

APLICABILIDAD CLÍNICA DE LOS MICROARRAYS CROMOSÓMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL

ALFREDO REPÁRAZ ANDRADE. *Unidad de Citogenética y Genética Molecular. Complejo Hospitalario Universitario de Vigo.*

CRISTINA TORREIRA BANZAS. *Unidad de Citogenética y Genética Molecular. Complejo Hospitalario Universitario de Vigo.*

CASO CLÍNICO

Neonato que ingresa por cardiopatía congénita con repercusión hemodinámica (comunicación interventricular perimembranosa, comunicación interauricular tipo *ostium secundum*). Embarazo sin incidencias (se realiza cariotipo en líquido amniótico con resultado 46,XY por translucencia nucal elevada) hasta la detección prenatal de la cardiopatía y retraso del crecimiento intrauterino (CIR) detectado en semana 36. Nacimiento en semana 39+2 mediante parto vaginal eutócico, inducido por CIR. Peso 2320 gr (p<3), longitud 48,5 cm (p 10-20), perímetro craneal 33 cm (p 3-10).

Como antecedentes familiares cabe destacar los antecedentes obstétricos de la madre, cuarta gestación (G4 P1 A2). Hermana sana. (Figura 1)

Además de la cardiopatía, presenta fenotipo peculiar. En la exploración neurológica destaca hipotonía. Se realiza cariotipo (46,XY) y cribado de metabolopatías (normal).

Se solicita microarray cromosómico (aCGH).

INTRODUCCIÓN

El abordaje clásico del estudio de pacientes con discapacidad intelectual (DI), trastornos del espectro autista (TEA) y/o múltiples malformaciones congénitas (MMC) comenzaba con la realización de cariotipo de alta resolución, seguido según la orientación diagnóstica de estudios de hibridación in situ fluorescente (FISH) dirigidos o estudios más amplios de regiones subtelo-méricas por MLPA y de patologías monogénicas como el Sd. X Frágil. Este abordaje diagnóstico tenía un bajo umbral diagnóstico, próximo al 3-4 % con la realización de múltiples estudios.

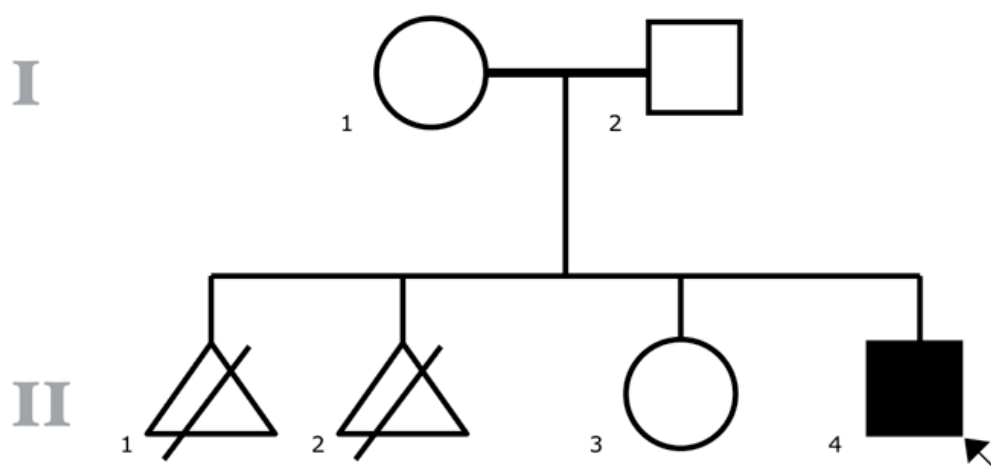


Figura 1. Árbol familiar del paciente.

La aparición de los **microarrays cromosómicos**, también llamado **cariotipo molecular**, que incluye tanto los arrays de hibridación genómica comparada (aCGH) como los arrays de polimorfismos de un único nucleótido, SNP (aSNP), cambió la forma de estudiar a estos pacientes. Estos estudios permiten la detección de cambios en el número de copias (deleciones y/o duplicaciones, amplificaciones) a través de todo el genoma con una resolución muy superior a la del cariotipo y con rapidez y puede, además, ser implementada de forma automatizada en plataformas de alto rendimiento.

LOS MICROARRAYS CROMOSÓMICOS

Descrita por primera vez en 1997, la técnica se basa en la hibridación competitiva del ADN del paciente y del control sobre un soporte físico (matriz, array) en el que radican sondas con secuencia y localización en el genoma conocida, lo que permite aumentar la resolución hasta miles de veces la correspondiente a un cariotipo convencional.

TIPOS DE MICROARRAYS CROMOSÓMICOS:

Existen varios tipos de microarrays cromosómicos, los arrays de hibridación genómica comparada (aCGH), en la que las sondas pueden ser basadas en cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o en oligonucleótidos y los arrays de polimorfismos de un único nucleótido (aSNP).

Microarrays de BAC: Fueron los primeros arrays utilizados. Basados en cromosomas bacterianos artificiales (BAC), fragmentos de ADN bicatenario y circular de longitud media 150 Kb, que se mantiene y propaga en un clon bacteriano. Cada sonda se imprime sobre un soporte físico (porta). Tiene las limitaciones propias de depender de un cultivo: localización inexacta de los BAC, contaminaciones cruzadas, recombinaciones, ... La resolución máxima posible ha sido superada por los otros tipos de arrays.

Microarrays de oligonucleótidos: Surgieron como evolución de los BAC arrays. Las sondas utilizadas son oligonucleótidos, moléculas sintetizadas de 60-80 pb de tamaño, con unas secuencias localizadas de manera definida en el genoma. No dependen de condiciones particulares de cultivo, etc, se sintetizan de manera robotizada in situ, y permiten en un único ensayo incluir un mayor número de sondas con una resolución mayor que los BAC arrays.

Microarrays de SNP: Son una variante de los arrays de oligonucleótidos diseñados para contener variantes tipo SNP. Tiene toda las ventajas de los arrays de oligonucleótidos pero además están diseñados para detectar la presencia o ausencia de un determinado SNP, factor que puede utilizarse para la detección de disomías uniparentales (UPD) y pérdidas de heterocigosidad (LOH).

COBERTURA DE LOS MICROARRAYS CROMOSÓMICOS

Otro factor importante en el diseño del microarray cromosómico es el tipo de cobertura.

Genoma completo: El diseño de estos arrays se basa en alta densidad de sondas a lo largo de todo el genoma. Utilizados sobre todo a nivel de investigación

Dirigidos: El diseño se basa en sondas localizadas en regiones de interés para patologías concretas.

Dirigidos con sondas a lo largo de todo el genoma: El diseño de estos arrays incluye alta densidad de sondas en regiones de interés y además presenta sondas con un nivel de densidad menor en el resto del genoma.

RESOLUCIÓN DE LOS MICROARRAYS CROMOSÓMICOS

La resolución del array sería el tamaño mínimo (teórico y real) de la alteración para ser detectada, identificada y mapeada con la mayor precisión posible. Dependerá del tipo de array y del diseño, pudiendo ser distinta en diversas zonas del array según la localización de las sondas.

NOMENCLATURA DE LOS MICROARRAYS CROMOSÓMICOS

Para la nomenclatura de las fórmulas cromosómicas de los microarrays se utilizan las recomendaciones del sistema ISCN (International System for Chromosome Nomenclature), actualmente en la versión del año 2013.

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MICROARRAYS CROMOSÓMICOS

La principal ventaja de los arrays es la capacidad de detectar cambios de número de copias realmente pequeños, con una gran precisión, rapidez y con capacidad de automatización.

Sin embargo, no están exentos de inconvenientes. El principal sería que no detectan reorde-

namientos cromosómicos equilibrados, como translocaciones equilibradas e inversiones. Este hecho tiene importancia a la hora del asesoramiento genético, ya que un resultado normal de un microarray cromosómico en los padres de un paciente no descarta la posibilidad de tener un riesgo de recurrencia superior al de población general por riesgo de transmisión en desequilibrio producto de un reordenamiento equilibrado.

Otra limitación de los microarrays es que no detecta alteraciones presentes en mosaicismo cuando están en proporciones menor del 20-30 % del total. Tampoco detecta estados de poliploidía.

La gran capacidad de detección de los microarrays cromosómicos tiene como consecuencia problemas de interpretación a la hora de valorar la implicación de cambios de número de copias no claramente asociados a patología.

ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE DISCAPACIDAD INTELECTUAL (DI), TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA) Y MÚLTIPLES MALFORMACIONES CONGÉNITAS (MMC)

Ya en el año 2010, se publicó un consenso internacional en el que recomendaban la utilización de los microarrays cromosómicos como herramienta diagnóstica de primera línea en pacientes con DI, TEA y/o MMC. En España se refrendó con un consenso nacional en el año 2012.

En ambos documentos se insiste en el cambio exponencial en el umbral diagnóstico de los microarrays (cercano al 15 %) frente al abordaje clásico con cariotipo (3-4 %).

Se establecen una serie de requisitos a nivel tanto de tipo, como de diseño y resolución que deben cumplir los microarrays cromosómicos para ser utilizados en el diagnóstico de pacientes con DI, TEA y/o MMC.

El **tipo** puede ser tanto aCGH (BAC u oligonucleótidos) como aSNP, aunque los más utilizados actualmente son los aCGH de oligonucleótidos y los aSNP, por las ventajas destacadas anteriormente.

El **diseño** recomendado es dirigido a regiones de interés pero con cobertura del resto del genoma a menor resolución. Para el estudio de pacientes con DI, TEA y/o MMC, el consorcio internacional ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays) propone un diseño común mínimo que deben seguir los microarrays cromosómicos.

La **resolución** mínima recomendada es que sea capaz de detectar alteraciones de 400 Kb. Este nivel de resolución permite identificar todos los síndromes recurrentes de microdelección y microduplicación mediados por duplicación segmental y la mayoría de desequilibrios inequívocamente patogénicos. Actualmente los microarrays utilizados permiten mayor resolución de detección, aunque aumentan los problemas de interpretación.

Ante el hallazgo de un cambio de número de copias (delección o amplificación), debe **clasificarse** como patogénica (si está relacionada con patología), probablemente benigna (si no hay

relación descrita con patología) o de significado incierto (si no está descrita como patológica ni como benigna).

A la hora de la interpretación de los resultados hay **bases de datos** públicas que facilitan este proceso, como DGV (Database of Genomic Variants), DECIPHER (Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources), OMIM (Online Mendelian Inheritance In Man).

RESULTADO DEL CASO CLÍNICO

Se realiza array de hibridación genómica comparada (aCGH) del ADN del paciente con ADN de referencia sin alteraciones genómicas con la plataforma comercial Nimblegen CGH ISCA Plus 6-plex (6x630K) que contiene 630000 sondas (oligonucleótidos y SNP). Para las sondas de oligonucleótidos (para estudio de deleciones y duplicaciones), la cobertura media del genoma es de 1 sonda cada 6,4kb siendo la resolución media de 32 kb (5 sondas contiguas para considerar una posible alteración). Para las sondas SNP (para estudio de pérdida de heterocigosidad), la cobertura media del genoma es de 1 sonda cada 38kb, siendo la resolución media de 1Mb (30 sondas contiguas para considerar una posible alteración). Para la extracción de datos, visualización, análisis bioinformático e interpretación de resultados, se utilizan los softwares DEVA y Nexus Copy Number, comparado con Genome Build GRCh37 (hg19).

El resultado del aCGH muestra dos variaciones de número de copias, con fórmula cromosómica según ISCN 2013: arr[hg19] 8p23.1(11,116-12,478,119)x1,20p13p12.2(0-10,997,219)x3.

Se trata de una deleción terminal heterocigota de 12,47 Mb en el brazo corto del cromosoma 8, citobanda 8p23.1, coordenadas genómicas 11,116-12,478,119. En esta región se encuentran 159 genes. Hay casos descritos en la literatura de síndrome de deleción 8p23.1 con fenotipo similar al del paciente. Es un síndrome de microdeleción recientemente definido caracterizado por cardiopatía congénita (comunicaciones interauriculares e interventriculares), hernia diafragmática congénita, retraso de desarrollo y comportamiento característico impulsivo e hiperactivo. La cardiopatía congénita es atribuible a haploinsuficiencia del gen *GATA4*. Hasta la fecha, se describe en la literatura asociación con hernia diafragmática congénita en 4 casos.

Se observa además una duplicación terminal en el brazo corto del cromosoma 20, en la citobanda 20p13p12.2, coordenadas genómicas 0-10,997,219, de aproximadamente 10,99 Mb. No hay descrita asociación con patología aunque probablemente condicione el fenotipo del paciente debido al tamaño y a los genes implicados. (Figura 2)

Debido a la presencia de una deleción y una duplicación terminal, se realiza en ambos progenitores no sólo aCGH sino también cariotipo, encontrando como resultado un reordenamiento equilibrado en la madre del paciente, no detectado (por limitaciones de la técnica) en el aCGH.

La madre presenta un cariotipo con fórmula cromosómica 46,XX, t(8;20)(p23.1;p12), con una translocación equilibrada entre el brazo corto de un cromosoma 8 y el brazo corto de un cromosoma 20. (Figura 3)

Revisando el cariotipo del paciente, se puede observar como pasó desapercibido que había recibido en vez de un cromosoma 8 materno, un cromosoma derivativo formado por un cromosoma 8 con pérdida de material de cromosoma 8 y ganancia de 20, con fórmula cromosómica 46,XY,der(8)t(8;20)(p23.1;p12)mat. (Figura 4)

Asesoramiento genético:

La presencia del reordenamiento equilibrado en la madre del paciente puede justificar que tuviese antecedente de 2 pérdidas fetales, probablemente consecuencia de un reordenamiento desequilibrado.

Si no se hubiese realizado el cariotipo en ambos progenitores, se hubiese dado como alteración *de novo*, y hubiese pasado inadvertido el riesgo de recurrencia que presenta.

Se ofrece a la familia diferentes opciones entre las que se encuentra gestación natural con diagnóstico prenatal, diagnóstico pregestacional, gestación con donación de ovocitos y adopción.

Se recomienda que se realice a la hermana del paciente cariotipo cuando alcance la edad reproductiva para descartar que sea portadora del reordenamiento equilibrado materno.

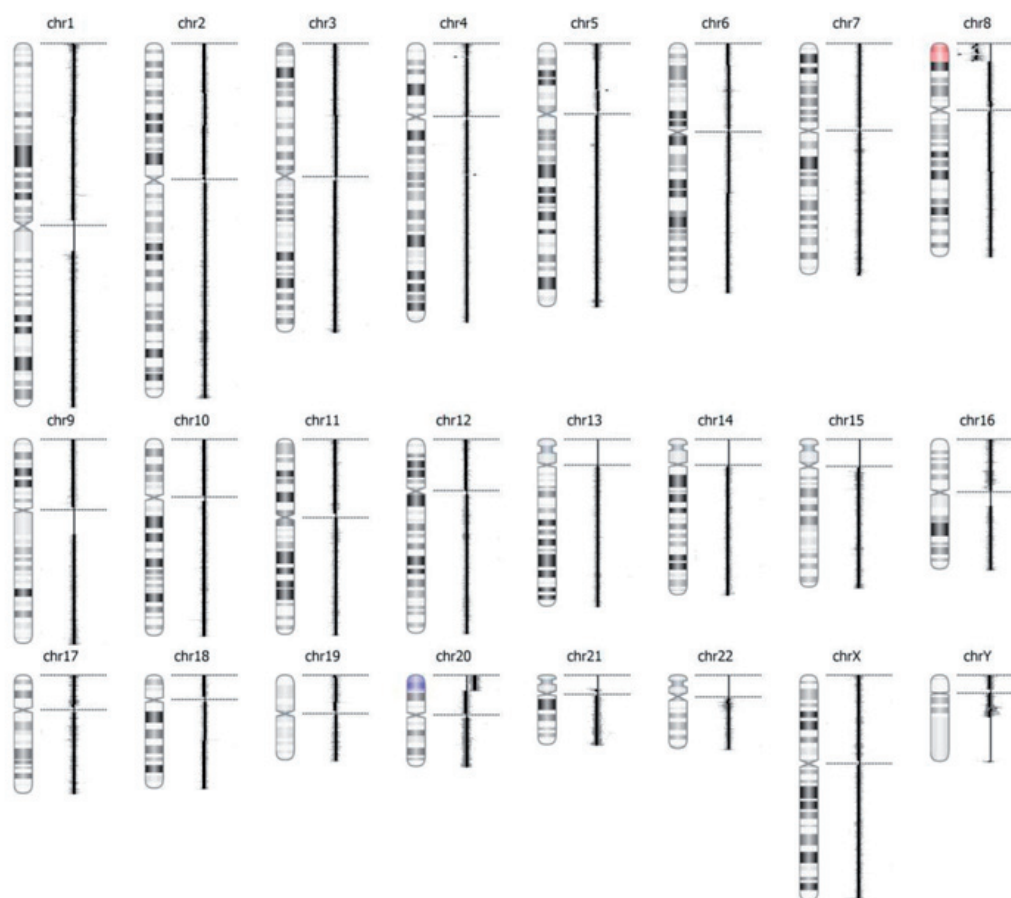


Figura 2. Representación del resultado aCGH. Se observa una deleción terminal en el cromosoma 8 y una duplicación terminal en el cromosoma 20, fórmula cromosómica arr[hg19] 8p23.1(11,116-12,478,119)x1,20p13p12.2(0-10,997,219)x3



Figura 3. Cariotipo con bandas G de la madre del paciente. Se observa una translocación equilibrada entre un cromosoma 8 y un cromosoma 20, con fórmula cromosómica 46,XX, t(8;20)(p23.1;p12)

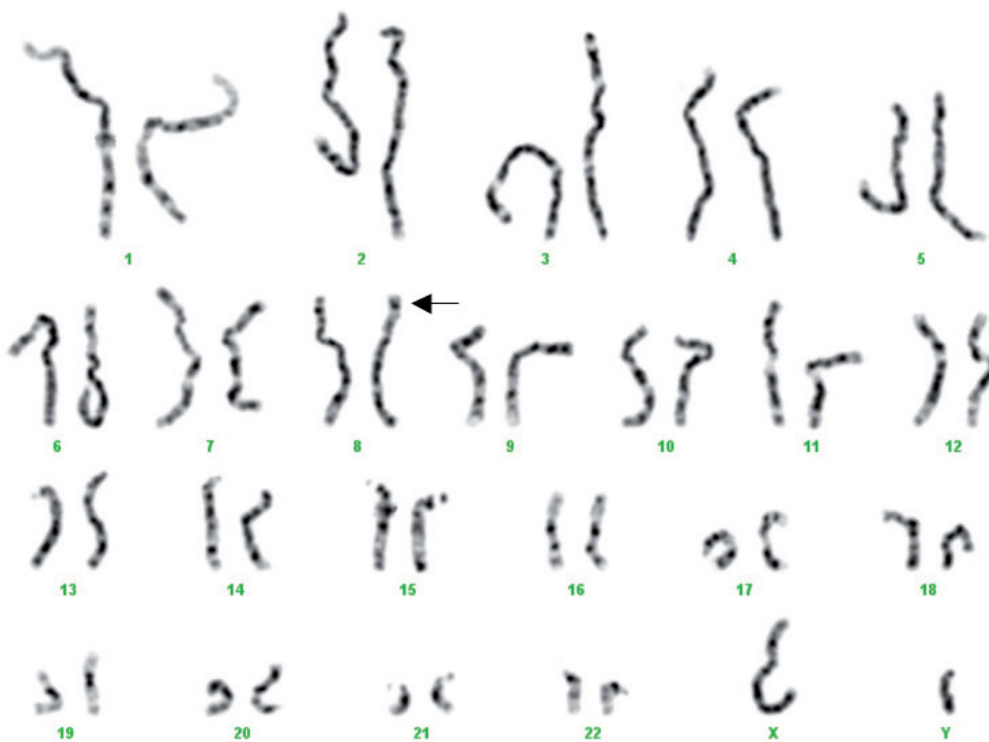


Figura 4. Cariotipo con bandas G del paciente. La flecha señala el cromosoma derivativo que previamente había pasado desapercibida formado por un cromosoma 8 con pérdida de material de cromosoma 8 y ganancia de 20 con fórmula cromosómica 46,XY,der(8)t(8;20)(p23.1;p12)mat

RESUMEN

La utilización de microarrays cromosómicos como herramienta de primera línea en pacientes con DI, TEA y AMC está demostrado como superior al abordaje con técnicas citogenética clásicas.

Los microarrays cromosómicos presentan limitaciones propias de estudios de citogenética molecular, como incapacidad para detectar reordenamientos equilibrados (translocaciones, inversiones) o mosaicismos de baja frecuencia.

No debemos olvidarnos de que el cariotipo sigue siendo útil a la hora de estudiar alteraciones en desequilibrio producto de segregación de reordenamientos equilibrados.

BIBLIOGRAFÍA

Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P., et al. (2010). Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics*, 86(5), 749–764

ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. L.G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid (eds); S. Karger, Basel 2013

Consenso para la Implementación de los Arrays [CGH y SNP-arrays] en la Genética Clínica. J.C. Cigudosa García, P. Lapunzina Badía (eds); Instituto Roche 2012

LINKS

DGV: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

DECIPHER: <https://decipher.sanger.ac.uk/>

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

FORMACIÓN CONTINUADA EN GENÉTICA COMISION DE GENETICA MOLECULAR

Josep Oriola Ambrós, Ana M^a Sánchez de Abajo, Atocha Romero (*coordinadora del curso*), Begoña Ezquieta, Carmen Cañadas, Concha Alonso, Cristina Torreira Banzas, Jesús Molano, María Arruebo Muñio, María Santamaría González, Orland Diez, Pilar Carrasco Salas

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

M. Rodríguez (*Presidente*), D. Balsells, R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, N. Rico, MC. Villà, B. Battikhi (*Residente*), A. Peña (*Residente*).

ISSN 1887-6463 - Junio 2015 (Recibido para publicación en Mayo 2015).