

# IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES EN NÚMERO DE COPIAS EN MOSAICO EN UNA SERIE DE PACIENTES CON DEFECTOS CONGÉNITOS

Claudia Armillas Salas

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutora académica: Dra. María del Carmen Portillo Guisado, Departamento  
Bioquímica y Biotecnología, [carmen.portillo@urv.cat](mailto:carmen.portillo@urv.cat)

En cooperación con: Consorcio Corporación Sanitaria Parc Taulí de Sabadell

Supervisores: Dra. Míriam Guitart Feliubadaló, Jefa del Laboratorio de  
Genética, [mguitart@tauli.cat](mailto:mguitart@tauli.cat) y Dra. Neus Baena Díez, [nbaena@tauli.cat](mailto:nbaena@tauli.cat)

Junio 2021

Yo, Claudia Armillas Salas, con DNI 48016262J, soy concedora de la guía de prevención del plagio a la URV Prevención, detección y tratamiento de plagio en la docencia; guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de junio de 2021

FIRMA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Claudia', with a stylized flourish at the end.

## **Agradecimientos**

*Me gustaría agradecer al equipo del Hospital Universitario Parc Taulí y en especial a la Dra. Miriam Guitart Feliubadaló y a la Dra. Neus Baena Díez, por su dedicación y paciencia al guiarme para la realización de este trabajo de final de grado y por ayudarme a afianzar todavía más mi interés de enfocar mi futuro profesional en el campo de la Genética Humana.*

*También agradecer a mi tutora de la universidad del trabajo de final de grado, la Dra. María del Carmen Portillo Guisado, por su implicación e interés en el seguimiento de este trabajo y su entrega en la corrección de este.*

*A mis compañeros de la carrera y a los de siempre, por las risas y por celebrar las victorias de cada uno de nosotros. A mi persona favorita por apoyarme siempre.*

*Por último, agradecer a mis padres y familia, que son los que me han inculcado que con trabajo y constancia se puede llegar a dónde uno se propone. A mi abuela por haber celebrado todos mis logros, aunque aún no hubieran ni llegado.*

## ÍNDICE

1.	<b>Datos del centro: Hospital Universitario Parc Taulí</b> .....	7
2.	<b>Abstract</b> .....	8
3.	<b>Lista de abreviaturas</b> .....	9
4.	<b>Introducción</b> .....	11
4.1	Variantes en número de copias (CNVs).....	11
4.2	Mosaicismo genético .....	12
4.3	Métodos de detección de CNVs en mosaico.....	14
4.3.1	Citogenética clásica: cariotipo .....	14
4.3.2	Citogenética molecular.....	14
4.3.2.1	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) .....	14
4.3.2.2	Array de Hibridación Genómica Comparada (aCGH)....	15
4.3.2.3	Amplificación de sondas múltiple dependiente de ligación (MLPA) .....	17
4.4	Anomalías congénitas .....	17
5.	<b>Hipótesis</b> .....	18
6.	<b>Objetivos</b> .....	18
7.	<b>Metodología</b> .....	19
7.1	Descripción de la muestra .....	19
7.2	aCGH.....	19
7.2.1	Diseño del nuevo protocolo de detección de CNVs en mosaico .....	20
7.2.2	Cálculo del porcentaje de mosaicismo genético .....	22
7.3	Cariotipo .....	23
7.4	FISH .....	23
7.5	MLPA.....	23
8.	<b>Resultados y discusión</b> .....	24
8.1	Descripción de casos considerados posibles mosaicos de acuerdo con el resultado del aCGH.....	25

8.2	Relación de los resultados obtenidos con las distintas técnicas .....	25
8.2.1	Caso 1: Gestante con aborto en el primer trimestre. ....	25
8.2.2	Caso 2: Paciente de sexo masculino con macrocefalia, prognatismo, comunicación intrauricular y retraso del lenguaje. ....	27
8.2.3	Caso 3: Paciente de sexo masculino con discapacidad intelectual.	29
8.2.4	Caso 4: Paciente de sexo masculino con Rasgos de Trastorno del espectro autista .....	31
8.2.5	Caso 5: Gestante con aborto en el primer trimestre.....	33
8.2.6	Caso 6: Paciente de sexo femenino con discapacidad intelectual.....	35
8.2.7	Caso 7: Paciente de sexo masculino con TEA y discapacidad intelectual leve.....	36
8.2.8	Caso 8: Paciente de sexo femenino con convulsiones neonatales y resonancia que muestra afectación de la sustancia blanca cerebral de forma simétrica y difusa.....	38
8.2.9	Caso 9: Paciente de sexo femenino diagnosticada con Síndrome de Turner. ....	40
8.3	Interpretación global de los resultados.....	47
9.	<b>Conclusiones</b> .....	48
10.	<b>Perspectivas de futuro</b> .....	49
11.	<b>Bibliografía</b> .....	49
12.	<b>Autoevaluación</b> .....	53
13.	<b>Anexos</b> .....	54
13.1	50 metafases del cariotipo caso 9.....	54
13.2	Sondas utilizadas en MLPA.....	55
13.3	Protocolo de Cariotipo sangre constitucional .....	56
13.4	Protocolo FISH .....	59
13.5	Protocolo aCGH .....	60
13.6	Protocolo MLPA.....	64

## **1. Datos del centro: Hospital Universitario Parc Taulí**

El trabajo final de grado (TFG) presentado está basado en las prácticas curriculares realizadas en el laboratorio de genética del *Consorti Corporació Sanitària Parc Taulí*, en el hospital universitario que se encuentra en Sabadell, Cataluña.

La Dra. Miriam Guitart Feliubadaló, la directora del laboratorio de citogenética y genética molecular y Dra. Neus Baena Díez han sido las mentoras de mi TFG.

Durante mis prácticas curriculares he participado en el proyecto de “Identificación de variantes en número de copias en mosaico en una serie de pacientes con defectos congénitos” en el período de los meses de febrero, marzo y abril del año 2021.

Este proyecto surgió con el objeto de intentar identificar CNVs en mosaico mediante técnicas citogenéticas y moleculares. Para los investigadores, la identificación del mosaicismo siempre ha sido un reto dada la dificultad para su detección y diagnóstico. Las doctoras Miriam y Neus me propusieron enfocar mi trabajo final de grado en la detección de CNVs en mosaico, estudiar qué técnicas son las idóneas para su validación y analizar la bibliografía que sustente las teorías descritas.

## 2. Resumen

El mosaicismo genético es la coexistencia de dos o más líneas celulares genéticamente diferentes en un individuo. Puede estar causado por CNVs de pequeño tamaño y su detección depende del tejido que se analice. La elección de las técnicas citogenéticas y moleculares es decisiva para la detección e identificación de mosaicismo.

En este estudio se intentó detectar CNVs en mosaico con una mayor precisión cuantitativa y cualitativa a partir de la implementación de un nuevo protocolo más sensible de la técnica molecular aCGH. Se empleó una cohorte de 629 individuos y se detectaron 6 casos con indicios de tener CNVs en mosaico (0,95 %). Las técnicas empleadas para la identificación de mosaicismo fueron aCGH, FISH, MLPA y el cariotipo.

El porcentaje de CNVs en mosaico obtenido con estas técnicas concuerda con los resultados de otros trabajos similares.

**Palabras clave:** mosaicismo, CNVs, detección, citogenética, molecular y aCGH.

### 3. Lista de abreviaturas

<b>AC</b>	Anomalías congénitas
<b>aCGH</b>	Array de Hibridación Genómica Comparada ( <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i> )
<b>BC</b>	Biopsia corial
<b>CEP</b>	Centrómero
<b>CIA</b>	Comunicación interauricular (cardiopatía congénita)
<b>CNV</b>	Variación en el número de copias ( <i>Copy Number Variation</i> )
<b>DEL</b>	Delección
<b>DI</b>	Discapacidad intelectual
<b>DIL</b>	Discapacidad intelectual leve
<b>DLRS</b>	Desviación estándar derivada de relaciones <i>log ratio</i> ( <i>Derivate log ratio spread</i> )
<b>DUP</b>	Duplicación
<b>FISH</b>	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> ( <i>Fluorescence in Situ Hybridization</i> )
<b>FoSTeS</b>	Estancamiento de hoquilla y cambio de patrón ( <i>Fork Stalling and Template Switching</i> )
<b>H</b>	Heterocromatina constitutiva
<b>Idic</b>	Cromosoma isodicéntrico
<b>LINE</b>	<i>Long Interspersed Nuclear Element-1</i>
<b>LR</b>	<i>Log ratio</i>
<b>mar</b>	Cromosoma marcador
<b>MLPA</b>	Amplificación de múltiples sondas dependiente ligación ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )
<b>MMBIR</b>	Ruptura inducida mediada por microhomología ( <i>Microhomology-Mediated Break-Induced Replication</i> )
<b>mos</b>	Mosaico
<b>NAHR</b>	Recombinación homóloga no alélica ( <i>Non-allelic homologous recombination</i> )
<b>NHEJ</b>	Recombinación no homóloga ( <i>Non-Homologous End Joining</i> )
<b>p</b>	Brazo corto del cromosoma
<b>q</b>	Brazo largo del cromosoma
<b>SNP</b>	Polimorfismos de un solo nucleótido
<b>TEA</b>	Trastorno del espectro autista
<b>TND</b>	Trastornos del neurodesarrollo

**VOUS** Variantes de significado incierto (*Variation of Uncertain Clinical Significance*)

## 4. Introducción

### 4.1 Variantes en número de copias (CNVs)

Las variaciones en el número de copias (CNVs) son segmentos de ADN que, comparándolas con un genoma de referencia, presentan un número variable de copias dando lugar a variantes estructurales. Las CNVs implican ganancias o pérdidas en el genoma produciendo duplicaciones (DUP) o deleciones (DEL). Representan el 7 % del genoma humano y tienen un tamaño variable que oscila entre 50bp hasta miles de pares de bases, pudiendo afectar a grandes regiones y regiones importantes del genoma humano.

En los últimos años, se ha reconocido la importancia de las CNVs en relación con la modulación génica, con la expresión del fenotipo y con la susceptibilidad a diversas enfermedades relacionadas con los trastornos del neurodesarrollo (TND) (autismo o discapacidad intelectual), Alzheimer, Parkinson, epilepsia, cáncer, diabetes, anomalías cardíacas congénitas, esqueléticas y trastornos psiquiátricos. Enfermedades hereditarias como la hipercolesterolemia familiar, cáncer de mama hereditario y el Síndrome de Lynch pueden estar causadas por CNVs (Blesa et al., 2020).

Según un estudio (Sebat et al., 2004) en el que comparaban el genoma de 55 individuos y evaluaban las variantes en número de copias, demostraron que muchas de las CNVs encontradas incluían genes funcionales involucrados en el crecimiento y metabolismo celular. Lo cual demuestra que las CNVs pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades humanas y en la diversidad genómica entre individuos.

Por ello, la detección de CNVs es clave para llegar a un diagnóstico genético correcto y así establecer estrategias preventivas y de tratamiento.

La formación de CNVs es causada por mecanismos de replicación y reparación del ADN. Éstas pueden heredarse o aparecer *de novo* por diferentes mecanismos:

- Recombinación homóloga no alélica (NAHR; *Non-Allelic Homologous Recombination*): la recombinación se da en regiones homólogas (LCR<sup>1</sup>) pero localizadas en diferentes locus del mismo cromosoma o diferentes cromosomas, dando lugar a duplicaciones, deleciones e inversiones. Las LCRs con alta homología de secuencia promueven la NAHR (Cardoso et al., 2016).

---

<sup>1</sup> LCR (*Low copy repeats*): regiones altamente homólogas del genoma.

- Recombinación no homóloga (NHEJ; *Non-Homologous End Joining*): es un mecanismo implicado en la reparación de dobles roturas en las hebras de ADN, dando lugar a duplicaciones y deleciones.
- Estancamiento de horquilla y cambio de patrón (FoSTeS; *Fork Stalling and Template Switching*) y ruptura inducida mediada por microhomología (MMBIR; *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*): durante la replicación del ADN se produce un error donde la horquilla de replicación se detiene en una posición y la otra hebra sintetizada se desengancha de la hebra molde y se une a la hebra más cercana con la que comparte microhomología y reiniciará la replicación del ADN, formando deleciones y duplicaciones.
- Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1): son elementos retrotransponibles que constituyen alrededor del 17 % del genoma humano. Estos elementos se encuentran normalmente de forma inactiva, pero aquellos que se encuentran activos pueden crear inserciones, deleciones, reordenamientos y CNVs.

## 4.2 Mosaicismo genético

El mosaicismo genético se define como la presencia en un organismo de dos o más líneas celulares que difieren en su composición genética. A diferencia del quimerismo, el mosaicismo deriva de un único cigoto.

Existen dos tipos de mosaicismo genético dependiendo a qué células afecte:

- Mosaicismo somático: es aquel en el que coexisten dos o más líneas celulares de células con dotación genética diferente. Esta mutación no puede ser transmitida a la descendencia a no ser que se encuentre en la línea germinal. Se produce por una mutación espontánea o inducida por diversos factores de riesgo.
- Mosaicismo germinal: es aquel en que la mutación afecta a los gametos (ovocitos y espermatozoides) y puede transmitirse a la descendencia.

La causa más común por la que se produce el mosaicismo genético es por un error de no disyunción durante el desarrollo embrionario o fetal temprano. La no disyunción es el error en la separación de los cromosomas homólogos durante la división celular, este evento es postcigótico, ya que ocurre después de la fertilización.

La no disyunción puede ser mitótica o meiótica y si ocurre durante la etapa de anafase de la mitosis en las células somáticas, no se heredará a la descendencia.

La no disyunción mitótica ocurre durante el desarrollo embrionario y provoca que la célula no se divida exactamente en dos mitades y de lugar a un individuo con más de una línea celular.

La no disyunción meiótica es el mecanismo prioritario y consiste en la producción de un fallo en la separación de los cromosomas homólogos durante la meiosis I, una célula hija tendrá dos cromosomas (disómica) y la otra célula hija no tendrá ninguno (nulisómica). Si la no disyunción ocurre en la meiosis II, el cigoto podrá ser normal, monosómico o trisómico (Alonso Cerezo, 2007).

Las otras causas por las que se puede dar el mosaicismo genético son el retraso en la etapa de la anafase en la mitosis o meiosis o en los reajustes estructurales. Estos reajustes estructurales están presentes hasta en el 50 % de los embriones en la etapa de 8 células y hasta en el 75 % en etapa de blastocisto. (De, 2011) analizó el mosaicismo somático en el desarrollo embrionario temprano y encontró que el 48 % de los embriones se trataban de mosaicos genéticos. De ese 48 %, el 90 % de los embriones se encontraban en la etapa de blastocisto.

Los individuos que padecen una alteración en forma de mosaicismo genético tienden a estar menos afectados que los individuos con la misma alteración genética, pero sin ser en mosaico, ya que contienen menores cantidades de células con el cambio genético. Si la mutación ocurre en el cigoto o durante la primera división mitótica, todas las células contribuirán a la formación del embrión, por tanto, la mutación puede ser identificada en cualquier tejido del organismo. En cambio, si la mutación ocurre en el desarrollo embrionario, el cambio puede estar presente solamente en un porcentaje determinado de células en un único tejido y, por tanto, ser difícil su detección.

En un estudio (Pham, J., et al. 2014) evalúan una cohorte de 10.362 pacientes buscando identificar los casos de mosaicismo genético y sus porcentajes. Fueron detectados un total de 57 casos de mosaicismo somático mediante la técnica de aCGH y eso supone el 0,55 % de la muestra, se concluye que 1 de cada 180 casos presenta mosaicismo genético según estos resultados.

De la revisión bibliográfica, este artículo resultó ser el más amplio en el número de casos evaluados y es por este motivo, que es el artículo seleccionado como dato de referencia para la búsqueda en mi estudio del porcentaje de mosaicismo.

### 4.3 Métodos de detección de CNVs en mosaico

La detección de mosaicismo genético depende de algunos factores como el número de células analizadas, el tipo de tejido estudiado, la sensibilidad de las técnicas aplicadas y si existe o no, una selección *in vivo* o *in vitro* de la técnica, a favor o en contra de la línea celular con la anomalía genética.

Para el diagnóstico de alteraciones genéticas en mosaico causadas por CNVs se emplean diferentes técnicas; las técnicas de citogenética clásica como el cariotipo son imprescindibles pero muchas veces insuficientes por su limitada resolución. También se emplean las técnicas citogenéticas moleculares como la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), el *array* de Hibridación Genómica Comparada (aCGH) y la Amplificación de múltiples sondas dependiente de ligación (MLPA).

#### 4.3.1 Citogenética clásica: cariotipo

El cariotipo es la dotación cromosómica de una especie, hace referencia al conjunto de cromosomas que tiene cada una de sus células.

Las técnicas de citogenética clásica fueron las primeras técnicas que se utilizaron para determinar una alteración genética asociada a un fenotipo concreto o a reordenamientos equilibrados. El cariotipo, por tanto, permite la detección de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales.

Esta técnica puede llegar a detectar CNVs (deleciones o duplicaciones), inversiones y translocaciones balanceadas con una resolución de 5 a 10 Mb de material genético.

El mosaicismo genético causado por alteraciones cromosómicas puede ser detectado por análisis mediante citogenética clásica. Para el análisis cromosómico de un individuo se estudian y se realiza el conteo de 20 metafases, pero para la determinación de mosaicismo se amplía hasta un mínimo de 50 metafases.

Aunque el cariotipo convencional sea la técnica más empleada en los laboratorios para diagnosticar alteraciones cromosómicas, no es útil para identificar casos de mosaicismo que afectan a una pequeña región cromosómica.

#### 4.3.2 Citogenética molecular

##### 4.3.2.1 Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

La técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) se utiliza para identificar regiones específicas de cromosomas de una muestra problema mediante una sonda marcada con fluorescencia. Permite la detección de alteraciones numéricas y estructurales,

identificar cromosomas marcadores y cuantificar células afectadas. Además, permite analizar metafases y núcleos en interfase.

La técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) tiene como objetivo diagnosticar microdeleciones, microduplicaciones y reorganizaciones de menos de 5Mb que no pueden ser detectadas mediante el cariotipo convencional. Permite el cribado rápido de un número elevado de células con una especificidad muy alta en comparación con la citogenética clásica.

La FISH sólo permite analizar regiones específicas del genoma y eso significa la limitación más importante de la técnica. Además, es necesario saber lo que buscamos identificar para el diseño específico de la sonda a hibridar.

#### 4.3.2.2 Array de Hibridación Genómica Comparada (aCGH)

El *array* de Hibridación Genómica Comparada es una técnica de diagnóstico genética que nos permite diagnosticar CNVs con una mayor resolución si lo comparamos con las técnicas de citogenética clásica y la técnica FISH.

En el aCGH se produce una hibridación competitiva del ADN del paciente (marcado con un fluorocromo, Cy5, color rojo) y el ADN de referencia procedente de un individuo del mismo sexo (marcado con un fluorocromo, Cy3, color verde) sobre una superficie sólida en la cual se encuentran moldes de ADN (sondas) con secuencia y localización en el genoma conocidas.

La muestra del paciente y la de referencia se unen a la superficie sólida por igual si no ha habido cambios de dosis génica, mediante fluorescencia se detectan las ganancias y/o pérdidas. En aquellas regiones donde haya habido una duplicación de la muestra del paciente, se observará más cantidad de fluorocromo rojo que verde. Si hay pérdidas, el resultado mostrará una disminución del fluorocromo rojo y aumento del fluorocromo verde (*Figura 1*).

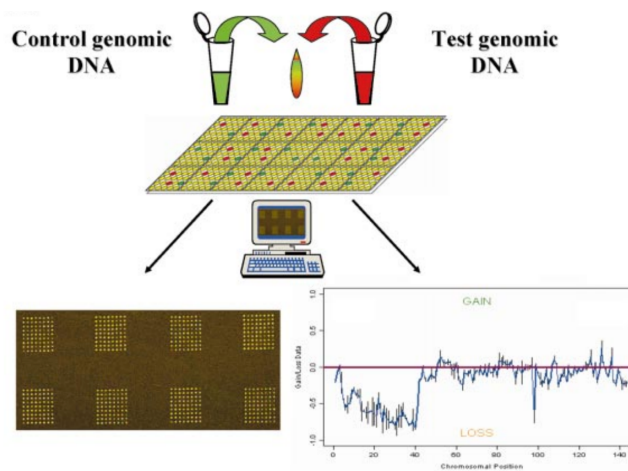


Figura 1. Fundamentos de la técnica aCGH. El ADN de referencia (izquierda, verde) y el ADN del paciente (derecha, rojo) se unen a dos fluorocromos diferentes. La mezcla resultante de los dos ADNs se coloca en la matriz (array). Las imágenes mediante un software se pasan al ordenador (Figura tomada de Shaffer & Bejjani, (2004)).

Las técnicas de citogenética clásica y la técnica FISH utilizan células estimuladas, esto puede subestimar el nivel de aneuploidía en un individuo. La técnica de aCGH utiliza ADN de células multi-linaje de sangre periférica lo cual permite un estudio más preciso del nivel de mosaicismo.

El objetivo principal del aCGH es el estudio molecular de alteraciones submicroscópicas para establecer la base genética de la patología genética prenatal y postnatal, en los trastornos del neurodesarrollo, en los defectos congénitos y en el cáncer. Se aplica en distintos tejidos como sangre periférica, líquido amniótico, vellosidad corial, pérdidas gestacionales, fibroblastos y médula ósea.

El aCGH no requiere de grandes cantidades de muestra de ADN, permite detectar las alteraciones citogenéticas mejor y analizar de forma simultánea diversas regiones genómicas asociadas a trastornos genéticos.

Existen varias limitaciones de la técnica de aCGH, no detecta traslocaciones cromosómicas equilibradas ni inversiones ni mutaciones puntuales. Casos como las poliploidías tampoco pueden detectarse mediante el aCGH por ser cambios genéticos globales del genoma. La cantidad de la muestra debe ser superior a la que se utiliza para otras técnicas moleculares y la calidad de esta debe ser la adecuada.

#### 4.3.2.3 Amplificación de múltiples sondas dependiente de ligación (MLPA)

La amplificación de múltiples sondas dependiente de ligación (MLPA) es una técnica semicuantitativa que se utiliza para determinar las CNVs de hasta 60 secuencias diana de ADN en una única reacción de PCR<sup>2</sup>.

La técnica de MLPA se utiliza para detectar CNVs pero no permite conocer su longitud exacta y está limitada a un máximo de 60 regiones.

La técnica se divide en 4 etapas:

- Hibridación: la muestra de ADN se hibrida con las sondas diseñadas.
- Ligación: el ADN de la muestra hibridado con las sondas específicas se liga gracias a la función de la ligasa<sup>3</sup>.
- PCR
- Electroforesis capilar y secuenciador

Esta técnica permite una detección rápida y de bajo coste para la identificación de duplicaciones o deleciones en regiones concretas.

Sin embargo, la técnica de MLPA presenta una serie de limitaciones. Los resultados de la técnica dependen de la calidad del ADN a analizar, no detecta deleciones y/o duplicaciones que estén fuera de la sonda diseñada, tampoco detecta reordenamientos genómicos equilibrados (traslocaciones o inversiones). Los resultados obtenidos pueden verse afectados por cambios como SNPs o mutaciones puntuales de la muestra a analizar.

#### 4.4 **Anomalías congénitas**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las anomalías congénitas (AC) son anomalías estructurales o funcionales que se detectan durante el embarazo, en el parto o en un momento posterior de la vida.

Las causas de las anomalías congénitas son de tipo ambiental, genético y de origen desconocido.

Actualmente, al 50 % de las anomalías congénitas no se les puede asignar una causa específica. Se ha estimado que una cuarta parte de todas las anomalías congénitas son

---

<sup>2</sup> La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR; *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de biología molecular que se basa en la amplificación del material genético.

<sup>3</sup> Ligasa: enzima que permite la unión covalente de dos moléculas.

de origen genético, las dos causas más comunes de AC son los defectos de un solo gen y las anomalías cromosómicas. El 17 % de éstas es causado por mutaciones de un solo gen. Las causas ambientales y maternas son responsables de aproximadamente del 4 al 10 % de la aparición de AC (Figura 2).

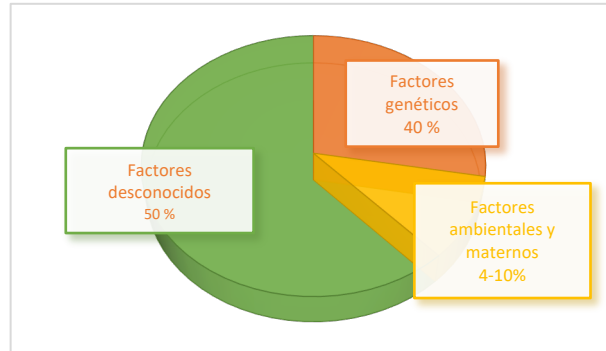


Figura 2. Gráfico con la representación de los porcentajes del origen de las anomalías congénitas. (datos extraídos de la OMS, Centers for Disease Control and Prevention y de Gimeno-Martos et al., (2016))

Estudios realizados en la Comunidad Valenciana (Gimeno-Martos et al., 2016) concluyen que las AC cromosómicas suponen aproximadamente el 15 % de las anomalías congénitas diagnosticadas antes del año de vida y que están asociadas con el 25 % de las muertes perinatales por AC, estos datos coinciden con los del resto de Europa.

El diagnóstico de las anomalías congénitas de origen genético mediante las técnicas de diagnóstico citogenético y molecular reducen la posibilidad de que un recién nacido presente AC y la posible prevención y el tratamiento de éstas.

## 5. Hipótesis

Las variantes en número de copias en mosaico en pacientes con defectos congénitos deberían estar presentes en el 0,55 % de los casos analizados mediante el uso de técnicas citogenéticas convencionales y moleculares.

## 6. Objetivos

- Desarrollar el diseño de un nuevo protocolo más sensible que los convencionales para la detección de mosaicismos genéticos en individuos con defectos congénitos.
- Identificar variantes en número de copias (CNVs) en mosaico mediante el uso de la técnica del *array* de hibridación genómica comparada.

- Validar estas CNVs en mosaico y su proporción mediante otras técnicas citogenéticas y/o moleculares.

## 7. Metodología

### 7.1 Descripción de la muestra

El número de casos analizados por la técnica aCGH fueron 629. En el año 2019 se analizaron 144 casos, en el año 2020 se analizaron 436 casos y en el año 2021 se analizaron 49 casos. Todos los casos ya habían sido previamente analizados y diagnosticados mediante la técnica de aCGH por el laboratorio de genética del Hospital Parc Taulí.

Para este trabajo, se volvieron a analizar los 629 casos, pero con un *software* y protocolo de análisis distinto con el objeto de localizar CNVs en mosaico no detectadas anteriormente.

Las muestras de ADN de los casos de 2019, 2020 y 2021 se encontraban guardadas en el congelador, excepto la muestra del que posteriormente se denominará caso 9 que fue recepcionada durante el estudio para identificar sus anomalías a través de las técnicas pertinentes siguiendo el protocolo del laboratorio de análisis.

Para la caracterización de las CNVs del caso 9 se realizaron técnicas complementarias (FISH y cariotipo) debido a la gran complejidad del diagnóstico del supuesto individuo mosaico.

### 7.2 aCGH

Los 629 casos se volvieron a analizar con la técnica aCGH pero con un nuevo protocolo para el diagnóstico específico de mosaicos genéticos.

La técnica de aCGH consiste en co-hibridar el ADN del paciente con un ADN de referencia procedente de un individuo del mismo sexo (*Human Genomic DNA Male and Female Sure Seq* de la casa comercial OGT) marcados con un fluorocromo distinto. Estos ADNs han de competir para poder hibridar sobre múltiples secuencias de ADN ligadas a un soporte sólido denominado *array*.

El *array* utilizado es de 180.000 oligonucleótidos (*Clinical Genome Resource<sup>†</sup> CytoSure Constitutional v3. 4x180K*). La cobertura del *array* es de nivel exónico (3 sondas como mínimo en un mismo exón) en los genes asociados a trastornos del neurodesarrollo (Proyecto *Deciphering Disorder Development* y mapa de dosis sensible *ClinGen*).

Los resultados del aCGH se procesan con el programa *Feature Extraction* y se analizan los datos mediante el software *Cytosure Interpret Software* o *Agilent Cytogenomics* a partir de un protocolo personalizado.

Mediante la técnica de aCGH se determina si ha habido pérdidas o ganancias del material genético, estableciéndose en cuatro el número mínimo de oligonucleótidos consecutivos tanto en pérdidas como en ganancias, para detectar una anomalía.

El protocolo completo de la técnica aCGH se encuentra en el *Anexo 13.5*.

El valor de calidad DLRS (Desviación estándar derivada de las relaciones *log ratio*) permite hacer un control de calidad de la técnica y debe ser inferior a 0,2 para determinar que el aCGH ha salido correctamente.

No se reportan las CNVs polimórficas presentes en una frecuencia > 1 % en la población general, las variantes menores a 400kb que no contienen genes, las variantes probablemente benignas ni otros elementos de referencia.

Una vez evaluados los genes incluidos en las CNVs se valoran su patogenicidad a través de las páginas web *OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man*, que cataloga las enfermedades humanas con un componente genético y así relacionar el fenotipo con el diagnóstico y con bibliografía relacionada y *PubMed*.

### **7.2.1 Diseño del nuevo protocolo de detección de CNVs en mosaico**

Se desarrolló un nuevo protocolo para la detección de CNVs en mosaico mediante el software *Agilent Cytogenomics* para la técnica de aCGH y se denominó *CGHv2mosaic\_31març2021\_*.

Para evaluar la eficacia del nuevo protocolo y su detección de CNVs en mosaico, se analizaron los 629 casos procedentes de los años 2019, 2020 y hasta la fecha actual. Estos casos ya habían sido interpretados anteriormente por el software *Feature extraction* y posteriormente analizados por el software *Cytosure Interpret Software* con el protocolo *OGT-Efsa-clas-loss 0,4* (*Figura 3*).

Figura 3. Ajustes del protocolo OGT-Efsa-clas-loss 0,4.

La reevaluación de los casos se realizó con el software *Agilent Cytogenomics* mediante un nuevo protocolo diseñado exclusivamente para la detección de mosaicismo. El protocolo llamado *CGHv2mosaic\_31març2021\_* fue programado con los ajustes mostrados en la *Figura 4*.

\* Each condition must be met before an amplification or deletion is reported.

Figura 4. Ajustes del protocolo CGHv2mosaic\_31març2021\_.

La finalidad del análisis de la técnica de aCGH fue comprobar la efectividad del nuevo protocolo a la susceptibilidad de encontrar un mayor número de CNVs en mosaico.

La creación del nuevo protocolo *CGHv2mosaic\_31març2021\_* se diferenciaba del protocolo *OGT-Efsa-clas-loss 0,4* anterior en los ajustes de las *log ratios*.

El ajuste más relevante fue disminuir los valores de las *log ratios* de pérdida y ganancia al valor de 0,15.

Para valorar si un individuo es portador de una variante se analiza el valor de la *log ratio*, la medida y los genes implicados en una CNV. La *log ratio* nos permite hacer una

estimación cuantitativa del porcentaje de mosaicismo de la delección o duplicación de la CNV.

Los valores teóricos de la *log ratio* de las delecciones son -0,7 y de las duplicaciones son 0,5 para la interpretación de una CNV que no es mosaico.

La interpretación de los valores de las *log ratios* fueron:

- Si la *log ratio* de una CNV se encuentra entre 0,15 y 0,49 determinaremos que es una duplicación en mosaico.
- Si la *log ratio* de una CNV se encuentra entre -0,15 y -0,59 determinaremos que es una delección en mosaico.

Únicamente se valoraron aquellas CNVs que contenían genes mórbidos<sup>4</sup> y tamaño mínimo de 25 kb. Se rechazaron todas las CNVs en mosaico de menos de 25 kb, que contuvieran genes no mórbidos y valores de *log ratio* inferiores o superiores a los establecidos.

### 7.2.2 Cálculo del porcentaje de mosaicismo genético

Los estudios (Cheung et al., 2007) y (Pham et al., 2014) proponen una fórmula para calcular el porcentaje de células patológicas en mosaico.

Las CNVs presentes en una parte de la población de células de un organismo, es decir, en mosaicismo, se pueden calcular a partir de la fórmula siguiente.

$$\alpha = (|\delta - 1| / 0,5) \times 100$$

$$\text{Dónde; } \delta = 2^{\log \text{ ratio}}$$

Fórmula 1. Cálculo de porcentaje de mosaicismo genético.

La *log ratio* nos permite hacer una estimación cuantitativa del porcentaje de mosaicismo de la delección o duplicación de la CNV. Los resultados obtenidos del aCGH se normalizan con la *log ratio*. Si la *log ratio* es igual a 0, no existen cambios del ADN del paciente comparado con el ADN de referencia; si la *log ratio* es negativa, el ADN del paciente presenta una delección en la región comparada con el ADN de referencia; si la *log ratio* es positiva, el ADN del paciente presenta una duplicación en la región comparada con el ADN de referencia (Picard et al., 2005).

<sup>4</sup> Genes mórbidos: son aquellos que se conocen por estar asociados a un fenotipo de una enfermedad

### 7.3 Cariotipo

La técnica del cariotipo con bandas G se empleó para la caracterización de una de las variantes estructurales en mosaico detectadas en el caso 9 mediante aCGH.

La base de la técnica del cariotipo es el cultivo de linfocitos durante 72 horas, estimulación con phitohemaglutinina<sup>5</sup> y sincronización del ciclo celular para obtener cromosomas prometafásicos (de alta resolución) para la posterior tinción de bandas G. El protocolo completo de la técnica se encuentra en el *Anexo 13.3*.

### 7.4 FISH

La técnica FISH consiste en la detección de deleciones y duplicaciones a partir de sondas marcadas con fluorocromos que hibridan específicamente las regiones diana del genoma.

La base de la técnica FISH es la hibridación del ADN del paciente con una sonda comercial marcada con un fluorocromo y posteriormente capturar las señales fluorescentes en el microscopio de epifluorescencia. Se realiza mediante el programa *Metafer M Search/FL* para determinar si se confirma o no la alteración genética, ya que las zonas no hibridadas no contienen fluorescencia.

La FISH únicamente se empleó para la determinación del cromosoma Y del caso 9. En este caso solo se utilizaron sondas comerciales. Las sondas utilizadas fueron: SRY Yp11.3, Yp subteloamérica, Yq subteloamérica, CEPY(DYZ1) región heterocromática Yq12 y sonda control del centrómero CEP X en todas las mix de la casa *Abbot*.

El protocolo completo de la técnica FISH se encuentra en el *Anexo 13.4*.

### 7.5 MLPA

La técnica MLPA se empleó para la validar las CNVs en posible mosaico que se obtuvieron de la técnica aCGH.

Las sondas utilizadas (*Anexo 13.2*) fueron creadas mediante una *pipeline* bioinformática para los casos a validar por MLPA.

El protocolo completo de la técnica MLPA se encuentra en el *Anexo 13.6*.

Las alturas de los picos obtenidos con el secuenciador ABI3130 y valorados en el software *GeneMapper*, se registraron en un documento Excel y a través de fórmulas se transformaron en valores numéricos (*ver 8. Resultados y discusión*).

---

<sup>5</sup> Phitohemaglutinina: lectina que se une a la membrana plasmática de los linfocitos y hace que se diferencien.

Los resultados obtenidos por MLPA se clasificaron siguiendo la tabla siguiente (según los criterios de *MRC Holland* (Tabla 1):

0,40 < DQ* < 0,65	DELECIÓN
<b>0,80 &lt; DQ* &lt; 1,20</b>	<b>NORMAL</b>
1,30 < DQ* < 1,65	DUPLICACIÓN
1,75 < DQ* < 2,15	TRIPLICACIÓN

\*DQ se trata del valor del resultado a través de los cálculos del Excel.

Tabla 1. Valores estandarizados de los valores numéricos de los resultados de MLPA.

## 8. Resultados y discusión

Los casos analizados mediante la técnica aCGH fueron 629. La técnica aCGH sirvió de *screening* para la obtención de los individuos con CNVs en mosaico.

De los 629 pacientes analizados por el protocolo *CGHv2mosaic\_31març2021\_* se identificaron un total de 9 casos posibles mosaicos genéticos. A continuación, se describirán los signos clínicos de los pacientes y el análisis de los resultados obtenidos de la aplicación de la técnica del aCGH.

Según el estudio (Pham et al., 2014) descrito en el apartado 1.2 de Mosaicismo genético, de los 629 casos evaluados, deberían presentar mosaicismo genético un total de 3,49 casos.

## 8.1 Descripción de casos considerados posibles mosaicos de acuerdo con el resultado del aCGH

Nº	SEXO	SIGNOS Y SÍNTOMAS CLÍNICOS	CNV DETECTADAS	LONGITUD	LOG RATIO
1	BC de sexo femenino	Aborto de primer trimestre	chr X q11.22 (53501295-53608073)	106 kb	-0.262
2	Hombre	Macrocefalia, prognatismo, CIA, retraso del lenguaje	chr X p22.3 (586064-1327751)	741 kb	0.321
3	Hombre	DI	chr 22q11.21 (18890162-21441817)	2,5 mb	-0.501
4	Hombre	Rasgos TEA	chr 16p11.2 (29652975-30193606)	540 kb	0.261
5	BC de sexo masculino	Aborto de primer trimestre	chr 2 q37.3 (241627284-241709377)	82 kb	-0.312
6	Mujer	DI	chr 16 q22.2 (70873788-71201509)	327 kb	-0.461
7	Hombre	TEA + DIL	chr 17 p11.2 (21195608-22104322)	908 kb	0.294
8	Mujer	Convulsiones neonatales, alteración subs. blanca periventricular a Rm cerebral	chr 20 q13.3 (61927655-62208125)	280 kb	-0.391
9	Mujer	Síndrome de Turner (45,X/46,X,+mar)	Monosomía cromosoma X y DUP cromosoma Y	0,8	2,79

Tabla 2. Descripción de las CNVs en mosaico obtenidas del análisis de aCGH por el protocolo CGHv2mosaic\_31març2021\_

## 8.2 Relación de los resultados obtenidos con las distintas técnicas

### 8.2.1 Caso 1: Gestante con aborto en el primer trimestre.

A la paciente se le realizó una biopsia corial<sup>6</sup> para determinar si la causa del aborto era de origen genético. El embrión era de sexo femenino.

<sup>6</sup> Biopsia corial: es una prueba invasiva de diagnóstico prenatal que consiste en tomar una muestra de la vellosidad corial.

▪ Técnica aCGH

En el aCGH se observó una posible CNV en mosaico. El aCGH mostraba una delección parcial del gen *HUWE1* de un tamaño de 106kb y un valor de *log ratio* de -0,262 (Figura 5).

La fórmula del *array* según ISCN 2020 (*An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*) es: *arr[hg19] Xq11.22(53501295\_53608073)x1*



Figura 5. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent CytoGenomics donde se muestra una delección parcial del gen *HUWE1* en el cromosoma X.

Según OMIM-*Online Mendelian Inheritance in Man*, el gen *HUWE1* causa, discapacidad intelectual ligada al cromosoma X tipo Turner (Figura 6):

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
Xp11.22	Mental retardation, X-linked syndromic, Turner type	309590	XL	3

Figura 6. Relaciones gen-fenotipo del gen *HUWE1*.

El gen *HUWE1* codifica para la enzima E3 ligasa involucrada en varios procesos celulares, incluido desarrollo y proliferación neuronal y sinaptogénesis (Muthusamy et al., 2020). La función de *HUWE1* es degradar el gen supresor de tumores *p53*.

La delección de este gen da como resultado la acumulación de la proteína *p53*<sup>7</sup> y la inducción de apoptosis en ciertos tejidos o células. *HUWE1* es un factor importante en la maduración de los ovocitos y desarrollo del embrión antes de la implantación. La delección de *HUWE1* conduce a una infertilidad completa debido a la muerte de los ovocitos (Eisa et al., 2020).

<sup>7</sup> *p53*: el gen *p53* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica para la proteína *p53*, responsable de la supresión de tumores.

El fenotipo descrito en el proyecto OMIM y en la bibliografía no está relacionado con la paciente del caso 1.

- Técnica MLPA

El resultado del caso 1 (del Xp11.22 en la *Figura 7*) dió un valor numérico de 1,06, este valor es normal. Se comparó con una muestra control de Síndrome de Klinefelter con un valor de 1,10.

El valor del resultado de MLPA del caso 1 no confirmó el resultado del aCGH, por tanto, se trata de un falso positivo. No se confirmó la deleción del gen *HUWE1* del cromosoma Xp11.22 y a su vez, se descartó la posibilidad de que la CNV fuera en mosaico.

↓

22q11.21	3p14.2	Xp11.22	5q35	19q13.42	16p11.2	16p13.1	15q13.3	17q11.2		Regio estu alteraci herència
1,12	1,04	1,06	0,95	0,92	1,00	0,99	1,01	0,98	Val mosai	A11
1,05	1,00	1,10	0,96	0,97	1,01	1,03	1,00	0,93	C+	A12 Xp11.22 klinefelter

*Figura 7. Resultado de la tabla del Excel de MLPA del caso 1.*

### 8.2.2 Caso 2: Paciente de sexo masculino con macrocefalia, prognatismo, comunicación interauricular y retraso del lenguaje.

- Técnica aCGH

El aCGH del paciente mostraba una duplicación terminal en el brazo corto del cromosoma X, en la región pseudoautosómica<sup>8</sup> PAR1 con una longitud de 741kb y una *log ratio* de 0,321 (*Figura 8*). El valor de la *log ratio* sugería que la CNV podría encontrarse en mosaicismo genético.

La fórmula del *array* según ISCN 2020 es: *arr[hg19] Xp22.3(586064\_1327751)x3*

<sup>8</sup> Región pseudoautosómica: regiones de los cromosomas X e Y dónde presentan homología.

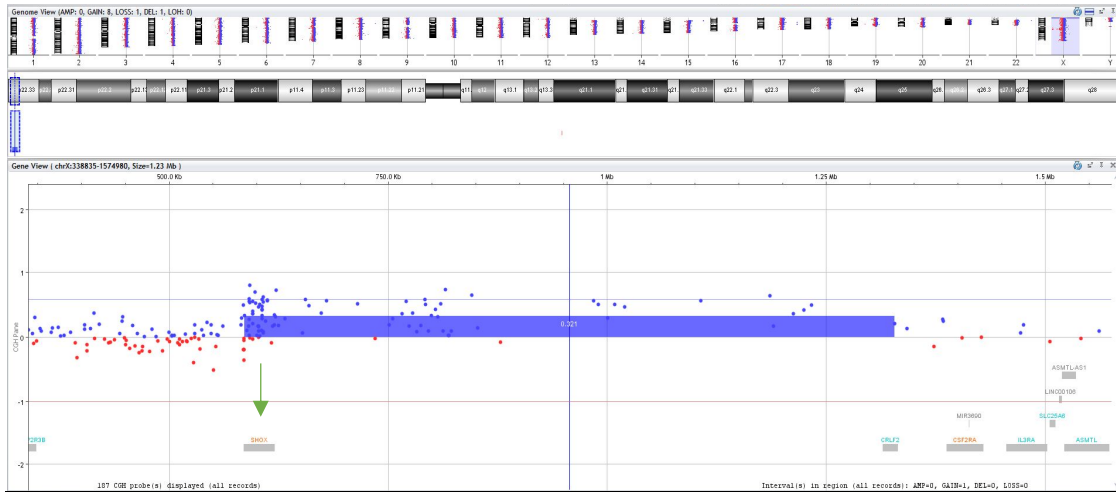


Figura 8. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent Cytogenomics donde se muestra una duplicación del gen SHOX en el cromosoma X.

La duplicación en Xp22.33 incluía el gen SHOX (de los 6 exones del gen, la duplicación estaba presente en los exones del 2 al 6). Este gen se expresa en dos isoformas principales: SHOXa (NM\_000451) y SHOXb (NM\_006883).

Según OMIM, la haploinsuficiencia (la delección) del gen SHOX se ha asociado con talla baja y con discondrosteosis de Leri Weill (Figura 9).

Location	Phenotype <span style="background-color: #f4a460; padding: 2px;">Clinical Synopses</span>	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
Xp22.33	Langer mesomelic dysplasia	249700	PR	3
	Leri-Weill dyschondrosteosis	127300	PD	3
	Short stature, idiopathic familial	300582		3

Figura 9. Relaciones gen-fenotipo de la haploinsuficiencia del gen SHOX.

En la figura se muestra PR: región pseudoautosomal recesiva y

PD: región pseudoautosomal dominante.

Recientemente se han descrito casos con duplicación parcial y/o completa del gen SHOX.

Un estudio de 2016 intentó demostrar la relación de microduplicaciones del gen SHOX de la región pseudoautosómica del brazo corto del cromosoma sexual (PAR1) con el TEA y los TND. Para intentar demostrar esta relación, los autores realizaron la técnica aCGH en una cohorte de 18.857 pacientes con trastornos del neurodesarrollo. Demostraron que las microduplicaciones del gen SHOX son un factor de susceptibilidad para TEA y otros trastornos del neurodesarrollo como discapacidad intelectual, retraso del lenguaje y retraso de aprendizaje. También puede presentarse una dismorfia craneofacial (micrognatia) y esquelética.

Los autores estiman una penetrancia del 3,6 % para el TEA y un 8,7 % para TND en pacientes con microduplicaciones del gen *SHOX* (Tropeano et al., 2016).

La duplicación Xp22.3 puede ser un factor de susceptibilidad de los trastornos del neurodesarrollo presentes en el paciente, sin embargo, esta alteración no explica el resto del fenotipo como la macrocefalia, dismorfia, CIA y prognatismo.

- [Técnica MLPA](#)

El resultado obtenido del caso 2 (dupXp22.33 en la *Figura 10*) mostró un valor numérico de 1,28, por tanto, se trató de una duplicación. El valor de la muestra de referencia era 1,24. La validación con la técnica MLPA confirmó el resultado del aCGH, se trataba de una duplicación del gen *SHOX* del cromosoma Xp22.3.

↓

2q37,3	3p14,2	2q37,3	Xp22,33	20q13,33	Xp22,33	16p11,2,21,1q21	16q22,2	17p11,2			Regio estu alteració	herència	
1,10	0,90	0,91	1,28	0,91	1,23	0,90	1,01	0,91	0,93	Val mosaic	A3	Xp22,33 dup	Confirmat
1,08	0,90	0,93	1,24	0,93	1,25	0,91	0,99	0,91	0,91	C+	A4	Xp22,33 Klinefelter	

*Figura 10. Resultado MLPA del caso 2.*

Una vez validado el caso 2 por la técnica MLPA, se procedió al cálculo del porcentaje de mosaicismo con la aplicación de la Fórmula 1. El resultado fue de 49,8 %.

### 8.2.3 Caso 3: Paciente de sexo masculino con discapacidad intelectual.

- [Técnica aCGH](#)

El aCGH del paciente mostraba una deleción intersticial en el brazo largo del cromosoma 22 con una longitud de 2,5Mb y una *log ratio* de -0,501 (*Figura 11*). El valor de la *log ratio* sugería que la CNV podría encontrarse en mosaicismo genético.

La fórmula del *array* según ISCN 2020 es: *arr[hg19] 22q11.21(18890162\_21441817)x1*

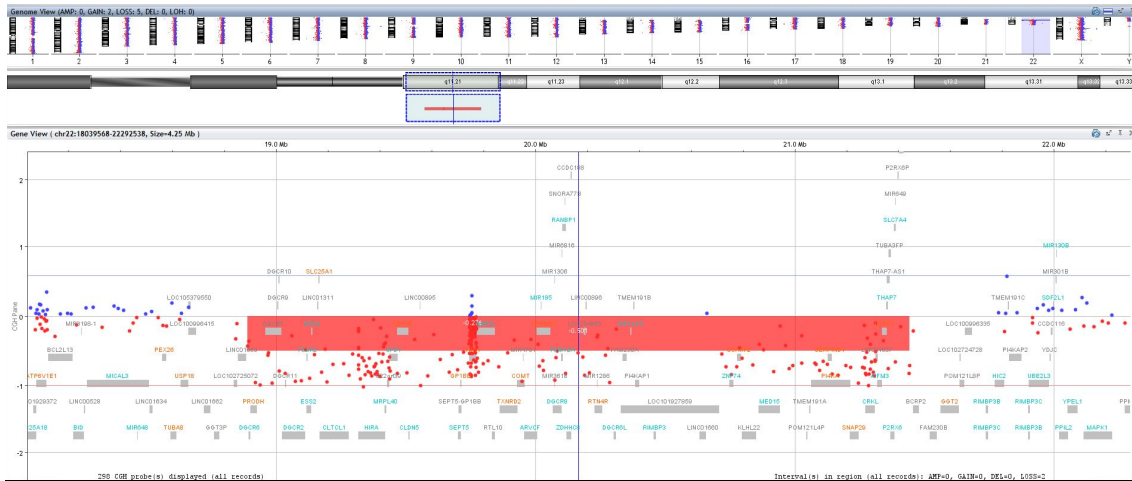


Figura 11. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent Cytogenomics donde se muestra una deleción de la citobanda q11.21 del cromosoma 22.

La deleción del cromosoma 22q11.21 es una de las microdeleciones más recurrentes en humanos con una incidencia de 1:4000 nacimientos. La deleción que presentaba el paciente se localiza entre dos regiones de repeticiones segmentarias LCR-A hasta LCR-D. Éstas pueden mediar en las CNVs del individuo a través de la recombinación homóloga no alélica. El brazo largo del cromosoma 22 posee un grupo de LCR susceptibles a la producción de CNVs, siendo la más común LCR-A y LCR-D que es las que presentaba el paciente (Burnside, 2015).

Según el OMIM, la deleción 22q11.21 causa el Síndrome Velocardiofacial (Figura 12):

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
22q11.21	Velocardiofacial syndrome	192430	AD	3	TBX1	602054

Figura 12. Relaciones gen-fenotipo de la deleción del cromosoma 22q11.21.

La deleción que presentaba el paciente corresponde al Síndrome Velocardiofacial. La haploinsuficiencia de los genes *TBX1*, *CRKL* y *MAPK1* son los responsables de este fenotipo. La clínica es variable y puede oscilar de leve a grave. Los rasgos más característicos de la deleción incluyen anomalías del paladar, dismorfia facial, retraso en el desarrollo, problemas de conducta, dificultades de aprendizaje y anomalías urogenitales (Burnside, 2015).

La deleción 22q11.21 presente en el paciente contiene los siguientes genes: *DGCR6*, *PRODH*, *DGCR5*, *DGCR9*, *DGCR10*, *DGCR2*, *DGCR11*, *DGCR14*, *TSSK2*, *GSC2*, *SLC25A1*, *CLTCL1*, *HIRA*, *MRPL40*, *C22orf39*, *UFD1L*, *CDC45*, *CLDN5*, *LOC150185*,

SEPT5, SEPT5-GP1BB, GP1BB, TBX1 GNB1L, C22orf29, TXNRD2, COMT, ARVCF, C22orf25, MIR185, DGCR8, MIR3618, MIR1306, TRMT2A, RANBP1, ZDHHC8, LOC150197, RTN4R, MIR1286, DGCR6L, PI4KAP1, RIMBP3, ZNF74, SCARF2, KLHL22, MED15, POM121L4P, TMEM191A, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, FLJ39582, MGC16703, P2RX6, SLC7A4.

- [Técnica MLPA](#)

El resultado obtenido del caso 3 (del22q11.21 en la *Figura 13*) mostró un valor numérico de 0,62, por tanto, se trató de una delección. El valor de la muestra de referencia era 1,30. La validación con la técnica MLPA confirmó el resultado del aCGH, se trataba de una delección en la región del cromosoma 22q11.21.

↓

22q11.21	3p14.2	Xp11.22	5q35	19q13.42	16p11.2	16p13.1	15q13.3	17q11.2	Regio estu alteraci herència				
0,62	1,13	0,81	0,95	1,15	1,12	1,16	1,23	1,01	Val mosai	A9		del	Confirmat
1,30	0,94	1,20	1,08	0,91	0,94	0,95	0,94	0,87	C+	A10	22q11,21	dup	

*Figura 13. Resultado MLPA del caso 3.*

Una vez validado el caso 3 por la técnica MLPA, se procedió al cálculo del porcentaje de mosaicismo con la aplicación de la Fórmula 1. El resultado fue de 58,8 %.

#### 8.2.4 Caso 4: Paciente de sexo masculino con Rasgos de Trastorno del espectro autista.

- [Técnica aCGH](#)

El aCGH del paciente mostraba una duplicación intersticial en el brazo corto del cromosoma 16 con una longitud de 540kb y una *log ratio* de 0,261 (*Figura 14*). El valor de la *log ratio* sugiere que la CNV podría encontrarse en mosaicismo genético.

La fórmula del *array* según ISCN 2020 es:

*arr[hg19] chr16p11.2(29652975\_30193606)x3*

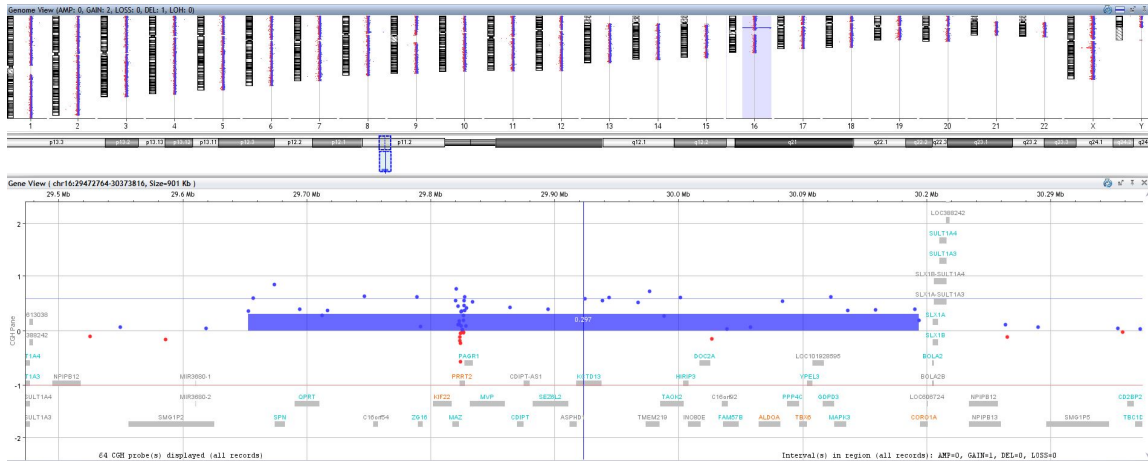


Figura 14. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent CytoGenomics donde se muestra una duplicación en el cromosoma 16p11.2.

Las CNVs entre los puntos de rotura BP4-BP5 de un tamaño de 600kb en la región 16p11.2 se encuentran entre las más frecuentes. Esta región contiene duplicaciones segmentarias que favorecen la formación de reorganizaciones: duplicaciones y deleciones mediante procesos de recombinación homóloga no alélica.

La CNV que presentaba el paciente era una duplicación entre los puntos de rotura BP4-BP5 e incluía los genes *SPN*, *QPRT*, *C16orf54*, *ZG16*, *KIF22*, *MAZ*, *PRRT2*, *PAGR1*, *MVP*, *CDIPT*, *CDIPT-AS1*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *KCTD13*, *TMEM219*, *TAOK2*, *HIRIP3*, *INO80E*, *DOC2A*, *C16orf92*, *FAM57B*, *ALDOA*, *PPP4C*, *TBX6*, *YPEL3*, *GDPD3*, *MAPK3*.

Según el OMIM, la duplicación 16p11.2 causa autismo y Síndrome de microduplicación 16p11.2 (Figura 15):

Location	Phenotype <span style="background-color: #f4a460; padding: 2px;">Clinical Synopses</span>	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
16p11.2	{Autism, susceptibility to, 14B}	614671		2
	Chromosome 16p11.2 duplication syndrome	614671		4

Figura 15. Relaciones gen-fenotipo de la duplicación del cromosoma 16p11.2.

La CNV del paciente se corresponde con el Síndrome de microduplicación 16p11.2. Este síndrome está asociado a un amplio espectro de anomalías del neurodesarrollo que incluyen el autismo (20 %), la discapacidad intelectual, el déficit de atención con hiperactividad, las convulsiones y la epilepsia. También se han reportado rasgos dismórficos, bajo peso, microcefalia y anomalías congénitas en menor proporción.

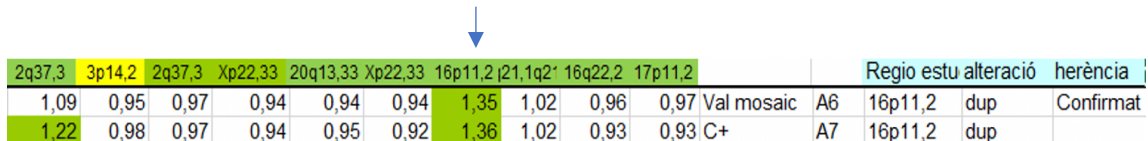
Existe un riesgo aumentado, alrededor del 15 %, de problemas psiquiátricos como la psicosis o la esquizofrenia (Giaroli et al., 2014);(Tabet et al., 2012).

Las duplicaciones tienen una penetrancia y una expresividad muy variable a diferencia de las deleciones que presentan una penetrancia elevada. En esta gran variabilidad, contribuyen genes adicionales y factores familiares (Steinman et al., 2016).

Por tanto, la duplicación en 16p11.2 que presentaba el paciente se corresponde con su fenotipo anómalo.

- [Técnica MLPA](#)

El resultado obtenido del caso 4 (dup16p11.2 en la *Figura 16*) mostró un valor numérico de 1,35, por tanto, se trató de una duplicación. El valor de la muestra de referencia era 1,36. La validación con la técnica MLPA confirmó el resultado del aCGH, se trataba de una duplicación en la región del cromosoma 16p11.2.



2q37,3	3p14,2	2q37,3	Xp22,33	20q13,33	Xp22,33	16p11,2	21q21,1q21	16q22,2	17p11,2	Regio estu alteració	herència			
1,09	0,95	0,97	0,94	0,94	0,94	1,35	1,02	0,96	0,97	Val mosaic	A6	16p11,2	dup	Confirmat
1,22	0,98	0,97	0,94	0,95	0,92	1,36	1,02	0,93	0,93	C+	A7	16p11,2	dup	

*Figura 16. Resultado MLPA del caso 4.*

Una vez validado el caso 4 por la técnica MLPA, se procedió al cálculo del porcentaje de mosaicismo con la aplicación de la Fórmula 1. El resultado fue de 39,66 %.

### 8.2.5 Caso 5: Gestante con aborto en el primer trimestre.

A la paciente se le realizó una biopsia corial para determinar si la causa del aborto era de origen genético. El embrión era de sexo masculino.

- [Técnica aCGH](#)

El aCGH mostraba una posible CNV en mosaico, que incluía una deleción parcial del gen *KIF1A*. La CNV detectada se trataba de una deleción en 2q37.3 con una longitud de 82kb y un valor de *log ratio* de -0,312 (*Figura 17*). El valor de la *log ratio* sugiere que la CNV podría encontrarse en mosaicismo genético.

La fórmula del *array* según ISCN 2020 es:

*arr[hg19] chr2q37.3(241627284\_241709377)x1*

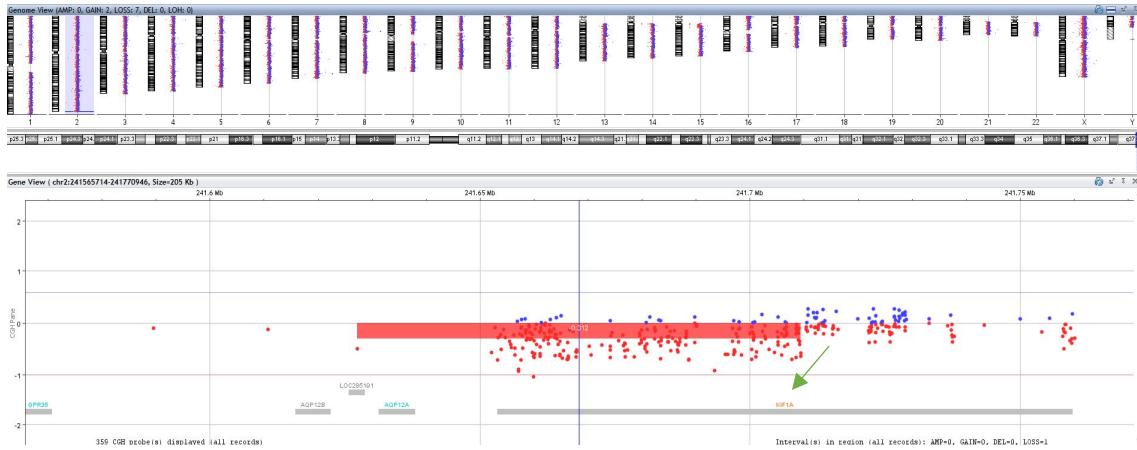


Figura 17. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent Cytogenomics donde se muestra una delección parcial del gen KIF1A en el cromosoma 2q37.3.

Según el OMIM, el gen KIF1A causa paraplejía espástica, neuropatía sensorial y síndrome de NESCAV (Figura 18):

Location	Phenotype <a href="#">Clinical Synopses</a>	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
2q37.3	NESCAV syndrome	614255	AD	3
	Neuropathy, hereditary sensory, type IIC	614213	AR	3
	Spastic paraplegia 30, autosomal dominant	610357	AD, AR	3
	Spastic paraplegia 30, autosomal recessive	610357	AD, AR	3

Figura 18. Relaciones gen-fenotipo del gen KIF1A.

Según la revisión (Montenegro-Garreud et al., 2020) se han reportado delecciones en KIF1A que causan discapacidad intelectual, hiperreflexia, hipotonía, ataxia, microcefalia, atrofia cerebelosa, nistagmo y atrofia óptica. La delección del gen KIF1A causa retraso en el desarrollo.

(Coe et al., 2019) realizó un estudio de 10.927 individuos con retraso en el desarrollo y autismo identificando 253 genes candidatos para los TND. La delección del gen KIF1A en 2q37 causa paraplejía espástica autosómica recesiva, neuropatía sensorial hereditaria autosómica recesiva o discapacidad intelectual autosómica dominante.

- [Técnica MLPA](#)

El resultado del caso 5 (del 2q37.3 en la Figura 19) dio un valor numérico de 1,02, este valor es normal. Se comparó con una muestra control de una delección con valor de 0,64. El valor del resultado de MLPA del caso 5 no confirmó el resultado del aCGH, por tanto, se trata de un falso positivo. No se confirmó la delección del gen KIF1A del cromosoma 2q37.3 y a su vez, descartamos la posibilidad de que la CNV fuera en mosaico.

↓

2q37,3	3p14,2	2q37,3	Xp22,33	20q13,33	Xp22,33	16p11,2	21,1q2'	16q22,2	17p11,2		Regio estu alteració	herència	
0,91	1,06	1,02	0,89	1,07	0,94	1,05	1,04	1,05	0,90	Val mosaic	A1	2q37,3 del	No es con
0,91	1,10	0,64	1,05	1,08	1,03	1,05	1,13	1,10	1,12	C+	A2	2q37,3 del	

Figura 19. Resultado MLPA del caso 5.

### 8.2.6 Caso 6: Paciente de sexo femenino con discapacidad intelectual.

- Técnica aCGH

El aCGH de la paciente mostraba una deleción en el cromosoma 16q22.2 con una longitud de 327 kb afectando al gen *HYDIN* (Figura 20). La CNV detectada se trataba de una deleción parcial del gen con una *log ratio* de -0,41.

La fórmula del *array* según ISCN 2020 es:

*arr[hg19] chr16q22.2(70873788\_71201509)x1*

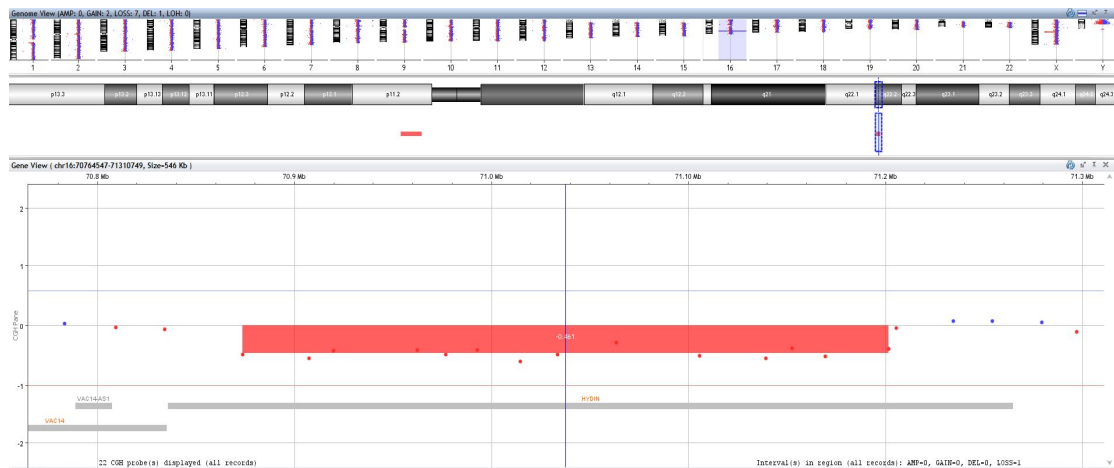


Figura 20. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent CytoGenomics donde se muestra una deleción parcial del gen *HYDIN* en el cromosoma 16q22.2.

Según el OMIM, el gen *HYDIN* causa Discinesia ciliar primaria tipo 5 con herencia autosómica recesiva (Figura 21).

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
16q22.2	Ciliary dyskinesia, primary, 5	608647	AR	3	HYDIN	610812

Figura 21. Relaciones gen-fenotipo del gen *HYDIN*.

La revisión (Brunetti-Pierri et al., 2008) relaciona el gen *HYDIN* con la hidrocefalia<sup>9</sup> en ratones. Un artículo, también demuestra que las CNVs que contienen el gen *HYDIN* se han relacionado con hidrocefalia y alteración de la motilidad ciliar en ratones, pero nunca

<sup>9</sup> Hidrocefalia: es la acumulación de líquido en el cerebro.

se ha asociado con el autismo. En su estudio, se reportó que en familias con autismo existe un aumento de las CNVs relacionadas con los genes *HYDIN* en niños con TEA. Las CNVs identificadas de *nov* tenían un tamaño superior a 50kb y se observaron en 17 genes diferentes, incluidos el gen *HYDIN* (Santhosh Girirajan et al., 2013).

- Técnica MLPA

El resultado del caso 6 (del 16q22.2 en la *Figura 22*) dio un valor numérico de 1,06, este valor entra dentro de una normalidad. El valor del resultado de MLPA del caso 6 no confirmó el resultado del aCGH, por tanto, se trata de un falso positivo. No se confirmó la delección del gen *HYDIN* del cromosoma 16q2.2 y a su vez, descartamos la posibilidad de que la CNV sea en mosaico.

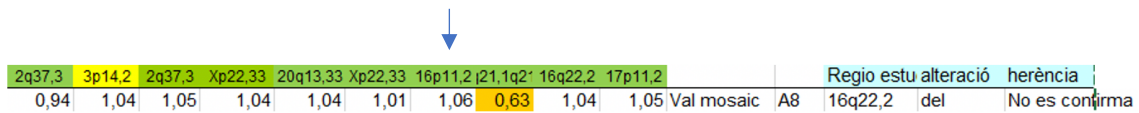


Figura 22. Resultado MLPA del caso 6.

### 8.2.7 Caso 7: Paciente de sexo masculino con TEA y discapacidad intelectual leve.

- Técnica aCGH

El aCGH del paciente mostraba una duplicación con una longitud 908 kb y una *log ratio* de 0,294. La CNV detectada en el cromosoma 17p11.2 afectaba a una región de múltiples genes como *KCNJ18*, *KCNJ12*, *MAP2K3* y *UBBP4* (*Figura 23*).

La fórmula del *array* según ISCN 2020 es:

*arr[hg19] chr17p11.2(21195608\_22104322)x3*

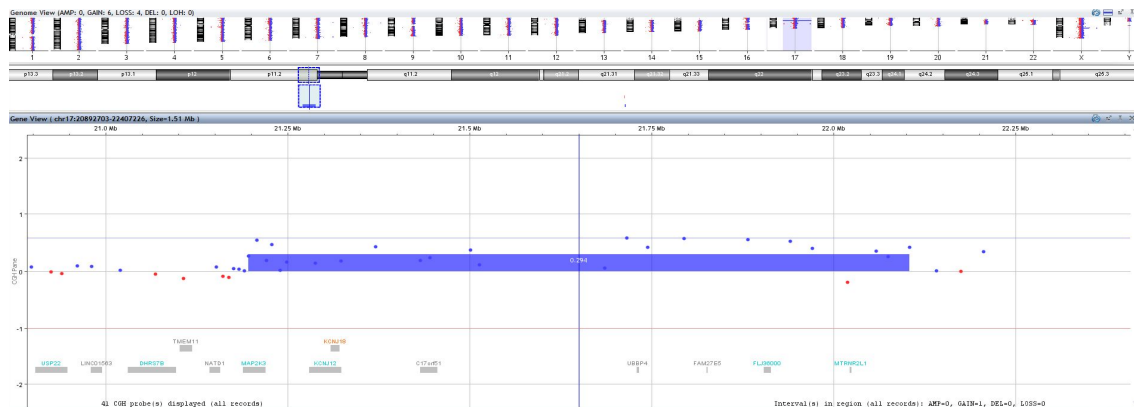


Figura 23. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent CytoGenomics donde se muestra una duplicación en la citobanda p11.2 del cromosoma 17.

Según el OMIM, la duplicación del cromosoma 17p11.2 que afecta al gen *KCNJ18* causa parálisis periódica tirotóxica susceptible tipo 2 con herencia autosómica dominante (Figura 24):

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
17p11.2	{Thyrotoxic periodic paralysis, susceptibility to, 2}	613239	AD	3


Figura 24. Relaciones gen-fenotipo del gen *KCNJ18*.

En la revisión (S. Girirajan et al., 2007) los pacientes con duplicaciones en el cromosoma 17p desarrollan discapacidad intelectual de leve a grave, retraso en el desarrollo, retraso del crecimiento, características conductuales, anomalías craneofaciales y baja estatura. Según los resultados del artículo, un paciente de sexo masculino de 8 años con retraso cognitivo, dismorfia facial, anomalías graves del comportamiento, extremidades débiles, neuropatía sensitivomotora y cardiopatía congénita padecía una duplicación parcial del cromosoma 17p. Se realizaron técnicas citogenéticas que revelaron la duplicación del cromosoma 17p11.2p12 y técnicas moleculares como FISH que confirmó la duplicación y una triplicación en mosaico o tetrasomía parcial en un 25 % de los núcleos analizados.

En la página web de *Clinvar*<sup>10</sup>, las duplicaciones que contienen los genes *KCNJ12* y *KCNJ18* están clasificadas como VOUS<sup>11</sup>.

- [Técnica MLPA](#)

El resultado obtenido del caso 7 (dup17p11.2 en la Figura 25) mostró un valor numérico de 1,41, por tanto, se trató de una duplicación. El valor de la muestra de referencia era 1,74. La validación con la técnica MLPA confirmó el resultado del aCGH, se trataba de una duplicación en la región del cromosoma 17p11.2.



2q37.3	3p14.2	2q37.3	xp22.33	20q13.33	xp22.33	16p11.2	121.1q2'	16q22.2	17p11.2	Regio estu alteració	herència			
0,91	0,99	0,98	0,92	0,98	0,94	0,99	1,03	0,99	1,41	Val mosaic	A9	17p11.2	dup	Confirmat
0,81	0,98	0,97	0,91	0,96	0,92	0,95	0,98	0,96	1,74	C+	A10	17p11.2	dup	

Figura 25. Resultado MLPA del caso 7.

Una vez validado el caso 7 por la técnica MLPA, se procedió al cálculo del porcentaje de mosaicismo con la aplicación de la Fórmula 1. El resultado fue de 45,20 %.

<sup>10</sup> Clinvar: archivo público con acceso gratuito a informes que relacionan las variaciones genéticas con el fenotipo.

<sup>11</sup> VOUS: Variantes de significado incierto.

### 8.2.8 Caso 8: Paciente de sexo femenino con convulsiones neonatales y resonancia que muestra afectación de la sustancia blanca cerebral de forma simétrica y difusa.

- [Técnica aCGH](#)

El aCGH de la paciente mostraba una deleción terminal en el brazo largo del cromosoma 20q13.3 con una longitud de 280kb y una *log ratio* de -0,391 (Figura 26). El valor de la *log ratio* sugiere que la CNV podría encontrarse en mosaicismo genético.

La fórmula del *array* según ISCN 2020 es:

*arr[hg19] chr20q13.3 (61927655-62208125)x1*

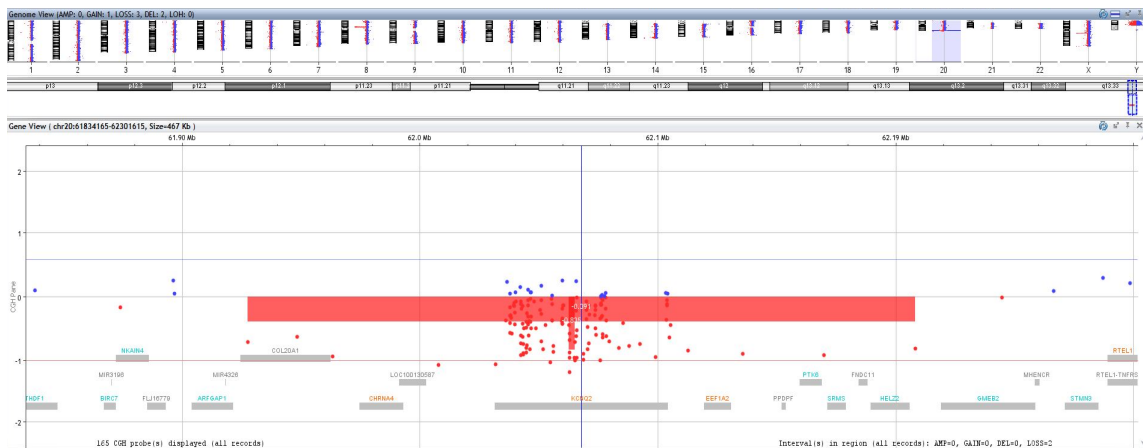


Figura 26. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent Cytogenomics donde se muestra una deleción del gen *KCNQ2* en el cromosoma 20q13.3.

La deleción en 20q13.3 contenía los genes *COL20A1*, *CHRNA4*, *KCNQ2*, *EEF1A2*, *PPDPF*, *PTK6*, *SRMS*, *C20orf195* y *HELZ2*. En esta región destacaban los genes *KCNQ2*, *CHRNA4* y *EEF1A2*.

El gen *KCNQ2* codifica para un canal de potasio dependiente de voltaje que se expresa en el cerebro y juega un papel crítico en la determinación de la respuesta a las entradas sinápticas y la electroexcitabilidad subumbral de las neuronas.

Las variantes patogénicas en heterocigosis del gen *KCNQ2* causan epilepsias neonatales autosómicas dominantes con un amplio espectro fenotípico que van desde convulsiones neonatales familiares benignas (*KCNQ2-BFNE*) hasta encefalopatía epiléptica de inicio temprano (*KCNQ2-NEE*) con discapacidad intelectual. La penetrancia de las variantes en *KCNQ2* para el fenotipo de las convulsiones neonatales o infantiles familiares benignas es aproximadamente del 70-80 % y mayoritariamente

hay un progenitor afectado. En cambio, la encefalopatía epiléptica neonatal se debe principalmente a variantes *de novo* (Bellini et al., 2013).

El gen *CHRNA4* codifica una subunidad alfa de receptores de acetilcolina neuronales. Variantes en este gen se han asociado a epilepsia lobar frontal nocturna autosómica dominante, trastorno que se caracteriza por una variedad de conductas paroxísticas (Mefford et al., 2012).

El gen *EEF1A2* codifica un complejo responsable de la liberación enzimática de tRNAs al ribosoma. Se han descrito variantes en este gen que cursan con encefalopatía epiléptica de debut temprano.


Según la revisión (Mefford et al., 2012) se ha demostrado que deleciones en 20q13.3 están asociadas a epilepsias neonatales y trastornos del neurodesarrollo. Se han observado casos con convulsiones neonatales, grado variable de discapacidad intelectual, retraso del desarrollo, deficiencias del lenguaje y comportamientos del espectro autista. Los genes *KCNQ2* y *CHRN4* están asociados con la epilepsia.

Existen casos reportados de deleciones en 20q13.33 que son consecuencia de cromosomas en anillo que suelen ser en mosaico. Los genes *EEF1A2* y *CHRNA4* presentes en el cromosoma 20 pueden desempeñar un papel importante en el retraso del desarrollo y convulsiones (Corrêa et al., 2020).

El valor de la *log ratio* observado en este estudio (-0.391) es compatible con una CNV mosaico.

- [Técnica MLPA](#)

El resultado obtenido del caso 9 (del20q13.3 en la *Figura 27*) mostró un valor numérico de 0,59, por tanto, se trató de una deleción. La validación con la técnica MLPA confirmó el resultado del aCGH, se trataba de una deleción en la región del cromosoma 20q13.3.



2q37,3	3p14,2	2q37,3	Xp22,33	20q13,33	Xp22,33	16p11,2	p21,1q2'	16q22,2	17p11,2		Regio estu alteració	herència	
0,99	1,07	1,05	1,02	0,59	1,02	1,04	1,16	1,05	1,06	Val mosaic	A5	20q13,33 del	Confirmat

*Figura 27. Resultado MLPA del caso 9.*

Una vez validado el caso 8 por la técnica MLPA, se procedió al cálculo del porcentaje de mosaicismo con la aplicación de la Fórmula 1. El resultado fue de 37,66 %.

### 8.2.9 Caso 9: Paciente de sexo femenino diagnosticada con Síndrome de Turner.

El caso 9 se valoró por separado por presentar monosomía total del cromosoma X y duplicación parcial del cromosoma Y. Se validó el posible mosaicismo con técnicas citogenéticas y moleculares: cariotipo con bandas G y análisis mediante FISH.

Se trata de una paciente de sexo femenino diagnosticada con Síndrome de Turner que se le realizaron las técnicas aCGH, FISH y cariotipo. A este caso, se le dedicó especial atención y se le aplicaron más técnicas para la detección de mosaicismo debido a su gran complejidad.

La paciente se trata de una niña de 7 años diagnosticada de Síndrome de Turner en otro centro con una fórmula cromosómica 45,X/46,X+mar. El Síndrome de Turner es un trastorno cromosómico asociado a una ausencia completa o parcial del cromosoma X. Las características clínicas incluyen baja estatura; insuficiencia ovárica prematura; cuello corto y alado; cabello con implantación baja en la nuca; manos y pies hinchados. La mayoría de los casos tienen inteligencia normal, pero algunas tienen retraso en el desarrollo, problemas de aprendizaje y/o problemas de conducta. El Síndrome de Turner tiene una prevalencia de 1 de cada 1.500 o 2.500 nacimientos (Bahillo-Currieses et al., 2016).

- [Técnica aCGH](#)

En el aCGH se observaron dos variantes patogénicas según la fórmula ISCN 2020: *arr[hg19] Xp22.33q28(2700078\_155232894)x1, Yp11.32q11.23(2307989\_28746696)x2*

Se trataba de una monosomía de todo el cromosoma X con una longitud de 152 Mb y una *log ratio* de 0,8 y una duplicación del cromosoma Y, brazo corto y brazo largo sin incluir la región distal heterocromática y la región pseudoautosómica PAR2, con una longitud de 59 Mb y una *log ratio* de 2,79 (Figura 28).

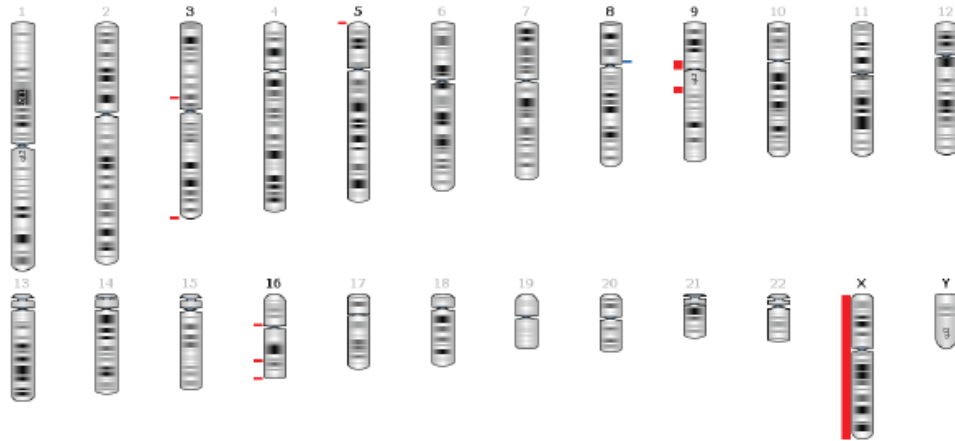


Figura 28. Resultado de la técnica aCGH del Caso 1 donde se muestra una DEL total del cromosoma X y DUP parcial del cromosoma Y.

La deleción total del cromosoma X según la fórmula ISCN 2020 (Figura 29):

$arr[hg19] Xp22.33q28(2700078\_155232894)x1$



Figura 29. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent CytoGenomics donde se muestra una deleción total del cromosoma X.

La duplicación parcial del cromosoma Y según la fórmula ISCN 2020 (Figura 30):

$arr[hg19] Yp11.32q11.23(2307989\_28746696)x2$

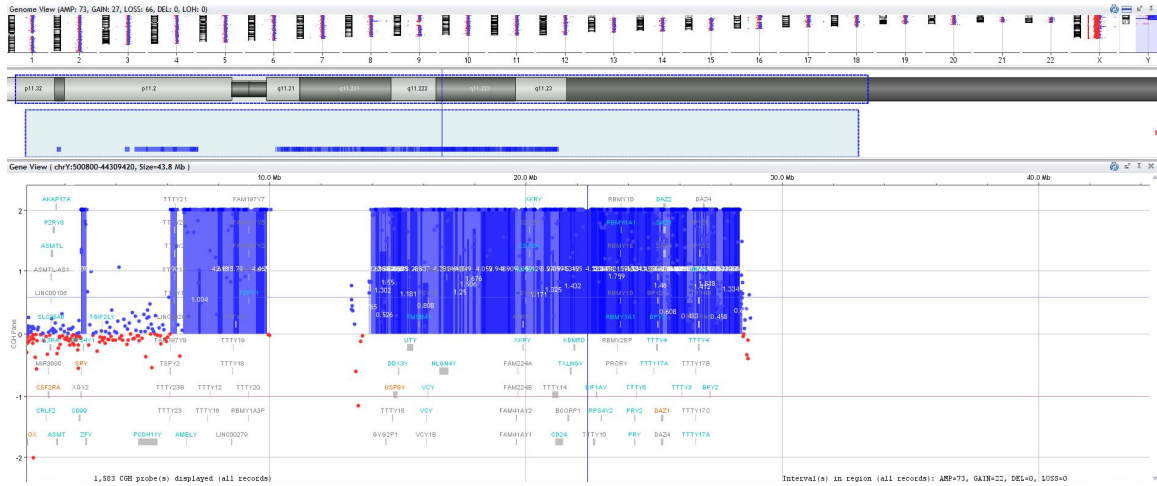


Figura 30. Resultado de la técnica aCGH por el software Agilent CytoGenomics donde se muestra una duplicación parcial del cromosoma Y.

- Técnica del cariotipo

Para caracterizar el mosaicismo de los cromosomas sexuales del caso 9 se realizó el cariotipo.

Se analizaron un total de 50 metafases, de éstas se obtuvieron 25 metafases 45,X que representan el 50 % del total y 25 metafases 46,XY que representan el otro 50 % (Anexo 13.1).

Resultado: mos 45,X[25]/46,X,idic(Y)(q11.23)[25]

El análisis de metafases realizada con tinción de bandas G muestra mosaicismo con dos líneas celulares en proporciones similares.

Una línea con monosomía del cromosoma X (Figura 31) y otra línea con un cromosoma Y isodicéntrico (Figura 32).

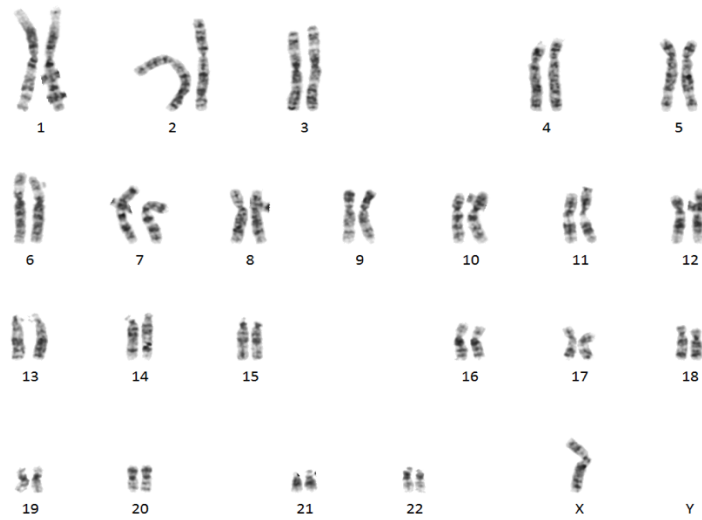


Figura 31. Metafase 45,X Síndrome de Turner.

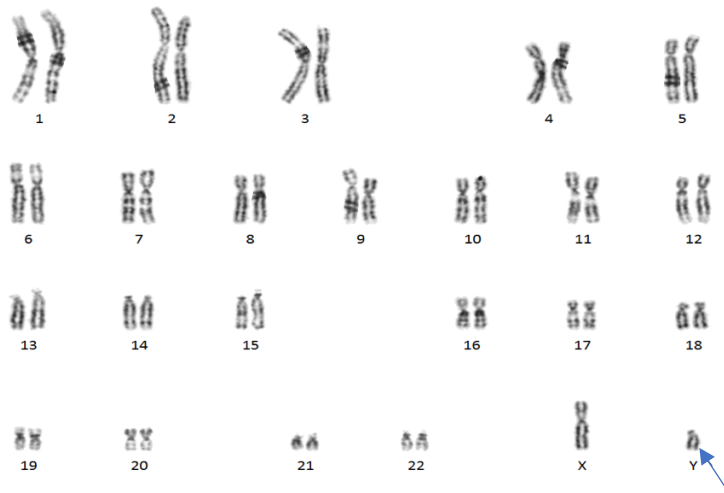


Figura 32. Metafase 46,X, idic(Y)(q11.23).

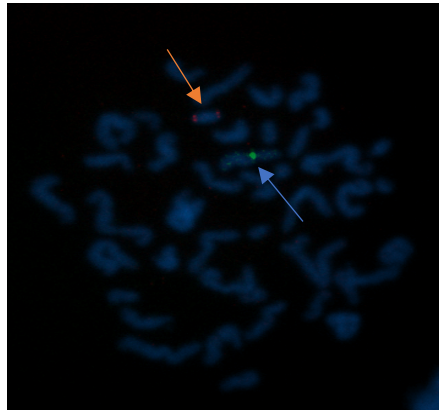
- [Técnica FISH](#)

En el caso 9 se decidió realizar la técnica FISH para caracterizar la estructura del cromosoma Y.

La primera sonda utilizada fue la sonda SRY/CEPX sonda (LSI SRY Spectrum Orange /CEP X Spectrum Green Vysis de la casa comercial Abbot).

Se analizaron las 18 metafases en las que en 12 metafases se observó 1 señal del CEPX y 2 señales del SRY y 8 metafases con 1 señal verde del CEPX y ninguna señal roja del SRY.

Con el programa *Metafer FISH: Metacyte* se capturaron y analizaron 144 núcleos, de los cuales 86 núcleos mostraron 1 señal verde del CEPX (59,7 %) (flecha azul en la *Figura 33*) y 2 señales rojas de la sonda SRY (40,3 %) (flecha naranja en la *Figura 33*).

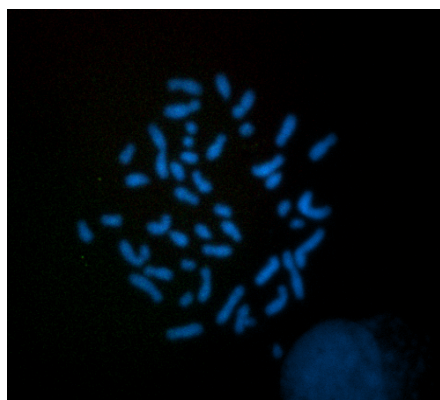


*Figura 33. Metafase obtenida mediante la técnica FISH con la sonda SRY/CEPX.*

Se realizó una segunda FISH para poder definir de una manera más exacta la estructura del cromosoma Y. Para ello, se realizaron extensiones en 3 portaobjetos.

El portaobjetos 1 se hibridó con la sonda *Vysis CEPY (sat III) SpectrumGreen DNA* de la casa *Abbot*.

Se capturó el portaobjetos con el programa *Metafer M Search/FL* y no se observó ninguna señal para el centrómero del cromosoma Y. Para confirmar la ausencia de señal, se comprobó la fluorescencia mediante un microscopio manual. Finalmente, se descartó que hubiera señal verde (*Figura 34*).

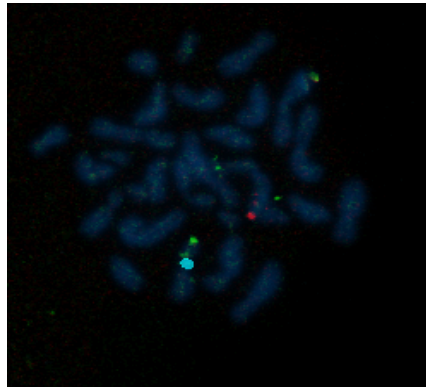


*Figura 34. Metafase obtenida mediante la técnica FISH con la sonda CEPY.*

Los portaobjetos 2 y 3 se hibridaron con sondas subtelo méricas *ToTelVysion tm Multicolor DNA Probe Mixtures* de la casa comercial *Abbot*. Estas sondas consisten en una mezcla de sondas de diferentes cromosomas (*Mixture 1* y *Mixture 2*).

La *Mixture 1* incluía las sondas *TelVysion 1p Spectrum Green*, *TelVysion 1q SpectrumOrange*, *TelVysion Xp/Yp Spectrum Orange and SpectrumGreen*, *CEPX Spectrum Aqua*.

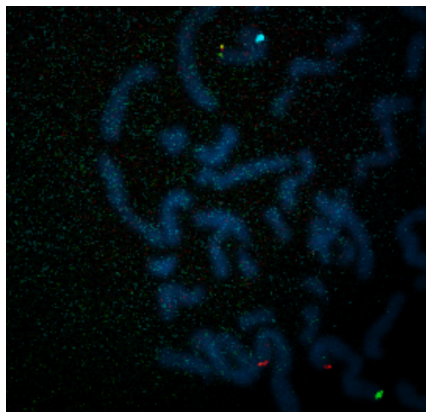
Usando la *Mixture 1*, se analizaron 10 metafases y en el 30 % de las mismas había 1 única señal de Xp sin presencia de señales Yq, mientras que en el 70 % de metafases se obtuvo 1 señal correspondiente a Xp y dos señales a Yp (*Figura 35*).



*Figura 35. Metafase obtenida mediante la técnica FISH con la sonda Xp/Yp.*

La *Mixture 2* consistía en la mezcla de sondas *TelVysion 2p Spectrum Green*, *TelVysion 2q SpectrumOrange*, *TelVysion Xq/Yq SpectrumOrange and SpectrumGreen*, *CEP X Spectrum Aqua*.

Se analizaron 8 metafases con esta *Mixture 2* y no se observó presencia de señal del cromosoma Yq. El 100 % de las metafases tenían únicamente señal en Xq (*Figura 36*).



*Figura 36. Metafase obtenida mediante la técnica FISH con la sonda Xq/Yq.*

El análisis de la FISH en metafases detecta 2 señales de SRY y dos señales subteloméricas Yp localizadas en los extremos del cromosoma Y. Ausencia de señal CEP Y (DYZ1) región heterocromática Yq12 y señal subtelomérica Yq.

La fórmula global de la técnica FISH según el ISCN 2020 es:

ish idic(Y)(SRY++,DXYS129++,ESTCdy16c07-,DYZ1-)

- [Interpretación de los resultados del caso 9](#)

El caso 9 se le realizó la técnica de aCGH para la caracterización del cromosoma marcador y se observó una monosomía del cromosoma X y una duplicación parcial del cromosoma Y. Para definir el mosaicismo y la estructura del cromosoma sexual de la paciente se le realizaron las técnicas del cariotipo y FISH.

Se determinó que el cromosoma Y se trataba de un cromosoma isodicéntrico. Los cromosomas isodicéntricos son aquellos que contienen fragmentos de material genético en forma de imagen especular y poseen dos centrómeros. En este caso, se trata de un cromosoma Y que contiene un brazo corto y parte del brazo largo hasta la banda Yq11.23 (de acuerdo con el resultado del aCGH).

Por tanto, la paciente diagnosticada previamente con Síndrome de Turner presenta mosaicismo genético (según el resultado del cariotipo) con dos líneas celulares; una monosomía del X y otra línea con el cromosoma Y parcialmente duplicado desde Yp11.32 hasta q11.23.

El cromosoma Y es compatible con un cromosoma isodicéntrico de acuerdo con el resultado de FISH, siendo esta alteración de las más comunes en los mosaicos de cromosomas sexuales (Manotas et al., 2021).

El mosaicismo es típico en el Síndrome de Turner, en un estudio de 902 individuos que lo padecían, el 31 % de ellos presentaban cariotipos en mosaico (Kruszka et al., 2020). El espectro fenotípico del mosaicismo 45, X con cromosoma Y es variable dando lugar a hipospadias, genitales ambiguos, Síndrome de Turner, sexo reverso y varón infértil. En este caso se trata de un Sd. de Turner en mosaico con presencia del cromosoma Y. Alrededor del 5 al 12 % de los casos de Síndrome de Turner presentan cromosoma Y (Saldarriaga Gil et al., 2011).

Las características clínicas en este tipo de mosaico con un cromosoma Y normal o un cromosoma Y isodicéntrico son similares al Síndrome de Turner. El riesgo de padecer

alteraciones del sistema endocrinológico, renal, inmunológico y problemas del neurodesarrollo en individuos mosaico con una línea celular 45, X y otra línea 46, XY es notablemente similar a los individuos con Síndrome de Turner que presentan una única línea celular con monosomía del cromosoma X (Guzewicz et al., 2021).

Las pacientes diagnosticadas de Síndrome de Turner con presencia de cromosoma Y (completo o parcial) tienen mayor riesgo de desarrollar gonadoblastoma (Guzewicz et al., 2021); (Manotas et al., 2021).

### 8.3 Interpretación global de los resultados

La valoración global de los resultados ha mostrado que los casos 1, 5 y 6 se tratan de falsos positivos al no haber podido ser validados por la técnica MLPA. Este resultado no es extraño, ya que las muestras del caso 1 y 5 procedían de biopsias de córion. Las muestras de biopsia corial acostumbran a tener muchas más CNVs y una DLRS más elevada que las de sangre periférica, debido a que el ADN prenatal suele estar más fragmentado.

Los casos 3 y 8 se tratan de deleciones que han sido validadas por la técnica MLPA y sus valores de las *log ratios* han sido evaluados numéricamente. Por tanto, podemos confirmar que se tratan de CNVs en mosaico.

Los casos 2, 4 y 7 se tratan de duplicaciones que han sido validadas por la técnica MLPA pero, es difícil establecer un diagnóstico de las CNVs en mosaico. Los valores de sus *log ratios* nos pueden hacer sospechar que estamos ante posibles casos de mosaicismo genético. Para confirmar esta teoría, deberíamos realizar otras pruebas más sensibles a la detección de mosaicos como el de la técnica FISH con sondas específicas.

Las duplicaciones en mosaico son más difíciles de diagnosticar que las deleciones en mosaico por el valor de las *log ratios*. Una deleción en mosaico se considera cuando hay un valor de -0,3 o -0,4 aproximadamente, en cambio, una duplicación en mosaico el valor de la *log ratio* debería ser de aproximadamente 0,32, sin embargo, el valor teórico de las duplicaciones sin mosaicismo es 0,5. Los valores de *log ratio* de las duplicaciones en mosaico se solapan con los valores establecidos para las duplicaciones sin mosaico (0,46-0,8).

Por tanto, los resultados obtenidos de las técnicas citogenéticas y moleculares concluyen que solo 3 casos de los 9 casos estudiados (casos 3, 8 y 9) se tratan de CNVs

en mosaico genético y los casos 2, 4 y 7 quedan pendientes de validación con técnicas complementarias más específicas.

El nuevo protocolo diseñado *CGHv2mosaic\_31març2021\_* ha demostrado ser eficaz para la detección de CNVs en mosaico y la identificación de casos que con el protocolo *OGT-Efsa-clas-loss 0,4* no habían sido detectados. El caso 8 no fue identificado por el antiguo procotolo y sí por el nuevo. Esto sugiere que la sensibilidad del nuevo protocolo es mayor para detección de CNVs.

## 9. Conclusiones

Las conclusiones extraídas en este trabajo son:

1. El diseño de un nuevo protocolo más sensible a la detección de casos mosaico ha sido útil para el diagnóstico de los 6 casos obtenidos como mosaicismos genéticos. Además, ha permitido identificar una nueva CNV (caso 8) no detectada con el antiguo protocolo (objetivo 1).
2. La técnica aCGH es la primera técnica de cribaje de identificación de CNVs en mosaico. La técnica aCGH es una buena opción para detectar CNVs en mosaico debido al valor numérico (*log ratio*) que calculan los softwares utilizados (objetivo 2).
3. El uso de técnicas citogenéticas y moleculares complementarias es imprescindible para el diagnóstico de casos de mosaicismo. La técnica MLPA ha sido útil para la validación de las CNVs obtenidas a través de la técnica aCGH. La técnica FISH ha sido útil para evaluar el porcentaje de mosaicismo y la técnica del cariotipo ha sido indispensable para evaluar la estructura de los cromosomas sexuales del caso 9 (objetivo 3).
4. Según la bibliografía descrita para el desarrollo de la fórmula del porcentaje de mosaicismo, se estimó que de una cohorte de 629 pacientes deberían presentar mosaicismo genético 3,49. Una vez realizado el análisis de los resultados, los casos de mosaicismo son un total de 6 sobre 629, que corresponde al 0,95 %. Aunque el porcentaje calculado supere el porcentaje estimado (0,55 %) el resultado obtenido confirma la hipótesis planteada (hipótesis).

## 10. Perspectivas de futuro

Ha quedado abierta una línea de investigación para los tres casos (casos 2, 4 y 7) de duplicación como posibilidad de ser mosaicismos genéticos mediante el uso de técnicas moleculares más personalizadas. Se diseñará una sonda customizada para el análisis de estas CNVs mediante la técnica FISH.

## 11. Bibliografía

1. Alonso Cerezo, C. (2007). Bases cromosómicas de las alteraciones genéticas humanas: Comisión de genética molecular. In *Química Clínica* (Vol. 26, Issue 4).
2. Bahillo-Curieses, M. P., Prieto-Matos, P., Quiroga González, R., Regueras Santos, L., Blanco Barrio, A., & Rupérez Peña, S. (2016). Síndrome de Turner: análisis de 42 casos. *Medicina Clínica*, 147(8). <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.06.033>
3. Bellini, G., Miceli, F., Soldovieri, M. V., Miraglia del Giudice, E., Coppola, G., & Tagliatela, M. (2013). KCNQ2-Related Disorders. *GeneReviews* (Internet).
4. Blesa, S., Olivares, M. D., Alic, A. S., Serrano, A., Lendinez, V., González-Albert, V., Olivares, L., Martínez-Hervás, S., Juanes, J. M., Marín, P., Real, J. T., Navarro, B., García-García, A. B., Chaves, F. J., & Ivorra, C. (2020). Easy One-Step Amplification and Labeling Procedure for Copy Number Variation Detection. *Clinical Chemistry*, 66(3). <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa002>
5. Brunetti-Pierri, N., Berg, J. S., Scaglia, F., Belmont, J., Bacino, C. A., Sahoo, T., Lalani, S. R., Graham, B., Lee, B., Shinawi, M., Shen, J., Kang, S. H. L., Pursley, A., Lotze, T., Kennedy, G., Lansky-Shafer, S., Weaver, C., Roeder, E. R., Grebe, T. A., ... Patel, A. (2008). Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nature Genetics*, 40(12). <https://doi.org/10.1038/ng.279>
6. Burnside, R. D. (2015). 22q11.21 deletion syndromes: A review of proximal, central, and distal deletions and their associated features. In *Cytogenetic and Genome Research* (Vol. 146, Issue 2). <https://doi.org/10.1159/000438708>

7. Cardoso, A. R., Oliveira, M., Amorim, A., & Azevedo, L. (2016). Major influence of repetitive elements on disease-associated copy number variants (CNVs). In *Human Genomics* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40246-016-0088-9>
8. Cheung, S. W., Shaw, C. A., Scott, D. A., Patel, A., Sahoo, T., Bacino, C. A., Pursley, A., Li, J., Erickson, R., Gropman, A. L., Miller, D. T., Seashore, M. R., Summers, A. M., Stankiewicz, P., Chinault, A. C., Lupski, J. R., Beaudet, A. L., & Sutton, V. R. (2007). Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 143(15). <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31740>
9. Coe, B. P., Stessman, H. A. F., Sulovari, A., Geisheker, M. R., Bakken, T. E., Lake, A. M., Dougherty, J. D., Lein, E. S., Hormozdiari, F., Bernier, R. A., & Eichler, E. E. (2019). Neurodevelopmental disease genes implicated by de novo mutation and copy number variation morbidity. *Nature Genetics*, 51(1). <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0288-4>
10. Corrêa, T., Venâncio, A. C., Galera, M. F., & Riegel, M. (2020). Candidate Genes Associated with Delayed Neuropsychomotor Development and Seizures in a Patient with Ring Chromosome 20. *Case Reports in Genetics*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5957415>
11. De, S. (2011). Somatic mosaicism in healthy human tissues. In *Trends in Genetics* (Vol. 27, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.002>
12. Eisa, A. A., Bang, S., Crawford, K. J., Murphy, E. M., Feng, W. W., Dey, S., Wells, W., Kon, N., Gu, W., Mehlmann, L. M., Vijayaraghavan, S., & Kurokawa, M. (2020). X-Linked Huwe1 Is Essential for Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. *iScience*, 23(9). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101523>
13. Giaroli, G., Bass, N., Strydom, A., Rantell, K., & McQuillin, A. (2014). Does rare matter? Copy number variants at 16p11.2 and the risk of psychosis: A systematic review of literature and meta-analysis. *Schizophrenia Research*, 159(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.09.025>
14. Gimeno-Martos, S., Cavero-Carbonell, C., López-Maside, A., Bosch-Sánchez, S., Martos-Jiménez, C., & Zurriaga, O. (2016). Anomalías cromosómicas: la experiencia del Registro de Anomalías Congénitas de

- la Comunitat Valenciana. *Anales de Pediatría*, 84(4).  
<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.09.010>
15. Girirajan, S., Williams, S. R., Garbern, B., Nowak, N., Hatchwell, E., & Elsea, S. H. (2007). 17p11.2p12 triplication and del(17)q11.2q12 in a severely affected child with dup(17)p11.2p12 syndrome. *Clinical Genetics*, 72(1). <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00831.x>
  16. Girirajan, Santhosh, Dennis, M. Y., Baker, C., Malig, M., Coe, B. P., Campbell, C. D., Mark, K., Vu, T. H., Alkan, C., Cheng, Z., Biesecker, L. G., Bernier, R., & Eichler, E. E. (2013). Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, 92(2). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.12.016>
  17. Guzewicz, L., Howell, S., Crerand, C. E., Umbaugh, H., Nokoff, N. J., Barker, J., & Davis, S. M. (2021). Clinical phenotype and management of individuals with mosaic monosomy X with Y chromosome material stratified by genital phenotype. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 185(5). <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62127>
  18. Kruszka, P., Addissie, Y. A., Tekendo-Ngongang, C., Jones, K. L., Savage, S. K., Gupta, N., Sirisena, N. D., Dissanayake, V. H. W., Paththinige, C. S., Aravena, T., Nampoothiri, S., Yesodharan, D., Girisha, K. M., Patil, S. J., Jamuar, S. S., Goh, J. C. Y., Utari, A., Sihombing, N., Mishra, R., ... Muenke, M. (2020). Turner syndrome in diverse populations. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 182(2). <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61461>
  19. Manotas, M. C., García-Acero, M., González, D. M., Moreno, O. M., Suárez-Obando, F., Céspedes, C., Forero, C., Pérez, J., Fernández, N., & Rojas, A. (2021). Clinical and molecular cytogenetic characteristics of five cases with isodicentric Y chromosome. *Sexual Development*. <https://doi.org/10.1159/000512803>
  20. Mefford, H. C., Cook, J., & Gospe, S. M. (2012). Epilepsy due to 20q13.33 subtelomere deletion masquerading as pyridoxine-dependent epilepsy. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 158 A(12). <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35633>
  21. Montenegro-Garraud, X., Hansen, A. W., Khayat, M. M., Chander, V., Grochowski, C. M., Jiang, Y., Li, H., Mitani, T., Kessler, E., Jayaseelan, J., Shen, H., Gezdirici, A., Pehlivan, D., Meng, Q., Rosenfeld, J. A.,

- Jhangiani, S. N., Madan-Khetarpal, S., Scott, D. A., Abarca-Barriga, H., Gibbs, R. A. (2020). Phenotypic expansion in KIF1A-related dominant disorders: A description of novel variants and review of published cases. *Human Mutation*, 41(12). <https://doi.org/10.1002/humu.24118>
22. Muthusamy, B., Nguyen, T. T., Bandari, A. K., Basheer, S., Selvan, L. D. N., Chandel, D., Manoj, J., Gayen, S., Seshagiri, S., Chandra Girimaji, S., & Pandey, A. (2020). Exome sequencing reveals a novel splice site variant in HUWE1 gene in patients with suspected Say-Meyer syndrome. *European Journal of Medical Genetics*, 63(1). <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.02.007>
23. Pham, J., et al. (2014). Somatic mosaicism detected by exon-targeted, high-resolution aCGH in 10,362 consecutive cases. *European Journal of Human Genetics*, 22 (969-978), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.285>
24. Picard, F., Robin, S., Lavielle, M., Vaisse, C., & Daudin, J. J. (2005). A statistical approach for array CGH data analysis. *BMC Bioinformatics*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-27>
25. Saldarriaga Gil, W., Ávila Sánchez, F., & Isaza de Lourido, C. (2011). SÍNDROME DE TURNER CON MOSAICISMO 45X/46XY: REPORTE DE CASO. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 76(1). <https://doi.org/10.4067/s0717-75262011000100010>
26. Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Månér, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., Navin, N., Lucito, R., Healy, J., Hicks, J., Ye, K., Reiner, A., Gilliam, T. C., Trask, B., Patterson, N., ... Wigler, M. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305(5683). <https://doi.org/10.1126/science.1098918>
27. Shaffer, L. G., & Bejjani, B. A. (2004). A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. In *Human Reproduction Update* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh022>
28. Steinman, K. J., Spence, S. J., Ramocki, M. B., Proud, M. B., Kessler, S. K., Marco, E. J., Green Snyder, L. A., D'Angelo, D., Chen, Q., Chung, W. K., & Sherr, E. H. (2016). 16p11.2 deletion and duplication: Characterizing neurologic phenotypes in a large clinically ascertained cohort. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 170(11). <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37820>

29. Tabet, A. C., Pilorge, M., Delorme, R., Amsellem, F., Pinard, J. M., Leboyer, M., Verloes, A., Benzacken, B., & Betancur, C. (2012). Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother. *European Journal of Human Genetics*, 20(5). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.244>
30. Tropeano, M., Howley, D., Gazzellone, M. J., Wilson, C. E., Ahn, J. W., Stavropoulos, D. J., Murphy, C. M., Eis, P. S., Eli Hatchwell, E., Dobson, R. J. B., Robertson, D., Holder, M., Irving, M., Josifova, D., Nehammer, A., Ryten, M., Spain, D., Pitts, M., Bramham, J., ... Murphy, D. G. (2016). Microduplications at the pseudoautosomal SHOX locus in autism spectrum disorders and related neurodevelopmental conditions. *Journal of Medical Genetics*, 53(8). <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103621>

#### **Páginas web consultadas:**

- *Appendices*. (2020, 24 noviembre). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/surveillancemanual/appendices/appendix->
- *Anomalías congénitas*. (2020, 1 diciembre). Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>

## **12. Autoevaluación**

La elección del Hospital Universitario *Parc taulí*, así como el equipo de profesionales del laboratorio de genética que me han tutelado en las prácticas curriculares y el hecho de incluirme en uno de sus proyectos de investigación para la realización de mi TFG, ha sido muy gratificante profesional y académicamente.

El tema que he abordado, la revisión bibliográfica y el desarrollo de la parte experimental en este trabajo de final de grado ha sido un reto que creo que he podido conseguir.

Los conocimientos en el campo de la genética y la experiencia en un laboratorio junto al equipo de profesionales de este hospital han sido decisivos a la hora de elegir hacia donde quiero enfocar el futuro de mi carrera profesional.

La dedicación y el esfuerzo que he puesto en este trabajo de final de grado me hacen sentir orgullosa de mí misma y del resultado obtenido.

## 13. Anexos

### 13.1 50 metafases del cariotipo caso 9

Número de porta	Metafase	Fórmula cromosómica
<b>Portaobjetos 2</b>	9	46,XY
	12	45,X
	16	46,XY
	17	43,X -21 -22
	21	45,X
	32	45,XY -20
	41	41,X -15 -16-19
	44	44,X -22
	52	45,X
	65	45,X
<b>Portaobjetos 3</b>	95	46,XY
	108	46,XY
	112	46,XY
	117	45,X
	120	45,X
	122	46,XY
	140	45,X
	148	44,X -16
	161	45,X
	165	46,XY
<b>Portaobjetos 7</b>	166	46,XY
	180	45,X
	187	46,XY
	190	45,X
	202	45,X
	208	45,XY -19
	211	44,X -5
	213	46,XY
	218	45,X
	219	46,XY
222	45,X -5	
223	46,XY	
224	46,XY	
225	46,XY	

<b>Portaobjetos 8</b>	230	46,XY
	236	45,X
	239	45,X
	243	46,XY
	248	45,X
	249	46,X +19
	256	45,X
	257	46,XY
	262	46,XY
<b>Portaobjetos 4</b>	265	46,XY
	270	46,XY
	278	45,X
	285	46,XY
	286	46,XY
	294	45,XY -9
	295	45,X

Tabla 1. Descripción de las 50 metafases del cariotipo del Caso 1.

### 13.2 Sondas utilizadas en MLPA

CASO	CNV	SONDA MLPA
<b>2</b>	chr X q11.22 (53501295-53608073)	SONDA 212 (53579293-53579343)
<b>3</b>	chr X p22.3 (586064-1327751)	SONDA 89 (809261-809319) y SONDA 334 (605700-605767)
<b>4</b>	chr 22q11.21 (18890162-21441817)	SONDA 216 (21119133-21119186) y SONDA 310 (18924018-18924059)
<b>5</b>	chr 16p11.2 (29652975-30193606)	SONDA 335 (30013363-30013434)
<b>6</b>	chr 2 q37.3 (241627284-241709377)	SONDA 281 (24655935-24165595) y SONDA 304 (241666244-241666293)
<b>7</b>	chr 16 q22.2 (70873788-71201509)	SONDA 306 (70979636-70979719)
<b>8</b>	chr 17 p11.2 (21195608-22104322)	SONDA 308 (21729893-21729980)
<b>9</b>	chr 20 q13.3 (61927655-62208125)	SONDA 309 (62103553-62103614)

Tabla 2. Descripción de las sondas utilizadas por la técnica MLPA.

### 13.3 Protocolo de Cariotipo sangre constitucional

Primero se recogen las muestras, se les asigna un número de genética y se anota en el tubo.

#### 1. Siembra de cultivo

- Atemperar en el baño de 37 °C el medio de cultivo Medio P que se encuentra en la nevera.
- Entrar en la cámara estéril, poner en marcha el flujo laminar de la cabina, encender el bunsen y colocarse los guantes estériles.
- Mezclar el tubo de muestra (sangre) y aspirar 0,5 mL de sangre con la jeringuilla de insulina. Añadir 5 mL de medio P + 0,5 mL de sangre y agitar suavemente.
- Dejar incubar en la estufa ES21 a 37 °C i 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.
- A las 50 horas de cultivo añadir 0,1 mL de la solución A del Synchronet, previamente atemperado en el baño de 37 °C. Tapar los viales con papel de plata. Este paso se realiza dentro de la cámara esteril pero no hace falta hacerlo bajo el flujo laminar.
- Reincubar 5 horas a la estufa ES21 a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.
- Pasadas las 5 horas, se añaden 0,1 mL de Colcemid (previamente atemperado) con una pipeta y reincubar 10 minutos en la estufa de ES21 a 37 +- 1°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

*Si se trata de cultivo de placenta, restos ovulares y tejidos fetales:*

- En tres cápsulas pequeñas de Petri (dos grandes y una pequeña) y con una jeringuilla de 10-20mL, dispensar en las cápsulas grandes unos 7-9 mL de medio MEM y 0,2-0,3 mL de Penicilina o Estreptomicina con una jeringuilla de insulina.
- Sacar la muestra de tejido con una y ponerla en la placa de Petri.
- Con la ayuda de una aguja y un bisturí cortar un fragmento del tejido. En caso de tratarse de placenta, escoger un fragmento que esté bien vascularizado (de color rosa).
- Una vez se ha cortado el fragmento, transferirlo a otra cápsula de Petri con medio para un segundo lavado.
- Guardar una parte del tejido en un criotubo para guardarlo en el congelador.
- El tejido sobrante pasarlo a la última cápsula de Petri que contiene 1 mL de MEM y con la ayuda de dos agujas, trozearlo hasta obtener hilos de unos 2-3mm.

- Cuando esté troceado, eliminar el medio con una pipeta Pasteur de plástico estéril y después con la misma pipeta, arrastrar los fragmentos a un cápsula para poder traspasarlo al tubo estéril.
- Verter la alícuota de 2mL de tripsina en el tubo cónico e incubar durante 2h en la estufa ES20 a 37 +/- 1°C y 5 +/- 0,5 % de CO<sub>2</sub>.
- Pasado el tiempo de incubación, centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
- En la cabina de flujo laminar, aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur de plástico estéril.
- Añadir 8 mL de BIO-AMF2 complementado y atemperado, con una pipeta Pasteur de plástico estéril.
- Resuspender con la mano, el pellet con el medio.
- Verter la suspensión a partes iguales en dos frascos de cultivo y anotar el tipo de cultivo y la fecha de siembra.
- Dejar en reposo los frascos durante 4 días como mínimo en la estufa ES20 a 37 +/- 1°C y 5 +/- 0,5 % de CO<sub>2</sub>.
- Pasado este tiempo, valorar el crecimiento de fibroblastos en el microscopio de inversión. Buscar las colonias con el objetivo 4x y analizarlo en el de 40x. Si hay crecimiento celular, cambiar el medio y verterlo en el medio de cultivo en una botella vacía y añadir una pipeta Pasteur de plástico estéril 3 mL de Medio BIO-AMF2 nuevo atemperado al baño de 37 +/- 1°C.
- Valorar el crecimiento de cultivo en el microscopio invertido y cada dos días cambiar el medio (como se explica en el punto anterior).
- Sacar el cultivo de la estufa cuando el crecimiento celular ocupe casi toda la superficie del frasco.

#### Sacrificio de cultivo

- Poner en una botella un volumen de hipotónico calculando que para cada muestra se necesitan 8 mL. Calentarlo en el baño BM11 de 37 °C.
- Antes de sacar los cultivos, marcar un tubo cónico de 10 mL y un criotubo con el número de la muestra.
- Sacar los portaobjetos limpios del congelador.
- Pasado el tiempo de actuación del Colcemid, sacar los cultivos de la estufa y verter el contenido de cada frasco en su tubo cónico.
- Centrifugar 10 minutos a 2000rpm.
- Aspirar el sobrenadante hasta la zona cónica con la trompa de agua.

- Agitar con el vórtex y añadir gota a gota el hipotónico con una pipeta Pasteur de vidrio hasta llegar a un volumen de 7-8 mL aproximadamente.
- Poner los tubos en el baño BM11 de 37 °C y dejar actuar el medio hipotónico durante 10 minutos.
- Preparar 35-40 mL del fijador Carnoy (3 partes de metileno y 1 de acetato) para cada cultivo. Cuando haya pasado el tiempo de incubación del hipotónico, añadir 1 mL de fijador Carnoy con una pipeta Pasteur de vidrio y dejar incubar 10 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm.
- Aspirar el sobrenadante con la trompa de agua.
- Añadir gota a gota con el dosificador el Fijador Carnoy hasta un volumen de 8 mL.
- Centrifugar 10 minutos a 2000rpm.
- Aspirar el sobrenadante con la trompa de agua.
- Repetir el lavado 3 veces más.
- Aspirar el sobrenadante y dependiendo del volumen del pellet dejar más o menos Fijador Carnoy (0,5-0,3 mL).
- Agitar el pellet en el vórtex y aspirar.
- Dejar caer 2-3 gotas del pellet resuspendido sobre el portaobjetos correspondiente a una distancia de 20 cm y soplar suavemente para que se extiendan las gotas.
- Dejar secar y mirar en el microscopio de contraste de fases para valorar el número de metafases por campo y su están bien extendidas.
- Preparar 4-8 extensiones para el cariotipo. *En los portaobjetos de FISH dejar caer 2-3 gotas en la parte central del portaobjetos. Poner las extensiones en cajas y dejar envejecer al menos una noche en la estufa ES22 de 65 °C.*

## 2. Tinción de Bandas G

- Coger unos 600 mL de buffer 2xSSC y colocar en un recipiente de plástico atemperado a 65 +/- 5°C.
- Coger un portaobjetos envejecido y depositarlo en una cubeta de 2xSSC y dejarlo de 1 segundo a 3 minutos.
- Limpiar el portaobjetos con agua del grifo.
- Secar con papel de filtro cubriendo los portaobjetos con papel y pasando la mano suavemente.

- Poner la extensión cromosómica sobre el soporte de aluminio y dispensar la solución Wright. Dejar de 15 segundos a 3 minutos.
- Secar con papel de filtro cubriendo los portaobjetos con papel y pasando la mano suavemente.
- Comprobar la calidad de las bandas en el microscopio.

### 3. Análisis cromosómico

- Una vez aplicadas la tinción de Bandas G, trabajar con el analizador *Metasystems*. Coger la hoja del cariotipo y realizar el estudio de los cromosomas.

## 13.4 Protocolo FISH

Utilizar los portaobjetos de FISH que dejamos envejeciendo una noche del Protocolo del cariotipo de sangre constitucional.

### 1. Preparación

Rellenar la hoja de trabajo de FISH correspondiente en función del diagnóstico.

### 2. Hibridación

- Deshidratación de los portaobjetos. Atemperar los alcoholes al 70 %, 85 % y 100 % previamente conservados a -20 °C.
- En una cubeta Coplin hacer un lavado de un minuto en cada uno de los etanoles en este orden: 70 %, 85 % y 100 %. Dejar que los portaobjetos se sequen a temperatura ambiente.
- Evaporar los restos de alcohol a 42 °C. Utilizar el *HYBrite*.
- Preparar las sondas. Existen tres tipos de sondas:
  - Sondas directas para el uso: Dispensar 5 µl de la sonda.
  - Otras sondas: Dispensar 3,5 µl de Buffer + 1 µl de agua destilada + 0,5 µl de sonda en un eppendorf. Dispensar al portaobjetos 5 µl de la mezcla de sonda.
- Sellar el cubreobjetos con la cola *paper cement* con la ayuda de una jeringuilla de 10-20m
- Hacer un *reset* en el *HYBrite* y poner el programa de hibridación.

### 3. Lavado y contratinción

- Pasado el tiempo de hibridación, encender el baño BM11 y graduar la temperatura a 72 °C, en una cubeta Coplin opaca calentar 50 mL de la solución 0,4XSSC/0,3 % de Igepal CA-630 para cada 3 portaobjetos.

- Al mismo tiempo colocar una cubeta Coplin opaca con 2XSSC/0,1 % de Igepal CA-630 a temperatura ambiente.
- Abrir el *HYBrite* y retirar la cola. Inmediatamente dejar los portaobjetos en la cubeta durante 2 minutos agitando el portaobjetos.
- Pasar los portaobjetos a la cubeta de 2XSSC/0,1 % de Igepal CA-630 para hacer un lavado a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Dejar que los portaobjetos se sequen totalmente.
- Mientras se secan preparar el DAPI II diluido a la mitad con McIlvane para cada sonda y preparar 9  $\mu$ l. Mezclar la preparación en el vórtex y realizar golpe de centrifuga.
- Una vez secos los portaobjetos, colocat un cubre y los 9  $\mu$ l de la mezcla.

#### 4. Captura e Interpretación de la FISH

Realizar la captura y el análisis con el sistema automático *Metafer*.

### 13.5 Protocolo aCGH

#### 1. Preparación de las muestras

- Preparar una alícuota de ADN ajustando la concentración de las muestras a 100ng/ $\mu$ l. Medir en el *nanodrop* la concentración de ADN y anotarla en la hoja de trabajo y hacer la dilución del ADN con agua estéril.
- Marcar 8 tubos de 0,2 mL (4 tubos numerados del 1 al 4 para el Cy3 (rojo) y 4 tubos numerados del 1 al 4 numerados del 1 al 4 para el Cy5 (verde)).
- Descongelar en el bloque térmico, homogenizando con los dedos los reactivos *Random Primer* y *Reaction Buffer* y hacer un spin.
- Preparar una mix poniendo 10  $\mu$ l de cada reactivo por muestra/referencia.

Componente	X rxns ( $\mu$ l)	x4 Pacientes	x8 Pacientes
<b>Random Primer</b>	10 $\mu$ l	44 $\mu$ l	88 $\mu$ l
<b>Random Buffer</b>	10 $\mu$ l	44 $\mu$ l	88 $\mu$ l
<b>ADN muestra /referencia</b>	18 $\mu$ l		

Tabla 3. Cantidades de los reactivos para la MIX de preparación.

- Hacer up and down y spin a los tubos.

- Colocar las muestras en el termociclador *AnalyticJena*, programa: *RandomOGT* (99 °C durante 20 minutos. Volumen = 38µl).
- Pasado ese tiempo, incubar inmediatamente 5 minutos en el hielo para provocar choque térmico.

## 2. Marcaje

Las muestras problemas se marcarán con Cy3 (rojo) y las muestras de referencia Cy5 (verde).

- Preparar dos mixes: una para el Cy3 y otra para el Cy5 según la siguiente tabla. Homogenizar los reactivos una vez descongelados agitándolos con los dedos y hacer un spin. Realizar un vórtex suave y un spin a las mixes.

Componente	X 4rxns (µl)	X 8rxns (µl)
<b>dCTP labelling mix</b>	44 µl	88 µl
<b>Cy3 dCTP or Cy5 dCTP</b>	4.4 µl	8.8 µl
<b>Exo (-) Klenow</b>	4.4 µl	8.8 µl
<b>Volumen Final</b>	52.8 µl	105.6 µl
<b>Labelling Master Mix</b>		

Tabla 4. Cantidades de los reactivos para la MIX de marcaje.

- Sacar los microtubos del bloque térmico y hacer un spin de 1 minuto a 6000g.
- Coger cada tubo y pipetear 12 µl de la mix de marcaje según corresponda: Cy3 (rojo) y Cy5 (verde), haciendo up-down.
- Colocar las muestras en el termociclador *AnalyticJena*, programa: *marcatgeAGi* (2 horas a 37 °C y cuando acabe este tiempo, 10 minutos a 65 °C. Volumen 25 µl.
- Inmediatamente incubar las muestras 5 minutos en hielo.

## 3. Purificación de la muestra

- Preparar 8 columnas de precipitación (tubo colector + columna) y 8 eppendorfs. Marcar 4 como Cy3 y los otros 4 como Cy5.
- Hacer un vórtex suave a la columna, girar el tapón ¼ y quitar la pinza pequeña de debajo de la columna, ponerla en el tubo colector y realizar un spin 1 minuto a 2000g.
- Descartar el tubo colector y poner las columnas en un eppendorf.
- Hacer un spin a los microtubos: 1 minuto a 6000g.
- Añadir el ADN en el centro de las columnas sin tocar el hielo.

- Centrifugar 1 minuto a 2000g.
- Mezclar la muestra y la referencia en un eppendorf y hacer up-down y spin.
- Concentrar las muestras en la *SpeedVac* y seleccionar el modus V-AL 45 °C durante 31 minutos (dejar los tapones abiertos).
- Medir el volumen y enrasar hasta 39 µl. Si es inferior, añadir H<sub>2</sub>O. Si es superior, volver a secar en la *SpeedVac* unos minutos más en función del volumen obtenido.

#### 4. Hibridación de la muestra

- Preparar 4 microtubos de 0,2 mL y marcarlos del 1 al 4.
- Poner en cada tubo los 39 µl del producto de marcaje.
- Preparar la mix de hibridación según la tabla siguiente. Homogenizar los reactivos una vez descongelados agitando con los dedos y hacer spin. Hacer un vórtex suave y un spin de la mix.

<b>Componente</b>	<b>Para 4 determinaciones (µl)</b>	<b>Para 8 determinaciones (µl)</b>
<b>Cot-1 DNA (1:0 mg/mL)</b>	22 µl	44 µl
<b>10x aCGH Blocking Agent</b>	48,4 µl	96,8 µl
<b>2x HI-RPM Hybridization Buffer</b>	242 µl	484 µl
<b>Volumen final</b>	312,4 µl	624,8 µl

*Tabla 5. Cantidades de los reactivos para la MIX de hibridación.*

- Añadir 71 µl de la mix a cada tubo pipeteando suavemente. Hacer un vórtex suave y un spin en la centrífuga.
- Colocar las muestras en el termociclador *AnalyticJena*, programa: prehibriOGT (3 minutos a 94 °C, 30 minutos a 37 °C. Volumen = 110).
- Montar el gasquet en el soporte metálico de la cámara de hibridación.
- Una vez acabe el programa de Hibridación, depositar 100 µl de muestra en cada subarray según el siguiente orden de las muestras (*Figura 1*).

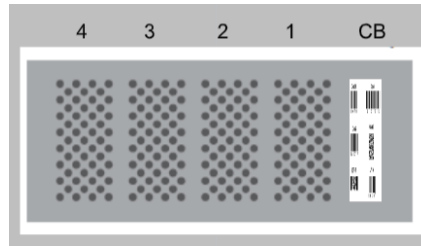


Figura 1. Gasquet del aCGH.

- Cuando se hayan colocado las muestras, cerrar el soporte metálico.
- Depositar el soporte en el horno hibridador a 65 °C (+/- 2 °C) durante 22h (+/- 30 minutos) a 20 rpm.

##### 5. Lavado

Antes de empezar el lavado, colocar una botella de 250 mL con el buffer 2, una cubeta de vidrio marcada con un iman en la estufa de 37 °C y la botella con la solución *Stabilization and drying* en el baño a 37 °C.

- Preparar las cubetas para el lavado en la campana extractora:

Cubeta	Solución	Tiempo
<b>A</b>	Buffer 1	10''-20''
<b>B</b>	Buffer 1	5'
<b>C</b>	Buffer 2	1'
<b>Acetonitril</b>	Acetonitril	10 ''
<b>Stabilization</b>	<i>Stabilization and drying</i>	30 ''

Tabla 6. Cantidades de los reactivos para el lavado.

- Una vez pasadas las 2 horas de hibridación, quitar el soporte del array y llevarlo a la zona del lavado. Los lavados se hacen bajo la campana extractora.
- Desmontar el sándwich *array-gasquet* dentro de la Cubeta A con la ayuda de unas pinzas. Agitar durante 10-20''.
- Poner el array en la cesta y depositarlo en la Cubeta B con el buffer 1. Ponerlo en agitación suave durante 5 minutos a 700 rpm.
- Poner la cesta en la Cubeta C con el buffer 2 en agitación suave durante 1 minuto a 700 rpm.
- Poner la cesta en la cubeta con acetonitril en agitación suave durante 10 segundos.
- Pasar a la cubeta con *Stabilization and drying solution* en agitación suave durante 30 segundos.

- Quitar la cesta, cubrir con papel de plata e ir al escáner para obtener la imagen.

#### 6. Escáner

Colocar el array dentro del escáner y seleccionar el programa para obtener las imágenes.

#### 7. Análisis de datos

Para el análisis de datos utilizar el *software Feature extraction* para la extracción de datos primarios generados a partir de las imágenes obtenidas por el escáner. Posteriormente las imágenes podrán ser analizadas por los *softwares Agilent Cytogenomics* o *Cytosure Interpret Software*.

### 13.6 Protocolo MLPA

#### 1. Dilución de las muestras

- Anotar la concentración de ADN y preparar una tira en función del número de muestras
- Diluir el ADN con H<sub>2</sub>O con un volumen final de 5 µl en tiras de 0,2 mL o microplaca.
- Hacer un pulso de centrifuga para concentrar la muestra al fondo del tubo o placa.
- Colocar en el termociclador flexcycler *Analytik Jena* (AN34): desnaturalización durante 10 minutos a 98 °C.

#### 2. Hibridación en el área pre-PCR

- Para la hibridación preparar la MIX 1 en un tubo eppendorf con 1,5 µl Salsa probemix y 1,5 µl MLPA Buffer.
- Homogenizar haciendo up and down.
- Colocar en el termociclador flexcycler *Analytik Jena* (AN34) hasta que baje a 25 °C. Añadir 3 µl de la MIX 1 preparada en cada muestra.
- Homogenizar con la pipeta haciendo up and down.
- Colocar en el termociclador flexcycler *Analytik Jena* (AN34) 1 minuto a 95 °C. Posteriormente, dejar las muestras 16 horas durante 60 °C.

#### 3. Ligación

Después de las 16 horas, se procede a la etapa de Ligación.

- Se prepara la MIX 2 en un tubo eppendorf con 25 µl de agua destilada + 3 µl *Ligase Buffer A* + 3 µl *Ligase Buffer B*.
- Realizar un vórtex.
- Para un total de 8 muestras + 1 adicional + 9 µl de *Ligase*.

- Homogenizar pipeteando con up and down.
- Añadir 32 µl de la MIX 2 en cada muestra.
- Termociclador con el programa de Ligación durante 15 minutos a 54 °C, después 6 minutos durante 98 °C y finalizar a 4 °C.

#### 4. PCR

- Preparar la MIX 3 con 3,75 µl de H<sub>2</sub>O + 1 µl *Primer mix* + 0,25 µl *SALSA Polymerase*.
- Añadir 5µl de MIX 3 a 20 µl del producto de la ligación.
- Homogenizar pipeteando con up and down.
- Colocar las muestras en el termociclador Veriti (AN76) y comenzar el programa de PCR de 35 ciclos:

30 minutos a 95 °C

30 minutos a 60 °C

1 minuto a 72 °C

20 minutos a 72 °C

Hold a 15 °C

#### 5. Análisis de fragmentos. Electroforesis capilar secuenciador ABI 3130.

Antes de preparar las muestras para el análisis de fragmentos (secuenciador) de los EFACM:

- Realizar una dilución del producto de la PCR a 1:40 con agua (78 µl de agua + 2 µl del producto de la PCR).
- A continuación, preparar la MIX 4: 9 µl de Hi-Di formamida para cada muestra + 0,2 µl 500Liz.
- En una placa del secuenciador, dispensar 9 µl de la MIX 4 y 1 µl del producto de la PCR.
- Homogenizar mediante up and down y desnaturalizar la placa.

Los resultados obtenidos por el secuenciador ABI 3130 en forma numérica (alturas de picos), se copian y se colocan en un Excel para realizar los cálculos correspondientes de la técnica.

Una demostración de como son los picos que extraemos del secuenciador es la Figura 2.

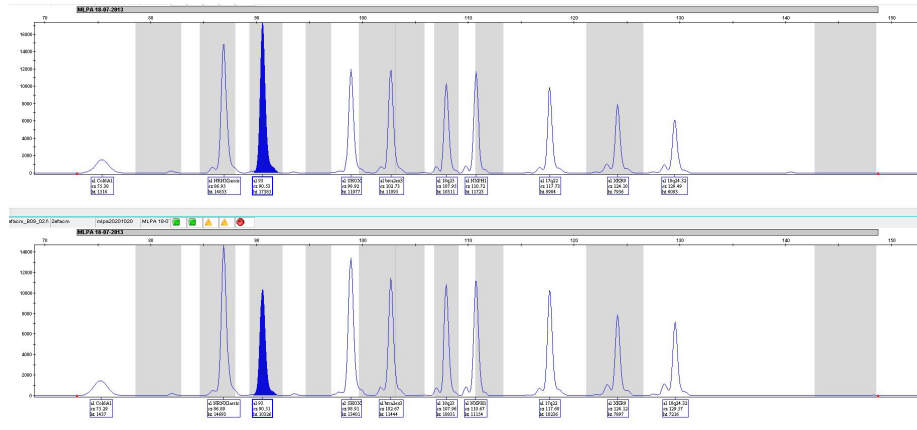


Figura 2. Picos extraídos del secuenciador ABI3130 de MLPA.

## ANEXO 2

### FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: \_\_\_ Claudia Armillas Salas \_\_\_\_\_

Nom i Cognoms del Tutor/a: \_\_\_\_\_ Maria del Carmen Portillo Guisado \_\_\_\_\_

Data de la entrevista amb l'alumne: \_\_\_ 21/05/21 \_\_\_\_\_

Recomanacions durant el seguiment: \_\_\_\_\_ En la segunda revisión he tenido acceso a la introducción completa, materiales y métodos y parte de los resultados y discusión de la memòria escrita de la estudiante. La estructura està correcta de momento. La recomendación general es ampliar información en los protocolos de materiales y métodos y modificar la discusión para incluir más bibliografía de trabajos previos relacionados. Por último, incluir los apartados que faltan: Índice, Abstract, datos del centro y conclusiones \_\_\_\_\_

Observacions: \_\_\_\_\_ La alumna lleva un buen ritmo de trabajo tanto en la ejecución de los experimentos y resultados como en la elaboración de la memòria de TFG. Demuestra madurez tanto en su investigación como en la escritura de la memoria \_\_\_\_\_

Observacions Darrera revisió:

Falta la discusión de los resultados y reordenación de los mismos acorde a los objetivos planteados. Falta el abstract, datos del centro, conclusiones y la bibliografía.

Signatura del Tutor/a

Signatura del Alumne/a



Tarragona a \_\_\_ 21 \_\_\_ de \_\_\_ Mayo \_\_\_\_\_ 2021 \_\_\_