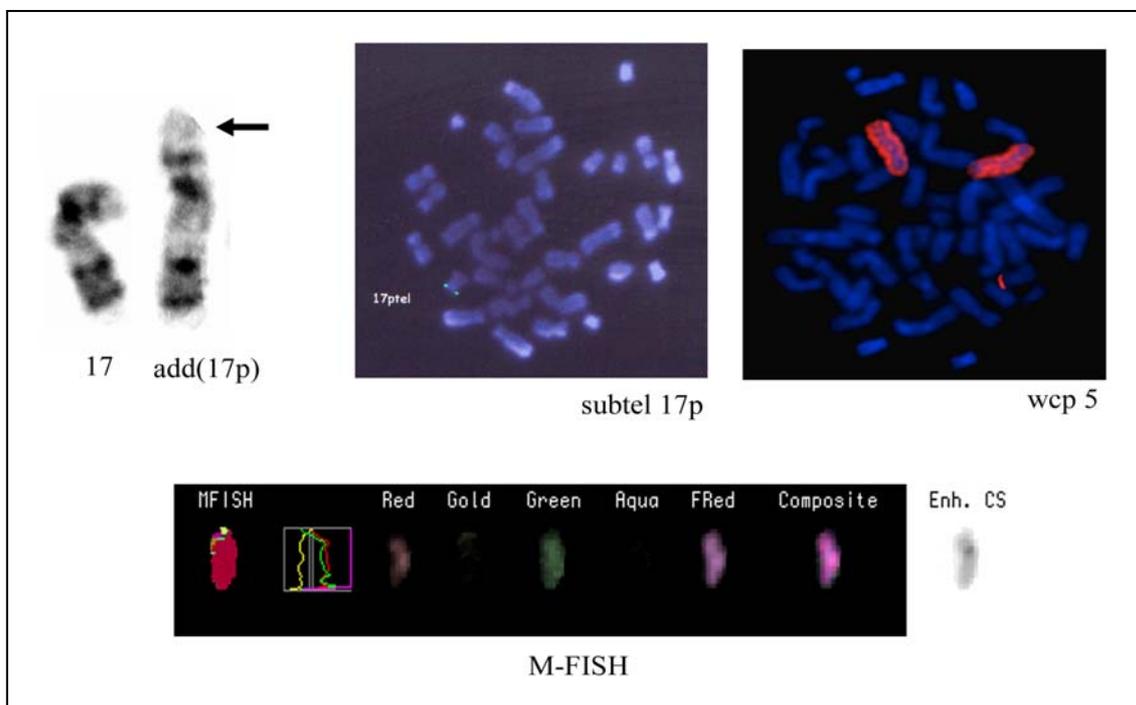
Caso M71. El estudio citogenético convencional ha detectado en este caso la presencia de un anillo del cromosoma 15 en el 100% de las células estudiadas. Con el fin de valorar la posible pérdida de las regiones distales del cromosoma, se ha aplicado la técnica de CGH. Los perfiles de CGH insinúan una deleción de las bandas 15q26.2-qter, que se ha confirmado al aplicar el *software* de HR-CGH.



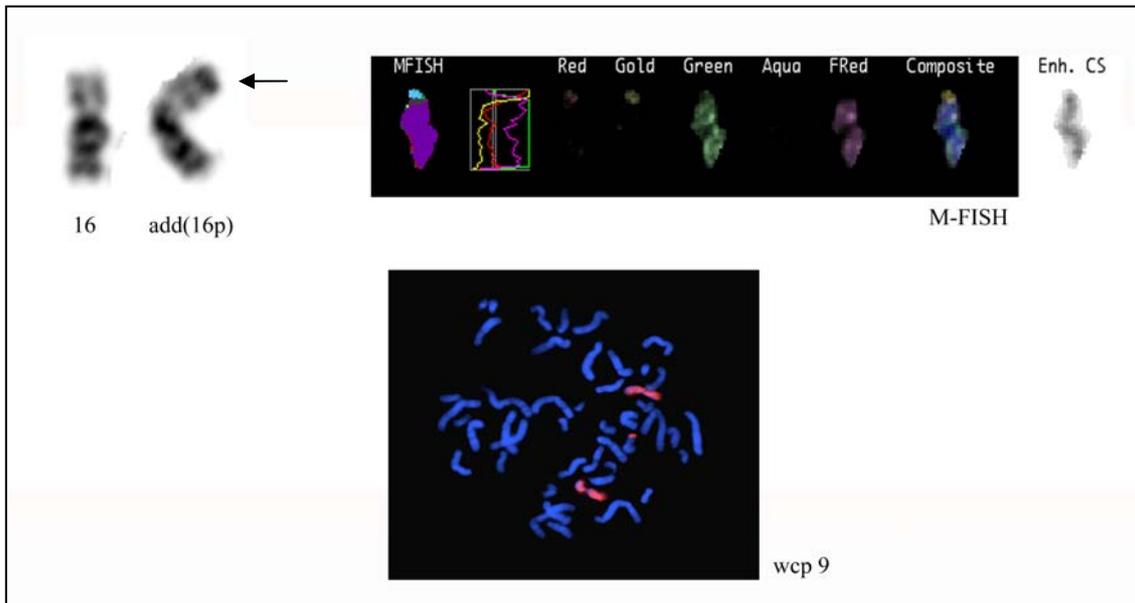
Caso M74. El estudio citogenético convencional ha mostrado la presencia de un cromosoma 15 en anillo, el cual, parecía ser doble en el 20% de las células estudiadas. La CGH convencional y HR-CGH no han permitido detectar la pérdida de material cromosómico, aunque si parece observarse en ambos casos una pequeña desviación significativa del perfil en la región 15q26.3.



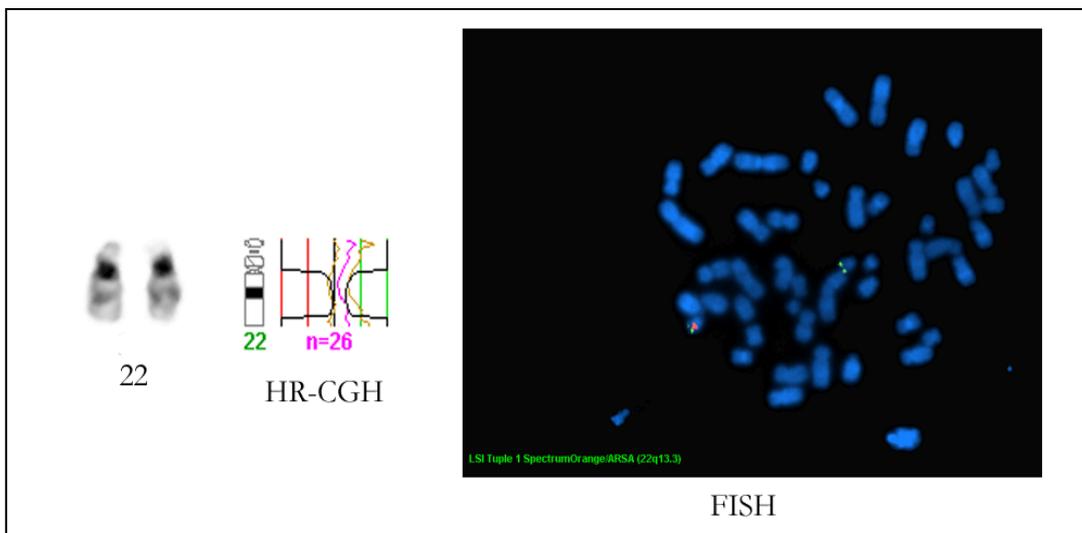
Caso M40. La citogenética convencional ha mostrado un cariotipo 46,XX,add(17)(p13). La adición no parecía ser una duplicación de 17p, sino más bien material de la región cromosómica 19qter o, menos probablemente, de 22qter. En el estudio mediante FISH con sonda subteloamérica de 17p se ha observado la ausencia de un telómero 17p. El posterior análisis mediante M-FISH ha permitido identificar un der(17)t(5;17), lo que ha sido confirmado posteriormente mediante sonda de pintado cromosómico específico. En este caso, no ha sido posible valorar la presencia de desequilibrios cromosómicos al no disponer de ADN del paciente.



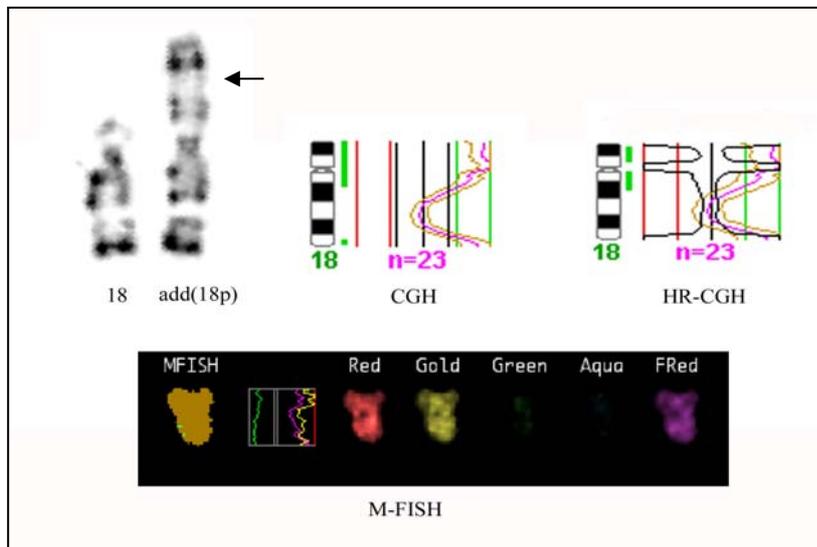
Caso M47. El cariotipo de este paciente ha revelado la presencia de material adicional en 16pter, el cual no ha podido ser identificado mediante bandas G. El análisis mediante M-FISH y la posterior confirmación con sonda de pintado cromosómico específica, ha permitido identificar el origen de este material adicional como cromosoma 9. El estudio de desequilibrios cromosómicos mediante CGH no ha sido posible debido a LA falta de ADN del paciente.



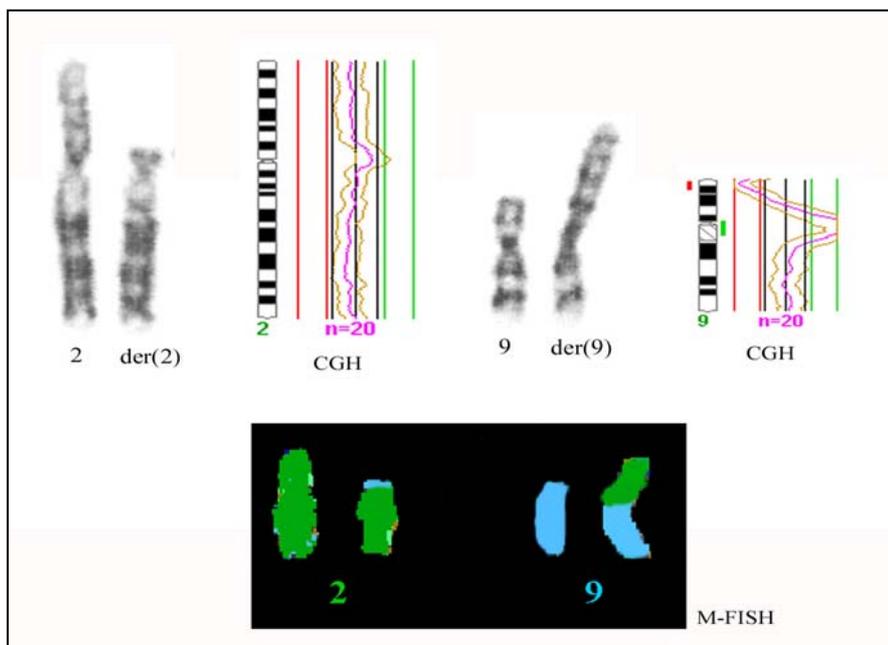
Caso M75. En este caso, el análisis mediante citogenética convencional ha mostrado un cariotipo normal en un paciente con sospecha clínica de síndrome de DiGeorge. El análisis mediante HR-CGH no ha detectado la presencia de desequilibrios cromosómicos. Sin embargo, el análisis mediante FISH con una sonda locus específica de esta región ha detectado la delección de la banda 22q11.2 en uno de los cromosomas 22 del paciente.



Caso M59. El cromosoma 18 derivativo no ha sido posible caracterizarlo mediante bandas G debido a su extraño patrón de bandas a partir de 18p11.32. El análisis mediante M-FISH ha evidenciado que el cromosoma 18 derivativo estaba compuesto íntegramente por material del cromosoma 18. Posteriormente, el estudio mediante CGH convencional ha detectado la ganancia de las regiones 18q12-pter y 18q23. El *software* de HR-CGH no ha detectado la ganancia de la banda 18q23 debido a que excluye esta región del análisis.



Caso M66. El análisis mediante citogenética convencional ha detectado la presencia de una t(2;9) con posible pérdida de material cromosómico. La M-FISH ha confirmado la presencia de dicha translocación. Posteriormente el análisis mediante CGH ha permitido identificar la delección de las bandas 9p23-pter. Con HR-CGH se ha observado el mismo resultado.



Los resultados correspondientes a los caso M-3 y M-43 se encuentran incluidos en los artículos 1 y 4 respectivamente que se adjuntan en el anexo I.

4.2 **MONOSOMÍAS Y TRISOMÍAS PARCIALES EN CROMOSOMAS SEXUALES**

En la Tabla 14 se detallan los resultados obtenidos al utilizar una o ambas técnicas en el análisis de las 12 muestras pertenecientes a este grupo, así como la fórmula cromosómica final.

En esta serie, es interesante destacar que un 50% de los casos se presentaban en mosaico (M-10, M-12, M-35, M-57, M-68 y M-69).

Se han identificado 4 casos con **monosomías parciales**, de las cuales:

- 3 afectaban al cromosoma Y (M-1, M-53 y M-69)
- 1 al cromosoma X (M-68).

Las 3 **trisomías parciales** detectadas afectaban todas al cromosoma Y (M-12, M-35 y M-73).

La presencia simultánea de una **monosomía y una trisomía parcial** ha sido observada afectando al cromosoma Y (M-10), al cromosoma X (M-34), a ambos cromosomas sexuales (M-52, M-57, y M-70). Todas ellas se han originado por la presencia de una translocación desequilibrada en el paciente, de las cuales cuatro casos se habían originado *de novo*.

En un caso (M-73) se ha identificado la presencia de una translocación desequilibrada del cromosoma Y con un autosoma (t(Y;15)).

De estas 12 anomalías cromosómicas, 5 han podido llegar a ser identificadas mediante CGH (en 4 casos sólo se disponía de ADN), 2 con FISH (sólo se disponía de extensiones cromosómicas) y el resto han requerido o se han empleado ambas metodologías para su caracterización.

Tabla 14. Monosomías y trisomías parciales de cromosomas sexuales.

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	CGH	HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosómica final
M-1 ^a	46,X,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	dim(Yq11.2qter)	dim(Yq11.2qter)	–	wcpY+	46,X,+mar.ish del(Y)(wcpY+).rev ish dim(Yq11.2qter)
M-10 ^a	45,X[11]/46,X,+mar[16]	<i>de novo</i>	ADN MET	enh(Yq11.2pter) dim(Yq11.2q12)	enh(Yq11.2pter) dim(Yq11.2q12)	–	–	45,X[11]/46,X,+mar[16] .rev ish idic(Y)(q11.2) enh(Yq11.2pter)dim(Yq11.2q12)
M-12 ^a	45,X,inv(9)(p11q12)[30]/ 46,X,idic(Y)(p11.3?), inv(9)(p11q12)[70]	<i>de novo</i>	ADN MET	enh(Yq11.2qter)	enh(Yq11.2qter)	–	wcpY+	45,X,inv(9)(p11q12)[30]/46,X,idic(Y)(p11.3?)[70] .ish der(Y)t(Y;Y)(p11.3;q11.2)(wcpY+) .rev ish enh(Yq11.2qter)
M-34	46,X,add(X)(q21.2?)	<i>de novo</i>	ADN	enh(Xp11.23pter) dim(Xq21.2qter)	enh(Xp11.23pter) dim(Xq21.2qter)	–	–	46,X,add(X)(q21.2?).rev ish der(X)t(X;X) (q21.2;p11.23)enh(Xp11.23pter)dim(Xq21.2qter)
M-35	46,X,+mar[22]/46,XY[28]	<i>de novo</i>	ADN MET	<i>enh(Yp11.2pter)</i>	<i>enh(Yp11.2pter)</i>	der(Y) t(Y;Y)	wcpY+ DYS129++	46,X,+mar[22]/46,XY[28].ish der(Y)t(Y;Y)(q12;p11.2) (wcpY+, DYS129++) .rev ish enh(Yp11.2pter)
M-52	46,X,add(X)(p22.3)	?	ADN MET	enh(Yq11.1qter) <i>dim(Xp22.3)</i>	enh(Yq11.1qter) <i>dim(Xp22.3)</i>	–	1125-YB+	46,XX,add(X)(p22.3).ish der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.1) (1125-YB+).rev ish enh(Yq11.1qter)dim(Xp22.3)
M-53	46,X,+mar	<i>de novo</i>	MET	–	–	–	wcpY+	46,X,+mar.ish der(Y)(wcpY+)
M-57	45,X[58]/ 46,X,idic(X)(q21?) [42]	<i>de novo</i>	ADN	enh(Xq21.1pter) dim(Xq21.2qter)	enh(Xq21.1pter) dim(Xq21.2qter)	–	–	45,X[58]/46,X,idic(X)(q21?) [42].rev ish idic(X)(q21.1)enh(Xq21.1pter)dim(Xq21.2qter)
M-68	45,X[15]/ 46,X,del(X)(q11?) [85]	<i>de novo</i>	ADN	dim(Xq11qter)	dim(Xq11qter)	–	–	45,X[15]/46,X,del(X)(q11?) [85] .rev ish del(X)(q11)dim(Xq11qter)

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	CGH	HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosómica final
M-69	45,X[30]/46,X,r(Y)[70]	pat	ADN MET	<i>dim</i> (Yp11.3)	<i>dim</i> (Yp11.3)	–	DYS129+ EST Cdy 16c07+	45,X[30]/46,X,r(Y)[70].ish r(Y)(DYS129+, EST Cdy 16c07+).rev ish dim(Yp11.3)pat
M-70	46,XX	<i>de novo</i>	ADN	enh(Yp11.3) dim(Xp22.3)	enh(Yp11.3) dim(Xp22.3)	–	–	46,XX.rev ish der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3) enh(Yp11.3)dim(Xp22.3)
M-73	45,X,add(15)(p11.2)	<i>de novo</i>	MET	–	–	der(15) t(Y;15) (?;p11.2)	–	45,X,add(15)(p11.2) .ish der(15)t(Y;15)(?;p11.2)(wcpY+,wcp15+)

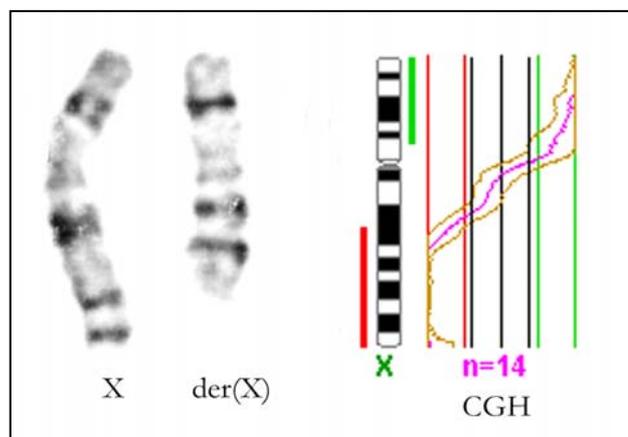
Abreviaciones. **dim**, relación (*ratio*) de intensidad de fluorescencia disminuida (delección); **DYS129**, locus localizado en la región subtelomérica del cromosoma Yp; **enh**, relación (*ratio*) de intensidad de fluorescencia aumentada (duplicación); **EST Cdy 16c07**, locus localizado en la región subtelomérica del cromosoma Yq; **M.D.** Tipo de material disponible para el estudio; **MET**, Preparación cromosómica metafásica; **pat**, Herencia paterna; **wcp**, sonda de pintado cromosómico; **1125-YB**, sonda específica de la región heterocromática del cromosoma Y.

En *color gris*, ganancia o pérdida no detectada por el *software* pero que muestra desviación significativa del perfil normal.

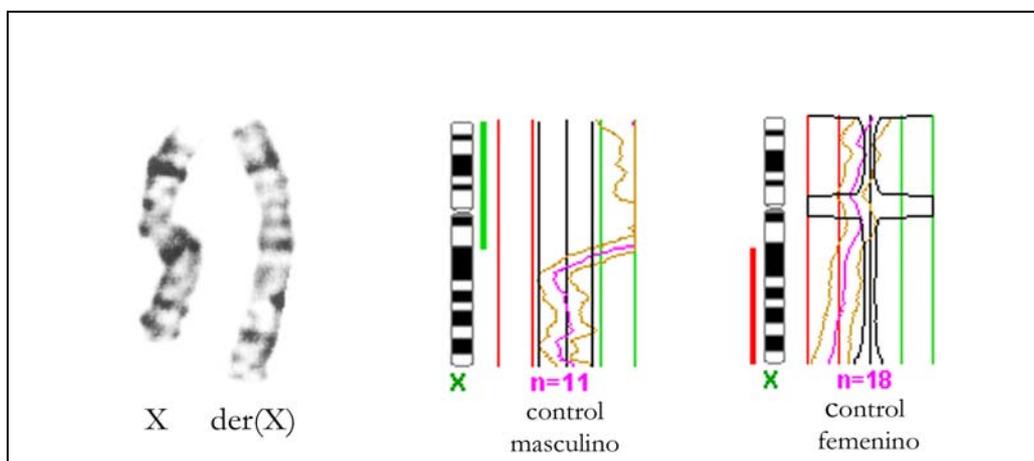
^a Casos publicados en Prenatal Diagnosis (2002); 22: 802-5.

IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CASOS CON MONOSOMÍAS Y TRISOMÍAS PARCIALES EN CROMOSOMAS SEXUALES

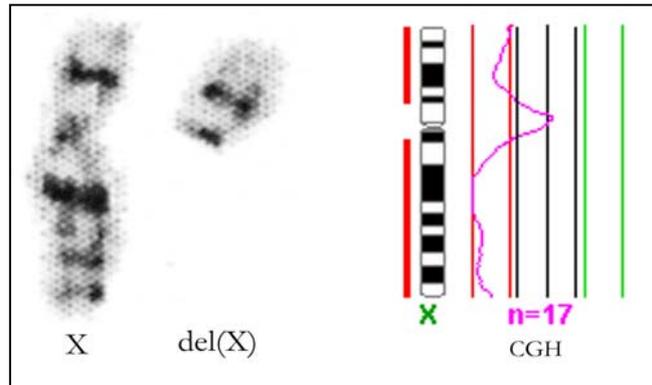
Caso M34. Mediante citogenética convencional se ha detectado la presencia de un cromosoma X derivativo. Paralelamente, el estudio mediante QF-PCR ha mostrado un patrón monoalélico del marcador X22 (localizado en Xq28) y del marcador XHPRT (Xq26.1). El estudio mediante CGH convencional ha permitido identificar la ganancia de la región cromosómica Xp11.23-pter y la pérdida de la región cromosómica Xq21.2-qter. Con HR-CGH se han obtenido los mismos resultados.



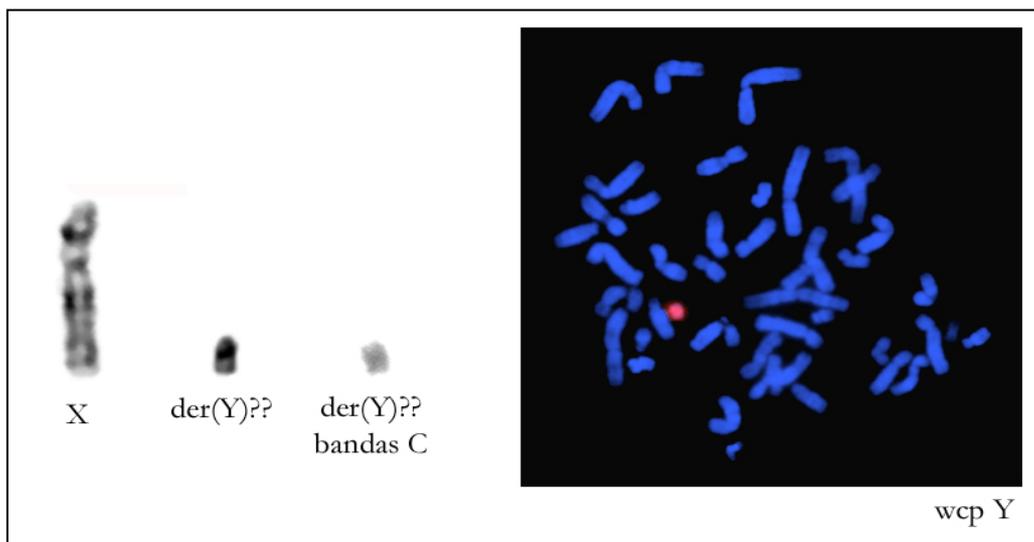
Caso M57. El estudio mediante citogenética convencional ha mostrado la presencia de una línea celular con un cromosoma X derivativo, en mosaico con una línea celular 45,X. El estudio mediante CGH convencional ha permitido identificar la ganancia de la región cromosómica Xp21.1-pter y la pérdida de la región cromosómica Xq21.2-qter. Los perfiles de HR-CGH han mostrado los mismos resultados. Cabe destacar en este caso, el efecto de la línea 45,X en los perfiles obtenidos, lo que requiere tener especial cuidado en la interpretación de estos mosaicos.



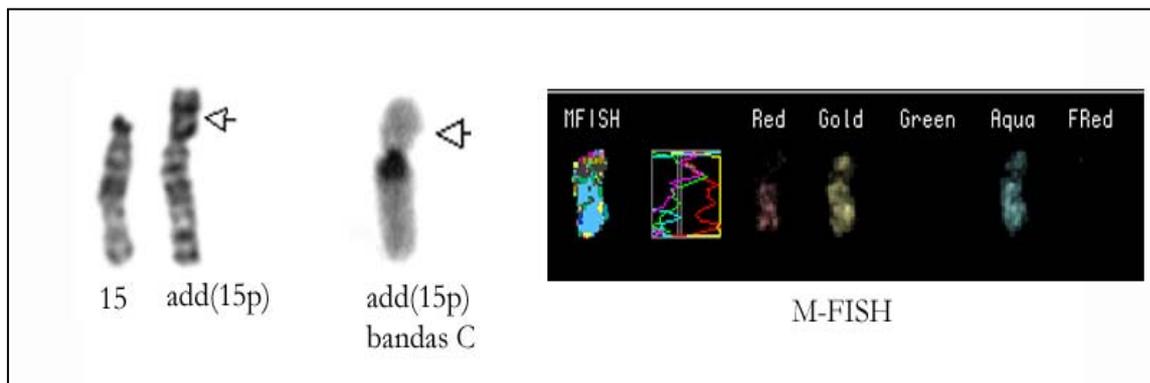
Caso M68. El análisis del cariotipo ha revelado la presencia de una línea celular con un cromosoma X delecionado, en mosaico con una línea celular 45,X. El estudio mediante CGH convencional ha permitido identificar la pérdida de la región cromosómica Xq11-qter. En este caso, también se ha observado la influencia de la línea 45,X en la desviación del perfil. Con HR-CGH se han obtenido los mismos resultados.



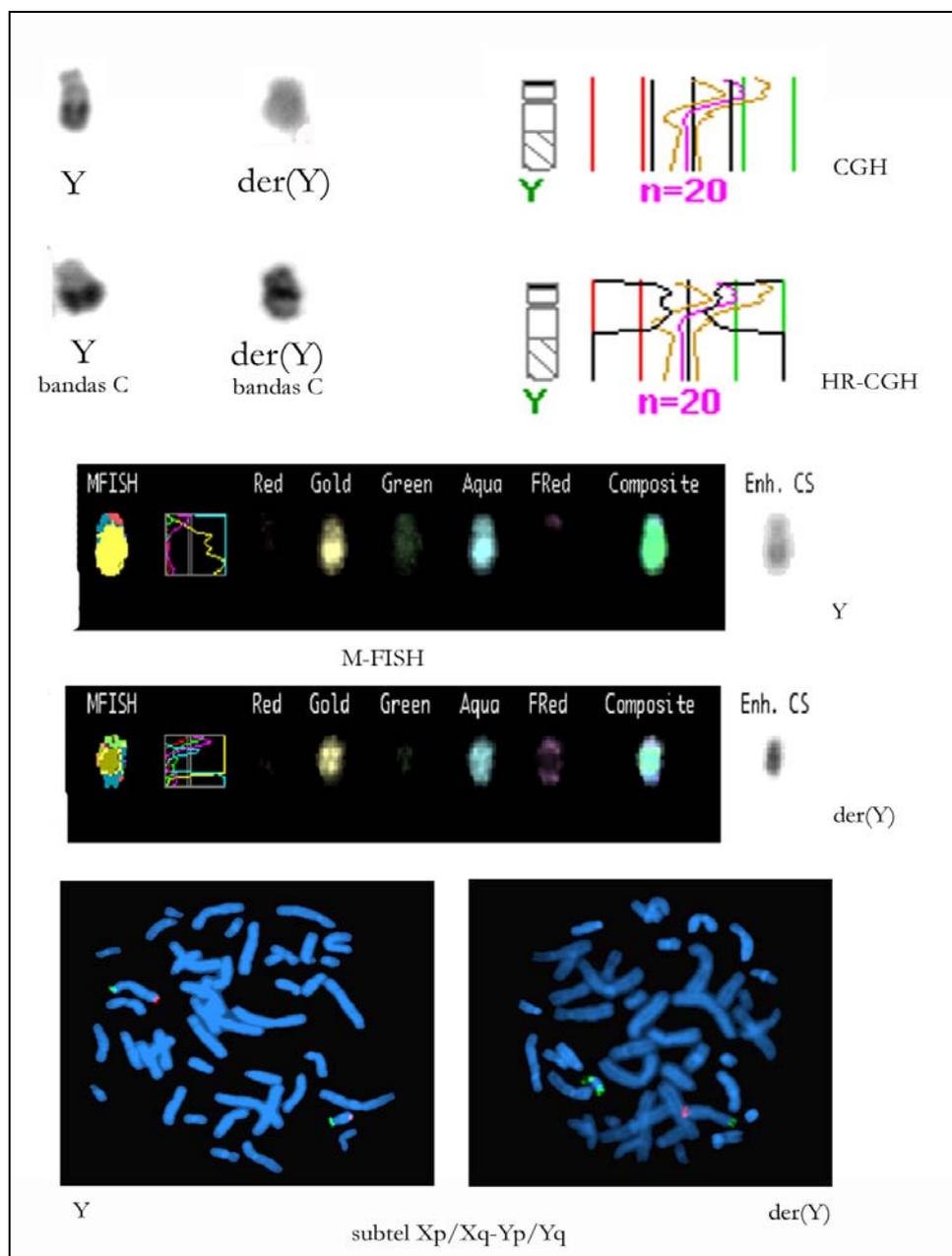
Caso M53. El estudio citogenético convencional ha detectado la presencia de un cariotipo 46,X,+mar. La aplicación de la técnica de bandas C ha descartado la presencia de heterocromatina en este marcador. La aplicación de la sonda de pintado específica del cromosoma Y ha permitido identificar el cromosoma marcador. El estudio de desequilibrios cromosómicos mediante CGH no fue posible debido a falta de ADN del paciente.



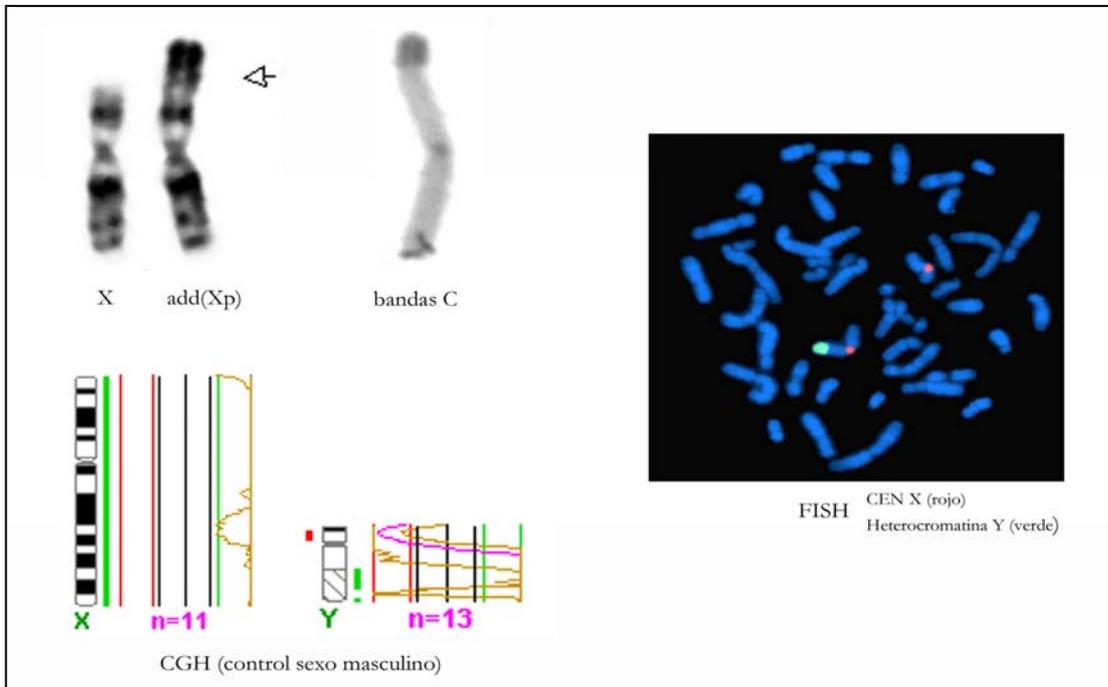
Caso M73. En este caso, el análisis mediante citogenética convencional ha mostrado la presencia de material adicional translocado en el brazo p de un cromosoma 15. La aplicación de la técnica de bandas C ha descartado la presencia de heterocromatina en este material. La posterior aplicación de la técnica de M-FISH ha identificado la presencia de una t(Y;15). El estudio mediante CGH no ha sido posible debido a la falta de ADN del paciente.



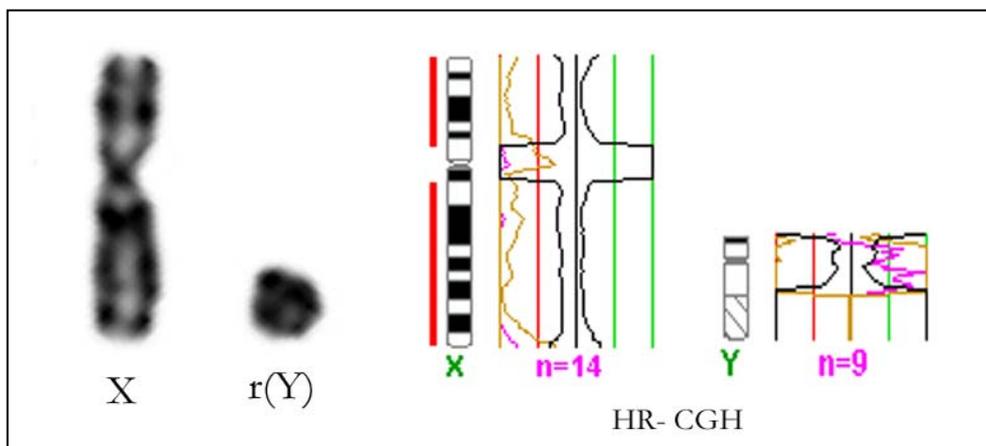
Caso M35. El análisis mediante citogenética convencional ha permitido observar la presencia de un cromosoma Y normal en aproximadamente el 56% de las células estudiadas y un cromosoma Y derivativo en el 44% restante. La aplicación de la técnica de bandas C y de una sonda específica de la región Yq12 (imagen no mostrada) ha descartado la presencia de heterocromatina constitutiva en el cromosoma Y derivativo. La aplicación de la técnica de CGH, HR-CGH y QF-PCR, limitadas en este caso por el mosaicismo observado, ha permitido sospechar de la existencia de una duplicación de Yp. El estudio mediante M-FISH, a pesar de no ser muy concluyente, ha mostrado un cromosoma Y derivativo con unos perfiles muy parecidos en ambos extremos y parecidos a su vez al brazo corto del cromosoma Y normal. Finalmente la aplicación de sondas subtelómero específicas de los cromosomas sexuales ha permitido confirmar la presencia de una t(Y;Y).



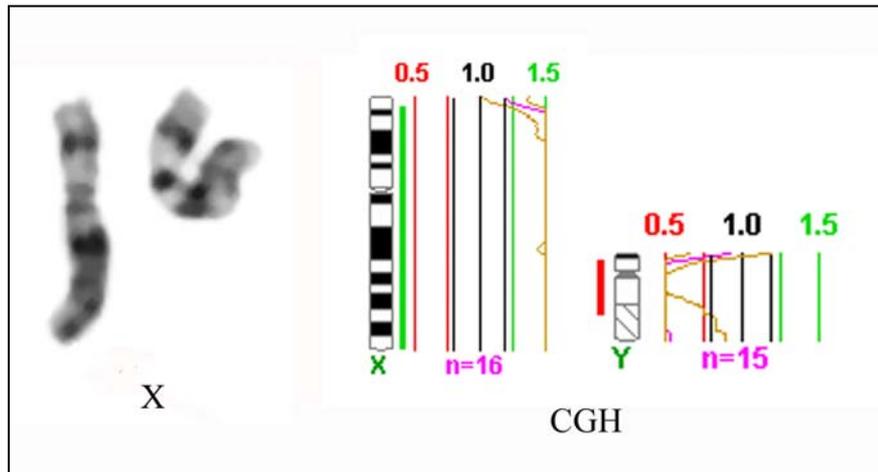
Caso M52. El cariotipo de este paciente ha evidenciado la presencia de material adicional en Xp22.3. La aplicación de la técnica de bandas C ha detectado la presencia de heterocromatina en el material adicional. El estudio mediante CGH convencional y HR-CGH ha permitido identificar la ganancia de la región cromosómica Yq11.1-q12, insinuando una mínima pérdida en Xp22.3.



Caso M69. En el presente caso el análisis mediante citogenética convencional ha revelado la presencia de una línea celular con un cromosoma Y en anillo y una línea 45,X. El análisis mediante CGH, ha insinuado la pérdida de la banda Yp11.3 aunque la HR-CGH no la llega a detectar, posiblemente debido a la presencia de amplios márgenes en esta región. En los perfiles que se muestran se observa la pérdida de un cromosoma X debido a que la hibridación se realizó con un control 46,XX. El estudio mediante PCR del gen SRY y el análisis mediante sondas subteloéricas ha mostrado la presencia de un cromosoma Y intacto desde SRY hasta el subtélomero de Yq.



Caso M70. El análisis citogenético convencional ha mostrado la presencia de un cariotipo 46,XX en un feto ecográficamente varón. El análisis mediante QF-PCR ha revelado la presencia de los marcadores correspondientes a dos cromosomas X (imagen no mostrada). Posteriormente el estudio mediante CGH convencional y HR-CGH con un control 46,XY ha detectado la presencia de la región Yp11.3 y la pérdida de Xp22.3. Finalmente, también se ha obtenido un resultado positivo en el análisis de gen SRY (dato no mostrado).



Los resultados correspondientes a los caso M-1, M-10 y M-12 se encuentran incluidos en el artículo 2 (ver anexo I).

4.3 CROMOSOMAS MARCADORES SUPERNUMERARIOS

En la Tabla 15 se detallan los resultados obtenidos al utilizar las técnicas de CGH y FISH así como la fórmula cromosómica final.

De las 15 muestras analizadas sólo se en una de ellas se ha observado mosaicismo (M-44). En 9 casos (60%) el cromosoma supernumerario tenía un origen *de novo*, en tres casos se había heredado de la madre (M-14, M-46 y M-64) y en los tres casos restantes se desconocía su origen (M-13, M-44 y M-72).

Se han identificado cromosomas marcadores derivados del:

- cromosoma 15, en 8 casos (M-13, M-14, M-20, M-42, M-46, M-58, M-72 y M-76).
- cromosoma 14, en 1 caso (M-39).
- cromosoma 22, en dos casos (M-27 y M-60).
- cromosoma 14/22, en dos casos (M-61 y M-64).
- cromosoma 4, en 1 caso (M-44).
- cromosoma 18, en 1 caso (M-67).

Los HSCs más frecuentes corresponden al grupo de pequeños marcadores derivados de cromosomas acrocéntricos: der (15) y der (22). De estos, el más frecuente, 53,3%, ha sido el der(15); en concreto la inversión-duplicación de la región pericéntrica del cromosoma 15.

La utilización de sondas centrómero-específicas ha revelado la existencia de HSCs con dos centrómeros en el 53% de los casos (M-13, M-14, M-20, M-27, M-42, M-58, M-72 y M-76).

Las limitaciones de la CGH y de la M-FISH en la identificación de pequeños cromosomas marcadores derivados de los cromosomas 14 y 22 se han puesto de manifiesto en los casos M-61 y M-64 donde no se han podido obtener resultados concluyentes.

De los 15 casos con HSCs, en 2 casos únicamente han podido llegar a ser identificados mediante FISH (sólo se disponía de extensiones cromosómicas), en el resto se han empleado ambas metodologías para su caracterización.

Tabla 15. Cromosomas marcadores supernumerarios.

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	CGH	HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosómica final
M-13	47,XX,+mar	?	ADN MET	equilibrado	equilibrado	der(15?)	D15Z1++ SNRPN-	47,XX,+mar.ish der(15) (SNRPN-,D15Z1++)
M-14	48,XY,+2mar	mat	ADN MET	equilibrado	equilibrado	der(15?)	D15Z1++ (x2) SNRPN- (x2)	48,XY,+2mar.ish der(15) (SNRPN-,D15Z1++)x2mat
M-20	47,XY,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	enh(15q11.2q14)	enh(15q11.2q14)	der(15)	D15Z1++ SNRPN+	47,XY,+mar.ish der(15)(wcp15+, SNRPN+,D15Z1++).rev ish enh(15q11.2q14)
M-27	47,XY,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	enh(14q11.2) enh(22q11.2)	enh(14q11.2) enh(22q11.2)	der(22?)	cep 22++ Midi 54++	47,XY,+mar.ish der(22) (cep22++,Midi54++).rev ish enh(22q11.2)
M-39	47,XY,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	enh(14q11.2) enh(22q11.2)	enh(14q11.2)	der(14)	wcp14+	47,XY,+mar.ish der(14)(wcp14+) .rev ish enh(14q11.2)
M-42	47,XX,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	equilibrado	equilibrado	-	D15Z1++ SNRPN-	47,XX,+mar.ish der(15) (SNRPN-,D15Z1++)
M-44	48,XY,+2mar[7]/47,XY, +mar[32]/46,XY[14]	?	MET	-	-	der(4) x2	wcp4+	48,XY,+2mar.ish der(4)(wcp4+)x2[7] /47,XY,+mar.ish der(4)(wcp4+)[32] /46,XY[14]
M-46	47,XY,+mar	mat	ADN MET	enh(15q11.2)	enh(15q11.2)	-	D15Z1+ SNRPN-	47,XY,+mar.ish der(15) (SNRPN-,D15Z1+).rev ish enh(15q11.2)mat
M-58	47,XX,+mar	<i>de novo</i>	MET	-	-	der(15?)	D15Z1++ SNRPN-	47,XX,+mar.ish der(15) (SNRPN-,D15Z1++)
M-60	47,XX,+mar	<i>de novo</i>	MET	-	-	der(22)	wcp22+ D22S553 -	47,XX,+mar.ish der(22) (wcp22+,D22S553-)
M-61	47,XX,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	<i>enh(14q11)</i> enh(22q11.2)	equilibrado	der(14?)	wcp14- D22S553 -	47,XX,+mar.ish der(14?) (wcp14-,D22S553-)

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	CGH	HR-CGH	M-FISH	FISH	Fórmula cromosómica final
M-64	47,XY,+mar	mat	ADN MET	<i>enh(14q11.2)</i> enh(22q11.2)	<i>enh(14q11.2)</i> enh(22q11.2)	–	D22S553 -	47,XY,+mar.ish der(22?)(D22S553-) .rev ish enh(22q11.2)mat
M-67	47,XY,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	enh(18p11.2pter)	enh(18p11.2pter)	–	wcp18+	47,XY,+mar.ish i(18)(p10)(wcp18+) .rev ish enh(18p11.2pter)
M-72	47,XY,+mar	?	ADN MET	enh(15q11.2)	enh(15q11.2)	–	D15Z1++ SNRPN -	47,XY,+mar.ish der(15) (SNRPN-,D15Z1++).rev ish enh(15q11.2)
M-76	47,XY,+mar	<i>de novo</i>	ADN MET	enh(15q11.2q15)	enh(15q11.2q15)	–	D15Z1++ SNRPN++	47,XY,+mar.ish der(15)(SNRPN++, D15Z1++).rev ish enh(15q11.2q15)

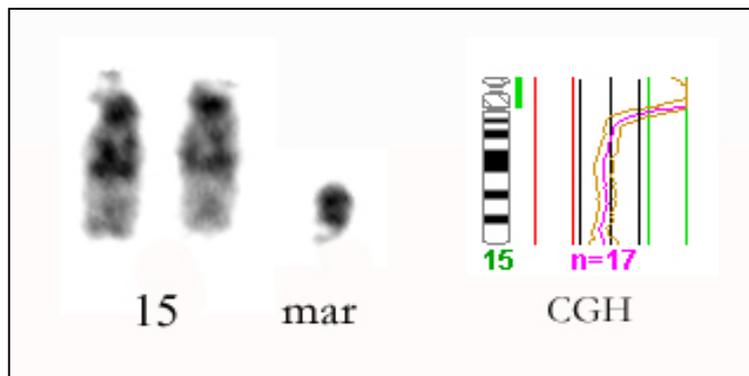
Abreviaciones. **cep 22**, sonda centromérica no comercial del cromosoma 22; **dim**, relación (*ratio*) de intensidad de fluorescencia disminuida (delección); **D15Z1**, locus localizado en la región centromérica del cromosoma 15; **D22S553**, locus localizado en la región 22q11.2 del cromosoma 22 (Región crítica síndrome de DiGeorge); **enh**, relación (*ratio*) de intensidad de fluorescencia aumentada (duplicación); **mat**. Herencia materna; **M.D.** Tipo de material disponible para el estudio; **MET**, Preparación cromosómica metafásica; **Midi 54**, región cromosómica localizada en brazo corto del cromosoma 22p; **SNRPN**, locus localizado en la región 15q11-q13 del cromosoma 15 (Región crítica síndrome de Prader-Willi/Angelman-PWACR); **wcp**, sonda de pintado cromosómico.

En *color gris*, ganancia o pérdida no detectada por el *software* pero que muestra desviación del perfil normal.

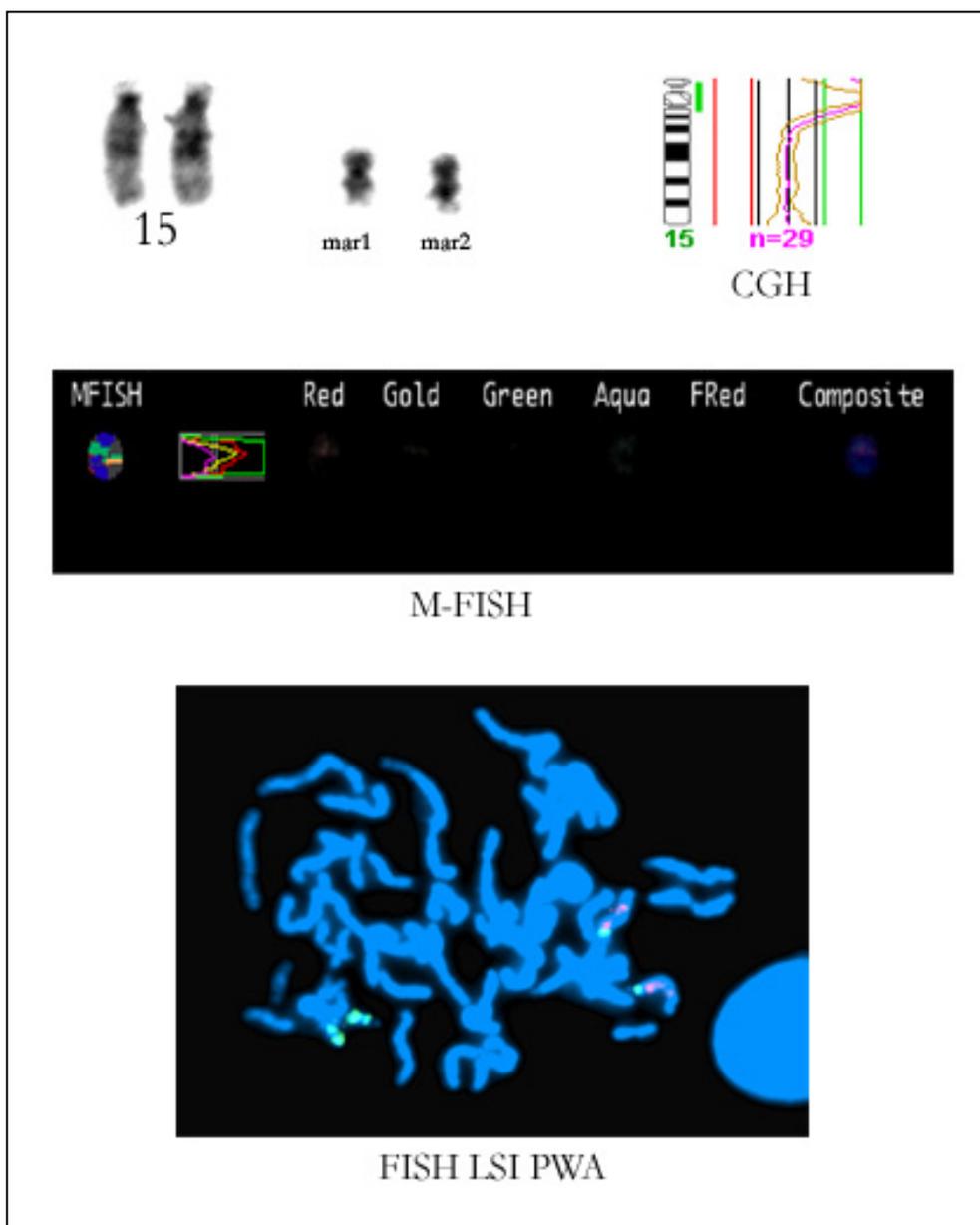
IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CASOS CON CROMOSOMAS
MARCADORES SUPERNUMERARIOS

- ***Marcadores supernumerarios derivados del cromosoma 15***

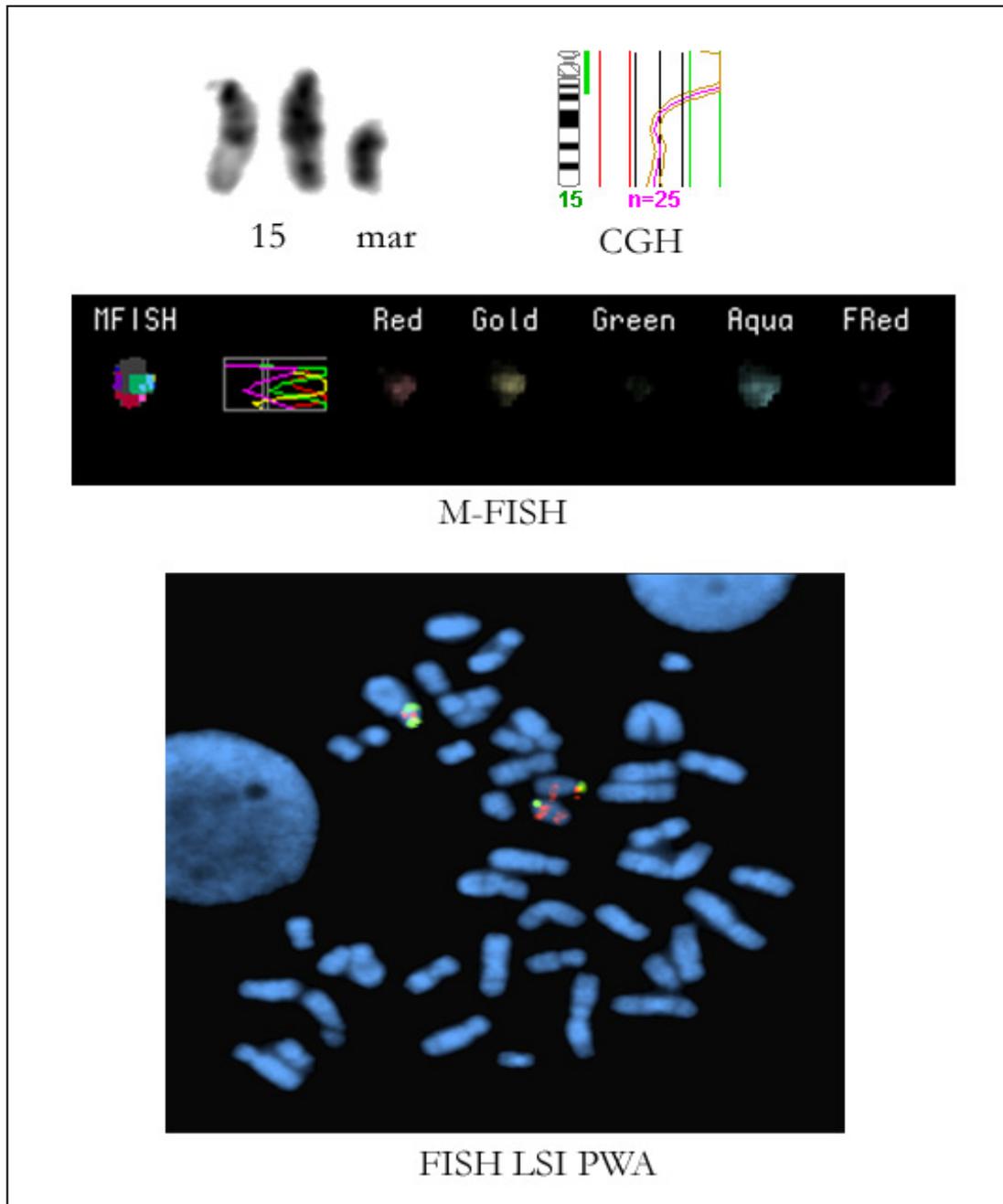
Caso M13. La técnica de CGH no ha detectado ganancia de eucromatina, pese a mostrar una desviación significativa del perfil en el centrómero del cromosoma 15. La aplicación de la sonda locus específica (LSI) del síndrome Prader-Willi/Angelman (PWA), ha mostrado la presencia de dos centrómeros y la ausencia de la región PWA en el cromosoma marcador.



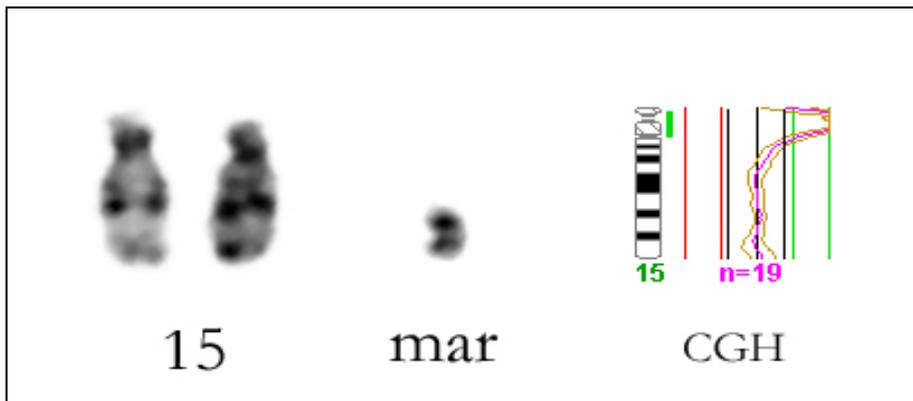
Caso M14. En este paciente, el cromosoma marcador se había heredado de la paciente M-13, estando además duplicado. La técnica de CGH igual que en el caso anterior, no ha detectado ganancia de eucromatina, pese a mostrar una desviación significativa del perfil en el centrómero del cromosoma 15. La técnica de M-FISH, aunque con resultado confuso, ha permitido sospechar de su origen cromosómico como del cromosoma 15. La aplicación de la sonda LSI de PWA, mostró la presencia de dos centrómeros y la ausencia de la región PWA en los dos cromosomas marcadores.



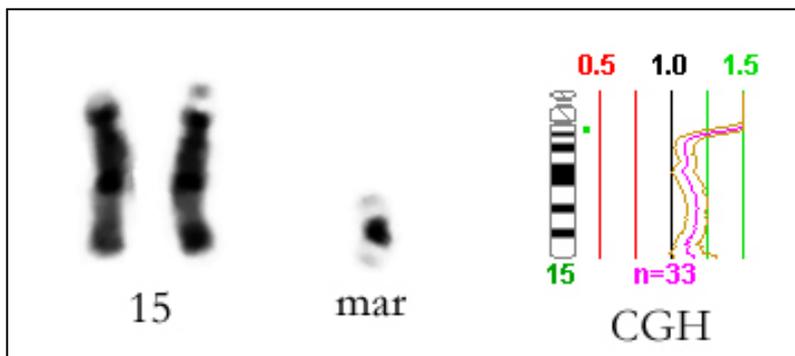
Caso M20. La aplicación de la técnica de CGH ha revelado la ganancia de las bandas 15q11.2-q14. En el análisis mediante M-FISH el cromosoma marcador ha mostrado hibridación de cromosoma 15. La posterior aplicación de la sonda LSI de PWA, ha evidenciado la presencia de dos centrómeros y de la región PWA.



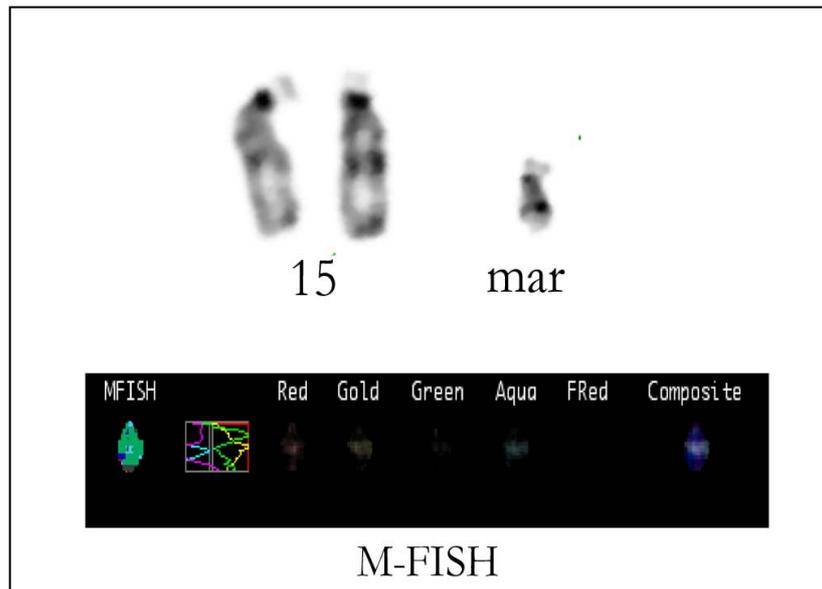
Caso M42. En el presente caso, los perfiles de CGH no han revelado ganancia de euromatina, pese a mostrar una desviación significativa del perfil en el centrómero del cromosoma 15. La aplicación de la sonda LSI de PWA ha puesto de manifiesto la presencia de dos centrómeros y la ausencia de la región PWA en el cromosoma marcador.



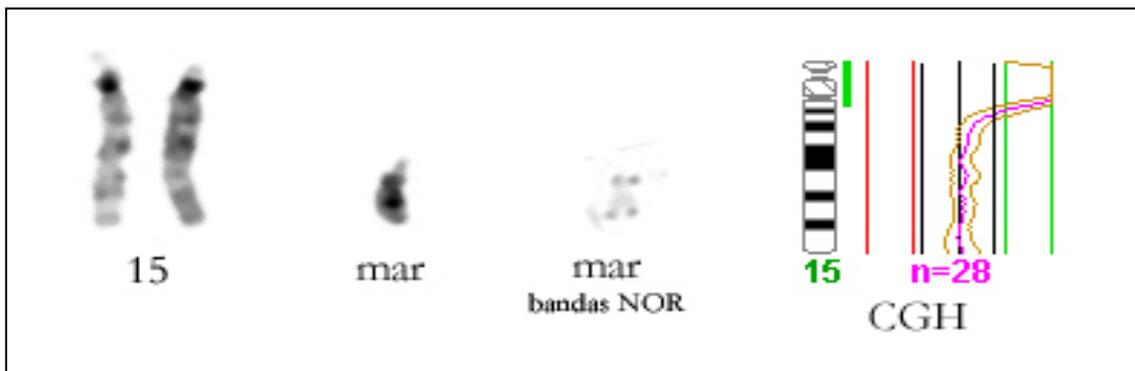
Caso M46. La CGH ha revelado la ganancia de la banda 15q11.2. La posterior aplicación de la sonda LSI de PWA ha mostrado la presencia de un centrómero y la ausencia de la región PWA.



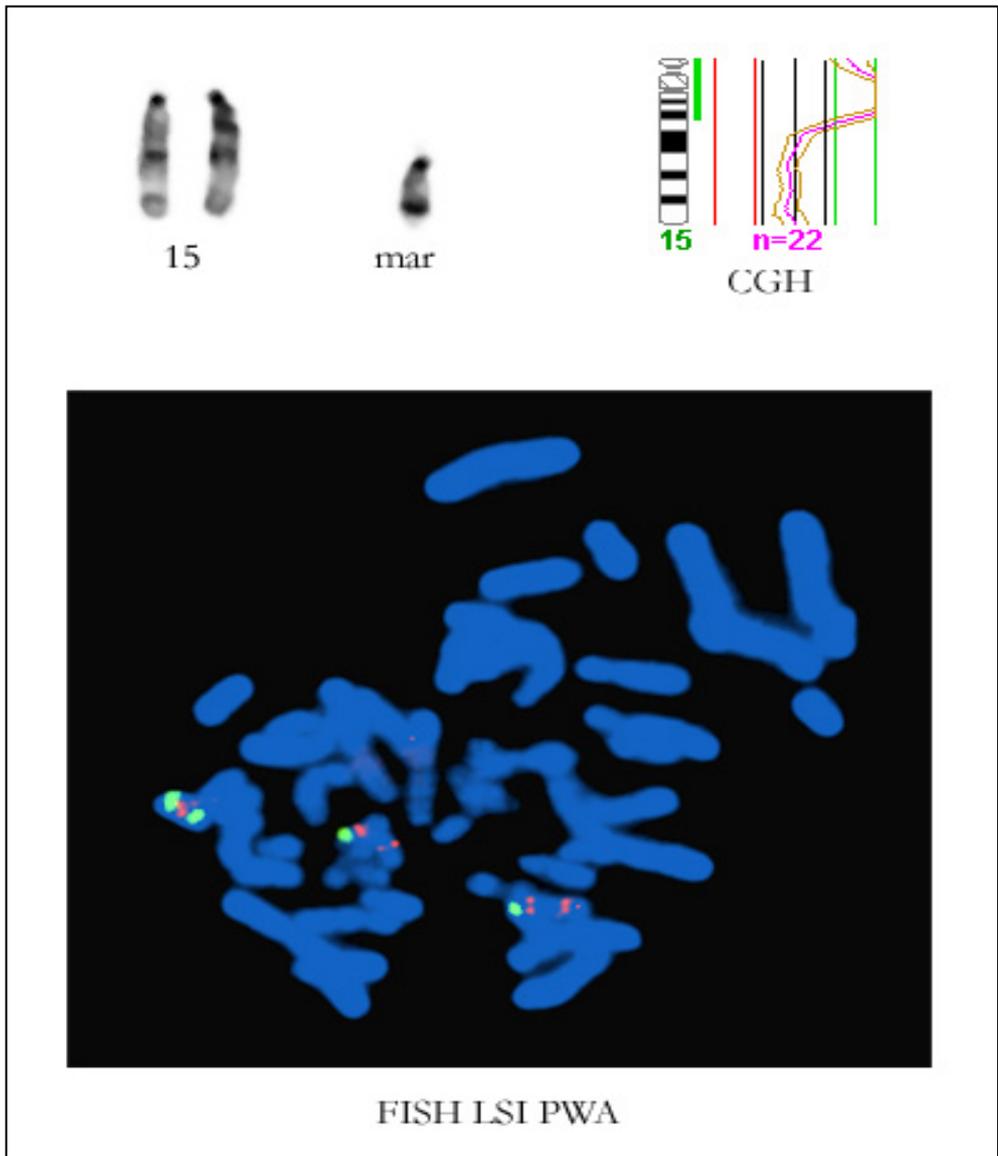
Caso M58. La aplicación de la técnica de M-FISH ha permitido sospechar el origen del cromosoma marcador como derivado del cromosoma 15. Posteriormente, la aplicación de la sonda LSI de PWA ha mostrado la presencia de dos centrómeros y la ausencia de la región PWA en el cromosoma marcador. En el presente caso, no ha sido posible la aplicación de la técnica de CGH al no disponer de ADN del paciente.



Caso M72. Los perfiles de CGH han revelado la ganancia de la banda 15q11.2. Las bandas NOR han mostrado la imagen de un cromosoma marcador bisatelizado. La posterior aplicación de la sonda LSI de PWA, ha evidenciado la presencia de dos centrómeros y la ausencia de la región PWA.

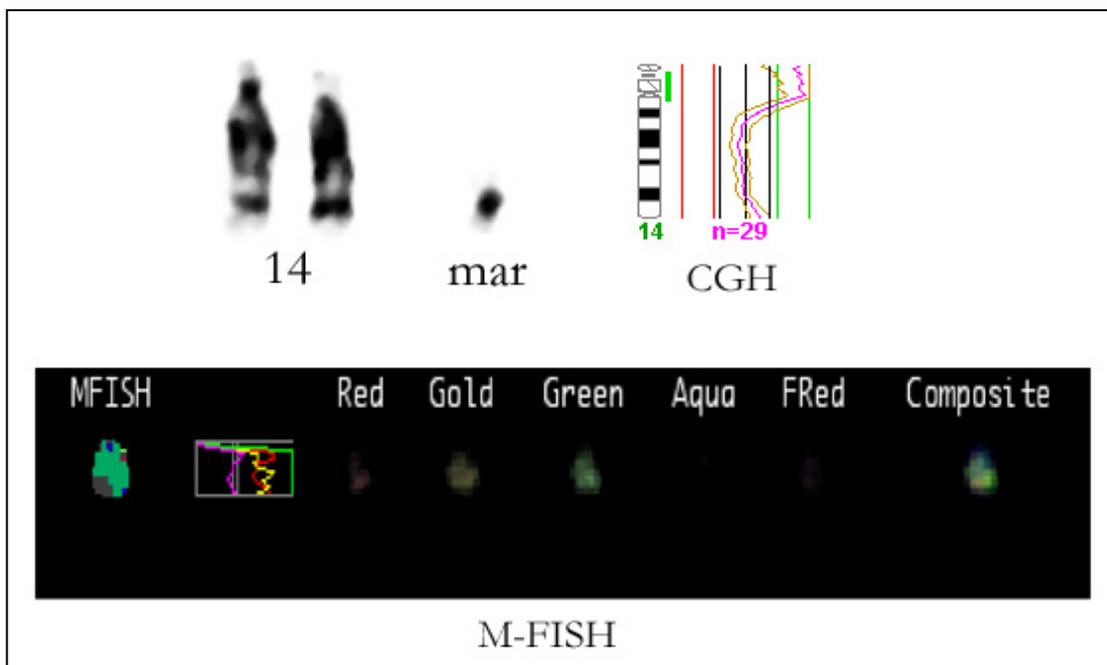


Caso M76. En este caso, la aplicación de la técnica de CGH ha revelado la ganancia de la banda 15q11.2-q15. La posterior aplicación de la sonda LSI de PWA ha mostrado la presencia de dos centrómeros y de dos regiones de PWA en el cromosoma marcador.



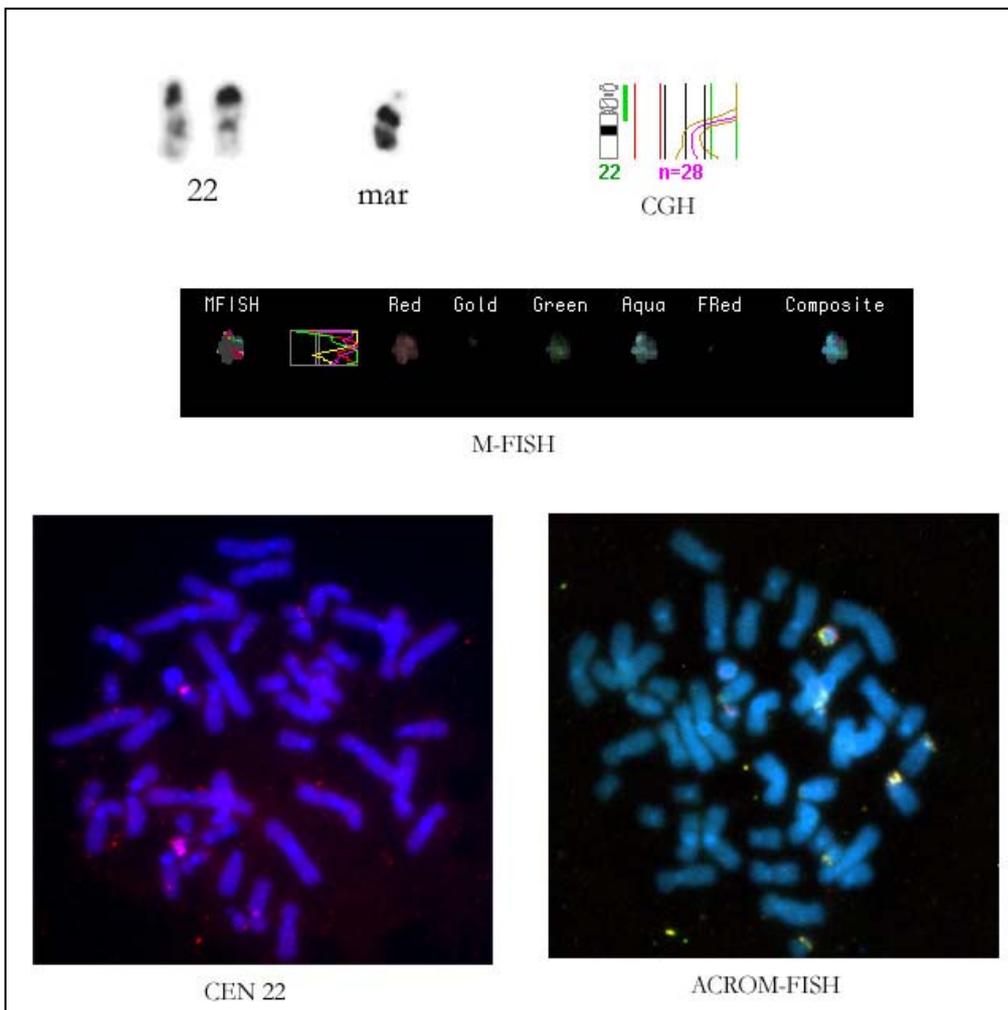
- ***Marcadores supernumerarios derivados del cromosoma 14***

Caso M39. La CGH ha revelado la ganancia parcial de la banda 14q11.2, pero también la ganancia de la banda 22q11.2 (imagen no mostrada). La aplicación de la técnica de M-FISH ha mostrado como el cromosoma marcador hibridaba con la combinación de fluorocromos correspondiente al cromosoma 14. Este resultado ha sido confirmado con sonda de pintado cromosómico específica del cromosoma 14.

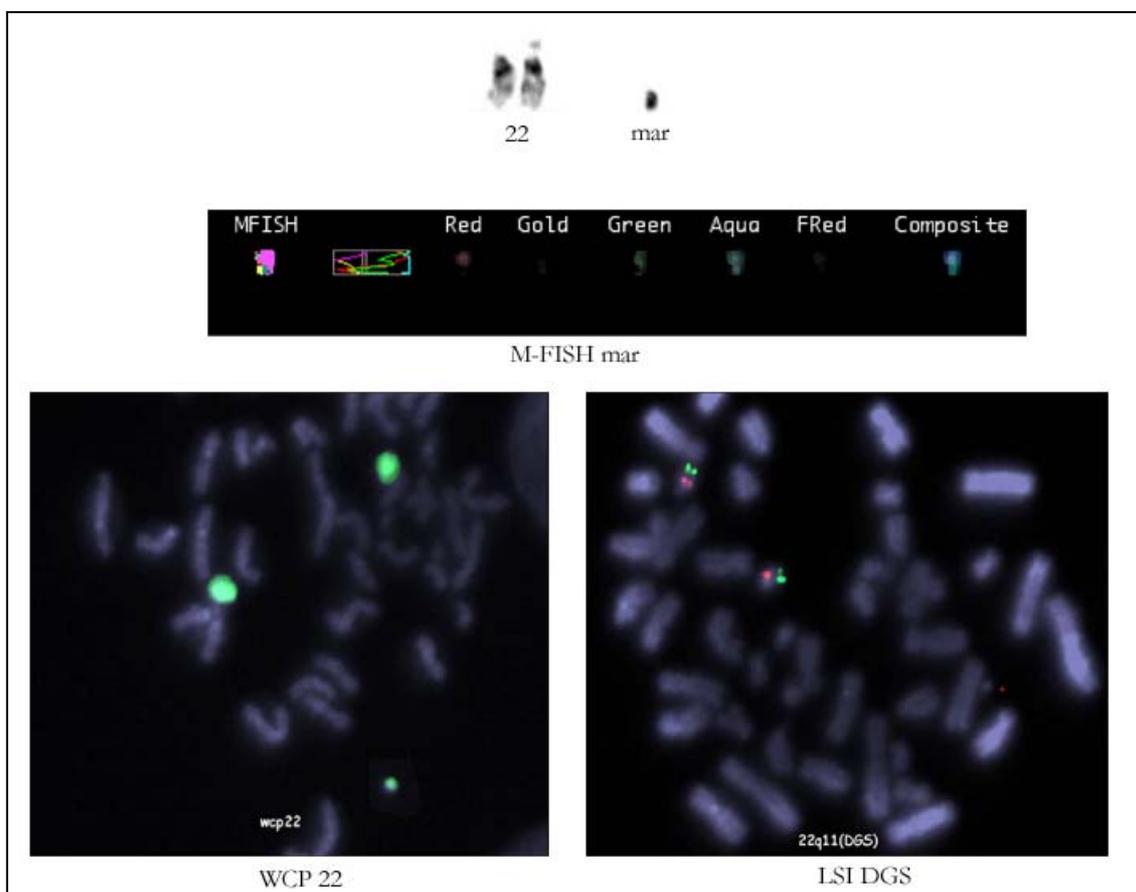


- **Marcadores supernumerarios derivados del cromosoma 22**

Caso M27. Los perfiles de CGH han revelado la ganancia de la banda 22q11.2, pero también la ganancia de la banda 14q11.2 (imagen no mostrada). La aplicación de la técnica de M-FISH ha permitido observar como el cromosoma marcador parecía estar compuesto por material del cromosoma 22. La aplicación de una sonda centromérica no comercial del cromosoma 22 y de las técnicas de cenM-FISH (imagen no mostrada) y ACROM-FISH ha evidenciado la presencia en el cromosoma marcador de: la región Midi54 (equivalente al brazo p) → región NOR → centrómero del cromosoma 22 → región heterocromática no identificada → centrómero cromosoma 22 → región Midi54.

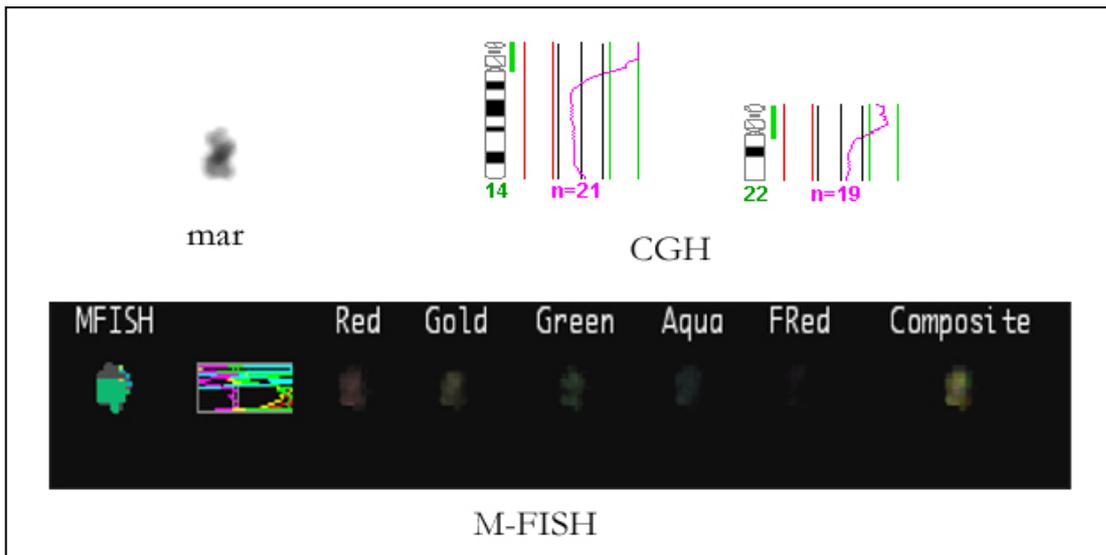


Caso M60. La aplicación de la técnica de M-FISH ha evidenciado como el cromosoma marcador hibridaba con la combinación de fluorocromos correspondiente al cromosoma 22. Este resultado ha sido confirmado utilizando sonda de pintado cromosómico del cromosoma 22. La aplicación de la sonda TUPLE I (22q11.2) (específica del síndrome de DiGeorge) no ha hibridado en el cromosoma marcador. El estudio mediante CGH no ha sido posible al no disponer de ADN del paciente.

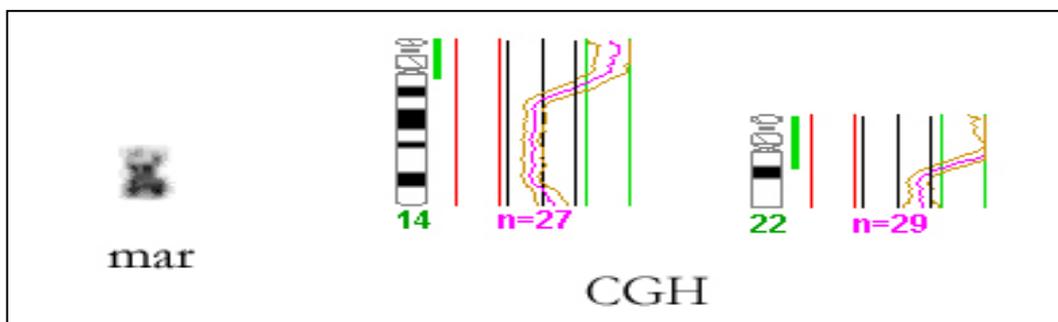


- ***Marcadores supernumerarios derivados de los cromosomas 14/ 22***

Caso M61. En el presente caso, la aplicación de la técnica de CGH ha revelado la ganancia parcial de la banda 22q11.1, pero también ha mostrado una desviación significativa alrededor del centrómero del cromosoma 14. La aplicación de la técnica de M-FISH no ha permitido obtener resultados concluyentes y la aplicación de la sonda TUPLE I (22q11.2) no ha hibridado con el cromosoma marcador (imagen no mostrada).

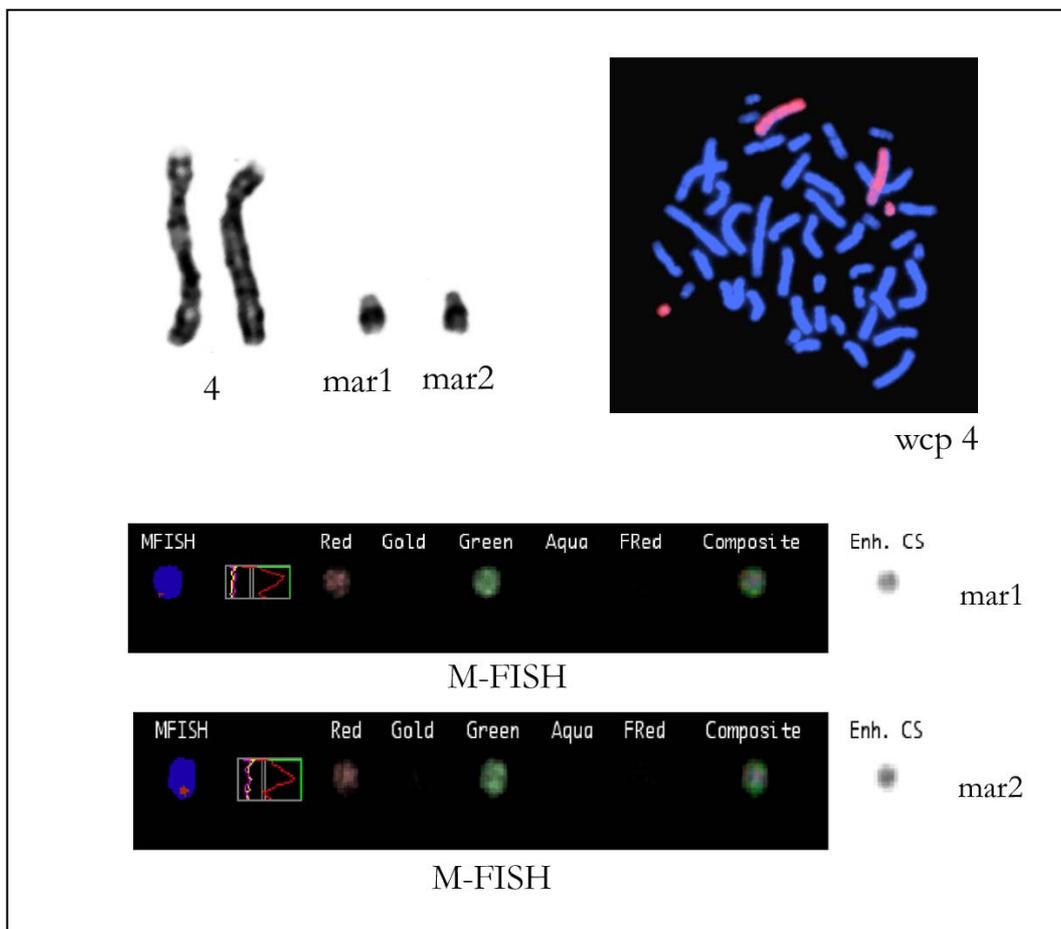


Caso M64. En el este caso, los perfiles de CGH han revelado la ganancia de la banda 22q11.2, pero también la existencia de una desviación significativa alrededor del centrómero del cromosoma 14. La aplicación de la sonda TUPLE I (22q11.2) no ha mostrado hibridación en el cromosoma marcador.

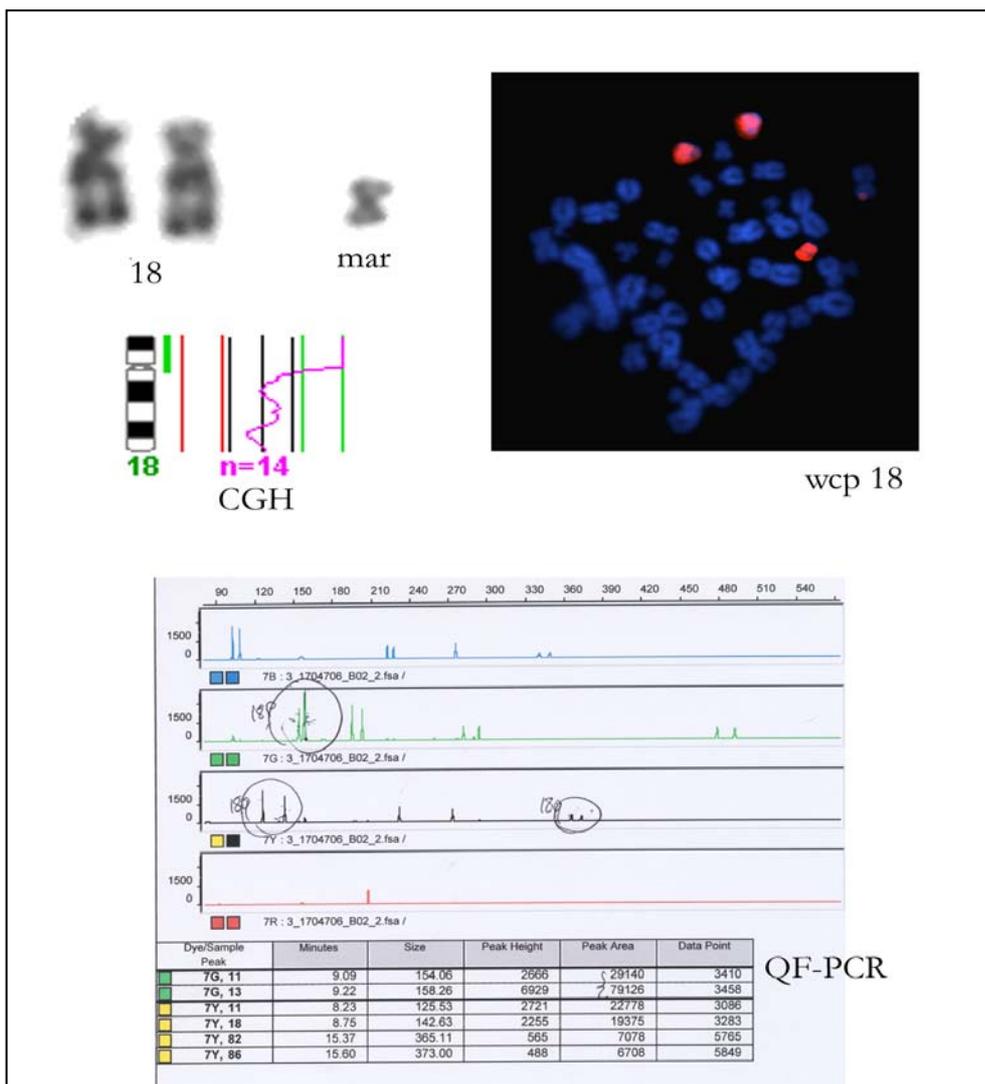


- **Otros marcadores supernumerarios**

Caso M44. El análisis citogenético convencional ha detectado en este paciente la presencia de 0-2 cromosomas marcadores. La M-FISH ha permitido identificar el origen de los cromosomas marcadores, como material del cromosoma 4. Este resultado ha sido confirmado con la aplicación de sondas de pintado cromosómico específico. No ha sido posible determinar mediante CGH la región cromosómica exacta implicada, debido a no disponer de ADN del paciente.



Caso M67. El estudio citogenético prenatal ha detectado la presencia de un cromosoma marcador extra no identificable por su patrón de bandas en un feto malformado. La aplicación de la técnica de CGH ha permitido la caracterización del marcador como un isocromosoma 18p. Este resultado ha sido confirmado mediante FISH con sonda de pintado cromosómico específico y mediante QF-PCR.



4.4 REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS “APARENTEMENTE” EQUILIBRADAS

En la Tabla 16 se detallan los resultados obtenidos al utilizar las técnicas de CGH y FISH en el análisis de reorganizaciones cromosómicas así como la fórmula cromosómica final.

De los 9 casos analizados sólo uno tenía un origen heredado (vía materna), el resto eran reorganizaciones cromosómicas *de novo*.

En dos casos, únicamente se ha podido llevar a cabo el estudio mediante técnicas de FISH al no disponer de ADN de estos pacientes (M-37 y M-54). El análisis mediante HR-CGH se ha realizado en 7 de las 9 muestras evidenciando la ausencia de desequilibrios del genoma (>3 Mb) en todas ellas, lo que sugiere que se trata de reorganizaciones cromosómicas “aparentemente” equilibradas.

El análisis detallado de las imágenes obtenidas mediante bandas G y FISH ha permitido la identificación exacta de los puntos de rotura.

Un 67% (6/9) de las muestras corresponden a RCCs. El número de cromosomas implicados en estas RCCs y de roturas ha sido variable.

En los casos M-7 y M-45 se ha detectado la implicación de satélites en la translocación cromosómica.

Dada la complejidad de las fórmulas de los siguientes casos, en la siguiente tabla, las fórmulas cromosómicas definitivas no se han expresado utilizando las normas ISCN 1995 para hibridación *in situ*, con el objetivo de simplificar su comprensión.

Tabla 16. Reorganizaciones cromosómicas “aparentemente” equilibradas .

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	M-FISH	FISH	HR-CGH	Puntos rotura	Fórmula cromosómica
M-7	46,X,t(X;2;?)	<i>de novo</i>	ADN MET	der(X)t(X;2) der(2)t(X;2)	Idem M-FISH	equilibrado	3	46,X,der(X)(Xpter→Xq21::?p12::2q32→2qter), der(2)(2pter→2q32::Xq21→Xqter)
M-17^a	46,XX,-1,-4,-6,-11, +mar1,+mar2,+mar3, +mar4	<i>de novo</i>	ADN MET	der(1)t(1;6) der(4)t(4;11) der(6)t(6;11;4) der(11)t(6;11)	Idem M-FISH excepto der(6) t(6;11;4;4)	equilibrado	6	46,X,der(1)t(1;6)(q43;q15),der(4)t(4;11)(q21;q22), der(6)t(6;11;4;4)(p21.3q15;q22;q21q33;q43;q33), der(11)t(6;11)(p21.3;q22)
M-24^b	46, X,-2,-11,-22,-X, +mar1,+mar2,+mar3, +mar4	<i>de novo</i>	ADN MET	der(X)t(22;X;2) der(2)t(X;2) der(11)ins(11;2) der(22)t(X;22)	Idem M-FISH excepto der(2) t(2;11;X)	equilibrado	7	46, X,der(X)t(22;X;2)(q13.3;p11.21q24;q31), der(2)t(2;11;X)(q21;q22.2;q24),der(11)ins(11;2) (q22.1;q21q31),der(22)t(X;22)(p11.21;q13.3)
M-36^a	46,XX,der(7)inv(7)(p13q32) del(7)(q36),t(14;15) (q11.2;q15)	<i>de novo</i>	ADN MET	der(7)ins(15;7) der(14)t(14;15) der(15)t(14;15)	Idem M-FISH	equilibrado	5	46,XX,der(7)inv(7)(p13q32)ins(15;7) (q15;q36.1q36.3),t(14;15)(q11.2;q15)

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	M-FISH	FISH	HR-CGH	Puntos rotura	Fórmula cromosómica
M-37	46,XY,t(1;6;16) (q21;q13;p11.2)	<i>de novo</i>	MET	der(1)t(1;16) der(6)t(6;1) der(16)t(16;1)	-	-	3	46,XY,t(1;6;16)(q21;q13;p11.2)
M-45	46,XX,add(22)(q13)	<i>de novo</i>	ADN MET	el material adicional no hibrida	-	equilibrado	2	46,XX,22qs
M-49	45,XX,der(21;22) (q10?;q10?)	<i>de novo</i>	ADN MET	-	-	equilibrado	2	45,XX,der(21;22)(q10?;q10?) .rev ish der(21;22)(q10;q10)
M-54	46,XX,add(12)(p13)	mat	MET	der(12)t(12;19) der(19)t(19;12)	Idem M-FISH	-	2	46,XX,t(12;19)(p13;p13.3)mat
M-65	46,XY,der(5)inv(5) (q13q33)t(5;7)(q13q15;p22)	<i>de novo</i>	ADN MET	der(7)ins(7;5)	Idem M-FISH	equilibrado	4	46,XY,der(5)inv(5)(q13q33)ins(7;5)(p15;q13q15), der(7)ins(7;5)

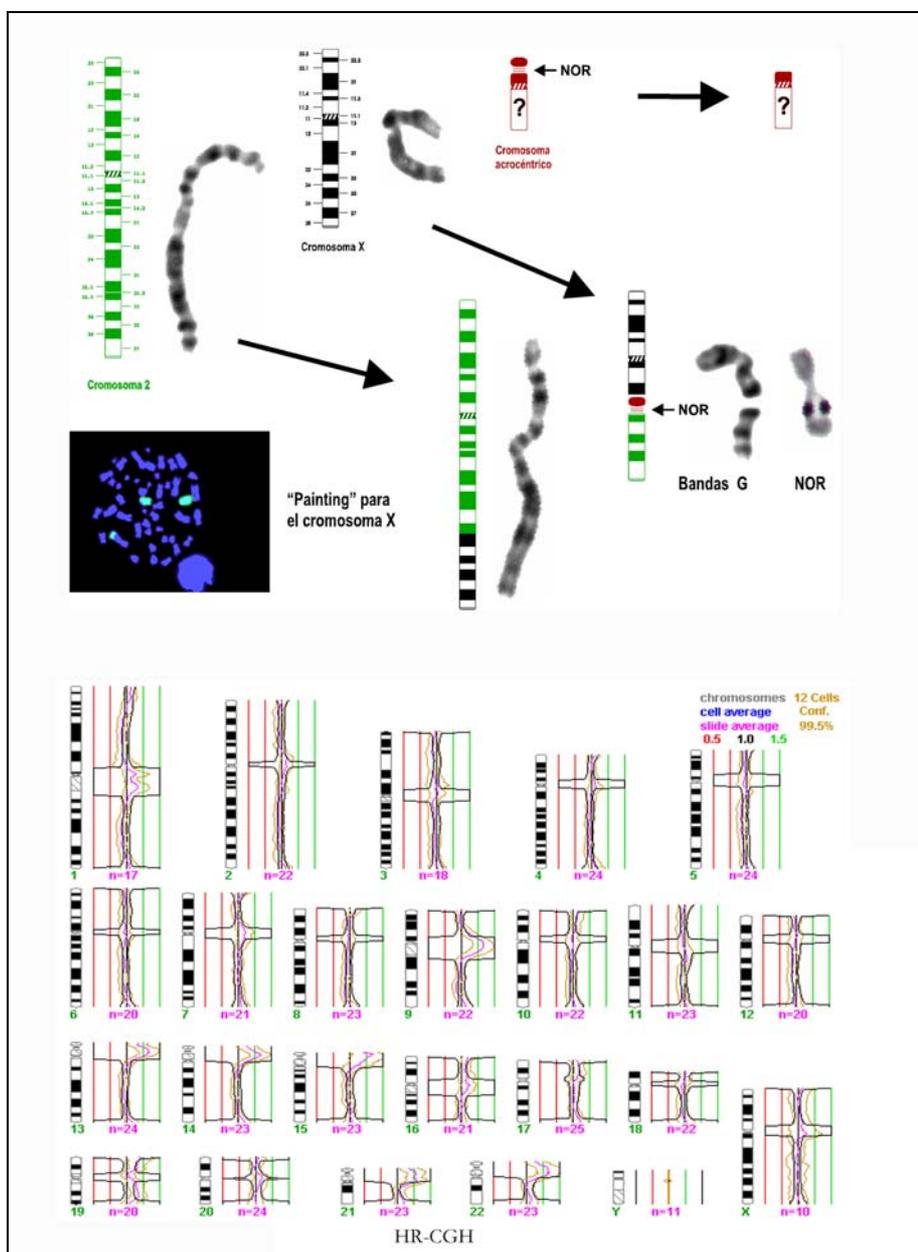
Abreviaciones. **M.D.** Tipo de material disponible para el estudio; **mat**, Herencia materna; **MET**, Preparación cromosómica metafásica.

^a Casos enviados para publicación.

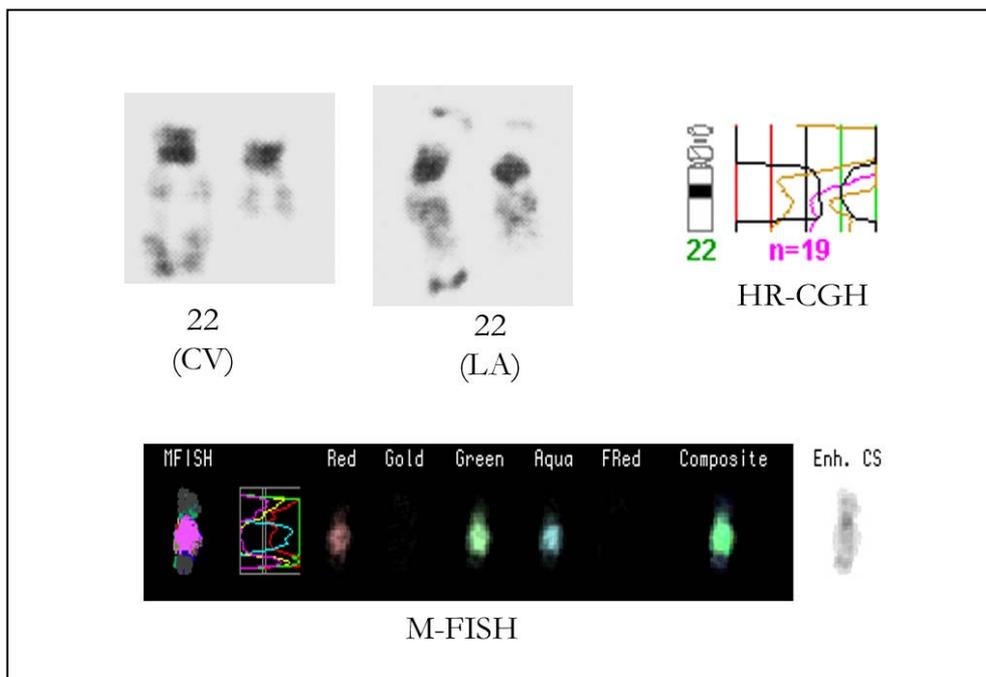
^b Caso publicado en Fertility and Sterility (2004); 82(6):1666-71

IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CASOS CON REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS “APARENTEMENTE” EQUILIBRADAS

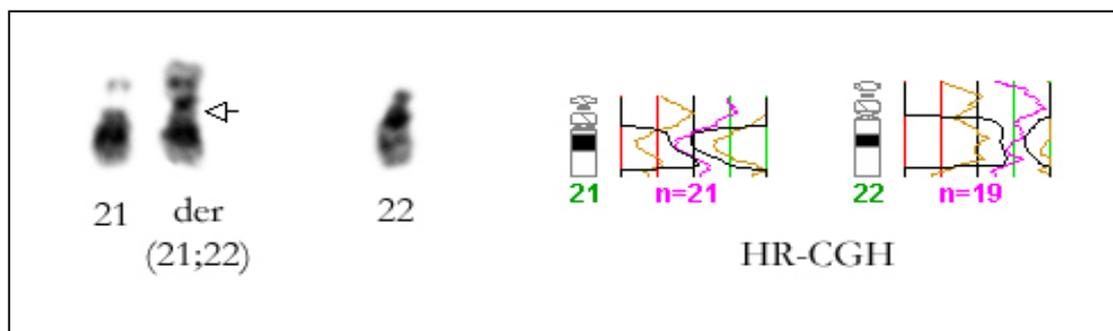
Caso M7. En el cariotipo del presente paciente se ha observado además de una t(X;2), confirmada por FISH, la presencia de un gap acromático en Xq21. Las bandas NOR han confirmado la presencia de una estructura NOR ectópica. El análisis mediante HR-CGH ha permitido descartar la presencia de desequilibrios cromosómicos > 3 Mb.



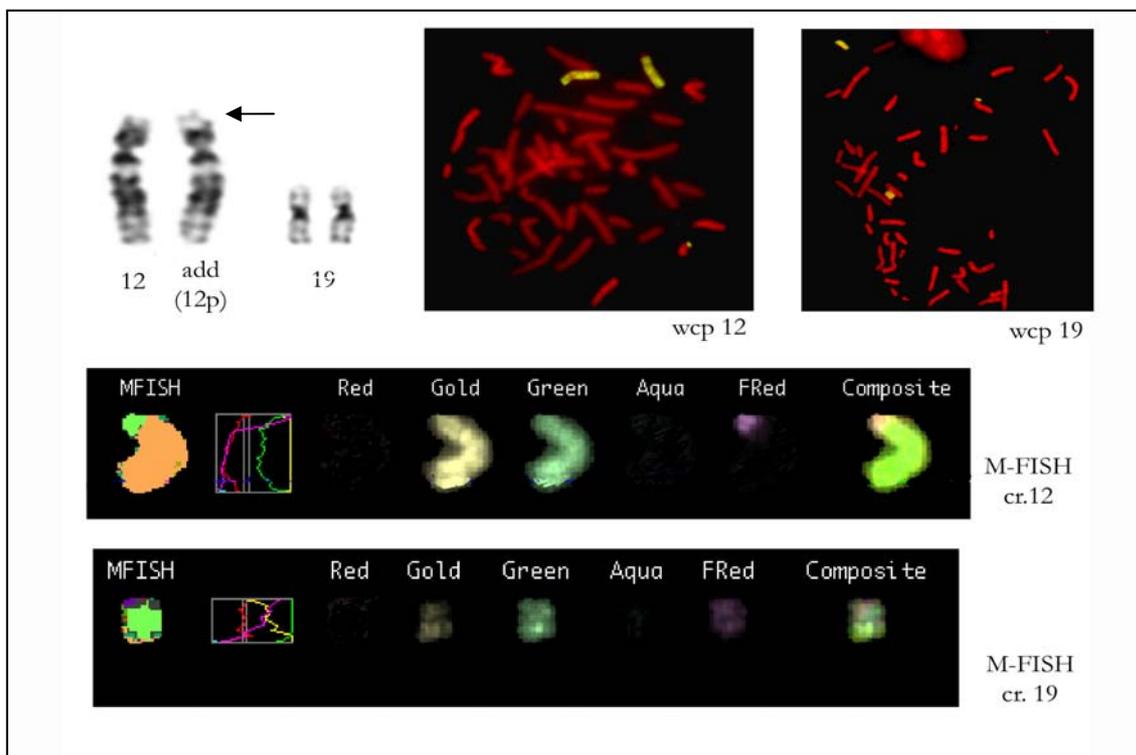
Caso M45. El análisis citogenético prenatal realizado en vellosidad corial ha mostrado la presencia de material adicional de origen desconocido en 22q13.3 en todas las células analizadas. El análisis mediante HR-CGH no ha detectado ningún desequilibrio cromosómico. En una muestra posterior de líquido amniótico, en la cual la anomalía se observaba únicamente en el 66% de las células estudiadas, se ha realizado el análisis mediante M-FISH, que ha revelado la ausencia de hibridación en el material adicionado. Ante la sospecha de una posible presencia de satélites translocados al brazo largo de un cromosoma 22, se han realizado bandas NOR las cuales han confirmado dicha hipótesis (imagen no mostrada).



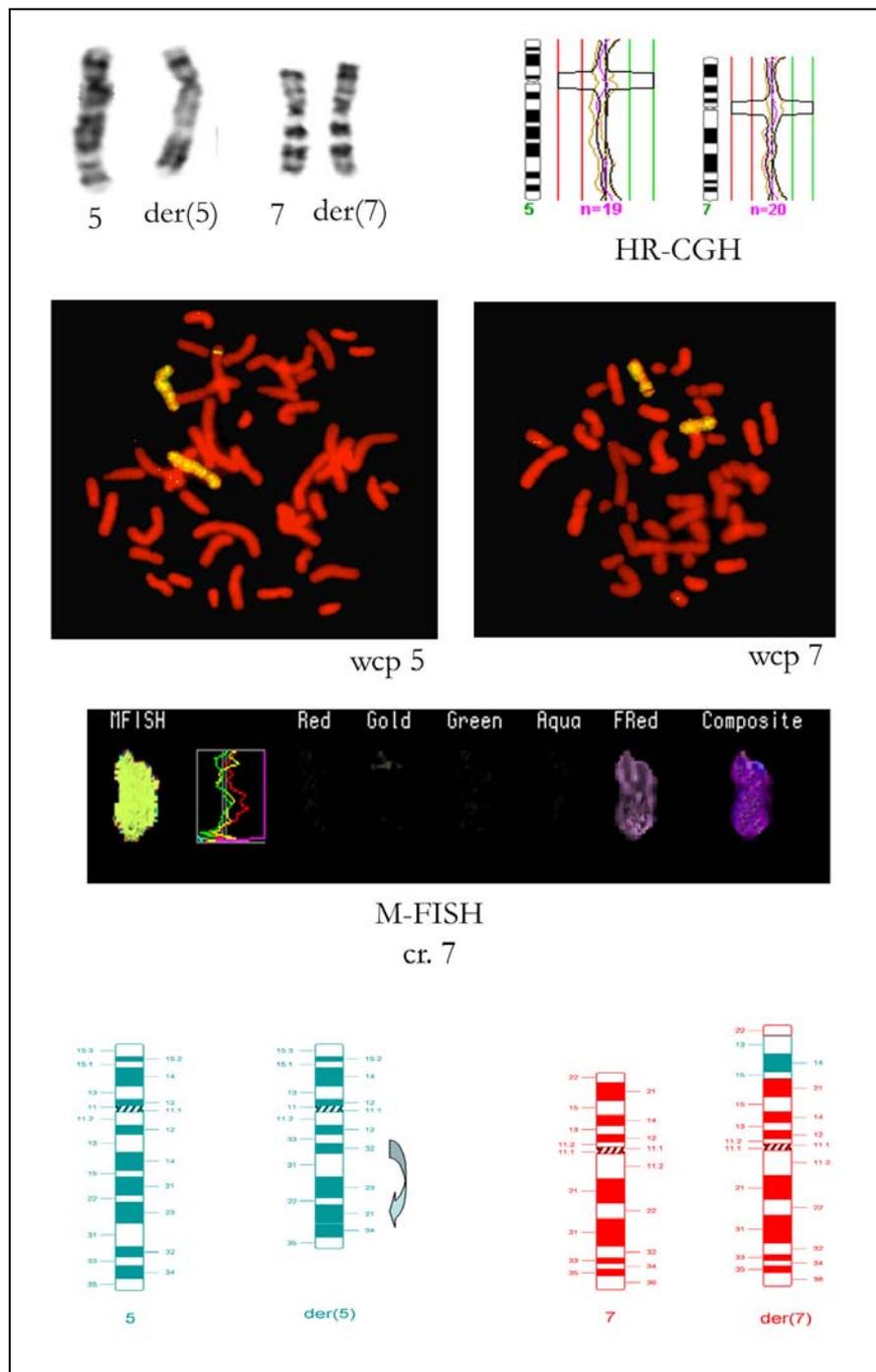
Caso M49. En el presente caso, el análisis citogenético convencional ha revelado la presencia de un cromosoma derivativo por una t(21;22) en una niña con fenotipo anómalo. La aplicación de la técnica de HR-CGH permitió descartar la presencia de desequilibrios cromosómicos >3 Mb.



Caso M54. En el siguiente caso, el análisis citogenético convencional ha detectado la presencia de material adicional en 12p13.3 (en un feto ecográficamente normal). Este mismo derivativo se ha encontrado al realizar el cariotipo de la gestante. El análisis mediante M-FISH ha revelado la presencia de una t(12;19), la cual ha sido confirmada mediante sondas de pintado cromosómico específico. En este caso no fue posible valorar la presencia de desequilibrios cromosómicos mediante CGH al no disponer de muestra de ADN.



Caso M65. El análisis citogenético convencional ha revelado la presencia de dos cromosomas derivados, 5 y 7, sospechándose la existencia de una inversión del brazo largo del cromosoma 5 y una posterior translocación al cromosoma 7. El análisis mediante HR-CGH no ha detectado desequilibrios cromosómicos >3 Mb. La aplicación de sondas de pintado cromosómico específico y la M-FISH multicolor ha mostrado la presencia de una inserción del cromosoma 5 en el brazo corto del cromosoma 7, descartando la hipótesis de una translocación recíproca entre los cromosomas 5 y 7.



Es interesante destacar la detección e identificación de:

- la presencia de dos inserciones crípticas en el mismo cromosoma derivativo (der(6)) del caso M-17
- una inserción críptica implicada en la RCC del caso M-24,
- y de una inserción de un fragmento del cromosoma 7 en el cromosoma 15 derivativo en el caso M-36 y del cromosoma 5 en el cromosoma 7 derivativo en el caso M-65.

Los resultados correspondientes a los casos M-24, M-17 y M-36 se encuentran incluidos en los artículos 3 y 5 respectivamente (ver anexo I).

4.5 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS CRÍPTICAS NO CARACTERIZADAS

Finalmente, en este grupo se han incluido tres casos: M-16 y M-21 (inicialmente clasificados como reorganizaciones cromosómicas crípticas, tabla 10 del apartado de material y métodos) y M-62 (inicialmente clasificado como paciente candidato de ser portador de una trisomía parcial autosómica, tabla 7 del apartado de material y métodos). Cabe destacar, que en los dos primeros casos, la anomalía cromosómica críptica está posiblemente exenta de efecto fenotípico, ya que se presentaba también en uno de sus progenitores (con fenotipo normal).

En los tres casos ha resultado un factor limitante, el no disponer del tipo de muestra necesario para la completa caracterización de la anomalía cromosómica previamente detectada mediante bandas G.

Al no poder aplicar técnicas de FISH que requieren preparaciones metafásicas (por falta de muestra) no se ha podido caracterizar la alteración cromosómica presente en los casos M-16 y M-21. Únicamente, se ha podido descartar, mediante HR-CGH, la presencia de desequilibrios del genoma (> 3 Mb) en ambos casos. Lo que sugiere que las anomalías cromosómicas detectadas son “aparentemente” equilibradas.

Por otro lado, en el tercer caso, M-62, únicamente ha sido posible la aplicación de la técnica de M-FISH, la cual no ha sido resolutive en este caso, ya que el material adicional detectado en 9q34 no pudo ser identificado al no hibridar con ninguna de las sondas de pintado cromosómico. La aplicación de la técnica de bandas NOR, mostró un material adicional NOR (-).

En la tabla 17 se detallan los resultados obtenidos al utilizar las diferentes técnicas

Tabla 17. Anomalías cromosómicas crípticas no caracterizadas.

Caso	Cariotipo	Origen	M.D.	M-FISH	FISH	Otras técnicas	HR-CGH	Fórmula cromosómica
M-16	46,XY,ins(13;?) (q21.2;?)	pat	ADN	–	–		equilibrado	46,XY,ins(13;?) (q21.2;?)pat
M-21	46,XX,?inv(1)(q41?)	mat	ADN	–	–		equilibrado	46,XX,?inv(1)(q41?)mat
M-62	46,XX,add(9)(q34)	?	MET	el material adicional no híbrida	–	NOR-	–	46,XX,9qs?

Abreviaciones: **mat**, Herencia materna; **M.D.** Tipo de material disponible para el estudio; **MET**, Preparación cromosómica metafásica; **NOR**, Bandas NOR; **pat**, Herencia paterna.

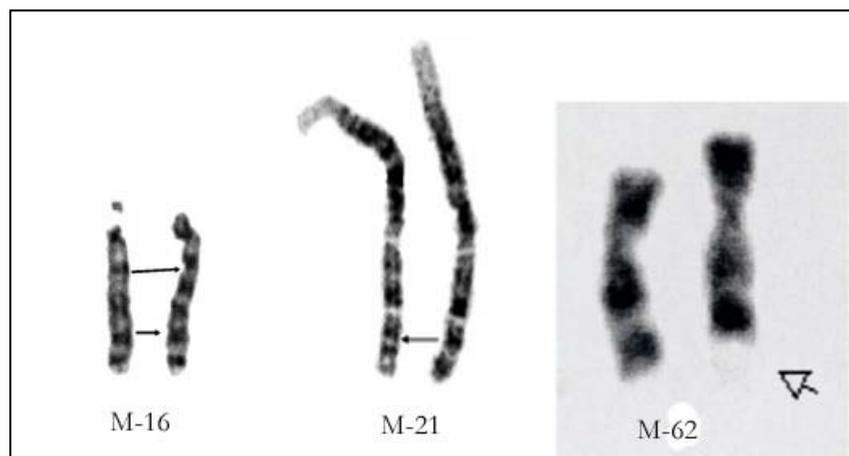


Tabla 18. Listado de todos los resultados obtenidos con los casos ordenados correlativamente.

<i>Caso</i>	<i>Cariotipo</i>
M-1	46,X,+mar.ish del(Y)(wcpY+).rev ish dim(Yq11.2qter)
M-3	46,XY,del(16)(p?) .rev ish dim(16p11.2)
M-7	46,X,der(X)(Xpter→Xq21::p12::2q32→2qter), der(2)(2pter→2q32::Xq21→Xqter)
M-10	45,X[11]/46,X,+mar[16].rev ish idic(Y)(q11.2)enh(Yq11.2pter)dim(Yq11.2q12)
M-12	45,X,inv(9)(p11q12)[30]/46,X,idic(Y)(p11.3?) [70].ish der(Y)t(Y;Y)(p11.3;q11.2)(wcpY+) .rev ish enh(Yq11.2qter)
M-13	47,XX,+mar.ish der(15)(SNRPN-,D15Z1++)
M-14	48,XY,+2mar.ish der(15)(SNRPN-,D15Z1++)x2mat
M-15	46,XX,add(18)(q23).rev ish der(18)t(8;18)(q22.3; q22)enh(8q22.3qter)dim(18q22qter)mat
M-16	46,XY,ins(13;?)(q21.2;?)pat
M-17	46,X,der(1)t(1;6)(q43;q15),der(4)t(4;11)(q21;q22), der(6)t(6;11;4;1;4) (p21.3q15;q22;q21q33;q43;q33), der(11)t(6;11)(p21.3;q22)
M-18	46,XY,r(18).rev ish dim(18p11.3,18q22qter)
M-20	47,XY,+mar.ish der(15)(wcp15+, SNRPN+,D15Z1++) .rev ish enh(15q11.2q14)
M-21	46,XX,?inv(1)(q41?)mat
M-22	46,XX,del(2)(q32.2q35).rev ish dim(2q32.3q35)
M-24	46, X,der(X)t(22;X;2)(q13.3;p11.21q24;q31),der(2)t(2;11;X)(q21;q22.2;q24),der(11)ins(11;2)(q22.1;q21q31),der(22)t(X;22)(p11.21;q13.3)
M-27	47,XY,+mar.ish der(22)(cep22++,Midi54++) .rev ish enh(22q11.2)
M-34	46,X,add(X)(q21.2?) .rev ish der(X)t(X ;X)(q21.2;p11.23)enh(Xp11.23pter)dim(Xq21.2qter)
M-35	46,X,+mar[22]/46,XY[28].ish der(Y)t(Y;Y)(q12;p11.2)(wcpY+, DYS129++) .rev ish enh(Yp11.2pter)
M-36	46,XX,der(7)inv(7)(p13q32)ins(15;7)(q15;q36.1q36.3),t(14;15)(q11.2;q15)
M-37	46,XY,t(1;6;16)(q21;q13;p11.2)
M-39	47,XY,+mar.ish der(14)(wcp14+) .rev ish enh(14q11.2)
M-40	46,XX,add(17)(p13).ish der(17)t(5;17)(?,p13)(wcp5+,D17S2199-)
M-41	46,XX,del(9)(q?) .rev ish dim(9q22.3q32)
M-42	47,XX,+mar.ish der(15)(SNRPN-,D15Z1++)
M-43	46,XX,inv(9)(p11q12),ins(16;?)(q22.3;?) .ish dup(16)(wcp16+) .rev ish enh(16q12.1q22.1)
M-44	48,XY,+2mar.ish der(4)(wcp4+)x2[7]/47,XY,+mar.ish der(4)(wcp4+)[32]/46,XY[14]
M-45	46,XX,22qs

<i>Caso</i>	<i>Cariotipo</i>
M-46	47,XY,+mar.ish der(15)(SNRPN-,D15Z1+).rev ish enh(15q11.2)mat
M-47	46,XY,add(16)(p13).ish der(16)t(9;16)(?:p13) (wcp9+)
M-48	46,XX,del(9)(p23?).ish del(9)(p24)(305J7-T7-).rev ish dim(9p23pter)
M-49	45,XX,der(21;22)(q10?;q10?).rev ish der(21;22)(q10;q10)
M-51	46,XY,add(Y)(q12).rev ish der(Y)t(Y;10)(q12;p11.2pter)enh(10p11.2pter)pat
M-52	46,XX,add(X)(p22.3).ish der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.1)(1125-YB+).rev ish enh(Yq11.1qter)dim(Xp22.3)
M-53	46,X,+mar.ish der(Y)(wcpY+)
M-54	46,XX,t(12;19)(p13;p13.3)mat
M-57	45,X[58]/46,X, idic(X)(q21?)[42].rev ish idic(X)(q21.1)enh(Xq21.1pter)dim(Xq21.2qter)
M-58	47,XX,+mar.ish der(15)(SNRPN-,D15Z1++)
M-59	46,XX,add(18)(p11.32?).ish der(18)t(18;18)(wcp18+).rev ish enh(18q12pter,18q23)
M-60	47,XX,+mar.ish der(22)(wcp22+,D22S553-)
M-61	47,XX,+mar.ish der(14?)(wcp14-,D22S553-)
M-62	46,XX,9qs?
M-64	47,XY,+mar.ish der(22?)(D22S553-).rev ish enh(22q11.2)mat
M-65	46,XY,der(5)inv(5)(q13q33)ins(7;5)(p15;q13q15), der(7)ins(7;5)
M-66	46,XY,der(9)del(9)(p22?)t(2;9)(p11;p11).isht(2;9)(wcp9+,wcp2+,wcp2+,wcp9+).rev ish dim(9p23pter)
M-67	47,XY,+mar.ish i(18)(p10)(wcp18+).rev ish enh(18p11.2pter)
M-68	45,X[15]/46,X,del(X)(q11?)[85].rev ish del(X)(q11)dim(Xq11qter)
M-69	45,X[30]/46,X,r(Y)[70].ish r(Y)(DYS129+,EST Cdy 16c07+).rev ish dim(Yp11.3)pat
M-70	46,XX.rev ish der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)enh(Yp11.3)dim(Xp22.3)
M-71	46,XX,r(15)(p11q26).rev ish dim(15q26.2qter)
M-72	47,XY,+mar.ish der(15)(SNRPN-,D15Z1++) .rev ish enh(15q11.2)
M-73	45,X,add(15)(p11.2).ish der(15)t(Y;15)(?:p11.2)(wcpY+,wcp15+)
M-74	46,XX,r(15)(p11q26).rev ish dim(15q26.3)
M-75	46,XY.ish del(22)(q11.2q11.2)(D22S553-)
M-76	47,XY,+mar.ish der(15)(SNRPN++, D15Z1++) .rev ish enh(15q11.2q15)

Discusión

5 DISCUSIÓN

5.1 ASPECTOS METODOLÓGICOS DE INTERES

Las nuevas técnicas de citogenética molecular aplicadas al análisis genético ofrecen muchas ventajas con respecto a las técnicas citogenéticas convencionales: mayor rapidez, especificidad, sensibilidad y posibilidad de automatización, lo que las hace cada día más atractivas para el diagnóstico clínico. Para cualquier laboratorio, es de suma importancia no sólo conseguir la optimización de estas técnicas, sino también conocer sus ventajas y limitaciones.

5.1.1 M-FISH

5.1.1.1 Optimización del protocolo: modificaciones introducidas

Para la aplicación de la técnica de M-FISH ha sido necesaria la adaptación del protocolo suministrado por la casa comercial, a nuestras condiciones de laboratorio y el tipo de muestras que queríamos analizar.

Son muchas las variables que intervienen en la obtención de una buena hibridación, su control aumenta el rendimiento de la técnica. Así, hemos comprobado que sin un envejecimiento previo los cromosomas no resisten el tratamiento enzimático. Los tratamientos enzimáticos son muy importantes ya que, al eliminar las proteínas, facilitan la accesibilidad de la sonda al ADN. Por tanto, conviene ajustar el tiempo de actuación enzimática para obtener buenos resultados, ya que si el tratamiento es excesivo se corre el peligro de degradar los cromosomas metafásicos (Wilkinson, 1999). Hemos comprobado el éxito que tiene este tipo de tratamiento en los diferentes tipos de muestra estudiados ya sea SP, LA o CV y la conveniencia de adaptarlo a cada caso en particular. Hemos prescindido en todos los casos del tratamiento con RNAasa recomendado por la casa comercial e imprescindible en el análisis de otros tipos de muestras.

También hemos adaptado el tiempo de desnaturalización a cada tipo de muestra, obteniendo así mejores resultados.

Cabe destacar, que siempre se ha utilizado el protocolo corto de lavado, ya que se ha observado que resulta igual de útil que el largo y reduce el tiempo del diagnóstico.

Por último, se ha disminuido la cantidad del cóctel de sondas utilizada respecto a la aconsejada por la casa comercial, de 10 µl a 4-6 µl, con el fin de rentabilizar su elevado coste. Disminuyendo el área de hibridación de 22 x 22 cm a 20 x 20 cm.

A pesar de haber aplicado distintos protocolos, ha resultado imposible la aplicación óptima de esta técnica en preparaciones previamente bandeadas en aquellos casos en los cuales no se disponía de suspensión celular fijada. En estos casos se ha obtenido una hibridación altamente inespecífica de todos los cromosomas para todos los fluorocromos, debido seguramente a la pérdida de secuencias específicas al realizar sobre éstos previamente las bandas G.

5.1.1.2 Limitaciones de la M-FISH

El control visual y la rapidez en la detección y análisis de anomalías cromosómicas al utilizar esta metodología viene condicionado por ciertas limitaciones y dificultades diagnósticas. Esta técnica, como consecuencia tanto del uso del cóctel de fluorocromos como del sistema *software* desarrollado para su análisis, en ciertas situaciones, puede conducir a una interpretación errónea de los resultados obtenidos. Muchos de estos errores parecen tener una misma base:

- La M-FISH, al igual que el SKY, no permite identificar: localizaciones específicas en un brazo o en una banda, ni detectar reorganizaciones intracromosómicas, pequeñas deleciones o duplicaciones (Uhrig y col., 1999). Por ello, en todos aquellos casos del presente estudio en los que se disponía de ADN y se sospechaba la existencia de pequeños desequilibrios cromosómicos se ha aplicado la técnica de CGH.
- Resulta difícil cuantificar la sensibilidad de este método en la detección de translocaciones e inserciones debido a que, en ocasiones, las combinaciones de fluorocromos de los segmentos grandes enmascaran a los del pequeño material que se inserta (Lee y col., 2001). Jalal y Law, (1999) estimaron que dicha sensibilidad se aproximaba a 1 Mb. No obstante, se sabe que dicha resolución se encuentra influenciada por dos parámetros: la condensación cromosómica y la composición de fluorocromos de los dos cromosomas implicados en dicha reorganización (Uhrig y col., 1999). Según Azofeifa y col. (2000) la identificación de reorganizaciones intracromosómicas ≤ 3 Mb depende críticamente de la composición de fluorocromos de los cromosomas involucrados. En este sentido se propuso un método para resolver, en parte, este problema utilizando combinaciones de siete fluorocromos, reduciendo así la probabilidad de combinaciones parecidas entre cromosomas (Azofeifa y col., 2000). Sin embargo, aún con esta modificación se han descrito reorganizaciones del orden de 2,6 Mb muy difíciles de detectar (Holinski-Feder y col., 2000), quedando no representadas las reorganizaciones subtelo méricas. En nuestro estudio, se ha constatado esta limitación diagnóstica en las inserciones crípticas implicadas en 2 de las 6 RCCs estudiadas: casos M-24 y M-17 (artículos 3 y 5 respectivamente, anexo I). Estas

inserciones crípticas que corresponden, en ambos casos, a la banda cromosómica 11q22.2, se calcula que tienen un tamaño de aproximadamente 1,2 Mb.

- En ocasiones, en las zonas donde se yuxtapone material cromosómico no homólogo, debido a una reorganización cromosómica, se puede observar un solapamiento de las fluorescencias en la interfase de los segmentos translocados. Este fenómeno se conoce como “flaring” o presencia de falsas inserciones en la interfase situada entre dos segmentos translocados (Lee y col., 2001), y se ha observado también en este estudio en los casos M-17 y M-24 (artículos 5 y 3 respectivamente). Debido a que estas falsas inserciones, no pueden ser corroboradas con sondas de pintado cromosómico (WCP), hay que tener cuidado en la interpretación de aquellos casos en los que el “probable” material cromosómico insertado tiene una combinación de fluorocromos coincidente con la mezcla del perfil de fluorocromos de los dos segmentos adyacentes.
- También, se han descrito errores en la clasificación de material cromosómico, cuando éste contiene pequeños segmentos de eucromatina acompañado de un alto contenido de heterocromatina (Lee y col., 2001). En estos casos, este material puede ser clasificado erróneamente o no llegar a ser detectado debido a la ausencia de hibridación, ya que el cóctel de sondas contiene ADN Cot-1 que suprime las secuencias que son comunes a varios cromosomas (bloquea la heterocromatina). Un claro ejemplo de esta limitación son los cromosomas marcadores de pequeño tamaño y/o compuestos por brazos p de cromosomas acrocéntricos. Este fenómeno se ha observado, en el presente estudio, en gran parte de la serie analizada de HSCs, pequeños cromosomas marcadores derivados de cromosomas acrocéntricos con un contenido mayoritariamente heterocromático (ver apartado 4.3 de resultados), a excepción de los casos M-44 y M-67, los cuales fueron identificados como HSCs de los cromosomas 4 y 18 respectivamente.
- Las reorganizaciones en las cuales se encuentran involucradas zonas pericentroméricas, también pueden clasificarse erróneamente, ya que estas regiones contienen secuencias altamente repetitivas (Choo, 1997). La supresión incompleta de estas regiones conlleva una intensa e ininterpretable fluorescencia capaz de mezclarse y yuxtaponerse con las zonas adyacentes (Eils y col., 1998). Este fenómeno se ha observado, en el presente estudio, en aquellos HSCs derivados de cromosomas acrocéntricos.
- Por último, se debe tener en cuenta que la información fluorescente de las regiones teloméricas puede perderse o malinterpretarse debido a que, en ocasiones, la contratinción con DAPI es menos intensa en los extremos de los cromosomas humanos (Lee y col., 2001). Por tanto, en aquellos casos en los que se sospeche de la presencia de este tipo de anomalías cromosómicas, como es el caso de individuos con retraso mental idiopático, se recomienda aplicar otras técnicas más específicas basadas

en el uso de sondas subteloméricas (Anderlid y col., 2002; Walter y col., 2004). Este hecho se puso de manifiesto en el análisis del caso M54, en el cual, las bandas G detectaron la presencia de material adicional en 12pter en un feto y en su progenitora. Tras la aplicación de la técnica de M-FISH, en linfocitos de la madre, se identificó el origen de este material adicional como derivado del cromosoma 19. Sin embargo, fue muy difícil observar por esta técnica la banda 12p13 translocada a 19pter ya que únicamente se insinuaba al observar el perfil de los fluorocromos. Para confirmar la existencia de una translocación recíproca críptica de las bandas terminales 12p13 y 19p13.3 fue necesario la utilización de sondas de pintado cromosómico, la cual se realizó en amniocitos.

Además de las limitaciones atribuidas a la utilización del cóctel de sondas, existen factores asociados a una inapropiada metodología que pueden influir también en la mala clasificación de las alteraciones cromosómicas observadas. Entre estos factores hemos podido identificar los siguientes:

- la realización de pre-tratamientos inadecuados contribuye a obtener una hibridación deficiente al no eliminarse de forma adecuada el citoplasma.
- la desnaturalización inapropiada de los cromosomas interfiere en la compactación de la cromatina, lo que conlleva una disminución de la intensidad de la señal de la sonda para determinadas regiones (*loci*) y un aumento del fenómeno de “*flaring*”.
- el secado de la sonda durante la hibridación contribuye a reducir la eficiencia de la hibridación y a incrementar el ruido de fondo.
- el análisis de cromosomas demasiado condensados favorece la aparición de un color adicional en los puntos de rotura de la translocación que no se observa en cromosomas largos, o en translocaciones, donde los fluorocromos implicados en los fragmentos translocados se pintan con fluorocromos distintos. Por tanto disponer de cromosomas largos y bien extendidos constituye un factor crucial en la resolución de la técnica, y es sobretodo muy importante en el análisis de translocaciones complejas.

Debido a todas estas limitaciones, nuestra experiencia aconseja seguir las siguientes pautas al analizar los resultados obtenidos mediante M-FISH:

- estudiar conjuntamente los resultados obtenidos mediante M-FISH y los obtenidos con bandas G, con el fin de disponer de la máxima información, ya que hoy por hoy, la calidad de las bandas obtenidas con DAPI hace muy difícil en ocasiones la determinación de los puntos de rotura.
- realizar un análisis exhaustivo de los la opción del visionador de cromosomas. Aquí se observa el cromosoma seleccionado del cariotipo en cada una de sus imágenes coloreadas individualmente situadas una al lado de la otra, el perfil de todos los fluorocromos a lo largo del eje del cromosoma, así como también la imagen compuesta en pseudocolores y la real. Todo esto facilita la detección de pequeñas reorganizaciones cromosómicas que, tal y como hemos comentado, pasan desapercibidas para el *software*. Este análisis resulta imprescindible, ya que puede ayudar en la capacidad discriminativa de reorganizaciones artefactuales debidas a tinción inespecífica. En el presente estudio, la valoración de estos perfiles ha sido clave en la identificación de algunas anomalías, sobretudo en pequeñas reorganizaciones, en las cuales se ha observado que es preferible la clasificación basada en la inspección visual de cada fluorocromo que la clasificación automatizada.

5.1.1.3 Aplicabilidad de la M-FISH al diagnóstico prenatal y postnatal

Nuestro estudio, nos ha permitido constatar que gracias a la aplicación de la M-FISH es posible detectar y caracterizar las regiones cromosómicas implicadas en determinadas anomalías (que podrían pasar desapercibidas si sólo se utiliza la técnica de bandas G). Sin embargo y teniendo en cuenta las limitaciones anteriormente descritas, la utilidad de esta técnica depende esencialmente del tipo de anomalía cromosómica presente en el individuo.

- Monosomías y trisomías parciales autosómicas

En este grupo de pacientes no se ha aplicado de forma rutinaria la técnica de M-FISH ya que ésta no permite detectar pequeñas deleciones o duplicaciones intracromosómicas (Uhrig y col., 1999). Únicamente se aplicó en 4 casos (M-40, M-47, M-59 y M-66) donde una reorganización cromosómica había sido la causa de un desequilibrio cromosómico. En estos casos el análisis mediante M-FISH permitió visualizar las t(5;17), t(9;16), t(18;18) y t(2;9) respectivamente, que habían sido identificadas previamente mediante bandas G como adiciones de material desconocido en los tres primeros casos, descartando además en todas ellas, la presencia de otras reorganizaciones intercromosómicas.

- Monosomías y trisomías parciales gonosómicas

Al igual que en el grupo anterior, estos pacientes tampoco se han estudiado mediante la técnica de M-FISH de forma rutinaria. Se ha aplicado únicamente en 2 casos (M-35 y M-73). En el caso M-35, la M-FISH ha permitido identificar una t(Y;Y) en un cromosoma Y derivativo, presente en mosaico, que fue caracterizada posteriormente mediante CGH. Y en el caso M-75, ha identificado el origen del material cromosómico adicional, localizado en el brazo corto de uno de los cromosomas 15 del paciente, como material del cromosoma Y. Sin embargo, en este último caso al carecer de ADN del paciente, no se pudo determinar exactamente la región del cromosoma Y que estaba adicionada.

- Cromosomas marcadores

Inicialmente se pensó que la M-FISH sería una técnica clave en la identificación de todo tipo de HSCs (Speicher y col., 1996; Uhrig y col., 1999). En nuestra serie, la M-FISH permitió caracterizar claramente los HSCs presentes en los casos M-44 y M-67 revelando que gran parte de su contenido era eucromático y derivaba íntegramente de los cromosomas 4 y 18 respectivamente.

También hemos comprobado, de acuerdo con la literatura (Hills y col., 2003; Liehr y col., 2004), que la mayoría de los cromosomas marcadores pequeños poseen muy poca cantidad de eucromatina. En estos casos la M-FISH se revela altamente ineficaz en la mayoría de casos al no detectar el origen cromosómico del marcador o incluso a dar lugar a identificaciones erróneas. En nuestra serie (tabla 15 de resultados) la mayoría de estos HSCs de pequeño tamaño se han conseguido identificar mediante la aplicación de la CGH y posterior aplicación de FISH convencional (sondas LSI).

Ha sido imposible identificar de forma exacta, dos HSCs de los cuales se sospecha que derivan de los cromosomas 14 o 22 (casos M-61 y M-64), al no contener estos HSCs cantidades detectables de eucromatina y debido a que los cromosomas 14 y 22 presentan regiones centroméricas muy parecidas. En estos casos, de acuerdo con la literatura, es aconsejable el empleo de técnicas más recientes y especializadas, como la cenM-FISH y la subcenM-FISH (Liehr y col., 2004; Liehr y col., 2004b). En el caso M-27 fue posible realizar una cenM-FISH, ACROM-FISH y probar una sonda no comercial centromérica del cromosoma 22, lo cual nos permitió caracterizar de forma muy precisa un HSC derivado del cromosoma 22.

- RCCs y otras translocaciones crípticas

Tal como indicamos en la introducción (apartado 1.1.2.1) la técnica de M-FISH ha mostrado ser muy útil en la caracterización de reorganizaciones cromosómicas complejas (difíciles de resolver mediante bandas G) y en la identificación de reorganizaciones intercromosómicas crípticas.

De acuerdo con la literatura, la técnica de M-FISH ha sido clave en la caracterización de cuatro de las seis RCCs estudiadas (casos M-17, M-24, M-36 y M-65) y de una translocación críptica (caso M-54).

En el presente estudio, aunque las reorganizaciones presentes en los casos M-17, M-24, M-36, M-54 y M-65 fueron detectadas rápidamente mediante bandas G; su completa caracterización se ha llevado a cabo mediante M-FISH y FISH. Cabe destacar, que en los casos M-24 y M-17, con una y dos translocaciones intersticiales crípticas respectivamente, éstas no fueron identificadas hasta la aplicación de FISH con sondas de pintado cromosómico específico. Sin embargo, en el caso M-36, la técnica de M-FISH si detectó una inserción del cromosoma 7 de una medida >1 Mb de acuerdo con las limitaciones descritas para esta técnica (Lee y col., 2001). En todos los casos, los resultados obtenidos mediante M-FISH han sido confirmados mediante sondas de pintado cromosómico específico. Por tanto, nuestros resultados, al igual que los de otros autores, muestran la utilidad del análisis combinado mediante bandas G, FISH multicolor y convencional para la caracterización de RCCs (Fuster y col., 1997; Uhrig y col., 1999; Kaiser-Rogers y col., 2000; Kotzot y col., 2001; Borck y col., 2001; Houge y col., 2003; Vermeulen y col., 2004).

5.1.2 CGH

Dado que se requiere ADN para llevar a cabo esta técnica, hemos procedido a la optimización de su extracción a partir de los diferentes tejidos que debíamos analizar (SP, LA y CV).

5.1.2.1 Optimización del método de extracción de ADN a partir de diferentes tejidos

Los diferentes protocolos de extracción de ADN, adaptados a cada tipo de muestra, permiten obtener un ADN genómico de elevado peso molecular y pureza, lo cual es imprescindible para la aplicación de determinadas técnicas moleculares, entre ellas la CGH (Isola y col., 1994). Uno de los principales inconvenientes de algunos protocolos es la utilización de fenol y cloroformo.

Hemos optado por la adaptación de un protocolo (Miller y col., 1988) estándar que no utiliza fenol ni cloroformo. Dicho método ha resultado ser efectivo en los diferentes tipos de muestra estudiadas posteriormente mediante CGH. Además, ha mostrado ser muy útil ya que permite

extraer ADN a partir de pequeñas cantidades de SP (~1 ml, frente a los 5-10 ml necesarios en otros protocolos), especialmente útil en el estudio de neonatos. Con este protocolo también se ha conseguido extraer ADN de muestras no frescas (>20 días) y de muestras recogidas en anticoagulante heparina (en lugar del idóneo, EDTA). Por otro lado, la adaptación realizada para la extracción de ADN en muestras procedentes de LA y CV (cultivo largo), ha permitido trabajar con volúmenes mucho más pequeños de reactivos, demostrando ser un método rápido, objetivo y fiable.

5.1.2.2 Optimización del protocolo de CGH: modificaciones introducidas

La aplicación de la CGH se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito por Kallionemi y col., 1994 con algunas modificaciones.

Se ha observado que con el bloqueo absoluto de las regiones heterocromáticas (sobretudo centroméricas), mediante ADN Cot-1 se pueden detectar mejor los desequilibrios que afecten a estas regiones. En el caso de las muestras de ADN extraídas a partir de LA y CV ha sido necesario doblar la cantidad de ADN Cot-1 utilizada, seguramente porque este tipo de muestras presenta un estado diferente de condensación de la heterocromatina. Estas regiones heterocromáticas, en especial 1qh, 9qh, 16qh e Yqh, y las regiones de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos presentan un mayor grado de descondensación en este tipo de muestras comparadas con linfocitos estimulados procedentes de sangre periférica (Pérez y col., 1991). Con estas modificaciones, se ha conseguido optimizar la CGH en tejidos embrionarios. En nuestro estudio sobre un total de 54 muestras analizadas hemos detectado 17 alteraciones próximas a regiones heterocromáticas (casos M-1, M-3, M-10, M-12, M-13, M-14, M-20, M-27, M-39, M-42, M-43, M-46, M-52, M-61, M-64, M-72 y M-76).

5.1.2.3 Limitaciones de la CGH

La enorme ventaja de la aplicación de la CGH al diagnóstico clínico es que permite identificar pequeños desequilibrios genéticos dependiendo del aislamiento del ADN y sin la necesidad de disponer de metafases. No obstante, esta técnica tiene también una serie de limitaciones que deben ser consideradas.

Una de sus grandes limitaciones es que no detecta anomalías cromosómicas equilibradas, tal como la mayoría de translocaciones e inversiones, ya que éstas no causan cambios en el número de copias de ADN (Kallionemi y col., 1994). Sin embargo, incluso en estos casos, la utilidad de la CGH es indiscutible ya que permite descartar la presencia de otras alteraciones

desequilibradas añadidas. En nuestro estudio, las diferentes RCCs y translocaciones crípticas que han mostrado perfiles equilibrados de CGH podrían considerarse anomalías cromosómicas equilibradas o mejor dicho “aparentemente” equilibradas ya que podrían presentar desequilibrios <3 Mb.

Esta técnica, también presenta limitaciones en la detección de alteraciones cromosómicas desequilibradas presentes en una baja proporción de células de la muestra (mosaicismo). El porcentaje mínimo de células necesario para identificar desequilibrios con CGH depende de los límites de detección que se establezcan en el momento de realizar el análisis de los perfiles. En general, se asume, que para detectar una población celular diploide donde el 50% de las células presenten anomalía, los límites de detección de ganancias y pérdidas se deben establecer en 1,25 y 0,75 respectivamente (Du Manoir y col., 1995). Para la detección de mosaicos más bajos, es aconsejable modificar los límites de detección de la técnica, así se ha descrito la detección de mosaicos del 40% (Bryndorf y col., 1995) e incluso del 15% (Ghaffari y col., 1998) modificando los límites de detección a 1,20 y 0,8. De los 6 casos de mosaicismo, estudiados mediante CGH, hemos detectado desequilibrios en muestras que presentaban grados de mosaicismo del orden de 80-90% (casos M-68 y M-69), 60-70% (casos M-10 y M-12), y menor al 50% (casos M-35 y M-47). El grado de mosaicismo para el caso M-35 fue del 44%, siendo este, el porcentaje de mosaico mas bajo detectado. Así pues, nuestros resultados, de acuerdo con otros publicados, demuestran que la CGH puede detectar mosaicismos presentes en menos del 50% de las células.

En cuanto a la asignación de puntos de rotura implicados en una reorganización cromosómica, duplicación o delección, la sensibilidad de la CGH es muy parecida a la de la citogenética convencional. La falta de precisión, en algunos casos, al utilizar ambas técnicas podría atribuirse a la variación en el grado de condensación en ciertas regiones cromosómicas (Du Manoir y col., 1995). En este sentido, los experimentos de CGH se han realizado utilizando preparaciones metafásicas comerciales, las cuales garantizan en principio, una densidad mitótica suficiente y un grado óptimo de condensación cromosómica. Sin embargo, nuestra experiencia aconseja que, dada la gran variedad existente en dichas extensiones, es básico seleccionar metafases de grado de condensación similar para realizar el análisis de CGH.

Por otro lado, el análisis mediante CGH en células neoplásicas, ha evidenciado la existencia de regiones consideradas como “conflictivas”, ricas en C-G, ya que suelen mostrar desviaciones de los perfiles debido a reducción de las intensidades de los fluorocromos en estas regiones, que incluso pueden llegar a dar falsos positivos al detectar desequilibrios inexistentes (Kallionemi y col., 1994; Du Manoir y col., 1995). Entre estas, se encuentran las regiones centroméricas, teloméricas, las correspondientes a los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, las regiones 1p32-pter, 1q12, 9q12, 16p, 16q12 y los cromosomas 19 y 22 (Moore y col., 1997). Aunque se observa que esta limitación puede reducirse considerablemente al utilizar el marcaje

directo, estas regiones se excluyen del análisis de desequilibrios en células neoplásicas (Kallionemi y col., 1994).

Sin embargo, nuestros resultados junto algunos publicados por otros autores (Ghaffari y col., 1998; Breen y col., 1999), muestran que en caso de las anomalías constitucionales, es posible aceptar desequilibrios en estas regiones siempre que dispongamos de datos adicionales obtenidos mediante otras técnicas: bandas G o FISH que corroboren este resultado. Cabe destacar, que en el presente estudio, se han detectado desviaciones del perfil de CGH en el cromosoma 19 en un 45% de los casos estudiados, no detectándose desviaciones significativas de los perfiles en el cromosoma 22, ni en otras regiones conflictivas, por tanto los desequilibrios detectados en estas regiones conflictivas deben interpretarse con precaución y confirmarse siempre mediante otras técnicas. Los resultados obtenidos mediante CGH de los casos M-18, M-71 y M-74 evidencian la existencia de pequeñas pérdidas o ganancias en regiones teloméricas que si nos basamos en los criterios propuestos por Kallionemi y col. (1994) deberían ser interpretados con precaución. No obstante, la existencia de otros datos y la comparación de estos perfiles con los obtenidos de rutina en estas regiones, permiten aceptar estos desequilibrios cromosómicos como verdaderos.

Otro ejemplo que muestra la superación de este tipo de limitaciones, en el caso de anomalías cromosómicas constitucionales, es la detección de la del(16)(p11.2) (caso M-3) ya que la CGH permitió detectar este desequilibrio pese a estar localizado en zonas próximas a regiones críticas como la centromérica 16qh. (Ver artículo 1, anexo I).

Según Kallionemi y col. (1992) la CGH permite cuantificar cambios relativos de cromosomas enteros. Otros autores también han apoyado esta posibilidad, así Tachdjian y col. (2000), describieron que en caso de trisomía se podía esperar una desviación del perfil a 1,5 y en caso de tetrasomía a 2,0. En cambio en caso de monosomía se espera una desviación del perfil a 0,5. Sin embargo, en el presente estudio hemos observado en el análisis de los casos M-13 y M-14 que al igual que han descrito otros autores (Lestou y col., 1999) esta técnica no siempre permite la cuantificación de las ganancias y/o las pérdidas de una determinada región cromosómica. En estos casos, a pesar de que el número de HSCs es distinto los perfiles que presentaban ambos casos son muy parecidos y no permitieron su cuantificación (Fig. 26). Aunque también debe tenerse en cuenta que dicho desequilibrio afecta a una región centromérica y por tanto conflictiva en este análisis.

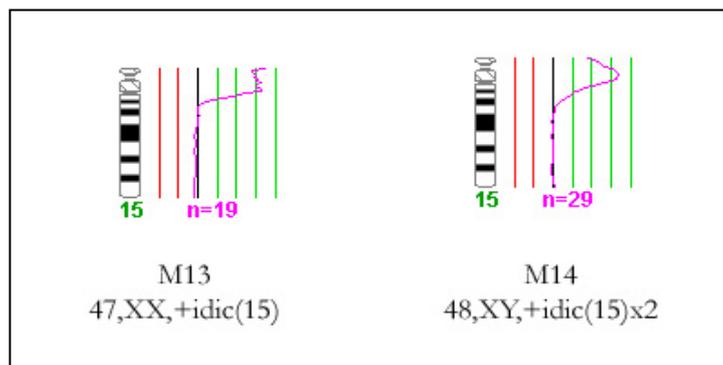


Figura 26. Perfiles obtenidos de CGH obtenidos en los casos M-13 y M-14.

5.1.2.4 HR-CGH

En el análisis mediante HR-CGH, los perfiles de CGH se evalúan haciendo uso de un intervalo dinámico estándar de referencia en lugar de los umbrales fijos, consiguiendo un incremento en la sensibilidad de la técnica tres veces superior respecto a la CGH estándar (Kirchhoff y col., 1998). Esta técnica se ha mostrado muy útil en la identificación de desequilibrios cromosómicos crípticos en pacientes con cariotipo aparentemente equilibrado, ya que debido a su mayor resolución, detecta anomalías que pasan desapercibidas con bandas G de alta resolución o CGH convencional (Kirchhoff y col., 2000, 2001). Es interesante destacar, que si bien la utilización de sondas subtelo méricas ha permitido la detección de anomalías crípticas en 0-23% de pacientes con retraso mental idiopático debido a su alta sensibilidad (30-100 Kb) (Kirchhoff y col., 2004), la HR-CGH sigue siendo un método válido ya que permite un rastreo de todo el genoma aunque con una sensibilidad algo menor. Por este motivo hemos analizado mediante HR-CGH todos los casos, especialmente las RCCs y aquellos casos en los que existía la sospecha de un desequilibrio cromosómico críptico, con el objetivo de descartar o confirmar la presencia de este tipo de alteraciones. Sin embargo, y teniendo en cuenta los límites de resolución de la HR-CGH (3 Mb), en un futuro, los casos que hemos estudiado esta previsto que se analicen mediante otras técnicas complementarias, como la M-TEL (Brown y col., 2001), la CGH *array* (Solinas-Toldo y col., 1997) o estudio mediante BACs específicos de los puntos de rotura presentes (Atsbury y col., 2004).

La elevada sensibilidad la HR-CGH la hace aconsejable en la detección e identificación de algunas microdeleciones y microduplicaciones. Recientemente, se ha descrito mediante esta técnica la duplicación distal de 8p en una serie de pacientes afectados de Síndrome de Kabuki (Milunsky y Huang, 2003). También se ha comprobado, que esta técnica es capaz de identificar algunas microdeleciones asociadas al síndrome de Prader-Willi/Angelman (de 3-5 Mb). Sin embargo, por el momento, no se detectan algunas microdeleciones como las responsables del

síndrome DiGeorge y de Williams (de un tamaño $\sim 1-2$ Mb) (Kirchhoff y col., 2001). No obstante y dado que la mayoría de los pacientes con síndrome de DiGeorge presentan deleciones típicas de aproximadamente 3 Mb (Mantripragada y col., 2004), en el presente estudio hemos aplicado la HR-CGH en un paciente con este síndrome (caso M-75), observando que la HR-CGH no ha sido capaz de detectar una microdelección en 22q11.2, que previamente había sido identificada mediante FISH locus específica.

Otra de las ventajas de la HR-CGH, es que las regiones adyacentes a las excluidas en CGH convencional: centrómeros, telómeros y regiones heterocromáticas, pueden ser analizadas directamente por el *software*, si se bloquean con la suficiente cantidad de ADN Cot-1 (Kirchhoff y col., 1998). Este hecho ha quedado demostrado en el análisis del caso M-3 (posteriormente a la publicación del caso), en el cual, la aceptación subjetiva de la del(16)(p11.2) mediante CGH fue claramente identificada con la HR-CGH, aunque al igual que se ha observado en otros casos, la pérdida detectada con el *software* de HR-CGH fue mayor (Fig. 27).

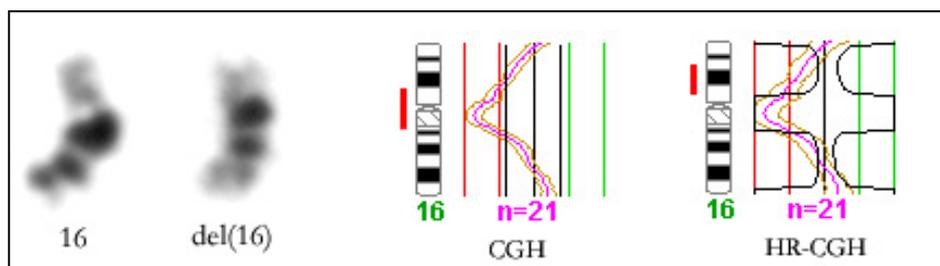


Figura 27. Bandas G y perfiles de CGH y HR-CGH obtenidos en el caso M-3, con cariotipo 46,XY,del (16)(p?)*rev ish dim*(16p11.2).

Sin embargo, en el estudio de HSCs derivados de cromosomas acrocéntricos, compuestos casi o enteramente por heterocromatina, el *software* de HR-CGH, al excluir automáticamente estas regiones del análisis, muestra perfiles equilibrados, lo que impide sospechar de su origen.

Por otro lado, cabe destacar que la HR-CGH puede dar lugar a “falsas” anomalías cromosómicas en casos de variantes polimórficas de la normalidad (Kirchhoff y col., 2004). Estos autores han detectado mediante ésta técnica la presencia de una duplicación de la región 15q12 en un hijo con fenotipo anómalo, pero también en su padre fenotípicamente normal. La variación de la región 15q11-12 se ha descrito en varios individuos normales (Ludowese y col., 1991; Fantes y col., 2002). Otro polimorfismo detectado con esta técnica por Kirchhoff y col. (2004) es la deleción de la región 2qter (Ballif y col., 2000; Van Karnebeek y col., 2002).

La aplicación de la CGH-*array*, más sensible que la HR-CGH, se presenta como una herramienta muy útil para el diagnóstico clínico, que permitirá sin duda, la identificación de muchas anomalías cromosómicas, entre ellas también, aquellas que se consideran variantes de la normalidad (Veltman y col., 2003).

5.1.2.5 Comparación de perfiles obtenidos por CGH y HR-CGH

Hasta el momento, existe un único estudio, realizado por nuestro grupo (Santos y col., 2002), que compara los resultados obtenidos con ambos *softwares* en el análisis de desequilibrios genómicos en tumores de Retinoblastoma.

En el presente estudio, se han analizado en todos los casos las mismas metafases mediante los *softwares* de CGH y HR-CGH. La pérdidas mínimas detectadas han sido de 2,9 Mb y 4 Mb (casos M-69 y M-74 respectivamente) y las ganancias mínimas de 2,9 Mb y 4,9 Mb (casos M-70 y M-46/M-72 respectivamente).

En aquellos casos que presentan desequilibrios que afectan a las regiones teloméricas, centroméricas o heterocromáticas, un análisis comparativo de los perfiles obtenidos en otros casos (que no tienen anomalías que afectan a estas regiones) permite aceptar o no, dicho desequilibrio como verdadero.

Por otro lado, en aquellos casos con desequilibrios fuera de estas regiones conflictivas se ha podido observar que en ocasiones, tanto en el caso de ganancias como de pérdidas, estas son mayores al analizarlas mediante HR-CGH. Estos resultados pueden ser atribuidos a falsos artefactos debido a la mayor sensibilidad del *software*, ya que al realizar un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos con ambos *softwares* respecto a los obtenidos con citogenética convencional, se ha observado una mayor concordancia de las ganancias y/o pérdidas detectadas mediante bandas G y el *software* de CGH convencional, a excepción del caso M-15, en el cual las bandas G muestran una mayor concordancia con los resultados obtenidos mediante HR-CGH. Este fenómeno no se ha observado en la detección de monosomías o trisomías gonosómicas, ni en los casos de HSCs.

Estos resultados coinciden con los observados en el estudio comentado anteriormente (Santos y col. 2004).

5.1.2.6 Aplicabilidad de la CGH al diagnóstico prenatal y postnatal

La sensibilidad de la técnica de CGH convencional es similar a la de las bandas G, es decir detecta ganancias y pérdidas de un tamaño ≥ 10 Mb (Kallionemi y col., 1998; Bentz y col., 1998). Por ello, esta técnica se ha utilizado, en muchas ocasiones, para confirmar la presencia de

anomalías observadas previamente mediante citogenética convencional (Erdel y col., 1997; Boceno y col., 1998; Levy y col., 1998; Breen y col., 1999; Rigola y col., 2001). En el presente estudio la técnica de CGH ha confirmado en el 19% de los casos los resultados obtenidos mediante citogenética convencional, descartando además la presencia de otros desequilibrios, y ha aportado nuevos datos en el 81% de los casos.

La CGH ha mostrado ser un método más rápido e informativo que la FISH convencional para la identificación de material adicional de origen desconocido (adiciones y cromosomas marcadores con contenido eucromático, ya que una única hibridación permite detectar la región cromosómica exacta implicada en la anomalía cromosómica. Además, la CGH permite estudiar casos sin necesidad de obtener células en división al igual que ocurre con la FISH interfásica. No obstante, mientras la CGH permite un análisis global de posibles desequilibrios en todo el genoma, la FISH interfásica únicamente proporciona información de la sonda utilizada.

En nuestro estudio, hemos aplicado las técnicas de FISH convencional para confirmar los datos previamente detectados o “sospechados” mediante CGH en un 46% de los casos. Sólo en tres casos no se observó coincidencia entre los resultados obtenidos con las dos técnicas utilizadas; en el caso M-75, en el que la CGH no fue capaz de detectar la microdelección en 22q11.2 previamente detectada mediante FISH con sonda locus específica y en los casos M-61 y M-64, en los cuales mediante FISH no se ha podido corroborar el resultado obtenido mediante CGH al tratarse de un cromosoma marcador derivado de 14/22 .

Respecto a la M-FISH, la CGH tiene la enorme ventaja de identificar las regiones exactas implicadas en el desequilibrio cromosómico y de poder detectar algunos tipos de anomalías intracromosómicas como deleciones y duplicaciones (ver tablas 13 y 14). En nuestro estudio, la utilidad de emplear ambas técnicas se ha puesto especialmente de relieve en el análisis de reorganizaciones complejas o crípticas ya que nos ha permitido detectar o descartar desequilibrios cromosómicos asociados (casos M-35, M-59, M-66 y M-7, M-17, M-24, M-36, M-45 y M-65 respectivamente).

- *Monosomías y trisomías parciales autosómicas*

Se han identificado monosomías parciales correspondientes a las regiones cromosómicas 2q32q35, 9p22pter, 9p23, 9q22.2q32, 15q26.2qter, 16p11.2, 18p11.3 y 18q22qter (en dos casos) y trisomías parciales de las regiones cromosómicas 8q22qter, 10p11.2pter, 16q12.1q22.1, 18q12pter y 18q22qter.

La aplicación de la técnica de HR-CGH (resolución 3 Mb) no ha identificado la pérdida de la región 22q11.2 en un paciente con el síndrome de DiGeorge (caso M-75). Esta microdelección

había sido identificada previamente mediante FISH locus específica. Dentro de los síndromes debidos a microdelección existen distintos tamaños de microdeleciones, unos más frecuentes que otros. En el caso del síndrome de DiGeorge la deleción más frecuente es de unas 3 Mb.

Por otro lado, en el caso M-74 a pesar de que el perfil de CGH no muestra claramente una pérdida de la región 15q26.3, esta puede sospecharse. Ya que aunque no sea detectada mediante HR-CGH, esto puede ser debido a que esta pérdida sea < 3 Mb o debido a que afecta a una región telómerica, considerada una región conflictiva (Kirchhoff y col., 1998). Así pues, en los casos M-71 y M-74 se ha aceptado una posible pérdida ya que en el resto de muestras estudiadas los perfiles habituales no mostraban desviación en esta región.

- Monosomías y trisomías parciales gonosómicas

Se han identificado tanto monosomías como trisomías parciales del cromosoma X, del Y, y que afectan a ambos cromosomas.

Los cromosomas sexuales contienen una región homóloga de aproximadamente 2,6 Mb de ADN que se localiza en el extremo Xp22.3 y Yp11.32 denominada PAR-1 (Rappold y col. 1993). Dado que la región Ypter muestra un comportamiento distinto al resto del cromosoma Y debido a la hibridación cruzada con su región homóloga en el cromosoma X, cualquier desequilibrio detectado de esta región mediante CGH debe ser interpretado con precaución. De hecho, en los intervalos dinámicos de confianza utilizados en HR-CGH esta zona queda excluida del análisis. En nuestro estudio, los perfiles de CGH junto a los datos obtenidos por FISH y QF-PCR han permitido identificar la presencia de un anillo del cromosoma Y (M-69) y una t(X;Y) desequilibrada en un varón XX (M-70). Estos resultados demuestran que la técnica de CGH es capaz de detectar desequilibrios cromosómicos crípticos en esta región conflictiva, incluso de un tamaño 2,9 Mb.

En nuestra serie también hemos identificado desequilibrios de los cromosomas X e Y que se encontraban en mosaico (principalmente con una línea 45,X). En este caso la interpretación de los perfiles de CGH requiere una mayor atención y experiencia y en ocasiones, resulta útil realizar la hibridación con controles de ambos sexos.

- Cromosomas marcadores

Los cromosomas marcadores supernumerarios (HSCs) se encuentran con frecuencia asociados a individuos con retraso mental y anomalías fenotípicas. Su identificación de manera rápida y precisa es esencial, sobretodo en diagnóstico prenatal. Hasta hace pocos años, la mayoría de HSCs de pequeño tamaño permanecían sin clasificar mediante bandas G debido a la poca cantidad de eucromatina que contenían o por estar compuestos únicamente por heterocromatina (Sachs y col., 1987).

La técnica de FISH utilizando sondas de pintado cromosómico o de copia única ha facilitado en muchos casos su identificación (Rauch y col., 1992; Callen y col., 1992; Blennow y col., 1995; Spinner y col., 1995). No obstante, estas aplicaciones requieren información previa para poder elegir la sonda adecuada. Asimismo, se considera que las técnicas de FISH con sondas de pintado cromosómico, M-FISH o SKY, sólo son efectivas en la identificación de HSCs de mayor tamaño que el brazo corto del cromosoma 17 (Haddad y col., 1998; Starke y col., 1999; Uhrigh y col., 1999; Yaron y col., 2003). Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas de FISH multicolor, como el bandeado multicolor (Weise y col., 2002; Starke y col., 2003) para la caracterización de pequeños cromosomas marcadores con cantidades muy pequeñas de eucromatina (la mitad del brazo corto del cromosoma 17) y la FISH multicolor subcentromérica (Liehr y col., 2004). En los últimos años y dado que una gran parte de los cromosomas marcadores derivan de los cromosomas acrocéntricos, han aparecido técnicas de FISH multicolor específicas que permiten diferenciar de manera efectiva incluso los centrómeros de los cromosomas 13 y 21 (Yaron y col., 2003), lo cual ni la cenM-FISH ni la acroM-FISH permiten hacerlo.

Varios estudios, incluido el nuestro, revelan la utilidad de la CGH en la identificación de HSCs de pequeño tamaño, ya que si el perfil muestra una ganancia, ésta es indicativa de la presencia de genes (eucromatina) ya que el ADN repetitivo (heterocromatina) se bloquea con el tratamiento con ADN Cot-1 (Bryndorf y col., 1995; Levy y col., 2000; Dupont y col., 2003).

La CGH nos ha permitido identificar un 80% de los HSCs estudiados. En este trabajo hemos podido evaluar la utilidad y sobre todo establecer los pasos a seguir para la identificación de cromosomas marcadores, utilizando las diferentes técnicas de citogenética convencional, FISH y CGH (Fig.28).

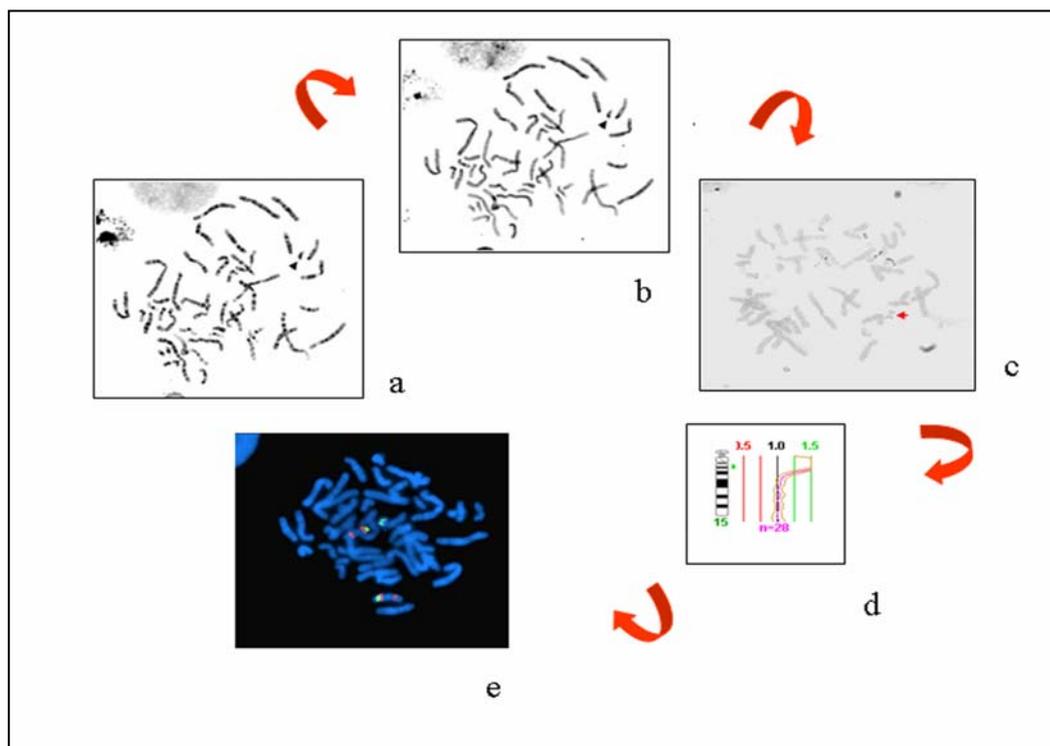


Figura 28. Identificación de un HSC presente en un paciente oligozoospermico mediante la combinación de varias técnicas. a) Bandas G; b) Bandas C; c) Bandas NOR; D) CGH; e) FISH.

En primer lugar es básico observar detalladamente la morfología y el tamaño del cromosoma marcador en metafase con bandas G, intentando evaluar la presencia de centrómero/s y de satélites en uno o ambos extremos. Posteriormente y para determinar la cantidad de eucromatina presente es muy recomendable la realización de bandas C y NORs. Si se observa un predominio de heterocromatina no recomendamos la aplicación de la M-FISH ya que hemos observado que esta técnica no es resolutive en estos casos, debido a que al *software* le resulta muy difícil establecer la combinación de fluorocromos presentes cuando la región hibridada es muy pequeña.

Cuando la mayor parte del cromosoma marcador está compuesto por heterocromatina, ni la CGH (aunque ésta en ocasiones ofrece una sospecha), ni la HR-CGH son de mucha utilidad ya en ellas quedan suprimidas las regiones heterocromáticas enmascarando la presencia de la poca eucromatina presente. En estos casos, la aplicación de esta técnica ofrece perfiles equilibrados (M-13, M-14 y M-61). Sin embargo, en ocasiones, un análisis detallado de los perfiles nos permite “sospechar” de la ganancia de ciertas regiones que han de ser confirmadas posteriormente con sondas de pintado cromosómico o locus específico (M-27, M-39, M-42, M-46, M-64 y M-72). Estas últimas sondas, permiten además descartar o confirmar la presencia de determinadas regiones cromosómicas. Cabe destacar que para valorar más precisamente la

cantidad de eucromatina presente en estos HSCs, dentro de nuestro grupo, se están llevando a cabo diversos estudios con BACs.

La aplicación de sondas de locus único en los casos de HSCs derivados del cromosoma 15, es muy efectiva para evaluar el riesgo asociado a este tipo de HSCs (Viersbach y col., 1998). En el presente estudio la sonda de PWA (*LSI Síndrome Prader-Willi/Angelman Dual Color probe (SNRPN SpOr/CEP 15 SpGr/PML SpOr) (Vysis)*) nos ha permitido identificar la presencia de un centrómero (caso M-46) o dos (casos M-13, M-14, M-20, M-42, M-58, M-72 y M-76) y a su vez, la presencia de la región crítica de los síndromes de PWA (15q11-13) en los casos M-20 y M-76, o su ausencia (casos M-13, M-14, M-42, M-46, M-58 y M-72). Otra sonda locus específica muy útil para identificar marcadores con material del cromosoma 22 es la *LSI Síndrome DiGeorge/VCFs Dual Color probe (TUPLE 1 SpectrumOrange /ARSA SpectrumGreen) (Vysis)* que nos ha permitido evaluar la ausencia de las regiones 22q11.2 y 22q13.3 en varios HSCs (casos M-60, M-61 y M-64).

Por último, hay que recordar que en aquellos casos en que los HSCs derivan de cromosomas imprintados, debe excluirse la posibilidad de UPD. Actualmente estos análisis se realizan mediante la aplicación de técnicas de genética molecular, tales como análisis de microsatélites (Salafsky y col., 2001) o PCR metilación específica (Nietzel y col., 2003).

- RCCs y otras translocaciones crípticas

La aparición de la técnica de HR-CGH mejora considerablemente la sensibilidad de la CGH, convirtiéndola en una herramienta muy útil para la detección de anomalías cromosómicas crípticas (Kirchhoff y col., 2000, 2001). Existen otras muchas técnicas útiles para la detección de este tipo de anomalías: *kits* de sondas subteloméricas, M-FISH, SKY o FISH multitelómero. La utilización de sondas subteloméricas es más sensible para la detección de pequeñas (< 3 Mb) deleciones subteloméricas, pero generalmente resulta menos sensible para las duplicaciones (Ness y col., 2002). No obstante, la mayor ventaja de la CGH frente al screening con sondas subteloméricas es que detecta otros desequilibrios (no únicamente los localizados en las regiones subteloméricas). Este hecho es importante ya que en los estudios realizados por Kirchhoff y col. (2000) se evidenció que los desequilibrios cromosómicos intersticiales son más comunes que los desequilibrios subteloméricos en grupos de pacientes con retraso mental.

En el presente estudio, la aplicación de la CGH/HR-CGH nos ha permitido descartar cualquier desequilibrio (dentro de los límites resolutivos de la técnica) en siete reorganizaciones cromosómicas, equilibradas según el estudio mediante citogenética convencional, por lo que las

hemos considerado como “aparentemente” equilibradas. En los casos M-37 y M-54, no se dispuso de ADN de los pacientes para la valoración de desequilibrios cromosómicos.

De las translocaciones crípticas identificadas en nuestro estudio, destaca por su interés el caso M-59, en el cual, las bandas G mostraban la presencia de un gran desequilibrio cromosómico que fue identificado posteriormente mediante CGH. El análisis de los perfiles de CGH del cromosoma 18 reveló la duplicación de un fragmento críptico en 18q23. El análisis detallado de los resultados obtenidos mediante bandas G, CGH y FISH nos permitió definir dicha reorganización como compleja.

Recientemente varios autores (Vermeulen y col., 2004; Lespinasse y col., 2004) han descrito la utilidad de disponer de los resultados de bandas G, FISH y CGH para conseguir una determinación exacta de los puntos de rotura en las RCCs. No obstante, la técnica de HR-CGH no detecta deleciones < 3 Mb, y hoy por hoy, aunque se han descrito deleciones crípticas en algunas RCCs con esta técnica (Lespinasse y col., 2004b), ya se considera que tiene una resolución limitada, con lo cual se aconseja la aplicación de BACs específicos de los puntos de rotura observados, pues se ha demostrado que ciertas RCCs aparentemente equilibradas no lo son en realidad por CGH (Kraus y col., 2003; Atsbury y col., 2004).

5.2 CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO

Hoy en día, se conocen muy pocas regiones cromosómicas cuya alteración, por pérdida o duplicación, esté asociada a un síndrome clínico bien definido (Carey y Viskochil, 2002). Distintos estudios, incluido el presente, muestran que tanto la CGH, como la M-FISH, son dos técnicas que contribuyen eficazmente en la identificación de regiones cromosómicas específicas asociadas a malformaciones congénitas concretas. Esta información es de suma importancia para los biólogos moleculares como indicación de qué regiones del genoma deben considerarse como “dianas” para identificar los genes implicados.

5.2.1 MONOSOMÍAS PARCIALES AUTOSÓMICAS

En general, en la especie humana se observa una mejor tolerancia a las duplicaciones que a las deleciones. La gravedad de estas depende, claro está, del contenido genético del fragmento cromosómico implicado. Hasta el momento, se han descrito aproximadamente un total de 1800 monosomías parciales que han sido revisadas por Brewer y col. (1998) y Stenson y col. (2003).

En el presente estudio se han identificado un total de 10 monosomías parciales autosómicas: 1 microdelección (M-75), 4 deleciones (M-3, M-22, M-41 y M-48), 3 cromosomas en anillo (M-18, M-71 y M-74) y 2 deleciones por translocación desequilibrada (M-15 y M-66).

5.2.1.1 Monosomías parciales por delección y por translocación

De las 7 deleciones cromosómicas identificadas; una es una microdelección (M-75), dos son deleciones terminales (M-48 y M-66), una es una delección terminal acompañada por una duplicación terminal (M-15) y 3 son deleciones intersticiales (M-3, M-22 y M-41).

El caso M-75 había sido remitido por los clínicos por una sospecha de síndrome de DiGeorge, que fue confirmado mediante FISH con la sonda locus-específica de esta región.

Sólo hemos conseguido información clínica completa de cinco casos (M-3, M-15, M-22, M-41 y M-66; tabla 11 de material y métodos). La revisión bibliográfica en pacientes con una alteración cromosómica similar nos ha permitido establecer algunas correlaciones genotipo-fenotipo.

- Delección intersticial de la región cromosómica 16p11.2 (caso M-3).

Se trata del primer caso descrito en la literatura, debido muy probablemente, a que esta alteración es difícil de detectar mediante bandas G. Hemos podido correlacionar múltiples malformaciones congénitas con la delección cromosómica 16p11.2 (ver artículo 1, anexo I).

- Delección intersticial de la región cromosómica 2q32-q35 (caso M-22).

En la literatura se han descrito más de 50 casos con deleciones intersticiales en 2q (Courstens y col., 1997; Loscalzo y col., 2004). Los casos revisados que comparten la monosomía de al menos la región 2q33.3-q34, pese a no presentar un fenotipo específico, se caracterizan por presentar retraso de crecimiento intrauterino, problemas en el desarrollo, retraso psicomotor y dificultades para alimentarse. También se ha descrito la presencia de paladar hendido y micrognatia entre otros rasgos característicos.

El caso más parecido al nuestro, es el descrito por Markovic y col. (1985) que correspondía, al igual que en nuestro caso, a un recién nacido (4 días) que presentaba bajo peso al nacer, hipertelorismo, paladar hendido, mandíbula pequeña, orejas displásicas y de baja implantación y cuello corto. Nuestro paciente no presentaba ventrículos cerebrales dilatados y piernas asimétricas como este paciente, sin embargo, si eran evidentes: una comunicación interauricular, luxación de caderas y genitales anormales.

- Delección intersticial de la región cromosómica 9q22.2-q32 (caso M-41).

Las deleciones intersticiales de 9q son muy poco frecuentes. En 2002, L'Hermine y col., describieron la primera delección intersticial del brazo largo del cromosoma 9: del(9)(q22.2q31.1). Ésta fue detectada prenatalmente, como en nuestro caso, en un feto con retraso de crecimiento intrauterino. Tras la autopsia, éste mostraba además dismorfias y presencia de pseudohermafroditismo femenino, por lo que se hipotetiza con la presencia en esta región de un gen implicado en el desarrollo genital.

- Delección terminal de la región cromosómica 9p23-pter (caso M-48) y de la región cromosómica 9p22-pter (caso M-66).

Ambos casos comparten la monosomía parcial de la región 9p23. La monosomía parcial de la región cromosómica 9p22-pter se conoce como Síndrome delección 9p- (Alfi y col., 1973). Se han descrito aproximadamente 100 casos (Christ y col., 1999), de los cuales el 60% presentaban el punto de rotura en 9p22. Se ha mapado una región crítica de 4-6 Mb para la delección de 9p22-p23 (Christ y col., 1999). El fenotipo se caracteriza por una clínica específica con retraso

mental, malformaciones craneales y faciales (trigonocefalia, fisuras palpebrales de inclinación ascendente, *filtrum largo*), defectos cardíacos congénitos y de genitales, hipotonía, escoliosis e hipospadias. El seguimiento a largo plazo de estos pacientes ha mostrado la aparición de problemas neuro-psiquiátricos en edad avanzada (Hou, 2003).

En nuestro caso, la clínica de ambos fetos se caracterizaba por un retraso del crecimiento intrauterino y en el feto M-66 además por una marcada dolicocefalia.

- *Deleción 18q22-qter acompañada de la duplicación de la región cromosómica 8q22-qter (caso M-15).*

El caso M-15, es la consecuencia de la herencia desequilibrada de una t(8;18) materna equilibrada. No se ha descrito ningún caso parecido en la literatura. Nuestra paciente presentaba: artrogriposis múltiple, dismorfia craneofacial, hipoplasia bilateral de costillas, CIA-OS, vena cava superior izquierda persistente que drena a seno coronario, hipertensión pulmonar, marcada hipodensidad de sustancia blanca, blefarofimosis bilateral, incoordinación motora ocular externa, agenesia de ambos conductos auditivos externos, úvula bífida, tronco corto, miembros delgados con dedos largos y delgados, retraso mental.

5.2.1.2 Monosomías parciales por formación de anillos

En el presente estudio hemos identificado tres pacientes con un autosoma en anillo: uno con un anillo del cromosoma 18 (M-18), y dos con anillos del cromosoma 15 muy similares, que presentaban fenotipo distinto (M-71 y M-74).

El fenotipo observado en pacientes portadores de un cromosoma en anillo se encuentra influenciado por tres factores principales:

1) Deleción de determinados genes como consecuencia de la pérdida de material cromosómico en la formación del anillo.

2) Inestabilidad mitótica del anillo que provoca anomalías cromosómicas diversas tales como, células con monosomías parciales para ese cromosoma y células con trisomías parciales (como consecuencia de la formación de un doble anillo). Todo esto conlleva una disminución de la viabilidad de estas células, con sus consiguientes consecuencias fenotípicas. Entre ellas destaca sobretodo el retraso de crecimiento (Kosztolanyi, 1987). Sin embargo, no todos los anillos son inestables (Gardner y Sutherland 1996). En el presente estudio se ha observado inestabilidad en los casos M-18 y M-74.

3) Origen parental del anillo (Rogan y col., 1996). La inestabilidad del anillo conlleva la aparición de un mosaico de células monosómicas para ese cromosoma, si éste contiene genes imprintados, el individuo expresará un fenotipo u otro en función del origen parental del anillo.

- Anillo del cromosoma 18: del(18p11.3) y del(18q22-qter) (caso M-18).

Se han descrito aproximadamente unos 70 pacientes con un r(18) (Schinzel, 2001). Los pacientes portadores de un cromosoma 18 en anillo presentan rasgos característicos del síndrome 18q- (retraso mental, hipotonía, pies deformes, canales auriculares atréticos/estenóticos, talla baja, microcefalia, genitales anormales, etc.) y del síndrome 18p- (retraso de lenguaje, hipotonía, talla baja, ptosis de párpados, retraso mental, holoprosencefalia, deficiencia de IgA, mandíbula pequeña, cuello corto, etc.) o de una mezcla de ambos (Stankiewicz y col., 2001). En nuestro caso, sólo tenemos el dato clínico de que el recién nacido presentaba diferentes malformaciones sin especificar, por ello no se ha podido comparar con las descritas en la literatura.

- Anillos del cromosoma 15: del(15q26.2-qter) (caso M-71) / del(15q26.3) (caso M-74).

En este caso hemos podido constatar que los dos pacientes, con anillos muy similares, presentan fenotipos distintos debido, muy probablemente, a la existencia de mosaicismo dinámico en el paciente M-74.

Hasta el momento, se han descrito aproximadamente 70 pacientes con anillos del cromosoma 15 en unas 55 publicaciones. Revisando los casos descritos, se observa que la heterogeneidad clínica observada no se correlaciona siempre con el tamaño del segmento delecionado, al igual que hemos observado en nuestros dos pacientes en los cuales el paciente con una deleción de mayor tamaño de la región 15q26 (M-71) presenta alteraciones fenotípicas más leves que el que presenta una deleción más pequeña (M-74), ya que como se ha comentado anteriormente en la expresión fenotípica de un cromosoma en anillo influyen varios factores.

Rogan y col. (1996), basándose en la inestabilidad dinámica que presentan estos cromosomas, postularon una correlación de fenotipos específicos dependiendo del origen parental del cromosoma 15 en anillo, ya que este hecho involucra la expresión uniparental de determinados genes. En nuestro caso, no ha sido posible estudiar el origen parental de ninguno de los cromosomas en anillo estudiados.

Recientemente, se ha descrito un gen candidato (*MEF2A*) para el desarrollo diafragmático localizado en la región 15q26.1q26.2 (Biggio y col., 2004). Teniendo en cuenta la ausencia de hernia diafragmática congénita en ambos pacientes, podríamos afirmar que ambas deleciones no incluyen esta región crítica.

En el caso M-74, la presencia de un cromosoma 15 en anillo permitió descartar un hipotiroidismo congénito como causa del enanismo observado en el paciente. Pese a no observarse una pérdida mediante CGH, pero sí una desviación significativa del perfil, se podría sospechar de una pequeñísima deleción de la región 15q26.3, ya que comparte los rasgos dismórficos típicos de este tipo de anomalía cromosómica.

Las principales características fenotípicas del síndrome de cromosoma 15 en anillo fueron descritas por Butler y col. en 1988 (ver tabla 19). Nuestros pacientes comparten algunas de estas características clínicas, como la típica cara triangular (presente en el 42% de los casos) y el retraso de crecimiento (presente en el 100% de los casos pero rasgo más inespecífico).

Tabla 19. Características fenotípicas del síndrome de cromosoma 15 en anillo y comparación con los dos casos estudiados.

Características fenotípicas	Frecuencia	Caso M-71	Caso M-74
Retraso crecimiento	100%	+	+
Retraso mental moderado/severo	95%	-	+
Microcefalia	88%	?	?
Hipertelorismo	46%	-	-
Cara triangular	42%	+	+
Edad ósea retrasada	75%	-	-
Braquidactilia	44%	-	-
Retraso lenguaje	39%	-	+
“frontal bossing”	36%	-	-
Orejas anormales	30%	-	+
Manchas cafe con leche	30%	-	-
Criptorquidismo	30%	-	-
Defectos cardíacos	30%	-	-

Harada y col. (2002) han postulado la presencia de 5 genes en 15qter: *ALDH1A3* (MIM 600433), *SNRPA1* (MIM 603521), *PACE4* (MIM 167405), *IGF1R* (*insuline-like growth factor 1 receptor gene*, MIM147370) y *MEF2A* (MIM600660). El gen *MEF2A* (MIM600660) que codifica para un factor de transcripción específico de miocitos podría colaborar en la inducción de la diferenciación el músculo y también en la regulación de genes, cuya expresión es crítica para la

supervivencia de neuronas recientemente diferenciadas, por lo tanto, deleciones de este gen podrían causar anomalías mentales como las observadas en el paciente M-74. Por otro lado, Nagai y col. (2002) han descrito el importante papel del gen *IGF1R*, uno de los principales factores de crecimiento, cuya pérdida o duplicación podría originar un retraso de crecimiento intrauterino o un sobrecrecimiento respectivamente. En nuestro caso los dos pacientes presentaban retraso de crecimiento. Cabe destacar que en algunos de estos pacientes existe una buena respuesta al tratamiento con hormona del crecimiento (Nuutinen y col., 1995). La esperanza de vida de nuestros pacientes podría ser normal al no detectarse defectos cardíacos severos, tal como han observado otros autores en pacientes con estas anomalías (Wilson y col., 1985).

5.2.2 TRISOMÍAS PARCIALES AUTOSÓMICAS

En el presente estudio se han identificado 6 trisomías parciales autosómicas: 1 corresponde a una duplicación intersticial (M-43) y las restantes derivan de translocaciones desequilibradas (M-15 anteriormente descrita, M-40, M-47, M-51 y M-59).

Únicamente disponemos de información clínica completa de tres casos (M-40, M-43 y M-51). No obstante, en el caso M-40 al no haber sido posible determinar la región cromosómica exacta implicada en el desequilibrio, no se ha podido comparar con casos similares ya descritos. La revisión bibliográfica en pacientes con una alteración cromosómica similar nos ha permitido establecer algunas correlaciones genotipo-fenotipo.

- *Duplicación de la región cromosómica 16q12.1-q22.1 (caso M-43).*

Es el segundo caso descrito en la literatura que asocia malformaciones congénitas a esta trisomía parcial. La comparación del presente caso con otras duplicaciones del brazo largo del cromosoma 16 previamente descritas en la literatura, permite correlacionar la presencia de la duplicación 16q12.1-q22.1 con anomalías en el comportamiento y otros efectos fenotípicos leves. En nuestro paciente el rasgo más destacado son las anomalías en el comportamiento (ver artículo 4, anexo I).

- *Duplicación de la región cromosómica 10p11.2pter (caso M-51).*

La trisomía 10p es un síndrome cromosómico muy poco frecuente, caracterizado por la presencia de anomalías craneofaciales, malformaciones esqueléticas y de órganos internos así como de un retraso en el desarrollo psicomotor (Schinzel, 2001). En la mayoría de los casos

descritos, la trisomía 10p es el resultado de una translocación equilibrada o de una inversión presente en alguno de los progenitores (Fechtrup y col., 2000). Nuestro paciente es portador de una t(Y;10) desequilibrada, que se encontraba en equilibrio en su progenitor y ecográficamente se observó la presencia de quistes de plexos coroideos, ectasia píelica y un derrame pericárdico.

5.2.3 CROMOSOMAS MARCADORES SUPERNUMERARIOS

Hasta el momento, con la combinación de citogenética convencional y molecular se han descrito alrededor de 2.000 cromosomas marcadores supernumerarios en humanos (HSCs) en más de 750 publicaciones (revisado por Liehr y col., 2004). Los HSCs se presentan con una frecuencia de 0,043% en nacidos vivos, 0,076% de diagnósticos prenatales, 0,426% de pacientes con retraso mental y 0,165% de individuos subfértiles (Fuster y col., 2004; Liehr y col., 2004). En nuestra serie de 15 HSCs, cinco fueron detectados prenatalmente y diez postnatalmente.

En cuanto a su origen, se considera que aproximadamente el 60% de los HSCs se producen *de novo* y el 40% restante tienen un origen familiar (Fuster y col., 2004; Liehr y col., 2004). En nuestro estudio, aunque son muy pocos casos, se sigue cumpliendo que la mayoría se originan *de novo* ya que de los 12 casos en que se conocía su origen, nueve eran *de novo* (75%) y los otros tres presentaban un origen familiar (todos heredados vía materna). Los HSCs heredados se asocian mayoritariamente a un fenotipo normal mientras que si el origen es *de novo* tienen un el riesgo >13% de presentar alteraciones (Warburton, 1991). En los HSCs heredados si el progenitor portador es normal el riesgo fenotípico se considera inexistente (Brondum-Nielsen y Mikkelsen, 1995). Sin embargo, esto no se mantiene si el progenitor portador es mosaico. En nuestro estudio, de los tres casos que presentaron un origen heredado: un paciente era fenotípicamente normal (M-46), otro mostraba un cuadro malformativo (M-64) y el tercero, portador de dos HSCs idénticos, presentaba infertilidad (M-14).

Aproximadamente el 60 % de los HSCs derivan del cromosoma 15, la mayoría son dicéntricos, con un centrómero inactivado y son conocidos como cromosoma 15 pseudodicéntrico o inv dup(15) (Fuster y col., 2004). Los HSCs no acrocéntricos más comunes son los derivados de los cromosomas 8 y 1 (Liehr y col., 2004). En nuestro estudio, también hemos detectado que la mayoría (53%) derivaban del cromosoma 15, dos derivaban del cromosoma 22, uno derivaba del cromosoma 14, dos de los cromosomas 14 o 22 (por determinar), uno derivaba del cromosoma 4 y uno del cromosoma 18.

En general, podemos decir que los fenotipos asociados a los HSCs son muy heterogéneos (Urioste y col., 1994; Paolini-Giacobino y col., 1998; Fuster y col., 2004; Liehr y col., 2004). Tan sólo el 33,8% de los HSCs están correlacionados con síndromes clínicos definidos (Liehr y col.,

2004). Este efecto fenotípico depende de diversos factores: tamaño del cromosoma marcador, presencia o ausencia de eucromatina y satélites, grado de mosaicismo, origen *de novo* o familiar y posibilidad de disomía uniparental. Por tanto, tras la detección de un cromosoma marcador es difícil ofrecer un consejo genético. En el presente estudio, sólo en un caso se ha observado mosaicismo (M-44).

El estudio de los HSCs presentes en individuos con fenotipo anormal es de gran utilidad para conocer qué regiones del genoma humano, al desequilibrar su dosis, originan anomalías fenotípicas (Sumption y Barber, 2001) y cuales no. En este último caso nos permiten conocer las regiones que están sujetas a silenciación génica (Li, 2002).

En el presente estudio se han identificado 15 HSCs, de los que conocemos su efecto fenotipo en 11 casos (M-13, M-14, M-20, M-27, M-42, M-46, M-58, M-64, M-67, M-72 y M-76; ver tablas 9 y 11 de material y métodos). La revisión bibliográfica en pacientes con una alteración cromosómica similar nos ha permitido establecer algunas correlaciones genotipo-fenotipo.

- *Cromosomas marcadores derivados del cromosoma 15.*

Los HSCs derivados del cromosoma 15 constituyen la mayor parte (53%) de los marcadores identificados. El 37,5% de los casos estudiados fueron de origen familiar, heredado en todos los casos vía materna (M-14, M-46 y M-64); uno de ellos fue detectado prenatalmente (M-46) por indicación diagnóstica de edad materna avanzada.

Según la literatura, los HSCs son frecuentemente dicéntricos (Fuster y col., 2004), en nuestro estudio también hemos constatado este hecho, ya que en el 87,5% de los casos, el cromosoma marcador presentaba dos centrómeros (identificados mediante FISH con sondas LSI que incluyen también sonda centromérica del cromosoma 15).

El fenotipo de los pacientes portadores de HSCs(15) es muy variable (Webb y col., 1998; Fuster y col., 2004; Liehr y col., 2004). En nuestro estudio, los distintos pacientes presentaban fenotipos muy heterogéneos, observándose desde un cuadro malformativo (M-20), fenotipos similares al síndrome de PraderWilli (M-42 y M-76), infertilidad (casos M-14 y M-72) e incluso un fenotipo normal (M-13, M-46 y M-58).

El HSC mejor conocido es invdup(15) ya que representa la mitad de todos los HSCs(15) (Gersen y Keagle, 1999). Este HSC consiste en un fragmento duplicado e invertido de 15q, que contiene además dos brazos cortos y dos centrómeros uno de los cuales suele estar inactivado, por lo que también se denomina psu dic(15;15) La mayoría son de origen materno y en general se forman por recombinación homóloga entre dos cromosomas 15 (Gersen y Keagle, 1999) (Fig. 29). En nuestro estudio creemos que algunos de los HSCs identificados formados por dos centrómeros fueron de este tipo.

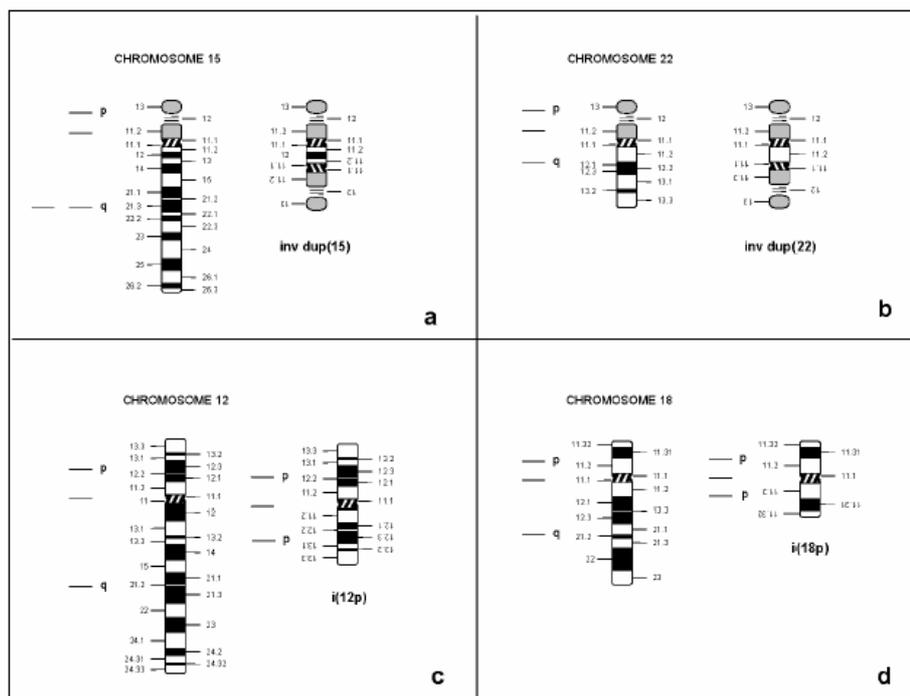


Figura 29. Ideograma de cuatro HSCs involucrados en síndromes específicos. a) invdup(15) o “síndrome inv dup(15)”; b) inv dup(22) o “síndrome *cat eye*”; c) isocromosoma 12p o “síndrome Pallister-Killian”; d) isocromosoma 18p o “síndrome i(18p)” (Fuster y col., 2004).

Los invdup(15) que contienen hasta q13 o q14 se asocian a un fenotipo descrito como síndrome invdup(15), caracterizado por retraso mental, autismo y dismorfia facial entre otros aspectos fenotípicos (Battaglia y col., 1997; Wandstrat y Schwartz, 2000; Schinzel y Niedrist, 2001). En nuestro estudio, los casos que contenían esta región (M-20, M-42, M-76) presentaban rasgos dismórficos en el primer caso y un fenotipo similar al del síndrome de PraderWilli en los dos casos restantes.

Cabe destacar, que la presencia de un HSC(15) en un individuo, tanto si es familiar como *de novo*, comporta un riesgo aumentado de disomía uniparental del cromosoma 15, por ello se recomienda hacer estos estudios de disomía uniparental (UPD), especialmente si se detecta al realizar un diagnóstico prenatal (Robinson y col., 1993; Kotzot y col., 2002). Se han descrito varios casos de síndrome de Prader-Willi o Angelman asociados a UPD del cromosoma 15 y presencia de un HSC (Liehr y col., 2004). En el presente estudio no ha sido posible llevar a cabo este análisis en ninguno de los casos estudiados.

En general, se ha asumido que presentan fenotipo normal aquellos pacientes con pequeños HSCs(15) (una vez descartada la UPD), mientras que aquellos con HSCs(15) de mayor tamaño,

que contienen la región crítica del síndrome de Prader-Willi/Angelman (PWA), suelen presentar anomalías fenotípicas. En nuestro estudio, se confirma este hecho ya que en dos casos (M-20 y M-76) con fenotipo alterado, se observó la presencia de la región crítica de PWA. En uno de ellos (M-76), el cromosoma marcador presentaba dos veces esta región, siendo portador de una tetrasomía parcial para esta región.

Se ha descrito que los individuos portadores de HSCs(15) con puntos de rotura en 15q11.1 presentan un fenotipo normal (Schinzel, 2001; Eggermann y col., 2002). En nuestra serie, los casos M-13, M-14 y M-42 presentaban HSCs con este punto de rotura. Los pacientes M-13 y M-14 presentaban un fenotipo normal, sin embargo el paciente M-14 (con dos HSCs idénticos) presentaba oligozoospermia. En cambio, el paciente M-42 presentaba un fenotipo similar a PW, el cual podría ser debido a una disomía uniparental del cromosoma 15, la cual queda pendiente de descartar.

Los pacientes descritos en la literatura con dos HSCs(15) presentaban malformaciones fenotípicas (Robinson y col., 1993; Nietzel y col., 2001; Qumsiyeh y col., 2003; Starke y col., 2003) o infertilidad (Martin-Lucas y col., 1986; Manenti 1992; Gentile, 1993). En el presente estudio, cabe destacar que el paciente M-14, presentaba dos HSCs del cromosoma 15 idénticos, presentando por tanto una hexasomía parcial que no incluía la región crítica de PWA. Este paciente, varón subfétil con fenotipo normal, había heredado el cromosoma marcador de su madre, la cual presentaba un único HSC y un fenotipo absolutamente normal. Es conocido que los HSCs(15) de origen familiar pueden expresar distinto fenotipo en los dos sexos y que en las mujeres éste suele ser normal (Buckton y col., 1985; Manenti, 1992; Martín-Lucas y col., 1986). En nuestro caso, la presencia de infertilidad en el hijo se debe muy probablemente a la presencia de los dos marcadores.

Varios autores han descrito la presencia de HSCs(15) en varones con oligozoospermia o azoospermia acompañada de un fenotipo normal (Cotter y col., 2000; Eggermann y col., 2002). También se han descrito varones infértiles portadores de HSCs derivados de otros cromosomas (McNerlan y col., 2003). Estos mismos autores han destacado un incremento en la frecuencia de HSCs, al igual que ocurre con las translocaciones robertsonianas, en los pacientes subfétils e infértiles. Por otro lado, el hecho de que los HSCs se transmitan mayoritariamente vía materna sugiere una fertilidad reducida en los varones portadores de HSCs o una exclusión del cromosoma marcador en espermatogénesis.

- Cromosomas marcadores derivados del cromosoma 14.

La mayoría de pacientes con HSCs derivados del cromosoma 14 presentan un fenotipo normal, pero también se ha descrito la presencia de retraso en el desarrollo y mental en un 16% de los casos y con esta misma frecuencia en pacientes subfértiles (Crolla, 1998).

En nuestro estudio, se ha identificado prenatalmente un HSC derivado del cromosoma 14 (caso M-39) en todas las metafases estudiadas. El embarazo llegó a término naciendo un niño con fenotipo absolutamente normal. Dado que se trata de un cromosoma candidato de *imprinting*, la presencia de un HSC(14), también constituye una situación de riesgo de disomía uniparental, por lo cual se recomienda realizar estos estudios moleculares (Shaffer, 2001). En el caso M-39 tampoco hemos podido llevar a cabo este análisis.

- Cromosomas marcadores derivados del cromosoma 22.

En el presente estudio, se han identificado este tipo de HSCs en dos pacientes no emparentados. En el caso M-27 se consiguió identificar el cromosoma marcador mediante CGH y cenM-FISH y en el caso M-60 mediante M-FISH y posterior confirmación con sonda de pintado cromosómica específico.

Los HSCs(22) se asocian a fenotipos muy heterogéneos (Crolla, 1998) lo que podría asociarse con puntos de rotura diferentes a nivel submicroscópico (Schinzel, 2001). En el caso M-60, diagnosticado prenatalmente, no se detectó ninguna alteración ecográfica y la gestación llegó a término, dando lugar a un recién nacido fenotípicamente normal. Sin embargo, en el caso M-27, se trataba de un niño con cuadro clínico (ver tabla 11).

- Cromosomas marcadores derivados de los cromosomas 14/22.

Hemos detectado dos casos (M-61 y M-64), que presentaban HSCs presumiblemente derivados de los cromosomas 14 o 22, los cuales no han podido llegar a ser caracterizados completamente debido a la similitud entre las secuencias alfoides centroméricas de los cromosomas 14 y 22. Ésta, es una limitación inherente a las técnicas empleadas, hecho descrito repetidamente por otros autores en la literatura (Hastings y col., 1999; Nietzel y col., 2001), que queda subsanada con la aparición de técnicas recientes (subcenM-FISH).

El caso M-61 corresponde a un feto en el que no se había detectado ninguna alteración ecográfica. Sin embargo, el paciente M-64 correspondía a un recién nacido con atresia anal y orejas dismórficas. La revisión bibliográfica de pacientes con alteraciones cromosómicas similares revela que si el HSC deriva del cromosoma 14 tiene un bajo riesgo de presentar un

fenotipo anómalo, mientras que si éste deriva del cromosoma 22 el riesgo es más elevado (Viersbach y col., 1998; George y col., 2002).

- *Cromosomas marcadores derivados del cromosoma 4.*

Hasta el momento, se han descrito en la literatura muy pocos casos de HSCs derivados del cromosoma 4 (Gravholt y Friedrich, 1995; Crolla, 1998; Grimbacher y col., 1999; Starke y col., 2003), todos ellos presentan un origen *de novo*, la mayoría son mosaicos y muestran una amplia heterogeneidad fenotípica.

En el caso M-44, se trataba de un varón estudiado mediante citogenética convencional junto a su pareja por presentar abortos de repetición. Se detectó mediante la técnica de M-FISH, la presencia de 0-2 HSCs por célula derivados del cromosoma 4, hecho confirmado posteriormente con sonda de pintado cromosómico específica. No fue posible determinar la región cromosómica específica debido a la imposibilidad de conseguir ADN del paciente. Sin embargo, la observación detallada del cariotipo en 24 colores (M-FISH) nos hace sospechar la existencia de un marcador derivado del cromosoma 4p debido al pseudocolor típico que muestra el cromosoma 4 en la región distal de su brazo corto con esta técnica. Actualmente esta pendiente de confirmarse esta sospecha mediante sondas subteloméricas específicas de esta región.

Los mosaicos asociados a HSCs es un hecho bien conocido (Crolla y col., 1998), si bien, no está clara su asociación a un fenotipo anómalo en función del grado de mosaicismo (Liehr y col., 2004). La recurrencia de abortos en esta pareja podría relacionarse con el comportamiento meiótico del cromosoma marcador que alteraría la segregación cromosómica en la espermatogénesis originando gametos con aneuploidías tal y como se ha propuesto en otros casos (Viersbach y col., 1998; Blanco y col., 2000).

- *Cromosomas marcadores derivados del cromosoma 18.*

En el presente estudio, hemos identificado un HSC derivado del cromosoma 18 que fue detectado prenatalmente en un feto con malformación cardíaca (caso M-67). Posteriormente se practicó una interrupción voluntaria del embarazo. La utilización combinada de las bandas G, CGH y posteriormente FISH utilizando sonda de pintado cromosómico específico, ha permitido caracterizar el marcador como i(18)(p10).

Se han descrito individuos con tetrasomía 18p y fenotipos muy heterogéneos, desde normal hasta claramente anormales (Moog y col., 1994). Sin embargo, más recientemente Guanciali-Franchi y col. (2004) han descrito en un feto un cromosoma marcador identificado como

i(18)(p10) con la técnica SKY y el empleo de YACs, en este caso, la gestación llegó a término y tuvo como resultado un neonato dismórfico y con cardiopatía. El nuestro, sería pues el segundo caso descrito en la literatura sugiriendo que la presencia de un HSC de este tipo podría asociarse a cardiopatías y por tanto a un mal pronóstico.

5.2.4 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

Para poder establecer correlaciones genotipo-fenotipo en este grupo de pacientes resulta imprescindible conocer las características típicas de estos cromosomas, como son la existencia de regiones pseudoautosómicas, la inactivación del cromosoma X o el papel del gen SRY (*sex-determining region Y*).

Las regiones distales Xp e Yp contienen secuencias de ADN muy similares (PAR1). Durante la meiosis masculina existe recombinación entre estas regiones, dado a que este hecho recuerda a la recombinación entre las parejas de autosomas, estas regiones se denominaron regiones pseudoautosómicas. También existen unas regiones altamente homólogas en los extremos distales de Xq e Yq (PAR2), las cuales parecen también recombinar durante la meiosis masculina (Freije y col., 1992).

En las células somáticas de mujeres con cariotipo normal (46,XX), únicamente se mantiene activo uno de los cromosomas X. La inactivación del cromosoma X o lionización, se inicia alrededor del tercer día después de la fertilización y se completa al final de la primera semana del desarrollo embrionario. La inactivación es al azar, es decir, tanto pueden ser inactivados el cromosoma X paterno como el materno. Sin embargo, una vez inactivado, todas las células hijas de la célula original mantendrán el mismo X inactivado. El cromosoma X inactivado se visualiza en un estado mucho más condensado en las mujeres, que se conoce como corpúsculo de Barr (Moore y Barr, 1954) y que puede ser identificado al presentar una replicación tardía. El gen que parece ser el responsable de la inactivación, gen XIST (*X-inactive-specific transcript*), ha sido identificado y secuenciado, y sólo se expresa en el cromosoma X inactivo (Brown y col., 1991). Se encuentra localizado en el centro de inactivación del cromosoma X (XIC), en la banda Xq13. Sin embargo, algunos genes del cromosoma X inactivo se mantienen activos, expresándose por tanto en los dos cromosomas X.

El fenotipo masculino, se debe al gen SRY (*sex-determining region Y*) que está localizado en la banda Yp11.3 (Sinclair y col., 1990). Las deleciones y mutaciones que originan una disfunción

del gen, al impedir la diferenciación testicular en el embrión, dan lugar a individuos con fenotipo de mujer y cariotipo 46,XY.

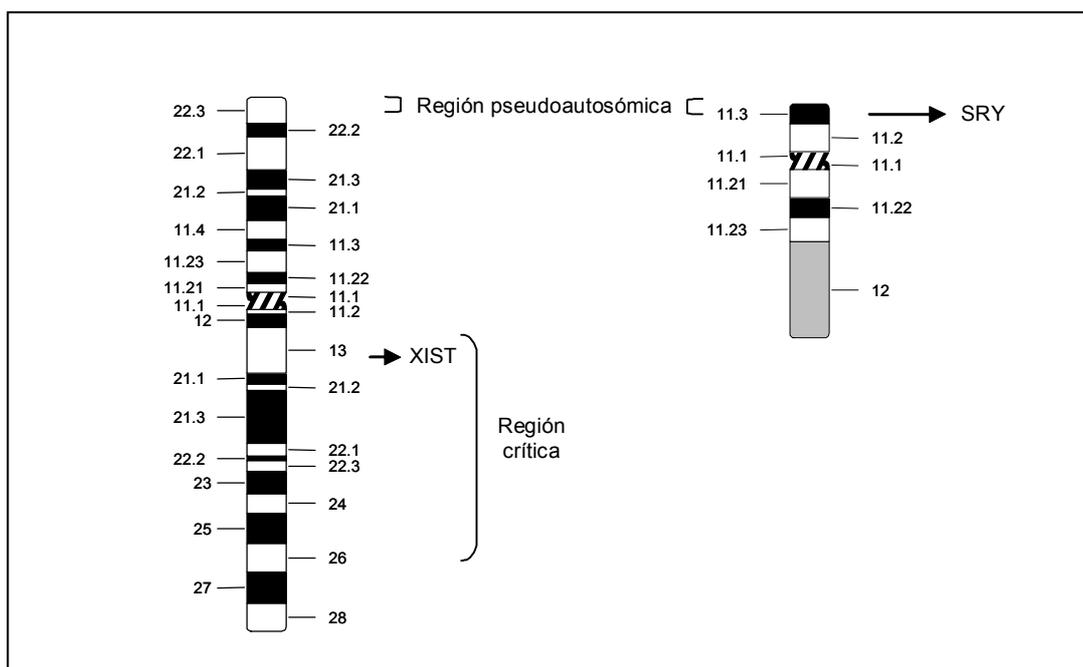


Figura 30. Ideogramas del cromosoma X e Y mostrando la presencia de la región pseudoautosómica en Xp y Yp; del gen XIST y la región crítica en Xq, y del gen SRY en Yp11.3.

5.2.4.1 Anomalías cromosómicas estructurales del cromosoma X

En nuestro estudio hemos detectado 4 mujeres que presentaban alteraciones estructurales del cromosoma X (M-34, M-52, M-57 y M-68); en dos casos la anomalía se encontraba en mosaico con una línea 45,X (M-57 y -M68). Ningún varón presentó alteraciones del X, a excepción de la presencia de la t(X;Y) presente en un varón 46,XX (M-70), que se comenta en el siguiente apartado.

Las anomalías estructurales del cromosoma X se asocian a un fenotipo más severo en hombres que en mujeres. Este hecho se explica en parte, por la inactivación preferencial del cromosoma X estructuralmente anormal en casos de duplicaciones, deleciones y translocaciones X:autosoma (Summitt y col., 1978). Sin embargo, en el 75% de los casos con translocaciones equilibradas X:autosoma, el cromosoma X que se inactiva es el no translocado, debido a una selección en contra de una posible disomía funcional del cromosoma X y una monosomía autosómica resultante (Abrams y Cotter, 2004).

- Deleciones del cromosoma X.

En el presente estudio hemos caracterizado mediante CGH, la del(X)(q11) presente en mosaico (junto con una línea 45,X) en el feto (M-68) de una gestante de 34 años con problemas hormonales. El embarazo terminó en un aborto espontáneo, del que resultó imposible conseguir más información.

Al contrario de lo que ocurre en individuos portadores de HSCs derivados de autosomas, en los cuales los marcadores de mayor tamaño son de peor pronóstico, en los portadores de cromosomas derivativos del X, tienen peor pronóstico si estos son de pequeño tamaño, ya que en estos casos se suele perder el centro de inactivación del cromosoma X (XIC en Xq13.2).

Las deleciones del brazo largo del cromosoma X tienen una expresión fenotípica muy variable. No obstante, el 43% de las mujeres que presentan estas deleciones presentan talla baja (Therman y Susman, 1990). Las mujeres con deleciones terminales en Xq13 tienen una mayor probabilidad de presentar fallo ovárico completo, mientras que aquellas con deleciones en Xq24 suelen presentar fallo ovárico prematuro (Tharapel y col., 1993). Nuestro feto, si hubiese llegado a nacer, al existir la línea 45,X es muy probable que hubiese presentado algún rasgo típico de síndrome de Turner además de fallo ovárico completo.

- Deleciones/duplicaciones del cromosoma X.

En este estudio se ha caracterizado una duplicación del cromosoma X, acompañada de una deleción del mismo cromosoma (M-34). El cromosoma X derivativo estaba presente en una mujer de 21 años de edad con amenorrea secundaria por fallo ovárico, identificándose la duplicación de la región Xp11.23-pter y la deleción de Xq21.2-qter con ayuda de la CGH.

Las mujeres con duplicaciones del brazo corto del cromosoma X muestran fenotipos muy heterogéneos, se han descrito casos con fenotipo normal, alterado y mujeres fértiles o que presentan amenorrea (Gersen y Keagle, 1999). La presencia, en nuestra paciente, de fallo ovárico prematuro podría atribuirse a la deleción de la región cromosómica Xq21-qter.

- Cromosomas X isodicéntricos.

Hemos identificado, mediante CGH, la existencia de un cromosoma isodicéntrico idic(X)(q21.1) en una niña de 12 años (M-57). La paciente presentaba un retraso en el crecimiento, maduración ósea retrasada (unos 18 meses), talla baja, fallo ovárico y no presentaba estigmas turnerianos.

Los pacientes con cromosomas X isodicéntricos presentan efectos fenotípicos distintos en función de si se han fusionado por los brazos cortos o por los largos, y de si va acompañado o

no de una deleción. Mientras que la fusión de sus brazos cortos da lugar a individuos con una estatura normal o baja, disgenesia gonadal y ocasionalmente estigmas turnerianos, aquellos individuos en los que se fusionan los brazos largos del cromosoma X presentan una estatura normal y disgenesia gonadal (Barnes y col., 1987). Nuestra paciente presentaba una talla baja y fallo ovárico típicamente observados en individuos portadores de este tipo de anomalías.

5.2.4.2 Anomalías cromosómicas estructurales del cromosoma Y

Hemos detectado este tipo de anomalías en 7 casos (M-1, M-10, M-12, M-35, M-53, M-69 y M-73). En 4 casos la anomalía se presentaba en mosaico (M-10, M-12, M-35 y M-69).

Entre las alteraciones del cromosoma Y, hemos caracterizado 2 deleciones (M-1 y M-53); 1 cromosoma Y en anillo (M-69), un isocromosoma de brazos cortos (M-10) y 4 casos en los que el cromosoma Y estaba translocado: con el cromosoma X (casos M-52 y M-70), con el mismo (M-35) y con un autosoma (M-73).

Las anomalías cromosómicas estructurales que comportan la deleción de la región proximal del brazo largo del cromosoma Y se asocian con azoospermia, infertilidad y talla baja. Por otro lado, los cromosomas marcadores derivados del cromosoma Y suelen estar relacionados con un incremento del riesgo de gonadoblastoma en mujeres con síndrome de Turner (Gersen y Keagle, 1999).

- Deleciones del cromosoma Y.

En el presente estudio, se han identificado deleciones del cromosoma Y en dos casos; uno prenatalmente (M-1) y otro en un individuo azoospermico (M-53). Mediante la utilización de las técnicas de CGH y FISH hemos caracterizado la deleción de todo el brazo largo del cromosoma Y en un feto de 18 semanas (M-1). Dicha deleción, fue posteriormente confirmada mediante un análisis por PCR de microdeleciones del cromosoma Y (caso 1, artículo 2, anexo I). Al nacer, el niño presentó genitales normales, macrosomía y un angioma vascular fronto-palpebral. El otro caso corresponde a un individuo azoospermico (M-53), portador de un cromosoma marcador derivado del cromosoma Y. No se pudo determinar la región cromosómica exacta presente en el cromosoma marcador al no disponer de ADN del paciente. Sin embargo, las imágenes de las bandas G y C, junto al fenotipo del paciente nos hace sospechar de la existencia de una deleción de toda la región cromosómica Yq12 y parcial de Yq11.2.

Las deleciones que implican únicamente la región heterocromática de Yq se asocian a un fenotipo masculino que con frecuencia, en la edad adulta, da lugar a una talla baja e infertilidad (Hsu, 1989; Ma y col., 2000; Kirsch y col., 2000; Kleiman y col., 2001). Si las deleciones incluyen

la región eucromática pueden asociarse o no a azoospermia en función de la ausencia o presencia de los genes AZF (*azoospermic factor*) (Fryns y col., 1985). La delección parcial de AZFc (dos de las 4 copias del gen DAZ), es la que se encuentra más frecuentemente en la población infértil (Machev y col., 2004). La presencia de azoospermia en el paciente M-53 se debe a la pérdida de Yq; en el caso M-1 podemos suponer que también la presentará en la edad adulta al carecer también de dicha región.

- Anillos del cromosoma Y.

La identificación citogenética de estos anillos es muy difícil, ya que por lo general, la región heterocromática del cromosoma Y se encuentra delecionada.

En el presente estudio se ha conseguido identificar parcialmente mediante CGH un anillo del cromosoma Y, en mosaico, detectado mediante citogenética convencional (M-69) en un hombre oligozoospermico, padre de un feto con la fórmula cromosómica 47,XX,r(Y)/46,XX. Los perfiles de CGH permitieron detectar una pérdida muy pequeña de la banda Yp11.3, pero ninguna pérdida de la región Yqter debido al bloqueo de las secuencias heterocromáticas. Estudios posteriores realizados por otros miembros de nuestro laboratorio (Arnedo y col., 2004) mediante FISH con sondas subteloméricas permitieron constatar la presencia de la región subtelomérica de Yq. Hasta el momento todos los r(Y) descritos en la literatura se han hallado en hombres infértiles; debido a la pérdida de genes relacionados con la espermatogénesis, la presencia de una línea 45,X o al no apareamiento de los cromosomas sexuales en meiosis (Arnedo y col., 2004).

- Isocromosomas Y.

Hemos caracterizado un isocromosoma de Yp (caso M-10) (caso 2, artículo 2, anexo I), mediante la técnica de CGH, en un feto de 16 semanas que presentaba una agenesia renal unilateral detectada ecográficamente. Al nacer presentó un fenotipo masculino con genitales aparentemente normales. En este paciente el i(Yp) se encontraba en mosaico con una línea celular 45,X atribuyéndose a la inestabilidad del propio isodicéntrico. Los resultados obtenidos por CGH fueron confirmados posteriormente mediante análisis por PCR de microdeleciones del cromosoma Y. Según Hsu (1989), el 27% de los individuos portadores de i(Yp) presentan un fenotipo masculino como nuestro paciente. Hasta el momento, es el primer caso descrito en la literatura de un i(Yp) asociado a una agenesia renal.

- Translocaciones X:Y.

Hemos logrado identificar, mediante CGH y FISH, este tipo de anomalías cromosómicas en dos pacientes, uno con fenotipo de mujer (M-52) y otro de varón (M-70).

En el primer caso, del cual desconocemos la indicación para el estudio citogenético, se identificó el material adicional en Xp como material del cromosoma Y, es decir, la mujer era portadora de una translocación X;Y. La ganancia de Yq11.1-qter parecía ir acompañada de una pequeñísima pérdida (que se insinuaba mediante CGH) de la región más distal del brazo corto del cromosoma X. En 1994, Hsu publicó una revisión del medio centenar de pacientes con translocación X;Y descritos en la literatura hasta el momento. Las translocaciones que originaban un cromosoma X derivativo se clasificaron en 7 tipos, siendo las más frecuentes, las que involucraban a la región Yq11qter en Xp22, que según creemos correspondería también a nuestro caso. Estamos en espera de aplicar sonda subtelomérica de Xp para confirmarlo.

En el segundo caso, se identificó, mediante la técnica de CGH y QF-PCR, la típica translocación Xp:Yp en un varón XX (M-70). La existencia del gen SRY, detectado por QF-PCR en este paciente, permitía explicar su fenotipo (Ballabio y Andria, 1992). Las regiones pseudoautosómicas de Xp e Yp se aparean en la meiosis masculina y en ocasiones ocurre un intercambio desigual de material que se extiende a las regiones adyacentes. Esta teoría explicaría el origen de los hombres XX con el gen SRY y otras regiones de Yp translocadas a Xp. Es el segundo caso en la literatura en el que se ha podido detectar la t(Xp;Yp) utilizando la técnica de CGH. El primero fue descrito por Rigola y col. (2002), constatándose una vez más, que la heterogeneidad fenotípica observada en estos pacientes esta relacionada con translocaciones X;Y entre distintos fragmentos.

- Translocaciones Y:Y.

La presencia de translocaciones entre dos cromosomas Y es algo inusual (Hsu, 1994). Sin embargo, en este estudio se han identificado dos casos.

Se ha caracterizado una translocación (Y;Y) en mosaico (M-35) en un niño con retraso psicomotor y de lenguaje. Gracias al análisis detallado de los perfiles de CGH y las imágenes de M-FISH y FISH con sondas subteloméricas y de pintado cromosómico específico, pudimos determinar la ganancia de la región cromosómica Yp11.2pter y por tanto la existencia de una translocación Y;Y.

En un segundo caso, se estudió una niña de 12 años con retraso de crecimiento, amenorrea primaria, útero hipoplásico y gónadas en cinta (caso 3, artículo 2, anexo I). Los resultados obtenidos mediante CGH permitieron identificar una translocación (Y;Y) en mosaico con una

línea celular 45,X, que se confirmó posteriormente mediante análisis por PCR de microdeleciones del cromosoma Y.

- Translocaciones Y:autosoma.

En el presente estudio se ha identificado, mediante la técnica de M-FISH, una t(Y;15) en un individuo infértil (M-73), que no pudo ser analizada por CGH.

En una revisión de 130 casos de translocaciones Y:autosoma, realizada por Hsu (1994), se describió como la translocación más frecuente la de la región heterocromática de Yq con los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, principalmente 15 y 22. Se han descrito translocaciones Y:autosoma para todos los autosomas excepto para los cromosomas 11 y 20. La presencia de Yp en una translocación Y:autosoma asegura la determinación de un individuo de sexo masculino. Basándonos en el fenotipo del paciente y en los datos publicados en la literatura, parece que en nuestro paciente, la región de cromosoma Y translocada correspondería al brazo corto. Estamos pendientes de confirmarlo utilizando una sonda subtelomérica específica de Yp.

5.2.5 REORGANIZACIONES “APARENTEMENTE” EQUILIBRADAS

La determinación exacta de los puntos de rotura en cualquier tipo de reorganización es necesaria para poder establecer correlaciones genotipo-fenotipo y para identificar aquellas regiones cromosómicas donde se localizan los genes específicos implicados en determinadas alteraciones clínicas. En nuestro estudio, se han identificado 9 reorganizaciones cromosómicas gracias a la utilización conjunta de las técnicas de bandeado cromosómico, CGH y FISH. Estos resultados, junto a otros muchos descritos en la literatura (Vermeulen y col. 2004; Tyson y col., 2004), muestran como empleando estas técnicas se puede avanzar en el establecimiento de estas correlaciones genotipo/fenotipo.

5.2.5.1 Reorganizaciones cromosómicas crípticas

Los clínicos expertos en dismorfias, pueden “sospechar” en ocasiones, de la existencia de determinadas anomalías cromosómicas basándose en ciertos rasgos fenotípicos del paciente. Lo mismo ocurre con los citogenetistas con amplia experiencia, que pueden llegar a “sospechar” la

presencia de anomalías crípticas analizando preparaciones cromosómicas bandeadas. Sin embargo, muy pocas llegaban a ser identificadas, incluso disponiendo de técnicas de alta resolución, debido a la gran dificultad en su detección. Los casos analizados en este trabajo han sido remitidos por ambos tipos de profesionales.

La aparición de modernas técnicas moleculares ha sido la clave para la detección e identificación de este tipo de anomalías. Además de las técnicas de FISH y CGH, en estos últimos años, el uso de BACs, YACs y la CGH-*array* está contribuyendo muy activamente a la identificación y caracterización de este tipo de anomalías. Recientemente, son varios los casos publicados, en los que se describen este tipo de anomalías cromosómicas al aplicar estas técnicas en pacientes que habían sido diagnosticados previamente mediante bandas G con cariotipos normales o con cariotipos menos complejos de lo que son en realidad (Atsbury y col., 2001; Borg y col., 2002; Tyson y col., 2004).

En nuestra serie, hemos caracterizado dos casos con reorganizaciones cromosómicas crípticas (M-45, y M-54), descartando la existencia de desequilibrios (>3 Mb) en el primer caso y en la paciente M-49 portadora de una t(21;22).

Mediante la combinación de las técnicas de bandas G, NOR, FISH convencional M-FISH y HR-CGH, se ha identificado la translocación y la inserción de una estructura NOR en el caso M-45 y en la RCC de la paciente M-7 respectivamente. Ambas reorganizaciones se han considerado “aparentemente” equilibradas al no detectarse desequilibrios en los perfiles de HR-CGH (>3 Mb). En el caso M-7, se trataba de una mujer de 28 años de edad con episodios de amenorrea (de hasta 5 meses) y fallo ovárico prematuro. Los puntos de rotura implicados esta translocación compleja han sido Xq21 y 2q32, incluyendo la inserción de una estructura NOR en la región crítica Xq21. El segundo caso (M-45), un feto normal (que fue estudiado prenatalmente por indicación de edad materna avanzada), presentaba en su cariotipo material adicional de origen desconocido en 22q13.3 que fue identificado como una estructura NOR. En la literatura se han descrito NORs ectópicos, en casos en que los brazos cortos de cromosomas acrocéntricos se han translocado a regiones terminales de otros cromosomas y de forma mucho menos frecuente a posiciones intersticiales (Reddy y col., 1998). Aunque generalmente este tipo de translocaciones no comportan ningún tipo de consecuencia fenotípica, se ha descrito, al menos un caso, de un hombre con paraplejía espástica con una probable disrupción en Xp11.2 (Tamagaki y col., 2000) y otro caso con una deleción parcial de Xq28 (Chen y col., 2000). En los dos casos en los que hemos detectado la presencia o inserción de estas regiones NOR, no se han observado alteraciones fenotípicas graves. La amenorrea y fallo ovárico de la paciente M-7 podrían ser debidos a la disrupción de genes situados en la región crítica Xq21

La detección de una translocación recíproca críptica t(12;19)(p13;p13.3) en un feto de 15 semanas (M-54), y en su progenitora, se ha realizado mediante técnicas de FISH. El hecho de

que la madre fuera fenotípicamente normal, facilitó la decisión de llevar a término la gestación. El recién nacido también presentó fenotipo normal. Así pues, ambos pacientes no presentaban alteraciones fenotípicas; a excepción de hirsutismo y altos niveles de cortisol observados en la madre; de lo que se supone, a pesar de no haber podido realizar la CGH, que eran portadoras “aparentemente” equilibradas.

5.2.5.2 Reorganizaciones cromosómicas complejas

Las reorganizaciones cromosómicas complejas (RCCs), equilibradas o desequilibradas, son muy poco frecuentes, y la mayoría de ellas (al igual que las que hemos analizado) se originan *de novo* (Pai y col., 1980). Las RCCs desprovistas de efecto fenotípico son raras y con frecuencia tienen origen familiar (Fukushima y col., 1986). Sin embargo, aunque la incidencia actual de las RCCs es baja, es muy difícil establecer su prevalencia con exactitud (Batanian y Eswara, 1998), ya que cabe tener en cuenta que hay pocos casos descritos en la literatura y además es muy probable que muchos portadores de RCCs con fenotipo normal no sean nunca descubiertos (Sikkema-Raddatz y col., 1995). En nuestro estudio, de los seis pacientes con una RCC, uno presentaba 2 cromosomas implicados en la reorganización (M-65), en tres casos la RCC afectaba a 3 cromosomas (M-7, M-36 y M-37) y los dos casos restantes se observó la implicación de 4 cromosomas (M-17 y M-24).

Las translocaciones-inserciones son reorganizaciones cromosómicas muy poco frecuentes pero que se observan a menudo en las RCCs (Van Hemel y col., 2000). La mayoría de RCCs analizadas en el presente trabajo (67%) muestran translocaciones-inserciones afectando a diversos cromosomas (M-7, M-17, M-24 y M-36).

Los cuadros clínicos observados en pacientes portadores de RCCs no se suelen asociar a síndromes definidos (Batanian y Eswara, 1998). Todos los individuos portadores de RCCs de nuestro estudio presentaban un fenotipo con anomalías excepto el paciente M-37 que presentaba un fenotipo normal con abortos de repetición. Se han descrito varios casos de varones portadores de RCCs subfértiles debido a una gametogénesis anormal (Saadallah y Hulten, 1985) o estériles debido a un bloqueo en espermatogénesis (Rodríguez y col., 1985). En nuestro paciente, por el momento, no tenemos conocimiento de que se hayan realizado estudios meióticos.

El riesgo de que un individuo portador de una RCC equilibrada *de novo* presente anomalías fenotípicas se ha llegado a estimar en un 90% (Gardner y Sutherland, 1989; Sikkema-Raddatz y col., 1995). No obstante, ya que la prevalencia de las RCCs es difícil de establecer, seguramente este riesgo es en realidad más bajo. De hecho, algunos autores creen que el riesgo es similar al de

las translocaciones simples, pero teniendo en cuenta que este riesgo aumenta aproximadamente un 3.5% por cada punto de rotura (Warburton, 1991; Batanian y Eswara, 1998). En el presente estudio, se ha conseguido caracterizar tres RCCs con más de 4 puntos de rotura (M-17, M-24 y M-36), una RCC con 4 puntos de rotura (M-65) y dos RCCs con tres puntos de rotura (M-7 y M-37).

Las RCCs equilibradas simples son las que tienen tres puntos de rotura, son las más frecuentes, presentan un menor riesgo asociado de repercusiones fenotípicas, y generalmente tienen un origen familiar (se heredan vía materna) (Farrell y col., 1994). En nuestro caso, tanto la paciente M-7 como el M-37, pertenecerían a este grupo, sin embargo, ambas se han originado *de novo*.

En general, se asume que las RCCs suelen presentar una correlación entre el número de puntos presentes en la reorganización y la severidad de los defectos congénitos observados, asociados o no a retraso mental (Batista y col., 1994; Ruiz y col., 1996; Madan y col., 1997; Batanian y Eswara, 1998). Sin embargo, hemos observado que esto no siempre ocurre, ya que la paciente con la RCC más compleja (M-24), siete puntos de rotura, únicamente presentaba amenorrea.

Por tanto, el fenotipo observado en nuestros pacientes con RCCs “aparentemente” equilibradas podría correlacionarse con la disrupción de genes situados en los puntos de rotura pero también con la aparición de deleciones crípticas como consecuencia de las reorganizaciones que han tenido lugar. De acuerdo con las sugerencias realizadas por Lespinasse y col., (2004b), como la técnica de HR-CGH no detecta deleciones <3 Mb, hoy por hoy, no debe descartarse la posibilidad de la existencia de deleciones crípticas asociadas a estas RCCs.

El estudio de las RCCs puede resultar muy útil al sugerir nuevas regiones críticas asociadas a alteraciones fenotípicas. Sin embargo, debido a que cada RCC es única, a la poca cantidad de RCCs descritas en la literatura y a la complejidad de éstas, es todavía pronto para poder establecer una comparación entre los fenotipos observados en individuos que comparten puntos de rotura. En la Tabla 20 se resumen los puntos implicados en las RCCs analizadas y su posible asociación con las anomalías fenotípicas observadas en estos pacientes.

Varios estudios, han descrito que en las RCCs existe una distribución no al azar de los cromosomas y de las bandas más implicadas (Lurie y col., 1994; Batanian y Eswara, 1998; Bailey y col., 2002; Vermeulen y col., 2004). Los cromosomas más frecuentemente implicados son el 3 y 7 seguidos en orden decreciente de los cromosomas 1, 5, 8, 6, 4, 12, 2, 10, 21, 9, 11 y 14 (Lurie y col., 1994). En el presente estudio hemos observado la implicación de los cromosomas X, 2 y un cromosoma acrocéntrico (M-7); 1, 4, 6 y 11 (M-17); X, 2, 11 y 22 (M-24); 7, 14 y 15 (M-36), 1, 6 y 16 (M-37) y 5 y 7 (M-65). Todos ellos, a excepción de los cromosomas 15, 16, 22 y X, son considerados como los más implicados en las RCCs. En nuestra serie, los cromosomas más frecuentemente implicados han sido: X, 1, 2 y 7 involucrados cada uno de ellos en dos de las seis RCCs estudiadas, sobretudo el cromosoma 7, ya que en el caso M-36 se observaron tres puntos

de rotura para este cromosoma. Recientemente, este hecho se ha relacionado con la gran cantidad de duplicaciones segmentarias presentes en este cromosoma (Bailey y col., 2002).

Según los datos publicados hasta el momento, la banda cromosómica más frecuentemente implicada en las RCCs es la 18q21 (Batanian y Eswara, 1998; Vermeulen y col., 2004). En nuestro estudio aunque hemos identificado 27 puntos de rotura en seis RCCs no se observó ninguno en dicha banda, ni tampoco ninguna región cromosómica especialmente afectada (Tabla 20).

Tabla 20. Bandas cromosómicas implicadas en las RCCs estudiadas y principales características fenotípicas observadas.

<u>Caso</u>	<u>Bandas cromosómicas implicadas</u>	<u>Principales características fenotípicas observadas</u>
M-7	2q32, Xq21	Amenorrea secundaria
M-17	1q43, 4q21, 4q33, 6p21.3, 6q15, 11q22	Tortícolis paroxismal
M-24	2q21, 2q31, 11q22.1, 11q22.3, 22q13.3, Xp11.21, Xq24	Amenorrea primaria
M-36	7p13, 7q32, , 7q36, 14q11.2, 15q15	Atrofia cortical congénita Subluxación de cristalinos Miopía magna bilateral
M-37	1q21, 6q13, 16p11.2	Abortos de repetición
M-65	5q13, 5q15, 5q33, 7p22	Retraso psicomotor No sensación de miedo

5.3 ANÁLISIS DE LOS PUNTOS DE ROTURA IMPLICADOS EN LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ANALIZADAS

En el presente estudio hemos identificado un total de 77 puntos de rotura implicados en translocaciones (33), deleciones (23) y duplicaciones (21). En la Tabla 21 se indican las características principales de las bandas cromosómicas donde se han localizado estos puntos de rotura cromosómica, patrón de banda G (clara/oscura), tamaño, número de genes; coincidencia con bandas dónde se encuentran lugares frágiles (FS-bands), y presencia/ausencia de duplicaciones segmentarias. También se detallan el tipo de anomalía cromosómica y la técnica utilizada para su identificación.

Al analizar la distribución de los puntos de rotura por cromosoma observamos que no se produce al azar, siendo los cromosomas más afectados: Y (10 veces), X (9 veces), 15 (8 veces), 18 (6 veces), 2, 7, 9, 16 (5 veces cada uno), y las bandas más implicadas: Yp11.2 y Yq11.2 (tres veces) y 9p23, 11q22.2, 14q11.2, 15q11.2, 16p11.2, 18q22, 22q11.2, Xp22.3, Xq21.2, Yp11.3 e Yq12 (dos veces).

En nuestro estudio, las bandas más pequeñas implicadas en las alteraciones cromosómicas estudiadas han sido: 4q33 (1,8 Mb), 9q32 (2,8 Mb), 11q22.2 (1,2 Mb), Xp11.21 (2 Mb), Xp11.23 (2,3 Mb), Xq21.2 (1,7 Mb), Yp11.3 (2,9 Mb). La CGH ha permitido detectar roturas en las bandas 9q32, Xp11.23, Xq21.2 y Yp11.3 al estar todas ellas implicadas en deleciones o duplicaciones, y el resto al estar implicadas en translocaciones han sido identificadas por la combinación de las técnicas de bandas G y M-FISH. El hecho de que hayamos podido detectar alteraciones cromosómicas en estas bandas (< 3 Mb) mediante CGH se debe a que los desequilibrios afectaban a regiones de mayor tamaño y el *software* es capaz de delimitar dicha región.

Savage (1977) demostró que al aplicar la técnica de bandas G, el ojo humano se concentra automáticamente en la disposición de las bandas oscuras, y en consecuencia la mayoría de roturas son asignadas a bandas claras. De las 15 roturas detectadas en banda oscura, 12 (80%) han sido identificadas mediante CGH que utiliza ADN del paciente (y no cromosomas como ocurre las técnicas de bandedo), siendo el propio *software* quien indica la región afectada por el desequilibrio.

Con excepción de las dos roturas en la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y, el resto se distribuían mayoritariamente, 80% (60/75), en bandas claras, lo que evidencia que se acumulan en estas regiones y no se debe a la longitud relativa de estas zonas en el cariotipo. Diversos autores describieron, hace más de 25 años, este mismo fenómeno (Bauchinger y Gotz,

1979; Tanaka y col., 1983; Fuster y col., 1989; Barrios y col., 1989). Nuestros resultados, como previamente han descrito estos autores, indican que las bandas G claras son más sensibles a romperse. No obstante, cabe destacar que las bandas G claras presentan un mayor contenido en genes (Swansbury J, 2003) y por tanto cualquier rotura podría ocasionar, con más probabilidad, una disfunción de los genes en ella localizados, que en caso de afectar a bandas oscuras.

En nuestro estudio, las bandas claras donde se localizaban los puntos de rotura que presentan una densidad génica más alta han sido: 1q21, 6q21.3, 9q34, 14q11.2, 15q15, 16p11.2 y 16q22.1.

Los lugares frágiles (fragile sites, FS) se consideran puntos calientes del genoma al ser zonas preferentes de rotura (HGM11, 1991). Se cree que los FS podrían predisponer durante la meiosis a roturas y reorganizaciones cromosómicas, y por tanto a originar gametos anómalos dando lugar a abortos espontáneos o a malformaciones congénitas en recién nacidos. Desde hace años, distintos trabajos han intentado comprobar si existe una correlación entre los puntos de rotura implicados en reorganizaciones cromosómicas de células fetales de líquido amniótico, vellosidades coriales, abortos espontáneos y recién nacidos, y las bandas dónde se localizan lugares frágiles (Hecht y Hecht, 1984; De Braekeleer, 1985). Hasta el momento, todavía no se ha podido demostrar la existencia de un mayor riesgo de tener descendencia afectada en individuos que expresan un determinado lugar frágil (Sutherland y Baker, 2000). Al comparar los puntos de rotura observados en nuestro estudio, con las bandas en dónde se localizan lugares frágiles hemos encontrado que sólo coinciden un 28% (20/70). Dado que 113 de las 400 bandas del cariotipo coinciden con FS-bands, esta coincidencia se aproxima a la obtenida por azar. Es decir, nuestros resultados sugieren que, en general, no habría ninguna asociación entre estos dos fenómenos. Un análisis detallado de las diez bandas más implicadas en las roturas estudiadas muestra que sólo una, la Xp22.3, coincide con una FS-band; lo que confirmaría nuestra suposición inicial.

Por último hemos querido analizar si existe alguna relación entre los puntos de rotura observados en este estudio y la presencia de duplicaciones segmentarias. Las técnicas de citogenética molecular han contribuido recientemente a la detección de un nuevo tipo de duplicaciones conocidas como “segmentarias”, de un tamaño inferior a 1 Kb; estas presentan un elevado grado de identidad de secuencia (>95%) y se han originado recientemente en la evolución, constituyendo aproximadamente un 5% del genoma humano (Cheung y col., 2003; Zhang y col., 2004). Estas duplicaciones segmentarias o duplicones se distribuyen de forma no homogénea a lo largo del genoma evidenciando la existencia de puntos calientes ya que presentan una tasa mutacional elevada y pueden considerarse como verdaderas dianas de reordenamientos genómicos. Por tanto, estos reordenamientos pueden causar enfermedades como consecuencia de la aparición de delección, duplicación o disrupción de determinados genes mediada por inversiones o translocaciones. Al analizar las bandas donde se localizan los 77

puntos de rotura identificados hemos observado que aproximadamente un 90% (69/77) coinciden con regiones donde se han descrito duplicaciones segmentarias. Algunas de las bandas más ricas en este tipo de duplicaciones son: 15q13 (que hemos identificado en un caso); 15q11.2 y 16p11.2 (en dos casos) y Yp11.2 (en tres roturas). Estos resultados apoyarían la hipótesis anterior, según la cual, los duplicones constituirían puntos calientes con alta predisposición a romperse dando lugar a la aparición de alteraciones del fenotipo.

Tabla 21. Puntos de rotura implicados en las anomalías cromosómicas analizadas.

<u>Banda citogenética</u>	<u>Patrón de banda</u>	<u>Mb</u>	<u>Genes en la secuencia</u>	<u>FS-bands</u>	<u>Duplicaciones segmentarias</u>	<u>Implicación</u>	<u>Técnica detección</u>
1q21	C	9,8	247	+	+	t	G/M-FISH
1q43	O	6,6	34	-	+	t	G/M-FISH
2q21	C	7,8	83	+	+	t	G/M-FISH
2q23.3	C	4,3	19	-	+	del	CGH
2q31	C	13,2	105	+	+	t	G/M-FISH
2q32	O	14,5	59	+	+	t	G/M-FISH
2q35	C	6,2	81	-	+	del	CGH
4q21	C	11,8	85	-	+	t	G/M-FISH
4q33	C	1,8	9	-	+	t	G/M-FISH
5q13	C	10,2	90	-	+	t	G/M-FISH
5q15	C	5,4	38	+	-	t	G/M-FISH
5q33	C	10,1	79	-	+	t	G/M-FISH
6p21.3	C	6,8	238	-	+	t	G/M-FISH
6q13	C	5,9	30	+	+	t	G/M-FISH
6q15	C	4,6	34	+	-	t	G/M-FISH
7p13	C	4	50	+	+	t	G/M-FISH
7p15	C	10	88	-	+	t	G/M-FISH
7p22	C	7	92	+	+	t	G/M-FISH

<u>Banda citogenética</u>	<u>Patrón de banda</u>	<u>Mb</u>	<u>Genes en la secuencia</u>	<u>FS-bands</u>	<u>Duplicaciones segmentarias</u>	<u>Implicación</u>	<u>Técnica detección</u>
7q32	C	6,1	69	+	+	t	G/M-FISH
7q36	C	11,3	114	+	+	t	G/M-FISH
8q23	O	11,5	20	-	-	dup	CGH
9p22.3	C	2,5	14	-	+	del	CGH
9p23 (x2)	O	5,1	10	-	-	del	CGH
9q32	C	2,8	42	+	+	del	CGH
9q34	C	11,1	234	-	+	t	FISH
10p11.2	C	9,4	53	-	+	dup	CGH
11q22.1	C	7,6	6	-	-	t	G/M-FISH
11q22.2 (x2)	C	1,2	20	-	+	t	G/M-FISH
12p13	C	14,7	237	-	+	t	G/M-FISH
14q11.2	C	5,3	284	-	+	dup	CGH
14q11.2	C	5,3	284	-	+	t	G/M-FISH
15q11.2 (x2)	C	4,9	92	-	++	dup	CGH
15q13	C	5,7	76	-	++	dup	CGH
15q14	O	6,5	50	-	+	dup	CGH
15q15	C	4,7	97	-	+	dup	CGH
15q15	C	4,7	97	-	+	t	G/M-FISH
15q26.2	O	4,2	14	-	-	del	CGH
15q26.3	C	4	38	-	+	del	CGH
16p11.2	C	6,8	171	-	++	del	CGH
16p11.2	C	6,8	171	-	++	t	G/M-FISH
16p13	C	16,7	292	+	+	t	M-FISH

<u>Banda citogenética</u>	<u>Patrón de banda</u>	<u>Mb</u>	<u>Genes en la secuencia</u>	<u>FS-bands</u>	<u>Duplicaciones segmentarias</u>	<u>Implicación</u>	<u>Técnica detección</u>
16q12.1	C	5,7	38	-	+	dup	CGH
16q22.1	C	5,5	112	+	+	dup	CGH
17p13.3	C	3	56	-	+	del	M-FISH
18p11.2	C	8,2	73	-	+	dup	CGH
18p11.31	O	4,3	26	-	-	del	CGH
18q12	O	18,5	63	+	+	dup	CGH
18q22	O	11,5	32	-	+	del	CGH
18q22	O	11,5	32	-	+	dup	CGH
18q23	C	4,8	37	-	+	del	CGH
19p13.3	C	6,9	220	+	+	t	G/M-FISH
22q11.2	C	8	279	-	+	dup	CGH
22q11.2	C	8	279	-	+	del	FISH
22q13	C	13,7	237	+	+	t	FISH
22q13.3	C	6,9	90	+	+	t	G/M-FISH
Xp11.21	C	2	19	-	+	t	G/M-FISH
Xp11.23	C	2,3	74	-	+	dup	CGH
Xp22.3 (x2)	C	9,3	50	+	+	del	CGH
Xq13	C	8,3	87	-	+	dup	CGH
Xq21.1	O	8,6	35	-	+	del	CGH
Xq21.2	C	1,7	6	-	+	del	CGH
Xq21.2	O	1,7	6	-	+	t	G/M-FISH
Xq24	C	4,3	48	-	+	t	G/M-FISH
Yp11.2 (x3)	C	7,9	72	-	++	dup	CGH
Yp11.3	O	2,9	27	-	+	del	CGH

Banda citogenética	Patrón de banda	Mb	Genes en la secuencia	FS-bands	Duplicaciones segmentarias	Implicación	Técnica detección
Yp11.3	O	2,9	27	-	+	dup	CGH
Yq11.2 (x2)	C	14,7	150	-	+	del	CGH
Yq11.2	C	14,7	150	-	+	dup	CGH
Yq12	H	30,6	7	-	+	del	CGH
Yq12	H	30,6	7	-	+	t	CGH

Abreviaciones. del: deleción; dup: duplicación; C: Banda clara; G: bandas G; H: Banda heterocromática; Mb: Megabases; O: Banda oscura; t: translocación.

Para realizar esta tabla se han consultado el NCBI Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=), Human Gene Mapping 11. London Conference (1991). 11th Internacional Workshop on Human Gene Mapping. Human Gene Mapping. Cytogenet Cell Genet 58: 27-84 y la Human Genome Segmental Duplications (<http://projects.tcag.ca/humandup/>)

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

1.- Se han puesto a punto y/o optimizado las técnicas de:

- M-FISH para su aplicación al diagnóstico prenatal y postnatal, determinando las limitaciones de la propia técnica y del *software*.
- Extracción de DNA a partir de pequeñas cantidades de sangre periférica (1-3 ml), de células cultivadas de líquido amniótico y de vellosidades coriales, sin requerir la utilización de fenol y cloroformo
- CGH para su aplicación al diagnóstico prenatal y postnatal, comparando las ventajas y limitaciones de los *softwares* de CGH y HR-CGH

2.- La combinación de las técnicas de citogenética convencional, FISH y CGH, nos ha permitido identificar las alteraciones cromosómicas siguientes:

- 27 monosomías y trisomías autosómicas y gonosómicas
- 15 marcadores supernumerarios
- 9 reorganizaciones complejas y crípticas

3.- Se ha establecido un protocolo para la identificación de marcadores cromosómicos supernumerarios mediante la utilización combinada de las técnicas de citogenética convencional, FISH y CGH.

4.- La combinación de las técnicas de citogenética convencional, FISH y CGH nos ha permitido el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo, tanto de alteraciones autosómicas como gonosómicas.

5.- El análisis de los 77 puntos de rotura implicados en las anomalías cromosómicas estudiadas ha revelado que:

- implican fundamentalmente a los cromosomas: 2, 7, 9, 15, 16, 18, X e Y
- afectan esencialmente a las bandas 9p23, 11q22.2, 14q11.2, 15q11.2, 15q15, 16p11.2, 18q22, 22q11.2, Xp22.3, Xq21.2, Yp11.3 e Yq12

- se localizan principalmente en bandas cromosómicas claras (80%) que corresponden a regiones con un mayor contenido genético
- en su mayoría no coinciden con bandas donde se han descrito lugares frágiles
- coinciden en un 90% (69/77) con regiones donde se han descrito duplicaciones segmentarias

Bibliografia

- Abrams L, Cotter PD. (2004). Prenatal diagnosis of de novo X;autosome translocations. *Clin Genet* 65: 423-8.
- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. (1997). Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 17: 1299-311.
- Albertson DG. (2003). Profiling breast cancer by array CGH. *Breast Cancer Res Treat* 78(3): 289-98.
- Alfi O, Donnell GN, Crandall BF, Derencsenyi A, Menon R. (1973). Deletion of the short arm of chromosome no.9 (46,9p-): a new deletion syndrome. *Ann Genet* 16(1): 17-22.
- Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M. (2002). Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 107(4): 275-84.
- Angelman H. (1965). "Puppet children" a report of three cases. *Dev Med Child Neurol* 7: 681-88.
- Arlt MF, Casper AM, Glover TW. (2003). Common fragile sites. *Cytogenet Genome Res* 100(1-4): 92-100.
- Arnedo N, Nogues C, Bosch M, Templado C. (2004). Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. *Hum Reprod* Nov 4 (on line).
- Astbury C, Christ LA, Aughton DJ, Cassidy SB, Fujimoto A, Pletcher BA, Schafer IA, Schwartz S. (2004). Delineation of complex chromosomal rearrangements: evidence for increased complexity. *Hum Genet* 114: 448-57.
- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR. (2000). An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet* 66(5): 1684-8.
- Bacino CA, Kashork CD, Davino NA, Shaffer LG. (2000). Detection of a cryptic translocation in a family with mental retardation using FISH and telomere region-specific probes. *Am J Med Genet* 92(4): 250-5.
- Bailey SM, Meyne J, Cornforth MN, McConnell TS, Goodwin EH. (1996). A new method for detecting pericentric inversions using COD-FISH. *Cytogenet Cell Genet* 75(4): 248-53.
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE. (2002). Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297(5583): 1003-7.
- Ballabio A, Andria G. (1992). Deletions and translocations involving the distal short arm of the human X chromosome: review and hypotheses. *Hum Mol Genet* 1: 221-7.
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. (2000). The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 67 : 1356-9.
- Barnes IC, Curtis DJ, Duncan SL. (1987) . An isodicentric X chromosome with short arm fusion in a woman without somatic features of Turner's syndrome. *J Med Genet* 24: 428-31.
- Barrios L, Miró R, Caballín MR, Fuster C, Guedea F, Subias A, Egozcue J. (1989). Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 41: 61-70.

- Batanian JR, Eswara MS. (1998). De novo apparently balanced complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosomes 4, 18, and 21 in a girl with mental retardation: Report and review. *Am J Med Genet* 78: 44-51.
- Batista DA, Pai GS, Stetten G. (1994). Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. *Am J Med Genet* 53: 255-63.
- Battaglia A, Gurrieri F, Bertini E, Bellacosa A, Pomponi MG, Paravatou-Petsotas M, Mazza S, Neri G. (1997). The inv dup(15) syndrome: a clinically recognizable syndrome with altered behavior, mental retardation, and epilepsy. *Neurology* 48: 1081-6.
- Battaglia A, Carey JC, Cederholm P, Viskochil DH, Brothman AR, Galasso C. (1999). Natural history of Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 15 cases. *Pediatrics* 103: 830-6.
- Bauchinger M, Gotz G. (1979). Distribution of radiation induced lesions in human chromosomes and dose-effect relation analysed with G-banding. *Rad Environm Biophys* 16: 335-66.
- Bentz M, P. A., Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. (1998). Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 172-5.
- Beuren AJ. (1972). *Birth Defects Orig. Art. Ser.* VIII(5): 45-56.
- Beverstock, G. B, V. Mollevanger, P. van de Kamp, JJP. Pearson, P. Kouwenberg, JM. Rosenberg, C. (2003). Multiple supernumerary ring chromosomes of different origin in a patient: a clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet* 122A: 168-173.
- Biesecker LG, Rosenberg M, Dziadzio L, Ledbetter DH, Ning Y, Sarneso C, Rosenbaum K. (1995). Detection of a subtle rearrangement of chromosome 22 using molecular techniques. *Am J Med Genet.* 58(4): 389-94.
- Biggio JR, Descartes MD, Carroll AJ, Lynn Holt R. (2004). Congenital diaphragmatic hernia: is 15q26.1-26.2 a candidate locus?. *Am J Med Genet* 126A: 183-5.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. (2000). Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 106: 500-5.
- Blennow E, Telenius H, de Vos D, Larsson C, Henriksson P, Johansson O, Carter NP, Nordenskjold M. (1994). Tetrasomy 15q: two marker chromosomes with no detectable alpha-satellite DNA. *Am J Hum Genet* 54(5): 877-83.
- Blennow E, Nielsen KB, Telenius H, Carter NP, Kristoffersson U, Holmberg E, Gillberg C, Nordenskjold M. (1995). Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridisation. *Am J Med Genet* 55: 85-94.
- Boceno M, Rival JM, Nomballais MF, David A, Avet-Loiseau H. (1998). Characterization of two add(4qter) chromosomes by comparative genomic hybridization. *Ann Genet* 41(2): 83-6.
- Borck G, Wirth J, Hardt T, Tonnie H, Brondum-Nielsen K, Bugge M, Tommerup N, Nothwang HG, Ropers HH, Haaf T. (2001). Molecular cytogenetic characterisation of a complex 46,XY,t(7;8;11;13) chromosome rearrangement in a patient with Moebius syndrome. *J Med Genet* 38:17-21.
- Borg I, Squire M, Menzel C, Stout K, Morgan D, Willatt L, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Ropers HH, Tommerup N, Kalscheuer VM, Sargan DR. (2002). A cryptic deletion of 2q35 including part of the PAX3 gene detected by breakpoint mapping in a child with autism and a de novo 2;8 translocation. *J Med Genet* 39: 391-9.

- Breen CJ, Barton L, Carey A, Dunlop A, Glancy M, Hall K, Hegarty AM, Khokhar MT, Power M, Ryan K, Green AJ, Stallings RL. (1999). Applications of comparative genomic hybridisation in constitutional chromosome studies. *J Med Genet* 36(7): 511-7.
- Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, FitzPatrick D. (1998). A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet* 63(4): 1153-9.
- Brondum-Nielsen K, Mikkelsen M. (1995). A 10-year survey, 1980-1990, of prenatally diagnosed small supernumerary marker chromosomes, identified by FISH analysis. Outcome and follow-up of 14 cases diagnosed in a series of 12,699 prenatal samples. *Prenat Diagn* 15(7): 615-9.
- Brondum-Nielsen K, Beck B, Gyftodimou J, Horlyk H, Liljenberg U, Petersen MB, Pedersen W, Petersen MB, Sand A, Skovby F, Stafanger G, Zetterqvist P, Tommerup N. (1997). Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphisms. *Hum Genet*. 99(1): 56-61.
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive chromosome. *Nature* 349(6304): 38-44.
- Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L. (2001). Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nature Med* 7: 497-501.
- Brown KW, Gardner A, Williams JC, Mott MG, McDermott A, Maitland NJ. (1992). Paternal origin of 11p15 duplications in the Beckwith-Wiedemann syndrome. A new case and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 58(1): 66-70.
- Browne CE, Dennis NR, Maher E, Long FL, Nicholson JC, Sillibourne J, Barber JC. (1997). Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61(6): 1342-52.
- Bruder CE, Hirvela C, Tapia-Paez I, Fransson I, Segraves R, Hamilton G, Zhang XX, Evans DG, Wallace AJ, Baser ME, Zucman-Rossi J, Hergersberg M, Boltshauser E, Papi L, Rouleau GA, Poptodorov G, Jordanova A, Rask-Andersen H, Kluwe L, Mautner V, Sainio M, Hung G, Mathiesen T, Moller C, Pulst SM, Harder H, Heiberg A, Honda M, Niimura M, Sahlen S, Blenow E, Albertson DG, Pinkel D, Dumanski JP. (2001). High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum Mol Genet* 1;10(3): 271-82.
- Brun JL, Gangbo F, Wen Z, Galant, Taine L, Maugey-Laulom B, Roux D, Mangione R, Horovitz J, Saura R. (2004). Prenatal diagnosis and management of sex chromosome aneuploidy: a report on 98 cases. *Pren. Diagn* 24: 213-8.
- Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. (1995). Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 57(5): 1211-20.
- Buckton KE, Spowart G, Newton MS, Evans HJ. (1985). Forty four probands with an additional "marker" chromosome. *Hum Genet* 69: 353-70.
- Butler MG, Fogo AB, Fuchs DA, Collins FS, Dev VG, Phillips JA. (1988). Two patients with ring chromosome 15 syndrome. *Am J Med Genet* 29(1):149-54.
- Callen DF, Mulley JC, Baker EG, Sutherland GR. (1987). Determining the origin of human X isochromosomes by use of DNA sequence polymorphisms and detection of an apparent i(Xq) with Xp sequences. *Hum Genet* 77(3): 236-40.
- Callen DF, Eyre H, Yip MY, Freemantle J, Haan EA. (1992). Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet* 43: 709-15.

- Callen DF, Eyre HJ, Ringenbergs ML, Freemantle CJ, Woodroffe P, Haan EA. (1992). Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics. *Am J Hum Genet* 48(4): 769-82.
- Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, Mutchinick OM, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns WB, Ledbetter DH.. (2003). Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet.* 72(4): 918-30.
- Carey JC, Viskochil DH. (2002). Status of the human malformation map: 2002. *Am J Med Genet* 115(4): 205-20.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. (1970). Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30: 215-227
- Cassidy SB. (1997). Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 34(11): 917-23.
- Chen CP, Devriendt K, Chern SR, Lee CC, Wang W, Lin SP. (2000). Prenatal diagnosis of inherited satellited nonacrocentric chromosome. *Prenat Diagn* 20: 384-9.
- Chen CP, Lee CC, Chang TY, Town DD, Wang W. (2004). Prenatal diagnosis of mosaic distal 5p deletion and review of the literature. *Prenat Diagn* 24(1): 50-7.
- 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. *Genome Biol* 4(4): R25.
- Cheung VG, Nowak N, Jang W, Kirsch IR, Zhao S, Chen XN, Furey TS, Kim UJ, Kuo WL, Olivier M, Conroy J, Kasprzyk A, Massa H, Yonescu R, Sait S, Thoreen C, Snijders A, Lemyre E, Bailey JA, Bruzel A, Burrill WD, Clegg SM, Collins S, Dhami P, Friedman C, Han CS, Herrick S, Lee J, Ligon AH, Lowry S, Morley M, Narasimhan S, Osoegawa K, Peng Z, Plajzer-Frick I, Quade BJ, Scott D, Sirotkin K, Thorpe AA, Gray JW, Hudson J, Pinkel D, Ried T, Rowen L, Shen-Ong GL, Strausberg RL, Birney E, Callen DF, Cheng JF, Cox DR, Doggett NA, Carter NP, Eichler EE, Haussler D, Korenberg JR, Morton CC, Albertson D, Schuler G, de Jong PJ, Trask BJ; BAC Resource Consortium. (2001). Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* 15; 409(6822): 953-8.
- Choo KH. (1997). Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet* 61: 1225-33.
- Chudoba I, Franke Y, Senger G, Sauerbrei G, Demuth S, Beensen V, Neumann A, Hansmann I, Claussen U. (1999). Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation. *Eur J Hum Genet* 7: 533-40.
- Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. (1999). High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84: 156-60.
- Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M. (1999). Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 19(12): 1099-103.
- Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, Lloveras E, Plaja A., Perez MM, Fuster C, Egozcue J. (2001). Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Repr* 7: 1001-6.
- Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, Adinolfi M. (2002). X chromosome dosage by Quantitative Fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Mol Hum Repr* 8: 1042-5.

- Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. (2004). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod* 10(11): 839-46.
- Clarkson B, Pavenski K, Dupuis L, Kennedy S, Meyn S, Nezarati MM, Nie G, Weksberg R, Withers S, Quercia N, Teebi AS, Teshima I. (2002). Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am J Med Genet* 107(4): 267-74.
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Starke H, Liehr T, Gutierrez-Mateo C, Sanchez-Garcia JF, Arango O, Egozcue J, Benet J. (2004). FISH characterization of a dicentric Yq (p11.32) isochromosome in an azoospermic male. *Am J Med Genet* 127A(3): 302-6.
- Cohen O, Cans C, Cuillel M, Gilardi JL, Roth H, Mermet MA, Jalbert P, Demongeot J. (1996). Cartographic study: breakpoints in 1574 families carrying human reciprocal translocations. *Hum Genet* 97(5): 659-67.
- Constancia M, Pickard B, Kelsey G, Reik W. (1998). Imprinting mechanisms. *genome res* 8: 881-900.
- Cook EH Jr, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E. (1997). Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* 60(4): 928-34.
- Cote GB, Katsantoni A, Deligeorgis D. (1981). The cytogenetic and clinical implications of a ring chromosome 2. *Ann Genet* 24(4): 231-5.
- Cotter PD, Ko E, Larabell SK, Rademaker AW, Martin RH. (2000). Segregation of a supernumerary del(15) marker chromosome in sperm. *Clin Genet* 58: 488-92.
- Courtens W, Speleman F, Messiaen I, Bormans J, Van Roy N, Vamos E. (1997). Interstitial deletion 2q33.3-q34 in a boy with a phenotype resembling the Seckel syndrome. *Am J Med Genet* 71: 479-85.
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. (1988). Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80: 235-46.
- Christ LA, Crowe CA, Micale MA, Conroy JM, Schwartz S. (1999). Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 65(5): 1387-95.
- Crolla JA, Howard P, Mitchell C, Long FL, Dennis NR. (1997). A molecular and FISH approach to determining karyotype and phenotype correlations in six patients with supernumerary marker (22) chromosomes. *Am J Med Genet* 72: 440-7.
- Crolla JA, Long F, Rivera H, Dennis NR. (1998). FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15 and 22: I. Results of 26 new cases. *Am J Med Genet* 75: 355-66.
- Crolla JA. (1998). FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am J Med Genet* 75(4): 367-81.
- Crolla JA, van Heyningen V. (2002). Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet* 71(5):1138-49.
- Daniel A, Malafiej P. (2003). A series of supernumerary small ring marker autosomes identified by FISH with chromosome probe arrays and literature review excluding chromosome 15. *Am J Med Genet A* 117(3): 212-22.

- De Braekeleer M. (1985). Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements. *Clin Genet* 27(5): 523-4.
- De Die-Smulders CE, Engelen JJ, Albrechts JC, Hamers GJ. (1999). Detection of a cryptic translocation t(13;20)(q34;p13) in an unexplained case of MCA/MR: value of FISH over high resolution banding. *Am J Med Genet* 86(4): 385-8.
- De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. (2003). Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 40(6): 385-98.
- DiGeorge AM. (1968). Birth Defects Orig. Art Ser IV (1):116-21.
- Djalali M, Steinbach P, Bullerdiek J, Holmes-Siedle M, Verschraegen-Spae MR, Smith A. (1986). The significance of pericentric inversions of chromosome 2. *Hum Genet* 72(1): 32-6.
- Drets ME, Shaw MW. (1971). Specific banding patterns in human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(9): 2073-7.
- Du Manoir S, Schrock E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T. (1995). Quantitative analysis of comparative genomic hybridisation. *Cytometry* 19(1): 27-41.
- Du Sart D, Cancilla MR, Earle E, Mao JI, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE, Choo KH. (1997). A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat Genet* 16(2): 144-53.
- Dupont C, Pipiras E, Chantoto-Bastaraud S, Verloes A, Baumann C, Wolf JP, Benzacken B. (2003). CGH and direct diagnosis of mosaic structural chromosomal abnormalities: description of a mosaic ring chromosome 17 and review of literature. *Eur J Hum Genet* 11(6): 452-6.
- Dutrillaux B, Lejeune J. (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C R Acad Sci (D)(Paris)* 272: 2638-40.
- Eggermann K, Mau UA, Bujdosó G, Koltai E, Engels H, Shubert R, Eggermann T, Raff R, Scwanitz G. (2002). Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. *Clin Genet* 62: 89-93.
- Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Satzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery J, Ganser M, Speicher MR. (1998). An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 82: 160-71.
- Engels H, Ehrbrecht A, Zahn S, Bosse K, Vrolijk H, White S, Kalscheuer V, Hoovers JM, Schwanitz G, Propping P, Tanke HJ, Wiegant J, Raap AK. (2003). Comprehensive analysis of human subtelomeres with combined binary ratio labelling fluorescence in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet* 11(9): 643-51.
- Ensenuer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM. (2003). Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 73(5): 1027-40.
- Erdel M, Duba HC, Verdorfer I, Lingenhel A, Geiger R, Gutenberger KH, Ludescher E, Utermann B, Utermann G. (1997). Comparative genomic hybridization reveals a partial de novo trisomy 6q23-qter in an infant with congenital malformations: delineation of the phenotype. *Hum Genet* 99(5): 596-601.
- Espinet B, Salido M, Pujol RM, Florensa L, Gallardo F, Domingo A, Servitje O, Estrach T, Garcia-Muret P, Woessner S, Serrano S, Sole F. (2004). Genetic

characterization of SÄ©zary's syndrome by conventional cytogenetics and cross-species color banding fluorescent in situ hybridization. *Haematologica* 89(2): 165-73.

- Estivill X, Cheung J, Pujana MA, Nakabayashi K, Scherer SW, Tsui LC. (2002). Chromosomal regions containing high-density and ambiguously mapped putative single nucleotide polymorphisms (SNPs) correlate with segmental duplications in the human genome. *Hum Mol Genet* 11(17): 1987-95.
- Fantes JA, Mewborn SK, Lese CM, Hedrick J, Brown RL, Dyomin V, Chaganti RS, Christian SL, Ledbetter DH. (2002). Organisation of the pericentromeric region of chromosome 15: at least four partial gene copies are amplified in patients with a proximal duplication of 15q. *J Med Genet* 39: 170-7
- Farrell SA, Summers AM, Gardner HA, Uchida IA. (1994). Balanced complex chromosome rearrangement ascertained through prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 52(3): 360-1.
- Fechtrup B, Kalhoff H, Diekmann L, Fritz B. (2000). Trisomy of the short arm of chromosome 10p; description of a female patient with de novo duplication 10p11.2-15. *Klin Padiatr* 212: 35-40.
- 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.
- Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. (1992). Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* 258: 1784-7.
- Fryns JP, Kleczkowska A, Van den Berghe H. (1985). Clinical manifestations of Y chromosome deletions. In the Y chromosome. Part B. Clinical aspects of Y chromosome abnormalities (Sandberg AA, ed), Alan R. Liss, New York, pp 151-70.
- Fukushima Y, Kuroki Y, Ito T. (1986). Balanced double complex translocations [46,XX,t(1p;6p;7p;3q;11p)(11q;22p;21q)] in an infant with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 25: 313-7.
- Fuster C, Miró R, Templado C, Barrios L, Egozcue J. (1989). Fragile sites and breakpoints in constitutional rearrangements and human sperm chromosomes. *Hum Genet* 82: 330-4.
- Fuster C, Míguez L, Miró R. (1997). Familial complex chromosome rearrangement ascertained by in situ hybridization. *J Med Genet* 34: 164-6.
- Fuster C, Rigola MA, Egozcue J. (2004). Human supernumeraries: are they B chromosomes?. *Cytogenet Genome Res* 106: 165-72.
- Gardner RJM, Sutherland GR. (1996). Chromosome abnormalities and genetic counselling. Oxford University Press, New York.
- Gentile M, Susca F, Resta N, Stella A, Cascone A, Guanti G. (1993). Infertility in carriers of two bisatellited marker chromosomes. *Clin Genet* (2): 71-5.
- George AM, Hallam L, Oei P, McGaughan J. (2002). Prenatal diagnosis of partial tetrasomy 14: a case study. *Prenat Diagn* 22(2): 127-30.
- Gersen SL, Keagle MB. (1999). The principles of clinical cytogenetics. Human Press.
- Ghaffari SR, Boyd E, Connor JM, Jones AM, Tolmie JL. (1998). Mosaic supernumerary ring chromosome 19 identified by comparative genomic hybridisation. *J Med Genet*. 35(10): 836-40.
- Glover TW. (1998). Instability at chromosomal fragile sites. *Recent Results Cancer Res* 154: 185-99.

- Granzow M, Popp S, Keller M, Holtgreve-Grez H, Brough M, Schoell B, Rauterberg-Ruland I, Hager HD, Tariverdian G, Jauch A. (2000). Multiplex FISH telomere integrity assay identifies an unbalanced cryptic translocation der(5)t(3;5)(q27;p15.3) in a family with three mentally retarded individuals. *Hum Genet* 107(1): 51-7.
- Gravholt CH, Friedrich U. (1995). Molecular cytogenetic study of supernumerary marker chromosomes in an unselected group of children. *Am J Med Genet* 56(1): 106-11.
- Gray JW, Collins C. (2000). Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 21(3): 443-52.
- Greenberg F, Lewis RA, Potocki L, Glaze D, Parke J, Killian J, Murphy MA, Williamson D, Brown F, Dutton R, McCluggage C, Friedman E, Sulek M, Lupski JR. (1996). Multi-disciplinary clinical study of Smith-Magenis syndrome (deletion 17p11.2). *Am J Med Genet* 62(3): 247-54.
- Grimbacher B, Dutra AS, Holland SM, Fischer RE, Pao M, Gallin JI, Puck JM. (1999). Analphoid marker chromosome in a patient with hyper-IgE syndrome, autism, and mild mental retardation. *Genet Med* 1(5): 213-8.
- Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Morizio E, Fantasia D, Colosimo A, Rinaldi MM, Cristini L, Simonelli A, Lonardo F, Turci A, Zatterale A, Lagana C, Stuppia L, Sabatino G, Palka G. (2004). Identification of 14 rare marker chromosomes and derivatives by spectral karyotyping in prenatal and postnatal diagnosis. *Am J Med Genet* 127A(2): 144-8.
- Guerrini R, Carrozzo R, Rinaldi R, Bonanni P. (2003). Angelman syndrome: etiology, clinical features, diagnosis, and management of symptoms. *Paediatr drugs* 5: 647-61.
- Guze C, Qin N, Kelly J, Yang X, Bruni R, Baker D, Hassan R. (2004). Isochromosome 22 in trisomy 22 mosaic with five cell lines. *Am J Med Genet* 124(1): 79-84.
- Haddad BR, Schrock E, Meck J, Cowan J, Young H, Ferguson-Smith MA, du Manoir S, Ried T. (1998). Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum Genet* 103(5): 619-25.
- Hall JG. (1990). Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet*. 1990 May;46(5): 857-73.
- Harada N, Shimokawa O, Nagai T, Kato R, Kondoh T, Niikawa N, Matsumoto N. (2002). A 4-Mb critical region for intrauterine growth retardation at 15q26. *Clin Genet* 62: 340-2.
- Harbison M, Hassold T, Kobryn C, Jacobs PA. (1988). Molecular studies of the parental origin and nature of human X isochromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 47(4): 217-22.
- Hastings RJ, Nisbet DL, Waters K, Spencer T, Chitty LS. (1999). Prenatal detection of extra structurally abnormal chromosomes (ESACs): new cases and a review of the literature. *Prenat Diagn* 19(5): 436-45.
- Hecht F, Hecht BK. (1984). Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements. I. Amniocentesis. *Clin Genet* 26: 169-73.
- Henegariu O, Bray-Ward P, Artan S, Vance GH, Qumsyieh M, Ward DC. (2001). Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex fish (CM-FISH). *Lab Invest* 81(4): 475-81.
- Henegariu O, Artan S, Grealley JM, Chen XN, Korenberg JR, Vance GH, Stubbs L, Bray-Ward P, Ward DC. (2001b). Cryptic translocation identification in human and mouse using several telomeric multiplex fish (TM-FISH) strategies. *Lab Invest* 81(4): 483-91.

- Hernando C, Carrera M, Ribas I, Parera N, Baraibar R, Egozcue J, Fuster C. (2002). Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis. *Prenat Diagn* 22(9) :802-5.
- Hills LV, Nouri S, Slater HR. (2003). Pericentromeric euchromatin is conserved in minute human supernumerary chromosomes: a study using cross-species colour segmenting (RxFISH). *Chromosome res* 11(4): 359-63.
- Holinski-Feder E, Reyniers E, Uhrig S, Golla A, Wauters J, Kroisel P, Bossuyt P, Rost I, Jedele K, Zierler H, Schwab S, Wildenauer D, Speicher MR, Willems PJ, Meitinger T, Kooy RF. (2000). Familial mental retardation syndrome ATR-16 due to an inherited cryptic subtelomeric translocation, t(3;16)(q29;p13.3). *Am J Hum Genet* 66(1): 16-25.
- Hook EB, Cross PK. (1987). Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC) detected at amniocentesis: frequency in approximately 75,000 prenatal cytogenetic diagnoses and associations with maternal and paternal age. *Am J Hum Genet* 40(2): 83-101.
- Hou JW. (2003). Del (9p) syndrome: report of four cases. *Acta Paediatr Taiwan* 44(1): 50-3.
- Houge G, Liehr T, Schoumans J, Ness GO, Solland K, Starke H, Claussen U, Stromme P, Akre B, Vermeulen S. (2003). Ten years follow up of a boy with complex chromosomal rearrangement: gain+g from a >5 to 15-breakpoint CCR. *Am J Med Genet* ;118A: 235-40.
- Hsu LY. (1989). Prenatal diagnosis of 45,X/46,XY mosaicism-a review and update. *Prenat diagn* 9: 31-48.
- Hsu, TC and Pomerat CM. (1953). Mammalian chromosomes in vitro. II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *J Hered* 44: 23-29.
- Hsu LY. (1994). Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53(2): 108-40.
- Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. (1994). Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145(6): 1301-8.
- Jabs EW, Wolf SF, Migeon BR. (1984). Characterization of a cloned DNA sequence that is present at centromeres of all human autosomes and the X chromosome and shows polymorphic variation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 4882-8.
- Jalal SM, Law ME. (1999) Utility of multicolor fluorescent in situ hybridization in clinical cytogenetics. *Genet Med* 1(5): 181-6.
- Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenaer R, Anderson MH Jr, Michels VV. (2003). Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 5(1): 28-34.
- James LA. (1999). Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol* 187(4): 385-95.
- Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P. (1993). Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* 90(6): 584-9.
- Kaiser-Rogers KA, Rao KW, Michaelis RC, Lese CM, Powell CM. (2000) Usefulness and limitations of FISH to characterize partially cryptic complex chromosome rearrangements. *Am J Med Genet* 95: 28-35.

- 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* 258(5083): 818-21.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. (1994). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10(4): 231-43.
- Karhu R, Ahlstedt-Soini M, Bittner M, Meltzer P, Trent JM, Isola JJ. (2001). Chromosome arm-specific multicolor FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 30(1): 105-9.
- Kasprzak L, Der Kaloustian VM, Elliott AM, Shevell M, Lejtenyi C, Eydoux P. (1998). Deletion of 22q11 in two brothers with different phenotype. *Am J Med Genet* 23;75(3): 288-91.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. (1998) Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 31: 163-73.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, Lundsteen C. (1999). Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 25(4): 410-3.
- Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Bugge M, Tommerup N, Tumer Z, Lespinasse J, Jensen PK, Wirth J, Lundsteen C. (2000). High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. *Eur J Hum Genet* 8: 661-8.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. (2001). High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38(11): 740-4.
- Kirchhoff M, P. S., Kjeldsen E, Rose H, Duno M, Kolvraa S, Lundsteen C. (2004). Prospective study comparing HR-CGH and subtelomeric FISH for investigation of individuals with mental retardation and dysmorphic features and an update of a study using only HR-CGH. *Am J Med Genet* 127A: 111-7.
- Kirsch S, Weiss B, De Rosa M, Ogata T, Lombardi G, Rappold GA.. (2000). FISH deletion mapping defines a single location for the Y chromosome stature gene, GCY. *J Med Genet* 37: 593-9.
- Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Paz G, Yavetz H. (2001). The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum Reprod* 16: 399-409.
- Kline AD, Griffin CA, Haddadin MH, Chudoba I, Morsberger LA, Hawkins AL, Amato RS, Munshi G, Cohen MM. (2004). A de novo complex karyotype with two independent balanced translocations and a double inversion of chromosome 6 presenting with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 129A(2): 124-9.
- Knight SJ, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DL, Flint J, Kearney L. (1997). Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 5(1): 1-8.
- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. (1999). Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation (see comments). *Lancet* 354: 1676-81.
- Knight SJ, Flint J. (2000). Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37(6): 401-9.
- Kosztolanyi G. (1987). Does "ring chromosome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 75: 174-9.

- Kotzot D, Holland H, Kohler M, Froster UG. (2001). A complex chromosome rearrangement involving chromosome 8, 11, and 12 analyzed by conventional cytogenetic investigations, fluorescence in situ hybridisation, and spectral karyotyping. *Ann Genet* 44: 135-8.
- Kotzot D. (2002). Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. *Am J Med Genet* 111: 366-75.
- Kraus J, C. M., Speicher MR. (2003). Multicolour FISH fine mapping unravels an insertion as a complex chromosomal rearrangement involving six breakpoints and a 5.89 Mb large deletion. *J Med Genet* 40(5): e60.
- Lacombe D, Saura R, Taine L, Battin J. (1992). Confirmation of assignment of a locus for Rubinstein-Taybi syndrome gene to 16p13.3. *Am J Med Genet.* 44(1): 126-8.
- Langer S, Fauth C, Rocchi M, Murken J, Speicher MR. (2001). AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. *Hum Genet* 109(2): 152-8.
- Langer LO Jr, Krassikoff N, Laxova R, Scheer-Williams M, Lutter LD, Gorlin RJ, Jennings CG, Day DW. (1984). The tricho-rhino-phalangeal syndrome with exostoses (or Langer-Giedion syndrome): four additional patients without mental retardation and review of the literature. *Am J Med Genet* 19(1): 81-112.
- Ledbetter DH, Ballabio A. (1995). Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: mechanisms and consequences of gene dosage imbalances. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th edition (Scriver CR, Beaudet A, Sly W, Valle D. eds.), McGraw Hill, New York, pp. 811-93.
- Ledbetter DH, Engel E. (1995). Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet* 4 Spec No: 1757-64.
- Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC. (2001). Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 68: 1043-7.
- Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatta J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. (1963). Trois cas de deletion partielle du bras court d'un chromosome 5. *C. R. Acad.Sci. (Paris)* 257: 3098.
- Lerer I, Meiner V, Pashut-Lavon I, Abeliovich D. (1994). Molecular diagnosis of Prader-Willi syndrome: parent-of-origin dependent methylation sites and non-isotopic detection of (CA)_n dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Med Genet* 52(1): 79-84.
- Lespinasse J, Bugge M, Kirchhoff M, Rethoré MO, North MO, Lundsteen C. (2004). De novo complex chromosomal rearrangements (CCR) involving chromosome 1, 5 and 6 resulting in a microdeletion for 6q14 in a female carrier with a psychotic disorder. *Am J Med Genet* 128 (2): 199-203.
- Lespinasse J, Rethoré MO, North MO, Bovier-Lapierre M, Lundsteen C, Fert-Ferrer S, Bugge M, Kirchhoff M. (2004). Balanced complex chromosomal rearrangements (BCCR) with at least three chromosomes and three or more breakpoints: report of three new cases. *Ann Genet* 47: 315-24.
- Lestou VS, Lomax BL, Barrett IJ, Kalousek DK. (1999). Screening of human placentas for chromosomal mosaicism using comparative genomic hybridization. *Teratology* 59(5): 325-30.
- Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K.. (1998). Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet Med* 1(1): 4-12.
- Levy B, Papenhausen P, Tepperberg J, Dunn T, Fallet S, Magid M, Kardon N, Hirschhorn K, Warburton P. (2000). Prenatal molecular cytogenetic diagnosis of partial

- tetrasomy 10p due to neocentromere formation in an inversion duplication analphoid marker chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 91(1-4): 165-70.
- Levy B, Jalal SM, Dunn TM, Warburton PE, Tonk VS, Hirschhorn K, Lockhart LH, Hughes T, Velagaleti GV. (2002). Unique case of mosaicism involving two morphologically similar marker chromosomes of different centric origin in a patient with developmental delay. *Am J Med Genet* 108(3): 198-204.
 - L'Hermine AC, Aboura A, Simon-Bouy B, Robin F, Audibert F, Strouk N, Capron F, Frydman R, Tachdjian G. (2002). Female pseudohermaphroditism in a fetus with a deletion 9(q22.2q31.1). *Prenat Diagn* 22: 652-5.
 - L'Hermine AC, Aboura A, Brisset S, Cuisset L, Castaigne V, Labrune P, Frydman R, Tachdjian G. (2003). Fetal phenotype of Prader-Willi syndrome due to maternal disomy for chromosome 15. *Prenat Diagn.* 23(11): 938-43.
 - Li E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3: 662-73.
 - Liehr T, Starke H. (2004). Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* 107: 55-67.
 - Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U. (2004b). Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol* 19: 229-37.
 - Lomax BL, Lestou VS, Barrett IJ, Kalousek DK. (1998). Confined placental mosaicism for chromosome 7 detected by comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 18: 752-4.
 - Loscalzo ML, Galczynski RL, Hamosh A, Summar M, Chinsky JM, Thomas GH. (2004). Interstitial deletion of chromosome 2q32-34 associated with multiple congenital anomalies and a urea cycle defect (CPS I deficiency). *Am J Med genet* 128A: 311-5.
 - Ludecke HJ, Schmidt O, Nardmann J, von Holtum D, Meinecke P, Muenke M, Horsthemke B. (1999). Genes and chromosomal breakpoints in the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8. *Hum Genet* 105(6): 619-28.
 - Ludowese CJ, Thompson KJ, Sekhon GS, Pauli RM. (1991). Absence of predictable phenotypic expression in proximal 15q duplications. *Clin Genet* 40: 194-201.
 - Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI. (1992). Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1(1): 29-33.
 - Lurie, IW, Wulfsberg EA, Prabhakar G, Rosenblum-Vos LS, Supovitz KR, Cohen MM. (1994) Complex chromosomal rearrangements: some breakpoints may have cellular adaptive significance. *Clin Genet* 46: 244-7.
 - Ma K, Mallidis C, Bhasin S. (2000). The role of Y chromosome deletions in male infertility. *Eur J Endocrinol* 142:418-30.
 - Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, Guichaoua M, Metzler-Guillemain C, Collignon P, Frances AM, Belougne J, Clemente E, Chiaroni J, Chevillard C, Durand C, Ducourneau A, Pech N, McElreavey K, Mattei MG, Mitchell MJ. (2004). Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet* 41(11): 814-25.
 - Madan K, Menko FH. (1992). Intrachromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet* 89(1): 1-9.
 - Madan K, Nieuwint AW, Van Bever Y. (1997). Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet* 99: 806-15.

- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JA, Jeffreys AJ, Pembrey ME. (1991). Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* 337(8743): 694-7.
- Manenti E. (1992). Two extra inv dup (15) chromosomes and male infertility: Second case. *Am J Med Genet* 42(3): 402-3.
- Mansfield ES. (1993). Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 2: 43-50.
- Mantripragada KK, Tapia-Paez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP. (2004). DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *Int J Mol Med* 13(2): 273-9.
- Maraia R, Saal HM, Wangsa D. (1991). Laboratory of Molecular Growth Regulation, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, Maryland. *Clin Genet* 39(6): 401-8.
- Marchina E, Piovani G, Vezzola L, Bellotti D, Cerri V, Groli C, Barlati S. (2003). Molecular and cytogenetic characterization of extra-structurally abnormal chromosomes (ESACs) found prenatally: outcome and follow-up. *Prenat Diagn* 23(12):959-63.
- Markovic S, Krstic M, Sulovic V, Radojkovic Z, Adzic S. (1985). Interstitial deletion of chromosome 2. *J Med Genet* 22: 154-5.
- Martin- Lucas MA, Perez-Castillo A, Abrisqueta JA. (1986). Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes. *Hum Genet* 73: 320-6.
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Armour JA, Jeffreys AJ, Ladda RL, Nicholls RD. (1992). The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med* 326(24): 1599-607.
- Matsui SI, Sasaki M. (1973). Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. *Nature* 246: 148-50.
- Matsuyama A, Croce CM, Huebner K. (2004). Common fragile genes. *Eur J Histochem* 48(1): 29-36.
- McNerlan SE, Morrison PJ, McClure N, Nevin NC. (2003). A supernumerary chromosome 20, identified by FISH, in a male with azoospermia – Cause or coincidence? *Am J Med Genet* 117A: 188-90.
- Miller JQ. (1963). Lissencephaly In 2 Siblings. *Neurology* 13: 841-50.
- Miller RW. (1964). Association Of Wilms's Tumor With Aniridia, Hemihypertrophy And Other Congenital Malformations. *New Eng J Med* 270: 922-7.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3): 1215.
- Milunsky JM, Huang XL. (2003). Unmasking Kabuki syndrome: chromosome 8p22-8p23.1 duplication revealed by comparative genomic hybridization and BAC-FISH. *Clin Genet* 64: 509-16.
- Moog U, Encelen JJM, de Die-Smulders CEM, Albrechts JCM, Loneus WH, Haagen AAM, Raven EJM, Hamers AJH. (1994). Partial trisomy of the short arm of chromosome 18 due to an inversion duplication and direct duplication. *Clin Genet* 46: 423-9.
- Moore DH, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW. (1997). A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 28: 183-90.

- Moore KL, and Barr ML. (1954). Nuclear morphology, according to sex, in human tissues. *Acta Anat* 21: 197-208.
- Moore T, Haig D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 7(2): 45-9.
- Muller S, O'Brien PMC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J. (1998). Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33: 445-52.
- Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T, Sakuta R, Niikawa N. (2002). Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): dosage effect of IGF1R?. *Am J Med Genet* 113: 173-7.
- Ness GO, Lybaek H, Houge G. (2002). Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 113(2): 125-36.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M. (1989). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 342(6247): 281-5.
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T. (2001). A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108(3): 199-204.
- Nietzel A, Albrecht B, Starke H, Heller A, Gillessen-Kaesbach G, Claussen U, Liehr T. (2003). Partial hexasomy 15pter-->15q13 including SNRPN and D15S10: first molecular cytogenetically proven case report. *J Med Genet* 40 E28: 1-4.
- Ning Y, Laundon CH, Schrock E, Buchanan P, Ried T. (1999). Prenatal diagnosis of a mosaic extra structurally abnormal chromosome by spectral karyotyping. *Prenat Diagn* 19(5): 480-2.
- Nuutinen M, Kouvalainen K, Knip M. (1995). Good growth response to growth hormone treatment in the ring chromosome 15 syndrome. *Med Genet* 32(6): 486-7.
- Ohashi H, Wakui K, Ogawa K, Okano T, Niikawa N, Fukushima Y. (1994). A stable acentric marker chromosome: possible existence of an intercalary ancient centromere at distal 8p. *Am J Hum Genet* 55(6): 1202-8.
- Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR. (1980). Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet* 18(6):436-4.
- Paoloni-Giacobino A, Morris MA, Dahoun SP. (1998). Prenatal supernumerary r(16) chromosome characterized by multiprobe FISH with normal pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 18(7): 751-2.
- Pérez MM, Miguez L, Fuster C, Miro R, Genesca A, Egozcue J. (1991). Heterochromatin decondensation in chromosomes from chorionic villus samples. *Prenat Diagn* 11(9): 697-704.
- Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, Winter R, Kroisel P, Adinolfi M. (1999). Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* 5: 1176-9.
- Pettenati MJ, Rao PN, Weaver RG Jr, Thomas IT, McMahan MR. (1993) Inversion (X)(p11.4q22) associated with Norrie disease in a four generation family. *Am J Med Genet* 45(5): 577-80.
- 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(2): 207-11.

- Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V, Summers AM, Meschino WS, Anyane-Yeboa K, Kashork CD, Shaffer LG, Lupski JR. (2000). Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 24(1): 84-7.
- Prader A, Labhart A, Willi H. (1956). *Schweiz. Med. Wschr.* 86: 1260-1.
- Queisser-Luft A, Stolz G, Wiesel A, Schlaefter K, Spranger J. (2002). Malformations in newborn: results based on 30,940 infants and fetuses from the Mainz congenital birth defect monitoring system (1990-1998). *Arch Gynecol Obstet* 266: 163-7.
- Qumsiyeh MB, Rafi SK, Sarri C, Grigoriadou M, Gyftodimou J, Pandelia E, Laskari H, Petersen MB. (2003). Double supernumerary isodicentric chromosomes derived from 15 resulting in partial hexasomy. *Am J Med Genet* 116(4): 356-9.
- Rappold GA. (1993). The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 92(4): 315-24.
- Rauch A, Pfeiffer RA, Trautmann U, Liehr T, Rott HD, Ulmer R. (1992). A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Clin Genet* 42: 84-90.
- Reddy KS, Sulcova V. (1998) The mobile nature of acrocentric elements illustrated by three unusual chromosome variants. *Hum Genet* 102:653-62.
- Reichenbach H, Holland H, Dalitz E, Demandt C, Meiner A, Chudoba I, Lemke J, Claussen U, Froster UG. (1999). De novo complete trisomy 5p: clinical report and FISH studies. *Am J Med Genet* 85(5): 447-51.
- Rigola MA, Carrera M, Ribas I, De La Iglesia C, Mendez B, Egozcue J, Fuster C. (2001). Identification of two de novo partial trisomies by comparative genomic hybridization. *Clin Genet* 59(2):106-10.
- Rigola MA, Carrera M, Ribas I, Egozcue J, Miro R, Fuster C. (2002). A comparative genomic hybridization study in a 46,XX male. *Fertil Steril* 78(1): 186-8.
- Rizzu P, Baldini A. (1994). Subchromosomal band interval mapping and ordering of DNA markers in the region 3q26.3-q27 involved in the dup(3q) syndrome. *Genomics* 24(3): 580-2.
- Robinson WP, Binkert F, Gine R, Vazquez C, Muller W, Rosenkranz W, Schinzel A. (1993). Clinical and molecular analysis of five inv dup(15) patients. *Eur J Hum Genet* 1: 37-50.
- Robinson WP, Bernasconi F, Basaran S, Yuksel-Apak M, Neri G, Serville F, Balicek P, Haluza R, Farah LM, Luleci G, et al.. (1994). A somatic origin of homologous Robertsonian translocations and isochromosomes. *Am J Hum Genet* 54(2): 290-302.
- Rodriguez MT, Martin MJ, Abrisqueta JA.. (1985). A complex balanced rearrangement involving four chromosomes in an azoospermic man. *J Med Genet* 22: 66-7.
- Rodríguez-Revinga L, Badenas C, Sánchez A, Mallolas J, Carrió A, Pedrinaci S, Barrionuevo JL, Milá M. (2004). Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 65(1): 17-23.
- Rogan PK, Seip JR, Driscoll DJ, Papenhausen PR, Johnson VP, Raskin S, Woodawd AL, Butler MG. (1996). Distinct 15q genotypes in Russell-Silver and Ring 15 syndromes. *Am J Med Genet* 62: 10-5.
- Rothlisberger B, Kotzot D, Brecevic L, Koehler M, Balmer D, Binkert F, Schinzel A. (1999). Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a

- balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. *Eur J Hum Genet* 7: 873-83.
- Rubinstein Jh, Taybi H. (1963). Broad thumbs and toes and facial abnormalities. A possible mental retardation syndrome. *Am J Dis Child* 105: 588-608.
 - Ruiz C, Grubs RE, Jewett T, Cox-Jones K, Abruzzese E, Pettenati MJ, Rao PN. (1996). Prenatally diagnosed de novo apparently balanced complex chromosome rearrangements: Two new cases and review of the literature. *Am J Med Genet* 64: 478-84.
 - Saadallah N, Hulten M. (1985). A complex three breakpoint translocation involving chromosomes 2, 4, and 9 identified by meiotic investigations of a human male ascertained for subfertility. *Hum genet* 71: 312-20.
 - Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G. (1992). The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4913-7.
 - Sachs ES, Van Hemel JO, Den Hollander JC, Jahoda MGJ. (1987). Marker chromosomes in series of 1000 prenatal diagnosis. Cytogenetic and follow-up studies. *Prenat Diagn* 7: 81-9.
 - Salafsky IS, MacGregor SN, Claussen U, von Eggeling F. (2001). Maternal UPD 20 in an infant from a pregnancy with mosaic trisomy 20. *Prenat Diagn* 21: 860-63.
 - Salman M, J. S., Ostrer H (2004). Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics?. *Clin Genet* 66: 265-75.
 - Santos M, Triviño E, Guitart M, Fuster C, Coll MD. (2002). CGH analysis of retinoblastoma tumors. 8th European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of human solid tumors. Barcelona.
 - Savage JRK (1977). Assignment of aberration breakpoints in banded chromosomes. *Nature* 270: 513-4.
 - Schinzel A. (2001). Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd ed. Berlin; de Gruyter, : New York
 - Schinzel A, Niedrist D. (2001). Chromosome imbalances associated with epilepsy. *Am J Med Genet* 106: 119-24.
 - Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273 (5274): 494-7.
 - Senger G, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brondum-Nielsen K. (1997). Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenat Diagn* 17(4): 369-74.
 - Shaffer LG, Agan N, Goldberg JD, Ledbetter DH, Longshore JW, Cassidy SB. (2001). American College of Medical Genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med* 3: 206-11.
 - Shaffer, LG, Bejjani BA. (2004). A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 10(3): 221-6.
 - Shaw CJ, Stankiewicz P, Christodoulou J, Smith E, Jones K, Lupski JR. (2004). A girl with duplication 17p10-p12 associated with a dicentric chromosome. *Am J Med Genet A* 124(2): 173-8.
 - Sikkema-Raddatz B, Sijmons RH, Tan-Sindhunata MB, van der Veen AY, Brunsting R, de Vries B, Beekhuis JR, Bekedam DJ, van Aken B, de Jong B. (1995). Prenatal

- diagnosis in two cases of de novo complex balanced chromosomal rearrangements. Three-year follow-up in one case. *Prenat Diagn* 15: 467-73.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-4.
 - Smith AC, McGavran L, Robinson J, Waldstein G, Macfarlane J, Zonona J, Reiss J, Lahr M, Allen L, Magenis E. (1986). Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am J Med Genet* 24(3): 393-414.
 - Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. (2001). Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29(3): 263-4.
 - 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 and Cancer* 20: 399-407.
 - Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12(4): 368-75.
 - Spinner NB, Zackai E, Cheng SD, Knoll JH. (1995). Supernumerary inv dup(15) in a patient with Angelman syndrome and a deletion of 15q11-q13. *Am J Med Genet* 57: 61-5.
 - Stankiewicz P, Brozek I, Helias-Rodzewicz Z, Wierzba J, Pilch J, Bocian E, Balcerska A, Wozniak A, Kardas I, Wirth J, Mazurczak T, Limon J. (2001). Clinical and molecular-cytogenetic studies in seven patients with ring chromosome 18. *Am J Med Genet* 101(3): 226-39.
 - Starke H, Schreyer I, Kahler C, Fiedler W, Beensen V, Heller A, Nietzel A, Claussen U, Liehr T. (1999). Molecular cytogenetic characterization of a prenatally detected supernumerary minute marker chromosome 8. *Prenat Diagn* 19:1169-74.
 - Starke H, Senger G, Kossakiewicz M, Tittelbach H, Rau D, Rubtsov N, Trifonov V, Heller A, Hartmann I, Claussen U, Liehr T. (2001). Maternal insertion of 18q11.2-q12.2 in 18p11.3 of the same chromosome analysed by microdissection and multicolour banding (MCB). *Prenat Diagn* 21(12): 1049-52.
 - Starke H, Mitulla B, Nietzel A, Heller A, Beensen V, Grosswendt G, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. (2003). First patient with trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(:p11 --> q11:) plus partial uniparental disomy 4p15-16. *Am J Med Genet* 116A(1): 26-30.
 - Starke H, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner R, Seidel J, Schimdt A, Kuechhler A, Schreyer I, Claussen U, Von Eggeling F, Liehr T. (2003b). Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 114: 51-67.
 - Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 21(6): 577-81.
 - Summitt RL, Tipton RE, Wilroy RS Jr, Martens PR, Phelan JP. (1978). X-autosome translocations: a review. *Birth Defects Orig Artic Ser* 14: 219-47.
 - Sumner AT. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304-6.

- Sumption ND, Barber JC. (2001). A transmitted deletion of 2q13 to 2q14.1 causes no phenotypic abnormalities. *J Med Genet* 38: 125-7.
- Sutherland GR, Baker E. (2000). The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. *Clin Genet*. 58(3): 157-61.
- Swansbury J. (2003). Introduction to the analysis of the human G-banded karyotype. *Methods Mol Biol* 220: 259-69.
- Tabet AC, Gosset P, Elghezal H, Fontaine S, Martinovic J, Encha Razavi F, Romana S, Vekemans M, Morichon-Delvallez N. (2004). Prenatal diagnosis and characterization of an anaphoid marker chromosome 16. *Prenat diagn* 24: 733-6.
- Tachdjian G, Aboura A, Lapierre JM, Viguie F. (2000). Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Ann Genet* 43(3-4):147-54.
- Tamagaki A, Shima M, Tomita R, Okumura M, Shibata M, Morichika S, Kurahashi H, Giddings JC, Yoshioka A, Yokobayashi Y. (2000). Segregation of a pure forms of spastic paraplegia and NOR insertion into Xq11.2. *Am J Med Genet* 94: 5-8.
- Tanaka K, Kamada N, Ohkita T, Kumamoto A. (1983). Non random distribution of chromosome breaks in lymphocytes of atomic bomb survivors. *J Radiat Res* 24: 291-304.
- Tharapel AT, Anderson KP, Simpson JL, Martens PR, Wilroy RS Jr, Llerena JC Jr, Schwartz CE. (1993). Deletion (X)(q26.1-->q28) in a proband and her mother: molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions. *Am J Hum Genet* 52: 463-71.
- Therman E, Laxova R, Susman B. (1990). The critical region on the human Xq. *Hum Genet* 85: 455-61.
- Tommerup N. (1993). Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet* 30(9): 713-27.
- Tyson C, McGillivray B, Chijiwa C, Rajcan-Separovic E. (2004). Elucidation of a cryptic interstitial 7q31.3 deletion in a patient with a language disorder and mild mental retardation by array-CGH. *Am J Med Genet* 129A(3): 254-60.
- Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Muller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR. (1999). Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 65: 448-62.
- Urioste M, Visedo G, Sanchís C, Villa A, Ludeña P, Hortigüela JL, Martínez-Friáz ML, Fernández-Piqueras J. (1994). Dynamic mosaicism involving an instable supernumerary der(22) chromosome in cat eye síndrome. *Am J Med Genet* 49: 77-82.
- Van Hemel JO, Eussen HJ. (2000). Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet* 107: 415-32.
- Van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM. (2002). Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 39: 546-53.
- Veltman JA, Vissers L, de Vries BBA, Janssen I, Huys E, van der Vliet W, Stratman H, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, de Jong P, Brunner H, Geurts van Kessel A, Schoenmakers EFPM. (2003). High resolution whole genome microdeletion screening by arrayCGH. *Eur J Hum Genet* 11(suppl) :C45.
- Vermeulen, S. M. B., Van Roy N, Van Limbergen H, De Paepe A, Mortier G, Speleman F. (2004). Molecular cytogenetic analysis of complex chromosomal rearrangement in patients with mental retardation and congenital malformations: delineation of 7q21.11 breakpoints. *Am J Med Genet* 124A: 10-8.

- Viersbach R, Engels H, Gamerding U, Hansmann M. (1998). Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients. *Am J Med Genet* 76(4): 351-8.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. (2003). Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73: 1261-70.
- Von Eggeling F, Hoppe C, Bartz U, Starke H, Houge G, Claussen U, Ernst G, Kotzot D, Liehr T. (2002). Maternal uniparental disomy 12 in a healthy girl with a 47,XX,+der(12)(p11-->q11:)/46,XX karyotype. *J Med Genet* 39: 519-21.
- Voullaire L, Saffery R, Davies J, Earle E, Kalitsis P, Slater H, Irvine DV, Choo KH. (1999). Trisomy 20p resulting from inverted duplication and neocentromere formation. *Am J Med Genet* 85(4): 403-8.
- Voullaire LE, Slater HR, Petrovic V, Choo KH. (1993). A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere?. *Am J Hum Genet* 52(6): 1153-63.
- Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, Sitska M, Utermann B, Viertel P, Kalscheuer V, Bartsch O. (2004). Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet* 128a(4): 364-73
- Wandstrat AE, Schwartz S. (2000). Isolation and molecular analysis of inv dup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. *Chromosoma* 109(7): 498-505.
- Warburton D. (1984). Outcome of cases of de novo structural rearrangements diagnosed at amniocentesis. *Prenat Diagn* 4: 69-80.
- 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.
- Warburton, PE. (2004). Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Res* 12(6): 617-6.
- Webb T, Hardy CA, King M, Watkiss E, Mitchell C, Cole T. (1998). A clinical, cytogenetic and molecular study of ten probands with supernumerary inv dup (15) marker chromosomes. *Clin Genet* 53(1): 34-43.
- Weber FM, Dooley RR, Sparkes RS. (1970). Anal atresia, eye anomalies, and an additional small abnormal acrocentric chromosome (47,XX,mar+): report of a case. *J Pediatr* 76(4): 594-7.
- Weise A, Starke H, Heller A, Tonnies H, Volleth M, Stumm M, Gabriele S, Nietzel A, Claussen U, Liehr T. (2002). Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterised by high resolution multicolour banding and region specific FISH probes. *J Med Genet* 39:434-9.
- Wiley S, Swayne S, Rubinstein JH, Lanphear NE, Stevens CA. (2003). Rubinstein-Taybi syndrome medical guidelines. *Am J Med Genet* 119A(2): 101-10.
- Wilkinson DG. (1999). *In situ hybridization, a practical approach*. 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford.
- Wilson GN, Sauder SE, Bush M, Beitins IZ. (1985). Phenotypic delineation of ring chromosome 15 and Russel-Silver syndromes. *J Med Genet* 22(3): 233-6.

- Yamagishi H, Srivastava D. (2003). Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome. *Trends Mol Med* 9(9): 383-9.
- Yaron Y, Carmon E, Goldstein M, Voskoboinik N, Ochshorn Y, Gelman-Kohan Z, Orr-Urtreger A. (2003). The clinical application of spectral karyotyping (SKY trade mark) in the analysis of prenatally diagnosed extra structurally abnormal chromosomes (ESACs). *Prenat Diagn* 23(1): 74-9.
- Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG. (2003). Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol* 12(17): 2145-52.
- Zang L, Lu H, Chung W, Yang J, Li W. (2004). Patterns of segmental duplication in the human genome. *Mol Bio Evol* (in press).

Anexo I

ARTÍCULO 1.

Hernando C, Plaja A, Rigola MA, Pérez MM, Vendrell T, Egozcue J, Fuster C.

”Comparative genomic hybridisation shows a partial *de novo* deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations”

Journal of Medical Genetics 2002; 39:vol. 5:24-26. ISSN 1468-6244

ELECTRONIC LETTER

Comparative genomic hybridisation shows a partial de novo deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations

C Hernando, A Plaja, M A Rigola, M M Pérez, T Vendrell, J Egocue, C Fuster

J Med Genet 2002;39:e24 (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/39/5/e24>)

Chromosome alterations, including numerical and structural chromosome rearrangements, are implicated in abnormal fetal development and congenital malformations. At least 50% of all first trimester spontaneous abortions are cytogenetically abnormal and about 6% of all postnatal congenital malformations are related to visible cytogenetic alterations detected by conventional G banding.^{1,2} These percentages will probably increase with the use of molecular cytogenetic methods such as fluorescence in situ hybridisation (FISH) and comparative genomic hybridisation (CGH) in prenatal and postnatal diagnosis,³ because they will allow the detection of chromosome abnormalities that are not identified at present. The recurrent association of particular chromosome aberrations with specific clinical features has defined many chromosomal syndromes. In order to facilitate the identification of genes involved in specific human malformations, Brewer *et al*⁴ have constructed a chromosome map of autosomal deletions (non-mosaic) associated with 47 different congenital malformations in 1753 patients. In this review, no congenital malformations were related to anomalies of 16p. So far, only the ATR-16 syndrome (α thalassaemia-retardation-16) associated with 16p13.3 deletion has been described.⁵⁻⁷ Interstitial deletions are relatively rare chromosomal anomalies that usually arise de novo. Here we describe multiple congenital malformations associated with a de novo interstitial chromosome deletion 16p11.2 confirmed by CGH. This is the first case reported with a phenotype-genotype correlation for this chromosome band.

CASE REPORT

An ultrasound examination at 20 weeks of gestation showed the presence of cardiac defects and unilateral multiple renal

cysts. Conventional cytogenetic analyses carried out on amniotic fluid samples showed a normal karyotype. The presence of trisomies 13, 18, and 21 was excluded using FISH on uncultured amniocytes. The couple decided to continue the pregnancy. The boy was born after an uncomplicated 40 week gestation by emergency caesarean section. He showed severe intrauterine growth retardation (weight 2080 g, <5th centile) and multiple congenital malformations were observed on clinical examination (table 1). He was admitted to the intensive care unit, but developed cardiac decompensation and died at the age of 5 months.

MATERIALS AND METHODS

Cytogenetic analysis

Peripheral blood samples obtained from the neonate and his parents were cultured for 72 hours in RPMI medium, supplemented with 20% fetal calf serum and phytohaemagglutinin. Metaphase chromosomes were analysed by the standard Wright G banding technique.

CGH analysis

DNA isolation and labelling, hybridisation, and detection were performed essentially as described by Kallioniemi *et al*⁸ (and according to the instructions of the supplier (Vysis Downer Grove, IL). Briefly, test DNA was isolated from leucocytes of the newborn and control DNA was prepared from blood of a healthy male. DNA was labelled with spectrum Red-dUTP and spectrum Green-dUTP, respectively, following standard nick translation using a commercial kit. The 1:1 probe mixture (700 ng) was hybridised in combination with unlabelled human Cot-1 DNA to normal male metaphase spreads. Slides were analysed using a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK). The software performed a calculation of the fluorescent ratios of the patient DNA to normal DNA along the length of each chromosome. Ratio values of CGH above 1.25 and below 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively.

RESULTS

Evaluation of G banded chromosome preparations from phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes of the proband showed a non-mosaic 46,XY,del(16p) (fig 1) in the 40 cells analysed. A retrospective analysis confirmed the deletion on karyotyping of amniocytes. It is interesting to note the maternal origin of the deleted chromosome, because the normal chromosome originated from a 16qh+ chromosome of the father. This is a de novo abnormality, because both parents were cytogenetically normal.

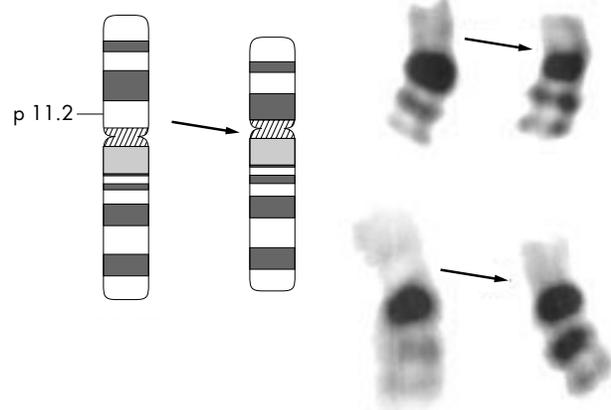


Figure 1 Two different pairs of chromosomes 16 from the proband showing the normal (left) and the deleted chromosome (right). The ideograms illustrate the deletion of band 16p11.2 on the abnormal chromosome 16.

Abbreviations: CGH, comparative genomic hybridisation; APKD, adult polycystic kidney disease

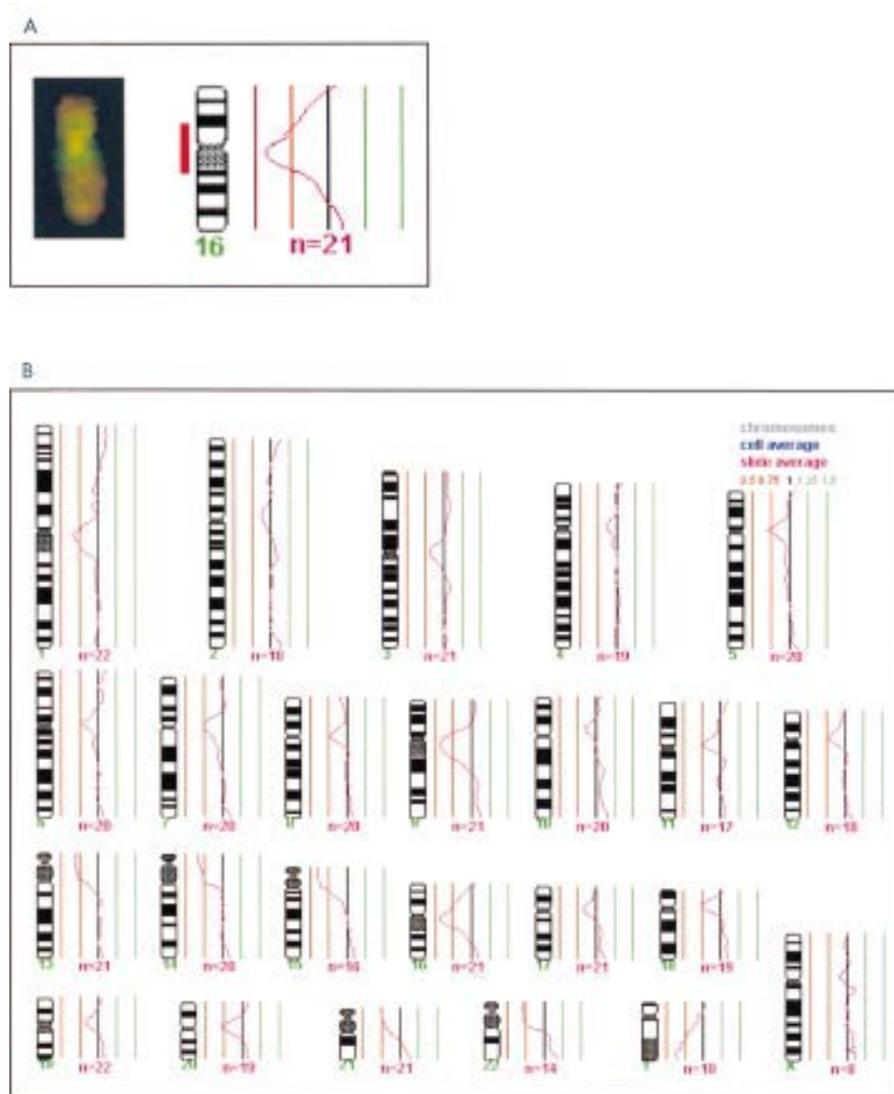


Figure 2 CGH results from the patient. Lines from left to right on the profiles represent fluorescence ratio values of 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, and 1.5. The vertical lines on the right of the chromosome indicate gains, those on the left indicate losses of corresponding chromosome regions. Chromosomes and profiles obtained by CGH showed (A) the loss of band 16p11.2 and (B) all other chromosomes with normal profiles.

CGH was performed to confirm the deleted fragment on chromosome 16. The CGH profile of chromosome 16 showed a loss at band 16p11.2. All other chromosomes had normal profiles (fig 2), which indicates the presence of an interstitial chromosome deletion 16p11.2 in this patient.

DISCUSSION

Partial chromosome 16 monosomies are very rare and in most cases correspond to the presence of ring chromosomes 16.⁹ Terminal and interstitial deletions of the long arm of chromosome 16 are associated with multiple congenital abnormalities.^{4 10 11} At present, only terminal deletions of the short arm of chromosome 16 have been described and are associated with the ATR syndrome (α thalassaemia-retardation-16).⁵⁻⁷ The present report is the first published case to correlate congenital malformations with an interstitial chromosome deletion of 16p11.2, probably because G banding often does not easily identify this chromosome aberration.

Adult polycystic kidney disease (APKD) is a common genetic disorder. Recent reports show that the APKD gene is located in the region 16p12-p13.2.¹²⁻¹⁴ The presence in our patient of polycystic kidney disease and chromosome deletion 16p11.2 could indicate that the APKD gene is located in this chromosome region.

The introduction of fluorescence in situ hybridisation and whole chromosome paints has provided new methods to complement chromosome banding techniques.¹⁵ However, this method is not useful when no specific paints for the chromosome regions involved are available, or when no previous information on the nature of the aberration exists. Additional strategies, such as multicolour FISH, do not require this previous knowledge to detect the extra material, but are not useful for the identification of deletions.¹⁶⁻¹⁸ A highly specialised procedure, microdissection, is useful in these cases, but this technology is only available in a few laboratories.¹⁵ Comparative genomic hybridisation (CGH) is a rapid molecular cytogenetic technique, which can identify gains or losses of chromosomal material without any previous information about the nature of the aberration.⁸ Since CGH detects chromosome deletions in the range of 5-20 Mb,^{19 20} it is useful for clinical diagnosis.^{3 21-25}

In tumours, it is generally accepted that the sensitivity of CGH declines in the telomeric regions and centromeres of all chromosomes, the heterochromatic regions, at the 1p32-pter and 16p chromosomal regions, and on chromosomes 19 and 22 as a whole.⁸ Recently, Ghaffari *et al*²⁶ and Breen *et al*³ used CGH to define chromosome 19 as the origin of ring and

Table 1 Clinical findings in our patient

Craniofacial	Flat facies, microretrognathia, blepharophimosis, short nose with hypoplastic alae nasi and absent nasal bridge, low set and malformed ears, and glossoptosis with hypoplastic palate
Cardiovascular	Tetralogy of Fallot with pulmonary atresia
Skeletal	Articular limitation, cubital deviation of hands, talipes varus, and hemivertebra at L1 level
Genitourinary	Unilateral renal agenesis (left kidney) and cryptorchidism
Ocular	Coloboma and unilateral chorioretinitis (right eye)

marker chromosomes respectively, when conventional cytogenetic banding and FISH methods had failed to identify their origin. In our case, we found no problem in characterising the deletion 16p11.2 by CGH, even taking into account its proximity to the heterochromatic region. These findings seem to indicate that the criteria applied to neoplasms are not necessarily applicable to constitutional chromosome abnormalities. Moreover, this report shows the utility of CGH for the characterisation of single copy deletions larger than 5 Mb.

This is the first published case to describe multiple congenital malformations associated with chromosome deletion 16p11.2. Our findings confirm that the combined use of conventional G banding and CGH methods may facilitate phenotype-genotype correlation and can contribute to mapping chromosome regions containing genes implicated in these congenital malformations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by DGEISIC (PB 98-0891).

Authors' affiliations

C Hernando, M A Rigola, J Egocue, C Fuster, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
A Plaia, T Vendrell, Unitat de Genètica, Hospital Materno-Infantil de la Vall d'Hebrón, 08035 Barcelona, Spain
M M Pérez, Secció de Genètica, Hospital de Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

Correspondence to: Dr C Fuster, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; carme.fuster@uab.es

REFERENCES

- Kalter H**, Warkany J. Medical progress. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention. *N Engl J Med* 1983; **308**:491-7.
- Abruzzo MA**, Hassold TJ. Etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mut* 1995; **25**:38-47.
- Breen CJ**, Barton L, Carey A, Dunlop A, Glacy M, Hall K, Hegarty AM, Khokhar MT, Power M, Ryan K, Green AJ, Stallings RL. Applications of comparative genomic hybridization in constitutional chromosome studies. *J Med Genet* 1999; **36**:511-17.
- Brewer C**, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet* 1998; **63**:1153-9.
- Wilkie AO**, Buckle VJ, Harris PC, Lamb J, Barton NJ, Reeders ST, Lindenbaum RH, Nicholls RD, Barrow M, Bethlenfalvay NC, Hutz MH, Tolmie JL, Weatherall DJ, Higgs DR. Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassemia/mental retardation syndromes. I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. *Am J Hum Genet* 1990; **46**:1112-26.
- Lindor NM**, Valdes MG, Wick M, Thibodeau SN, Jalal S. De novo 16p deletion: ATR-16 syndrome. *Am J Med Genet* 1997; **72**:451-4.
- Holinski-Feder E**, Reyners E, Uhrig S, Golla A, Wauters J, Kroisel P, Bossuyt P, Rost I, Jedele K, Zierler H, Schwab S, Wildenauer D, Speicher MR, Willems PJ, Meitinger T, Kooy RF. Familial mental retardation syndrome ATR-16 due to an inherited cryptic subtelomeric translocation, t(3;16)(q29;p13.3). *Am J Hum Genet* 2000; **66**:16-25.
- Kallioniemi OP**, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* 1994; **10**:231-43.
- Callen DF**, Eyre H, Yip MY, Freemantle J, Haan EA. Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet* 1992; **43**:709-15.
- Fryns JP**, Melchoir S, Jaeken J, van der Berghe H. Partial monosomy of the long arm of chromosome 16 in a malformed newborn: karyotype 46,XX,del(16)(q21). *Hum Genet* 1977; **38**:343-6.
- Casamassima AC**, Klein RM, Wilmot PL, Brenhold P, Shapiro LR. Deletion of 16p with prolonged survival and usual radiographic manifestation. *Am J Med Genet* 1990; **37**:504-9.
- Harris P**, Lalonde M, Stroh H Bruns G, Flint A, Latt SA. Construction of a chromosome 16-enriched phage library and characterization of several DNA segments from 16p. *Hum Genet* 1987; **77**:95-103.
- Watson ML**, Wright AF, Macnicol AM, Allan PL, Clayton JF, Dempster M, Jeremiah SJ, Corney G, Hopkinson DA. Studies of genetic linkage between adult polycystic kidney disease and three markers on chromosome 16. *J Med Genet* 1987; **24**:457-61.
- Jeffery S**, Saggat-Malik AK, Morgan S, MacGregor GA. A family with autosomal dominant polycystic kidney disease not linked to chromosome 16p13.3. *Clin Genet* 1993; **44**:173-6.
- Blennow E**, Brondum-Nielsen K, Telenius H, Carter NP, Kristofferson U, Holmberg E, Gilberg C, Nordenskjöld M. Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1995; **55**:85-94.
- Schröck E**, du Manoir S, Vedman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Nin Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; **273**:494-7.
- Speicher MR**, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH. *Nat Genet* 1996; **12**:368-75.
- Stone D**, Ning Y, Guan XY, Kaiser-Kupfer M, Wynshaw-Boris A, Biesecker L. Characterization of familial partial 10p trisomy by chromosomal microdissection, FISH, and microsatellite dosage analysis. *Hum Genet* 1996; **98**:396-402.
- Bentz M**, Plesch A, Stilgenbauer S, Dölner M, Litcher P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 1998; **21**:172-5.
- Kirchhoff M**, Gerdes T, Maar J, Rose H, Bentz M, Döhner H. Deletion below 10 megabase pairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chrom Cancer* 1999; **25**:410-13.
- Bryndorf T**, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 1995; **57**:1211-20.
- Daniely M**, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A. Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1999; **86**:512-55.
- Daniely M**, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A. Detection of numerical chromosome aberrations by comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999; **19**:100-4.
- Lapierre JM**, Cacheux V, Luton D, Collot N, Ourly JF, Aurias A, Tachdjian G. Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. *Prenat Diagn* 2000; **20**:123-31.
- Christiaens GC**, Visser J, Poddidge PJ, de Pater JM. Comparative genomic hybridization for cytogenetic evaluation of stillbirth. *Obstet Gynecol* 2000; **96**:281-6.
- Haffari SR**, Boyd E, Connor JM, Jones AM, Tolmie JL. Mosaic supernumerary ring chromosome 19 identified by comparative genomic hybridization. *J Med Genet* 1998; **35**:836-40.

ARTÍCULO 2.

Hernando C, Carrera M, Ribas I, Pareira N, Baraibar R, Egozcue J, Fuster C.

” Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis”

Prenatal Diagnosis 2002;22:802-805. ISSN 1097-0223

SHORT COMMUNICATION

Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis

C. Hernando¹, M. Carrera², I. Ribas², N. Parear³, R. Baraibar⁴, J. Egocue¹ and C. Fuster^{1*}

¹Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

²Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal, Barcelona, Spain

³Servei de Ginecologia, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain

⁴Servei de Pediatria, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain

We describe three cases in which we used fluorescence *in situ* hybridization (FISH), polymerase chain reaction (PCR) and comparative genomic hybridization (CGH) to characterize Y chromosome structural anomalies, unidentifiable by conventional G-banding. Case 1 was a 46,X,+mar karyotype; FISH analysis revealed an entire marker chromosome highlighted after hybridization with the Y chromosome painting probe. The PCR study showed the presence of Y chromosome markers AMG and SY620 and the absence of SY143, SY254 and SY147. CGH results confirmed the loss of Yq11.2-qter. These results indicated the presence of a deletion: del(Y)(q11.2). Case 2 was a 45,X [14]/46,XY[86] karyotype with a very small Y chromosome. The PCR study showed the presence of Y chromosome markers SY620 and AMG, and the absence of SY143, SY254 and SY147. CGH results showed gain of Yq11.2-pter and loss of Yq11.2-q12. These results show the presence of a Yp isodicentric: idic(Y)(q11.2). Case 3 was a 45,X,inv(9)(p11q12)[30]/46,X,idic(Y)(p11.3?),inv(9)(p11q12)[70] karyotype. The FISH signal covered all the abnormal Y chromosome using a Y chromosome paint. The PCR study showed the presence of Y chromosome markers AMG, SY620, SY143, SY254 and SY147. CGH only showed gain of Yq11.2-qter. These results support the presence of an unbalanced (Y;Y) translocation. Our results show that the combined use of molecular and classical cytogenetic methods in clinical diagnosis may allow a better delineation of the chromosome regions implicated in specific clinical disorders. Copyright © 2002 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: isochromosomes; FISH; PCR; CGH; prenatal diagnosis

INTRODUCTION

Many individuals with sex chromosome abnormalities remain undiagnosed because usually their phenotype falls within the limits of 'normality,' although the karyotypic change has an effect on most non-mosaic cases. Even now, when many abnormalities of the sex chromosomes have been defined and their clinical consequences reported in detail, the precise role of the sex chromosomes in sex differentiation and in the genetic control of gametogenesis still remain obscure (Robinson *et al.*, 1999; Kleiman *et al.*, 2001).

In recent years, fluorescence *in situ* hybridization (FISH and multi-colour-FISH) and comparative genomic hybridization (CGH) have allowed the correct identification of constitutional chromosomal aberrations. These techniques, combined with conventional G-banding, have a clear diagnostic and prognostic value, and contribute to genetic counselling (Lichter *et al.*, 1991; Bryndorf *et al.*, 1995; Speicher *et al.*, 1996; Daniely *et al.*, 1999; Stumm *et al.*, 1999; Rigola *et al.*, 2001).

Here, we describe three cases where de novo Y chromosome structural anomalies were detected by pre and

postnatal diagnosis and characterized by molecular cytogenetic analysis. The present report illustrates the usefulness of FISH, polymerase chain reaction (PCR) and CGH for the accurate identification of Y chromosome structural anomalies, as well establishing a better correlation with the clinical manifestations.

CASE REPORTS

Case 1

Case 1 was a fetus with 46,X,+mar karyotype. A 38-year-old woman requested a prenatal diagnosis when she was in the 18th week of pregnancy. Previously, she had two spontaneous abortions and a phenotypically normal girl. Cytogenetic analysis of cultured amniotic fluid cells after G-banding showed an abnormal karyotype with 46 chromosomes, including a normal X chromosome and a small marker chromosome in 14 of the clones analysed. To characterize the marker chromosome in this fetus, FISH, PCR and CGH were carried out. Analysis of peripheral blood lymphocytes from the parents showed normal karyotypes. Ecography revealed male genitalia, and no fetal malformations were observed. The couple decided to continue with the pregnancy. An apparently

*Correspondence to: C. Fuster, Unitat de Biologia, Departament de Biologia Celular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: carme.fuster@uab.es

normal boy was born at 39.3 weeks without complications. He weighed 4.410 g, his length was 48 cm and the head circumference was 37 cm. Physical examination detected megalosomia and a fronto-palpebral vascular angioma. Apparently normal male genitalia (no cryptorchidism or hypospadias) were observed.

Case 2

Case 2 was a fetus with a unilateral renal agenesis. For rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies, QF-PCR (quantitative fluorescent PCR) was carried out in amniocytes. No autosomal aneuploidies were found using the highly polymorphic STR markers S1313, S1818 and S2121; X22, HPRT and the modified AMXY showed characteristic monoallelic patterns and were uninformative for sex chromosome copy number. Cytogenetic study of amniocytes revealed a mosaic 45,X[11]/46,X,der(Y)[16] karyotype. Analysis of peripheral blood lymphocytes from the parents showed normal karyotypes. The couple decided to continue with the pregnancy. No evidence of intrauterine growth retardation was observed. An apparently phenotypically normal boy was born at term. Birth weight, length and head circumference were 2910 g, 49 cm and 36 cm, respectively. Apparently normal male genitalia (no cryptorchidism or hypospadias) were observed. To verify the fetal karyotype in the neonate and to characterize the derivative Y chromosome, conventional cytogenetic and molecular cytogenetic analyses (PCR and CGH) were carried out in peripheral blood.

Case 3

Case 3 was a 15-year-old girl with primary amenorrhea and a 45,X,inv(9)(p11q12)[30]/46X,idic(Y)(p11.3?), inv(9)(p11q12)[70] karyotype. A clinical examination detected the presence of growth retardation (length 149 cm and weight 44 kg) and bone age retardation. No other phenotypic signs of Turner syndrome were found. She had apparently normal external female genitalia. The internal genitalia had no testicular elements; she had a hypoplastic uterus and a streak right gonad. The secondary sex characteristics were apparently normal. It is interesting to note the presence of a notable breast asymmetry (the left breast was larger). Simple ichthyosis and epiphyseal closing were observed. No renal or cardiac congenital malformations were detected. Analysis of peripheral blood lymphocytes from the parents showed normal karyotypes. FISH, PCR and CGH analyses were carried out in peripheral blood to verify the chromosome anomaly.

Figure 1 illustrates the partial karyotypes showing the sex chromosomes of all three cases.

MATERIAL AND METHODS

Cytogenetic and FISH analyses

Amniotic fluid cells or peripheral blood samples from these cases were cultured in Chang and RPMI-1640

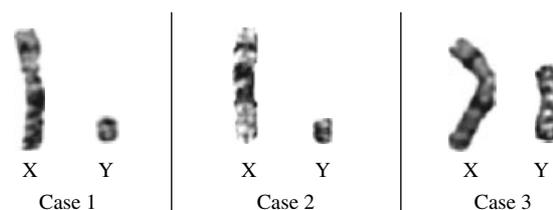


Figure 1—G-banded partial karyotypes showing the sex chromosomes from the three patients

media according to standard procedures. Metaphase chromosomes were analysed by Wright G-banding. FISH was performed with X and Y chromosome specific paint probes (Chromoprobe-M Multiprobe, Cytocell Ltd, UK). Hybridization to metaphase spreads was performed according to the instructions of the supplier.

PCR and CGH analyses

DNA was extracted from amniotic fluid cells or peripheral blood samples according to standard procedures.

PCR analyses for SY620 (AZFa), SY143 (AZFb), SY254 (DAZ-AZFc), SY147 (AZFc) used sequence tagged site markers from four different regions of the long arm of the Y chromosome. Following amplification, the fluorescent PCR products were mixed with a reference molecular standard (GeneScan-500 TAMRA, Applied Biosystems, USA) and electrophoresis was performed employing an automated DNA sequencer (ABI 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems, USA).

CGH was carried out to identify the abnormal Y chromosomes. For CGH, the red-labelled patient DNA and the green-labelled control DNA were hybridized on normal male metaphases, following the instructions of the supplier (Vysis, Downer Grove, IL, USA). Standard nick-translation was performed using a commercial kit. The 1:1 probe mixture (700 ng) was hybridized in combination with unlabeled human Cot-1 DNA on normal male metaphase spreads. Slides were analysed using a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK). The software performed a calculation of the patient DNA to normal DNA fluorescence ratios along the length of each chromosome. Ratio values of CGH above 1.25 and below 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses respectively.

RESULTS

In case 1, FISH analysis showed an entire marker chromosome highlighted after hybridization with the Y chromosome painting probe. PCR analysis detected the presence of the Y chromosome marker SY620 and the absence of SY143, SY254 and SY147. CGH results confirmed the loss of Yq11.2-qter (Figure 2); all other chromosomes had normal CGH profiles. These results indicated the presence of a *de novo* del (Y)(q11.2) in this fetus. Based on classical cytogenetics, FISH and CGH data, the karyotype of this patient was defined as 46,X,+mar.rev ish dim (Yq11.2-qter).

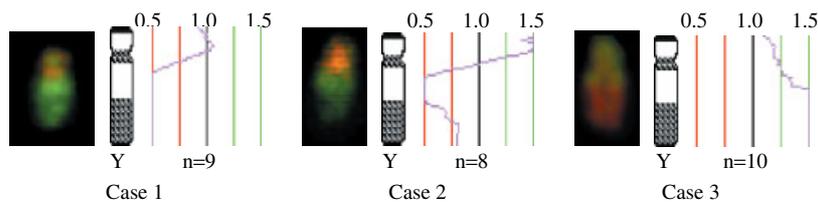


Figure 2—Y chromosomes and profiles obtained by CGH showing: loss of Yq11.2-qter in case 1, gain of Yq11.2-pter and loss of Yq11.2-q12 in case 2, and gain of Yq11.2-qter in case 3

Evaluation of G-banded chromosomes of case 2 at birth confirmed the presence of mosaicism 45,X[14]/46,X,der(Y)[86] with a very small Y chromosome. The PCR study showed the presence of Y chromosome marker SY620 and the absence of SY143, SY254 and SY147. These findings and those obtained by QF-PCR (the presence of AMGY located at Yp) are in agreement with the presence of an isodicentric Yp. CGH results confirmed the gain of Yq11.2-pter and the loss of Yq11.2-q12 (Figure 2); all other chromosomes had normal CGH profiles. These analyses revealed the presence of mosaicism for an isodicentric (Y)(q11.2) and a 45,X cell line in this newborn. Based on classical cytogenetics and CGH data, the karyotype of this patient was defined as 45,X[14]/46,X,der(Y)[86]. rev ish enh (Yq11.2-pter).rev ish dim (Yq11.2-q12).

In patient 3, FISH analysis showed a bright signal on the entire chromosome after hybridization with the Y chromosome paint. PCR study showed the presence of Y chromosome markers SY620, SY143, SY254 and SY147. CGH results only detected the gain of Yq11.2-qter (Figure 2); all other chromosomes had normal CGH profiles. These results indicate the presence of mosaicism for an unbalanced translocation between two Y chromosomes and a 45,X cell line in this woman. Based on classical cytogenetics, FISH, and CGH data, the karyotype of this patient was defined as 45,X,inv(9)(p11q12)[30]/46X,der(Y),inv(9)(p11q12)[70]. rev ish enh (Yq11.2-qter).

DISCUSSION

The precise characterization of the chromosome fragments implicated in constitutive unbalanced karyotypes has a considerable prognostic value and may contribute to the discovery of genes implicated in specific disorders. The prenatal detection of Y chromosome structural anomalies poses a diagnostic dilemma because their effect on fetal and postnatal development is difficult to predict. In 1989, Hsu published the first evidence of the existence of a drastic difference in terms of the phenotypic outcome between postnatal diagnosis and prenatal diagnosis of 45,X/46,XY mosaicism. Due to the biased ascertainment of postnatally diagnosed cases, all cases were phenotypically abnormal while over 92% of prenatal cases were born as phenotypically normal male infants with normal genitalia (Hsu, 1989). Similar findings have been described more recently by Telvi *et al.* (1999).

FISH and PCR analyses have proved useful for the accurate identification of Y chromosome structural alterations. Moreover, CGH has been shown to be helpful for the identification of marker chromosomes (Yu *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995). In the present work we have used these three methods (FISH, PCR and CGH) to characterize three *de novo* structural Y chromosome alterations in pre and postnatal diagnostic situations.

The cytogenetic study of case 1 revealed a deletion Yq that was characterized as del(Y)(q11.2) by CGH and PCR analyses. A comparison with previous published cases confirms that almost all patients with 46,X,del(Y)(q11) were phenotypic males who, as adults, usually show short stature and infertility (Hsu, 1989; Ma *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 2000; Kleiman *et al.*, 2001). The presence of AZFa in our patient does not discard the presence of infertility, since recently, Martinez *et al.*, (2000) reported that no deletions of the AZFa region were detected in a screening for AZF deletions in a large series of patients with severely impaired spermatogenesis. According to this information, the prognosis for this newborn, with normal clinical features, is the probable presence of short stature and infertility on reaching adulthood.

Previously reported patients with Yp isodicentrics were 45,X mosaics due to the unstable nature of the dicentric chromosome. Predicting the phenotypic consequences of different duplications and deletions in dicentric chromosomes is complicated due to the variability resulting from the different degrees of mosaicism (Hsu, 1989; Stuppia *et al.*, 1996). Our case 2, as most reported cases, was a *de novo* idic(Yp) and had a breakpoint at Yq11.2. He was phenotypically male, as were 27% of the reported cases with the same isodicentric chromosome (Hsu, 1989). The only clinical abnormality observed in case 2 was the presence of a unilateral renal agenesis; to our knowledge, this phenotype has not been previously described associated with this chromosome alteration. Due to the loss of AZFb, AZFc-DAZ and AZFc, it is very probable that our patient will be an infertile adult.

Translocation between two Y chromosomes is unusual. The presence of a 45,X cell line in most Y/Y translocation may suggest that some of these Y/Y translocations could be dicentric. A clear distinction between a Y/Y translocation, a Yp isochromosome and a Yq isodicentric chromosome is difficult using cytogenetic techniques. The use of CGH identified the chromosome alteration in our patient 3 as a Y/Y translocation. The high proportion of the 45,X cell line (30%) determined the presence of Turner syndrome stigmata (Hsu *et al.*, 1989; Bergendi *et al.*, 1997).

Moreover, the presence of spermatogenesis controlling genes (AZF) in this patient could play an important role in gonadal development and in the differentiation into a phenotypic female with some Turner stigmata (Bergendi *et al.*, 1997; Jenderny *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1999, Giltay *et al.*, 2001).

The present report illustrates the importance of FISH, PCR and CGH techniques in complementing conventional cytogenetic methods for the accurate identification and characterization of Y chromosome structural alterations in pre and postnatal diagnosis, and to correlate them with clinical manifestations.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was given by DGEIC (PB 98-0891) and CIRIT (2001, SGR-00201).

REFERENCES

- Bergendi E, Plochl E, Vlasak I, Rittinger O, Muss W. 1997. A Turner-like phenotype in a girl with an isodicentric fluorescent Y chromosome mosaicism. *Klin Padiatr* **209**: 133–136.
- Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, *et al.* 1995. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* **57**: 1211–1220.
- Daniely M, Barkai G, Godman B, Avidam-Goldring A. 1999. Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **86**: 51–55.
- Giltay JC, Ausems MG, van Seumeren I, *et al.* 2001. Short stature as the only presenting feature in a patient with isodicentric (Y)(q11.23) and gonadoblastoma: a clinical and molecular cytogenetic study. *Eur J Pediatr* **160**: 154–158.
- Hsu LYF. 1989. Prenatal diagnosis of 45,X/46,XY mosaicism—a review and update. *Prenat Diagn* **9**: 31–48.
- Jenderny J, Schmidt W, Held KR. 1998. Presence of the AZF region in a female with an idic(Y)(q11). *Clin Genet* **54**: 341–344.
- Kirsch S, Weiss B, De Rosa M, Ogata T, Lombardi G, Rapold GA. 2000. FISH deletion mapping defines a single location for the Y chromosome stature gene, CGY. *J Med Genet* **37**: 593–599.
- Kleiman SE, Maymon BBS, Yogev L, Paz G, Yavetz H. 2001. Prognostic value of Y deletion analysis. The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum Reprod* **16**: 399–409.
- Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC. 1991. Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic *in situ* hybridization. *Genet Anal Tech Appl* **8**: 24–35.
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S. 2000. The role of Y chromosome deletions in male infertility. *Eur J Endocrinol* **142**: 418–430.
- Martínez MC, Bernabé MJ, Gomez E, *et al.* 2000. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl* **21**: 651–655.
- Rigola MA, Carrera M, Ribas I, *et al.* 2001. Identification of two *de novo* partial trisomies by comparative genomic hybridization. *Clin Genet* **59**: 106–110.
- Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA, *et al.* 1999. A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y-chromosomes in patients with Turner syndrome. *J Med Genet* **36**: 279–284.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor-FISH. *Nature Genet* **12**: 368–375.
- Stumm M, Tönnies H, Wieacker PF. 1999. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. *Eur J Pediatr* **158**: 531–536.
- Stuppia L, Calabrese G, Franchi PG, *et al.* 1996. Molecular studies in three patients with isodicentric Y chromosome. *Hum Genet* **98**: 691–695.
- Telvi L, Lebbar A, Del Pino O, Barber JP, Chaussain JL. 1999. 45,X/46,XY Mosaicism: report of 27 Cases. *Pediatrics* **104**: 304–308.
- Wang BBT, Yu LCh, Peng W, Falk RE, Williams J. 1995. Prenatal identification of i(Yp) by molecular cytogenetic analysis. *Prenat Diagn* **15**: 1115–1119.
- Yu LC, Williams J, Wang BT, *et al.* 1993. Characterization of the i(18p) in prenatal diagnosis by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* **13**: 355–361.

ARTÍCULO 3.

Hernando C, Plaja A, Català V, Sarret E, Egozcue J, Fuster C.

”Primary amenorrhea in a woman with a cryptic complex chromosome rearrangement involving the critical regions Xp11.2 and Xq24”

Fertility and Sterility 2004; 82(6): 1666-1671. ISSN 0015-0282

Primary amenorrhea in a woman with a cryptic complex chromosome rearrangement involving the critical regions Xp11.2 and Xq24

Cristina Hernando, M.S.,^a Alberto Plaja, Ph.D.,^b Vicens Català, Ph.D.,^c
Enric Sarret, M.D.,^b Josep Egozcue, M.D.,^a and Carme Fuster, Ph.D.^a

Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona; Unitat de Genètica, Hospital Materno Infantil de la Vall d'Hebron; and Prenatal Genetics, Barcelona, Spain

Objective: To characterize a complex chromosome rearrangement (CCR) previously detected by G-banding in peripheral blood lymphocytes, as 46,X,-2,-11,-22,-X,+mar 1+mar2+mar3+mar4 in a patient with primary amenorrhea.

Design: Case report.

Setting: University faculty of Medicine and hospital.

Patient(s): A 36-year-old woman with primary amenorrhea.

Intervention(s): Fluorescence in situ hybridization (FISH).

Main Outcome Measure(s): Use of commercially available M-FISH probe (24 colors simultaneously) and whole chromosome painting probes for chromosomes 2, 11, 22, and X to characterize the CCR.

Result(s): The use of conventional and multiple FISH allowed the redefinition of the CCR, showing a cryptic insertion of chromosome 11 in marker 3 previously suspected by M-FISH. The combination of G-banding and FISH data revealed that four chromosomes and seven breakpoints, including 2q21, 2q31, 11q22.1, 11q22.3, 22q13.3, Xp11.21, and Xq24, were implicated in this CCR.

Conclusion(s): This report confirms the importance of a combination of G-banding and FISH (M-FISH and conventional FISH) techniques to characterize the de novo CCR. These techniques also were useful in defining two possible critical chromosome regions, Xp11.21 and Xq24, in which genes of potential interest for a primary amenorrhea could be located. (*Fertil Steril*® 2004;82:1666–71. ©2004 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Chromosomal aberration, complex chromosome rearrangement, FISH, primary amenorrhea

Complex chromosomal rearrangements (CCRs) have been defined as reorganizations involving more than a reciprocal exchange of segments between two chromosomes or multiple breaks in three or more chromosomes (1). Constitutional CCRs are rare events in human beings. At present, about 100 CCRs had been reported, most of them de novo (2, 3). Constitutional de novo CCRs imply considerable diagnostic difficulties, both of a clinical and cytogenetical type (4–8). However, they have been associated with infertility, repeated miscarriages, and chromosomal imbalances in the offspring (9–13).

Limitations of conventional banding analysis in accurate diagnosis and interpretation of

structural chromosome anomalies have largely been overcome by the development of new molecular cytogenetic technologies, such as fluorescence in situ hybridization (FISH), microFISH (microdissection and FISH) as well as comparative genomic hybridization (CGH) and multicolor FISH (M-FISH). The M-FISH technique is especially indicated to facilitate an easy detection of translocations and insertions involving two nonhomologous chromosomes in CCRs, allowing all human chromosomes to be painted in different fluorescent colors within a single hybridization (8, 14–17).

We report on the characterization by the combined application of G-banding and

Received January 21, 2004; revised and accepted May 4, 2004.

Financial support given by SAF (2003-03894) and CIRIT (2001, SGR-00201).

Reprint requests: Carme Fuster, Ph.D., Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain (FAX: 00-34-93/581-10-25; E-mail: carme.fuster@uab.es).

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

^b Unitat de Genètica, Hospital Materno Infantil de la Vall d'Hebron.

^c Prenatal Genetics.

0015-0282/04/\$30.00
doi:10.1016/j.fertnstert.2004.05.085

FISH (conventional and M-FISH) methods of an apparently balanced CCR identified in a woman with primary amenorrhea.

CASE REPORT

A 36-year-old woman was referred for cytogenetic evaluation because of the presence of primary amenorrhea. Her body height was 174 cm, and her weight was 65 kg. When she was 32 years old an ultrasound examination disclosed that her uterus measured $5.9 \times 2.5 \times 3.0$ cm, and both ovaries were absent. Growth, mental development, and a physical examination including secondary sexual characteristics confirmed that she was in completely normal condition. The study was approved by our institutional ethics committee.

Conventional Cytogenetic Analyses

Peripheral blood samples of the patient and her parents were cultivated for a 72-hour period in a RPMI-1640 medium enriched with 20% fetal calf serum and phytohemagglutinin. Chromosomes were harvested according to standard procedures and were further analyzed by the standard G-banding technique.

M-FISH Analysis

To characterize the chromosomes implicated in the CCR and to discard any subtle rearrangement undetected by G-banding, we applied M-FISH, which enabled the detection of reorganizations involving nonhomologous chromosomes in a single hybridization. The M-FISH analysis was performed using the SpectraVysion probe (Vysis, Downers Grove, IL) according to the manufacturer's instructions. Digital fluorescence imaging was performed using an epifluorescence microscope and a computer-controlled filter system that contained five single-band-pass filters suitable for the five different fluorescence dyes: SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold, SpectrumRed, SpectrumFarRed (all Vysis), and DAPI. Images through the filters were continuously captured with a monochrome charged coupled device (CCD) camera, and were analyzed with the SpectraVysion software (Vysis).

Conventional FISH Analyses

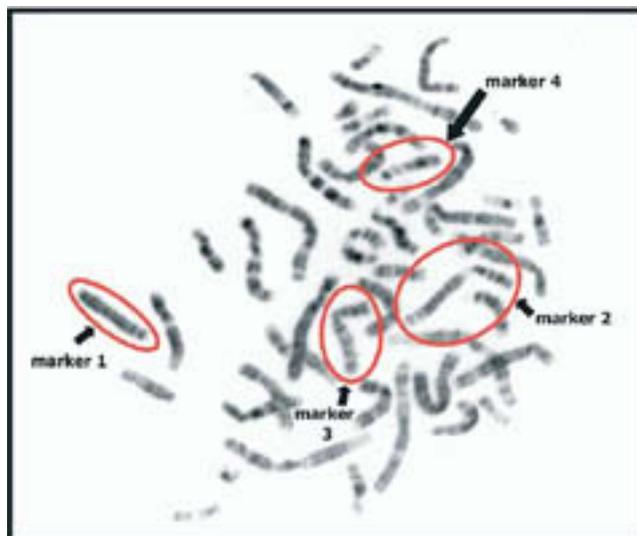
To confirm the results obtained by M-FISH, conventional FISH was performed with whole-chromosome painting probes for the chromosomes involved in the CCR, which could be previously identified by M-FISH. The hybridization to metaphase spreads were performed according to the supplier's instructions (Vysis).

RESULTS

The G-banding chromosome analysis showed the presence of a $46,X,-2,-11,-22,-X,+mar1+mar2+mar3+mar4$ karyotype in all analyzed metaphases (Fig. 1). The

FIGURE 1

G-banded metaphase of the patient showing the presence of four marker chromosomes.



Hernando. Cryptic CCR and primary amenorrhea. *Fertil Steril* 2004.

mother and brother karyotypes were normal; unfortunately, paternal cytogenetic investigations could not be performed.

The M-FISH analysis clarified the reorganization present in the patient, identifying marker 1 as $der(X)t(22;X;2)$; marker 2 as $der(11)ins(11,2)$; marker 3 as $der(2)t(2;X)$; and marker 4 as $der(22)t(X;22)$ (Fig. 2). It is indeed interesting to note that M-FISH showed the implication of chromosome 22 in marker 1 (that had not been detected before by G-banding) discarding, in this way, other chromosomal rearrangements.

Subsequent FISH analyses using chromosome-specific painting probes of the chromosomes involved in the CCR confirmed the results previously obtained by M-FISH and showed the existence of a cryptic insertion of chromosome 11 in marker 3, as has been suggested by the M-FISH analysis (Fig. 3).

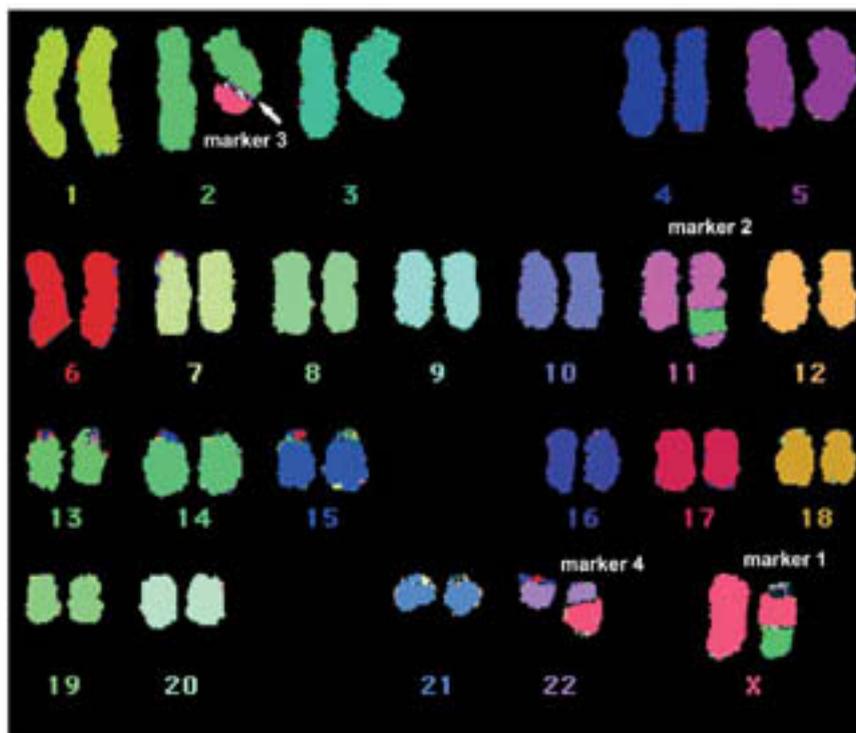
Analyzing G-banding and FISH results, we could identify the four derivative chromosomes with seven breakpoints, including 2q21, 2q31, 11q22.1, 11q22.3, 22q13.3, Xp11.21, and Xq24 implicated in this CCR. Thus, the karyotype of patient was reinterpreted as: $46,X,der(X)t(22;X;2)(q13.3;p11.21q24;q31),der(2)t(2;11;X)(q21;q22.2;q24),der(11)ins(11;2)(q22.1;q21q31),der(22)t(X;22)(p11.21;q13.3)$ (Fig. 4).

DISCUSSION

A precise characterization of CCR might be rather complicated or even impossible when working with conventional cytogenetic techniques. Youngest development

FIGURE 2

Multicolor karyotype of the patient showing marker 1 as $\text{der}(X)t(22;X;2)$, marker 2 as $\text{der}(11)\text{ins}(11;2)$, marker 3 as $\text{der}(2)t(2;X)$, and marker 4 as $\text{der}(22)t(X;22)$. Note the suspect insertion in marker 3 (arrow).



Hernando. Cryptic CCR and primary amenorrhea. Fertil Steril 2004.

tendencies in new molecular cytogenetic methodologies allow detailed elucidation of an increasing number of CCRs (8, 14–17). In the present case, the use of conventional and M-FISH techniques allowed an accurate characterization of this CCR. However, we could not clarify the familial or de novo origin of this CCR because paternal karyotyping was not possible.

Recently, some problems with M-FISH misinterpretation have been reported, especially for detecting subtle, small rearrangements, as a consequence of overlapping fluorescence “flaring” at the boundaries of juxtaposed chromosome regions with different origins (18, 19). In the present case, M-FISH showed a more complex reorganization of marker 1 that had not been identified previously with G-banding. Moreover, the images obtained by M-FISH suggested a possible small insertion in marker 3; however, the flaring effect due to overlapping was not reliable and it had to be discarded. Thus, a second FISH study was performed using chromosome-specific painting probes for the chromosomes implicated in the CCR. This confirmed the existence of a cryptic translocation in this marker. Our results show that to specify the chromosomal breakpoints and to elucidate the origin of the rearrange-

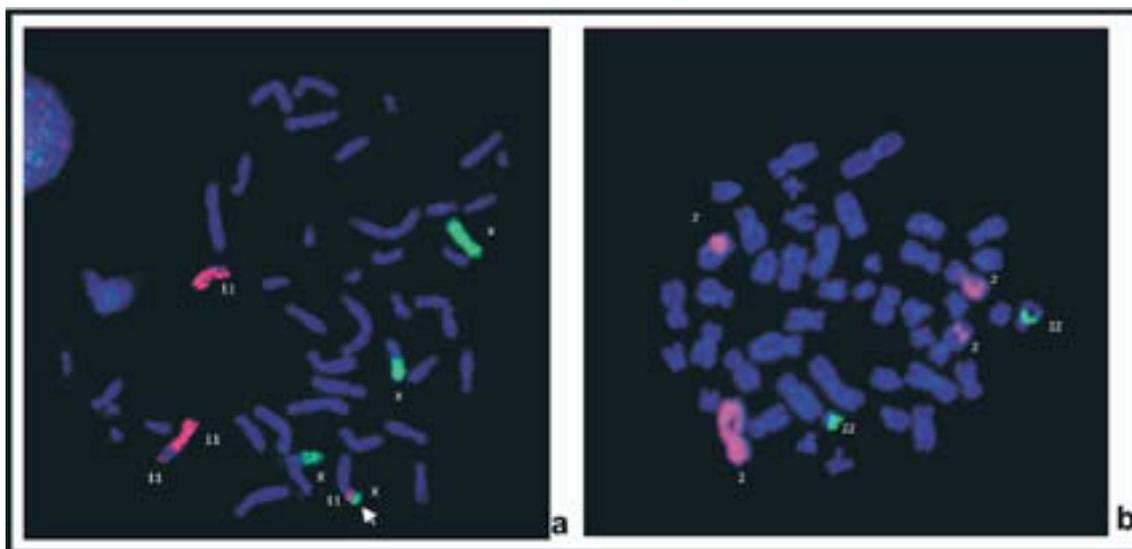
ment in a CCR reliably, combined data from G-banding, FISH, and M-FISH are required.

The increased number of breakpoints involved in a CCR probably causes disruptive effects on gene(s) or regulatory sequences(s), and could likewise result in a growing quantity of phenotypic abnormalities (4, 6, 8). However, CCR without phenotypic effect has been described in the literature, based on couples in which one member carried a CCR that resulted in a malformed child or repeated spontaneous abortions (9, 11, 12). Our patient, with seven breakpoints and four chromosomes implicated in the CCR, appeared phenotypically normal, excluding her primary amenorrhea and her apparent lack of ovaries. Hence, a correlation between the number of breakpoints implicated in a CCR and the severity of the phenotype probably does not always exist in every case.

Although the causes of primary amenorrhea vary and occasionally remain unclear, chromosomal aberrations are the most common cause. They are present in 46% to 62% of women with primary amenorrhea in the form of X aneuploidy, male karyotype, or different structural X chromosome aberrations such as X isochromosomes, di-

FIGURE 3

FISH results obtained using chromosome-specific painting probes for the chromosomes involved in the complex rearrangement. (a) Hybridization using painting probes specific for chromosome 11 (red) and X (green). Note the derivative chromosome 2 (arrow) showing a very small insertion of chromosome 11. (b) Hybridization using painting probes specific for chromosome 2 (red) and 22 (green).



Hernando. Cryptic CCR and primary amenorrhea. *Fertil Steril* 2004.

centrics, rings, and deleted or inverted X chromosomes (20).

It has been proposed that deletions of the short arm of the X chromosome result in short stature with the Turner phenotype, whereas deletions of the long arm of one of the X chromosomes in the q13-q27 bands lead to failure of ovarian development (21). The description of cases of women carrying Xq-autosome translocations with primary amenorrhea (22) led to the definition of a critical region on the long arm of the X-chromosome spanning the q13 to q26 bands (23, 24). However, three cases of autosomal translocations: t(6;15), t(8,9), t(1;11) associated with primary amenorrhea and/or gonadal dysgenesis but without the Turner phenotype have been reported (25, 26). The breakpoint implicated in the last translocation is 11q25. On the other hand, those breakpoints that affected chromosome 11 in our patient corresponded to 11q22.1 and 11q22.3. The Xq critical region hypothesis fails to explain such cases, suggesting that primary amenorrhea and gonadal dysgenesis in these women could possibly be attributed to the disruption of the autosomal gene(s).

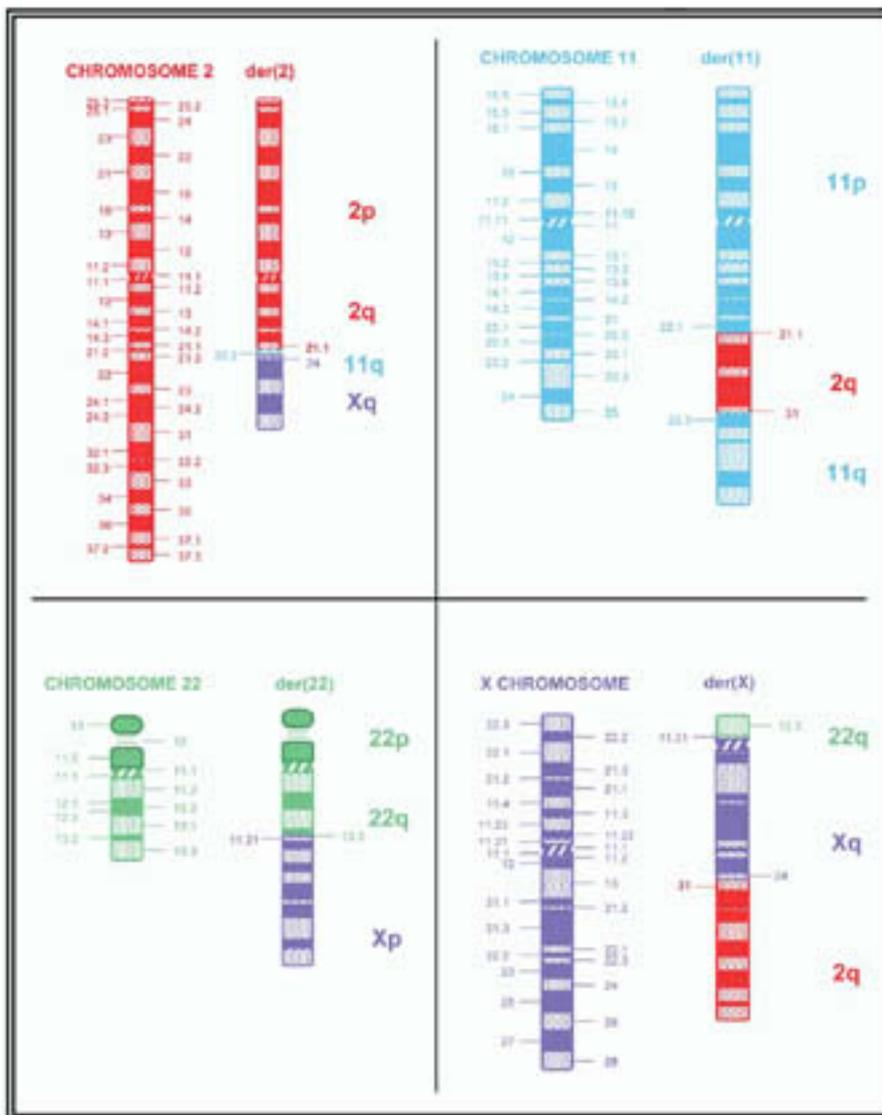
The presence of primary amenorrhea associated with an apparently balanced CCR in our patient might be explained by the disruption of genes, either autosomal or

in the X chromosome, and/or the loss of a very small chromosome fragment next to one of the breakpoints. However, the presence of a normal phenotype in women with primary amenorrhea and breakpoints at the critical X regions has been described before in two reports. Grass et al. (27) described a patient who had an insertion of Xq22-q24 on Xp11 of the same chromosome, and Letterie (28) described a woman with an unbalanced X;X translocation (Xq22;Xp11.2). These findings suggest that breakpoints within the critical regions Xq22-q24 and Xp11.2 are frequently associated with delayed puberty, primary amenorrhea, premature menopause, and the Ullrich-Turner syndrome. After all possible causes had been considered, we believe the ovarian development failure present in our patient is probably due to the presence of breakpoints affecting any of these X critical regions: Xp11.21 and Xq24. Future molecular characterization of these two critical chromosome regions should allow a better understanding of the gene(s) involved in primary amenorrhea.

Our study confirms the importance of the combined use of G-banding and FISH (conventional and M-FISH) techniques for a better characterization of de novo CCR, evidencing the benefits of determining the critical chromosome regions,

FIGURE 4

Idiograms of chromosomes 2, 11, 22, and X representing the origin of the CCR present in this patient.



Hernando. Cryptic CCR and primary amenorrhea. *Fertil Steril* 2004.

such as Xp11.21 and Xq24, in which genes of potential interest for specific diseases such as primary amenorrhea may be located.

References

1. Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR. Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet* 1980;18:436–44.
2. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counselling. New York: Oxford University Press, 1996:182–90.
3. Batanian JR, Eswara MS. De novo apparently balanced complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosomes 4, 18 and 21 in a girl with mental retardation. *Am J Med Genet* 1998;78:44–51.
4. Batista DA, Pai GS, Stetten G. Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. *Am J Med Genet* 1994;53:255–63.
5. Mercier S, Fellmann F, Cattin J, Bresson JL. Molecular analysis by fluorescence in situ hybridization of a prenatally detected de novo complex chromosomal rearrangement t(2q;3p;4q;13q). *Prenat Diagn* 1996;16:1046–50.
6. Madan K, Nieuwint AW, Van Bever Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet* 1997;99:806–15.
7. Berend SA, Bodamer OA, Shapira SK, Shaffer LG, Bacino CA. Familial complex chromosomal rearrangement resulting in a recombinant chromosome. *Am J Med Genet* 2002;109:311–7.
8. Houge G, Liehr T, Schoumans J, Ness GO, Solland K, Starke H, et al. Ten years follow up of a boy with complex chromosomal rearrange-

- ment: going from a >5 to 15-breakpoint CCR. *Am J Med Genet* 2003;118A:235–40.
9. Kausch K, Haaf T, Kohler J, Schmid M. Complex chromosomal rearrangement in a woman with multiple miscarriages. *Am J Med Genet* 1988;31:415–20.
 10. Gorski JL, Kistenmacher ML, Punnett HH, Zackai EH, Emanuel BS. Reproductive risks for carriers of a complex chromosome rearrangement. *Am J Med Genet* 1988;29:247–61.
 11. Van der Burgt CJ, Merck GF, Janssen AH, Mulder JC, Suijkerbuijk RF, Smeets DF. Partial trisomy for 5q and monosomy for 12p in a liveborn child as a result of a complex five breakpoint chromosome rearrangement in a parent. *J Med Genet* 1992;29:739–41.
 12. Sikkema-Raddatz B, Sijmons RH, Tan-Sindhunata MB, van der Veen AY, Brunsting R, de Vries B, et al. Prenatal diagnosis in two cases of de novo complex balanced chromosomal rearrangements. Three-year follow up in one case. *Prenat Diagn* 1995;15:467–73.
 13. Röthlisberger B, Kotzot D, Brecevic L, Koehler M, Balmer D, Binkert F, et al. Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. *Eur J Hum Genet* 1999;7:873–83.
 14. Fuster C, Miguez L, Miro R, Rigola MA, Perez A, Egozcue J. Familial complex chromosome rearrangement ascertained by in situ hybridization. *J Med Genet* 1997;34:164–6.
 15. Jalal SM, Law ME. Utility of multicolour fluorescent in situ hybridization in clinical cytogenetics. *Genet Med* 1999;1:181–6.
 16. Kotzot D, Holland H, Köhler M, Froster UG. A complex chromosome rearrangement involving chromosomes 8, 11 and 12 analyzed by conventional cytogenetic investigations, fluorescence in situ hybridisation, and spectral karyotyping. *Ann Genet* 2001;44:135–8.
 17. Borck G, Wirth J, Hardt T, Tönnies H, Brondum-Nielsen K, Bugge M, et al. Molecular cytogenetic characterisation of a complex 46,XY,t(7;8;11;13) chromosome rearrangement in a patient with Moebius syndrome. *J Med Genet* 2001;38:117–20.
 18. Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, et al. An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet* 2000;66:1684–8.
 19. Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blenow E, et al. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 2001;68:1043–7.
 20. Midro AT, Panasiuk B, Radwan J, Sipowicz I, Jaworowska B, Korsak E. Les aberrations des chromosomes sexuels chez les patientes présentant des troubles de la menstruation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1990;19:811–6.
 21. Di George AM. Hermaphroditism (intersexuality). In: Behrman RE, Kliegman RM, Nelson WE, Vaughan VC, eds. *Nelson textbook of pediatrics*. 14th ed. Philadelphia: Saunders, 1992:1464–72.
 22. Ji XW, Chen XY, Tan J, Liang H. Balanced X;15 translocation 46,X,t(X;15)(q21;q23) associated with primary amenorrhea. *Am J Med Genet* 1988;31:783–6.
 23. Therman E, Laxova R, Susman B. The critical region on the human Xq. *Hum Genet* 1990;85:455–61.
 24. Schmidt M, Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet* 1992;42:161–9.
 25. Tullu MS, Arora PP, Parmar RC, Muranjan MN, Bharucha BA. Ovarian dysgenesis with balanced autosomal translocation. *J Postgrad Med* 2001;47:113–5.
 26. Tupler R, Barbierato L, Larizza D, Sampaolo P, Piovella F, Maraschio P. Balanced autosomal translocations and ovarian dysgenesis. *Hum Genet* 1994;94:171–6.
 27. Grass FS, Schwartz RP, Deal JO, Parke JC Jr. Gonadal dysgenesis, intra-X-chromosome insertion, and possible position effect in an otherwise normal female. *Clin Genet* 1981;20:28–35.
 28. Letterie GS. Unique unbalanced X;X translocation (Xq22;p11.2) in a woman with primary amenorrhea but without Ulrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1995;59:414–6.

ARTÍCULO 4.

Hernando C, Grao P, Santos M, Soler C, Egozcue J, Fuster C.

“Characterization by CGH of a *de novo* duplication 16q12.1-q22.1 in a child with behavioural abnormalities”

Enviado para publicación.

**CHARACTERIZATION BY CGH OF A *DE NOVO* DUPLICATION
16q12.1-q22.1 IN A CHILD WITH BEHAVIOURAL
ABNORMALITIES**

Hernando C¹⁻², Grao P², Santos M¹, Soler C³, Egozcue J¹, Fuster C¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de
Barcelona. E-08193. Spain.

²Departamento de Genética. CERBA Internacional. Sabadell. Spain.

³Sección de Lactantes. Complejo Hospitalario Xeral-Cies. Vigo. Spain.

Correspondence to: Dra. Carme Fuster

Unitat de Biologia. Facultat de Medicina. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i
Immunologia. Edifici M. Universitat Autònoma de Barcelona. E-08193. Bellaterra. Spain.

Fax 00-34-93/581 10 25

Phone 00-34-93/581 12 73

(e-mail: carme.fuster@uab.es)

ABSTRACT

A two year-old girl with behavioural abnormalities, mild dysmorphic features and no internal anomalies showed the presence of extra chromosome material within the long arm of chromosome 16 in all examined cells. The use of fluorescence in situ hybridization (FISH) revealed that the extra material derived from chromosome 16. Comparative genomic hybridization (CGH) detected the gain of the 16q12.1-q22.1 chromosome region. We were able to characterize the presence of a de novo direct tandem duplication 16q12.1→q22.1 by the use of G-bands, FISH and CGH. As we know, this is the second report published in the literature regarding a liveborn with this partial trisomy. The presented case is compared with previously reported cases about partial 16q trisomies free from deletions or duplications of a second chromosomal segment, in an attempt to correlate the presence of 16q12.1-q22.1 duplication with behavioural abnormalities and minor phenotypic effects. On the other hand, these results demonstrate, once again, CGH application as a focussed, single-step method for the identification of chromosomal material of unknown origin.

KEY WORDS: partial trisomy 16q, direct duplication (16)(q12.1-q22.1), FISH, CGH, phenotype-genotype correlation.

INTRODUCTION

Trisomy 16 composes nearly one third of all chromosomal abnormalities encountered in early miscarriages material, suggesting a high rate of non-disjunction of this chromosome. It has been rarely observed in the second [Cusick et al., 1995] and third trimester [Yancey et al., 1996] indicating their early lethality. The prenatal detection of trisomy 16 cells is associated with a high probability of fetal death, preterm delivery, intrauterine growth retardation (IUGR), and fetal anomalies [Benn, 1998]. According to our knowledge complete trisomy of chromosome 16, nonmosaic, could not be found in liveborns. However, there have been cases of confined placental mosaicism, fetal mosaicism and partial trisomy involving chromosome 16 reported in fetuses at term [Benn, 1998; Engelen et al., 2002; Brisset et al., 2002]. Duplications of 16p or 16q in liveborn children are generally associated with limited postnatal survival [Engelen et al., 2002; Brisset et al., 2002].

Duplication of the heterochromatic region 16q11-q12 probably does not have any clinical signification. Nevertheless, a duplication but duplication of large regions of a long arm of chromosome 16 (from 16q13 to qter) leads to severe malformations and early lethality [Brisset et al., 2002]. In most reported patients, other chromosomal alterations are present in addition to partial trisomy 16q, since these are often associated with a balanced translocation in one of the parents. Paladini et al. [1999], concluded that even though paternally-derived trisomies 16, partial or complete, are less frequent than maternally-derived ones. There will not be any correlation between parental origin of the translocation and survival.

Up to now, 50 patients with a partial trisomy of the long arm of chromosome 16 have been reported in the literature [Erikson et al., 1971; Francke, 1972; Machin and Crolla, 1974; Young et al., 1976; Yunis et al. 1977; Duca-Marinescu et al., 1979; Hirai et al. 1981;

Ward et al., 1981; Kosanovic et al., 1983; Zidovska et al., 1989; Mascarello and Hubbard, 1991; Van den Boogaard et al., 1991; Luberda-Zapasnik et al., 1995; Levy et al. 1998; Stratakis et al., 2000; Giardino et al., 2001; Brisset et al., 2002; Chen et al., 2003; Piram et al., 2003]. Nevertheless, approximately half of them were secondary to chromosome rearrangements resulting concurrently in deletions or duplications for a second chromosome. Accordingly, only some of these reports are useful in defining chromosomal regions associated with particular phenotypes.

However, only thirteen cases produced de novo had been reported, seven of them as direct duplications [Hirai et al., 1981; Ward et al., 1981; Romain et al., 1984; Fryns et al., 1990; Mascarello and Hubbard, 1991; Engelen et al., 1999; Stratakis et al. 2000], one as intrachromosomal duplication [Levy et al. 1998]; four as de novo translocations [Houlston et al., 1994; Eggermann et al., 1998; Bacino et al., 1999; Brisset et al., 2002] and one case with a marker chromosome [Masuno et al., 2000]. On the other hand, only eight patients had a proximal duplication of 16q, involving various intervals from 16p11 to 16q22 [Ward et al., 1981]; from 16q11 to 16q13 [Romain et al., 1984; Fryns et al., 1990; Engelen et al., 1999], from 16q11 to 16q21 [Machin and Crolla, 1974; Stratakis et al. 2000], from 16q12 to 16q13 [Mascarello and Hubbard, 1991] and from 16q12.1-q22.1 [Levy et al. 1998].

In this work we report the second case of a de novo partial trisomy 16q, involving the region 16q12.1-q22.1, in a two-year-old girl with slight dysmorphic features and behavioural abnormalities. Clinical effects are compared with those partial trisomies 16q previously published, especially with the nine-year-old female reported by Levy et al. (1998) carrying exactly the same chromosomal segment duplication trying by that to establish a phenotype-genotype correlation for this specific chromosomal region.

CLINICAL REPORT

This 2-year-old female, was the first child with healthy unrelated 33 and 35-year-old parents. Their relatives did not have a history of congenital malformations. During the last month of pregnancy complete rest was required since prenatal ultrasound detected IUGR. The child was already born after a 38 weeks of gestation, by caesarean section due to no fetal progression and bradycardia.

At birth the child weighted 2.480 gr. and its head circumference was on P-10. There were no perinatal problems except for a hypertonia and hyper reflexia during its first year of life. At the age of 4 months, the child required an examination at the Paediatric Clinic due to a serious continuous and inconsolable crying (80% of the day). Physical exam revealed weight and head circumference on P-25, and height on P3-P10. Examination did not reveal gross dysmorphic stigmata except for dysplastic ears, lacrimal duct stenosis and left preauricular pit. She also presented feet deformities including a metatarsus adductus. Periorbital edema, hypertelorism and sublingual frenulum were not observed. Nuclear magnetic resonance scan disclosed a mielinization delay, considered as a normal variant. She did not show any cardiac, vertebral or internal anomalies (Fig. 1).

However, behavioural abnormalities focused the clinics of this child since birth; inconsolable crying, problems to become and stay asleep, with REM sleep almost non-existent and a serious attention deficit disorder required an exhaustive study. Her intellectual growing advanced indeed slowly: until the first year of life she did not show social smile and it was nearly impossible to establish any communication; at the 13th month she was able to get up but with assistance, starting to walk at 1 ½ years. The child was feeding well. Up to now she disposed on a good muscular tone but she still did not start speaking suffering as well known sleeping problems.

CONVENTIONAL AND MOLECULAR CYTOGENETIC ANALYSES

Cytogenetic analysis was performed on cultured lymphocytes from peripheral blood during 72 hours in RPMI-1640 medium, supplemented with a 20% fetal calf serum and phytohaemagglutinin. Chromosomes were harvested according to standard procedures being analyzed later on following Wright G-banding and C-banding techniques.

In order to identify the origin of the chromosomal material implicated in the unbalanced chromosome alteration detected by G-banding, a FISH analysis was performed using whole chromosome painting probes (Cambio Ltd. UK) following the supplier's recommendations.

CGH and HR-CGH analyses had been used in order to determine the specific chromosome region implicated in the anomaly. For this methodology, a high-molecular-weight test DNA was extracted from a peripheral blood sample of the patient according to conventional methodology. DNA labelling, hybridization and detection were carried out according to standard procedures with minor modifications [Kallionemi et al., 1994] and following the supplier's instructions (Vysis, Downer Grove, IL, USA). Slides were analyzed using a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK).

RESULTS

Analysis of G-banded chromosomes revealed the presence of a structurally abnormal chromosome 16 in all analyzed metaphases and a polymorphic inversion of chromosome 9. C-bands discarded the presence of two centromeres in the abnormal chromosome 16. Parental karyotypes were karyotypes were considered as normal, her father carried the inv(9)(p11q12) also observed in the daughter.

FISH with chromosome 16-specific paint, showed that the extra material derived from chromosome 16.

Subsequently, CGH and HR-CGH confirmed the gain of a specific 16 chromosome region. It is interesting to note, that the analysis of the same metaphases realized by means of the two different softwares showed differences with respect to the size of the gained segment: 16q12.1-q22.1 defined by CGH and 16q12.2-q22.1 by HR-CGH (Fig. 2).

Subsequently, having realized an accurate examination, combining conventional cytogenetics, CGH and HR-CGH results, we concluded that whole 16q12.1 band was present on the duplicated fragment.

Banding pattern we also observed that the duplicated fragment was joined with an identical orientation, concluding that the child got a direct tandem duplication (Fig.3).

Thus, the child had a nonmosaic trisomy of the 16q12.1→q22.1 segment, which originated de novo because the parental karyotypes were normal. The karyotype of the patient was redefined as:

46,XX,inv(9)(p11q12),ins(16;?)(q22.3;?).ish dup(16)(wcp 16+)
.rev ish enh(16q12.1q22.1)

DISCUSSION

The first case of a partial 16q trisomy of an unspecified length, was studied by autoradiography and had been reported by Eriksson et al [1971]; however this child was also deficient regarding a segment of the long arm of chromosome 18. Since then, most patients described with partial 16q trisomy, represent an unbalanced consequence of a parental reciprocal balanced autosomal translocation which often presents deletions or duplications of a second chromosome. This fact makes it difficult to establish a phenotype-genotype correlation in this heterogeneous group of patients. In spite of this, the

phenotypic expression of partial trisomy 16 is relatively well defined, presenting a wide spectrum of abnormalities. Recently, in a review published by Brisset et al. [2002] the described patients showed a great number of congenital malformations and dysmorphic stigmata.

In Table I and Figure 4, we have summarized all cases described until now, with “pure” and nonmosaic partial trisomy 16q (including the present patient). The term “pure” is referred to a partial trisomy not associated with a monosomy or trisomy for another chromosomal segment. As imbalances for the short arms of acrocentric chromosomes only have a minor or none significant effect, we consider these cases as exhibiting the specific phenotype of partial trisomy 16q. Many features, such as low birth weight, psychomotor retardation, ear anomalies, hypotonia and mental retardation are common to many other unbalanced chromosome abnormalities. However, other features, such as marked failure to thrive, decreased subcutaneous fat, flexion abnormality of fingers and limbs, and a common facial appearance comprising a high forehead, small palpebral fissures, thin upper lip, and long philtrum seem to be fairly characteristic of most patients with 16q duplications.

Generally partial trisomy 16 is not compatible with long term survival. Garau et al [1980] postulated that trisomy 16q is mainly responsible for the total prenatal lethality of the full trisomy 16. Certainly, total duplication of 16q has regularly led to early postnatal death. Table I shows that postnatal survival in pure and nonmosaic partial trisomy 16q ranges between 1 day and 34 years, with death of most individuals during the first weeks of life. The extent of the duplication seems to represent the most important prognostic determinant. In those cases with almost complete duplication of the long arm of chromosome 16 (q11→qter or q13→qter) die during first weeks of life, whereas the few long-term survivors (up to 34 years) show shorter duplications of the proximal region only

(16q11.2-q13). According to this information, it is probable that our patient will have a long survival.

Levy et al. [1998] reported a nine-year-old female with the following karyotype: 46,XX,add(16p),ish dup inv ins(16)(p11.2q22.1q12.1)(pcp16p+;pcp15q++).rev ish enh(16)(q12.1q22.1), showing markedly delayed expressive language skills, microcephaly, low height and weight, down-slanted palpebral fissures, hypertelorism, low-set ears, preauricular pits, malar hypoplasia, long smooth philtrum, micrognathia, hand and foot deformities including: brachydactyly, clinodactyly, syndactyly, left hand polydactyly and left foot with six toes. She also showed enlarged liver and spleen, primary pulmonary hypertension and high arched palate. In spite of having got the same duplicated chromosomal region as in our case, her phenotype seemed more affected, presenting severest hand and foot abnormalities as well as internal organ anomalies. This fact could be the consequence of the presence of an additional breakpoint in 16p11.2 band. However both cases seem to share some of the clinical features as the markedly delayed expressive language skills and the preauricular pits.

Our patient only showed slight facial dysmorphism: dysplastic ears, lacrimal duct stenosis and left preauricular pit. Other features, observed in other 16q trisomies which are not observed in our patient, are likely the consequence of a more distal trisomy.

The most important finding regarding our patient is the presence of behavioural abnormalities: a serious continuous and inconsolable crying, 80% of the day, (since birth but absent at present), problems to become and stay asleep, with REM sleep almost non-existent, a serious attention deficit disorder, absence of a social smile and lack of communication until a few months ago, and the long delay of a language development. Reviewing all cases described of 16q duplication (free from monosomy or trisomy for a second chromosomal segment) including our case, we have observed that serious behavioural problems only appear in those cases with proximal duplications, such as

16q11-q13 [Romain et al., 1984; Fryns et al., 1990; Engelen et al., 1999], 16q11-q21 [Stratakis et al., 2000] and obviously 16q12.1-q22.1 [Levy et al., 1998]. It is possible that these problems could not be registered in the other reported cases with almost all 16q duplicated due to their short survival, although this problem appears rather early (at 4 months in our patient) as in the case of Fryns et al [1990] (at 3 years). Our conclusion is that all these observations show that distal duplications are not implicated in behavioural disorder. This indicates that there could be a relationship between proximal duplication and behavioural problems, and supports the hypothesis recently suggested by Brisset et al [2002] according to which behavioural abnormalities were correlated to chromosomal band 16q11-q13. However, Ward et al [1981], in a patient with a 16p11-q22 duplication did not observe any behaviour abnormalities. Moreover, according to above observations, we suppose that a gene(s) with a role in the control of normal behaviour, essentially related to sleep, could be located on 16q12.1-q13; this chromosomal region contains 122 genes, of which only 29 are labelled (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/cyto/hrbc.shtml>).

We conclude the clinical consequences of 16q duplications may be related to the size of genetic material gained (amount of euchromatin) and/or the disruption of a gene(s) localized at the boundaries of the duplicated region. Although each patient described is unique, because even though duplicated regions may overlap the boundaries of the lesions, they are almost always different (Fig.4), the phenotype-genotype correlation may be useful to predict the clinical course of these patients, although questions arise about the function of the genes that are duplicated.

The use of molecular cytogenetics methods (FISH and CGH) has allowed the precise characterization of a great number of constitutional chromosome aberrations, especially in patients with mental retardation and apparent normal karyotype [Ness et al., 2002; Kirchhoff et al., 2001]. In the present case, the slight discrepancy observed in the size of the fragment gained detected by two softwares: CGH and HR-CGH (Fig. 2) is due to an

exclusion of the conflictive region, 16p11.1-q12.1, near by the centromeric region, by the dynamic standard reference interval used in HR-CGH [Kirchhoff et al., 1998]. This observation suggests that interpretation of CGH and HR-CGH profiles requires a certain prudence and that the combined interpretation with G-bands in constitutional chromosome abnormalities is absolutely necessary.

This is the second published case referring to congenital malformations, especially behaviour abnormalities, associated with a duplication 16q12.1-q22. The review of the clinical findings in the seven patients reported in the literature with pure proximal duplications, including our patient, suggests on one hand that proximal duplication 16q is not a life-threatening chromosome aberration, but is accompanied by moderate to severe behavioural abnormalities, and on the other hand that duplications of more distal parts of 16q seem to be responsible for the dysmorphism and internal organ malformations involving a shorter survival.

Acknowledgements

Financial support was given by SAF (2003-03894) and CIRIT (2001, SGR-00201)

REFERENCES

Bacino CA., Lee B, Spikes AS, Shaffer LG. 1999. Trisomy 16q in a female newborn with a de novo X;16 translocation and hypoplastic left heart. *Am J Med Genet* 82:128-31.

Balestrazzi P, Giovannelli G, Landucci Rubini L, Dallapiccola B. 1979. Partial trisomy 16q resulting from maternal translocation. *Hum Genet* 49:229-35.

Benn P. 1988. Trisomy 16 and trisomy 16 mosaicism. *Am J Med Genet* 79:121-33.

Brisset S, Joly G, Ozilou C, Lapierre JM, Gosset P, LeLorc'h M, Raoul O, Turleau C, Vekemans M, Romana SP. 2002. Molecular characterization of partial trisomy 16q24.1-pter: Clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet* 113:339-45.

Chen CP, Lin SP, Chern SR, Shih SL, Lee CC, Wang W, Liao YW. 2003. Perinatal findings and molecular cytogenetic analysis of trisomy 16q and 22q13.3 deletion. *Prenat Diagn* 23:504-8.

Cusick W, Bork M, Fabri B, Benn P, Rodis JF, Buttino L Jr. 1995. Trisomy 16 fetus surviving into the second trimester. *Prenat Diagn* 15:1078-81.

Duca-Marinescu D, Melia P, Ionescu-Cerna M, Georghe V, Joan D, Maxmilian C. 1979. Partial trisomy for the long arm of chromosome 16: 46,XY,der(13)t(13;16)(p12;q13). *Acta Med Auxol* 11:171-74.

Eggermann T, Kolin-Gerresheim I, Gerresheim F, Schwanitz G. 1998. A case of de novo translocation 16;21: trisomy 16q phenotype and origin of the aberration. *Ann Genet* 41:205-8.

Engelen JJ, de Die-Smulders CE, Dirckx R, Verhoeven WM, Tuinier S, Curfs LM, Hamers AJ. 2002. Duplication of chromosome region (16)(p11.2→p12.1) in a mother and daughter with mild mental retardation. *Am J Med Genet* 109:149-53.

Engelen JJ, de Die-Smulders CE, Vos PT, Meers LE, Albrechts JC, Hamers AJ. 1999. Characterization of a partial trisomy 16q with FISH. *Ann Genet* 42:101-4.

Eriksson B, Fraccaro M, Hulten H, Lindsten J, Thoren C, Tiepolo L. 1971. Structural abnormalities of chromosome 18. II. Two familial translocations, B/18 and 16/18, ascertained through unbalanced forms. *Ann Genet* 14:281-90.

Francke U. 1972. Quinacrine mustard fluorescence of human chromosomes: characterization of unusual translocations. *Am J Med Genet* 24:189-213.

Fryns JP, Kleczkowska A, Decock P, Van Den Berghe H. 1990. Direct duplication 16q11.1→16q13 is not associated with a typical dysmorphic syndrome. *Ann Genet* 33:46-8.

Garau A, Crisponi G, Peretti D, Vanni R, Zuffardi O. 1980. Trisomy 16q21 = to qter. *Hum Genet* 53:165-67.

Giardino D, Finelli P, Gottardi G, Clerici D, Mosca F, Briscioli V, Larizza L. 2001. Cryptic subtelomeric translocation t(2;16)(q37;q24) segregating in a family with unexplained stillbirths and a dysmorphic, slightly retarded child. *Eur J Hum Genet* 9:881-6.

Hirai S, Ujiié J, Suzuki J, Hishiyama S, Tsukanishi A, Muramoto J, Kano H, Suzuki H. 1981. Duplication of the long arm of chromosome 16. *Jpn J Pediatr* 34:1963-67.

Houlston RS, Renshaw RM, James RS, Ironton R, Temple IK. 1994. Duplication of 16q22-->qter confirmed by fluorescence in situ hybridisation and molecular analysis. *J Med Genet* 31:884-87.

Kallionemi OP, Kallionemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* 10:231-43.

Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. 1998. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 31:163-73.

Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. 2001. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38:740-44.

Kosanovic M, Lopacic L, Diklic V, Nikolis J. 1983. Partial trisomy 16q in the son resulting from paternal 16/21 translocation. *Acta Med Iugosl* 37:335-40.

Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K. 1998. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet Med* 1(1):4-12.

Luberda-Zapasnik J, Midro AT, Szwalkiewicz-Warowicka E. 1995. Syndrome of congenital malformations and dysmorphic features in a newborn with partial trisomy 16q due to maternal translocation t(9;16)(p24;q13). *Pediatr Pol* 70:769-73.

Machin GA, Crolla JA. 1974. Chromosome constitution of 500 infants dying during the perinatal period. With an appendix concerning other genetic disorders among these infants. *Humangenetik* 23:183-98.

Mascarello JT, Hubbard V. 1991. Routine use of methods for improved G-band resolution in a population of patients with malformations and developmental delay. *Am J Med Genet* 38:37-42.

Masuno M, Ishii T, Tanaka Y, Ohyama M, Kawataki M, Kimura J, Imaizumi K, Kuroki Y. 2000. De novo trisomy 16p11.2-qter: report of an infant. *Am J Med Genet* 92:308-10.

Ness GO, Lybaek H, Houge G. 2002. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 113:125-36.

Nevin NC, Coffey WW, Nevin J, Reid MM. 1983. Partial trisomy 16q in two boys resulting from a maternal translocation, t(15;16)(p12;q11). *Clin Genet* 24:375-9.

Paladini D, D'Agostino A, Liguori M, Teodoro A, Tartaglione A, Colombari S, Martinelly P. 1999. Prenatal findings in trisomy 16q of paternal origin. *Prenat Diagn* 19:472-75.

Pérez-Castillo A, Martin-Lucas MA, Abrisqueta JA. 1990. Duplication 16q12-qter arising from 3:1 segregation in a 46,XX,t(13;16) (q12;q12) mother. *Ann Genet* 33:121-3.

Piram A, Ortolan D, Peres LC, Pina-Neto JM, Riegel M, Schinzel A. 2003. Newborn with malformations and a combined duplication of 9pter-q22 and 16q22-qter resulting from unbalanced segregation of a complex maternal translocation. *Am J Med Genet* 120A:247-52.

Ridler MA, McKeown JA. 1979. Trisomy 16q arising from a maternal 15p;16q translocation. *J Med Genet* 16:317-20.

Romain DR, Frazer AG, Columbano-Green LM, Parfitt RG, Smythe RH, Chapman CJ. 1984. Direct intrachromosomal duplication of 16q and heritable fragile site fra(10)(q25) in the same patient. *Am J Med Genet* 19:507-13.

Savary JB, Vasseur F, Manouvrier S, Daudignon A, Lemaire O, Thieuleux M, Poher M, Lequien P, Deminatti MM. 1991. Trisomy 16q23-qter arising from a maternal t(13;16)(p12;q23): case report and evidence of the reciprocal balanced maternal rearrangement by the Ag-NOR technique. *Hum Genet* 88:115-8.

Schmickel R, Poznanski A, Himebaugh J. 1975. 16q Trisomy in a family with a balanced 15/16 translocation. *Birth Defects* 5:229-36.

Stratakis CA, Lafferty A, Taymans SE, Gafni RI, Meck JM, Blancato J. 2000. Anistomasia associated with interstitial duplication of chromosome 16, mental retardation, obesity, dysmorphic facies, and digital anomalies: Molecular mapping of a new syndrome by Fluorescence in situ hybridization and microsatellites to 16q13 (D16S419-D16S503). *J Clin Endocrinol Metab* 85:3396-401.

Van den Boogaard MJ, De Pater J, Hennekam RC. 1991. A case with laringuella atresia and partial trisomy 9 due to maternal 9;16 translocation. *Genet Couns* 2:83-91.

Ward BE, Bradley CM, Cooper JB, Robinson A. 1981. Homodacentric chromosomes: a distinctive type of dicentric chromosome. *J Med Genet* 18:54-8.

Yancey MK, Hardin EL, Pacheco C, Kuslich CD, Donlon TA. 1996. Nonmosaic trisomy 16 in a third-trimester fetus. *Obstet Gynecol* 87:856-60.

Young SR, Donovan DM, Greer HA, Burch K, Potter DC. 1976. Tertiary trisomy, 47,XX,+14q-, resulting from maternal balanced translocation, 46,XX,t(14;16)(q11;q24). *Hum Genet* 33:331-34.

Yunis E, Gonzalez JT, Torres de Caballero OM. 1977. Partial trisomy 16q. *Hum Genet* 38:347-50.

Zidovska J, Bobekova A, Stloukalova M, Svarcova M. 1989. 16q+ partial trisomy in a 7-day-old surviving neonate. *Cesk Pediatr* 44:608-9.

Table I. Clinical features of our case and previously described cases with partial trisomy 16q free from monosomy or trisomy for a second chromosomal segment.

References	Chromosomal region duplicated	Survival	Psychomotor retardation	Periorbital edema	Muscle tone	Congenital heart defects	Dysmorphic facies	Hand and foot deformity	Behavioural abnormalities
Ward et al., (1981)	p11→q22	?	+	-	Hypotonic	+	+	-	-
Schimckel et al. (1975)	p11→qter	7 weeks	+	-	Hypotonic	+	+	+	-
Masuno et al. (2000)	p11.2→qter	4 months		-	Hypertonic	+	+	+	
Engelen et al. (1999)	q11.2→q13	28 yr/living	+	-	Hypotonic	-	Not gross	-	Self-destructive behaviour spastic quadriplegia impossible communication
Fryns et al. (1990)	q11.1→q13	3 yr/living	+	-	Normal	-	Not gross	+	Hiperkinetic behaviour attention deficit disorder
Romain et al. (1984)	q11.2→q13	34 yr/living					+		Mildly aggressive
Stratakis et al. (2000)	q11→q21	22 yr/living	-	-	Normal	-	+	-	Attention deficit disorder
Yunis et al. (1977)	q11→qter	5 mo/living		-	Normal	-	+	+	
Ridler and McKeown (1979)	q11→qter	12 days	+	+	Normal	+	+	-	
Nevin et al.,(1983)	q11→qter	5 weeks ?	+	+	Hypotonic	+/-	+	+	-
Eggermann et al. (1998)	q11.2→qter	1 yr/living	+	-	Hypotonic	+	+	+	-
Levy et al. (1998)	q12.1→q22.1	9 yr/living	-	-		-	+	+	Markedly delayed expressive language skills
Perez-Castillo et al. (1990)	q12→qter	15 days	+	-	Hypotonic	-	+	+	
Hirai et al. (1981)	q13→q24	11 months			Hypotonic	+	+	+	-
Balestrazzi et al. (1979)	q21→qter	3 yr/living	+	+	Hypertonic	-	+	+	-
Savary et al. (1991)	q23→qter	6 mo/living	+	-	Hypotonic	-	+	-	-
Present case	q12.1→q22.1	2 yr/living	+	-	Hypertonic until 1 yr	-	Not gross	+	Attention deficit disorder

Figure legends

Figure 1. Pictures of our patient.

Figure 2. CGH and HR-CGH profiles of chromosome 16, showing a gain of 16q12.1-22.1 by CGH (a); and a gain of 16q12.2-q22.1 by HR-CGH (b).

Figure 3. Idiograms of chromosome 16 representing the duplication present in this patient.

Figure 4. The diagram shows all partial and pure trisomies 16q described so far. Our case report is indicated on the left in red color and the others cases previously described on the right: *) Levy et al. 1998 a) Ward et al., 1981; b) Masuno et al. 2000; c) Schmickel et al. 1975; d) Romain et al. 1984; e) Fryns et al. 1990; f) Engelen et al. 1999; g) Stratakis et al., 2000; h) Yunis et al. 1977; i) Eggermann et al., 1998; j) Ridler and McKeown, 1979; k) Nevin et al. 1983; l) Mascarello and Hubbard, 1991; m) Pérez-Castillo et al. 1990; n) Hirai et al., 1981; o) Balestrazzi et al., 1979; p) Savary et al. 1991.



Figure 1.

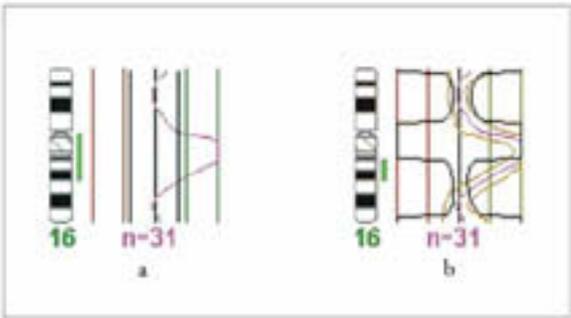


Figure 2.

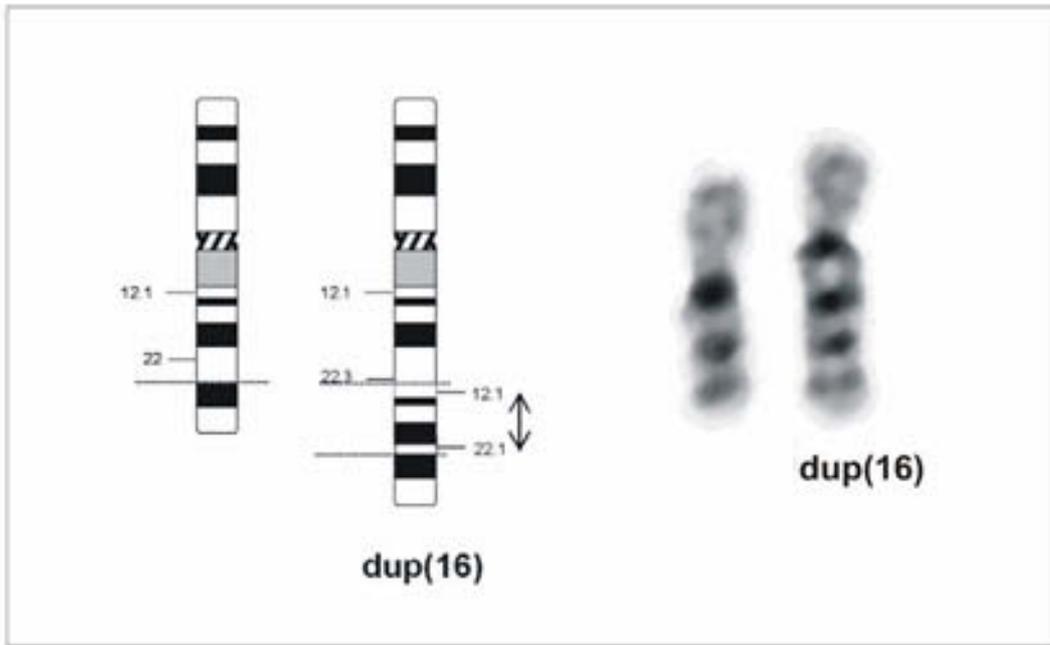


Figure 3.

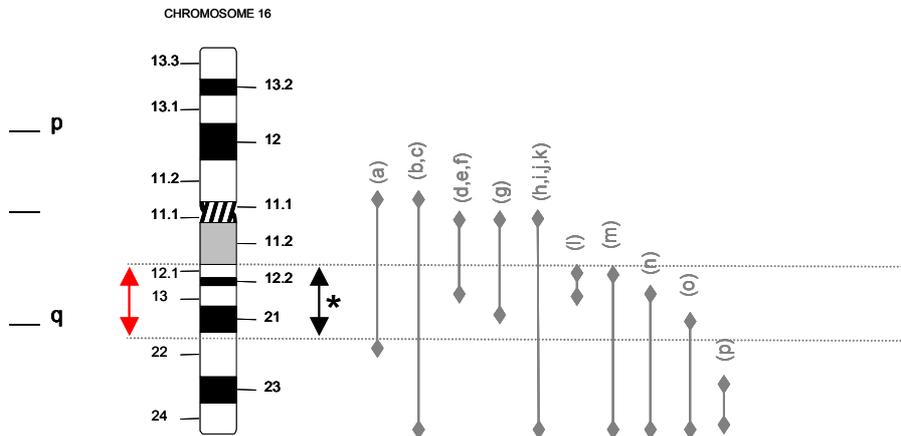


Figure 4.

ARTÍCULO 5.

Hernando C, Grao P, Balaguer A, Soler C, Egozcue J, Fuster C.

“Identification of potentially critical chromosome regions implicated in clinical disorders by molecular cytogenetics in two patients with partially cryptic complex chromosome rearrangements”

Enviado para publicación.

**IDENTIFICATION OF POTENTIALLY CRITICAL CHROMOSOME REGIONS
IMPLICATED IN CLINICAL DISORDERS BY MOLECULAR CYTOGENETICS IN
TWO PATIENTS WITH PARTIALLY CRYPTIC COMPLEX CHROMOSOME
REARRANGEMENTS**

Hernando C¹⁻², Grao P², Balaguer A³, Soler C⁴, Egozcue J¹, Fuster C¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain. ²Departamento de Genética. CERBA Internacional. Sabadell. Spain. ³Servicio de Pediatría. Hospital Sant Joan de Reus. Tarragona. Spain. ⁴Sección de Lactantes. Complejo Hospitalario Xeral-Cies. Vigo. Spain.

Running title: Cryptic CCRs identified by molecular cytogenetics.

Address for correspondence: Carme Fuster

Unitat de Biologia. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. E-08193. Bellaterra. Barcelona. Spain.

FAX 34 -93 / 581 10 25
Telf. 34-93 / 581 12 73
e-mail:carme.fuster@uab.es

ABSTRACT

Complex chromosome rearrangements (CCRs) are unusual findings. Up to now, only about one hundred cases have been reported, most of them *de novo*. In two probands with an abnormal phenotype, we have found two *de novo* partially cryptic CCRs, characterized postnatally by G-band analysis, conventional fluorescence in situ hybridization (FISH), multicolor-FISH (M-FISH) and high resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH). Patient 1 was a two-year-old infant with paroxysmal torticollis and some features vaguely reminiscent of trisomy 21. Conventional G-banding showed a *de novo* CCR involving chromosomes 1, 4, 6 and 11. M-FISH (24 colours) confirmed the presence of this reorganization. However, a subsequent FISH study using whole chromosome painting probes for the chromosomes involved in the rearrangement disclosed two cryptic insertions in the same derivative chromosome: der(6) t(6;11;4;1;4), previously undetected by M-FISH. Patient 2 was a twelve-year-old child referred for a maturity delay. G-banding showed the presence of a *de novo* CCR involving chromosomes 7, 14 and 15. Subsequent M-FISH showed a more complex CCR, disclosing an insertion of chromosome 7 into the derivative 15 chromosome. No apparent deletions or duplications were identified by HR-CGH in both of them. Our findings pinpoint six possible chromosomal regions of interest, adjacent to the breakpoints (1q43, 4q21, 4q33, 6p21.3, 6q15 and 11q22) for the development of paroxysmal torticollis and five possible chromosome bands (7p13, 7q32, 7q36, 14q11.2 and 15q15) related to cortical atrophy, congenital lens subluxation and bilateral magna myopia.

KEYWORDS: complex chromosome rearrangement, cryptic chromosome rearrangement, abnormal phenotype, phenotype-genotype correlation, FISH, HR-CGH.

INTRODUCTION

Reciprocal translocations and inversions are found in approximately 0.1‰ and 0.2‰ of newborns¹. Reciprocal translocations result from an exchange of segments between two chromosomes implicating two breakpoints; inversions result from a two break event with a 180° rotation of an intercalary segment within a single chromosome. However, an insertional translocation, also called “insertion”, requires at least three breaks: two in one chromosome and a third break in another chromosome, or in the case of insertional shifts, three breaks in the same chromosome.

Complex chromosomal rearrangements (CCRs) have been defined as constitutional structural rearrangements that involve three or more chromosomes or have more than two breakpoints². CCRs are unusual structural rearrangements. Up to now, about one hundred cases have been reported, most *de novo*³⁻⁴. These rearrangements, when inherited, are usually transmitted from a carrier mother, while the *de novo* cases typically arise during spermatogenesis⁵. Most patients with *de novo* CCRs have been ascertained due to abnormal phenotypes in the offspring, recurrent spontaneous abortions, occasionally in males with oligo or azoospermia and finally in individuals with an abnormal phenotype.

Accurate determination of CCR breakpoints is important, not only for genotype-phenotype correlation but also for mapping genes. CCR characterization can often be difficult using standard banding technique alone. The development of new molecular cytogenetic technologies, such as conventional and multicolour (24 colours) fluorescence in situ hybridization (FISH) provide the possibility to quickly detect and identify complex chromosomal rearrangements⁶⁻¹¹. Comparative genomic hybridization (CGH), particularly with high resolution-CGH (HR-CGH), has been employed effectively to detect genetic imbalances >3 Mb¹²⁻¹⁴. Recently, Vermeulen et al.¹⁵ have described the useful combination of G-banding, FISH and CGH data to accurately locate the breakpoints in CCRs.

Here, we characterize two new CCRs detected postnatally, in children with abnormal phenotypes, using conventional and multicolour FISH techniques. The application of HR-CGH showed the existence of an “apparently” balanced CCR in both cases.

CASE REPORTS

Patient-1. A two-year-old infant was referred for two episodes of head-tilting to one side, which lasted several hours and then disappeared. She had no vomits, regurgitations or neurological symptoms. Since the neurological examination was normal, her condition was diagnosed as paroxysmal torticollis. She was the first child from a healthy 22-year-old mother. The parents had no consanguinity and did not have a family history of congenital malformations. After a normal pregnancy, the proband was born at term, weighted 3.080 g., and her Apgar score was 9/10/10. Her development and pondostatural evolution have been normal until now. She did not have prominent features, although some of her facial characteristics were slightly reminiscent of syndromic babies. She had a rather hypopigmented skin, round face, slightly flat facial profile, broad forehead, depressed nasal bridge, anteverted nostrils, small mouth with thick lips and long philtrum, and low set ears. She also had hypertelorism, palpebral fissures with epicanthal folds that slanted slightly upwards and light blue irises. Other physical and neurological examinations were normal. Since some of the baby’s features were vaguely reminiscent of trisomy 21, a cytogenetic study to discard a low grade mosaicism of trisomy 21 was requested.

Patient-2. A twelve-year-old girl was referred for cytogenetic study due to maturity delay. Her parents had no consanguinity and their relatives did not have a history of congenital malformations except for a renal duplication, vesicouretral reflux and myopia present in the mother. The proband was born at term after a normal pregnancy and no neonatal problems were noted. She was seen

when she was one year old due to an episode of fever and convulsions. Joint hyperlaxity and general hypotonia was observed, and she was diagnosed of cortical atrophy, congenital lens subluxation and bilateral magna myopia. During childhood she had apneas/hypoapneas and was operated of tonsils and adenoids. At present, she has enuresis at night and requires speech therapist assistance at school. She has an acceptable psychomotor development in spite of being a little bradipsychic and has generalized hypotonia and low muscular development, basically in the lower extremities. Her E.E.G and E.M.G. are normal.

MATERIAL AND METHODS

Conventional cytogenetic analysis. Metaphase chromosome preparations were obtained from PHA-stimulated lymphocyte cultures from patients and both parents, according to standard procedures. Chromosome banding was produced by the standard Wright-G-banding technique.

FISH analyses. To better determine the CCRs previously detected by G-banding and discard any undetected subtle rearrangement, M-FISH was performed using a set of combinatorial labelled 24 colour whole chromosome paints (SpectraVysion probe), according to the manufacturer instructions (Vysis, Downers Grove, IL). Digital fluorescence imaging was performed using a Olympus BX-60 epifluorescence microscope and SpectraVysion software (Vysis). To confirm the M-FISH findings, conventional FISH analyses were carried out using whole chromosome painting probes (WCP) specific for the chromosomes implicated in both CCRs according to the manufacturer specifications (Cambio).

CGH analysis. To corroborate the presence of an “apparently balanced” CCR in these patients, CGH (specially HR-CGH) was used. CGH analysis was carried out according to standard procedures¹² with minor modifications. The software performed a calculation of the patient DNA

to normal DNA fluorescent ratios along the length of each chromosome. Aberrations were detected by standard reference intervals as described Kirchhoff *et al*⁴.

RESULTS

G-banding chromosome analysis of both children, detected the existence of a CCR in all cells analyzed. The karyotype of patient-1 revealed the presence of a CCR which was interpreted as involving 4 breakpoints and 4 derivative chromosomes: 1, 4, 6 and 11 (Fig. 1a). The karyotype of patient-2 showed a CCR with a derivative chromosome 7, resulting from a 7p13-q32 inversion and 7q36 deletion; moreover, a reciprocal translocation between chromosomes 14 and 15 was observed (Fig. 2a). Parental karyotypes were normal in both cases indicating a *de novo* origin of the CCRs.

M-FISH confirmed the presence of the CCR in patient-1 and additionally the possible existence of an interstitial translocation from material of chromosome 1 in the derivative chromosome 6 previously undetected by G-band analysis (Fig. 1b). In patient-2, M-FISH revealed a chromosome 7 insertion in the derivative chromosome 15 besides the presence of the t(14;15) discarding the 7q36 deletion previously suggested (Fig. 2b).

FISH analysis using specific WCP probes for the chromosomes involved in the CCRs confirmed M-FISH results in both cases (Fig.1c, 2c). Moreover, the presence of an insertion of chromosome 11 in the derivative chromosome 6, previously unsuspected by M-FISH (Fig.1d), was detected in patient-1.

HR-CGH did not show any gains or losses of chromosome material in these patients suggesting the existence of an apparently balanced CCR.

Based on G-banding and conventional and multicolour FISH data, we identified the breakpoints implicated in these CCRs.

Patient-1 had a karyotype:

46,XX,der(1)t(1;6)(q43;q15),der(4)t(4;11)(q21;q22),der(6)t(6;11;4;1;4)(p21.3q15;q22;q21q33;q43;q33),der(11)t(6;11)(p21.3;q22). (Fig.1e)

and patient-2:

46,XX,der(7)inv(7)(p13q32)ins(15,7)(q15;q36.1q36.3),t(14;15)(q11.2;q15) (Fig.2d)

DISCUSSION

CCRs with more than four breakpoints are uncommon, and *de novo* rearrangements predominate in this group. Exact determination of the breakpoints in any chromosomal reorganization is necessary to establish phenotype-genotype correlations and to identify genes implicated in specific clinical disorders.

In our study, although the two CCRs were cytogenetically visible after G-banding analysis and were characterized by M-FISH, the two cryptic interstitial translocations in patient-1 were not appreciated until FISH studies using specific whole painting probes were done. M-FISH detected a chromosome 7 insertion in patient-2, the size of which would be >1Mb according to the limitation defined in this technique¹⁶. Our results, as well as those of other authors^{6-11,15}, show again the useful combination of G-banding, conventional and multicolour FISH to precisely characterize CCRs.

HR-CGH analyses did not detect any chromosomal deletions >3 Mb in any of them. Thus, the abnormal phenotypes observed in our patients with “apparently balanced” CCRs, may be related to cryptic deletions, as a consequence of the complex rearrangement, undetectable by HR-CGH, or more probably to the disruption of genes at the site of multiple breakpoint recombination.

Reviewing the literature, from the approximately 37 postnatal balanced CCRs described up to now with 5 or more breakpoints, 26 had an altered phenotype. Most of them show inversions and insertional translocations affecting different chromosomes and breakpoints. It is interesting to note, that while simple insertional translocations are unusual chromosomal rearrangements¹⁷ they are often present in CCRs. Our findings support this fact, because FISH analyses confirmed the insertion of regions 1q43-qter and 11q22 on chromosome 6 in patient-1 and the presence of 7q36 band inserted into the derivative 15 in patient-2.

Several studies carried out in CCRs have shown that chromosomes and breakpoints involved are not random. Chromosomes 3 and 7 are the most frequently involved followed in decreasing order by 1, 5, 8, 6, 4, 12, 2, 10, 21, 9, 11 and 14¹⁸. In our study, we have observed the implication of chromosomes 1, 4, 6 and 11 (patient-1) and chromosomes 7, 14, 15 (patient-2). All of them, with the exception of chromosome 15, are considered as more affected in the literature, specially chromosome 7, that was involved in patient-2 CCR with three breakpoints. The chromosome bands more implicated in CCRs were reviewed by Batanian and Eswara³ and Vermeulen et al.¹⁵. The comparison of these CCRs and the four studied by Vermeulen et al.¹⁵ with the two cases described here, shows that with the exception of 15q15, all breakpoints implicated in our CCRs have been previously described in the literature. So far, chromosome band 4q21 has been described in six CCRs; 6p21 in five CCRs; 7q32 and 7q36 in four CCRs; 1q43 and 7p13 in three CCRs; 4q33, 6q15 and 14q11.2 in three CCRs and finally 11q22 in two CCRs.

In general, CCRs show a correlation between the number of breakpoints and the severity of clinical disorders^{3,5,19}. Moreover, mental retardation is a common feature of CCRs²⁰ associated to other signs. Our patients (with 5 and 7 breakpoints respectively) have a mildly altered phenotype in both cases, and neurological disorders in patient-2. The clinical pictures observed do not identify any known syndrome. However, our study has allowed to suggest new critical regions, where genes

related with paroxysmal torticollis (patient-1) and cortical atrophy, congenital lens subluxation and magna bilateral myopia (patient-2) could be located.

In sum, molecular cytogenetic analyses allow the precise characterization of CCRs. In our study we have identified two new *de novo* CCR with cryptical insertions combining conventional and multicolour FISH and standard G-banding results. An accurate localization of the chromosomal breakpoints implicated contributes to a more precise phenotype/genotype correlation, and also helps to identify the genes implicated in the corresponding pathology. Our findings have shown six possible chromosomal regions of interest (1q43, 4q21, 4q33, 6p21.3, 6q15 and 11q22), adjacent to the breakpoints, for the development of paroxysmal torticollis and five possible chromosome bands (7p13, 7q32, 7q32, 7q36, 14q11.2 and 15q15) related with cortical atrophy, congenital lens subluxation and bilateral magna myopia.

Acknowledgements

Financial support was given by SAF (2003-03894) and CIRIT (2001, SGR-00201)

REFERENCES

- 1 Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 1992; **29**: 103-108.
- 2 Pai GS, Thomas GH, Mahoney W. Complex chromosome rearrangements. *Clin Genet* 1980; **18**: 436-444.
- 3 Batanian JR, Eswara MS. De novo apparently balanced complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosomes 4, 18, and 21 in a girl with mental retardation: Report and review. *Am J Med Genet* 1998; **78**: 44-51.
- 4 Rothlisberger B, Kotzot D, Brecevic L *et al.* Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. *Eur J Hum Genet* 1999; **7**: 873-883.
- 5 Batista DA, Pai GS, Stetten G. Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. *Am J Med Genet* 1994; **53**: 255-263.
- 6 Fuster C, Míguez L, Miró R. Familial complex chromosome rearrangement ascertained by in situ hybridization. *J Med Genet* 1997; **34**: 164-166.
- 7 Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C *et al.* Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 1999; **65**: 448-462.

- 8 Kaiser-Rogers KA, Rao KW, Michaelis RC, Lese CM, Powell CM. Usefulness and limitations of FISH to characterize partially cryptic complex chromosome rearrangements. *Am J Med Genet* 2000; **95**: 28-35.
- 9 Kotzot D, Holland H, Kohler M, Froster UG. A complex chromosome rearrangement involving chromosome 8, 11, and 12 analyzed by conventional cytogenetic investigations, fluorescence in situ hybridisation, and spectral karyotyping. *Ann Genet* 2001; **44**: 135-138.
- 10 Borck G, Wirth J, Hardt T *et al.* Molecular cytogenetic characterisation of a complex 46,XY,t(7;8;11;13) chromosome rearrangement in a patient with Moebius syndrome. *J Med Genet* 2001; **38**: 117-121.
- 11 Houge G, Liehr T, Schoumans J *et al.* Ten years follow up of a boy with complex chromosomal rearrangement: going from a >5 to 15-breakpoint CCR. *Am J Med Genet* 2003; **118A**: 235-240.
- 12 Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J *et al.* Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **10**: 231-243.
- 13 Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001; **38**: 740-744.
- 14 Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998; **31**: 163-173.

- 15 Vermeulen S, Menten B, Van Roy N *et al.* Molecular cytogenetic analysis of complex chromosomal rearrangements in patients with mental retardation and congenital malformations: Delineation of 7q21.11 breakpoints. *Am J Med Genet* 2004; **124A**: 10-18
- 16 Lee C, Gisselsson D, Jin C *et al.* Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 1043-1047.
- 17 Van Hemel JO, Eussen HJ. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet* 2000; **107**: 415-432.
- 18 Lurie, IW, Wulfsberg EA, Prabhakar G, Rosenblum-Vos LS, Supovitz KR, Cohen MM. Complex chromosomal rearrangements: some breakpoints may have cellular adaptive significance. *Clin Genet* 1994; **46**: 244-247.
- 19 Ruiz C, Grubs RE, Jewett T *et al.* Prenatally diagnosed de novo apparently balanced complex chromosome rearrangements: Two new cases and review of the literature. *Am J Med Genet* 1996; **64**: 478-484.
- 20 Madan K, Nieuwint AW, Van Bever Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet* 1997; **99**: 806-815.

Titles and legends to figures

Figure 1. Conventional and molecular cytogenetic characterization of the CCR from patient-1: a) G-banded chromosomes involved in the CCR. On the left, the normal chromosomes are displayed, on the right, the derivative chromosomes; b) Multicolour karyotype; the arrowheads show der(1), der(4), der(6) and der(11); c) Metaphase spread hybridized with chromosome 1 painting probe; the arrowhead shows a small insertion in der(6); d) Metaphase spread hybridized with chromosome 11 painting probe; the arrowheads show two insertions, one in der(4) and another in der(6); and e) Idiograms of rearranged chromosomes.

Figure 2. Conventional and molecular cytogenetic characterization of the CCR from patient 2: a) G-banded chromosomes implicated in the CCR. On the left, the normal chromosomes are displayed, on the right, the derivative chromosomes; b) Multicolour karyotype; the arrowheads show der(7), der(14) and der(15); c) Metaphase spread hybridized with chromosome 7 painting probe; the arrowhead indicates chromosome 7 insertion into the derivative 15 chromosome; and e) Idiograms of rearranged chromosomes.

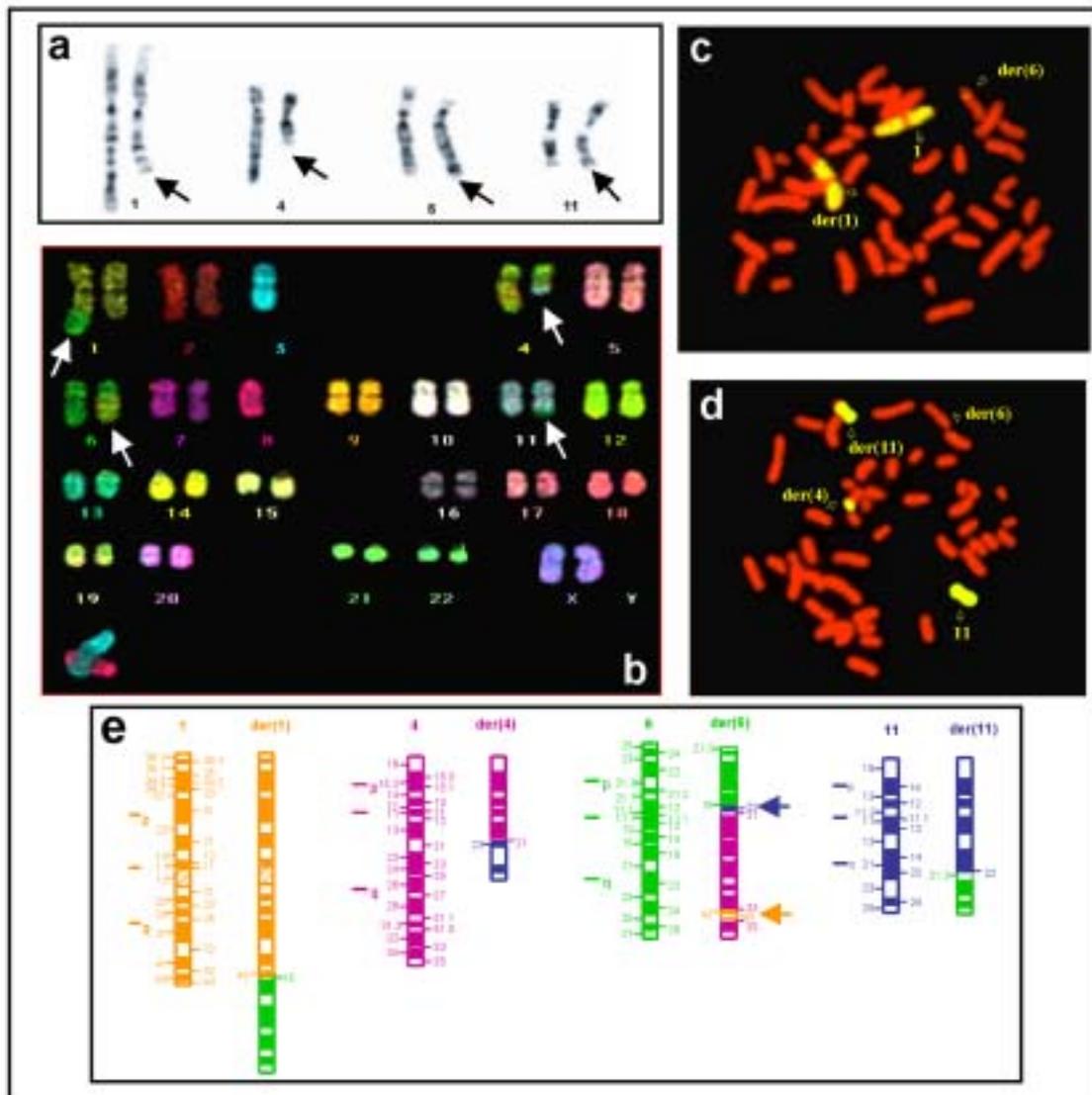


Figure 1

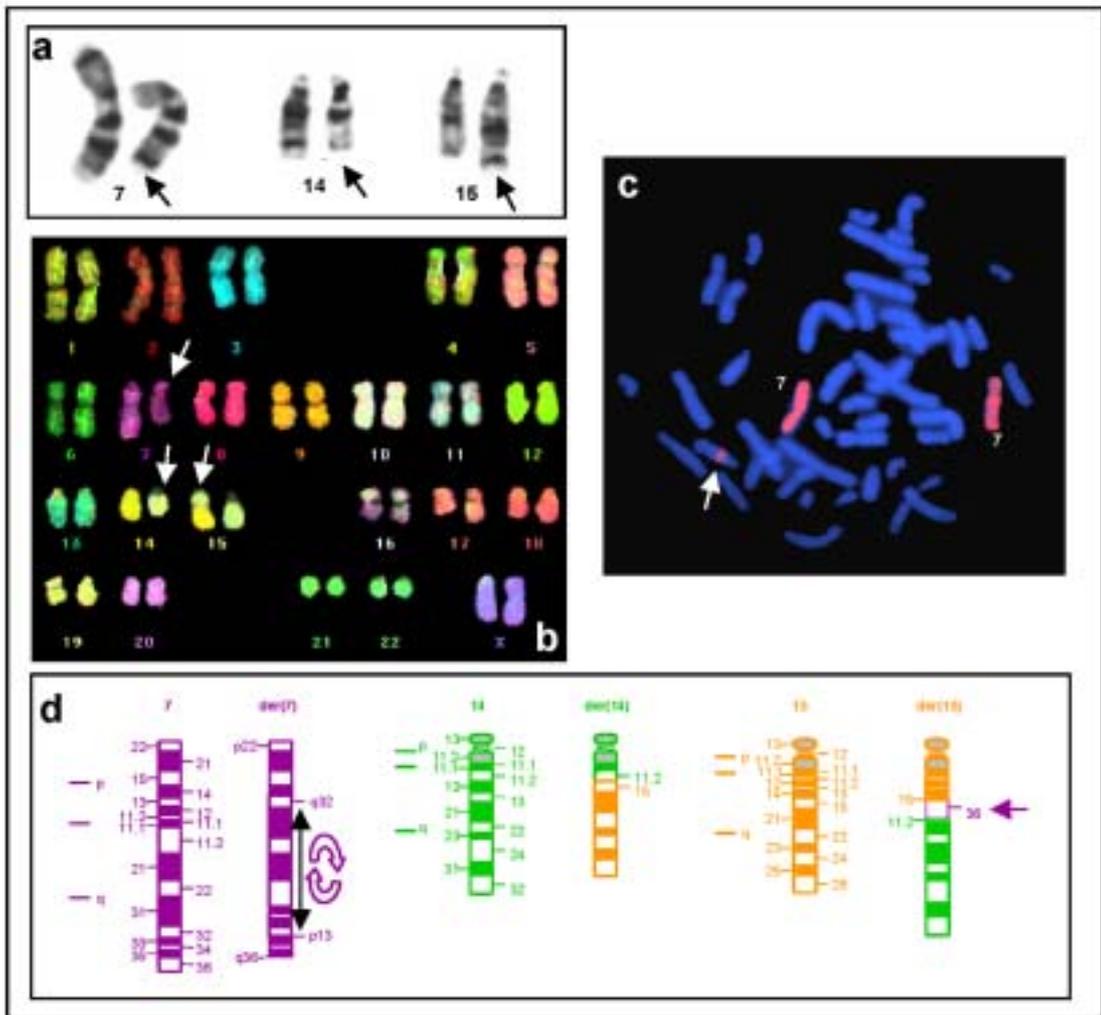


Figure 2.