



MLPA EN EL ESTUDIO DE DESÓRDENES GENÓMICOS

Ramírez J*, Echeverría M*, Mampel A*, Marino M, Gallardo A***, Triguy J*****

Schroh A**, Arce C*, Marzese D*, Calderón E*, Vargas A*;*;*******

* Instituto de Genética. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

** Laboratorio de ADN. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

*** Servicio de Cardiología. Hospital H. Notti. Mendoza

**** Servicio de Inmunología. Hospital H. Notti. Mendoza

***** Centro de Malformaciones Craneofaciales. Hospital Luis Lagomaggiore.

Contacto: j.ramirez@fcm.uncu.edu.ar

RESUMEN

El término de desórdenes genómicos se utiliza para definir aquellas condiciones que surgen por inestabilidad en la molécula de ADN y, que ocasionan, rearrreglos cromosómicos que involucran regiones de uno o varios pares de megabases. Estos rearrreglos determinan la pérdida, ganancia o interrupción de genes cuya expresión fenotípica varía de acuerdo a la cantidad de secuencia codificante presente (dosage- sensitive- genes). Estas anomalías genómicas surgen predominantemente durante eventos de recombinación no alélica entre cromosomas homólogos (NAHR), aunque otros mecanismos también han sido descritos. Los rearrreglos cromosómicos ocurren en puntos de quiebra que concentran regiones inestables de la molécula de ADN como lo son las secuencias repetidas llamadas LCRs (low copy repeats) que sirven como sustrato de recombinación o los sitios palindrómicos ricos en adenina- timina.

Entre los desórdenes originados por alteración en la estructura genómica se cita al síndrome de delección/duplicación 22q11.2, que incluye varios cuadros clínicos con superposición de rasgos fenotípicos. Se estima que la variabilidad clínica en estos pacientes es consecuente con la cantidad de secuencia codificante presente en relación al tamaño de la delección/ duplicación. El advenimiento de nuevas técnicas moleculares permite actualmente determinar con precisión el segmento delecionado/ duplicado. Una nueva metodología conocida como MLPA (multiplex ligation probe amplification) podría discriminar, para este desorden en particular, cambios en el número de copias genómicas responsables de los diferentes fenotipos. Se considera que la técnica de MLPA es una herramienta de diagnóstico complementaria, con una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de desórdenes genómicos, que permite cuantificar microdelecciones/

microduplicaciones no objetivables por otros métodos. Se espera en un futuro que el conocimiento en cuanto a los complejos mecanismos de producción de los diferentes desórdenes genómicos permita definir con claridad la existencia de una relación genotipo- fenotipo que pueda delinear a aquellas entidades con fenotipos intermedios.

Introducción

Tradicionalmente las enfermedades de causa genética ha sido clasificadas categóricamente en cromosómicas (causadas por aberraciones estructurales o numéricas), monogénicas o mendelianas, multifactoriales y de origen mitocondrial. Esta clasificación se modifica cuando a través del uso de técnicas de biología molecular se descubren patologías que surgen de manera esporádica en individuos, asociadas a mecanismos complejos que no coinciden específicamente con los patrones de herencia clásicos. Se cita como ejemplo a las microdeleciones/microduplicaciones submicroscópicas, las enfermedades por repetición de trinucleótidos, las enfermedades de origen epigenético por defectos de la impronta y las patologías asociadas a cambios en el número de copias de secuencia codificante. En cuanto a estas últimas, se ha acordado utilizar el término de desórdenes genómicos como alternativo para delinear a aquellos síndromes que surgen de rearrreglos en la molécula de ADN y que aparecen *de novo* en un grupo familiar o presentan un patrón clásico de herencia mendeliano.¹ El concepto de desórdenes genómicos fue introducido por James Lupski en el año 1998. El término se utiliza para definir aquellas condiciones que surgen por

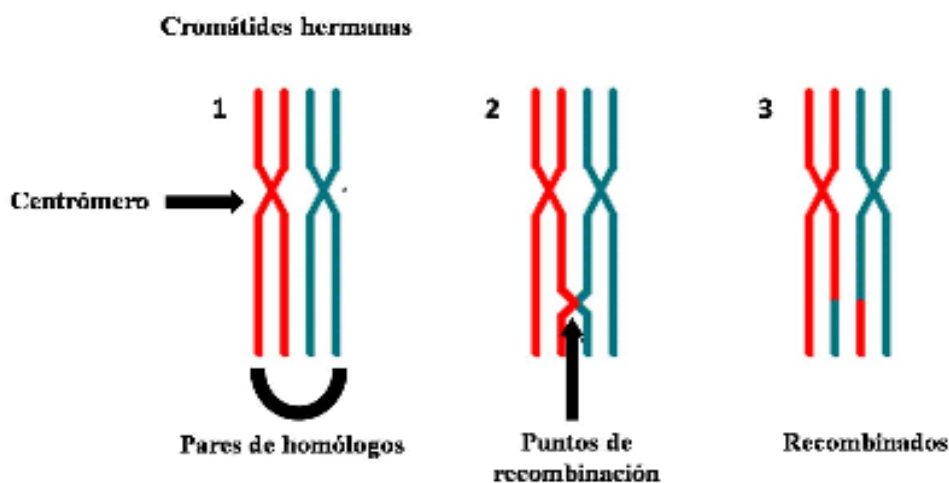


Figura 1. El esquema muestra un evento de recombinación entre cromosomas homólogos. Para que este fenómeno ocurra, los fragmentos que han de ser recombinados deben poseer homología en su secuencia.

inestabilidad en la molécula de ADN y que ocasionan, debido a una compleja estructura genómica, rearrreglos cromosómicos que involucran regiones de uno o varios pares de megabases.² Estos rearrreglos determinan la pérdida, ganancia o disrupción de genes cuya expresión fenotípica varía de acuerdo a la cantidad de secuencia codificante presente (dosage- sensitive- genes).^{3,4} Estas anomalías genómicas surgen predominantemente en eventos de recombinación no alélica entre cromosomas homólogos (NAHR) **Figura 1**. Menos frecuentemente se producen entre cromosomas homólogos (HR) y también mediante la unión de terminaciones no homólogas (NHEJ) presentes en los puntos de quiebra dispersos en el genoma.⁵ Actualmente, los desórdenes genómicos y los eventos NAHR se consideran la principal causa de la mayoría de las enfermedades humanas.³

Comparativamente existen diferencias entre la mayoría de los trastornos de herencia monogénica (también llamados mendelianos) y los de causa genómica, en cuanto al origen y la etapa de producción de los mismos. Generalmente, los desórdenes monogénicos convencionales se deben a mutaciones específicas dentro de un gen y surgen por errores en la replicación o reparación del ADN. Los desórdenes genómicos, en cambio, reflejan condiciones basadas en un mecanismo de recombinación erróneo que involucra grandes segmentos que incluyen uno o más genes.^{3,4} Debe destacarse sin embargo, que actualmente se ha descrito que varios trastornos mendelianos se originan en rearrreglos cromosómicos.³ Algunos ejemplos se detallarán a continuación.

ESTRUCTURA GENÓMICA.

Se ha postulado que los rearrreglos cromosómicos no ocurren al azar, sino que surgen en secuencias que presentan una estructura genómica compleja. Los puntos de quiebra implicados en estos rearrreglos se distribuyen principalmente en

regiones pericentroméricas y subteloméricas.⁵ Estos puntos de quiebra concentran particularmente regiones inestables de la molécula de ADN como lo son las secuencias repetidas llamadas LCRs (low copy repeats) o los sitios palindrómicos ricos en adenina- timina.²

Las regiones específicas LCRs han sido conocidas como segmentos duplicados o duplicones (aunque este término resulta erróneo cuando existen más de dos copias repetidas involucradas) y consisten en bloques de ADN de entre 10 a 400 Kb con más del 97% de identidad de secuencia. Se piensa que su origen se remonta al proceso de evolución de los primates y que están involucrados en la plasticidad de nuestro genoma.³ Los LCRs pueden contener genes, fragmentos de genes, pseudogenes, secuencias retrovirales endógenas u otros fragmentos parálogos.³ La presencia de LCRs le confiere inestabilidad a la molécula de ADN y predispone a las regiones que los contienen a eventos NARH.³

Para que un evento de recombinación se produzca es necesario que exista un segmento compartido de homología provisto por un sustrato. Los LCRs situados en cromosomas actúan como sustratos de eventos NAHR.⁴ La suma de estas secuencias particulares y los eventos NAHR son la fuente de origen de los principales rearrreglos entre los que se incluye deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones.⁵ Los eventos NAHR que involucran LCRs que presentan una misma orientación, en el mismo cromosoma, dan como resultado deleciones y/o duplicaciones. Los eventos NAHR ocasionados entre LCRs con orientación invertida, en el mismo cromosoma, resultan en inversiones y aquellos que ocurren entre LCRs localizados en diferentes cromosomas dan como resultado translocaciones recíprocas (3). **Figura 2.**

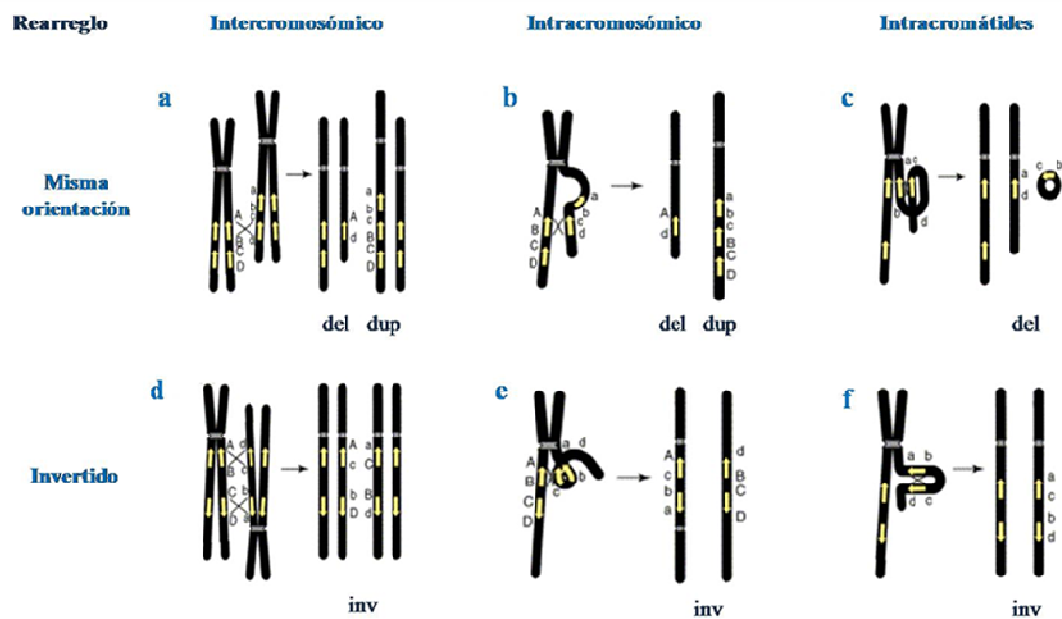


Figura 2. Imagen modificada. Stankiewicz P, et al. Trends in Genetics (2002). Representación esquemática de los mecanismos de recombinación no alélica entre cromosomas (NARH) mediados por LCRs. El producto de recombinación entre cromosomas, cromátides o intercromosomas que presentan la misma orientación pero no están alineados ocasiona deleciones (del) y duplicaciones (dup) como se muestra en (a) (b) (c). El producto de recombinación intracromátides cuando la orientación es diferente ocasiona inversiones (inv) como resultado (d) (e) (f).

LOS DESÓRDENES GENÓMICOS PUEDEN MANIFESTARSE COMO RASGOS MENDELIANOS O DESÓRDENES CROMOSÓMICOS.

Dependiendo del tamaño del segmento genómico involucrado y de la cantidad de secuencia codificante presente en los genes (dosage sensitive genes) contenidos en el segmento que sufre el rearreglo, pueden ocasionarse las siguientes entidades: enfermedades mendelianas, síndromes de genes contiguos o desórdenes cromosómicos.³

Entre las enfermedades mendelianas se cita como entidades más frecuentes: la Nefronoptosis familiar juvenil de herencia autosómica recesiva, la Neurofibromatosis de tipo 1 (NF1) de tipo autosómico dominante causada por microdeleciones intersticiales en 17q11.2, los casos de Incontinencia pigmentaria

originadas en deleciones dentro del gen NEMO localizado en Xq28 y las microdeleciones en AZFa dentro de Yq11.2 responsables de los casos de azoospermia e infertilidad masculina.³

El síndrome de genes contiguos se origina en rearrreglos del ADN (deleciones – duplicaciones) que encierra varios genes adyacentes en un segmento del genoma. Entre ellos se incluye: el síndrome de Williams Beuren, los síndromes de Prader Willi/ Angelman, la enfermedad de Charcot- Marie- Tooth tipo 1 y síndrome de deleción en 22q11.2 que será detallado a continuación.^{3,4}

DESÓRDENES GENÓMICOS ASOCIADOS A DELECIÓN 22q11.2.

Existe una asociación entre la alteración del número de copias genómicas localizadas en el brazo largo del cromosoma 22 (22q)⁶ y la manifestación de varios síndromes entre los que se incluye el síndrome de DiGeorge (SDG), el Velo- Cardio- Facial (SVCF), anomalías conotruncales aisladas y esquizofrenia.⁷ El fenotipo puede variar en este grupo de patologías e incluso superponerse. La variabilidad fenotípica referida sugiere que ésta probablemente depende del tamaño y localización de la deleción de la región implicada, aunque la evidencia en humanos hasta ahora no es concluyente.⁸

Las características clínicas en estos pacientes incluyen: defectos cardíacos congénitos, anomalías en el desarrollo de timo y paratiroides, rasgos faciales típicos y manifestaciones neurológicas y del comportamiento.⁷

Se sabe que la presencia de LCRs (low copy repeats) en la región 22q11.2 predispone a diferentes eventos de recombinación homóloga y, consecuentemente, a la aparición de rearrreglos cromosómicos siendo la deleción la anomalía más frecuentemente hallada. También se describe la aparición de duplicaciones/ microduplicaciones aunque en menor proporción de casos.⁶ Se ha

demostrado que en más del 85% de los pacientes la región delecionada comprende un tamaño aproximado de 3Mb. Éste tipo de deleción se denomina deleción típica y se expande desde el primer LCR al último (LCR-A a LCR-D).^{9,10}

Figura 3. Se estima que la incidencia de aparición del síndrome de deleción 22q11.2 es de 1 cada 4000 recién nacidos vivos.⁹

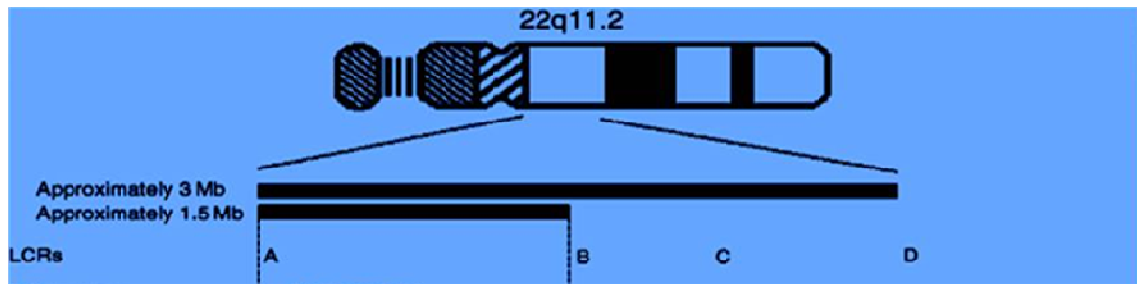


Figura 3. Imagen modificada Fernández et al. Clinical Genetic (2005). Esquema que localiza la banda 1, de la región 1, del brazo largo del cromosoma 22; en la que se muestra la distribución de secuencias repetidas o LCRs (low copy repeats) que participan como sustrato de eventos de recombinación. Puede observarse también la extensión de los segmentos más frecuentemente delecionados.

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES GENÓMICOS.

El número de desórdenes genómicos reconocidos hasta ahora aumenta en forma continua y se han utilizado varias herramientas de estudio a nivel molecular para ponerlos en evidencia.

Las técnicas citogenéticas más utilizadas se basan en la tinción cromosómica por bandas o el pintado cromosómico completo. El estudio de cariotipo convencional y por bandeado G (Giemsa) resulta útil para el diagnóstico de grandes deleciones/ duplicaciones y translocaciones que afectan los diferentes cromosomas.

La técnica de FISH (fluorescent in situ hybridation) ha sido una de las más apropiadas para detectar la presencia o ausencia de secuencia en preparados cromosómicos hasta un cierto nivel de resolución. Esta técnica pierde sensibilidad en la detección de pequeñas deleciones o duplicaciones (<40 Kb), pudiendo determinar resultados falsos positivos o dudosos, ya que, en pequeñas deleciones

la sonda puede hibridar y mostrar señal fluorescente como si toda la secuencia en estudio estuviese presente.⁷

La electroforesis en gel por campo pulsado (PGFE) y la técnica de FISH extienden el alcance de detección del estudio de cariotipo convencional y resuelven cambios de 10^4 a 10^6 pares de bases.^{11,12}

La aplicación de array genómicos (chips de ADN capaces de detectar cambios en el número de copias de partes específicas del genoma) ha hecho posible la detección de deleciones y duplicaciones genómicas submicroscópicas. La técnica de array CGH (Hibridización Genómica Comparativa) es capaz de resolver cambios causantes de desbalances genómicos de entre 10^3 a 10^8 pares de bases.¹¹

En tiempos recientes se ha desarrollado la técnica de MLPA (multiplex ligation probe amplification), como una herramienta de laboratorio útil para detectar deleciones/ duplicaciones de los exones de un gen, así como el cambio en el número de secuencias genómicas. Esta técnica ha marcado un rumbo fundamental en la caracterización de los desórdenes genómicos, siendo la más adecuada para poner en evidencia las microdeleciones/ duplicaciones responsables de diferentes cuadros clínicos.^{7,9}

MLPA COMO TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO EN EL SÍNDROME DE DELECIÓN/ DUPLICACIÓN EN 22q11.2

La técnica MLPA (multiplex ligation probe amplification) demuestra una alta sensibilidad y especificidad en la detección de microdeleciones/ duplicaciones en 22q11.2 no objetivables por las técnicas citogenéticas convencionales y FISH.⁷

Fernández y colaboradores publicaron en el año 2005 una comparación de métodos de laboratorio incluyendo FISH, STRs y MLPA aplicados en el síndrome

de delección 22q11.2, demostrando que esta última técnica fue la más eficiente para poner en evidencia la delección en todos los casos en que las otras dos metodologías mostraron resultados indeterminados.¹⁰ Vorstman y colaboradores publicaron en el año 2006, que la técnica de MLPA es una herramienta útil, con una sensibilidad y especificidad de 0.95 y 0.99, respectivamente, para el diagnóstico de cambios en el número de copias en la región 22q11.2. Esto la convierte en un método de diagnóstico rápido y económico.⁷

La aplicación de la misma en el síndrome de delección 22q11.2, a través del Kit P023 MRC- Holland, ha comenzado a demostrar la complejidad de los rearrreglos intracromosómicos responsables de este desorden genómico. Recientemente se ha descrito además, la existencia de cuadros clínicos menos graves que el síndrome de DiGeorge típico, determinados por duplicaciones de partes de la secuencia localizados en la misma región dando origen a un nuevo síndrome llamado microduplicación 22q11.2.¹³ Esta complejidad molecular demuestra la necesidad de incrementar los estudios de este tipo para identificar las alteraciones específicas del ADN que determinan las diferencias fenotípicas.

El Kit de estudio P023 MRC- Holland para este grupo de entidades incluye primers de PCR para 39 loci específicos, de los cuales 11 están localizados en el brazo largo del cromosoma 22. Estos están estratégicamente distribuidos entre las regiones flanqueadas por LCRs A al D y también dentro de las secuencias LCRs citadas. Se incluye en el Kit la presencia de marcadores en 28 loci diferentes que actúan, a manera de control, localizándose en diferentes posiciones cromosómicas (cromosomas 4, 7, 8, 10, 17 y 18).

Cada locus amplificable por PCR consiste en dos hemisondas, cada una de las cuales contiene la mitad de la secuencia target. Dependiendo de la disponibilidad

de secuencia codificante presente estas hemisondas son ligadas y su amplificación posterior genera fragmentos de longitud variable. Los fragmentos producidos son separados luego por electroforesis capilar y analizados en un secuenciador automático, pudiéndose estimar la cantidad de producto obtenido mediante la emisión de un pico de señal. Los resultados son analizados mediante el software Gene Marker 1.6. El área de señal de intensidad de pico de los productos de PCR puede ser medido, permitiendo inferir la cantidad de secuencia presente. Una disminución del área de señal indica delección y un aumento duplicación.^{6,7,10,14} **Figura 4.**

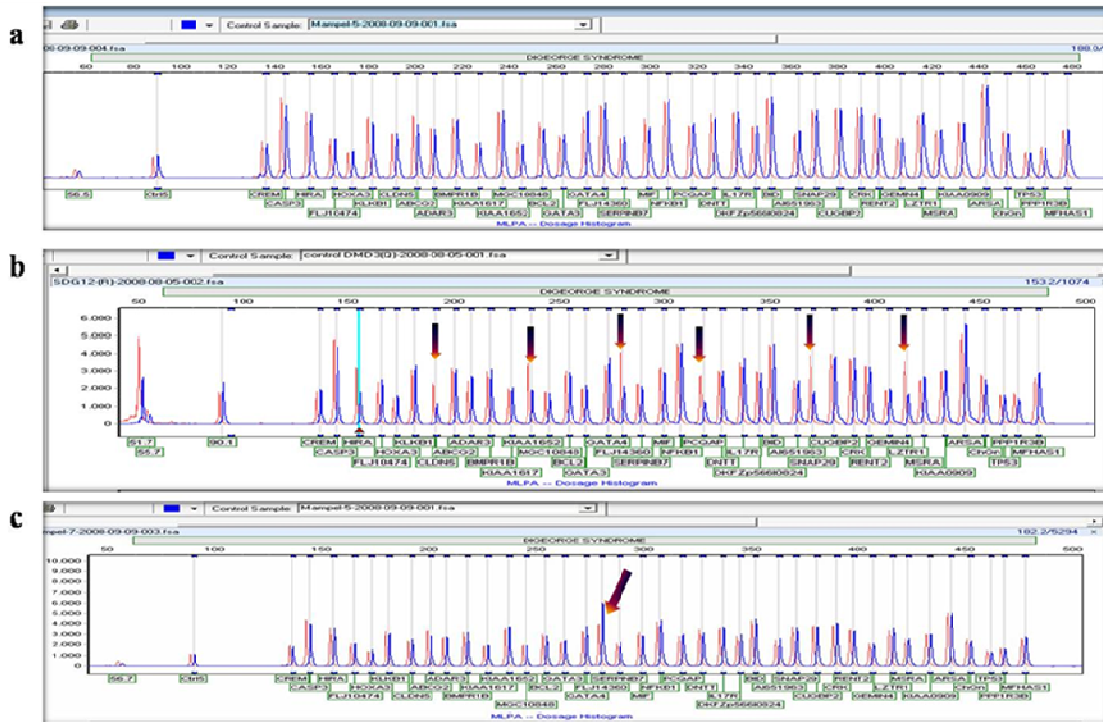


Figura 4. Ramirez, et al Técnica de MLPA, electroferogramas de pacientes con diagnóstico clínico de deleción 22q11.2. La imagen a corresponde al paciente control, en el que no se detectó deleción por la técnica de MLPA. La imagen b muestra el electroferograma de un paciente con deleción típica de 3 Mb que abarca las secuencias target HIRA- LZTR1. La imagen c pertenece a un paciente con microduplicación de la secuencia target FLJ14360.

Conclusiones

El conocimiento de nuevos desórdenes genómicos avanza conforme el tiempo. La mayoría de estos desórdenes surge como consecuencia de deleciones/microdeleciones. Sin embargo, la existencia de síndromes que responden a duplicaciones/micro-duplicaciones ha comenzado a evidenciarse, con más frecuencia, en las últimas décadas.²

La aplicación de nuevas técnicas de biología molecular permite descifrar los mecanismos subyacentes en estas enfermedades, cada vez, con mayor precisión.

La utilidad de estas técnicas no sólo se basa en brindar un diagnóstico certero al paciente, sino que permite conocer la etiopatogenia y brindar el asesoramiento familiar correspondiente.¹⁵

La técnica de MLPA es una técnica complementaria, sensible y específica en la detección de cambios en el número de copias genómicas, no detectados por los métodos convencionales de laboratorio.⁷

Si bien la evidencia actual no es concluyente, se sabe que existe una relación entre el número de copias genómicas presentes y la expresión fenotípica en varios síndromes. Actualmente se considera que, muchos fenotipos intermedios podrían estar relacionados con microduplicaciones/microdelecciones que son sub-diagnosticadas clínicamente o que no pueden incluirse en ningún síndrome genético específico por falta de criterios. Se espera en un futuro, que el conocimiento del genoma humano permita establecer una clara relación genotipo-fenotipo que permita identificar a este grupo de pacientes y delimite los criterios de inclusión para estos cuadros sindromáticos y otros nuevos.

Referencias bibliográficas

1. Kumar D (2009): Disorders of the genome architecture: a review. *Genomic Medicine*.
2. Lupski, JR. (1998). Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genetic*. 14, 417-422.
3. Stankiewicz, P; Lupski, JR (2002): Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics*. 18(2):74-82.
4. Lupski JR and Stankiewicz P (2005): Genomic disorders: Molecular Mechanisms for Rearrangements and Conveyed Phenotypes. *Plos Genetics*. 1(6): 627-633.
5. Shaw, JC; Lupski JR (2004): Implications of human genome architecture for rearrangements-based disorders: the genomic basis of disease. *Human Molecular Genetics*. 13:57-64.
6. Jalali, GR; Vorstman, JAS; Errami, AB; Vijzelaar, R; Biegel, J; Shaikh, T; Emanuel, BS (2008). Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Human Mutation* 29(3): 433- 440.
7. Vorstman, JAS; Jalali, GR; Rappaport, EF; Hacker, AM; Scott, C; Emanuel, BS (2006). MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q11.2. *Human Mutation* 27: 814- 821.
8. McDermid, HE; Morrow, B (2002): Genomic Disorders on 22q11.2. *American Journal of Human Genetic*. 70: 1077- 1088.
9. Scambler PJ (2000): The 22q11 deletion syndromes. *Human Molecular Genetics* 9(16): 2421-2426.

10. Fernández, L; Lapunzina, P; Arjona, D; López Pajares, I; García- Guereta, L; Elorza, D; Burgueros, M; De Torres, ML; Mori, MA; Palomares, M; García, A; Delicado, A (2005). Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clinical Genetics* 68: 373- 378.
11. Lupski, JR (2007). Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature Genetics* 39: 43- 47.
12. Sahikh, T; Kurahashi, H; Saitta, SC; O' Hare, AM; Hu, P; Roe, BA; Driscoll, DA; McDonald- McGinn, D; Zackai, EH; Budarf, ML, Emanuel, BS (2000). Chromosome 22- specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Human Molecular Genetics* 9 (4): 489- 501.
13. Ensenauer, R; Adeyinka, A; Flynn, HC; Michels, VV; Lindor, NM; Dawson, DB; Thorland, EC; Lorentz, CP; Goldstein, JL; McDonald, MT; Smith, WE; Simon- Fayard, E; Alexander, AA; Kulharya, AS; Ketterling, RP; Clark, RD; Jalal, SM (2003). Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic and molecular analysis of thirteen patients. *Am.J.Hum.Genet.* 73:1027-1040.
14. SALSA MLPA KIT PO23B DIGEORGE SYNDROME/VCF.
<http://www.mlpa.com>.
15. Carele- Calmels, N; Saugier- Veber, P; Girard- Lemaire, F; Rudolf, G; Doray, B; Guérin, E; Kuhn, P; Arrivé, M; Gilch, K; Schmitt, E; Fehrenbach, BS; Schnebelen, A; Frébourg, T; Flori, E (2009). Genetic compensation in a human genomic disorder. *New England Journal of Medicine* 360: 1211- 1216.