



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Departamento de Biología Celular e Molecular  
Área de Xenética

Estudo de anomalías xenéticas en humanos  
Estudio de anomalías genéticas en humanos  
A survey of chromosomal abnormalities in humans

Tania Verdía Cotelo

Traballo de Fin de Grao  
Data de defensa: 29/06/2015

Dirixido polas Doutoradas M<sup>a</sup> Montserrat Rodríguez Pedreira e Marta Vila Taboada



## Declaración

O presente Traballo de Fin de Grao (TFG) realízase no marco dunha colaboración entre o SERGAS e a UDC. Ao tratarse dun diagnóstico molecular, a alumna non puido procesar persoalmente as mostras analizadas (imperativo legal). Con todo, a alumna estivo presente no laboratorio en todo momento e foi instruída polas persoas que realizaban eses procesos. As fases de laboratorio nas que a normativa permite a manipulación por persoal alleo (v.g. parte do protocolo de extracción de ADN xenómico, cuantificación da cantidade/calidade do ADN en espectrofotómetro) sí foron realizadas pola alumna, obviamente baixo supervisión. As análises bioinformáticas tamén foron realizadas pola alumna, dirixida polo persoal do SERGAS.

Dado que o TFG do Grao en Bioloxía pola UDC implica unha carga de traballo de 150 horas, a alumna a as súas titoras desexan especificar a distribución dese tempo.

Tarefa	Horas	Persoas implicadas
Recollida de información xenealóxica e xenética dispoñible sobre o caso de estudo	5	Alumna, Dra. Rodríguez
Revisión da bibliográfica e discusión inicial	15	Alumna, Dras. Rodríguez e Vila
Traballo de laboratorio	80	Alumna, equipo da Dra. Rodríguez
Análise de resultados	10	Alumna, equipo da Dra. Rodríguez
Elaboración da memoria	40	Alumna, Dras. Vila e Rodríguez
Total	150	

**Pola presente ambas as dúas titoras autorizan a presentación deste Traballo de Fin de Grao realizado por D<sup>a</sup> Tania Verdía Cotelo para ser defendido o día 29 de xuño de 2015 ante o tribunal cualificador correspondente.**

A Coruña, 18 de xuño de 2015,

Marta Vila Taboada e Montserrat Rodríguez Pedreira

## Agradecementos

En primeiro lugar agradecerlle ao Dr. José Luis Fernández García, xefe da Unidade de Xenética Clínica e Molecular do Complexo Hospitalario Universitario da Coruña (CHUAC), a gran oportunidade que me ofreceu permitíndome desenvolver este TFG nos laboratorios do Hospital Teresa Herrera.

En segundo lugar, e con elo non menos importante, darlle as grazas ás miñas titoras, as doutoras Montserrat Rodríguez Pedreira (CHUAC) e Marta Vila Taboada (UDC), por terme prestado atención cando espuxen o caso e apoiar en todo o momento que a partir del puidese realizar o presente TFG. Moitas grazas por todo ese apoio e polo tempo de atención durante a elaboración do documento.

Quería agradecer tamén ao Dr. Alejandro Mosquera Rey (CHUAC) todo o tempo que investiu neste traballo, particularmente as súas excelentes explicacións de protocolos de laboratorio e análises bioinformáticas.

Por último, unha mención a todo o persoal do Laboratorio de Xenética, especialmente a Loli Vázquez Calenti, pola súa supervisión no procesamento das mostras.



## Contido

Resumo / abstract.....	1
Introdución.....	2
CGH-arrays (Comparative Genomic Hybridization Arrays).....	2
Limitacións do CGH-array.....	3
Comparativa con outros métodos.....	4
Consello xenético.....	5
Historia familiar.....	5
Obxectivos / objectives.....	8
Material e métodos.....	9
Árbore familiar.....	9
Elección da proba axeitada para determinar os puntos de ruptura.....	9
Determinación dos probandos ideais.....	9
Extracción de ADN e procesamento das mostras para a realización do CGH-array.....	9
Extracción ADN de sangue periférico.....	9
Repurificación do ADN.....	10
Dixestión.....	10
Reacción de marcado (en escuridade).....	10
Hibridación.....	11
Lavado do porta.....	12
Escaneado do porta.....	12
HCForum e riscos de transmisión.....	12
Resultados.....	13
Lectura do KaryoArray 8x60K.....	13
Afecta número 1 (77140169).....	13
Afecta número 2 (77140170).....	15
Diagrama de Paquitene e cálculo de riscos.....	18
Discusión.....	20
Xenes, enfermidades e fenotipos asociados.....	20
Implicacións.....	21
Riscos de transmisión.....	21
Probas prenatais.....	22
Conclusións /conclusions.....	23
Bibliografía.....	24
Anexo 1.....	25



## Resumo / Abstract

Neste traballo retómase a análise xenética dunha familia na que existen casos de retraso psicomotor, abortos espontáneos e na que os estudos citoxenéticos realizados hai 20 anos non foron concluíntes, xa que cómpre unha metodoloxía máis precisa para a determinación exacta dos puntos de ruptura e as implicacións da hipotética translocación detectada naquel momento.

Tras a revisión da árbore familiar obsérvase a presenza de afectos vivos polo que se decide utilizar CGH-arrays (*Comparative Genomic Hybridization Array*) para a caracterización da anomalía cromosomósima. Os CGH-arrays posibilitan a determinación de duplicacións ou delecións como posibles factores etiolóxicos en casos de retraso mental e outros fenotipos patolóxicos baseándose o seu funcionamento na hibridación competitiva de dous ADN (o ADN problema e o ADN control) marcados con distintos fluorocromos. Esta competencia permite a detección de ganancias e perdas de rexións cromosómicas en todo o xenoma do caso problema pola comparación das intensidades dos sinais de hibridación. Deste xeito, este estudio e os CGH-arrays (que só detectan perdas e ganancias, non reordenacións equilibradas) só se poderán levar a cabo grazas á existencia de afectos vivos no que a translocación non é equilibrada.

Os resultados aportados polo CGH-array permiten determinar unha perda no cromosoma 18 de arredor de 18.800.000 pb e unha ganancia no cromosoma 1 de arredor de 7.100.000 pb. Estes datos sinalan que a causa do fenotipo patolóxico estudado é unha translocación familiar de fórmula  $t(1;18)(q43,q21.33)$ . Inclúense os riscos de transmisión materna e paterna, unha serie de recomendacións e probas diagnósticas aplicables de cara á descendencia de portadores da mutación, así como as características fenotípicas dos posibles afectos.

.....

This work takes over the genetic analysis of a family with several cases of psychomotor retardation and miscarriages, and for which cytogenetic studies made 20 years ago were inconclusive: a more precise methodology was needed in order to accurately determine the breakpoints and implications of that hypothetical autosomal translocation.

Pedigree inspection revealed the availability of two affected individuals. This led to the use of an array-CGH (*Comparative Genomic Hybridization Array*) as the preferred tool to characterize that chromosomal abnormality. CGH-arrays allow the determination of duplications or deletions as possible etiological factors in cases of mental retardation and other pathological phenotypes. This technique is based on the competitive hybridization of two DNAs (problem and control) labeled with different fluorochromes. This competition permits the detection of gains and losses of chromosomal regions throughout the whole genome of the study case by comparing the intensities of the hybridization signals. Thus, this genomic procedure (which only detect losses and gains) is only useful to analyze affected individuals whose translocation is unbalanced.

The results provided by the array-CGH determined a loss in chromosome 18 of about 18,800,000 bp and a gain in chromosome 1 of about 7,100,000 bp. Therefore, the cause of the disease phenotype is a familial translocation with the formula  $t(1; 18)(q43, q21.33)$ . This essay also includes some issues about genetic counselling: the risk of maternal and paternal transmission, some recommendations concerning prenatal testing as well as phenotype characteristics of the putative affected progeny.

## Introdución

As probas de diagnóstico molecular son parte da actual revolución tecnolóxica e conceptual que supón a abordaxe xenómica da herdanza. Ata hai ben pouco, o diagnóstico xenético baseábase nunha aproximación que poderíamos denominar “xen a xen” e, a medida que se coñecían máis rexións cromosómicas involucradas nunha mesma patoloxía, procedíase a incluír esa nova información nas análises conducentes ao diagnóstico. No ano 2001 publícase o borrador do xenoma humano e aparelado a ese proxecto internacional vai non só o coñecemento (anotación) da estrutura e función das distintas rexións xenómicas, senón o desenvolvemento de tecnoloxía que permita caracterizar a información xenética dun individuo, mesmo as posibles diferenzas entre as súas linaxes celulares. Termos como *exoma* ou acrónimos como *NGS*<sup>1</sup> xa aparecen nos medios de comunicación habituais (v.g. De Benito & Lillo 2014).

Entre as múltiples causas de doenzas xenéticas, os reordeamentos cromosómicos de tipo translocación están a ser estudados intensivamente desde a perspectiva xenómica ao seren causa de doenzas tan coñecidas e de relativa prevalencia como por exemplo determinadas leucemias e linfomas (translocacións somáticas). Que unha translocación remate ou non en enfermidade depende de varios factores: (1) das rexións cromosómicas implicadas na translocación, (2) do momento no que se produce o reordenamento cromosómico (*de novo* en determinada linaxe celular dun individuo ou ben herdado ao estar presente na liña xerminal do/s seu/s proxenitor/es) e (3) de se a translocación é equilibrada (i.e. a rotura e posterior empalme dos cromosomas remate nun intercambio de material entre dous cromosomas distintos sen ganancia nen perda de materia) ou non. As equilibradas adoitan ser menos problemáticas, a menos que o corte-empalme implique efectos deletéreos, v.g. por interrupción na pauta de lectura dalgún xene codificante.

O CGH-array (*Comparative Genomic Hybridization Array*) é unha potente tecnoloxía que está a posibilitar a determinación de duplicacións ou deleccións como posibles factores etiolóxicos en casos de retraso mental, discapacidade intelectual, trastornos da aprendizaxe e do espectro autista e/ou en anomalías conxénitas múltiples. A clasificación dun determinado fenotipo (un síntoma, un conxunto de síntomas en forma de síndrome, un tumor específico, etc.) da forma máis precisa posible permite axustar o diagnóstico e o tratamento de xeito individual (medicina personalizada). Non menos importante é que esta tecnoloxía está a contribuir a unha mellor adaptación social de determinados pacientes (v.g. acceso á educación) e unha máis acertada planificación familiar.

A utilización dos CGH-arrays presentan claras vantaxes científico/técnicas sobre a análise citoxenética convencional no diagnóstico posnatal dos pacientes con retraso mental e/ou malformacións. Sen embargo, a súa aplicación no eido prenatal aínda se atopa en fase de avaliación.

## CGH-arrays (Comparative Genomic Hybridization Arrays)

Tal como explican Mori et al. (2012), o seu funcionamento baséase na hibridación competitiva de dous ADN (o ADN problema e o ADN control normal) marcados con distintos fluorocromos nun entramado de sondas colocadas sobre un soporte.

O ADN problema márcase cun fluorocromo verde (Cy3) e o ADN control cun fluorocromo vermello (Cy5). Ambos ADN mestúranse en cantidades equimolares e realízase unha hibridación, desta forma ambos ADNs marcados competirán por hibridar nos mesmos lugares cromosómicos podéndose dar tres situacións diferentes (**Figura 1**):

---

<sup>1</sup> Next Generation Sequencing. Secuenciación de nova xeración (ou masiva)



- En condicións **normais** (caso sen alteracións xenéticas) a cantidade de ADN marcado en vermello (control) e verde (problema) será a mesma, o resultado final serán unha proporción 1:1 de ambos fluorocromos.
- En condicións patolóxicas (caso con ganancia cromosómica) a cantidade de ADN problema dispoñible para hibridar será maior cá de ADN control resultando nunha maior proporción de fluorocromo do ADN problema (verde).
- En condicións patolóxicas (caso con perda cromosómica) haberá máis cantidade de ADN control (vermello) para hibridar nesa rexión ca ADN problema resultando nunha maior proporción do fluorocromo do ADN control (vermello).

Permiten, polo tanto, a detección de ganancias e perdas de rexións cromosómicas en todo o xenoma do caso problema pola comparación das intensidades das sinais de hibridación (tendo en conta que os controis se axustan ás mostras por sexos).

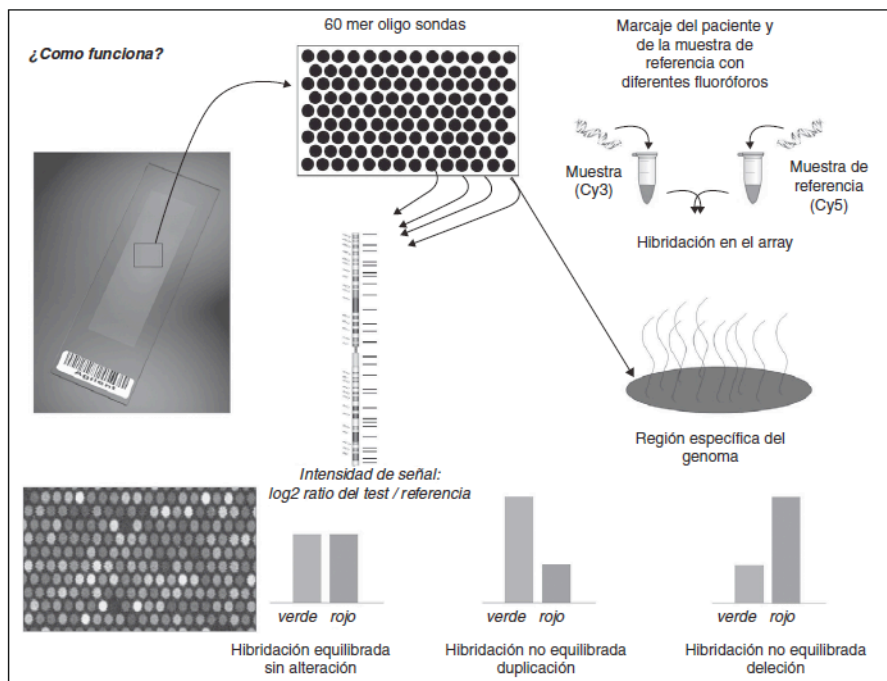


Figura 1. Esquema dunha análise mediante CGH-array (tomado de Mori et al. 2012).

### Limitacións do CGH-array

Tal como recolle a publicación de referencia “Consenso para la Implementación de los Arrays [CGH y SNP-arrays] en la Genética Clínica” coordinada en 2012 por Cigudosa García & Lapunzina Badía, esta técnica xenómica:

1. Só detecta cambios de *dose xenica*, i.e. ganancias e/ou perdas de material xenético. Non informa, polo tanto, sobre translocacións ou inversións equilibradas.
2. Por tanto, non é quen de detectar poliploidías, i.e. variacións no número cromosómico que involucren dotacións completas de cromosomas.
3. Paradoxicamente, a interpretación dos seus resultados dificúltase polo gran número de CNV<sup>2</sup> sen impacto clínico claro *a priori* (VOUS<sup>3</sup>) que pode detectar. De feito, os CGH-arrays poden ser deseñados con cobertura de xenoma completo (resolución semellante ao longo de todos os cromosomas) ou *dirixidos* a determinadas rexións de interese patolóxico (maior densidade de sondas en determinadas rexións). Aínda máis, os propios profesionais poden decidir velar parte dos datos contando só con acceso

<sup>2</sup> Copy number variation. Variación no número de copias

<sup>3</sup> Variant of uncertain significance. Variante de significado incerto

aos resultados daquelas rexións xenómicas nas que si existe certeza de CNV con significación clínica.

4. A cantidade e calidade do ADN necesarias é superior ás que precisan outras técnicas moleculares empregadas no diagnóstico xenético.
5. Non pode detectar mosaicismos de baixo grao (xenotipo diferente en distintas células dun mesmo individuo) na mostra analizada, agás que o grao de mosaicismo supere un valor mínimo (10% segundo Mori et al. 2012; 20-30% segundo Cigudosa García & Lapunzina Badía 2012).

## Comparativa con outros métodos

Segundo Cigudosa García & Lapunzina Badía (2012), de entre os métodos aínda empregados en Xenética Clínica para o diagnóstico de ganancia/perda de material xenético, cómpre resaltar as vantaxes e limitacións dos CGH-array fronte a:

### 1. Cariotipo

Ademais dunha resolución de 10 a 1000 veces menor ca do CGH-array, o cariotipo atópase limitado pola necesidade de células en continua división. O CGH-array informa sobre o contido xenómico de miles ou millóns de células simultaneamente, mentres que o cariotipo faino dunhas poucas decenas de metafases dun mesmo cultivo, v.g. 20 en oncohematoloxía e 50 en casos de mosaicismo. Con todo, o cariotipo pode, en principio, detectar graos de mosaicismo máis baixos (10-15%) ca o CGH-array (20-30%). A maioría das plataformas clínicas actuais de CGH-arrays poden detectar cambios no número de copias cun límite inferior de resolución de ~400Kb, unha resolución alomenos 10 veces máis alta cá do cariotipo. Este nivel de resolución proporciona un cribado suficientemente fiable e máis independente da experiencia do profesional para identificar todos os síndromes coñecidos de microdelección e microduplicación recorrentes.

### 2. FISH<sup>4</sup>

Presenta dúas vantaxes substanciais: (1) detecta alteracións que non implican cambio de número de copia (inversións ou translocacións) sendo, ademais, moi sensible en casos de mosaicismo e (2) aporta a posibilidade de asociar a fluorescencia a un *locus* ou rexión cromosómica determinada.

O CGH-array, ao ser una técnica global, pódese considerar unha FISH en maior detalle xa que esta última só detecta deleccións e duplicacións do tamaño da sonda. Ademais, necesítase unha sospeita previa da rexión xenómica alterada para ser dirixido a ela especificamente.

### 3. SKY<sup>5</sup> ou multi-FISH

Baseáase na asociación dun espectro de cores a cada par cromosómico permitindo identificar coa resolución dun cariotipo poliploidías e reordenacións. É unha técnica pouco estendida polo seu elevado coste e complexidade experimental e analítica. A súa grande desvantaxe é a necesidade dun cultivo e a súa baixa resolución. Porén, é moi eficaz para identificar reordenamentos complexos.

### 4. qF-PCR<sup>6</sup>

Baseáase no uso de varios *loci* de tipo microsatélite de localización cromosómica coñecida para determinar cantas veces aparecen representados no xenoma da mostra problema. O CGH-array conta coa vantaxe de que non está restrinxido a certas rexións senón que realiza un barrido de todo o xenoma. A vantaxe da qF-PCR é a capacidade de detección de poliploidías, menores requerimentos de ADN, ademais dunha maior rapidez na obtención e interpretación dos resultados.

<sup>4</sup> Fluorescence *in situ* hybridization. Hibridación *in situ* fluorescente

<sup>5</sup> Spectral karyotyping. Cariotipo espectral

<sup>6</sup> Quantitative fluorescence polymerase chain reaction. Reacción en cadea da polimerasa cuantitativa e fluorescente

## 5. MLPA<sup>7</sup>

Esta técnica pode, nunha única reacción de reacción en cadea da polimerasa (PCR), detectar cambios no número de copias de ata 40 secuencias de localización cromosómica coñecida. A súa gran vantaxe é o baixo custo e a facilidade de manexo. Porén, a efectos de cobertura, un panel de marcadores MLPA non pode competir coa análise xenómica global do CGH-array.

### Consello xenético

Unha vez diagnosticado un reordenamento cromosómico como poida ser unha translocación non equilibrada, o consello xenético trata de responder, entre outras, ás seguintes preguntas:

1. Hai risco de ter un fillo/a enfermo?
2. Se o hai, cal é a magnitude dese risco?
3. Cal sería o seu fenotipo?

Para o presente TFG cómpre aclarar o concepto de “risco”, referíndose ao seu significado de probabilidade (v.g. probabilidade de transmitir unha determinada mutación á descendencia).

Gardner et al. (2011) revisaron distintos métodos para calcular o risco de transmisión dunha determinada mutación. Por unha banda atópase o chamado “risco empírico” para o que non hai unha explicación teórica a partir da que calcular ese parámetro, senón que só se conta con datos de diversas xenealoxías onde se deu esa mutación procedentes da bibliografía e bases de datos específicas. Por outra banda está o “risco Mendeliano”, valor calculado cando si se coñece o patrón de herdanza da mutación estudada.

Centrándonos nas translocacións autosómicas desequilibradas, hai que salientar que o cálculo do risco tamén depende da casuística de cada familia. Non é o mesmo avaliar unha translocación na que hai afectos vivos (xa que ese feito demostra a viabilidade dese reordenamento cromosómico e polo tanto incrementa o risco) que avaliar mutacións para as cales os datos familiares dispoñibles son número de abortos espontáneos ou infertilidade (caso no que a probabilidade de viabilidade do reordenamento cromosómico é menor). A partir de aquí, dedúcese que o primeiro paso no cálculo do risco de transmisión dunha translocación autosómica será elaborar un diagrama dos posibles gametos producidos por unha persoa portadora da translocación, i.e. Diagrama de Paquitene (ver Resultados) e comprobar se algunha das posibilidades que conducen a gametos non equilibrados (v.g. adxacente-1, adxacente-2) deu lugar a un afecto vivo.

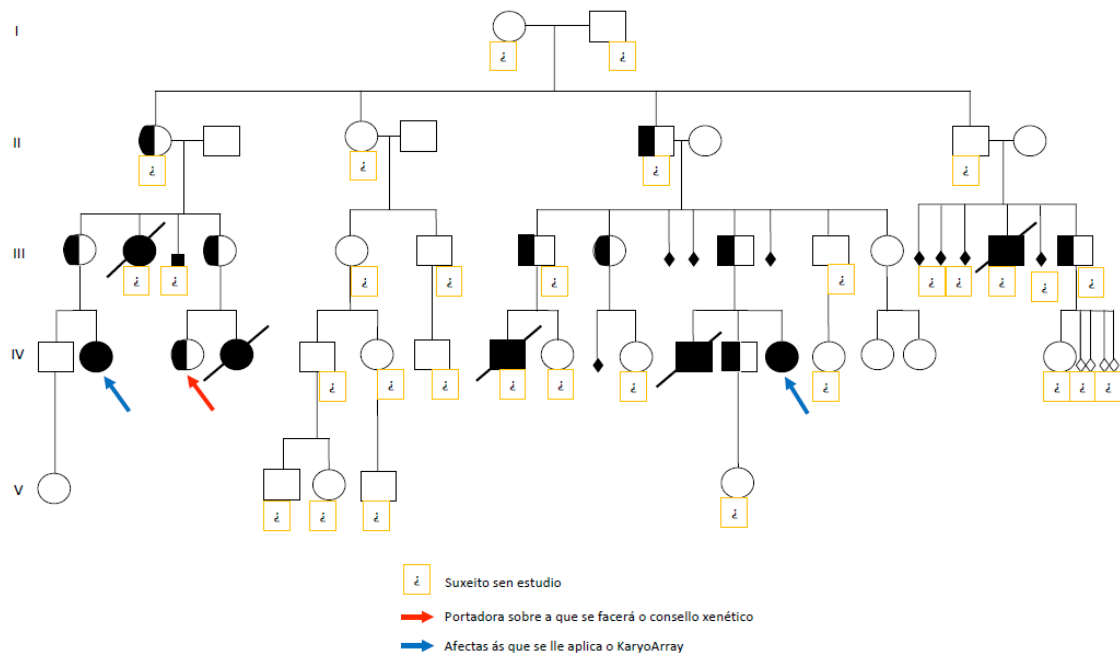
Ademais do Diagrama de Paquitene, estimar un risco de transmisión precisa de datos sobre os xenes involucrados na translocación obxecto de estudo. Cómpre suñar que non hai unha relación matemática simple entre a lonxitude dos segmentos translocados e a viabilidade do cigoto, así algúns segmentos coma o 18p ou extremo distal 5p en estado trisómico conlevan un menor grao de patoxenicidade ca determinadas rexións máis curtas que, en aneuploidía, provocan morte do embrión.

### Historia familiar

No ano 1994 o Centro Oncolóxico de Galicia e maila Universidade de Georgetown (EEUU) replican o estudo citoxenético de tres pacientes (individuos III-4, IV-3 e IV-4, **Figura 2**) que presentan antecedentes familiares de retraso psicomotor e múltiples abortos espontáneos.

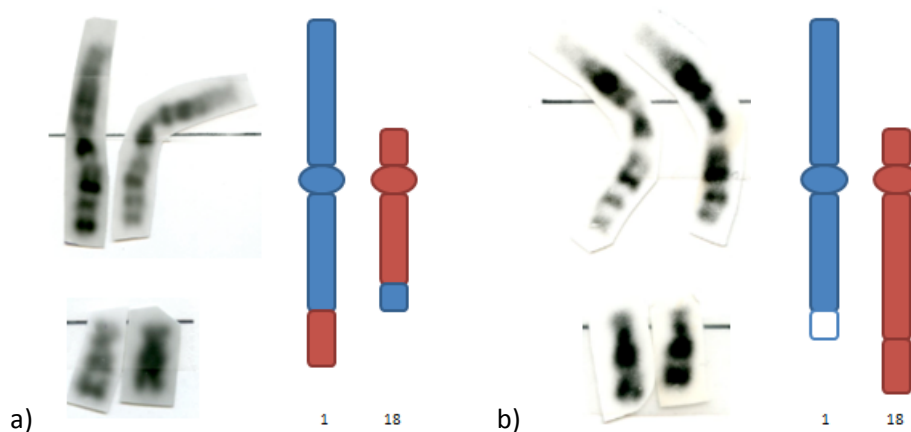
---

<sup>7</sup> Multiplex ligation-dependent probe amplification. Amplificación multiplex dependente de ligamento a sonda.



**Figura 2.** Xenealoxía completa do caso obxecto de estudo.

Os resultados de cariotipo e FISH de ámbalas dúas institucións apuntaban a posibilidade dun reordenamento cromosómico na liña xermlinal involucrando os cromosomas 1 e 18: o fenotipo normal da nai (III-4) e a primoxénita (IV-3) iría asociado a unha translocación equilibrada 1:18, mentres que o fenotipo patolóxico da filla menor (individuo IV-4; cardiopatía complexa, hipotonía, dismorfías e finada aos catro meses de idade) semella causado por unha trisomía parcial do cromosoma 18 e monosomía parcial do cromosoma 1 (**Figura 3**). Nótese que o cariotipo prenatal realizado á nena IV-4 non detectou ningunha anomalía cromosómica. Este feito pon de manifesto a necesidade de probas diagnósticas de maior resolución de cara ao consello xenético en familias coma esta, onde o pequeno tamaño do fragmento xenómico alterado se atopa no límite de resolución do cariotipo.



**Figura 3.** Cromosomas 1 e 18 procedentes do cariotipo realizado en 1994 aos individuos (a) III-1 (fenotipo san) e (b) IV-4 (fenotipo patolóxico). Á dereita de cada fotografía esquematízase o reordenamento cromosómico sospeitado: portadora de translocación equilibrada 1:18 e monosomía parcial do 1 e trisomía parcial do 18, respectivamente.

Dada a resolución das probas cariotipo e FISH, deduciuse que o material xenético involucrado neses reordenamentos cromosómicos había de corresponderse cun tamaño igual ou menor a dunha única banda metafásica. Ese pequeno tamaño unido a outros factores, como a baixa calidade das mostras de partida, impediu caracterizar inequivocamente a etioloxía das patoloxías transmitidas nesa familia. Asemade, o feito de non ter atopado a anomalía

cromosómica en todas as mitoses dun mesmo individuo fixo postular a existencia de mosaicismo nos individuos III-4 e IV-4. A interpretación actual dese resultado é que o mosaicismo é moi improbable neste caso, sendo máis congruente que as sondas utilizadas ou o seu tamaño e localización fixesen que se uniran a unha pequena porcentaxe das células analizadas.

Por último, infórmase á familia de que, aínda que puidesen ter descendencia sen reordenamentos cromosómicos ou con translocación equilibrada conducente a un fenotipo san, un 50% ou máis da descendencia de portadores da translocación equilibrada (casos III-4 e IV-3) podería verse afectado por trisomías e monosomías parciais como a sufrida por IV-4.

A caracterización máis detallada da translocación, establecendo os seus puntos de ruptura, constitúe o primeiro obxectivo do presente Traballo de Fin de Grao, utilizándose esta información para proporcionar consello xenético aos membros da familia portadores da translocación.

## Obxectivos / Aims

Caracterización dunha translocación equilibrada que involucra fragmentos de pequeno tamaño no límite de resolución do cariotipo, a través de arrays de hibridación xenómica comparada (CGH-arrays) para establecer os puntos de ruptura do reordenamento.

Establecer a aplicación dos resultados obtidos (1) na determinación dos riscos reprodutivos de persoas portadoras e (2) no posible diagnóstico prenatal e/ou preimplantacional a realizar en futuras xestacións de portadoras da devandita translocación.

.....

Characterization of a balanced translocation involving small size fragments, at the limit of resolution of the karyotype, through CGH-array (*Comparative Genomic Hybridization Array*) in order to identify the breakpoints of the rearrangement.

Use the obtained results for genetic counselling: (1) determining the reproductive risks in carriers of the surveyed translocation and (2) revising the possibilities of prenatal diagnosis and/or preimplantation genetic diagnosis in future pregnancies of those carriers.

## Material e métodos

### Árbore familiar

A xenealoxía foi realizada pola autora do presente TFG e nel recopilouse a seguinte información entrevistándose cos membros da familia afectada:

- Se o individuo manifesta fenotipicamente retraso psicomotor, dismorfías ou outras patoloxías comúns co individuo IV-4 (**Figura 1**).
- Se o individuo contaba con algún estudio citoxenético previo. Indícase, no seu caso, se a condición é de portador da translocación 1:18 obxecto de estudo, non portador, afectado ou sen determinar.
- Número de abortos sufridos por cada muller.

Aínda que non se recolla nesta memoria, tamén se rexistraron as causas da morte de todos os membros da familia, as características fenotípicas dos individuos afectados tanto vivos coma finados e se os abortos foron naturais ou inducidos.

### Elección da proba axeitada para determinar os puntos de ruptura

Decídese utilizar un KaryoArray<sup>®</sup> CGH que combina unha cobertura do xenoma completo cun incremento de sondas dirixido a cubrir máis de 380 rexións clinicamente relevantes asociadas a desequilibrios de dose xénica, incluíndo tódalas rexións subteloméricas e pericentroméricas (cunha cobertura mínima de 5Mb), así coma todas as rexións asociadas con síndromes de microdeleción/microduplicación coñecidas, retraso mental e autismo. Todo elo, nun formato de 8x60K que contén 62.976 sondas de oligonucleótidos que se reparten nun total de 46.609 sondas específicas e controis, así como 16.367 sondas no esqueleto do *array*. A densidade media de cobertura xenómica do *array* é de 43Kb e a densidade media nas rexión patoxénicas coñecidas ascende ate 7Kb e a 175Kb no esqueleto. Todo isto conleva que se teña descrito: (1) un poder de resolución de 10 a 1.000 veces maior ca do cariotipo, (2) unha sensibilidade técnica do 98,41% e (3) unha especificidade dun 95%.

### Determinación dos probandos ideais

A caracterización dos puntos de ruptura da translocación 1:18 obxecto de estudo mediante a utilización de CGH-Array precisa de probandos coas seguintes características: membro da familia estudada que presente fenotipo patolóxico, asegurando así que a translocación non é *de novo*, senón herdada e que existirá ganancia/perda de material xenético abondo para ser detectada polo CGH-array.

As persoas portadoras (heterocigotas) da translocación pero sen patoloxía (v.g. individuos III-4 ou IV-3, Figura 1) non son idóneas para este tipo de estudo, xa que a translocación que presentan é con elevada probabilidade equilibrada (sen ganancia/perda de material xenético) e o CGH-array non diferenciaría a estas persoas dun suxeito con xenotipo sen a translocación.

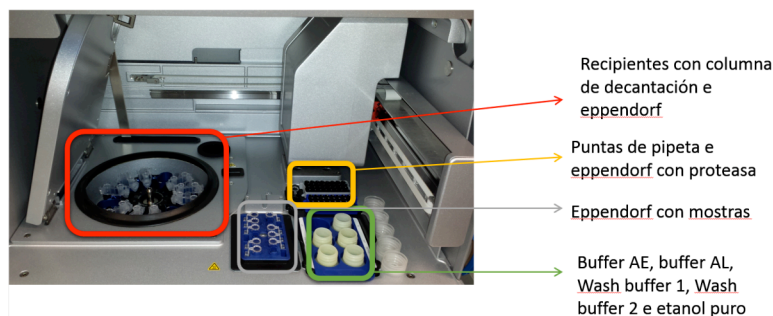
A existencia de dúas afectas vivas (individuos IV-2 e IV-14, **Figura 1**) fai por tanto posible a caracterización dos puntos de ruptura da translocación mediante CGH-array.

### Extracción de ADN e procesamento das mostras para a realización do CGH-array

#### Extracción ADN de sangue periférico

Extraer unha mostra de sangue periférico a cada unha das afectas nun tubo con EDTA. Introducir 2,5 mL de sangue nun tubo Falcon e completalo con 11,5 mL de tampón de lise de eritrocitos (*erythrocyte lysis buffer*), levar ao conxelador durante 15 minutos axitándoo cada 5 minutos. Una vez feito isto centrifugar durante 10 minutos a 400 rcp e levar a 4°C.

Decantar o sobrenadante, resuspender o *pellet* con 200  $\mu\text{L}$  de soro e pasar todo a un tubo eppendorf de 2mL que se introducirá na plataforma robotizada QIACube (QIAGEN™) onde tamén haberá preparados 5 botes con: *buffer AE*, *buffer AL*, *Wash buffer 1*, *Wash buffer 2* e etanol puro, ademais dun eppendorf con proteasa e puntas de pipeta estériles (**Figura 4**).



**Figura 4.** Interior da máquina QIACUBE (QIAGEN) con todos os reactivos necesarios para a extracción de ADN da sangue periférica.

### Repurificación do ADN <sup>8</sup>

Tomar 3 $\mu\text{g}$  de ADN ou 100  $\mu\text{L}$  de ADN e engadir 1/10 vol de acetato de sodio (3M) durante 10 segundos, posteriormente engadir tamén 2 ½ vol de etanol (EtoH) 100% e mesturar. Incubar todo durante 2horas a -20°C.

Centrifugar 15 minutos a 14.000 g, eliminar o sobrenadante e resuspender o *pellet* en 500  $\mu\text{L}$  de EtoH 70%. Volver centrifugar 15 minutos a 14.000 g, eliminar o sobrenadante, secar o *pellet* a temperatura ambiente durante 5-10 minutos e resuspender en tampón TE 1X. Deixar incubando a 37°C durante varias horas e cuantificar o ADN presente no espectrofotómetro NANODROP™ (Thermo Fisher Scientific).

### Dixestión

Uniformizar as mostras problema á concentración de 600ng/10,1 $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf de 0,2mL e preparar os controis que se axustarán coas mostras segundo o seu sexo: os femininos levarán 4,16  $\mu\text{L}$  de ADN feminino e os masculinos 2,94  $\mu\text{L}$  de ADN masculino. Complétanse todos ata os 10,1  $\mu\text{L}$ .

Para facer a mestura de dixestión das mostras, introducir as seguintes cantidades e na seguinte orde:

1. H<sub>2</sub>O: 1  $\mu\text{L}$
2. *Buffer C*: 1,3  $\mu\text{L}$
3. Seroalbúmina Bovina (BSA): 0,1  $\mu\text{L}$
4. Enzima de restrición *AluI*: 0,25  $\mu\text{L}$
5. Enzima de restrición *RsaI*: 0,25  $\mu\text{L}$

Engadir aos tubos eppendorf (tanto das mostras problema coma dos controis) 2,9  $\mu\text{L}$  da mestura de dixestión e levalos ao termociclador cun programa a 37°C durante 2 horas subindo posteriormente a 65°C durante 10 minutos. Finalmente baixarase ata os 4°C o tempo que se precise.

### Reacción de marcado (en escuridade)

Desconxelar os reactivos de marcaxe e engadir a cada mostra 2  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O e 2,5  $\mu\text{L}$  de *random primer*. Mesturar ben. Meter as mostras ao termociclador nun programa a 95°C durante 5 minutos e pasar inmediatamente a 4°C durante 5 minutos.

<sup>8</sup> Paso non estritamente necesario. O que se fai é unha “repurificación do ADN”, elimínanse ADN pequenos y de mala calidad.



Preparar a *master mix* para a reacción de marcado seguindo a orde que aparece na **Táboa 1**:

<b>Táboa 1</b>			
Reactivo	X1 tubo (µL)	Para 8 mostras (µL)	Para 8 controis (µL)
5xbuffer	5	42	42
10xDNTP	2,5	21	21
Cy3 DNTP (vermello)	1,5	12,6	
Cy5 DNTP (azul)	1,5		12,6
EXO Kleeno	0,5	4,2	4,2

**Táboa 1.** Reactivos e cantidades utilizadas en µL para a reacción de marcado.

Engadir a cada mostra 9,5 µL do *mix* que contén Cy3 (verde) e 9,5 µL do *mix* que contén Cy5 (vermello) a cada control, levar ao termociclador nun programa a 37°C durante 2 horas, 65°C durante 10 minutos. Unha vez rematado o programa pasar as mostras a tubos eppendorf de 1,5 µL e engadirilles 430 µL de TE.

Preparar uns tubos de array con columna (Centrifugal Filter Units, Millipore) e pasar a cada un unha mostra, posteriormente centrifugar a 14.000 rcp durante 10 minutos.

Unha vez centrifugado, decantar noutros eppendorf os eluidos das columnas e engadir 480 µL de TE. Volver centrifugar a 14.000 rcp durante 10 minutos e finalmente invertir cada columna dentro de tubos novos volvendo a centrifugar a 1.000 rcf durante 1 minuto.

Concentrar as mostras marcadas das columnas nun concentrador Speedvac™ a 75°C durante 1 h e resuspender en 9,5 µL de TE. Cuantificar ADN no NANODROP.

## Hibridación

Preparar a *mix* de hibridación segundo aparece reflectido na **Táboa 2**:

<b>Táboa 2</b>		
Reactivo	X1 tubo (µL)	Para 8 mostras (µL)
Cot Human	2	18
10xBlock	4,5	40,5
2xHybrid	22,5	202,5

**Táboa 2.** Reactivos e cantidades utilizadas en µL para a reacción de hibridación.

Mesturar cada mostra co control adxudicado (según os resultados da cuantificación de ADN) e engadir a cada eppendorf 29 µL do mix de hibridación. Meter ao termociclador cun programa a 95°C durante 3 minutos, 37°C durante 30 minutos.

Preparar o cubreobxectos para arrays 8X (60K array/8x) na cámara de hibridación (**Figura 5**) poñendo a cara que contén as sondas (portaobxectos) en contacto cos 40µL de mostra que se introducen en cada recadro do cubreobxectos. Meter a cámara de hibridación á estufa rotatoria a 65 °C durante alomenos 24 horas.



**Figura 5.** Cámara de hibridación. Á dereita aberta e á esquerda pechada co portaobxectos e o cubreobxectos dentro.

### Lavado do porta

Poñer o baño a quentar a 37°C cunha cubeta chea de solución 2<sup>9</sup> mentres se preparan dúas cubetas con solución 1<sup>10</sup> (nunha delas hase introducir un axitador).

Retirar o porta da cámara de incubación que tiñamos na estufa e introduci-lo na cubeta de solución 1 que non ten axitador; separar no seu interior o porta e o cubre e lavar o porta axitándoo dentro da solución 1. Pasar o porta á outra cubeta de solución 1 que ten o axitador e deixalo durante 5 minutos tapado.

Finalmente introducir o porta durante 1 minuto na solución 2 e retiralo lentamente para que se seque.

### Escaneado do porta

O escaneado realízase co Software Mapix (Innopsys) nun escaner Innoscan 710. Escanease o porta a un tamaño de 3µm, analizándose os datos co Software BlueFuse Multi v2.1 (BlueGenome). O algoritmo Multi v2.1 permite estudar os resultados aplicando sempre o mesmo criterio para determinar perdas e ganancias, tendendo a dar resultados conservadores utilizando o criterio da desviación de tres sondas consecutivas para a detección da anomalía.

### HCFforum e riscos de transmisión

Seguindo o protocolo da Unidade de Xenética do CHUAC, o cálculo de transmisión da translocación estudada foi calculado utilizando a ferramenta informática HCFforum® ([www.hcforum.net](http://www.hcforum.net); Cohen et al. 2001), un repositorio que almacena datos procedentes de diversas fontes (publicacións e comunicacións directas dos laboratorios) correspondentes a anomalías estruturais autosómicas de tipo familiar. HCFforum® constitúe unha valiosa ferramenta para o consello xenético xa que permite seleccionar graficamente as rexións cromosómicas implicadas no reordenamento e o seu tamaño. Con estes datos, obtéñese unha estimación do risco de transmisión específica para esa mutación, ademais de referencias sobre a existencia de reordenamentos semellantes na bibliografía. O cálculo dese risco utiliza distintas aproximacións: Diagrama de Paquitene, o denominado Método D (un tipo de análise de compoñentes principais) e modelos de regresión loxística que inclúen variables como características citoxenéticas da translocación, idade e sexo do parental portador e viabilidade potencial dos gametos (revisado por Cohen et al. 2001).

---

<sup>9</sup> Solución de secado.

<sup>10</sup> Solución de lavado.

## Resultados

### Lectura do KaryoArray 8x60K

#### Afecta número 1

Control de calidade do array:

SD<sup>11</sup> Autosome/Robus: 0.14/0.12

SBR<sup>12</sup> Ch1/Ch2: 8.96/8.20

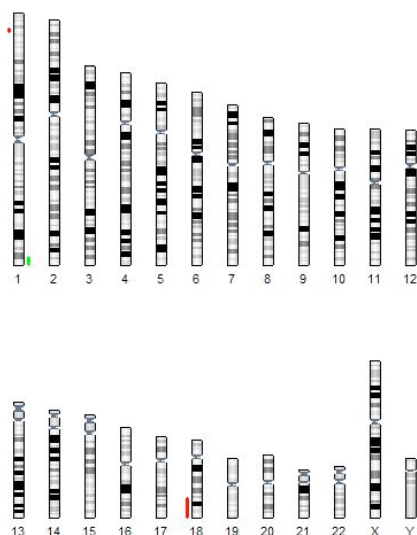
DLR<sup>13</sup> Raw/Fused: 0.23/0.19

Os resultados cumpren os criterios de calidade para o estudo.

Tras o escaneado do obtivéronse as seguintes aberracións (**Figura 6**):

1. No brazo pequeno do cromosoma 1 detectouse unha perda de 277.887 pb<sup>14</sup> que comeza na rexión 1p36.13 e remata na mesma (localizada no intervalo entre 16.770.876 e 17.048.762 pb).
2. No brazo grande do cromosoma 1 detectouse unha ganancia de 7.117.715 pb que comeza na rexión 1q43 e remata na 1q44 (242.094.925-249.212.639 pb).
3. No brazo grande do cromosoma 18 detectouse unha perda de 18.796.349 pb que comeza na rexión 18q21.33 e remata na 18q23 (59.157.788-77.954.136 pb).

Os parámetros indicados por defecto no algoritmo do programa suxiren que: (1) a perda de 277.887pb localizada no brazo pequeno do cromosoma 1 pode ser benigna, (2) a ganancia de 7.117.715 pb no brazo longo do mesmo cromosoma pode ser patoxénica e (3) a perda de 18.796.349 pb no brazo longo do cromosoma 18 pode ser patoxénica.



**Figura 6.** Resultado do escaneado realizado polo Software Mapix (Innopsys) e a súa lectura co Software BlueFuse Multi v2.1 (BlueGenome) onde se poden observar as alteración cromosómicas presentes na mostra da afecta número 1. En cor verde represéntanse as ganancias e en cor vermella as perdas.

<sup>11</sup> Standard Deviation. Desviación estándar (medida entre as intensidades das sondas)

<sup>12</sup> Signal-to-background ratio. Cociente entre sinal e sinal de fondo (variación entre as ratios calculadas para cada un dos dous fluorocromos)

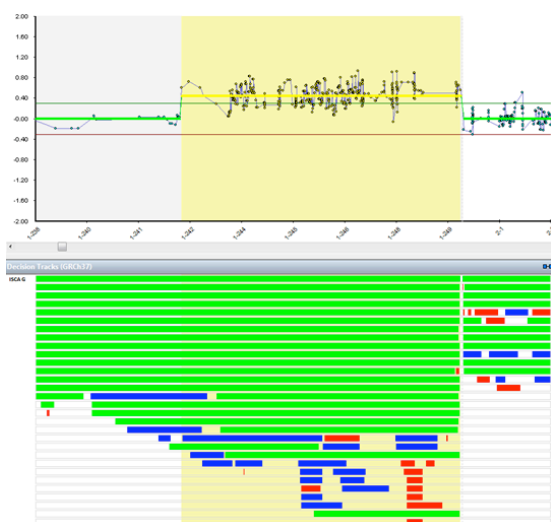
<sup>13</sup> Derivative log ratio. Cociente de derivadas logarítmicas (diferenza existente entre a intensidade dunha sonda e as sondas do seu arredor)

<sup>14</sup> Base Pairs. Pares de bases

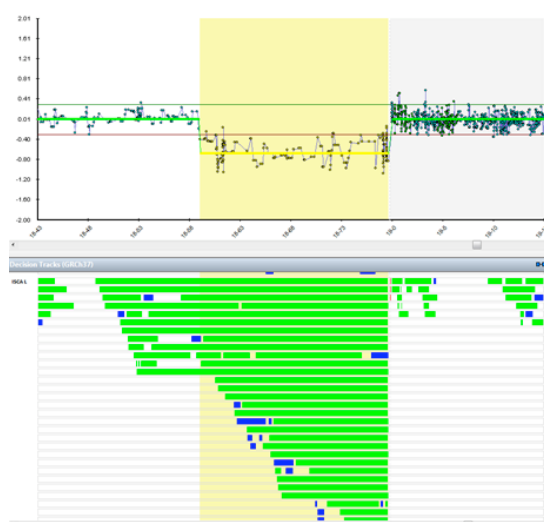
Tras examinar os resultados que suxire o programa, obsérvanse os xenes involucrados en cada unha das rexións alteradas e compáranse con resultados semellantes en diferentes bases de datos para corroborar a patoxenicidade ou non patoxenicidade da mutación atopada. Deste xeito, obsérvase que:

1. A perda de 277.887 pb localizada no cromosoma 1 involucra a nove xenes HGNC<sup>15</sup> (dos cales 6 son xenes OMIM<sup>16</sup>) ademais dunha enfermidade OMIM (**Anexo 1. Táboa I**).
2. A ganancia de 7.117.715pb detectada no cromosoma 1 implica 125 xenes HGNC (dos cales 18 son xenes OMIM), ademais de cinco enfermidades OMIM (**Anexo 1. Táboa II**).
3. A perda de 18.796.349pb atopada no cromosoma 18 relaciónase con 95 xenes HGNC (dos cales 43 son xenes OMIM), ademais de nove enfermidades OMIM (**Anexo 1. Táboa III**).

Deste xeito púidose concluir que (1) a perda de 277.887 pb do cromosoma 1 é benigna posto que, aínda que a rexión está incluída no síndrome de microdeleción 1p36, hai referencias de deleccións pequenas dentro desta mesma rexión descritas como VOUS, (2) a ganancia de 7.117.715pb detectada no cromosoma 1 é patoxénica xa que hai referencias de ganancias moi similares ou incluso menores na mesma zona que son patoxénicas (**Figura 7**) e (3) a perda de 18.796.349pb detectada no cromosoma 18 é patoxénica xa que hai referencias de perdas menores en tamaño involucrando a mesma zona que son patoxénicas (**Figura 8**).



**Figura 7.** A base de datos ISCA sinala que ganancias na mesma zona e de tamaño menor á ganancia detectada no cromosoma 1 da mostra son patoxénicas. Nótese que na imaxe se están considerando as dúas ganancias como unha soa.



**Figura 8.** A base de datos ISCA sinala que perdas na mesma zona e de tamaño menor á perda detectada no cromosoma 18 da mostra son patoxénicas.

<sup>15</sup> HUGO Gene Nomenclature Committee. Comité para a nomenclatura de xenes: caracteriza cada xene humano cun nome único e significativo.

<sup>16</sup> Online Mendelian Inheritance in Man. Herdanza mendeliana no humano en liña: base de datos que contén información sobre os fenotipos e enfermidades humanos con base xenética e a súa asociación aos xenes do xenoma humano.

## Afecta número 2

Control de calidade do array:

SD Autosome/Robus: 0.15/0.13

SBR Ch1/Ch2: 8.86/7.13

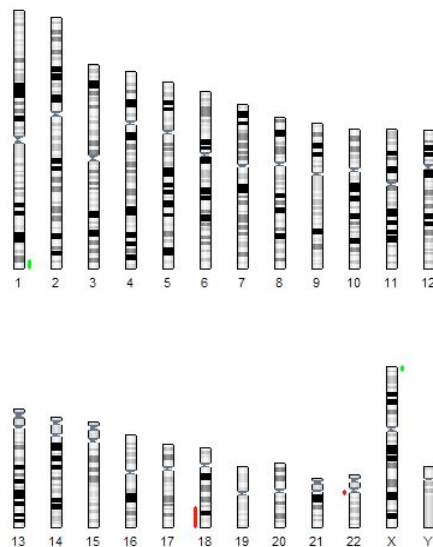
DLR Raw/Fused: 0.27/0.20

Os resultados cumplan os criterios de calidade para o estudo.

Tras o escaneado do portaobxectos obtivéronse as seguintes seis aberracións (**Figura 9**):

1. No brazo grande do cromosoma 1 detectouse unha ganancia de 3.417.303 pb que comeza na rexión 1q43 e remata na 1q44 (242.023.948-245.441.250 pb).
2. No brazo grande do cromosoma 1 detectouse unha ganancia de 3.707.573 pb que comeza na rexión 1q44 e remata na mesma (245.505.067-249.212.639 pb).
3. No brazo grande do cromosoma 18 detectouse unha perda de 18.937.776 pb que comeza na rexión 18q21.33 e remata na 18q23 (59.016.361-77.954.136 pb).
4. No brazo grande do cromosoma 22 detectouse unha perda de 250.287pb que comeza na rexión 22q11.1 e remata na mesma (16.639.458-16.889.744 pb).
5. No brazo pequeno do cromosoma X detectouse unha ganancia de 274.431 pb que comeza na rexión Xp22.33 e remata na mesma (305.744-580.174 pb).
6. No brazo pequeno do cromosoma X detectouse unha ganancia de 848.451 pb que comeza na rexión Xp22.33 e remata na mesma (1.499.764-2.348.214 pb).

Os parámetros indicados por defecto no algoritmo do programa suxiren que: (1) a ganancia de 3.417.303 pb localizada no brazo longo do cromosoma 1 pode ser patoxénica, (2) a ganancia de 3.707.573 pb localizada no brazo longo do cromosoma 1 pode ser patoxénica, (3) a perda de 18.937.776 pb no brazo longo do cromosoma 18 pode ser patoxénica, (4) a perda de 250.287pb no brado longo do cromosoma 22 pode ser de significado incerto, (5) a ganancia de 274.431 pb no brazo pequeno do cromosoma X pode ser benigna e (6) a ganancia de 848.451 pb no brazo pequeno do cromosoma X pode ser de significado incerto.

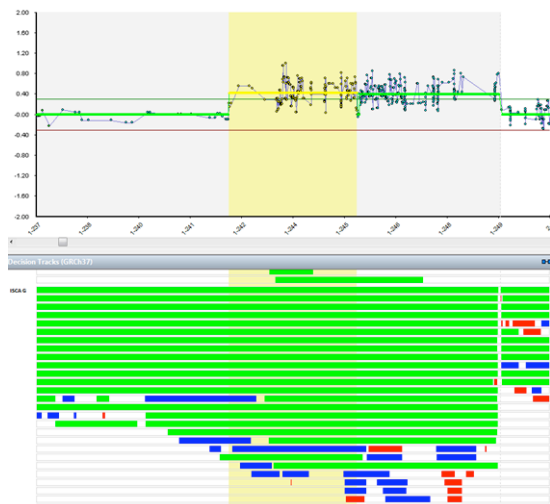


**Figura 9.** Resultado do escaneado realizado polo Software Mapix (Innopsys) e a súa lectura co Software BlueFuse Multi v2.1 (BlueGenome) onde se poden observar as alteración cromosómicas presentes na mostra da afecta número 2. En cor verde represéntanse as ganancias e en cor vermella as perdas.

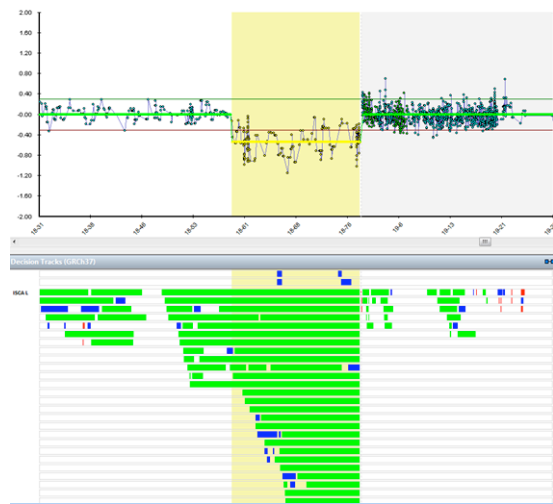
Tras examinar os resultados que proporciona o programa, obsérvanse os xenes involucrados en cada unha das rexións alteradas e compáranse con resultados similares en diferentes bases de datos para corroborar a patoxenicidade ou non patoxenicidade do defecto no material. Deste xeito obsérvase que:

1. A ganancia de 3.417.303 pb localizada no cromosoma 1 involucra a 35 xenes HGNC (dos cales 11 son xenes OMIM), ademais de dúas enfermidades OMIM (**Anexo 1. Táboa IV**).
2. A ganancia de 3.707.573 pb detectada no cromosoma 1 implica a 91 xenes HGNC (dos cales nove son xenes OMIM), ademais de tres patoloxías OMIM (**Anexo 1. Táboa V**).
3. A perda de 18.937.776 pb atopada no cromosoma 18 involucra a 97 xenes HGNC (dos cales 43 son xenes OMIM) ademais de nove trastornos OMIM (**Anexo 1. Táboa VI**).
4. A perda de 250.287pb localizada no cromosoma 22 implica a dous xenes HGNC (dos cales ningún é xene OMIM) (**Anexo 1. Táboa VII**).
5. A ganancia de 274.431 pb detectada no cromosoma X involucra a 3 xenes HGNC (dos cales un é un xene OMIM) (**Anexo 1. Táboa VIII**).
6. A ganancia de 848.451 pb atopada no cromosoma X implica a 10 xenes HGNC (dos cales 12 son xenes OMIM) (**Anexo 1. Táboa IX**).

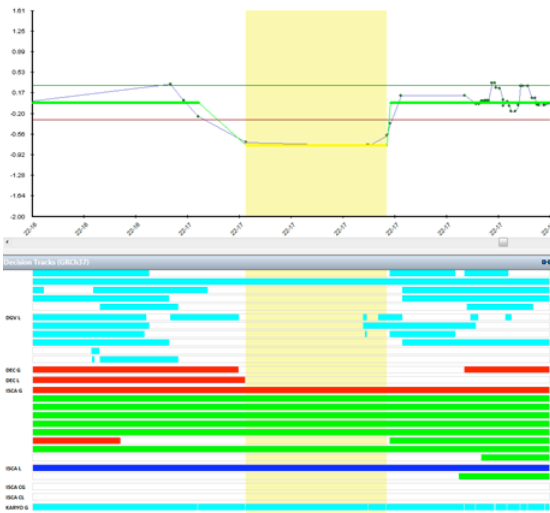
Así mesmo, púidose concluír que (1) a ganancia de 3.417.303 pb localizada no cromosoma 1 e maila ganancia de 3.707.573 pb do mesmo cromosoma constitúen unha soa de 7.124.876 pb que é patoxénica porque hai referencias de ganancias de menor tamaño patoxénicas (**Figura 10**), (2) a perda de 18.937.776 pb detectada no cromosoma 18 é patoxénica xa que hai referencias de perdas menores en tamaño involucrando a mesma zona que son patoxénicas (**Figura 11**), (3) a perda de 250.287pb detectada no cromosoma 22 é benigna porque hai referencias de perdas de maior tamaño benignas (**Figura 12**), (4) a ganancia de 274.431 pb detectada no cromosoma X é benigna xa que hai unha referencia dunha ganancia moi similar benigna (**Figura 13**) e (5) a ganancia de 848.451 pb detectada no cromosoma X é benigna porque hai ganancias de tamaño menor á ganancia detectada que son benignas ou de significado incerto (**Figura 14**).



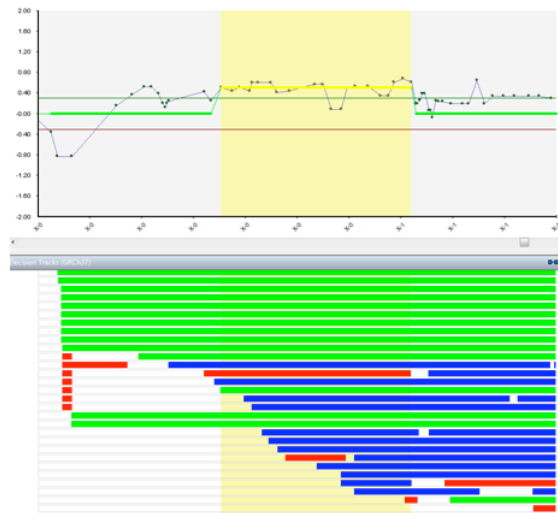
**Figura 10.** A base de datos ISCA sinala que hai ganancias de tamaño menor á ganancia detectada no cromosoma 1 da mostra 2 que son patoxénicas.



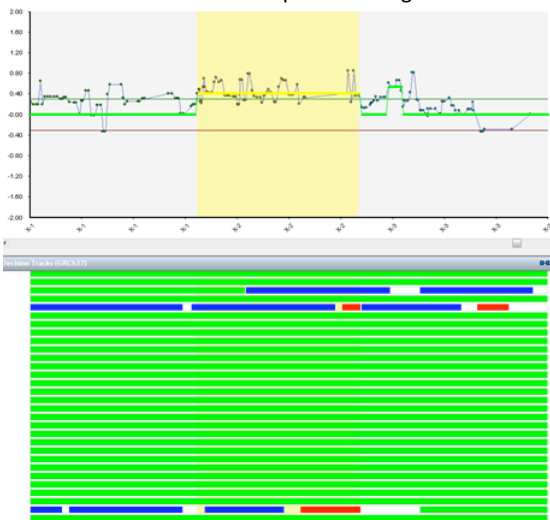
**Figura 11.** A base de datos ISCA sinala que perdas na mesma zona e de tamaño menor á perda detectada no cromosoma 18 da mostra 2 son patoxénicas.



**Figura 12.** A base de datos DECIPHER<sup>17</sup> sinala que hai perdas de tamaño maior á perda detectada no cromosoma 22 da mostra 2 que son benignas.



**Figura 13.** A base de datos ISCA sinala unha referencia dunha ganancia de moi similar á ganancia detectada no cromosoma X da mostra 2 que é benigna.



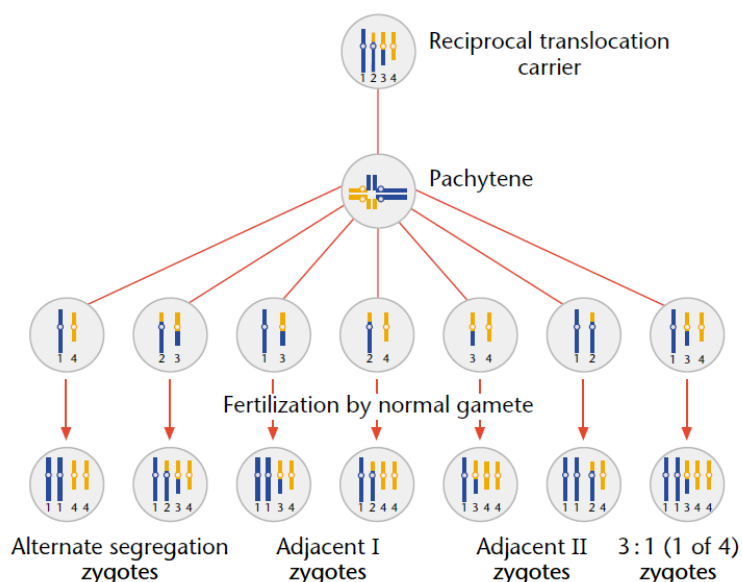
**Figura 14.** A base de datos ISCA sinala que hai ganancias de tamaño menor á ganancia detectada no cromosoma X da mostra 2 que son benignas ou de significado incerto.

<sup>17</sup> Database of genomic variation and phenotype in humans using Ensembl resources. Base de datos da variación xenómica e fenotipo en humanos utilizando recursos Ensembl: relaciona información acerca de microdeleicións, duplicacións, insercións, inversións e translocacións con enfermidades xenéticas.

## Diagrama de Paquitene e cálculo de riscos.

Existen catro patróns de segregación básicos dunha translocación recíproca cuadrivalente (Figura 15):

- Alternada: os dous cromosomas normais móvense cara un polo e os dous cromosomas coa translocación ao polo oposto. Todos os gametos formados son equilibrados.
- Adxacente I: os centrómeros non homólogos adxacentes diríxense cara o mesmo polo. Isto resulta nun complemento cromosómico desequilibrado que conlevará un zigoto con trisomía parcial nun cromosoma e monosomía parcial no outro. Este patrón de segregación case sempre é compatible coa viabilidade.
- Adxacente II: os centrómeros homólogos adxacentes diríxense cara o mesmo polo; resultando usualmente nun amplo número de desequilibrios na cromatina, o que é habitualmente incompatible coa supervivencia embrionaria.
- Segregación "3:1": tres dos catro cromosomas móvense cara un polo e só un ao polo oposto. Despois da fertilización hase formar un embrión con 47 cromosomas e portador da translocación.



**Figura 15.** Cuadrivalente cos resultados das segregacións alternada, adxacente I, adxacente II e segregación 3:1 tras a fecundación por un gameto normal. Tomado de Moore & Best (2001).

Deste xeito, para a determinación das posibles segregacións e cales delas son as máis probables de dar lugar a un concepto viable, véase necesario facer un debuxo do Diagrama de Paquitene do presunto cuadrivalente. A maiores disto, débese ter en conta que: (1) se asume que a segregación alternada é frecuente asociándose coa normalidade fenotípica, (2) o menos desequilibrado dos gametos é un dos máis probables na produción dun concepto viable e (3) se os segmentos translocados son pequenos en contido xenético, adxacente I é a segregación máis probable para a xeración de descendencia anormal (Gardner et al. 2011).

Tras a selección das rexións implicadas dos cromosomas 1 e 18 no programa HCFforum, este establece que as segregacións máis probables para esta translocación serían a alternada e a adxacente I tal e como se supuxo previamente (Figura 16).

Desta forma, e tendo en conta os cromosomas nos que se produciu a translocación e o tamaño dos fragmentos involucrados, resólvese que as probabilidades de herdanza da mutación para a descendencia de portadores sans son. Dos embarazos a termo:

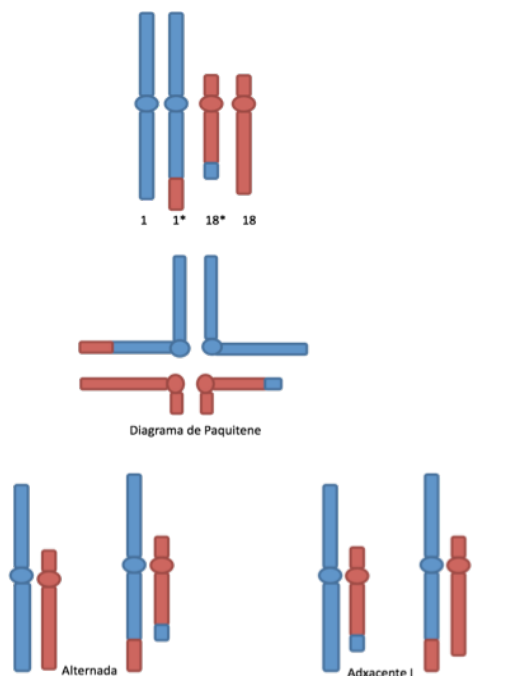


- A maioría dos nados terán un fenotipo normal (unha das catro posibilidades de segregación representadas na **Figura 15**), nos que aproximadamente a metade portará un cariotipo normal e a outra metade presentará a translocación equilibrada (ao igual co proxenitor).
- Dentro da segregación desequilibrada (tres das catro posibilidades da **Figura 15**), as que poderán cursar con malformacións serían os reordenamentos anómalos resultados dunha segregación adxacente I que impliquen trisomías ou monosomías parciais en relación aos segmentos 1q43-qter e 18q21.33-qter. O risco de malformacións asociado a esta translocación cando se herda por vía materna sería de entre un 23,19 e un 31,77% teórico mentres que, para a transmisión por vía paterna o risco é algo menor situándose ente un 21,88 e un 31,05%.

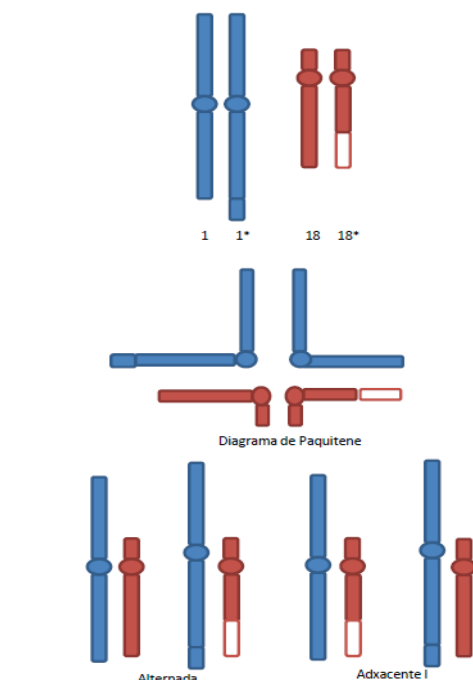
O resto de xestacións con cromosopatías diferentes ás dúas anteriores resultarán en abortos espontáneos de repetición.

Por outro lado, as probabilidades de herdanza da translocación para a descendencia de portadores afectados (con fenotipo alterado) son, segundo a segregación cromosómica mendeliana (**Figura 17**):

- A metade da descendencia herdaría a delección e a duplicación de forma independente é dicir, un 25% herdaría a delección e un 25% a duplicación.
- Un 25% herdaría as dúas xuntas.
- Un 25% non herdaría ningunha.



**Figura 16.** Diagrama de Paquitene e representación esquemática do resultado da segregación dun portador da translocación 1:18 obxecto de estudo.



**Figura 17.** Diagrama de Paquitene e representación esquemática do resultado da segregación dun portador afecto da translocación

## Discusión

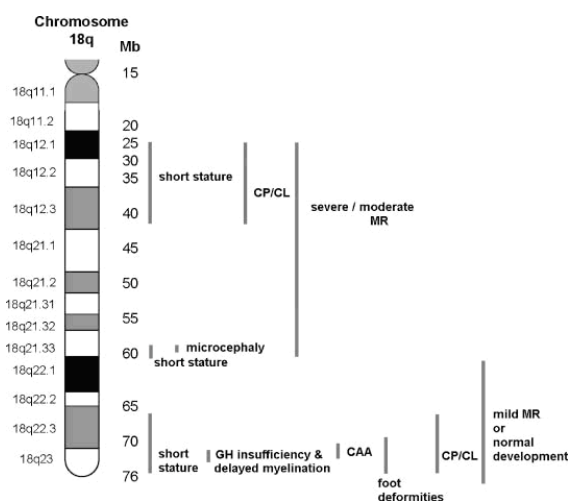
### Xenes, enfermidades e fenotipos asociados

Na literatura especializada non se ten descrito ningún paciente coa mesma alteración cromosómica ca o caso de estudo.

A determinación dos puntos de ruptura da translocación analizada debería, *a priori*, permitir unha aproximación aos fenotipos asociados á ganancia/perda deses segmentos cromosómicos. Así, as bases de datos informan sobre asociación entre retrasos do desenvolvemento e dimorfías tanto cando existe unha copia extra do fragmento 1q43-qter coma cando falta (v.g. síndrome de delección 1q43-44), pero curiosamente das cinco enfermidades OMIM asociadas a ese segmento cromosómico das que informa o software BlueFuse Multi v2.1 (BlueGenome) utilizado para a análise dos datos do CGH-array, ningunha está causada por ganancias ou perdas, senón por substitucións nucleotídicas nos xenes *SDCCAG8* (síndrome Senior Loken 7), *NLRP3* (Síndromes Autoinflamatoria por frío, CINCA e Muckle-Wells) e *AKT3* (Síndrome Megalencefalia-polimicrogiria-polidactilia-hidrocefalia tipo 2).

En canto ao cromosoma 18, das seis enfermidades OMIM asociadas á delección do fragmento 18q21.33-qter hainas relacionadas (1) con substitucións nucleotídicas, como por exemplo as do xene *PIGN* causantes da Síndrome convulsiones-hipotonía-anomalías conxénitas múltiples tipo 1, (2) con duplicación pero non con deleccións, coma a causante dunha variante da enfermidade ósea de Paget na que se observan duplicacións en tándem de aproximadamente 25 bp no exón 1 do xene *TNFRSF11A* e (3) só con deleccións, como a Atresia Aural Conxénita, consecuencia dunha delección na rexión 18q22.3-q23.

A delección 18q21.33-qter pode englobarse dentro da Síndrome de delección 18q- (Figura 18; Feenstra et al. 2007) xa que non se poden identificar puntos de ruptura comúns entre os afectados, polo que estes presentan unha gran variabilidade clínica. Aínda así, tense descrito que incluso entre membros da mesma familia coa mesma delección existe expresividade variable e que en case un 30% dos casos se acompaña dunha alteración noutro cromosoma (Linnanviki et al. 2006), tal e como ocorre no presente caso de estudo. Isto é debido a que unha alta porcentaxe das deleccións 18q son debidas a translocacións equilibradas nalgún dos proxenitores, aínda que tamén se describen casos *de novo*.



**Figura 18.** Mapa fenotípico do brazo longo do cromosoma 18 indicando as rexións críticas para varios fenotipos patolóxicos. CAA, atresia aural conxénita; CP/CL, padal e labio leporino; MR, retraso mental. Tomado de Feenstra et al. (2007).

A base de datos OMIM indica que aínda que o fenotipo asociado é moi variable, adoita ir asociado a retraso mental, baixa estatura, hipotonía, defectos da audición e deformidades nos pés. Ademais, un 25% dos pacientes presenta cardiopatías conxénitas, un 10% padal fendido e labio leporino, nun 40% dos casos descríbese epilepsia e o 25% dos varóns presenta hipospadias. Aínda que estas características se consideran típicas, descríbense algúns casos con afectación moi leve e sen afectación mental debido á variabilidade na expresión dos síntomas explicada anteriormente.

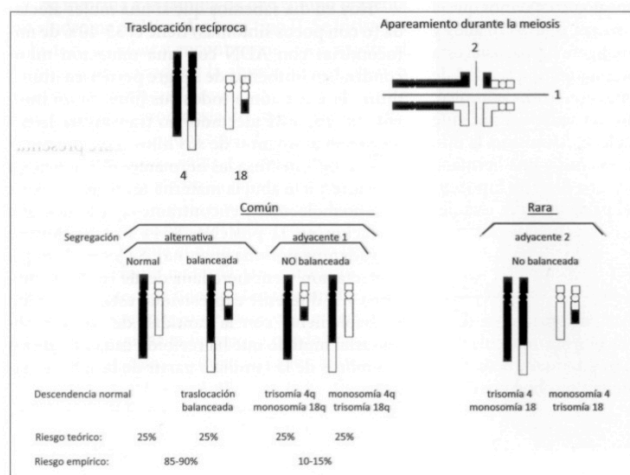
Polo tanto, aínda que non é posible predicir a expresión clínica dos posibles afectos, o cadro clínico incluírá características do Síndrome de deleción 18q- máis os derivados da duplicación 1q43-qter ou síntomas de trisomía do 18, pero moito máis leves, ademais dos derivados da monosomía 1q43-qter. As dúas afectas analizadas neste TFG presentan variabilidade fenotípica entre elas non puidéndose asociar un único patrón fenotípico á translocación familiar. Entre os síntomas anteriormente referenciados, as afectas presentan padal fendido, dificultades de aprendizaxe, deformidades nos pés, Atresia Aural Conxénita, estatura baixa, convulsións e dismorfías faciais. Outros dos posibles fenotipos non puideron ser diagnosticados ben por non ter realizado as probas pertinentes ou por non ter a idade típica de para o seu desenvolvemento.

## Implicacións

### Riscos de transmisión

Os riscos asociados a unha translocación dependen da seguinte serie de variables: (1) características citoxenéticas da translocación, (2) lonxitude de banda R dos segmentos translocados, (3) idade e sexo do portador parental e (4) a viabilidade potencial dos gametos (Cans et al. 1993)

Debido ao pequeno tamaño dos fragmentos obsérvase un aumento nas posibilidades de transmisión de cara á descendencia de portadores e afectos. Isto débese a que a translocación, deleción ou duplicación de fragmentos cromosómicos pequenos conleva un maior risco de malformación nos embrións que os portan, ademais de ser potencialmente viables mentres que se fosen fragmentos máis grandes, a viabilidade veríase comprometida (v.g abortos de repetición). Por exemplo, unha translocación  $t(4;18)(q35;q12.12)$  leva asociado un risco empírico de transmisión de entre o 10-15% (**Figura 19**; Delgado Rubio et al. 2012). É dicir, moito menor ca o asociado a fragmentos de menor tamaño, coma no presente caso, onde aínda que o cromosoma 18 tamén está implicado, o risco é dun 26,21-27,27% de media.



**Figura 19.** Posibilidades transmisión dunha translocación 4:18. Tomado de Delgado Rubio et al. (2012).

En canto ao maior risco de malformacións asociado á transmisión por vía materna, un 27,27% fronte a un 26,21% de media, tamén se describe en Faraut et al. (2000) coma algo que ocorre con relativa frecuencia, habendo máis mulleres que son nais ca homes que son pais nas translocación familiares. Así, na revisión de Faraut et al (2000) de 1.597 nenos en familias con este tipo de translocacións, indícase que as nais son as responsables do 61% dos nenos froito dunha segregación adxacente 1, do 70% dos nenos froito dunha segregación adxacente 2 e polo menos no 92% dos casos da descendencia desequilibrada resultado da segregación 3:1.

O cálculo do risco persoalizado para un portador heterocigoto dunha translocación equilibrada implica un problema importante do campo da xenética porque as translocacións son case sempre específicas de familia polo que se depende en gran medida das cifras xerais do risco derivados doutros estudos de familias con translocacións similares. Isto fai que o problema estea particularmente adaptado para a análise estatística bayesiana, na que se poden introducir certos coñecementos *a priori*, v.g. datos específicos da familia (VanDerwerken 2015).

### Probos prenatais

Os resultados deste TFG permiten avanzar respecto ás probas diagnósticas a realizar nas xestacións de fillos de portadores desta translocación.

Para valorar se un feto é portador ou non do reordenamento desequilibrado, hase ofertar a posibilidade de diagnóstico prenatal a realizar arredor da semana 12 mediante biopsia corial ou na semana 16 a través do estudo do líquido amniótico.

O diagnóstico de translocación desequilibrada debería realizarse mediante CGH-array para evitar que debido ao pequeno tamaño dos fragmentos implicados poida pasar desapercibida unha segregación desequilibrada como pasou no caso do individuo IV-4 (**Figura 2**). Tamén se recomendará a realización dun cariotipo para complementar o resultado.

As translocacións son unha das causas contempladas pola lexislación vixente (*Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reprodución humana asistida e Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización*) para proceder ao Diagnóstico Xenético Preimplantacional consistente nunha fecundación *in vitro* e posterior diagnóstico dos embrións, seleccionando só os carentes da translocación para seren implantados. Con todo, este proceso non está exento de dificultades, como por exemplo as baixas taxas de embarazo por transferencia embrionaria (**Táboa 3**), así como o erro potencial asociado a este procedemento.

<b>Táboa 3</b>	
<b>Idade (anos)</b>	<b>Taxa de embarazo por IVF-ET<sup>18</sup></b>
20 - 24	44%
25 - 29	36%
30 - 34	24%
35 - 39	18%
40 - 44	10%
45 ou máis	8%

**Táboa 3.** Taxa de embarazo utilizando a técnica de IVF-ET segundo diferentes rangos de idade. Tomada de Bansal (2011).

Este consello é estensíbel a outros membros desta familia en idade reproductiva que porten a mesma translocación.

<sup>18</sup> In Vitro Fertilization Embryo Transfer. Transferencia de embrións resultantes de fecundación *in vitro*

## Conclusións / Conclusions

Descrición dunha trisomía 1q43-q44 de 7.1Mb e unha monosomía 18q21.33-q23 de 18.8Mb nas dúas afectas vivas que permite establecer que a fórmula cromosómica da translocación detectada na familia é t(1;18)(q43,q21.33).

Establécese un risco de transmisión á descendencia, no caso dos portadores equilibrados, que vai do 23,19 ao 31,77% en caso da transmisión por vía materna e do 21,88 ao 31,05% no caso da transmisión por vía paterna.

En caso de embarazo existe a posibilidade de diagnóstico prenatal mediante CGH-array e cariotipo habendo, ademais, a opción de diagnóstico preimplantacional aplicando esta técnica a embrións procedente de fecundación *in vitro* e seleccionando para implantación aqueles válidos cromosomicamente.

.....

Description of a 1q43-q44 trisomy of 7.1MB and 18q21.33-q23 monosomy of 18.8Mb in the two affected individuals. Therefore, the chromosome formula for this familial translocation is t(1; 18) (q43, q21.33).

The risk of transmission of this rearrangement from a carrier to his/her offspring ranges from 23.19 to 31.77% (maternal transmission) and from 21.88 to 31.05% (paternal transmission).

Prenatal diagnosis by CGH-array and karyotype are recommended. In addition, preimplantation genetic diagnosis (selection of unaffected embryos produced through *in vitro* fertilization) is currently available for translocations as this one under the current Spanish law.

## Bibliografía

- Bansal, K. 2011. *Manual of Intrauterine insemination (IUI), In Vitro Fertilization (IVF) and Intracytoplasmic Sperm Injections (ICSI)*. 2nd edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- Cans, C.; Cohen, O.; Lavergne, C.; Mermet, M.A.; Demongeot, J. & Jalbert, P. 1993. Logistic regression model to estimate the risk of unbalanced offspring in reciprocal translocations. *Human Genetics*, 92: 598-604.
- Cigudosa García, J.C. & Lapunzina Badía, P. (coord.) 2012. *Consenso para la Implementación de los Arrays [CGH y SNP-arrays] en la Genética Clínica*. [http://contenidos.institutoarce.es/pdf/2012/consenso\\_arrays.pdf](http://contenidos.institutoarce.es/pdf/2012/consenso_arrays.pdf) Último acceso: 14/05/2015.
- De Benito, E. & Lillo, M. 2014. Los enfermos 'raros' toman las riendas. [http://sociedad.elpais.com/sociedad/2014/02/27/actualidad/1393531241\\_119497.html](http://sociedad.elpais.com/sociedad/2014/02/27/actualidad/1393531241_119497.html). Último acceso: 14/05/2015.
- Delgado Rubio, A.; Galán Gómez, E.; Lapunzina Badía, P.D.; Guillén-Navarro, E.; Penchaszadeh, V.B.; Romeo Casabona, C.M. & Emaldi Criación, A. 2012. *Asesoramiento Genético en la Práctica Médica*. Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Faraut, T.; Mermet, M.A.; Demongeot, J. & Cohen, O. 2000. Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88: 15-21.
- Feenstra, I.; Vissers, L.E.L.M.; Orsel, M.; van Kessel, A.G.; Brunner, H.G.; Veltman, J.A. & van Ravenswaaij-Arts, C.M. 2007. Genotype–Phenotype Mapping of Chromosome 18q Deletions by High-Resolution Array CGH: An Update of the Phenotypic Map. *American Journal of Human Genetics*, 143A: 1858–1867.
- Gardner, R.J.M.; Sutherland, G.R. & Shaffer, L.G. 2011. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Oxford Monographs on Medical Genetics 61. 4th edition. Oxford University Press.
- Linnankivi, T.; Tienari, P.; Somer, M.; Kähkönen, M.; Lönnqvist, T.; Valanne, L. & Pihko, H. 2006. 18q deletions: Clinical, molecular, and brain MRI findings of 14 individuals. *American Journal of Medical Genetics*, 140A: 331-339.
- Moore, C.M. & Best, R.G. 2001. *Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations*. Encyclopedia Of Lifesciences.
- Mori, M.A.; Mansilla, E.; García-Santiago, F.; Vallespín, E.; Palomares, M.; Martín, R.; Rodríguez, R.; Martínez-Payo, C.; Gil-Fournier, B.; Ramirof, S.; Lapunzina, P. & Nevado, J. 2012. Diagnóstico prenatal y array-hibridación genómica comparada (CGH) (I). *Gestaciones de elevado riesgo*. *Diagnóstico Prenatal*, 23:34–48.
- VanDerwerken, D. No prelo. Bayesian Assessment of Genetic Risk in Families with a Balanced Translocation. *Journal of Genetic Counseling*. DOI:10.1007/s10897-015-9821-0.

## Anexo 1

Táboa I	
Xenes HGNC	NECAP2, CROCCP3, RNU1-1, NBPF1, CROCCP2, MST1P2, RNU1-3, EIF1AXP1 e ESPNP
Xenes OMIM	" NECAP ENDOCYTOSIS-ASSOCIATED PROTEIN 2; NECAP2 (*611624)", " RNA, U1A SMALL NUCLEAR; RNU1A (*180680)", " NEUROBLASTOMA BREAKPOINT FAMILY, MEMBER 15; NBPF15 (*610414)", " NEUROBLASTOMA BREAKPOINT FAMILY, MEMBER 1; NBPF1 (*610501)", " NEUROBLASTOMA BREAKPOINT FAMILY, MEMBER 11; NBPF11 (*614001)", " RNA, U1A SMALL NUCLEAR; RNU1A (*180680)"
Enfermidades OMIM	CHROMOSOME 1p36 DELETION SYNDROME (607872)

Táboa II	
Xenes HGNC	BECN1P1, CFL1P4, MAP1LC3C, RNU6-1139P, TUBB8P6, PLD5, RNA5SP81, RN7SKP12, RSL24D1P4, RNU6-747P, CEP170, SDCCAG8, FCF1P7, MIR4677, AKT3, FABP7P1, AKT3-IT1, ZBTB18, RN7SL148P, C1orf100, TGIF2P1, ADSS, C1orf101, DESI2, COX20, HNRNPU-AS1, HNRNPU, RN7SKP55, RNU6-947P, EFCAB2, RNU6-1089P, RNU6-999P, RNU1-132P, KIF26B, DNAJC19P8, SMYD3, CHCHD4P5, RNU6-1283P, SMYD3-IT1, TFB2M, CNST, SCCPDH, AHCTF1, ZNF695, ZNF670, ZNF669, C1orf229, FGFR3P6, ZNF124, MIR3916, MIR3916, RNA5SP82, VN1R17P, VN1R5, ZNF496, NLRP3, OR2B11, OR2W5, GCSAML, GCSAML-AS1, OR2C3, OR2G2, OR2G3, RNU6-691P, OR14L1P, OR3D1P, OR13G1, OR6F1, OR14A2, OR14K1, OR1C1, OR9H1P, OR14A16, HSD17B7P1, OR6R1P, OR11L1, TRIM58, OR2W3, OR2T8, OR2AJ1, OR2L13, OR2X1P, OR2L8, OR2AK2, OR2L9P, OR2L1P, OR2L6P, OR2L5, OR2L2, OR2L3, OR2T32P, OR2M1P, OR2M5, OR2M2, OR2M3, OR2M4, OR2T33, OR2T12, OR2M7, OR14C36, OR2T4, OR2T6, OR2T1, OR2T7, OR2T2, OR2T3, OR2T5, OR2AS2P, OR2G6, OR2AS1P, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27, OR14I1, AHCYP8, LYPD8, SH3BP5L, MIR3124, ZNF672, ZNF692, PGBD2, RNU6-1205P
Xenes OMIM	" MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1, LIGHT CHAIN 3, GAMMA; MAP1LC3C (*609605)", " CENTROSOMAL PROTEIN, 170-KD; CEP170 (*613023)", " SEROLOGICALLY DEFINED COLON CANCER ANTIGEN 8; SDCCAG8 (*613524)", " V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 3; AKT3 (*611223)", " ZINC FINGER PROTEIN 238; ZNF238 (*608433)", " ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE; ADSS (*103060)", " DESUMOYLATING ISOPEPTIDASE 2; DESI2 (*614638)", " CYTOCHROME c OXIDASE 20, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF; COX20 (*614698)", " HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN U; HNRNPU (*602869)", " KINESIN FAMILY MEMBER 26B; KIF26B (*614026)", " SET AND MYND DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 3; SMYD3 (*608783)", " TRANSCRIPTION FACTOR B2, MITOCHONDRIAL; TFB2M (*607055)", " CONSORTIN; CNST (*613439)", " AT HOOK-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1; AHCTF1 (*610853)", " ZINC FINGER PROTEIN 124; ZNF124 (*194631)", " ZINC FINGER PROTEIN 496; ZNF496 (*613911)", " NLR FAMILY, PYRIN DOMAIN-CONTAINING 3; NLRP3 (*606416)", " OLFACTORY RECEPTOR, FAMILY 13, SUBFAMILY G, MEMBER 1; OR13G1 (*611677)"
Enfermidades OMIM	SENIOR-LOKEN SYNDROME 7; SLSN7 (#613615), MEGALENCEPHALY-POLYMICROGYRIA-POLYDACTYLY-HYDROCEPHALUS SYNDROME; (#603387), FAMILIAL COLD AUTOINFLAMMATORY SYNDROME 1; FCAS1 (#120100), CINCA SYNDROME; CINCA (#607115), MUCKLE-WELLS SYNDROME; MWS (#191900)

Táboa III	
Xenes HGNC	CDH20, RNF152, RPIAP1, PIGN, KIAA1468, TNFRSF11A, RPL17P44, ACTBP9, ZCCHC2, RN7SL705P, PHLPP1, RNU6-142P, BCL2, KDSR, VPS4B, SERPINB5, ATP5G1P6, SERPINB12, SERPINB13, SERPINB4, SERPINB11, SERPINB3, SERPINB7, SERPINB2,

	SERPINB10, HMSD, SERPINB8, RPL12P39, LINC00305, RNU7-146P, CDH7, PRPF19P1, CDH19, RNU6-1037P, MIR5011, RPL31P9, DSEL, AKR1B10P2, TMX3, CCDC102B, RNU6-39P, SDHCP1, DOK6, CD226, RTTN, SOCS6, RPS2P6, RN7SL795P, GTSCR1, CBLN2, HNRNPA1P11, NETO1, RNA5SP460, MIR548AV, RN7SL401P, FBXO15, TIMM21, RN7SL551P, CYB5A, C18orf63, FAUP1, FAM69C, CNDP2, CNDP1, LINC00909, ZNF407, ZADH2, TSHZ1, SMIM21, ZNF516, LINC00908, LINC00683, ARL2BPP1, RNU6-346P, ZNF236, RPL26P35, MBP, GALR1, BDP1P, RNA5SP461, LINC01029, RNU6-655P, SALL3, ATP9B, NFATC1, CTDP1, KCNG2, PQLC1, HSBP1L1, TXNL4A, RBFA, RBFADN, SLC25A6P4, ADNP2, PARD6G
Xenes OMIM	" CADHERIN 20; CDH20 (*605807)", " PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN, CLASS N; PIGN (*606097)", " TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 11A; TNFRSF11A (*603499)", " PH DOMAIN AND LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN PHOSPHATASE; PHLPP (*609396)", " B-CELL CLL/LYMPHOMA 2; BCL2 (+151430)", " FOLLICULAR LYMPHOMA VARIANT TRANSLOCATION 1; FVT1 (*136440)", " VACUOLAR PROTEIN SORTING 4, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, B; VPS4B (*609983)", " PROTEASE INHIBITOR 5; PI5 (*154790)", " PROTEASE INHIBITOR 13; PI13 (*604445)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 4; SERPINB4 (*600518)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 3; SERPINB3 (*600517)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 7; SERPINB7 (*603357)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 2; SERPINB2 (*173390)", " PROTEASE INHIBITOR 10; PI10 (*602058)", " MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, SERPIN DOMAIN-CONTAINING; HMSD (*612086)", " PROTEASE INHIBITOR 8; PI8 (*601697)", " CADHERIN 7; CDH7 (*605806)", " CADHERIN 19; CDH19 (*603016)", " DERMATAN SULFATE EPIMERASE-LIKE; DSEL (*611125)", " DOCKING PROTEIN 6; DOK6 (*611402)", " CD226 ANTIGEN; CD226 (*605397)", " ROTATIN; RTTN (*610436)", " SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALING 4; SOCS4 (*605118)", " PRECEREBELLIN 2; CBLN2 (*600433)", " NEUROFILIN- AND TOLLOID-LIKE 1; NETO1 (*607973)", " F-BOX ONLY PROTEIN 15; FBXO15 (*609093)", " TRANSLOCASE OF INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE 21, YEAST, HOMOLOG OF; (*615180)", " CYTOCHROME b5, TYPE A (MICROSOMAL); CYB5A (*613218)", " FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 69, MEMBER C; FAM69C (*614544)", " PEPTIDASE A; PEPA (*169800)", " CARNOSINE DIPEPTIDASE 1; CNDP1 (*609064)", " TEASHIRT ZINC FINGER HOMEBOX 1; TSHZ1 (*614427)", " ZINC FINGER PROTEIN 516; ZNF516 (*615114)", " ZINC FINGER PROTEIN 236; ZNF236 (*604760)", " MYELIN BASIC PROTEIN; MBP (*159430)", " GALANIN RECEPTOR 1; GALR1 (*600377)", " SAL-LIKE 3; SALL3 (*605079)", " ATPase, CLASS II, TYPE 9B; ATP9B (*614446)", " NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS, CYTOPLASMIC, CALCINEURIN-DEPENDENT (*600489)", " C-TERMINAL DOMAIN OF RNA POLYMERASE II SUBUNIT A, PHOSPHATASE OF, (*604927)", " POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SUBFAMILY G, MEMBER 2; KCNG2 (*605696)", " THIOREDOXIN-LIKE 4A; TXNL4A (*611595)", " PARTITIONING-DEFECTIVE PROTEIN 6, C. ELEGANS, HOMOLOG OF, GAMMA; PARD6G (*608976)"
Enfermidades OMIM	MULTIPLE CONGENITAL ANOMALIES-HYPOTONIA-SEIZURES SYNDROME 1; MCAHS1 (#614080), PAGET DISEASE OF BONE; PDB (#602080), FAMILIAL EXPANSILE OSTEOLYSIS; FEO (#174810), OSTEOPETROSIS, AUTOSOMAL RECESSIVE 7; OPTB7 (#612301), B-CELL CLL/LYMPHOMA 2; BCL2 (+151430), POLYMICROGYRIA WITH SEIZURES; PMGYS (#614833), METHEMOGLOBINEMIA TYPE IV (#250790), AURAL ATRESIA, CONGENITAL; CAA (#607842), CONGENITAL CATARACTS, FACIAL DYSMORPHISM, AND NEUROPATHY (#604168)

<b>Táboa IV</b>	
Xenes HGNC	EXO1, BECN1P1, CFL1P4, MAP1LC3C, RNU6-1139P, TUBB8P6, PLD5, RNA5SP81, RN7SKP12, RSL24D1P4, RNU6-747P, CEP170, SDCCAG8, FCF1P7, MIR4677, AKT3, FABP7P1, AKT3-IT1, ZBTB18, RN7SL148P, C1orf100, TGIF2P1, ADSS, C1orf101, DESI2, COX20, HNRNPU-AS1, HNRNPU, RN7SKP55, RNU6-947P, EFCAB2, RNU6-1089P, RNU6-999P, RNU1-132P, KIF26B



Xenes OMIM	" EXONUCLEASE 1, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF; EXO1 (*606063)", " MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1, LIGHT CHAIN 3, GAMMA; MAP1LC3C (*609605)", " CENTROSOMAL PROTEIN, 170-KD; CEP170 (*613023)", " SEROLOGICALLY DEFINED COLON CANCER ANTIGEN 8; SDCCAG8 (*613524)", " V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 3; AKT3 (*611223)", " ZINC FINGER PROTEIN 238; ZNF238 (*608433)", " ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE; ADSS (*103060)", " DESUMOYLATING ISOPEPTIDASE 2; DESI2 (*614638)", " CYTOCHROME c OXIDASE 20, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF; COX20 (*614698)", " HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN U; HNRNPU (*602869)", " KINESIN FAMILY MEMBER 26B; KIF26B (*614026)"
Enfermidades OMIM	SENIOR-LOKEN SYNDROME 7; SLSN7 (#613615), MEGALENCEPHALY-POLYMICROGYRIA-POLYDACTYLY-HYDROCEPHALUS SYNDROME; (#603387)

**Táboa V**

Xenes HGNC	KIF26B, SMYD3, CHCHD4P5, RNU6-1283P, SMYD3-IT1, TFB2M, CNST, SCCPDH, AHCTF1, ZNF695, ZNF670, ZNF669, C1orf229, FGFR3P6, ZNF124, MIR3916, MIR3916, RNA5SP82, VN1R17P, VN1R5, ZNF496, NLRP3, OR2B11, OR2W5, GCSAML, GCSAML-AS1, OR2C3, OR2G2, OR2G3, RNU6-691P, OR14L1P, OR3D1P, OR13G1, OR6F1, OR14A2, OR14K1, OR1C1, OR9H1P, OR14A16, HSD17B7P1, OR6R1P, OR11L1, TRIM58, OR2W3, OR2T8, OR2AJ1, OR2L13, OR2X1P, OR2L8, OR2AK2, OR2L9P, OR2L1P, OR2L6P, OR2L5, OR2L2, OR2L3, OR2T32P, OR2M1P, OR2M5, OR2M2, OR2M3, OR2M4, OR2T33, OR2T12, OR2M7, OR14C36, OR2T4, OR2T6, OR2T1, OR2T7, OR2T2, OR2T3, OR2T5, OR2AS2P, OR2G6, OR2AS1P, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27, OR14I1, AHCYP8, LYPD8, SH3BP5L, MIR3124, ZNF672, ZNF692, PGBD2, RNU6-1205P
Xenes OMIM	" KINESIN FAMILY MEMBER 26B; KIF26B (*614026)", " SET AND MYND DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 3; SMYD3 (*608783)", " TRANSCRIPTION FACTOR B2, MITOCHONDRIAL; TFB2M (*607055)", " CONSORTIN; CNST (*613439)", " AT HOOK-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1; AHCTF1 (*610853)", " ZINC FINGER PROTEIN 124; ZNF124 (*194631)", " ZINC FINGER PROTEIN 496; ZNF496 (*613911)", " NLR FAMILY, PYRIN DOMAIN-CONTAINING 3; NLRP3 (*606416)", " OLFACTORY RECEPTOR, FAMILY 13, SUBFAMILY G, MEMBER 1; OR13G1 (*611677)"
Enfermidades OMIM	FAMILIAL COLD AUTOINFLAMMATORY SYNDROME 1; FCAS1 (#120100), CINCA SYNDROME; CINCA (#607115), MUCKLE-WELLS SYNDROME; MWS (#191900)

**Táboa VI**

Xenes HGNC	CDH20, RNU6-116P, RPL30P14, RNF152, RPIAP1, PIGN, KIAA1468, TNFRSF11A, RPL17P44, ACTBP9, ZCCHC2, RN7SL705P, PHLPP1, RNU6-142P, BCL2, KDSR, VPS4B, SERPINB5, ATP5G1P6, SERPINB12, SERPINB13, SERPINB4, SERPINB11, SERPINB3, SERPINB7, SERPINB2, SERPINB10, HMSD, SERPINB8, RPL12P39, LINC00305, RNU7-146P, CDH7, PRPF19P1, CDH19, RNU6-1037P, MIR5011, RPL31P9, DSEL, AKR1B10P2, TMX3, CCDC102B, RNU6-39P, SDHCP1, DOK6, CD226, RTTN, SOCS6, RPS2P6, RN7SL795P, GTSCR1, CBLN2, HNRNPA1P11, NETO1, RNA5SP460, MIR548AV, RN7SL401P, FBXO15, TIMM21, RN7SL551P, CYB5A, C18orf63, FAUP1, FAM69C, CNDP2, CNDP1, LINC00909, ZNF407, ZADH2, TSHZ1, SMIM21, ZNF516, LINC00908, LINC00683, ARL2BPP1, RNU6-346P, ZNF236, RPL26P35, MBP, GALR1, BDP1P, RNA5SP461, LINC01029, RNU6-655P, SALL3, ATP9B, NFATC1, CTDTP1, KCNG2, PQLC1, HSBP1L1, TXNL4A, RBFA, RBFADN, SLC25A6P4, ADNP2, PARD6G
Xenes OMIM	" CADHERIN 20; CDH20 (*605807)", " PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN, CLASS N; PIGN (*606097)", " TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 11A; TNFRSF11A (*603499)", " PH DOMAIN AND LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN PHOSPHATASE; PHLPP (*609396)", " B-CELL CLL/LYMPHOMA 2; BCL2 (+151430)", " FOLLICULAR LYMPHOMA VARIANT TRANSLOCATION 1; FVT1 (*136440)", " VACUOLAR PROTEIN SORTING 4, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, B; VPS4B (*609983)", " PROTEASE

	INHIBITOR 5; PI5 (*154790)", " PROTEASE INHIBITOR 13; PI13 (*604445)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 4; SERPINB4 (*600518)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 3; SERPINB3 (*600517)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 7; SERPINB7 (*603357)", " SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE B (OVALBUMIN), MEMBER 2; SERPINB2 (*173390)", " PROTEASE INHIBITOR 10; PI10 (*602058)", " MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, SERPIN DOMAIN-CONTAINING; HMSD (*612086)", " PROTEASE INHIBITOR 8; PI8 (*601697)", " CADHERIN 7; CDH7 (*605806)", " CADHERIN 19; CDH19 (*603016)", " DERMATAN SULFATE EPIMERASE-LIKE; DSEL (*611125)", " DOCKING PROTEIN 6; DOK6 (*611402)", " CD226 ANTIGEN; CD226 (*605397)", " ROTATIN; RTTN (*610436)", " SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALING 4; SOCS4 (*605118)", " PRECEREBELLIN 2; CBLN2 (*600433)", " NEUROFILIN- AND TOLL-RECEPTOR-LIKE 1; NETO1 (*607973)", " F-BOX ONLY PROTEIN 15; FBXO15 (*609093)", " TRANSLOCASE OF INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE 21, YEAST, HOMOLOG OF; (*615180)", " CYTOCHROME b5, TYPE A (MICROSOMAL); CYB5A (*613218)", " FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 69, MEMBER C; FAM69C (*614544)", " PEPTIDASE A; PEPA (*169800)", " CARNOSINE DIPEPTIDASE 1; CNDP1 (*609064)", " TEASHIRT ZINC FINGER HOMEODOMAIN 1; TSHZ1 (*614427)", " ZINC FINGER PROTEIN 516; ZNF516 (*615114)", " ZINC FINGER PROTEIN 236; ZNF236 (*604760)", " MYELIN BASIC PROTEIN; MBP (*159430)", " GALANIN RECEPTOR 1; GALR1 (*600377)", " SAL-LIKE 3; SALL3 (*605079)", " ATPase, CLASS II, TYPE 9B; ATP9B (*614446)", " NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS, CYTOPLASMIC, CALCINEURIN-DEPENDENT (*600489)", " C-TERMINAL DOMAIN OF RNA POLYMERASE II SUBUNIT A, PHOSPHATASE OF, (*604927)", " POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SUBFAMILY G, MEMBER 2; KCNG2 (*605696)", " THIOREDOXIN-LIKE 4A; TXNL4A (*611595)", " PARTITIONING-DEFECTIVE PROTEIN 6, C. ELEGANS, HOMOLOG OF, GAMMA; PARD6G (*608976)"
Enfermidades OMIM	MULTIPLE CONGENITAL ANOMALIES-HYPOTONIA-SEIZURES SYNDROME 1; MCAHS1 (#614080), PAGET DISEASE OF BONE; PDB (#602080), FAMILIAL EXPANSILE OSTEOLYSIS; FEO (#174810), OSTEOPETROSIS, AUTOSOMAL RECESSIVE 7; OPTB7 (#612301), B-CELL CLL/LYMPHOMA 2; BCL2 (+151430), POLYMICROGYRIA WITH SEIZURES; PMGYS (#614833), METHEMOGLOBINEMIA TYPE IV (#250790), AURAL ATRESIA, CONGENITAL; CAA (#607842), CONGENITAL CATARACTS, FACIAL DYSMORPHISM, AND NEUROPATHY (#604168)

**Táboa VII**

Xenes HGNC	ZNF72P, ABCD1P4
Xenes OMIM	∅
Enfermidades OMIM	∅

**Táboa VIII**

Xenes HGNC	PPP2R3B, FABP5P13, KRT18P53
Xenes OMIM	" PROTEIN PHOSPHATASE 2, REGULATORY SUBUNIT B-DOUBLE PRIME, BETA; PPP2R3B (*300339)"
Enfermidades OMIM	∅

**Táboa IX**

Xenes HGNC	IL3RA, SLC25A6, LINC00106, ASMTL-AS1, ASMTL, P2RY8, AKAP17A, ASMT, DHRSX, DHRSX-IT1
Xenes OMIM	" INTERLEUKIN 3 RECEPTOR, ALPHA; IL3RA (*308385)", " INTERLEUKIN 3 RECEPTOR, Y-CHROMOSOMAL; IL3RA (*430000)", " ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCATOR 3, Y-

	<p>CHROMOSOMAL; ANT3Y (*403000)", " ALPHA-2-MACROGLOBULIN; A2M (*103950)",  " SOLUTE CARRIER FAMILY 25 (MITOCHONDRIAL CARRIER, ADENINE NUCLEOTIDE  (*300151)", " ACETYLSEROTONIN METHYLTRANSFERASE-LIKE; ASMTL (*300162)", "  ACETYLSEROTONIN METHYLTRANSFERASE-LIKE, Y-LINKED (*400011)", "  PYRIMIDINERGIC RECEPTOR P2Y, G PROTEIN-COUPLED, 8; P2RY8 (*300525)", "  SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH, 17A; SFRS17A (*312095)", " SPLICING  FACTOR, ARGININE/SERINE RICH, 17A; SFRS17A (*465000)", " ACETYLSEROTONIN  METHYLTRANSFERASE, X-CHROMOSOMAL; ASMT (*300015)", " ACETYLSEROTONIN  METHYLTRANSFERASE, Y-CHROMOSOMAL; ASMT (*402500)"</p>
Enfermedades OMIM	∅