

Análisis genómico global en el Síndrome de invdup(15) [idic(15) syndrome]: evaluación de la dosis genómica mediante microarrays personalizados de SNPs y estudio de genes candidatos del fenotipo.

Dres. Julián Nevado- Elena Mansilla & Pablo Lapunzina

INGEMM- Instituto de Genética Médica y Molecular

Hospital Universitario La Paz

CIBERER, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras

Paseo de la Castellana 261

28046- Madrid

19 de Diciembre de 2016



RESUMEN

El síndrome de duplicación invertida del cromosoma 15 [invdup(15)] es una rara anomalía cromosómica caracterizada clínicamente por una discapacidad intelectual de grado variable, un retraso del desarrollo (psicomotor y del desarrollo del habla), hipotonía con tendencia a desarrollar hipertonia progresiva, anomalías faciales menores, epilepsia y conductas autistas. Se han descrito unos pocos casos en nuestro país, probablemente por subdiagnóstico de la mayoría de ellos. Se estima una prevalencia aproximada de 1/25.000 a 1/30.000 nacimientos. Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen retraso del desarrollo, déficit cognitivo de grado leve a grave, ausencia o retraso del habla y lenguaje expresivos e hipotonía, epilepsia, trastorno de espectro autista que contribuyen a un retraso psicomotor moderado a grave. Un porcentaje alto de individuos con [invdup(15)] presentan un grado de trastorno del espectro autista que varía ampliamente entre ellos, de leve a grave. La dismorfia facial, más evidente en la infancia, es sutil y no es característica. Ocasionalmente se han descrito: defectos cardíacos, anomalías oculares y del sistema urinario, paladar hendido, desarrollo dental anómalo, así como anomalías en las extremidades y caderas dislocadas.

El objetivo principal de este PI es abordar los reordenamientos genómicos aplicando tecnologías pangenómicas (arrays de 1,000,000 SNPs) para la caracterización de la duplicación y delección en todos los pacientes con diagnóstico de [invdup(15)] enviados desde la Fundación de España. Siguiendo el modelo que ya hemos aplicado en el INGEMM para otras enfermedades (ej: Síndrome de Dravet; <http://www.dravetfoundation.eu/es>) este proyecto sería potencialmente ampliable a cualquier paciente con este diagnóstico de cualquier parte del mundo. El estudio también permitirá la detección de ganancias y pérdidas cromosómicas en todas las regiones del genoma y para el abordaje masivo de alteraciones genéticas no diagnosticadas a través del cariotipo y/o el FISH.

El uso de un array específico que combina una cobertura genómica completa y una alta densidad de sondas en los genes/loci implicados en [invdup(15)] permitirá la detección de alteraciones crípticas en estos pacientes y la identificación de nuevas regiones, genes o *loci* candidatos.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

El síndrome de duplicación invertida del cromosoma 15 [invdup(15)] es una rara anomalía cromosómica caracterizada clínicamente por una discapacidad intelectual de grado variable, un retraso del desarrollo (psicomotor y del desarrollo del habla), hipotonía con tendencia a desarrollar hipertonía progresiva, anomalías faciales menores, epilepsia y trastorno del espectro autista. Se han descrito unos pocos casos en nuestro país, probablemente por subdiagnóstico de la mayoría de ellos. Se estima una prevalencia de 1/25.000 a 1/30.000 nacimientos.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen retraso del desarrollo, déficit cognitivo de grado leve a grave, ausencia o retraso del habla y lenguaje expresivos e hipotonía, que contribuyen a un retraso psicomotor moderado-grave. La mayoría de niños con [invdup(15)] son descritos como afables, sociables y comunicativos (no verbales), pero algunos pueden mostrar déficit de atención, agresividad, impulsividad e hiperactividad. Entre el 30% y el 50% de individuos con [invdup(15)] presentan un grado de trastorno del espectro autista que varía ampliamente entre ellos, de leve a grave.

La dismorfia facial, más evidente en la infancia, es sutil y no característica. Los adultos con [invdup(15)] presentan una talla normal o ligeramente baja y tienen tendencia a desarrollar hipertonía progresiva, contracturas articulares y escoliosis. Ocasionalmente se han descrito: defectos cardíacos, anomalías oculares y del sistema urinario, paladar hendido, desarrollo dental anómalo, así como anomalías en las extremidades y caderas dislocadas.

El diagnóstico se basa en los signos clínicos y en el análisis cromosómico. Las técnicas moleculares deben usarse para la caracterización genética de la delección (FISH, MLPA, array CGH). El diagnóstico diferencial incluye otros déficits intelectuales con anomalías congénitas múltiples como otras anomalías cromosómicas, en particular aquellas que presentan epilepsia y trastorno del espectro autista. El diagnóstico prenatal se basa en el análisis citogenéticos tras amniocentesis o biopsia corial. En las familias con un afectado, se recomienda consejo genético. Los reordenamientos [invdup(15)] ocurren de novo. Sin embargo, los progenitores pueden portar como variante una inversión común que afecte al región 15q que, en raras ocasiones, puede conducir al reordenamiento [invdup(15)] en su descendencia. No existe un tratamiento médico específico. Se recomienda la fisioterapia desde una edad temprana, así como terapia ocupacional y logopedia. Algunos pacientes se benefician de la terapia musical. No se observan complicaciones ortopédicas graves. Sin embargo, es preciso un seguimiento regular. No existen datos en relación a la esperanza de vida. La mayoría de individuos

[invdup(15)] necesitarán atención a tiempo completo a lo largo de su vida. La epilepsia puede requerir tratamiento de por vida y varía de evolución con la edad.

Las alteraciones genómicas y el reordenamiento [invdup(15)]. Las alteraciones genómicas tales como las duplicaciones, inversiones y translocaciones son los responsables de del Síndrome de [invdup(15)] debido a la supresión o activación de genes que intervienen en el desarrollo pre y postnatal. El principal problema es que la investigación sobre este Síndrome es escasa y no se conoce exactamente cual o cuales son los genes responsables de las características clínicas de los pacientes.

La tecnología de microarrays. Los microarrays basados en la hibridación genómica comparada (CGH array: aCGH) son una técnica relativamente nueva que se emplea para el análisis del genoma en búsqueda de ganancias y pérdidas de material cromosómico. Este método tiene una resolución y un rendimiento clínico mayor que técnicas de citogenética clásica. Los aCGH han demostrando ser una herramienta muy útil en la detección de desequilibrios cromosómicos en una amplia gama de trastornos, como retraso mental, anomalías congénitas múltiples, autismo y otros [15]. **Hay por lo menos tres clases de arrays de ADN:** **BACs** (cromosomas artificiales de bacterias), de **oligonucleótidos** y de **SNPs** (polimorfismo de un único nucleótido). Los arrays de BACs contienen ADN aislado a partir de clones que varían en tamaño desde 150 hasta 200 kb. Son muy sensibles y los resultados obtenidos se pueden validar fácilmente con hibridación in situ fluorescente (FISH). Sin embargo, la producción de BACs necesita una gran mano de obra y la resolución de estos arrays es limitada [15]. Los arrays de oligonucleótidos están compuestos de miles del oligos de 50-60 bases que ofrecen una mayor cobertura del genoma. Por otro lado, los arrays de SNP se basan en la localización de cientos de miles a millones de SNPs para proporcionar una resolución extremadamente alta de todo el genoma que permite no sólo la detección de número de copias, sino también la pérdida de heterocigosidad debido a la homocigosidad de los SNPs (disomía uniparental, UPD) [15] ó por haploinsuficiencia por deleciones. En función del diseño del array estos pueden ser “dirigidos” si se seleccionan BACs, oligos o SNPs para estudiar exclusivamente *loci* implicados en patologías conocidas. Este tipo de arrays reduce la probabilidad de detectar variantes de número de copias o CNVs (Copy Number Variants) de significado incierto, pero también minimiza la posibilidad de descubrir alteraciones no descritas previamente. Por el contrario los arrays genómicos comercialmente disponibles cubren todo el genoma y por tanto son más adecuados para

la identificación de nuevas alteraciones relacionadas con una patología en concreto, pero detectan CNVs con mayor frecuencia.

En este proyecto nos proponemos utilizar la tecnología de arrays de SNPs, que es la que tiene mayor poder de discriminación en los aspectos de pérdidas y ganancias de material genético, tal como ocurre en el Síndrome de [invdup(15)].

Nuestras investigaciones previas en esta patología nos han permitido abordar el estudio de esta enfermedad en 13 pacientes (de Torres y col., 2014, aún sin publicación). Por otra parte tenemos experiencia previa en varios **proyectos de investigación anteriores y siguiendo en la misma línea de trabajo de los reordenamientos genómicos en estas patologías.**

En este PI **pretendemos aplicar tecnologías genómicas (microarrays de dosis de SNPs)** para la detección de las ganancias y pérdidas cromosómicas en todos los pacientes disponibles con diagnóstico de [invdup(15)].

REFERENCIAS

- 1: Tu XD, Cong XW, Zeng J, Zheng DZ, Yan AZ, Lin YH, Qiu LP, Zhang M, Zhong F, Lan F. [Analysis of small supernumerary marker chromosome 15q11 in four infertile males]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2013 Oct;30(5):539-43. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2013.05.007. Chinese. PubMed PMID: 24078566.
- 2: Rossi E, Giorda R, Bonaglia MC, Candia SD, Grechi E, Franzese A, Soli F, Rivieri F, Patricelli MG, Saccilotto D, Bonfante A, Giglio S, Beri S, Rocchi M, Zuffardi O. De novo unbalanced translocations in Prader-Willi and Angelman syndrome might be the reciprocal product of inv dup(15)s. *PLoS One*. 2012;7(6):e39180. doi: 10.1371/journal.pone.0039180. Epub 2012 Jun 14. PubMed PMID: 22720067; PubMed Central PMCID: PMC3375265.
- 3: Kraoua L, Chaabouni M, Ewers E, Chelly I, Ouertani I, Ben Jemaa L, Maazoul F, Liehr T, Chaabouni H. Hexasomy of the Prader-Willi/Angelman critical region, including the OCA2 gene, in a patient with pigmentary dysplasia: case report. *Eur J Med Genet*. 2011 Jul-Aug;54(4):e446-50. doi: 10.1016/j.ejmg.2011.04.007. Epub 2011 May 6. PubMed PMID: 21621018.
- 4: Battaglia A. The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Nov 19;3:30. doi: 10.1186/1750-1172-3-30. Review. PubMed PMID: 19019226; PubMed Central PMCID: PMC2613132.
- 5: Valente KD, Freitas A, Fridman C, Varela M, Silva AE, Fett AC, Koiffmann CP. Inv dup (15): is the electroclinical phenotype helpful for this challenging clinical diagnosis? *Clin Neurophysiol*. 2006 Apr;117(4):803-9. Epub 2006 Feb 21. PubMed PMID: 16495142.
- 6: Loitzsch A, Bartsch O. Healthy 12-year-old boy with mosaic inv dup(15)(q13). *Am J Med Genet A*. 2006 Mar 15;140(6):640-3. PubMed PMID: 16470686.
- 7: Battaglia A. The inv dup(15) or idic(15) syndrome: a clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain Dev*. 2005 Aug;27(5):365-9. Epub 2005 Apr 22. Review. PubMed PMID: 16023554.
- 8: Mahjoubi F, Peters GB, Malafiej P, Shalhoub C, Turner A, Daniel A, Hill RJ. An analphoid marker chromosome inv dup(15)(q26.1qter), detected during prenatal diagnosis and characterized via chromosome microdissection. *Cytogenet Genome Res*. 2005;109(4):485-90. PubMed PMID: 15905642.
- 9: Akahoshi K, Spritz RA, Fukai K, Mitsui N, Matsushima K, Ohashi H. Mosaic supernumerary inv dup(15) chromosome with four copies of the P gene in a boy with pigmentary dysplasia. *Am J Med Genet A*. 2004 Apr 30;126A(3):290-2. PubMed PMID: 15054844.
- 10: Chifari R, Guerrini R, Pierluigi M, Cavani S, Sgrò V, Elia M, Canger R, Canevini MP. Mild generalized epilepsy and developmental disorder associated with large inv dup(15). *Epilepsia*. 2002 Sep;43(9):1096-100. PubMed PMID: 12199736.

11: Dawson AJ, Mogk R, Rothenmund H, Bridge PJ. Paternal origin of a small, class I inv dup(15). *Am J Med Genet.* 2002 Feb 1;107(4):334-6. PubMed PMID: 11840492.

12: Shim SH, Lee CH, Park YJ, Lee HJ, Park WI, Cho YH. Two inv dup(15) chromosomes in a woman with repeated abortions. *Am J Med Genet.* 2001 Dec 15;104(4):303-6. Review. PubMed PMID: 11754065.

13: Cockwell AE, Dávalos IP, Rivera HR, Crolla JA. FISH characterisation of dynamic mosaicism involving an inv dup(15) in a patient with mental retardation. *Am J Med Genet.* 2001 Nov 1;103(4):289-94. PubMed PMID: 11746008.

14: Torrisi L, Sangiorgi E, Russo L, Gurrieri F. Rearrangements of chromosome 15 in epilepsy. *Am J Med Genet.* 2001 Summer;106(2):125-8. PubMed PMID: 11579432.

15: Grosso S, Balestri P, Anichini C, Bartalini G, Pucci L, Morgese G, Berardi R. Pubertal disorders in inv dup(15) syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2001 Jun;15(3):165-9. PubMed PMID: 11447726.

16: Borgatti R, Piccinelli P, Passoni D, Dalprà L, Miozzo M, Micheli R, Gagliardi C, Balottin U. Relationship between clinical and genetic features in "inverted duplicated chromosome 15" patients. *Pediatr Neurol.* 2001 Feb;24(2):111-6. PubMed PMID: 11275459.

17: Buoni S, Sorrentino L, Farnetani MA, Pucci L, Fois A. The syndrome of inv dup (15): clinical, electroencephalographic, and imaging findings. *J Child Neurol.* 2000 Jun;15(6):380-5. PubMed PMID: 10868780.

18: Takeda Y, Baba A, Nakamura F, Ito M, Honma H, Koyama T. Symptomatic generalized epilepsy associated with an inverted duplication of chromosome 15. *Seizure.* 2000 Mar;9(2):145-50. PubMed PMID: 10845741.

19: Wandstrat AE, Leana-Cox J, Jenkins L, Schwartz S. Molecular cytogenetic evidence for a common breakpoint in the largest inverted duplications of chromosome 15. *Am J Hum Genet.* 1998 Apr;62(4):925-36. PubMed PMID: 9529335; PubMed Central PMCID: PMC1377019.

20: Long FL, Duckett DP, Billam LJ, Williams DK, Crolla JA. Triplication of 15q11-q13 with inv dup(15) in a female with developmental delay. *J Med Genet.* 1998 May;35(5):425-8. PubMed PMID: 9610809; PubMed Central PMCID: PMC1051320.

21: Webb T, Hardy CA, King M, Watkiss E, Mitchell C, Cole T. A clinical, cytogenetic and molecular study of ten probands with supernumerary inv dup (15) marker chromosomes. *Clin Genet.* 1998 Jan;53(1):34-43. PubMed PMID: 9550359.

22: Hou JW, Wang TR. Unusual features in children with inv dup(15) supernumerary marker: a study of genotype-phenotype correlation in Taiwan. *Eur J Pediatr.* 1998 Feb;157(2):122-7. PubMed PMID: 9504785.

23: Battaglia A, Gurrieri F, Bertini E, Bellacosa A, Pomponi MG, Paravatou-Petsotas M, Mazza S, Neri G. The inv dup(15) syndrome: a clinically recognizable syndrome with altered behavior, mental retardation, and epilepsy. *Neurology*. 1997 Apr;48(4):1081-6. PubMed PMID: 9109904

HIPOTESIS

A. Reordenamientos genómicos complejos patogénicos están presentes en pacientes con Síndrome de [invdup(15)]. Éstos, pueden ser diagnosticados por medio de herramientas de diagnóstico genómico, como los SNParrays. El uso de un array de SNPs personalizado diseñado específicamente para este trastorno aumentará el poder de detección/diagnóstico de nuevos reordenamientos genómicos y de otros previamente conocidos, UPDs y la detección de pérdida de heterocigosidad (LOH) en un porcentaje de pacientes con este diagnóstico.

Esta hipótesis está sustentada sobre las siguientes observaciones: a) el hallazgo reciente en la literatura de algunos pacientes con [invdup(15)] con alteraciones citogenéticas y reordenamientos genómicos no detectadas por los métodos tradicionales, no esperadas y nuevas; b) la mejor calidad y capacidad de diagnóstico y discriminación de los SNParray en comparación con las técnicas citogenéticas clásicas, el FISH, el MLPA y los estudios moleculares clásicos (Southern blot, microsatélites, QF-PCR, etc.), c) la posibilidad de estudio de dosis de la totalidad del genoma en un único ensayo mediante SNParrays y el análisis de todos los genes y de las vías metabólicas de los reordenamientos genómicos distintos que puedan detectarse en los pacientes; y d) el incremento importantísimo en los últimos 2 años del uso de tecnologías genómicas para la optimización del análisis multigénico para investigación y asistencia.

OBJETIVOS

El **objetivo de este proyecto es A) diseñar y aplicar un formato de microarray de entre 850.000 y 1.000.000 SNPs**: para el diagnóstico de anomalías y reordenamientos crípticos (alteraciones de la dosis: microdeleciones, microduplicaciones, etc.), contribución alélica parental (bloques de homocigosidad, UPD) en pacientes con [invdup(15)]. ***Para ello se propone la consecución de las siguientes acciones concretas:***

1. **Implementar el SNParray, con el objeto de identificar las alteraciones genómicas crípticas** (microdeleciones, microduplicaciones o grandes reordenamientos cromosómicos, disomías uniparentales parciales o totales, bloques de homocigosidad) mediante técnica de arrays genómicos combinados de oligonucleótidos y SNPs (array-CGH) en una serie de pacientes con [invdup(15)].

METODOLOGÍA

Lugar de realización del Trabajo: Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz de Madrid, España.

Pacientes y muestras biológicas. Los pacientes seleccionados para este estudio serán pacientes con [invdup(15)] con muestras ya disponibles y todo paciente con este diagnóstico de cualquier parte del país (y eventualmente del mundo), enviado a través de la Fundación de afectados.

Diseño del microarray. Se utilizará un array de SNPs de entre 800.000 y 1.000.000 de SNPs. En dicho formato se incluirán todas las regiones cromosómicas y todos los genes conocidos hasta la fecha. Estas regiones estarán enriquecidas de forma tal que se puedan discriminar reordenamientos (microduplicaciones y microdeleciones) pequeños con muy buena sensibilidad. Este array además tendrá suficiente representación de todo el genoma (*backbone*) para sospechar reordenamientos en *loci* previamente no conocidos. El equipo del INGEMM ya tiene experiencia en el diseño de arrays personalizados específicos, su validación y su uso en clínica, diagnóstico e investigación. **En los últimos 3 años se han diseñado y validado varias versiones de KaryoArray®.** El KaryoArray® es un array de diseño de 60,000 oligonucleótidos diseñado específicamente para más de 350 enfermedades genéticas, deleciones subteloméricas, de las regiones centroméricas para detectar marcadores, de las regiones de los síndromes de microdeleción y microduplicación conocidos y clásicos (Smith-Magenis, Williams, Charcot-Marie-Tooth, etc.) y de los nuevos síndromes de microdeleción (17q21.31, 15q13.3, 16p11.2, 15q24, 1q41q42, 2p15p16.1, 9q22.3 y 4q21, entre otros). El KaryoArray® ha sido registrado como marca y nombre en Europa y Estados Unidos por el INGEMM a través de la FIBHULP (Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz) (<http://www.trademarkia.com/karyoarray-79078751.html>) y está siendo utilizado en el INGEMM con excelentes resultados. El grupo del INGEMM ha diseñado también otros arrays personalizados, tales como un array específico para la región terminal del cromosoma 22 (22qter), de la región terminal de 9q y 1q, uno para la región del Síndrome de Sotos, Osteogénesis imperfecta, de la región 8q21 y uno para la región del Síndrome de Pelizaeus-Mersbacher. Junto con el grupo de Citogenética del Hospital de Badajoz (Dra. I. Vallcorba) hemos trabajado en el diseño de un microarray para diagnóstico de reordenamientos en pacientes con leucemias (OncoHematoArray), en colaboración con el grupo de la Dra. Magdalena

Ugarte (Dras. Belen Pérez y Lourdes Ruiz) de la UAM uno para el estudio de los pacientes con alteraciones metabólicas (MetabolArray) y en colaboración con el grupo de la Dra. C Ayuso de la FJD una microarray específico para el estudio de la región del Síndrome WAGR (WAGRArray). También hemos diseñado un formato específico para Oncología Infantil junto con colaboradores de 8 hospitales de España, que analiza 955 genes implicados en cáncer (OncoArray), y que fuera presentado recientemente a la convocatoria de PI de la AECC. Por otra parte, en 2010 hemos obtenido con el grupo del ECLAMC de Argentina/Brasil un PI internancional del Ministerio de Ciencia e Innovación para el diseño y aplicación de un array personalizado para las patologías con fisuras orales (labio leporino/paladar hendido; denominado CleftArray), que consta de 384 genes distintos en un formato de 180,000 x 4 (*MICINN PIB2010 AR-00345*).

Para la validación del array y similarmente a lo que hemos hecho con otros formatos de microarrays dirigidos, primero se diseñará una versión 1 con los genes y regiones de interés ya seleccionados, luego se procederá a su impresión en formato de porta y se procederá a su prueba o validación con un grupo de controles (10 muestras patológicas y 10 controles) a semejanza de lo realizado previamente con otros formatos. En resumen, el proceso de validación y análisis incluye: a) selección de las muestras a partir de una amplia gama de trastornos genómicos ya conocidos en pacientes con [invdup(15)] para poner a prueba esta herramienta de una manera ciega (un mínimo de 20 muestras normales y 10 muestras patológicas previamente diagnosticadas con otros métodos) b) Eliminar CNVs sin significado clínico tras el análisis de la primera versión; c) Validar supuestos nuevos hallazgos con otras técnicas moleculares como FISH, MLPA y qPCR, d) Elaborar nuestra propia base de CNV en nuestra población; e) implementar la herramienta a medida en nuestro análisis genético de [invdup(15)] en los pacientes elegidos, en lo que será la versión 2 del array, luego de la corrección de sondas que puedan mostrar errores de hibridación o desviaciones de la normalidad, o cualquier otro problema. Para el desarrollo de este paso se valorarán los siguientes indicadores: 1) Diseño y desarrollo de proceso: validación del diseño por el proveedor de servicios del Array; 2) Validación: porcentaje de concordancia en muestras patológicas y no patológicas; parámetros de calidad "QC metrics", nivel de la relación señal/ruido; 3) Proceso de implementación: tasa de detección de desequilibrios genómicos en una cohorte de pacientes con alteraciones conocidas deleción/duplicación establecidos previamente por MLPA, FISH y otros métodos.

Validación de los resultados de arrays. Para validar las anomalías en desbalance detectadas mediante arrayCGH se llevarán a cabo otros análisis de seguimiento. Para la confirmación de deleciones y/o duplicaciones (mayores de 3 Mb) detectadas en el estudio

de arrays de SNPs, se emplearán técnicas de FISH con marcaje de los BACs correspondientes, PCR cuantitativa ó MLPA de diseño propio. En el caso de duplicaciones de tamaño inferior a las 3 Mb se optará por realizar estudios moleculares con qPCR o MLPA, pues la resolución de los microscopios de fluorescencia impide que sean capaces de separar las señales derivadas de una duplicación. Dado que tanto deleciones como duplicaciones pueden resultar de la segregación en desbalance de una inserción balanceada en uno de los padres, se realizará FISH en metafases de los padres para excluir translocaciones teloméricas, inserciones o inversiones en los progenitores, cuando corresponda. La alta densidad y cobertura genómica alcanzada por esta plataforma de 1,000,000 SNPs nos permitirá mapear los puntos de rotura en los pacientes en los que se detecten alteraciones. Nuestro grupo tiene experiencia en el uso de arrays customizados, que, cuando bien diseñados, han demostrado que son superiores a los arrays comerciales en la capacidad de detección de anomalías específicas. A los padres de los pacientes con [invdup(15)] se les realizará un estudio de FISH con sondas de la región y si fuera necesarios e les aplicará el array de diseño. Se ofrecerá estudio a todo familiar en riesgo y se podrán hacer estudios prenatales.

Comparación y análisis de los resultados. El análisis de los resultados de microarrays se realizará mediante el uso del programa propio de Illumina. Todos los resultados obtenidos se compararán con las bases de datos internacionales: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>); (<https://decipher.sanger.ac.uk/application/>); (<http://projects.tcag.ca/variation/>), (<http://genome.ucsc.edu/>).

Análisis de correlación clínico-molecular. Se analizarán y correlacionarán los datos clínicos de los pacientes estudiados y su diagnóstico presuntivo o principal con los hallazgos clínicos, citogenéticos y moleculares de los mismos. Se definirá el espectro clínico que cubren las distintas anomalías genómicas identificadas. Se elaborarán listas de criterios consensuados que detallen la caracterización fenotípica en grupos de pacientes con reordenamientos previamente no identificados y que permitan más adelante el reconocimiento de pacientes candidatos a sufrir reordenamientos similares. Para almacenar los datos obtenidos de este estudio se dispondrá de las aplicaciones informáticas de uso habitual por nuestro grupo (Decipher, DGV, etc.).

Infraestructura y equipamiento específica: Para la realización de este proyecto, el INGEMM del Hospital Universitario La Paz de Madrid cuenta con 3 scanners de arrays, así como toda la infraestructura para el marcaje, hibridación, análisis y validación de microarrays. Este equipamiento específico es: escáner alta resolución con una gran

capacidad para realizar el análisis de los microarrays de alta densidad. Su resolución es desde 10 hasta 2 micras, permitiendo el escaneado de los nuevos arrays SurePrint G3 arrays, así como los microarrays *Legacy*. El escáner tiene un rango dinámico (XRD), que permite la identificación de señales débiles y previene la saturación de la señal. El procesamiento de datos y el “autofoco dinámico” aporta la claridad y calidad de señal necesarios para el análisis de microarrays. También contamos con un escaner MS 200 Microarray de NimbleGen para arrays de NimbleGen. El MS200 tiene una resolución de 2 micras y una sensibilidad incrementada para generar datos de alta calidad y resultados muy consistentes. El software SignalMap aporta una mejor visualización de datos desde el MS200. Las posibilidades de automatización del MS200 permiten el desarrollo de investigación genómica de alto rendimiento. El INGEMM cuenta también con tres secuenciadores masivos de nueva generación (MySeq y Next Seq 500).

Comunicación y difusión de resultados. Los resultados de los estudios de arrays y moleculares de NGS encuadrados en este PI serán remitidos a los facultativos responsables de los pacientes con una leyenda explicativa que indique que fueron realizados en el marco de un PI financiado. De ninguna forma se aceptarán muestras para diagnóstico prenatal en hermanos o familiares de pacientes incluidos en el período de tiempo que dure la investigación. Si los resultados permiten ser incorporados en forma directa a la asistencia, al finalizar este PI se intentará la transferencia de experiencia y tecnologías al pool de estudios que se realizan en base diagnóstica en el INGEMM del HULP, previa autorización de Dirección Médica de la Institución.

PLAN DE TRABAJO

Lugar de realización del Trabajo: INGEMM, Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

Primera etapa:

Objetivos: Puesta en marcha del Proyecto.

Tiempo estimado (meses):4-6

Actividad: Reclutamiento de pacientes y familias seleccionados. Evaluación de las genealogías, historias clínico-genéticas completas y extracción de muestras biológicas (sangre) para extracción de DNA, RNA y para cultivos y preparaciones de cromosomas en aquellos pacientes en los que no se hallan obtenido previamente. Desarrollo de los formatos y soportes informáticos iniciales del Proyecto.

Tarea del Investigador Principal: Evaluación pormenorizada de los casos para considerar su inclusión o no. Este es un punto trascendente, debido a que una mala selección de los casos podría conllevar a una evaluación errónea de los resultados obtenidos. Diseño y planificación de los formatos de Recogidas de Datos. Diseño y solicitud del diseño final del array. Llevar la contabilidad y supervisar la distribución de asignaciones de fondos. Monitorizar y coordinar el inicio del funcionamiento de los estudios de microarrays del Proyecto.

Tareas del resto de los Investigadores Asociados: Diseño y planificación de los estudios de microarrays. Evaluación y revisión bibliográfica de las últimas publicaciones para definir el diseño definitivo del SNPArray.

Tareas del Becario: Manejo y procesamiento de las muestras biológicas, extracción de ADN y ARN, cuantificación de los mismos. Inicio de los estudios de microarrays con el formato de diseño específico. Colaboración con el diseño de formatos específicos de recogida de datos clínicos y de laboratorio.

Segunda Etapa:

Objetivos: Realización de estudios de microarrays en pacientes con [invdup(15)] de acuerdo a su diagnóstico presuntivo inicial. Análisis de casos seleccionados de pacientes con fenotipos específicos.

Tiempo estimado (meses): 26-28

Actividad: Realización de estudios de microarrays. Análisis de los resultados mediante el software específico de microarrays. FISH a padres y familiares.

Tarea del Investigador Principal: Evaluación de los resultados. Evaluación de los datos obtenidos y diseño de los estudios de validación. Elaboración de los informes anuales

financiero y científico. Presentación y/o publicación de conclusiones y resultados parciales en congresos y reportes en revistas de impacto.

Tareas del resto del Equipo: Realización de los estudios. Análisis de los datos parciales.

Tareas del Becario: Realización de estudios de microarrays y validación de resultados por otras técnicas.

Tercera etapa:

Objetivos: Análisis final de datos y elaboración de conclusiones. Publicaciones en revistas. Elaboración del informe final.

Tiempo estimado (meses): 4-6

Tarea del Investigador Principal y asociados: Supervisión de los estudios con microarrays. Análisis de los datos que surjan. Elaboración del informe anual, financiero y científico. Publicación de hallazgos, conclusiones y reportes en revistas de impacto.

Búsqueda de financiación para asegurar la continuidad del Proyecto. FISH a padres y familiares.

Tareas del Becario: Colaboración con el análisis final y conclusiones de los estudios con arrays genómicos de oligonucleótidos y de secuenciación masiva. Colaboración y redacción de artículos para la difusión de hallazgos, conclusiones y reportes en revistas de impacto.

EXPERIENCIA DEL GRUPO INVESTIGADOR

El IP de este PI es el Coordinador-Director y uno de los 14 investigadores del INGEMM del Hospital Universitario La Paz de Madrid, creado en 2008 fruto de la fusión de varios Grupos, Servicios y Secciones del Hospital con intereses comunes en las enfermedades de base Genética. Cuenta con varias Secciones y Grupos de investigación (véase más abajo), con un total de 84 personas en el INGEMM a marzo de 2011. El INGEMM es uno (y el más grande) de los 40 grupos de investigación que forman el IdiPAZ, el Instituto de Investigación Sanitaria del HULP. En conjunto, en los últimos 40 años se han visto más de 55.000 pacientes, se ha realizado unos 35.000 estudios citogenéticos postnatales y unos 17.000 estudios citogenéticos prenatales. Actualmente en el INGEMM se realizan unos 40.000 estudios genéticos por año. El valor añadido del INGEMM radica en 1) la participación de diferentes grupos de trabajo pertenecientes a distintas áreas funcionales del HULP; 2) la altísima dotación tecnológica obtenida en los últimos años, lo que le permite abordar estudios genéticos de alta complejidad; 3) la gestión integral de los procesos con la consecuente optimización de costes y procedimientos 4) una cartera de Servicios de Genética muy amplia en estudios genéticos (más de 350); y 5) un grupo de investigadores de gran nivel que ha permitido en los últimos 5 años la publicación de más de 350 artículos en revistas de primer nivel y la concesión de más de 45 proyectos de investigación competitivos.

Nuestro grupo tiene demostrada capacidad de desarrollo e innovación, y acreditada capacidad de diseño de herramientas genómicas ya que ha generado y/o registrado 6 herramientas genómicas de diseño que han finalizado en patentes/marcas registradas, principalmente en el ámbito de la genómica. Entre estos productos podemos destacar KaryoArray® pre y postnatal, MetabolArray®, OverGrowthArray®, OncoHematoArray® y OncoArray®.

En estos últimos 10 años, nuestras aportaciones específicas de investigación en SSC incluyen: 1) Desde el punto de vista nosológico se ha propuesto una clasificación de los SSC que ha sido publicada y es de uso generalizado [1], se han descrito casos y series de pacientes con SSC y tumores [2-7] y se han publicado artículos de revisión editorial por invitación acerca de los riesgos de cáncer en los SSC y sus recomendaciones de seguimiento [1, 2, 8]. Desde el punto de vista clínico también se han publicado grandes series de pacientes con patologías con sobrecrecimiento, pacientes aislados de interés único y recomendaciones de seguimiento clínico [1-5, 7-17]. A nivel de diagnóstico e investigación molecular se han descrito mutaciones nuevas en varias patologías [9-25]. 2) Recientemente, hemos contribuido con la descripción de un nuevo

síndrome previamente no conocido con compromiso vascular y sobrecrecimiento en 6 pacientes [26], la descripción de un mecanismo molecular y biológico muy infrecuente (Disomía uniparental paterna genómica en mosaico) en una mujer con SSC y cáncer [6]. El grupo ha obtenido 6 proyectos de Investigación relacionados con los Síndromes de Sobrecrecimiento (2 FIS, 1 de la Fundación Mutua-Madrileña y 2 Proyectos de la Universidad Autónoma de Madrid, 1 Proyecto de la Marató TV3) y participa actualmente en más de 10 Proyectos de Investigación activos, obtenidos con fondos competitivos otorgados por el FIS, MEC, la Unión Europea, la FMMA, la FIBHULP, la UAM y el CIBERER. Se han establecido colaboraciones estables con el grupo de investigadores de la Unidad de Epigenética del IdiBell (Dres. Monk y Esteller) en relación a temas concretos de metilación genómica, que ha redundado en la publicación de 3 artículos a revistas internacionales [27-29]. La colaboración internacional se ha reflejado en la publicación de un artículo internacional de grupos europeos de estudio de Sobrecrecimiento (Dra. N. Rahman, UK) [10], otro estadounidense (Dr. S. Warren, USA) [14] y otros multinacionales [30-32].

En **el área de Genómica**, el IP y grupo Investigador posee una importante experiencia en las técnicas genómicas y moleculares, que vienen siendo utilizadas en nuestro Instituto desde hace unos años. Concretamente, utilizando abordajes genómicos con arrays de oligos y arrays de SNPs recientemente hemos hallado un nuevo gen (*Osterix*) de una forma recesiva de osteogénesis imperfecta [33]. También hemos contribuido al hallazgo de un nuevo Síndrome de microdelección (del8q21.11) en 8 pacientes con fenotipo similar en los que hemos sido capaces de acotar a un gen (*ZFX4*) como potencial responsable del fenotipo de estos pacientes [34]. El equipo investigador y el IP de este PI ha recibido financiación para Proyectos de Investigación en el campo de la genética a través de proyectos financiados del Fondo de Investigación Sanitaria y Proyectos Europeos, por su actividad en investigación clínica aplicada. En las técnicas de Genética Molecular, el equipo investigador cuenta con experiencia demostrada con publicaciones y cantidad de pacientes estudiados. El Investigador Principal de este PI ha obtenido una Intensificación del FIS-ISCIII para el año 2011 para el 50% de su actividad asistencial pueda ser invertida en Investigación. Nuestro grupo participa como Unidad (U753) del CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras) desde 2008, y colabora activamente con la Mendelian Cytogenetic Network Project (BMH4-CT97-2268) <http://www.mcndb.org>; ECARUCA (Proyecto QLRI-CT-2002-02746; www.ecaruca.net) y participamos como socios activos de las Redes Discerne y Dechipper.

IMPACTO CLINICO ASISTENCIAL Y/O DESAROLLO TECNOLOGICO E IMPACTO BILIOMÉTRICO.

Los resultados del hallazgo de nuevas regiones genómicas y nuevos genes implicados en el Síndrome de [invdup(15)] serían de traslación inmediata para el diagnóstico genético para los profesionales de la Salud, contribuyendo al diagnóstico asistencial de los propios enfermos. Así, la **utilidad de los resultados de este Proyecto de Investigación podrían observarse a distintos niveles.**

1) Asistencial. Por una parte, una vez identificadas las regiones genómicas implicadas en reordenamientos complejos en pacientes con [invdup(15)] (**Objetivo 1**) podrán tal vez extrapolarse a otros genes relacionados con la patología, la identificación de anomalías específicas en estos genes o regiones genómicas podrán dar nuevas perspectivas al conocimiento de estos procesos patológicos. Además, clarificar los mecanismos moleculares mediante estudios genómicos subyacentes en algunos enfermos contribuirá a un conocimiento mayor de la historia natural de esta enfermedad. Por otra parte y en forma adicional, a nivel de los pacientes y su familia, contribuiría con la confirmación diagnóstica a nivel molecular de las patologías de éstos, con la consecuente mejor asistencia, seguimiento y conocimiento de la enfermedad y beneficios directos para el asesoramiento del propósito y su familia ampliada, a la vez que el estudio sistemático en los padres de los pacientes afectos ayudará a proporcionar elementos de conocimiento para estimar riesgos en la familia.

2) Investigación e Innovación tecnológica. La implementación de este PI **colaborará con el desarrollo tecnológico** ya que finalizará en **el diseño de herramientas de investigación (un microarray customizado** directamente trasladables a la asistencia, ya que permitirá en un breve plazo de tiempo y en aquellas patologías en las que es necesario analizar un número importante de genes, cambiar el abordaje del diagnóstico a la captura genómica.

3) Impacto Bibliométrico. Finalmente, creemos que con el historial de nuestro grupo en publicaciones surgidas de proyectos de investigación anteriormente concedidos, **el impacto bibliométrico estaría garantizado**, ya que con la concesión de proyectos anteriores se han publicado muchos artículos científicos.

MEDIOS DISPONIBLES

El Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital Universitario La Paz de Madrid, creado en 2008 fruto de la fusión de varios Grupos, Servicios y Secciones del Hospital con intereses comunes en las enfermedades de base Genética. El **INGEMM cuenta desde febrero de 2011 con 2.135,80 m2 distribuidos en 2 plantas, con 39 laboratorios, 5 consultas, salas de reuniones y seminarios, 2 salas blancas y espacio físico para desarrollar todas las áreas asistenciales y de investigación del INGEMM.** Está organizado en 10 Secciones verticales (Preanalítica, Genética Clínica, Citogenética, Genética Molecular, Diagnóstico Genético Preimplantacional, Genética de las Enfermedades Metabólicas, Genómica Estructural y Funcional, Farmacogenética y Farmacogenómica, Oncogenética Molecular y Endocrinología Molecular) donde se articulan las actividades asistenciales y 6 Secciones horizontales (Administración, Docencia, Gestión, Calidad, Investigación y Supervisión de Enfermería) que vertebran las anteriores Áreas.

El **grupo de investigación en SSC está integrado en la Sección de Endocrinología Molecular** y colabora activamente con todas las Secciones del Instituto, principalmente para el desarrollo de tecnologías genómicas con la Sección de Genómica Estructural y Funcional.

El INGEMM cuenta con 3 secuenciadores automáticos (2 de 16 capilares y uno de 96 capilares y personal facultativo y técnico para su funcionamiento). Se cuenta también con laboratorios de cultivo, áreas de procesamiento de material biológico, cuarto oscuro, áreas de marcaje para radioactividad, termocicladores (37 bloques de placas de 96 pocillos), y material y equipamiento habitual para el desarrollo y aplicación de técnicas de biología molecular.

El **área de Genómica cuenta con 3 scanners de microarrays** (Agilent, CapitalBIO e Illumina), **un spotter (arrayer) y una estación de hibridación automatizada.** Para **secuenciación masiva contamos con tres secuenciadores masivos** (MySeq y Next Seq de Illumina).

JUSTIFICACION DETALLADA

Hemos solicitado en este Proyecto de Investigación la provisión de fondos para la actualización de los cariotipadores y material fungible diverso para los SNParrays.

FUNGIBLES

Se utilizará para poder llevar a cabo este PI reactivos para la realización de arrays.

Se utilizarán arrays en formato Illumina, reactivos de diversa índole APRA citogenética y citogenética molecular. Para los arrays y la validación de resultados de arrays se requieren además reactivos adicionales: columnas de purificación de ácidos nucleídos, soluciones de hibridación, reactivos para secuenciación de fragmentos de DNA, kits de MLPA, material para el marcaje de sondas no comerciales de FISH. Estos son los fungibles y reactivos básicos que se utilizarán en el desarrollo del Proyecto.

CARIOTIPADORES

Se reactualizarán los cariotipadores con softwares y cámaras de captura nueva para poder dar respuesta al proyecto.

PRESUPUESTO SOLICITADO

Actualización de cariotipadores y material necesario de citogenética molecular y citogenética tradicional, incluyendo si fuese necesario contratación de personal para la ejecución del proyecto

32.100 euros

Fungibles

Arrays de SNPs

6.500 euros

(el resto de los fungibles por un valor de 21,000 los proveerá el Hospital Universitario la Paz)

TOTALES

38.600 euros