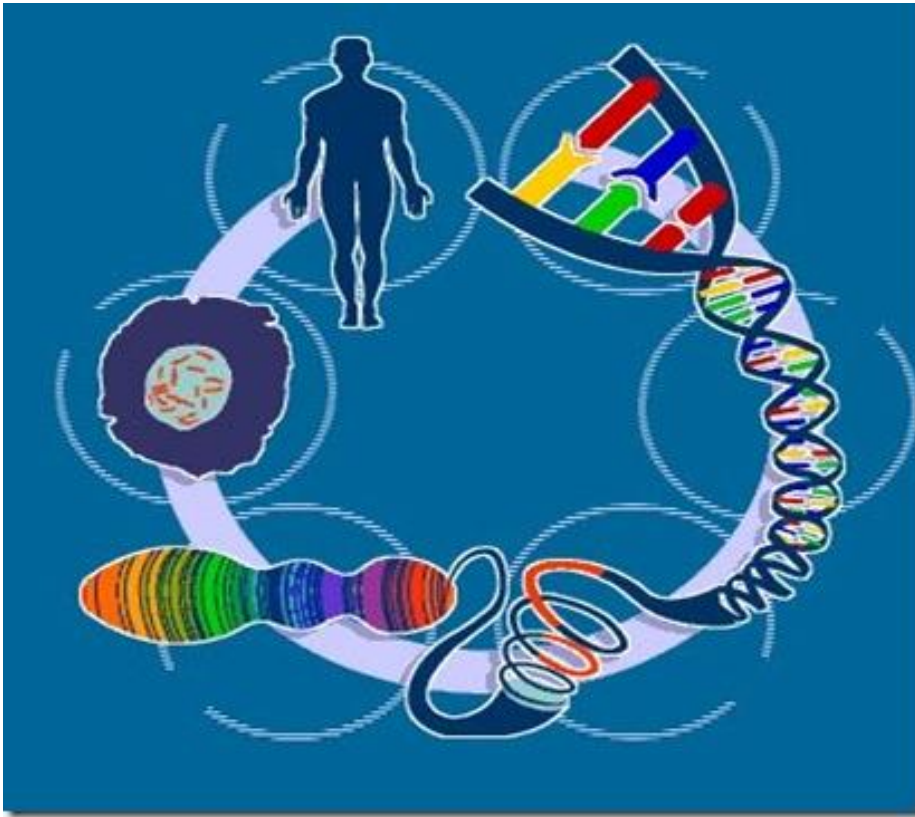


TÉCNICAS DE ESTUDIO GENÉTICO CITOGENÉTICA Y GENÉTICA MOLECULAR *¿EN QUÉ PUNTO ESTAMOS?*

- ✓ Conocimiento del genoma y bases moleculares de la patología genética humana
- ✓ Avances tecnológicos y nuevas metodologías (*microarrays*, secuenciación de última generación)
- ✓ Proyectos de estudio del genoma humano y su diversidad

Genoma humano:



- 46 pares de cromosomas (XX en la mujer y XY en el varón)
- Secuencia ADN: 3000 millones pb
- 19.000 genes
- Genoma mitocondrial

BASES MOLECULARES DE LA PATOLOGÍA GENÉTICA HUMANA

Enfermedades monogénicas

Autosómica dominante: NF1, Noonan

Autosómica recesiva: Fibrosis quística, déficit 21-OH

Ligada al X: X frágil, Distrofinopatías

Mitocondrial: encefalopatía mitocondrial, Neuropatía de Leber

Mosaicismo somático: McCune Albright

Trastornos epigenéticos:

PraderWilli

Silver Russell:

Cromosomopatías

Numéricas:

X0

+21,

Estructurales: deleciones, traslocaciones

Trastornos genómicos: microdeleciones

diGeorge/velocardiofacial

S de Williams

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO

- De la investigación a la práctica clínica

- **Técnicas citogenéticas:** pueden estudiar todo el material genético en los cromosomas o dirigirse al estudio de loci específicos
- **Técnicas de genética molecular:** Posibilidad de analizar mutaciones únicas, secuencias de genes, el genoma completo de un paciente.
- **Elección de la técnica:**
- **sospecha diagnóstica,**
- **conocimiento de la causa genética más frecuente y**
- **resolución de la técnica (ventajas y limitaciones)**

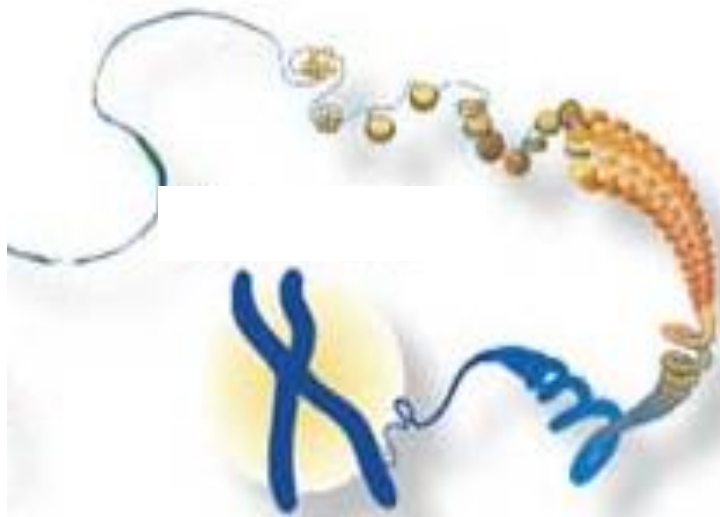


Citogenética
molecular
Arrays CGH
FISH



Genética Molecular
Secuenciación
NGS

Citogenética clásica
Cariotipo



Citogenética clásica
Cariotipo

Citogenética clásica

El cariotipo

- Anomalías cromosómicas numéricas y estructurales.
- Resolución ganancias, pérdidas o cambios de posición de entre 5-10 Mb.
- Permite detectar mosaicismos, inversiones y translocaciones equilibradas
- Ampliamente utilizada en el ámbito prenatal, en estudios de infertilidad y en Oncología.
- Precisa cultivo para obtener metafases cromosómicas

DESEQUILIBRIOS CROMOSÓMICOS

Responsables del 3-5% casos de DISCAPACIDAD INTELECTUAL

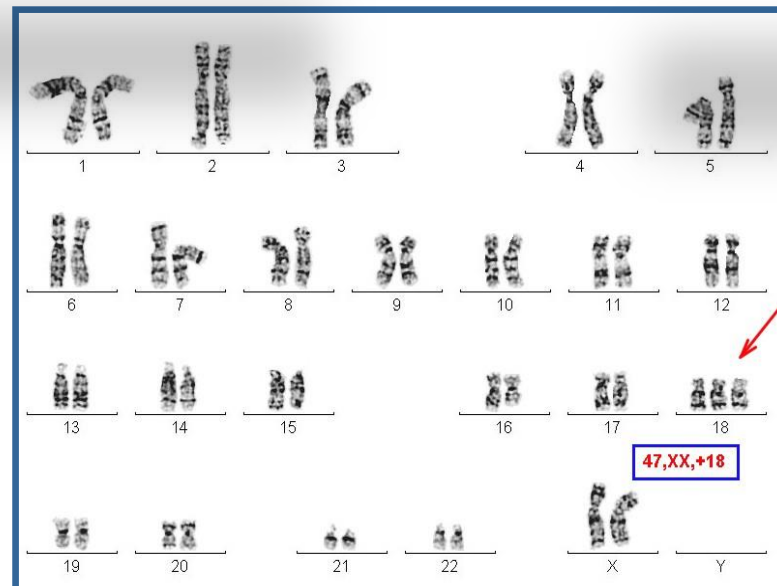
✓ **Numéricas:** +21, gonosomopatías

✓ **Estructurales:** síndrome Cri-du-chat (del 5p15), Wolf-Hirschorn (del 4p16)...

FENOTIPO CROMOSÓMICO

- Problemas en el crecimiento,
- Rasgos dismórficos faciales,
- Malformaciones estructurales: cardíacas, urogenitales y de extremidades

ESTUDIO DEL CARIOTIPO



Citogenética
molecular
Arrays CGH
FISH



Genética Molecular
Secuenciación
NGS

Citogenética clásica
Cariotipo

Citogenética
molecular
Arrays CGH
FISH



Trastornos genómicos

Entidades clínicas producidas por reordenamientos en el genoma humano

Microdeleciones y microduplicaciones:

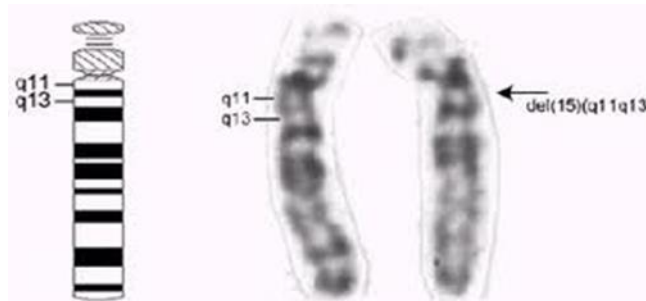
- Williams-Beuren
- diGeorge-velocardiofacial
- Potocki-Lupski:
- S. Prader-Willi/Angelman

deleción 7q11.23

deleción 22q11.2

duplicación 17p11.2

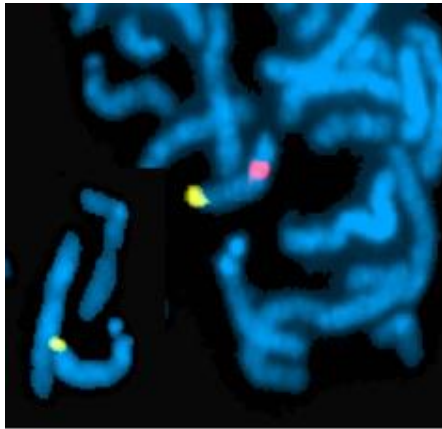
del 15q11-q13



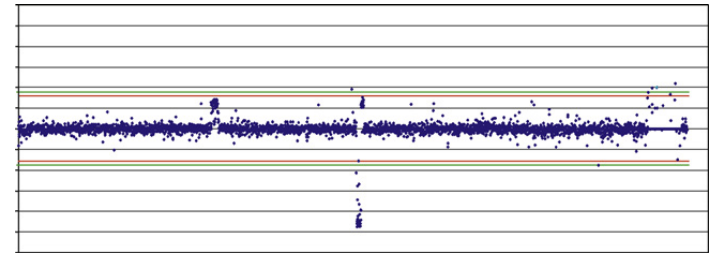
*la mayoría
submicroscópicas*

CITOGENÉTICA MOLECULAR

FISH



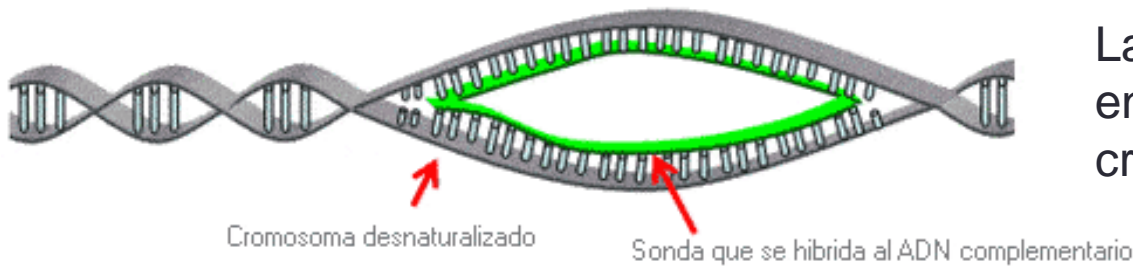
aCGH



- Las técnicas de hibridación fluorescente y microarrays de CGH permiten diagnosticar desequilibrios crípticos submicroscópicos
- Han permitido identificar numerosos síndromes de microdelección/microduplicación

HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU

SONDA: segmento de ADN marcado con fluorescencia que es complementario a la región cromosómica de interés.

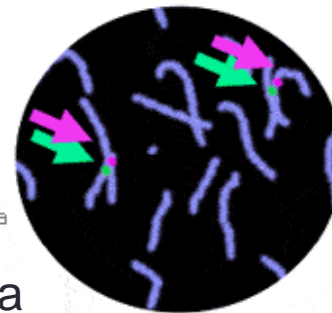


La **HIBRIDACIÓN** tiene lugar entre la sonda y el ADN cromosómico complementario

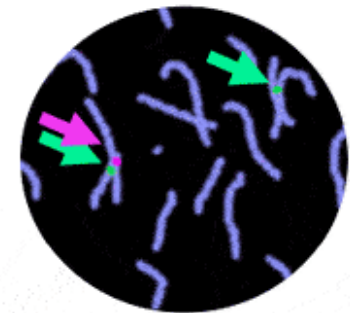
Las **SEÑALES FLUORESCENTES** indican la presencia de ADN cromosómico complementario

Señal verde:
control normal

Señal rosa:
región cromosómica de interés

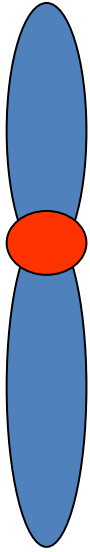


Control normal:
Dos señales verdes
Dos señales rosa

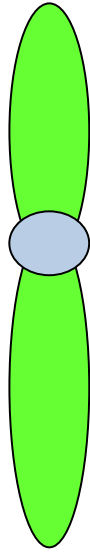
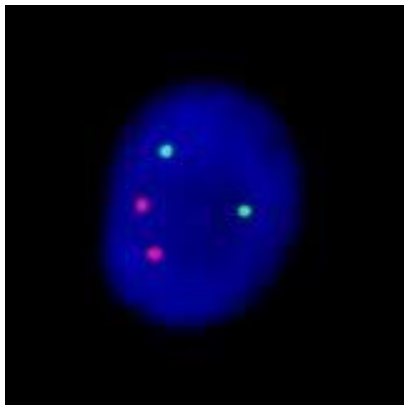


Paciente con delección:
Dos señales verdes
Una señal rosa

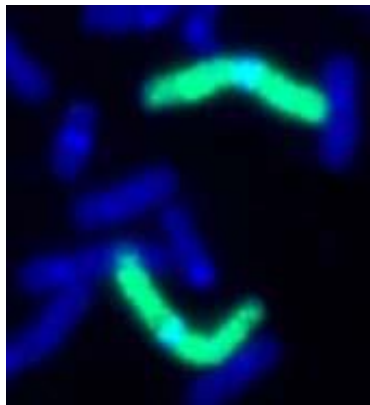
TIPOS DE SONDAS FISH



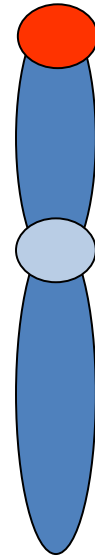
Centromérica



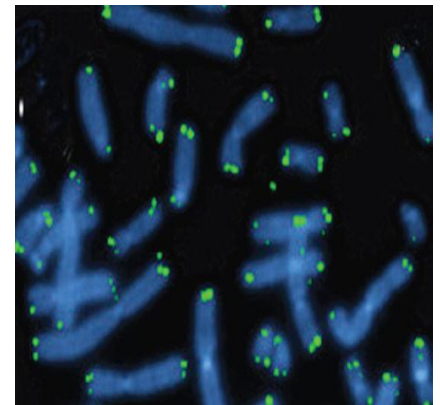
Painting



Secuencia única



Telomérica



DIAGNÓSTICO SÍNDROMES MICRODELECIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

Sonda específica

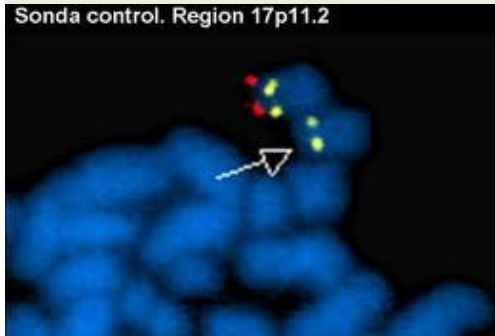


Sonda marcadora

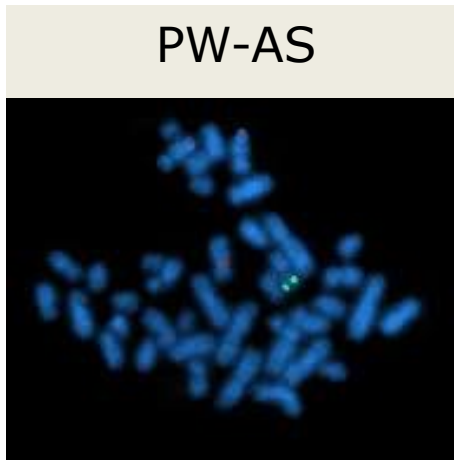


Miller Dieker

Sonda control. Region 17p11.2



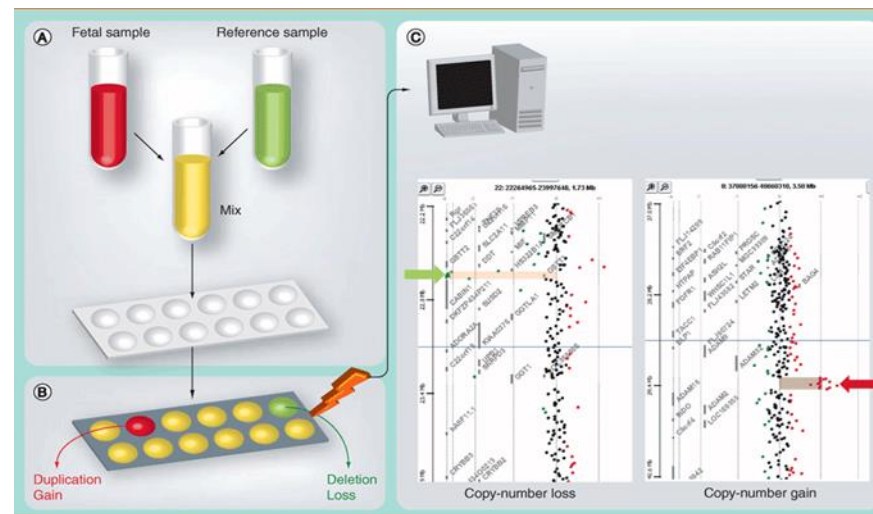
PW-AS



CATCH22

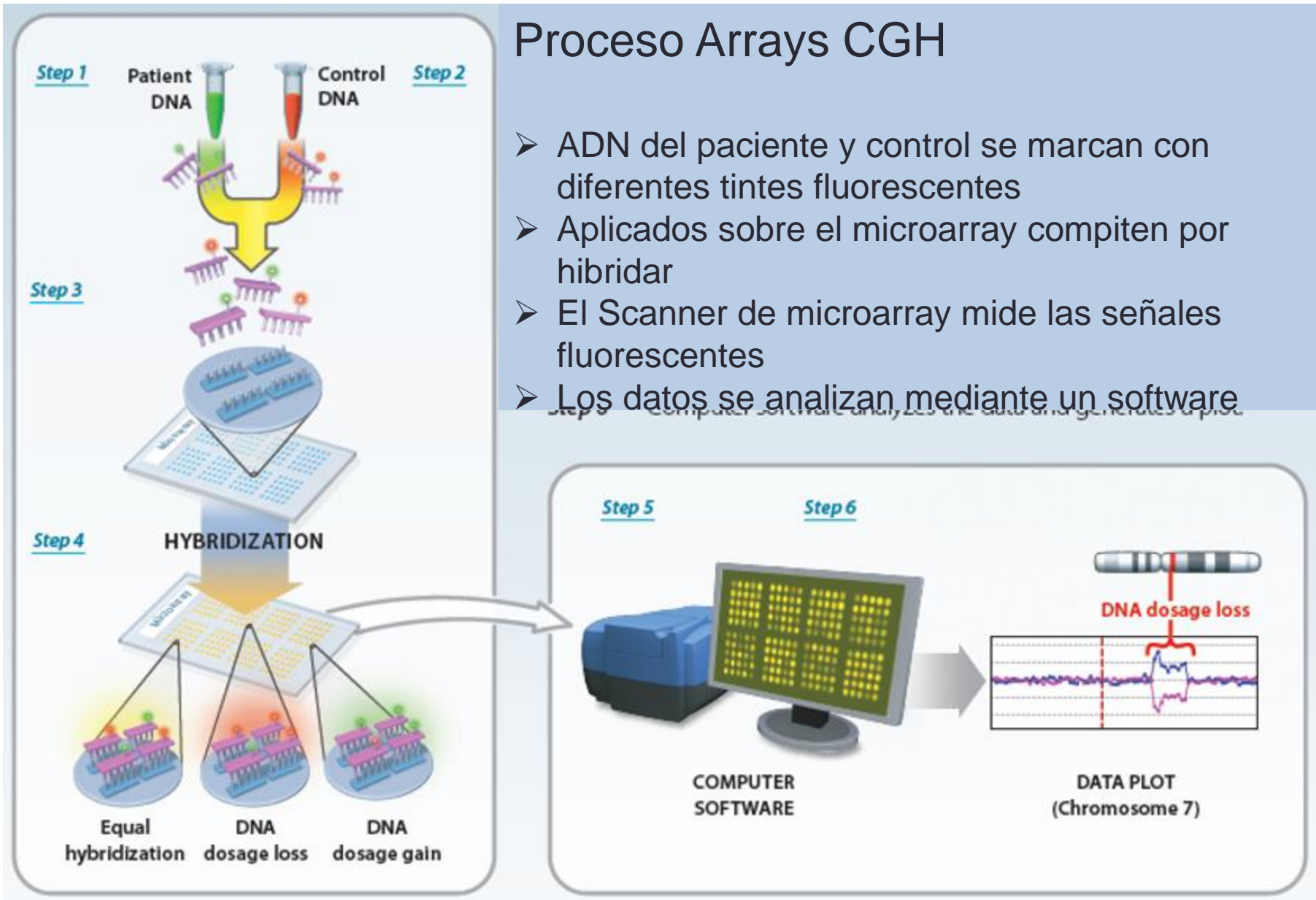
CGH array

- Al igual que el **cariotipo**, estudia globalmente el genoma.
- Tiene más resolución que el cariotipo
 - *Cariotipo molecular*
- No necesita cultivo
- Alta especificidad y sensibilidad



Proceso Arrays CGH

- ADN del paciente y control se marcan con diferentes tintes fluorescentes
- Aplicados sobre el microarray compiten por hibridar
- El Scanner de microarray mide las señales fluorescentes
- Los datos se analizan mediante un software



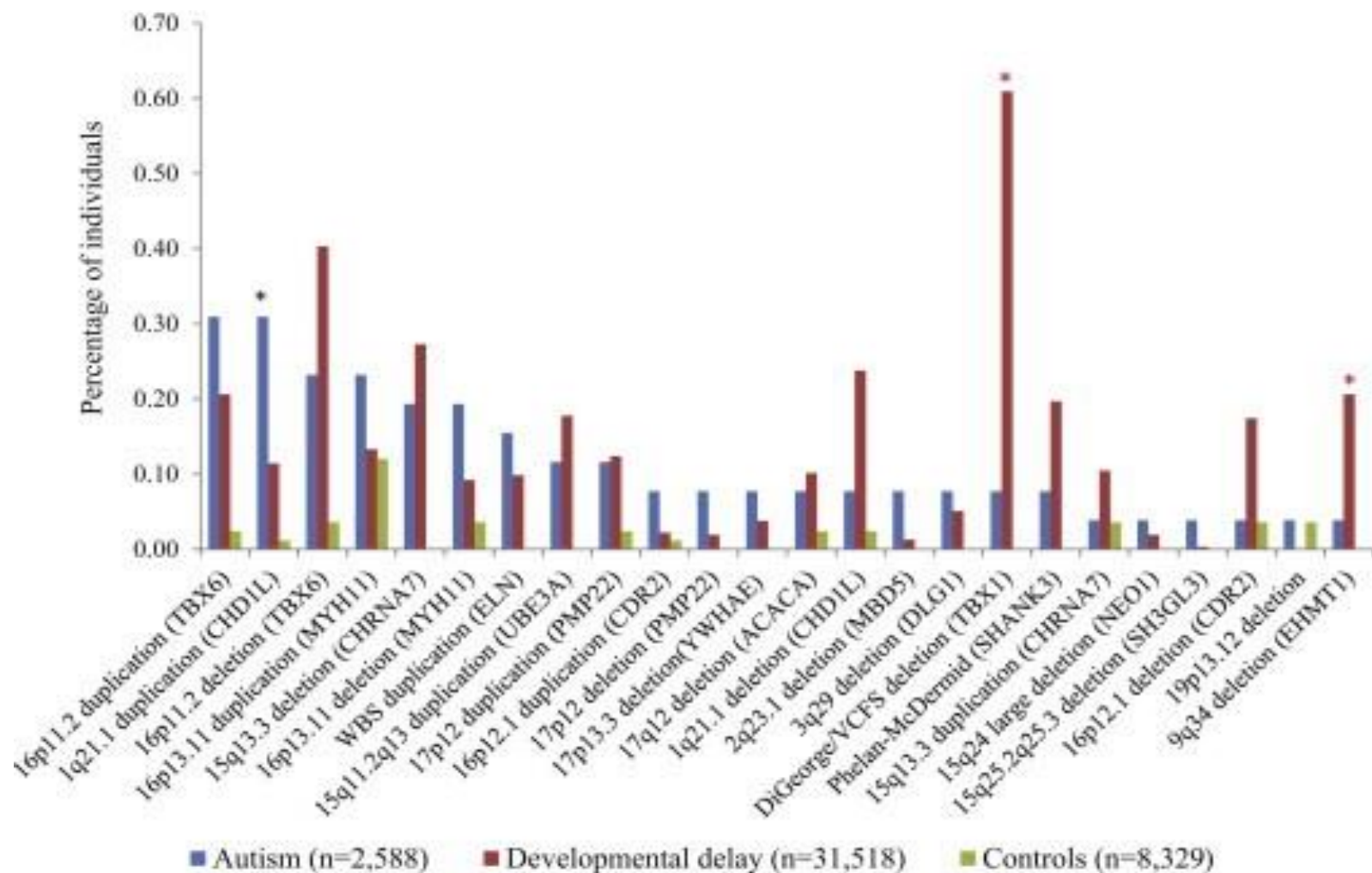
LIMITACIONES aCGH

SOLO DETECTA GANANCIAS Y PÉRDIDAS.

NO DETECTA:

- mutaciones puntuales
- translocaciones equilibradas
- inversiones equilibradas
- duplicaciones o deleciones inferiores al rango de resolución.
- alteraciones presente en mosaico <40%.

 **VOUS (variantes significado incierto)**



Técnica	Aplicaciones	Ventajas	Desventajas
Cariotipo	Identificación cromosomopatías <ul style="list-style-type: none"> • estructurales • numéricas 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Genoma completo 	<ul style="list-style-type: none"> • Resolución limitada • Precisa células en división
FISH	Determina <ul style="list-style-type: none"> • presencia, • nº de copias • localización de secuencias ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad y especificidad • Células en división e interfase 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitada a la secuencia que se investiga
aCGH	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta pérdidas y ganancias de ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Genoma completo • No precisa células en división 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto coste • No detecta reorganizaciones equilibradas ni mosaicos de bajo grado

Citogenética
molecular
Arrays CGH
FISH



Genética Molecular
Secuenciación
NGS

Citogenética clásica
Cariotipo

Genética Molecular
Secuenciación
NGS



Enfermedades monogénicas

- El OMIM (*Online Mendelian inheritance of Man*) base de datos de fenotipos y genes mendelianos
- De muchas pero no todas se conoce base molecular y la descripción del fenotipo.
- Herencia:
 - Autosómica recesiva (necesario que las dos copias de un gen estén alteradas para que se produzca la enfermedad),
 - Autosómica dominante (el fenotipo aparece con solo una de las dos copias del gen alterada)
 - Ligada al cromosoma X (dominante, recesiva o intermedia)

OMIM Entry Statistics

Number of Entries in OMIM (Updated May 8th, 2018) :

MIM Number Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
Gene description *	15,067	729	49	35	15,880
Gene and phenotype, combined +	66	0	0	2	68
Phenotype description, molecular basis known #	4,877	325	4	31	5,237
Phenotype description or locus, molecular basis unknown %	1,455	124	5	0	1,584
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,660	105	2	0	1,767
Totals	23,125	1,283	60	68	24,536

*: La entrada corresponde a un gen.

#: Se describe un fenotipo que, normalmente, está representado por más de un locus.

+: Se conocen la secuencia y le fenotipo del gen.

%: La entrada describe un fenotipo del cual no se conoce la base molecular.

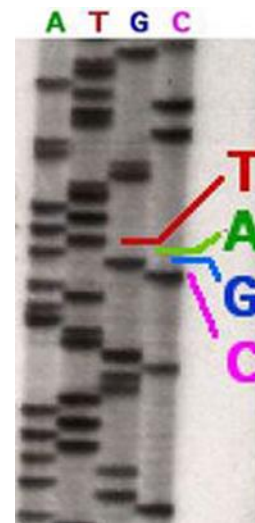


Genética molecular

Secuenciación SANGER

Permite conocer el orden en que se presentan los nucleótidos en el ADN

```
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCT
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTG
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGC
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCA
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAG
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAGG
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAGGT
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAGGTG
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAGGTGG
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAGGTGGG
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAGGTGGGG
PRIMERCTGTCCCTGTTTCCTGCAGGTGGGGA
```



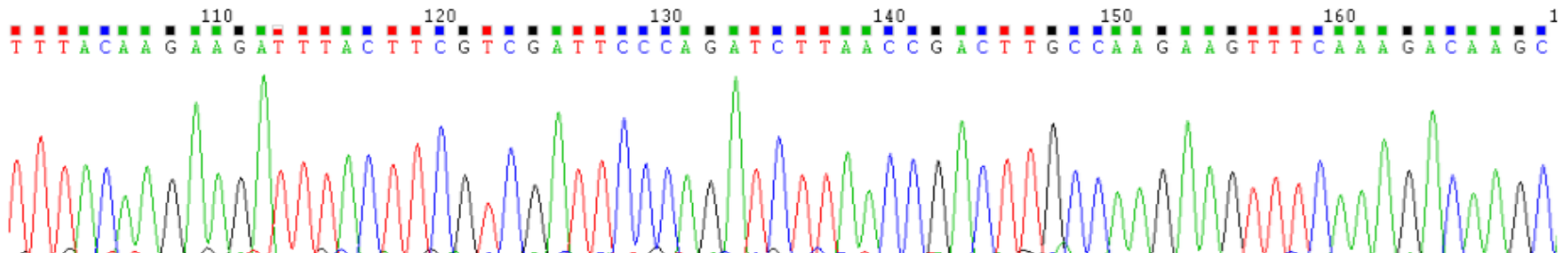
Genética molecular

Electroforesis capilar

Utilizada para llevar a cabo la secuenciación del genoma humano planteado en el Proyecto Genoma Humano (1985-2003)

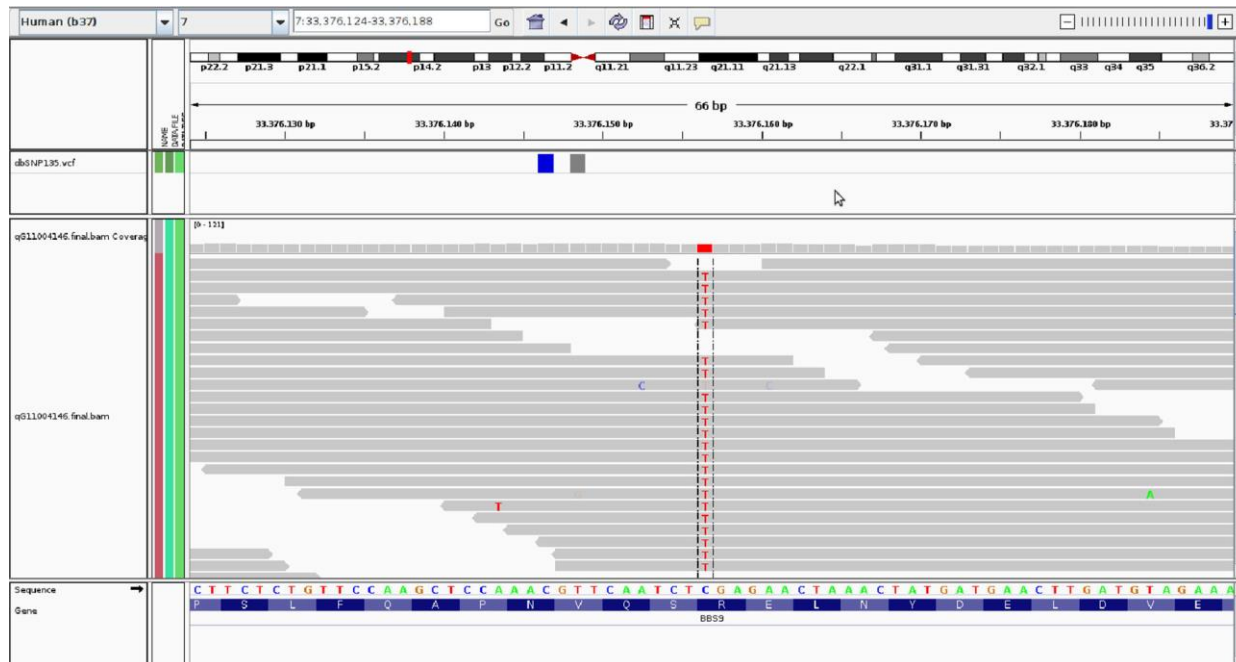
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G G
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G G T
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G G T G
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G G T G G
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G G T G G G
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G G T G G G G
PRIMER CTGTC C C C T G T T T C C T G C A G G T G G G G A

Electroforesis capilar



SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)

- Se obtienen múltiples secuencias cortas (100 pb) de un modo paralelo, produciendo millones de lecturas al mismo tiempo y un coste muy bajo
- Una vez ensambladas estas secuencias se confrontan a un genoma de referencia.



Aplicaciones secuenciación masiva

Estudio de genomas completos,

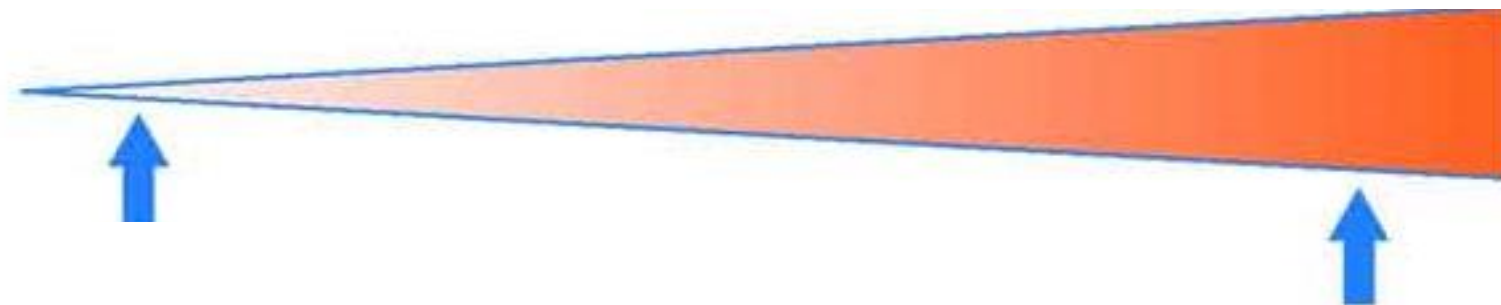
Estudio de exomas o regiones codificantes de todo el genoma,

Paneles de genes implicados en el desarrollo de patologías raras y/o cánceres (targeted sequencing),



Posibles resultados de los test genéticos

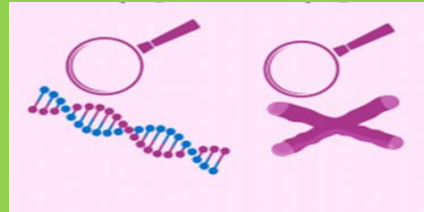
No mutación ---- Benigna ---- Probablemente benigna ---- VOUS ---- Probablemente patológica ---- Patológica



Menor → UTILIDAD CLÍNICA → Mayor

El diagnóstico genético correcto.

- Historia clínica exhaustiva
- Historia familiar detallada: árbol familiar
- Exploración física completa y detallada, deberá incluir medidas antropométricas y toma de fotografías
- En el caso de que afecten a sistemas u órganos específicos consulta especializada.
- Estudios complementarios (Imagen, bioquímicos u hormonales)
- Estudios genéticos específicos, citogenéticos o moleculares.



En un 40-50% de los casos estudiados no es posible llegar a un diagnóstico genético específico

▶ ¿ Cómo contactar?

- ▶ Buzón de citas para la consulta
 - Volante de petición habitual
 - Solicitud electrónica (Selene / Millenium)
 - Teléfono de contacto con Administración Genética Teléfono Hospital: 985108000
 - **Extensión 37491**
- ▶ Comentar un caso con Genética Clínica
 - Teléfono directo 985667126
 - **Extensión 38820**
- ▶ Correo electrónico
 - Envío de pruebas complementarias, informes, historias ...
 - genetica.gae4@sespa.es

