

Citogenética y biología molecular

0041. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE FIBROSIS QUÍSTICA EN DONANTES DE GAMETOS

M. García Rivera, A.B. García Ruano, I. Romero García, S. García Chileme, F. Ben Jelloum y J.V. García Lario

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad crónica causada por mutaciones recesivas que inactivan la función normal del gen CFTR. Las personas que tienen ambas copias del gen con mutaciones presentan problemas respiratorios y desarreglos en la función exocrina del páncreas y de otras glándulas. Generalmente estos individuos han recibido una copia deficiente de cada uno de sus dos progenitores. Las personas con una copia del gen normal y otra deficiente no presentan la enfermedad. La incidencia de la FQ es de 1 entre 2.000 a 4.000 nacimientos dependiendo de la población. Los individuos normales portadores de una copia del gen con la mutación ocurren a una frecuencia de 1 por cada 25 personas. En este momento se han descrito 1.871 mutaciones para este gen. La mutación más frecuente es la δ F508 que alcanza un 50% en España, solamente otras cuatro mutaciones alcanzan el 1% en nuestro país (G542X, G551D, N1303K y W1282X).

Objetivos: Nosotros hemos querido calcular la tasa de portadores sanos de FQ en nuestro entorno usando un panel con 33 mutaciones cuya sensibilidad es aproximadamente del 80% y ver si nuestros datos se corresponden con lo descrito en la bibliografía. También hemos estudiado la frecuencia de las mutaciones que se dan en estos portadores sanos.

Material y métodos: Mediante el kit Cystic Fibrosis Genotyping Assay (Abbott) hemos podido genotipar un panel de mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembranal de la FQ (CFTR) en el ADN genómico aislado de muestras extraídas de 193 pacientes donantes de gametos a los que se le realiza por protocolo el estudio de FQ. El panel incluye 33 mutaciones recomendados por el ACMG (American College of Medical Genetics) y el ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists): δ F508, δ F507, W1282X, G542X, 1717-1GA, G551D, R553X, N1303K, R560T, 3905insT, G85E, 621+1GT, R117H, 1078delT, R347P, R347H, R334W, 711+1GT, 2789+5GA, R1162X, 3659delC, 3849+10kbCT, A455E, 2183AAG, S549R, S549N, V520, 1898+IG, 2184delA, 3120+1GA, I148T, 394delTT y 3876delA. El procedimiento consta de una PCR, seguida de un ensayo de ligación con oligonucleótidos (PCR-OLA) para detectar la presencia de alelos normales y mutados mediante electroforesis capilar (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer).

Resultados: De un total de 193 pacientes estudiados hallamos los siguientes resultados: 181 negativos para las mutaciones estudiadas; 10 portadores heterocigotos cuya frecuencia de mutaciones fue: 60% δ F508, 20% R334W, 10% G542X, 10% S549R; 2 patológicos homocigotos: 2789+5GA, R334W.

Conclusiones: La tasa de portadores sanos en nuestro medio es del 5% lo que se corresponde totalmente con lo descrito en la bibliografía. La mutación δ F508 es la más frecuente a nivel mundial tal y como ocurre en nuestra población, pero hemos de resaltar el hallazgo de mutaciones diferentes a las habituales en nuestro país, pensamos que es debido al amplio panel utilizado. Por último queremos destacar los dos pacientes patológicos hallados y por ello la importancia de este estudio en donantes de gametos.

0042. ANÁLISIS DE MATERIAL FETAL. DIFERENCIAS ENTRE DOS TÉCNICAS INVASIVAS

M. García Rivera, A.B. García Ruano, I. Romero García, I. Casanovas Moreno-Torres, M. López Melchor y A. Guzmán Olmedo

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: Las alteraciones cromosómicas numéricas o aneuploidías ocurren en el 1% de los recién nacidos y son la causa más frecuente de abortos espontáneos. La única forma de descartarlas es mediante la realización de técnicas invasivas con el fin de obtener material fetal para el análisis del cariotipo. Para acotar el grupo de riesgo se ha puesto en práctica un método que combina marcadores bioquímicos y ecográficos minimizando así el número de procedimientos invasivos realizados. Las mujeres que dan positivo en este cribaje se someten a una extracción de material fetal que serán analizadas mediante la técnica QF-PCR.

Objetivos: Evaluar los resultados obtenidos en el diagnóstico rápido de aneuploidías mediante QF-PCR desde su implantación en nuestro hospital. Estos resultados serán analizados en función del motivo por el que se indicó la realización de la técnica invasiva (cribado combinado de primer trimestre positivo, antecedentes familiares, sospechas ecográficas y ansiedad materna). Posteriormente los resultados obtenidos por este procedimiento serán comparados con los obtenidos por cariotipo, técnica diagnóstica de mayor fiabilidad para la detección de aneuploidías pero que presenta ciertos inconvenientes, entre otros, su elevado coste y el alto tiempo de respuesta.

Material y métodos: Se analizaron 944 muestras mediante QF-PCR. Se llevó a cabo la extracción del DNA y su amplificación en un termociclador de Roche diagnostics® y a continuación la electroforesis capilar de los productos de la PCR en el analizador Abi-Prims 310 de Applied Biosystem®, utilizando un total de 24 marcadores de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y del kit Cromoquant de Genycel®. En paralelo, se realizaron cultivos celulares de material fetal y posterior estudio citogenético.

Resultados: De las 944 muestras recibidas, el 61,2% procedían de screening combinado positivo, el 3,9% de gestantes con antecedentes familiares de cromosomopatías, el 16,9% de sospecha ecográfica de anomalías fetales y el 18% de gestantes con ansiedad. Los resultados fueron los siguientes: screening combinado positivo: 84,9% fueron resultados compatibles con la normalidad para los cromosomas estudiados (N), 6,9% resultados patológicos (P) y 8,2% resultados no concluyentes por contaminación con sangre materna (NC). Antecedentes familiares: 86,5% (N), 0% (P) y 13,5% (NC). Anomalías fetales: 74,2% (N), 17,6% (P) y 8,2 (NC). Ansiedad materna: 95,9%(N), 1,7% (P) y 2,4% (NC). Todos los resultados obtenidos en nuestro Hospital por QF-PCR para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, coincidieron con los resultados obtenidos por cariotipo.

Conclusiones: La QF-PCR surgió ante la necesidad de hacer más rápido el análisis de material fetal ante hallazgos ecográficos o bioquímicos sugerentes de trisomía. El análisis mediante QF-PCR tarda entre 24-48h frente a 10-20 días del cariotipo. Otras ventajas de la QF-PCR frente al cariotipo son su bajo coste económico, el requerimiento de volúmenes de muestra más bajos y la posibilidad de realizar el análisis de un alto número de muestras.

0043. FARMACOGENÉTICA DEL INTERFERÓN PEGILADO MÁS RIBAVIRINA EN PACIENTES INFECTADOS CON HEPATITIS C

C. Moya Martín, C. Almazán Alonso, L. Gómez Fernández, J. Molina Santiago, J.L. Pascual Gómez y M. Moya Martín

Hospital San Agustín. Linares. Jaén. España.

Introducción: IL28B, interferón tipo III con posible actividad antivírica VHC; polimorfismos de nucleótido único (SNP) situados en

el cromosoma 19 (gen IL28B) se asocian con la eliminación espontánea (genotipos: 2,3) e inducida por el tratamiento con interferón alfa y ribavirina del VHC (genotipos 4,1). La hepatitis C tiene características peculiares en el paciente coinfectado por VIH; La tasa de respuesta al tratamiento es menor que en enfermo mono infectado por VHC, 45-50%. Algunos estudios muestran: 1) El genotipo CC del SNP rs12979860 se asocia con RVS (respuesta viral sostenida) al tratamiento PEG-IFN y RBV. La utilización de IL28B, junto otras variables predictivas de respuesta al tratamiento de la hepatitis C, previas al mismo, permitiría desarrollar modelos que predigan la respuesta al tratamiento de la hepatitis C en los pacientes coinfectados.2) El genotipo CC del SNP rs12979860 tiene más efecto preventivo de la evolución a la cronicidad de la infección por genotipos de VHC 1 o 4.

Objetivos: Crear un modelo descriptivo de respuesta al tratamiento de hepatitis C en pacientes coinfectados, incluyendo el genotipo de IL28B, conocer cómo este genotipo afecta a la probabilidad de infección y cronificación por distintos genotipo de VHC.

Material y métodos: Estudio prospectivo de cohorte, modelo experimental in vitro. Cohorte principal de coinfectados: 169 pacientes coinfectados VIH/VHC, que reciben tratamiento con PEG-IFN + RBV (H.V. Rocío, H.R. Sofía). Tratamiento farmacológico: interferón pegilado alfa-2a 180 µg/semana o interferón pegilado alfa-2b 150 µg/Kg/semana, más ribavirina 800-1.200 mg/día. Determinación del genotipo IL28B: se obtuvo el DNA mediante MagNA Pure (Roche). Y el Kit de Taqman de Applied Biosystems para el SNP rs 12979860. El DNA (IL28B) se genotipo en un termociclador MX3005. Análisis de datos: cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg; programa Haploview. Se analizó la asociación: RVS-genotipo rs 12979860, tasa de RVS- parámetros influyentes en la respuesta al tratamiento del VHC.

Resultados: En el estudio 77 pacientes tratados (46%) alcanzaron una RVS. En concreto, 33 (30%) de 111 pacientes con genotipos 1-4 y 44 (76%) de 58 pacientes con genotipos 2-3 consiguió la SVR. La frecuencia del alelo C fue significativamente mayor entre los pacientes que obtuvieron una RVS (75% vs 56%). Las tasas de RVS según el genotipo rs12979860 fueron de 50% en los portadores TT, el 29% en TC, y el 71% en CC. Las diferencias en la RVS entre los pacientes con genotipo CC (rs12979860) y aquellos con CT / TT, tuvieron mayor importancia en pacientes VHC de genotipo 1/4.

Conclusiones: El estudio muestra que el genotipo IL28B es un fuerte parámetro predictivo de RVS a interferón pegilado más ribavirina, en pacientes coinfectados VIH/VHC con genotipo 1. En concreto, rs12979860 genotipo CC se asocia con una tasa 2 veces mayor de RVS que los genotipos TC/TT. El genotipo CC para rs12979860 fue significativamente más común en pacientes con genotipo 3 que en los pacientes con genotipos 1 y 4 del HCV.

0044. HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA TIPO I (ASOCIADA AL GEN HFE). FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES C282Y Y H63D

I.M. Castro Vega, A. Serrano Garballo, M. Mayor Reyes, A. Cobos Díaz, A.M. Fernández Ramos, A. Enguix Armada y G. Ramírez Ramírez

Complejo Hospitalario Virgen de la Victoria. Málaga. España.

Introducción: La hemocromatosis hereditaria (HH) tipo 1, es un trastorno frecuente del almacenamiento del hierro. Se produce un aumento de la absorción intestinal del mismo, aún en situación de sideremia elevada, debido a la anómala interacción de la proteína HFE con el receptor de la transferrina a nivel del enterocito. Posteriormente se deposita en las células parenquimatosas, y da lugar a la lesión de los tejidos y alteración funcional de los órganos: hígado, páncreas, corazón, articulaciones, hipófisis. El gen implicado en la hemocromatosis tipo 1 se denomina HFE (mutación del gen, localizado en el brazo corto del cromosoma 6), se here-

da como un rasgo autosómico recesivo. Es la enfermedad genética más común en poblaciones con ascendentes europeos. La mutación más frecuente es la sustitución de cisteína por tirosina en la posición 282 (C282Y). Más del 90% diagnosticados clínicamente de HH son homocigotos para la mutación C282Y. Pero no todos los homocigotos C282Y progresan a una significativa sobrecarga férrica con expresión fenotípica e incluso algunos no tienen sobrecarga, debido posiblemente a una baja penetrancia génica. Existe una segunda mutación de HFE, relativamente frecuente, donde se produce la sustitución del aminoácido histidina por ácido aspártico en la posición 63 (H63D). Algunos heterocigotos mixtos (C282Y, H63D), presentan un aumento de los depósitos de hierro.

Objetivos: Estudio de la frecuencia de las mutaciones C282Y y H63D del total de peticiones analíticas recibidas en la Sección de Biología Molecular. junio-diciembre 2010.

Material y métodos: Análisis para la detección de la mutación C282Y y H63D en el gen de HFE. Extracción manual de DNA mediante el kit High Pure PCR Template Preparation (Roche®). Amplificación del DNA y detección con sondas FRET mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR-RT), autoanalizador Light Cycler (Roche®). El test determina la presencia o ausencia de la mutación y distingue entre los genotipos homocigoto y heterocigoto.

Resultados: Del total de pacientes estudiados $n = 132$, la distribución de la presencia o ausencia de las mutaciones C282Y y/o H63D, fueron: a) Negativo C282Y. Negativo H63D: 52,27% ($n = 69$); b) Negativo C282Y. Positivo heterocigoto H63D: 31,06% ($n = 41$); c) Positivo heterocigoto C282Y. Negativo H63D: 7,57% ($n = 10$); d) Positivo heterocigoto C282Y. Positivo heterocigoto H63D: 4,54% ($n = 6$); e) Negativo C282Y. Positivo homocigoto H63D: 3,03% ($n = 4$); f) Positivo homocigoto C282Y. Negativo H63D: 1,51% ($n = 2$)

Conclusiones: La mutación más frecuente en nuestro estudio fue el estado heterocigoto H63D: 31,06% ($n = 41$) cuya prevalencia es la mayor según estudios previos, seguida de heterocigoto para la mutación C282Y: 7,57% ($n = 10$), con más de la mitad de los casos de negatividad para ambas mutaciones y tan solo un 1,51% ($n = 2$) de casos de homocigosis C282Y, lo que sugiere una mala orientación diagnóstica, siendo necesario la implantación por parte del laboratorio de un protocolo diagnóstico de HFE, donde la determinación de parámetros bioquímicos sugestivos de sobrecarga férrica (índice de saturación de transferrina y ferritina) se realicen previa determinación de las mutaciones del gen HFE.

0045. ASOCIACIÓN ENTRE EL FACTOR V LEIDEN Y LA RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA. PROTOCOLO PARA SU DETERMINACIÓN

I.M. Castro Vega, A. Serrano Garballo, A.M. Fernández Ramos, B. Pérez Nevot, M. Cortés y M. Ruiz Galdón

Complejo Hospitalario Virgen de la Victoria. Málaga. España.

Introducción: El factor V Leiden es una variante del factor V originado por una mutación genética puntual, sustitución nucleotídica, G por A en posición 1691 (G1691A) traducido en un reemplazo aminoácido de Arg por Gln en posición 506. Esta proteína alterada puede activarse correctamente, pero es resistente a la degradación por la proteína C activada (PCA) durante la cascada de la coagulación, inactivándose diez veces más lentamente que el factor V. El resultado de esta resistencia es una concentración elevada de trombina en la sangre y un riesgo aumentado de tromboembolismos venosos (TEV). El FV Leiden está presente en 20-50% de los pacientes que desarrollan trombosis venosas y el 5% de individuos normales caucásicos. El riesgo de sufrir un evento trombótico aumento 3-7 veces en los portadores heterocigotos del FV Leiden, llegando a ser de 80 en los pacientes homocigotos.

Objetivos: Estudio de la frecuencia de factor V Leiden del total de peticiones analíticas recibidas en la Sección de Biología Mo-

lecular del HUVV de Málaga de enero a diciembre del 2010 y su asociación con la resistencia a la proteína C activada.

Material y métodos: Análisis para la detección de la mutación G1691A en el gen del factor V (FV) humano. Extracción manual de DNA (kit High Pure PCR Template Preparation (Roche®)), con posterior amplificación del DNA (PCR-RT) y detección con sondas FRET (Light Cycler). El test determina la presencia o ausencia de la mutación distinguiendo entre los genotipos homocigoto y heterocigoto. La determinación de la RPCa se basa en la activación de la proteína C endógena por incubación del plasma con veneno de serpiente (ProC® (Siemens)).

Resultados: Del total de peticiones para la determinación del Factor V Leiden $n = 162$, el 46,29% ($n = 75$) no se llevó a cabo la determinación al no proceder, por poseer una RPCa $> 2,00$ (valores medios de RPCa: $4,65 \pm 1,06$); del resto de peticiones, la distribución de la presencia o ausencia de la mutación G1691A en el gen del factor V, fueron: a) Negativo: 24,07% ($n = 39$), siendo los valores medios de RPCa: $4,20 \pm 1,67$; b) Positivo heterocigoto: 29,01% ($n = 47$), siendo los valores medios de RPCa: $1,35 \pm 0,19$; c) Positivo homocigoto: 0,61% ($n = 1$), valor de RPCa: 1,33.

Conclusiones: La resistencia a la proteína C activada está asociada con una mutación genética puntual del factor V (la mayoría de las veces factor V Leiden), debiendo ser su determinación una prueba adicional posterior a la determinación de la RPCa, como ocurre con el protocolo utilizado en nuestro laboratorio. Tras el estudio hemos observado también unos valores de RPCa patológicos con unos resultados negativos en la mutación del V Leiden, lo que orienta a la existencia de otras causas primarias o secundarias a las analizadas, como podrían ser mutaciones del factor V que pueden también ocasionar dicha resistencia a la proteína C activada y que no pueden ser detectadas por las sondas de mutación del kit utilizado, como ocurre con el factor V Cambridge y el factor V Hong Kong.

0046. ALGORITMO DIAGNÓSTICO EN EL SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO

M.M. Rodríguez Pedreira, B. Rodríguez Sánchez, A. Mosquera Rey, I. López Baltar, F.M. Otero Fariña, S. García Mayo, J.L. Fernández García, A. Álvarez Rueda e I. Constanso Conde

CHU A Coruña. España.

Introducción: El cáncer de mama es una entidad prevalente, pero solo un pequeño porcentaje es debido a mutaciones conocidas. De manera general, el 15-20% de los cánceres de mama presentan historia familiar, y en el 5-10% de los casos se atribuyen a mutaciones por línea germinal en genes con herencia autosómica dominante y penetrancia elevada, como los genes BRCA 1 y 2. Por su frecuencia y elevado coste del estudio se hace necesario crear criterios de inclusión restrictivos para el estudio genético.

Objetivos: Determinar la eficacia del algoritmo diagnóstico implantado, y evaluar los resultados obtenidos.

Material y métodos: Se han incluido en el estudio 64 pacientes remitidas por Ginecología, Oncología y Cirugía. A aquellas pacientes que no cumplían los criterios aprobados para el estudio de mutaciones en BRCA 1 y 2, se les ofreció consejo genético en base a su historia familiar. El resto de pacientes fueron estudiadas para la mutación ancestral gallega C330A $> G$. En aquellas pacientes en las que este estudio fue negativo, se procedió a la secuenciación de BRCA1. Si este resultaba negativo, se comenzaba la secuenciación de BRCA2 (ninguna paciente presentaba antecedentes de cáncer de mama en varón). En caso de que estos estudios fuesen negativos, en aquellas pacientes cuya probabilidad pretest de encontrar mutación calculado mediante el programa Cagene era superior al 50%, se procedía al estudio mediante MLPA para detección de grandes deleciones y/o duplicaciones.

Resultados: De 64 pacientes, cumplían criterios 32 (tabla 1). En 11 pudo encontrarse mutación causal de síndrome de cáncer de mama/ovario. Destacar que en 7 de ellas (63,63%), la mutación detectada fue la considerada ancestral. En las 21 restantes, con secuenciación negativa, la probabilidad pretest fue > 50% en dos. De estas, una no obtuvo resultado para el estudio mediante MLPA, mientras que en otra se halló la mutación responsable de la predisposición al cáncer (BRCA1: c120-?del,met1-?_X1864+?del) (probabilidad pretest del 98%). Una de las pacientes que cumplía criterios rechazó la realización de la prueba.

Conclusiones: Con los criterios utilizados, se ha conseguido focalizar el grupo de riesgo beneficiado de un estudio de este tipo. Este estudio permite la identificación de portadoras de esta mutación, que, aunque ya afectas, tienen mayor riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer que el resto de la población, y seguir las adecuadamente. También nos permite identificar a otros familiares en riesgo mediante estudio secuencial. Además, y por último, se ofrece consejo genético a estas mujeres con mutación positiva. En el caso de no encontrar una mutación causal, no es posible confirmar ni descartar la presencia de un riesgo aumentado, ya sea por limitaciones de la técnica o por la presencia de otros factores reguladores no conocidos. Destacamos la prevalencia en nuestra área de la mutación R71G, de origen gallego, incluida como primera etapa del algoritmo.

Pacientes	Gen	Mutación
1	2	C.8621-8627DEL,PRO2978LEUX21
2	1	R71G
3	1	R71G
4	1	R71G
5	1	C.2411-2429DUP19,PLEU771ARGFSX3
6	2	C.1538-1541DELAAGA
7	1	R71G
8	1	R71G
9	1	R71G
10	2	C.1538-1541DELAAGA
11	1	R71G

0047. ANÁLISIS DE INFORMATIVIDAD DE LOS MARCADORES DE DOS KITS DE ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE QF-PCR EN LA POBLACIÓN DE VALLADOLID

R. Iglesias García, M. Del Río Martín, S. Yáñez Soria, A.M. García Rodríguez, F. Sánchez Martín, N. Alonso Castillejos y J.A. Garrote Adrados

Hospital Río Hortega. Valladolid. España.

Introducción: La irrupción de técnicas para la determinación de aneuploidías de forma rápida permite obtener resultados con menor tiempo de respuesta al de los estudios citogenéticos, aunque existen limitaciones técnicas. En la PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR) es especialmente importante la informatividad de los marcadores utilizados, siendo dependiente de su heterocigosidad (% de individuos que presentan 2 alelos diferentes).

Objetivos: Conocer la informatividad de los marcadores en nuestra población y comparar la eficacia de las dos técnicas.

Material y métodos: Se analizaron los resultados obtenidos mediante la determinación de aneuploidías en líquido amniótico y sangre periférica con 2 kits comerciales de análisis por QF-PCR, de enero-julio de 2010 con Chromoquant® (método "A") y de julio/10-mayo/11 con Devyser Compact® (método "B"). El número de muestras analizadas fue 281; 81 con "A" y 177 con "B", excluyéndose 10 analizadas con "A" y 14 con "B". La extracción de ADN se realizó con EZ1 Advanced de Qiagen®, la reacción de PCR en un termociclador Veriti® de Applied Biosystems®, la electroforesis en un se-

cuenciador ABI3130® de Applied Biosystems® y el análisis mediante el software GeneMapper®. Se excluyeron las muestras con contaminación materna y las de resultado patológico por la aparición de alelos repetidos del mismo progenitor. Se obtuvo la distribución de sexo en la población estudiada. Se calculó la heterocigosidad de cada uno de los marcadores (excepto de los que no poseen un único locus) como % de muestras con 2 alelos diferentes. Se calculó la diferencia entre los 2 kit y su IC95%, así como la significación estadística. Se calculó la frecuencia de muestras con un único marcador heterocigoto para cada autosoma y cromosoma X.

Resultados: La distribución de sexo es similar con cada kit (A"y "B" respectivamente): masculino 54,9% y 57,7%, femenino 45,1% y 42,3%. Se observa una mayor heterocigosidad (tabla 1). La frecuencia de muestras con un único marcador heterocigoto se muestra en la tabla 2.

Tabla 1

Kit	Marcador	Significación	Diferencia	IC95%
Chromoquant®	D18S535	0,046	12,11	0,22-24,01
Devyser Compact®	D18S386	0,007	11,56	20,02-3,11
	D21S1411	0,001	20,74	31,43-10,04

Tabla 2

	13	18	21	X
Deviser	1,2	1,2	0,0	4,3
ChromoQuant	4,2	4,2	0,0	12,8

Conclusiones: En términos generales el kit Devyser Compact® presenta un mejor perfil de heterocigosidad, obteniendo en nuestra población unos datos prácticamente iguales a los publicados por el fabricante. La frecuencia de muestras con un solo marcador heterocigoto es significativamente mayor para Chromoquant®, a excepción del cromosoma 18 que tiene un marcador más para Devyser Compact®, lo que justificaría una menor probabilidad de marcadores homocigotos. En el cromosoma X todos los marcadores son diferentes para las 2 técnicas, y si bien la determinación sexual del individuo puede realizarse mediante el análisis de otros marcadores como SRY o amelogenina, consideramos que una frecuencia de 12,8% es excesiva. La dificultad para establecer el sexo del feto de una forma fiable con Chromoquant®, un peor perfil de heterocigosidad, la necesidad de 2 mezclas de sondas y un mayor número de muestras con interferencias en la lectura de los resultados limita considerablemente la utilidad del kit con respecto a Devyser Compact®.

0048. ASOCIACIÓN ENTRE CÁNCER DE PRÓSTATA Y LOS POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR TIPO TOLL

P. Sáenz-López Larrocha, A. Pérez-Alija Fernández, M. García Rivera, R. Coscojuela Berga, A. Guzmán Olmedo y J.V. García Lario

Hospital Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: El cáncer de próstata es uno de los tumores más comunes y un gran problema sanitario en los países industrializados. Comprender los factores asociados a la incidencia y mortalidad por cáncer de próstata es de vital importancia debido a la heterogeneidad de la enfermedad. La inflamación de la próstata es un suceso común y se ha asociado con la aparición de este tipo de cáncer. Los receptores tipo Toll (TLR) son un componente

fundamental de la respuesta inmunitaria primaria, usando una vía similar a la del receptor de la IL-1. Polimorfismos en los genes TLR podrían influir en la susceptibilidad y progresión de la enfermedad mediante la alteración de la respuesta inmunitaria y el proceso inflamatorio. El estudio de estos polimorfismos y su asociación con el cáncer de próstata todavía no se ha estudiado en profundidad. En este estudio relacionamos el riesgo de cáncer de próstata y sus características clinicopatológicas con los polimorfismos en los genes TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR10 de la población española.

Material y métodos: El estudio incluye 405 pacientes diagnosticados con cáncer de próstata y una población control compuesta por 271 donantes de sangre sanos. La extracción de DNA a partir de la sangre de pacientes y controles se realizó con el kit MagAttract DNA Blood Mini M48 Kit QUIAGEN. El genotipado de los TLRs se realizó usando sondas prediseñadas TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reacción de PCR se realizó en un 7500 FAST REAL TIME PCR SYSTEM (Applied Biosystems). Se tiparon los siguientes polimorfismos: TLR3 T/C (rs3775291), TLR3 A/T (rs5743305), TLR7 G/T (rs 2302267), TLR7 A/T (rs 179008), TLR8 A/G (rs 5744082), TLR8 A/G (3764880), TLR9 C/T (rs 352140), TLR10 T/G (rs11096955), TLR10 T/C (rs4129009). Las frecuencias alélicas se testaron para equilibrio Hardy-Weinberg. Las frecuencias genotípicas se compararon mediante el test Pearson χ^2 . Se usaron los siguientes parámetros clínicos: Infiltración tumoral, PSA inicial, PSA actual, Gleason, hormonoresistencia, recidiva bioquímica y recidiva. Los análisis estadísticos se hicieron con el SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados: TLR y riesgo de cáncer: La aparición de cáncer de próstata está significativamente asociado con los polimorfismos en los genes TLR3, TLR9 y TLR10. TLR 7 y 8 no se asocian con el riesgo de padecer cáncer de próstata. TLR y características del tumor: Hemos encontrado una correlación significativa entre el estadio de infiltración tumoral y el gen TLR3 (rs377591) ($p = 0,027$) y del nivel PSA inicial con el TLR 3 y (rs5743305) ($p = 0,022$) y el TLR9 (rs352140) ($p = 0,017$).

Conclusiones: Existen evidencias de la relación de los polimorfismos en TLR con el riesgo y las características del cáncer de próstata. Nuestro estudio indica que los TLRs (TLR3, TLR9 and TLR10) influyen en el riesgo y progresión del cáncer. Los polimorfismos en TLR7 y 8 no parecen estar asociados con el cáncer de próstata. Proponemos el estudio de estos polimorfismos en otras poblaciones para confirmar su influencia.

0049. DESCRIPCIÓN DE LAS CAUSAS DE SOLICITUD DE FISH DIRECTO EN GESTANTES

M.J. Medina Corpas^a, A.M. Peña Casas^b, M. Rodríguez Espinosa^c, E. Ocaña Pérez, M.V. Camacho Reina^a y R. Sánchez-Agosta Ortega^a

^aComplejo Hospitalario Ciudad de Jaén. España. ^bHospital de Jaén. España. ^cHospital Materno Infantil de Málaga. España.

Introducción: La biopsia corial es un sistema de diagnóstico prenatal que consiste en obtener un pequeño fragmento de la placenta para analizarlo. Como la placenta es un tejido que tiene la misma composición que el embrión, permite realizar un estudio genético con más seguridad que si se realiza la biopsia del feto. Por eso se utiliza cuando interesa descartar enfermedades genéticas en el bebé <http://www.elbebe.com/index.php/es/bebe> (como fibrosis quística, metabolopatías, enfermedad de Duchenne). Como es un tejido que crece muy deprisa, los resultados de los estudios de citogenética se obtienen en 3-4 días.

Objetivos: Evaluar las causas de solicitud de la realización de un Fish directo a muestras de vellosidades coriales procedentes de gestantes.

Material y métodos: Hemos realizado estudio prospectivo de las muestras de vellosidades coriales correspondientes a gestantes con riesgo de alteraciones genéticas recibidas en el Laboratorio, duran-

te el periodo comprendido entre enero 2009 hasta febrero 2011, ambos inclusive, en las que se realizó el estudio de Fish directo. Se han estudiado las causas que motivan la solicitud del estudio.

Resultados: De las 77 muestras estudiadas, en 45 la causa de solicitud fueron las alteraciones ecográficas, 18 por motivos de estudios moleculares ante una sospecha clínica, 3 por alteraciones en cribado de primer trimestre, 8 por causa de alteraciones genéticas en la progenitora, 2 debido a la edad materna, 1 por pérdida gestacional. En los todos los casos a los que les realizó estudio de Fish, han sido positivos para las sospecha del motivo por la cual se solicitaba.

Conclusiones: La causa más frecuente de solicitud en nuestro estudio, son las alteraciones ecográficas en gestantes, mientras que la causa menos frecuente es la correspondiente a la pérdida gestacional.

0050. TROMBOFILIAS Y EMBARAZO

R. Aguilar Peña, M.V. Camacho Reina, A. Martínez Cañamero, I. Herrera Contreras, E. Ocaña Pérez, M. Gassó Campos y M.D.M. Nieto

Complejo Hospitalario Ciudad de Jaén. España.

Introducción: Trombofilia es predisposición hereditaria o adquirida a la aparición de trombosis venosas recurrentes por alteración de los mecanismos que previenen el exceso de coagulación por déficit de anticoagulantes naturales, mutaciones de sistemas anticoagulantes o mecanismos fibrinolíticos. Su frecuencia en la gestación es seis veces mayor que la población general, ya que el embarazo es un estado hipercoagulable y protrombótico, con factores coagulantes aumentados y niveles disminuidos de anticoagulantes naturales. Las condiciones trombofílicas hereditarias incluyen deficiencia de antitrombina III, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, resistencia a proteína C activada (factor V Leiden), mutación G20210A de la protrombina, mutación MTHFR C677T y A1298C e hiperhomocisteinemia. Los portadores heterocigotos del factor V Leiden sufren un riesgo relativo de trombosis venosa entre 5 y 6, pudiendo ser de 80 en homocigotos. A la variante G20210A del gen de la protrombina se le atribuye un riesgo relativo entre 2 y 4. Ambas podrían estar implicadas en complicaciones gestacionales tipo aborto recurrente, muerte fetal intrauterina, abrupcio placentae o preeclampsia (lo que ha venido a reforzar la hipótesis trombótica de estas gestosis y abrir una vía de prevención con heparinas de bajo peso molecular).

Objetivos: Evaluar los resultados de los estudios moleculares de trombofilia solicitados desde el Servicio de Obstetricia y Ginecología en 2010.

Material y métodos: Análisis descriptivo de los datos de estudio molecular del Gen Factor V Leiden, gen de la protrombina G20210A, mutación A1298C y C667T de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y factor XII, solicitados desde el Servicio de Obstetricia y Ginecología durante el año 2010. Para el estudio de las mutaciones se hizo extracción de ADN (MagNapore Compact, Roche), PCR a Tiempo Real (termociclador LightCycler 2.0 Roche). Se han tenido en cuenta además otras variables como homocisteína (Arquitech, Abbott) y el estudio de coagulación e Informe del Servicio de Hematología. El tratamiento y resultado del mismo se ha consultado en la Historia Clínica. El análisis con el paquete estadístico SPSS.

Resultados: Procedencia: 39 peticiones desde la Unidad de Reproducción Asistida, 10 desde la consulta de Alto Riesgo y 18 desde Consultas Externas. Tratamiento: Las que únicamente eran portadores heterocigotos de las mutaciones de la MTHFR (38) con valores normales de homocisteína y resto de estudios de trombofilia también dentro de la normalidad, fueron tratadas con ácido acetilsalicílico. El resto de portadoras con heparina de bajo peso molecular y no se presentó ninguna complicación en las mujeres tratadas.

Estudio Molecular de la Mutación	No mutado	Homocigoto	Heterocigoto	Total
1. Factor II	64		3 (4,47%)	67
2. Factor V Leiden	66		1 (1,49%)	67
3. MTHFR A1298C	22	1	16 (43,5%)	39
4. MTHFR C677T	13	4	22 (67%)	39
5. Factor XII	27	3	9 (31%)	39
6. 2 Mutaciones			15	39
9. 3 Mutaciones			1	39

Conclusiones: Importancia de un abordaje multidisciplinar (Obstetricia y Ginecología, Hematología, Laboratorio) y utilidad del tratamiento con Heparina de bajo peso molecular. De las mutaciones estudiadas la MTHFR C677C es la más frecuente. Hay estudios que no recomiendan su determinación rutinaria en el estudio de trombofilia. Se debería valorar la posibilidad de excluirla del mismo.

0051. NUEVA MUTACIÓN EN EL GEN ATP7A COMO CAUSA DE UNA FORMA DE PRESENTACIÓN MODERADA DE ENFERMEDAD DE MENKES

J. Santana Benítez^a, P. Santana Gil^b, E. Rodríguez Torres^b, L.C. Ríos Castañeda^c, S. Montes López^c, C. Wong Ramírez^d, M.I. Baeza Ramírez^d, G. Dávila Gutiérrez^e, R. Giné Benaiges^b, G.J. León García^a y A. Santana Rodríguez^b

^aHospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. España. ^bComplejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil. Gran Canaria. España. ^cInstituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. México. ^dEscuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México. ^eInstituto Nacional de Pediatría. México.

Introducción: La enfermedad de Menkes es un defecto genético del metabolismo del cobre, de herencia recesiva ligada al cromosoma X, y causado por diferentes mutaciones en el gen MNK/ATP7A (Xq13.2-q13.3). Se manifiesta por un déficit sistémico de cobre, síntomas neurodegenerativos y alteraciones en el tejido conectivo, secundarios a déficits funcionales de enzimas cuprodependientes. En humanos existen tres formas clínicas con distinto grado de afectación. La mayoría de pacientes sufren la forma grave (90-95%), caracterizada por neurodegeneración neonatal, hipopigmentación, hiperlaxitud cutánea y articular, pelo áspero y retorcido, hipotermia, convulsiones, retraso del crecimiento y muerte, frecuentemente antes de los 3 años. En las formas moderadas predominan la ataxia cerebelosa y menor retraso psicomotor. El diagnóstico se confirma mediante análisis bioquímicos (niveles bajos de cobre y ceruloplasmina), el hallazgo de cobre tisular aumentado mediante el análisis de fibroblastos cultivados, e investigando mutaciones en el gen MNK/ATP7A. El tratamiento consiste en la administración parenteral de histidinato de cobre de forma precoz y continuada.

Caso clínico: Niño de 11 meses que presenta hipotonía desde el periodo postnatal, ataxia y retraso psicomotor. Embarazo y parto normales, con un peso al nacer de 2,5 kg. Su madre sufrió un aborto espontáneo previo. A la exploración: longitud de 77 cm (percentil 80); peso de 8,1 kg (percentil 10); circunferencia cefálica de 46 cm (percentil 55); tiroides no palpable; exploración cardiopulmonar normal; pelo escaso, fino y áspero; conformación cefálica anormal; hipotonía generalizada; fuerza muscular disminuida; retraso psicomotor, siendo incapaz de sentarse solo. En nuestro laboratorio se le realizaron una bioquímica completa con perfiles hepático y lipídico, con unos resultados dentro del rango de referencia. Se le realizaron cupremia sérica (38 µg/dL (VR: 90-190)) y concentración de ceruloplasmina (12 mg/dL (VR: 15-60)). La resonancia magnética nuclear cerebral mostraba atrofia cortical. Con el diagnóstico de enfermedad de Menkes, se cuantifica el cobre en fibroblastos cultivados: 227 ng/mg de proteína (VR: 21,2-46). El subsiguiente estudio familiar mediante secuenciación de ADN del gen MNK/

ATP7A mostró que el niño y su madre portaban una mutación puntual (substitución de citosina por timidina) en el exón 16 del gen, que resulta en una sustitución del aminoácido treonina (1048) por una isoleucina. Diseñamos un ensayo PCR-RFLP, que corroboró la presencia de la mutación en el niño y en su madre, pero no en su abuela. Se inició terapia parenteral con histidinato de cobre desde los 18 meses, que se mantiene actualmente (7 años). Los niveles de cobre y ceruloplasmina aumentaron progresivamente, evidenciándose una mejoría paulatina en tono muscular, cabello, convulsiones y actividad motora.

Conclusiones: La existencia de la mutación T1048I en el gen MNK/ATP7A no ha sido descrita previamente. En nuestro caso, la mutación de aparición de novo en la madre del niño, creemos que afecta a la vehiculización y dinámica funcionales de ATP7A en el transporte de cobre. Su efecto en la función proteica parece ser menos grave que el de otras mutaciones descritas. La identificación de estas mutaciones permite mejorar el pronóstico del paciente, tratado precozmente, así como abrir la investigación de nuevas vías terapéuticas.

0052. DETERMINACIÓN CONJUNTA DE HOMOCISTEÍNA Y MTHFR. REVISIÓN DEL PROTOCOLO A SEGUIR

I. Castro Vega, A. Serrano Garballo, M.J. Segovia Cuevas, M. Mayor Reyes, M. Cortes, B. Pérez Nevot, A. Enguix Armada y G. Ramírez Ramírez

Complejo Hospitalario Virgen de la Victoria. Málaga. España.

Introducción: La homocisteína (HCY) es un aminoácido derivado de la metionina, que requiere del ácido fólico, vitamina B6 y B12 como cofactores para su correcta degradación. La hiperhomocisteinemia se produce fundamentalmente por deficiencias de estas vitaminas y/o por alteraciones genéticas de las enzimas implicadas en su metabolismo. La homocisteína formada a través de la conversión de la metionina se metaboliza por procesos de remetilación y transulfuración. La remetilación está controlada por la metionina sintetasa (MS) dependiente de la vitamina B₁₂ y la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), mientras que la transulfuración lo está por la cistationina beta sintetasa (CBS) dependiente de la vitamina B₆. La disminución de la actividad de cualquiera de estas enzimas podría aumentar los niveles plasmáticos de la homocisteína. La mutación puntual C677T de la MTHFR resulta en una enzima termolábil que presenta una actividad alterada. Los polimorfismos genéticos provocan una disminución importante de dicha actividad y el ácido fólico no puede ser convertido eficientemente en metil-tetrahidrofolato. La hiperhomocisteinemia se considera un factor de riesgo tanto de aterogénesis como de trombogénesis, observándose una mayor frecuencia de la misma en personas mayores, fumadores, enfermos renales, diabéticos o vegetarianos estrictos.

Objetivos: Estudio de la asociación entre los valores de HCY y de MTHFR del total de peticiones analíticas recibidas en la Sección de Biología Molecular pertenecientes al Área Sanitaria de nuestro hospital durante un año.

Material y métodos: Detección de la mutación C677T en el gen de MTHFR humano. Extracción manual de DNA (kit High Pure PCR Template Preparation (Roche®)), amplificación del DNA (PCR-RT) y detección con sondas FRET (Light Cycler). Determinando la presen-

cia (hetero/homocigoto) o ausencia de la mutación. Determinación de homocisteína mediante inmunonefelometría (BN ProSpec® (Siemens)).

Resultados: Total de peticiones con determinación simultánea de HCY y MTHFR $n = 63$, resultando: 1) 20,63% ($n = 13$) valores positivos de HCY ($> 15 \mu\text{mol/L}$) (VR: 4,90-15) distribuyéndose la presencia o ausencia de la mutación C677T en el gen de MTHFR: a) Negativo: 15,38% ($n = 2$), ($\text{HCY} \pm 16,55 \mu\text{mol/L}$); b) Positivo heterocigoto: 38,46% ($n = 5$), ($\text{HCY} \pm 18,00 \mu\text{mol/L}$) c) Positivo homocigoto: 46,15% ($n = 6$) ($\text{HCY} \pm 60,09 \mu\text{mol/L}$). 2) 23,80% ($n = 15$) valores dudosos de HCY (10-15 $\mu\text{mol/L}$), siendo la mutación C677T del gen MTHFR: a) Negativo: 13,33% ($n = 2$); b) Positivo heterocigoto: 33,33% ($n = 5$); c) Positivo homocigoto: 53,33% ($n = 8$). 3) 55,55% ($n = 35$) resultaron valores negativos de HCY ($< 10 \mu\text{mol/L}$) siendo la mutación C677T del gen MTHFR: a) Negativo: 40% ($n = 14$); b) Positivo heterocigoto: 51,42% ($n = 18$); c) Positivo homocigoto: 8,57% ($n = 3$).

Conclusiones: Los resultados del estudio muestran que solo el 20,63% poseían valores elevados de HCY, y más del 50% eran negativos. Debido al carácter multifactorial de la hiperhomocisteinemia (incluyendo factores hereditarios, patológicos, nutricionales y farmacológicos) la determinación de la mutación del gen de la MTHFR como causa de su elevación debe ser posterior a la confirmación de un estado de hiperhomocisteinemia. Debiendo por tanto modificarse el protocolo a seguir.

0053. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CAUSAS DE SOLICITUD DE FISH DIRECTO EN BIOPSIA CORIAL EN 2009-2010

M.J. Medina Corpas^a, A.M. Peña Casas^a, A. Martínez Cañamero^a, M. Orera Clemente^a, M. Rodríguez Espinosa^b y M. Gassó Campos^a

^aComplejo Hospitalario Ciudad de Jaén. España. ^bHospital Materno Infantil Carlos Haya, Málaga. España.

Introducción: La biopsia corial es un procedimiento invasivo que tiene por objeto el estudio cromosómico a partir del tejido corial (células placentarias), en el primer trimestre del embarazo. Se puede realizar por vía abdominal y por vía vaginal, con sondas o pinzas especiales. En caso de realizarse por el abdomen puede precisarse de anestesia local. La elección de una vía u otra guarda relación con la semana de gestación y la posición de la placenta, siempre controlada por ecografía.

Objetivos: Comparar el número de solicitudes de estudio de Fish directo en biopsias coriales y las causas que las motivaron, realizadas en el año 2009 frente a 2010.

Material y métodos: Estudio prospectivo de muestras de biopsias coriales en gestantes con alto riesgo de alteraciones cromosómicas, recibidas en la Unidad de Genética del Hospital Gregorio Marañón de Madrid, en el año 2009 y 2010. Hemos estudiado la diferencia de los motivos de solicitud en 2009 frente a 2010.

Resultados: De las 77 solicitudes en total recibidas en el Laboratorio de Citogenética, los resultados se muestran en la tabla. En el año 2009, hay 25 solicitudes las cuales son positivas en el estudio del Fish (13 por alteraciones ecográficas, 8 por alteraciones en cribado prenatal, 3 por sospecha de s. Down, y 1 por pérdida gestacional). En el año 2010, hay 52 solicitudes que son positivas

	2009	2010	%
n	25	52	
Alteraciones ecográficas	13	32	9,5%
Alteraciones en estudios moleculares	8	10	-13%
Sospecha s. Down	3	-	-12%
Antecedentes familiares	-	8	15,4%
Edad materna	-	2	7,7%
Pérdida gestacional	1	-	-4%

para el estudio del Fish (32 por alteraciones ecográficas, 10 por alteraciones en cribado prenatal, 8 por antecedentes familiares, y 2 por edad materna).

Conclusiones: Aumentan las solicitudes en el año 2010, con respecto al 2009. Las principales causas de solicitud son visualización de alteraciones ecográficas durante las primeras semanas de gestación, alteraciones en cribados bioquímicos, sospecha de s. de Down, antecedentes familiares, edad materna, y presencia de alguna pérdida gestacional. El mayor aumento de solicitudes se debe a causas de visualización de alteraciones ecográficas.

0054. EXPRESIÓN CITOGÉNÉTICA DEL SITIO FRÁGIL POCO COMÚN FRA12A LIGADO A RETRASO MENTAL

F. Espejo López, J. Lara Laranjeira, R. Real Terrón, C. Fernández Pozuelo, V. Aguadero Acera, I. Baena Ferrer, A. Fernández de los Ríos y J. Barrasa Abadía

Hospital de Mérida. España.

Introducción: Los sitios frágiles son zonas del DNA propensas a roturas que se expresan como huecos, estrechamientos o roturas en algunos cromosomas cuando las células son cultivadas in vitro bajo unas condiciones específicas que alteran la replicación celular. La relación entre los sitios frágiles poco comunes (presentes en menos del 5% de la población) y retraso mental fue propuesta hace muchos años, pero después del clonaje molecular de FRAXA y FRAXE, implicados inequívocamente en retraso mental en el síndrome del cromosoma X frágil, ningún otro sitio frágil ligado a retraso mental se clonó durante una década. FRA12A es un sitio frágil poco común que había sido encontrado en individuos con retraso mental idiopático, aunque también en individuos aparentemente sanos; estudios preliminares proporcionaron una fuerte evidencia de un efecto dosis: el porcentaje de expresión citogenética parecía estar significativamente asociado al fenotipo clínico de los pacientes. El reciente clonaje de FRA12A y la identificación del gen asociado, DIP2B, ha permitido identificar la expansión de la repetición polimórfica CGG y la metilación de la región del promotor del gen como la base molecular de FRA12A.

Material y métodos: Paciente de 13 años de edad con retraso mental moderado y crisis epilépticas, de la que se solicitó cariotipo de alta resolución. Se realizó este mediante cultivo de linfocitos T, sincronización celular con timidina y posterior liberación del bloque con desoxicitidina, técnica que permite obtener cromosomas en estados más precoces de la mitosis (profase o prometáfase), incrementando la precisión diagnóstica, y que al mismo tiempo permite observar ciertos sitios frágiles que se expresan bajo condiciones que alteran la replicación celular.

Resultados: Se detectó el sitio frágil fra(12)(q13.1) en 23 de las 50 metafases observadas (46%) (46,XX, fra(12)(q13.1)[23]/46,XX[27]). Tras el hallazgo, se realizó también cariotipo de alta resolución a la hermana de la paciente, con retraso mental leve, y a los progenitores, detectándose también en la hermana y la madre el sitio frágil FRA12A, con un nivel de expresión similar en la hermana, 50% (25 de 50 metafases), y más bajo en la madre, 18% (9 de 50).

Conclusiones: Los niveles de expresión citogenética del sitio frágil FRA12A, encontrados en la paciente y su hermana, son altos, similares al nivel medio de expresión descrito en la literatura en individuos FRA12A con problemas neurocognitivos importantes (43,7% (IC95% 33,6%-54,8%)); en la madre, el nivel de expresión, más bajo, está en torno a lo observado en portadores de FRA12A aparentemente sanos (16,6% (IC95% 14,3%-19,0%)), compatible con el fenómeno de anticipación que se observa en este tipo de alteración. No obstante, para un diagnóstico definitivo se requiere la confirmación mediante el estudio de expansión de tripletes CGG y su estado de metilación, cuyos resultados estamos pen-

dientes de conocer. De confirmarse el diagnóstico molecular se trataría de un caso extraordinariamente poco frecuente, similar al síndrome X frágil en cuanto a su base molecular, lo que hace muy importante el asesoramiento genético en las familias con algún afectado.

0055. RIESGO AUMENTADO DE TRANSMISIÓN A LA DESCENDENCIA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

M.M. Rodríguez Pedreira, B. Rodríguez Sánchez, A. Mosquera Rey, B. Dos Santos Marcano, J.L. Fernández García, I. López Baltar, M.F. Otero Fariña, A. Álvarez Rueda, I. Constanso Conde y S. García Mayo

CHU A Coruña. España.

Caso clínico: Motivo de interconsulta a genética: sospecha clínica de corea de Huntington. Datos clínicos: mujer de 71 años con déficit amnésico y movimientos "coreicos". Deterioro cognitivo leve. Antecedentes de depresión. Hipotonía. RM: lesiones de desmielinización-infarto en sustancia blanca subcortical, lesiones confluentes en región parietal por dilatación de espacios perivasculares. SPECT: leve hipoperfusión en corteza temporal izquierda. Neurofisiología: muy discretos signos focales de ondas lentas y agudas de proyección sobre región temporal de predominio izquierdo. Sin alteración valorable de la actividad de fondo. Estudio genético: genotipo 30CAG/40CAG (normal: 9-29, riesgo expansión: 30-35, penetrancia incompleta: 36-39, patológico: > 39). El número de repeticiones (CAG)_n del gen IT15 fue estudiado mediante PCR. Diagnóstico diferencial: dentro de las enfermedades asociadas a la corea no heredadas, se excluyó la tirototoxicosis, el lupus, la depresión o demencias tipo alzheimer y la policitemia. Otras enfermedades hereditarias que pueden considerarse (Huntington-like, enfermedad de Creutzfeld-Jakob...), serán diagnóstico de segunda línea en el caso de estudio genético para Huntington negativo y clínica aparente.

Discusión: La enfermedad de Huntington es un trastorno progresivo de la función motora, cognitiva y que se acompaña de alteraciones psiquiátricas. La edad media de aparición es entre 35 y 40 años y el tiempo de supervivencia media es de 16 años tras el diagnóstico. En este caso la edad de inicio de los síntomas fue 53 si bien el diagnóstico se ha establecido a los 69. Una vez realizado el árbol genealógico y hecho el estudio genético se informó a la familia de la paciente, que ostenta la tutela. La familia recuerda una evolución parecida en la madre y abuela de la consultante. La paciente tiene actualmente 3 hermanos vivos menores que ella asintomáticos, 9 hijos vivos todos asintomáticos (edades comprendidas entre los 37 y 52 años) y 13 nietos (edades entre los 2 y los 33 años). En este caso, uno de los alelos estudiados presenta un número de repeticiones en rango patológico, compatible con la sospecha diagnóstica. Independientemente de esto, se facilitó consejo genético a la familia, ya que el riesgo de transmisión a la descendencia, teniendo en cuenta que sigue un patrón autosómico dominante, sería del 50%. Lo que diferencia este caso, es que en esta paciente el otro alelo presenta un número de repeticiones en rango inestable, que, no siendo patológico en el portador, si puede expandir en la descendencia. Por ello, para los 9 hijos de la paciente el riesgo es mayor del 50%, ya que también puede producirse expansión en caso de heredar el alelo no patológico. Ahora bien, que esto ocurra va a depender de varios factores: El número de repeticiones (30 en este caso), la posición cis de la secuencia de ADN con respecto a la expansión CAG, y el sexo y edad del progenitor que la transmite. En este caso, siendo de origen materno, este es un riesgo teórico, ya que los casos descritos con expansión se transmiten de forma preferente por hombres de

edad avanzada. Para un tamaño de 35 repeticiones el riesgo se estimó en el 6-10%.

0056. DIAGNÓSTICO PRENATAL: ANOMALÍAS ESTRUCTURALES. A PROPÓSITO DE UN CASO

A. Díaz Díaz, I. Ortega Madueño, C. Cotarelo-Pérez, M.J. Lautre-Ecenarro y M. Arroyo Fernández

Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

Introducción: Las alteraciones cromosómicas son una de las principales causas de malformaciones en recién nacidos. Se clasifican en: -Alteraciones numéricas, consisten en la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas completos (incidencia aproximada de 5 cada 1.000 nacimientos). Las más comunes son las trisomías (síndrome de Down o trisomía 21, síndrome de Edwards o trisomía 18, síndrome de Patau o trisomía 13 y síndrome de Klinefelter o XXY) y las monosomías (síndrome de Turner o XO) para las que existen técnicas de diagnóstico rápido prenatal. -Alteraciones estructurales equilibradas o desequilibradas, menos frecuentes que las anteriores (incidencia aproximada de 4 cada 1000 nacimientos), afectan la estructura de uno o varios cromosomas y solo son detectables mediante el análisis del cariotipo.

Material y métodos: Líquido amniótico (LA) obtenido tras amniocentesis a las 16,4 semanas de gestación procesado para FISH y cultivo celular: -FISH prenatal directo del LA mediante kit de sondas de ADN Multicolor AneuVysion® (Vysis CEP 18, X, Y-alfa-satélite, LSI 13 y 21). -Cariotipo realizado mediante bandas G. -FISH de metafases tras cultivo celular de LA con sondas para las regiones subteloméricas de los cromosomas 1qter y 22qter y con sonda para la región 22q11 (TelVysion™ Multi-color DNA Probe Mixtures).

Caso clínico: Mujer gestante de 31 años G1P0A0 que acude a la consulta de Diagnóstico Prenatal al presentar un cribado combinado de primer trimestre de alto riesgo (riesgo Down = 1/35, riesgo Edwards 1/142.033) a las 13 semanas y 5 días de gestación. Se realizó amniocentesis para FISH directo prenatal y estudio citogenético convencional. En el FISH prenatal, se observaron dos señales para las sondas correspondientes a los cromosomas 13, 18 y X y tres señales para la sonda correspondiente al cromosoma 21, compatible con síndrome de Down. El estudio citogenético confirmó el síndrome de Down (cromosoma extra del par 21) y el cariotipo femenino. Además, en todas las metafases se observó una translocación recíproca aparentemente equilibrada entre los brazos largos de uno de los cromosomas del par 1 y los brazos largos de uno de los cromosomas del par 22. Este resultado se confirmó mediante FISH con sondas para las regiones subteloméricas para los cromosomas 1qter (loci D1S3738, D1S3739) y 22qter (loci MS607, ACR, D22S1726) y con sonda para la región 22q11 (LSI BCR), resultando un cariotipo 47,XX,+21,t(1;22)(q42;q11). Debido a estos resultados se citó a los padres en consulta para proporcionar opciones informadas y continuar el estudio para consejo genético, ya que los portadores de una translocación recíproca tienen más riesgo de aborto y/o de hijos con anomalías. El estudio citogenético de la madre resultó normal, descartando su estado de portadora. El estudio del padre no se pudo realizar, quedando sin determinar si la translocación fue "de novo" o heredada vía paterna.

Conclusiones: Mediante sondas de FISH prenatal se pueden descartar las cromosopatías numéricas más frecuentes, sin embargo es necesario realizar el cariotipo para descartar otro tipo de anomalías estructurales con una incidencia más baja pero que pueden tener repercusión en futuros embarazos de los progenitores.

0057. INFLUENCIA DE VARIANTES DE LOS GENES APOA5, APOC3 Y APOE EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON FIBRATO EN PACIENTES CON RIESGO CARDIOVASCULAR

B. Candás Estébanez, A. Padró Miquel, E. Corbella Inglés, X. Pintó Sala y P. Alía Ramos

Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

Introducción: Los fibratos se emplean para disminuir la concentración de triglicéridos en plasma (cTg) y, además, elevar la de colesterol HDL. Actúan inhibiendo la expresión del gen *APOC3* disminuyendo así la concentración de la apolipoproteína y favoreciendo la actividad de la lipasa. Sin embargo, está descrito que existe una amplia heterogeneidad en cuanto a la respuesta al tratamiento, y se ha propuesto que varios polimorfismos de genes implicados en el desarrollo de la hipertrigliceridemia (HTG), como *APOA5*, *APOC3* y *APOE* podrían influir también en esta respuesta.

Objetivos: Estudiar la influencia de diversas variantes genéticas de los mencionados genes en la disminución relativa de la cTg tras la administración de fibrato en sujetos con hipertrigliceridemia.

Material y métodos: Se han analizado las variantes -1131T > C y c.56G > C de *APOA5*, c*40C > G de *APOC3* y E2 y E4 de *APOE* en 145 individuos a los que se les detectó HTG (concentración en suero superior a 1,7 mmol/L, según la NCEP). La respuesta al tratamiento con fibrato se evaluó mediante la diferencia porcentual relativa entre la cTg en el momento inicial y el final (3 meses de tratamiento). Se empleó una tabla de equivalentes farmacológicos para expresar la dosis en función de gemfibrozilo. Se estudió si existe correlación entre la dosis administrada y la respuesta. Además, se recogieron las variables de cambio que podrían ser responsables de una variación en la concentración de triglicéridos: dieta, IMC, TAD, TAS, tabaquismo, enolismo, edad y sexo. El efecto de cada variable se analizó mediante regresión lineal simple. En el caso de existir más de una variable significativa en los estudios univariantes se incluirían en un estudio múltiple.

Resultados: Se halló una correlación débil no significativa entre la dosis y las diferencia relativas ($r = 0,18$; $p = 0,10$); por ello, no se tuvo en cuenta la dosis recibida en la disminución de la cTg como variable de control para ajustar el modelo. En los estudios univariantes, las variables no-genéticas no fueron significativas. En cuanto a las genéticas, tras el estudio de regresión lineal múltiple, que incluyó edad, sexo y cada una de las minoritarias, se encontró que tan solo la variante minoritaria para *APOC3* fue significativa y que podía explicar hasta un aumento del 11% en la respuesta al tratamiento con fibrato respecto a los no portadores en esta población.

Conclusiones: El efecto de la disminución de la cTg tras la administración de fibrato es atribuible en su mayor parte al fármaco, y las medidas no farmacológicas quedan en un segundo plano en esta población. A pesar de que todos los individuos responden al tratamiento con fibrato, es interesante, dada la amplia variabilidad en cuanto a la respuesta, se sugiere que pueda haber factores genéticos implicados, como la variante c*40G > C de *APOC3*.

0058. DIABETES MODY TIPO 2 Y 3: ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR Y CONSEJO GENÉTICO EN UNA FAMILIA

M. Arruebo Muño, M. Ramos Álvarez, S. Menao Guillén, L.M. Elósegui Alberdi y J.J. Puente Lanzarote

Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza. España.

Introducción: La diabetes tipo MODY es una diabetes monogénica de herencia autosómica dominante y alta penetrancia, caracterizada por hiperglucemia moderada, ausencia de marcadores de autoinmunidad, y que, en general, se manifiesta antes de los 25 años. Constituye un grupo heterogéneo de diabetes y su etiología está asociada a mutaciones en 9 genes distintos, causantes todos

ellos de una disfunción en la célula β pancreática, dando lugar a 9 subtipos de MODY diferentes. La diabetes tipo MODY supone el 1-5% de todos los tipos de diabetes, siendo el MODY 2 (déficit de glucoquinasa) y MODY 3 (déficit del factor HNF-1 α) los más frecuentes. Clínicamente, sus características varían en función del gen alterado, yendo desde cuadros infantiles de hiperglucemias permanentes leves/moderadas y con buen pronóstico clínico (ej: MODY 2); a cuadros con hiperglucemias mantenidas acompañadas, si existe un mal control glucémico, de complicaciones crónicas graves y precoces (ej: MODY 3).

Objetivos: Análisis de los genes GCK (glucoquinasa) y HNF-1 α (factor hepato-nuclear 1 α) en busca de mutaciones patogénicas causantes de diabetes MODY 2 y MODY 3 respectivamente, en una familia de nuestro hospital.

Material y métodos: Se realiza el estudio genético de una familia en la que tres de sus miembros presentan alguna alteración del metabolismo de los hidratos de carbono: padre, 51 años, diagnosticado de diabetes hace 20 años; hijo mayor, varón, 20 años, diagnosticado a los 6 años de "hiperglucemia en ayunas"; hijo menor, varón, 11 años, diagnosticado en 2009 de "hiperglucemia en ayunas". Los tres cumplen los criterios clínicos para el estudio de la diabetes MODY: cifras de glucosa basal y hemoglobina glicosilada por encima de la normalidad, inicio precoz, péptido C detectable, no dependencia insulínica, y autoinmunidad (anti GADA) negativa. Se extrae DNA de sangre periférica a los tres miembros de la familia afectados y se procede al estudio de todos los exones de los genes GCK y HNF-1 α . Tras PCR y purificación del DNA, se utiliza, en primer lugar, el método de screening genético DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante), para proceder después a la secuenciación automática de aquellas muestras que presenten un patrón anormal de electroforesis.

Resultados: En los tres miembros de la familia estudiados, se detectó un patrón de migración anómalo en el DNA correspondiente al exón 9 del gen GCK, confirmando la mutación tras la secuenciación automática de dicho exón. Se diagnostica, por tanto, a los tres pacientes de diabetes MODY tipo 2, portadores en heterocigosis de la mutación que produce un cambio en el DNA de una citosina por una timina (C53060 > T), lo que supone, a nivel de proteína, una sustitución de una glutamina por un codón de stop en la posición 347(Q347X).

Conclusiones: El diagnóstico genético de la diabetes tipo MODY es de importante relevancia, ya que la clasificación de los pacientes en un tipo concreto de MODY, permite un conocimiento más profundo de la etiología de la enfermedad, optimizar la terapia de acuerdo con el genotipo, y ofrecer un adecuado consejo genético a otros miembros de la familia.

0059. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LOS GENOTIPOS ASOCIADOS A HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA TIPO 1

E. Ocaña Pérez, A. Muñoz Colmenero, R. Aguilar Peña, R. Sánchez-Agosta y J.M. Arias de Saavedra

UGC de Laboratorio y Alergología. Laboratorio de Biología Molecular. Complejo Hospitalario de Jaén. España.

Introducción: La hemocromatosis hereditaria (HH) es un desorden hereditario en el que debido a una hiperabsorción de hierro en la mucosa gastrointestinal se produce un depósito excesivo de hierro en distintos tejidos provocando daño tisular. La HH más prevalente, tipo I, se asocia a mutaciones del gen de la hemocromatosis (HFE). La más frecuente es la mutación C282Y en forma homocigota, aunque también pueden aparecer las mutaciones C282Y/H63D o C282Y/S65C en forma heterocigota doble en un porcentaje más pequeño de pacientes. Las recomendaciones para el estudio del gen HFE son: 1) Presentar un Índice de saturación de transferrina (IST) > 45% y/o 2) una ferritina > 400 ng/ml, en dos ocasiones separadas un mínimo de 3 meses.

Objetivos: Determinar la frecuencia de las mutaciones del gen HFE en nuestro hospital y evaluar la relación entre los niveles de ferritina e IST con el tipo de mutación.

Material y métodos: Se analizaron 908 pacientes con sospecha clínica de hemocromatosis, derivados al Laboratorio de Biología Molecular de forma consecutiva durante los años 2007-2010. Se realizó el estudio genético del gen HFE (mutaciones C282Y, H63D y S65C, Lightcycler 2.0), y se midieron los niveles de hierro, ferritina y transferrina (Olympus AU5400) y se calculó el IST. Los pacientes se distribuyeron en cuatro grupos en función de los resultados genéticos obtenidos (tabla). El grupo 1 corresponde a pacientes que presentaron genotipos asociados a HH, mientras que los grupos 2, 3, 4 corresponden a pacientes con genotipos no asociados a HH. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 15.0.

Distribución de genotipos HFE			
Grupo	Mutaciones		
	C282Y	H63D	S65C
1	hom/wt/wt		
	het/het/wt		
	het/wt/het		
2	wt/wt/wt		
	wt/het/wt		
	wt/wt/het		
3	wt/hom/wt		
	wt/het/het		
4	het282		

Resultados: Se ha detectado la presencia de mutaciones en el gen HFE asociadas a HH en el 7,26% de los casos estudiados. La forma genética más frecuente fue la heterocigótica compuesta C282Y/H63D (66,66%), seguida de la homocigótica C282Y (19,70%) y la doble heterocigota C282Y/S65C (6,06%). Cuando analizamos los niveles de ferritina e IST en los diferentes grupos encontramos los siguientes resultados: El grupo 1 presentó valores de IST > 45% (valor medio 54%) y ferritina > 400 ng/mL (405 ng/mL), mientras que el resto de grupos mostraron un IST < 45% (grupo 2, 39%; grupo 3, 41% y grupo 4, 37%) y ferritina < 400 ng/mL, excepto el grupo 2 que presentó los niveles de ferritina más altos a pesar de no ser individuos genéticamente predispuestos (grupo 2, 441 ng/mL; grupo 3, 367 ng/mL y grupo 4, 313 ng/mL). El valor de IST más alto se detectó en el grupo 1 ($p < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ferritina entre los diferentes grupos.

Conclusiones: El genotipo C282Y/H63D asociado a HH es el más frecuente en nuestra población. El IST es un parámetro útil para el cribado de HH, mientras que los niveles de ferritina fueron similares en los 4 grupos. De acuerdo con los resultados, sería conveniente revisar los criterios de adecuación de las peticiones para el estudio genético de HH.

0060. PREVALENCIA DEL GENOTIPO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA PROVINCIA DE JAÉN

A. Muñoz Colmenero, E. Ocaña Pérez, A. Vera Vega, J. García García y R. Aguilar Peña

UGC de Laboratorio y Alergología. Área de Biología Molecular. Complejo Hospitalario de Jaén. España.

Introducción: La variabilidad genética del virus de la hepatitis C (VHC) ha dado lugar a la clasificación de 6 genotipos con distintos subtipos. La prevalencia de los diferentes genotipos varía según el

área geográfica estudiada. La importancia de la determinación del genotipo del VHC se basa en la orientación terapéutica. Así, los genotipos 1 y 4 presentan una menor respuesta al tratamiento y requieren una mayor duración terapéutica. Los últimos datos sugieren que la prevalencia del genotipo 1a, 3 y 4 se ha incrementado en España en los últimos años debido a la aparición de dos epidemias. La primera involucró la dispersión de los genotipos 1a y 3, y la segunda la diseminación del genotipo 4.

Objetivos: Poner de manifiesto los cambios en la prevalencia de los genotipos del VHC en nuestra zona.

Material y métodos: Se realizó un análisis retrospectivo de los resultados de genotipado del VHC en muestras séricas extraídas en nuestro laboratorio a sujetos diagnosticados de infección por VHC durante el periodo 2007-2010. El número de pacientes estudiados fue 587. La extracción de ARN se llevó a cabo mediante el sistema COBAS Ampli-Prep (Roche Diagnostic). La transcripción inversa, amplificación e hibridación inversa se realizó con Linear Array HCV genotyping test, Roche Diagnostic). Se calculó la prevalencia de los genotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en nuestra población. Los resultados de las muestras se agruparon teniendo en cuenta la fecha de nacimiento de los pacientes. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo mediante el test t-Student, aceptando $p < 0,05$ como nivel de significación.

Resultados: La distribución de genotipos del VHC en nuestra población fue, para el genotipo 1, 62,86%; coinfección genotipos 1+2, 0,17%; genotipo 2, 2,04%; genotipo 3, 19,59% y genotipo 4, 15,33%. Considerando la fecha de nacimiento de los pacientes, las prevalencias de los genotipos 3 y 4 fueron significativamente mayores entre los nacidos después de 1950, 21,05% para el genotipo 3 y 16,54% para el 4 frente al 3,7% y 3,7%, respectivamente, antes de 1950. En cambio, la del genotipo 1 descendió del 90,74%, antes de 1950, al 60,15%.

Conclusiones: La distribución de los diferentes genotipos en nuestra población fue acorde a la referida en la bibliografía (Echevarría et al, 2006) sobre la media estatal, salvo un ligero aumento del genotipo 4 (15,33% vs 11,6%). Nuestros resultados corroboran las conclusiones llevadas a cabo por el grupo de investigación del Centro Nacional de Microbiología, que indica que en España han sucedido dos últimos episodios de importación de cepas del VHC, el primero supuso la diseminación de cepas de los genotipos 1a y 3, y el segundo supuso la introducción de cepas del genotipo 4, de ahí la diferencia encontrada entre los genotipos de los pacientes antes y después de 1950.

0061. CORRELACIÓN BIOQUÍMICA Y GENOTÍPICA EN PACIENTES CON HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA TIPO 1

L. Rincón de Pablo, A. Muñoz Colmenero, R. Melero Valencia, J.M. Urra Ardanaz, A. Agarrado Roldán, P. Nieto-Sandoval Martín de la Sierra, P. Carrasco Salas y C. Cabrera Morales

Hospital General Universitario de Ciudad Real. España.

Introducción: El diagnóstico de la Hemocromatosis Hereditaria (HH) debe realizarse en los estadios iniciales, donde aún no se han manifestado los síntomas de la enfermedad. En la actualidad, se diagnostica, cada vez más, como un hallazgo accidental en relación con otras enfermedades, ante un elevado índice de saturación de transferrina (IST) y de ferritina y, menos, en base a criterios clínicos. El diagnóstico final precisa de la positividad de pruebas genéticas (demostración de las mutaciones C282Y/C282Y, C282Y/H63D y C282Y/S65C) y bioquímicas (IST y/o ferritina sérica elevadas).

Objetivos: Analizar la frecuencia de mutaciones asociadas a la HH y estudiar las diferencias de los parámetros bioquímicos utilizados en el diagnóstico de hemocromatosis entre los genotipos asociados a dicha enfermedad y compararlos con un grupo control

de genotipos no asociados al desarrollo de la enfermedad (C282Y/wt, H63D/wt y H63D/H63D).

Material y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo de las peticiones que solicitaron el estudio genético del gen HFE, desde el año 2006 hasta abril del 2011. Como criterios de inclusión se tomó todas la analíticas que cumplieran la presencia de IST > 45% y/o ferritina > 400 µg/L en dos ocasiones separadas por un mínimo de tres meses. Se excluyeron todas las peticiones que no cumplieran estos requisitos y las muestras que no vinieran bien extraídas (en tubo EDTA). La determinación de ferritina y hierro se realizó en el analizador ADVIA 2400, la transferrina (IST) en el IMMAGE y el estudio de las mutaciones en el termociclador Lightcycler 2.0 utilizando una PCR a tiempo real (uso de sondas FRET) + la realización de curvas melting. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS 15.0.

Resultados: La frecuencia de las mutaciones asociadas a la aparición de HH se distribuyó en un 48,4% para la mutación C282Y/C282Y y 51,6% para C282Y/H63D. Los C282Y/C282Y presentaron valores de saturación de transferrina > 45% y ferritina > 400 ng/mL, mientras que los C282Y/H63D mostraron niveles de ferritina > 400 ng/mL pero con un IST < 45%, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El grupo de pacientes con mutaciones no asociadas a HH también presentaron niveles de ferritina > 400 ng/mL e IST < 45%, aunque sí hubo diferencias significativas para los niveles de IST con respecto al total de los enfermos. Los valores medios obtenidos de los parámetros bioquímicos en los diferentes genotipos se muestran en la tabla. No hubo diferencias significativas en la ferritina entre los grupos.

Valores bioquímicos de los diferentes grupos

	Ferritina	IST
C282Y/ C282Y	716,53	53,89
C282Y/H63D	553,94	43,78
Genotipos no asociados	517,50	27,35

Conclusiones: El genotipo C282Y/H63D fue la mutación más frecuente y el genotipo C282Y/C282Y el que presentó valores de ferritina e IST más elevados. No hubo diferencias significativas para los valores de ferritina entre los grupos ya que existen múltiples causas por las que puede estar aumentada, aparte de por una sobrecarga de hierro. En cambio, el IST tiene mayor sensibilidad, especificidad y valor predictivo pronóstico positivo para la detección de HH.

0062. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS COLIA I (SP1) Y VDR (BSML) EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES TRASPLANTADOS DE RIÑÓN

P. Argüelles Menéndez, L. Chamorro López, O. Fernández Codejón, M. Palacios Gasós, C. Gutiérrez Fernández, J.M. del Rey Sánchez y J.J. Villafuella Sanz

Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. España.

Introducción: La alteración óseo-mineral asociada a la enfermedad renal crónica conlleva las siguientes manifestaciones clínicas: anomalías del Ca, P, PTH y vitamina D; alteraciones esqueléticas y calcificaciones. El riesgo de fractura está incrementado en los pacientes trasplantados de riñón. La genética molecular ha permitido determinar una serie de polimorfismos asociados a la predisposición hereditaria a la osteoporosis. El más estudiado está localizado en una zona no codificante del extremo 3' del gen VDR, y es definido por la enzima de restricción BsmI. Las dos formas alélicas son la «B» y la «b» (ausencia o presencia de la diana de restricción). Los sujetos BB poseen una densidad mineral ósea inferior a los «bb»; los heterocigotos tienen valores intermedios. En los últimos años, se ha demostrado una fuerte asociación entre el polimorfismo de los genes del colágeno tipo 1 alfa 1 (COLIA1) y el

riesgo de fractura. En el nucleótido 2046 hay un cambio básico de G (guanina - alelo S) para T (timidina - alelo s) que afecta la unión del factor de transcripción Sp1 al gen. Los genotipos GT y TT (Ss y ss) están asociados al riesgo de fractura.

Objetivos: Estudiar la predisposición hereditaria al riesgo de fractura en 44 pacientes trasplantados de riñón afectados de osteopenia confirmada por densitometría (DEXA) en los que el tratamiento con metabolitos activos de la vitamina D no ha tenido los efectos deseados. Se trata de 28 hombres y 16 mujeres, con edades comprendidas entre los 30 y los 80 años. La edad media es de 60 ± 12,5 años.

Material y métodos: Aislamos DNA a partir de sangre total, con el PUREGENE DNA Isolation Kit, para detectar el polimorfismo Sp1 (S/s) en el gen COLIA 1 y el polimorfismo BsmI (B/b) en el gen VDR mediante el kit Genetic Risk Factors for Osteoporosis de Autoimmun Diagnostika. Asimismo, analizamos los valores medios de Ca, P, PTH, 25-vitD y 1,25-vit D durante el período 2006-2010 en dichos pacientes.

Resultados: Se muestran en las tablas.

Genotipo	Nº pacientes	%
SsBb	20	45,45%
SSBb	7	15,9%
SsBB	5	11,36%
SSbb	4	9,09%
SSBB	4	9,09%
ssbb	2	4,54%
Ssbb	2	4,54%

Parámetro	Media	DE
Ca(mg/dL)	9,44	± 0,47
P (mg/dL)	3,46	± 0,85
PTH (pg/mL)	152,5	± 119,01
25-D (ng/mL)	21,65	± 8,23
1,25-D (pg/mL)	41,05	± 28,41

Conclusiones: El examen de los alelos de riesgo VDR-B y COLIA1-s ayuda a determinar en una fase temprana una predisposición para los trastornos del metabolismo fosfo-cálcico. Los resultados obtenidos en post-trasplantados suplementados con vitamina D refuerzan la hipótesis de que el genotipo de estos pacientes ha de tenerse en cuenta en su tratamiento. Se hace necesaria la redefinición de los valores de referencia de vitamina D, así como una estandarización de los métodos de análisis. Debido a la falta de consenso en la definición de población normal, pacientes como estos pueden estar recibiendo tratamientos con suplementos de vitamina D inferiores a sus necesidades reales.

0063. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE CRIBADO MEDIANTE DGGE PARA EL DIAGNÓSTICO DE DIABETES TIPO MODY 2 Y MODY 3

M. Ramos Álvarez, M. Arruebo Muñoz, S. Menao Guillén, L.M. Elósegui Alberdi y J.J. Puente Lanzarote

H.C.U. Lozano Blesa. Zaragoza. España.

Introducción: La diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) es una forma de diabetes monogénica, de herencia autosómica dominante, caracterizada por hiperglucemia moderada sin cetoacidosis de comienzo, ausencia de marcadores de autoinmunidad pancreática, y que suele manifestarse durante la infancia o la juventud (< 25 años). La diabetes tipo MODY supone entre el 1-5% de todos los tipos de diabetes. Constituyen un grupo

heterogéneo, cuya etiología está asociado a defectos en 9 genes distintos, dando lugar a 9 subtipos de MODY, de donde el MODY 2, que afecta al gen de la glucokinasa y MODY 3, que afecta al gen del factor de transcripción HNF-1 α son las formas más prevalentes. En España un 80% de las diabetes tipo MODY son del tipo 2 y un 8,5% del tipo 3.

Objetivos: Puesta a punto de un método de screening mutacional para el diagnóstico de diabetes MODY 2 (gen *GCK*) y MODY 3 (gen *HNF-1 α*), basado en la técnica de gradiente de densidades DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Material y métodos: El material utilizado para este trabajo ha sido DNA de 4 pacientes, extraído de sangre periférica. La extracción de DNA se ha llevado a cabo mediante el equipo Magstration System. La amplificación de los distintos exones se ha realizado mediante PCR utilizando para ello parejas de primers que hibridan en las regiones colindantes a los exones codificantes y en los que se ha añadido en uno de ellos una cola CG (GC-clamp) que permite aumentar la sensibilidad de la técnica DGGE. Los primers han sido diseñados utilizando el programa MELtingen 1.0 (Ingeny Internacional, Goes, Países Bajos). A partir del producto de PCR de los distintos exones se han estudiado distintas condiciones de temperatura, tiempo y gradientes de urea y formamida de la técnica DGGE, para detectar cambios en la secuencia del DNA. EL análisis se ha llevado a cabo mediante el sistema INGENYphorU.

Resultados: Para el screening mutacional basado en DGGE, las mejores condiciones obtenidas en los distintos exones han sido gels en gradiente desnaturante de urea y formamida del 25/75 a 110V durante 17 horas, excepto para los exones 4 y 5 del gen *GCK*, donde las condiciones ideales fueron 20/65 a 110V durante 12 horas.

Conclusiones: Se ha puesto a punto un método de screening para el diagnóstico de MODY 2 y MODY 3 basado en la técnica DGGE que ha permitido, hasta el momento, detectar con un 100% de sensibilidad las mutaciones testadas y que va a permitir reducir considerablemente el coste del diagnóstico. Es necesario ampliar el estudio a más pacientes para validar completamente la técnica.

0064. RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO HTTLPR-5 DEL GEN RECAPTADOR DE LA SEROTONINA CON EL ABORTO ESPONTÁNEO

B. Pérez Nevot^a, A. Rosales Martínez^b, A.M. Lendínez Ramírez^a, M. Cortés Rodríguez^a, M. Mayor Reyes^a y M. Ruiz Galdón^a

^aComplejo Hospitalario Virgen de la Victoria. Málaga. España.

^bHospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: Si bien existen pocas referencias a cerca de la relación entre el sistema serotoninérgico y la fertilidad

humana, algunos trabajos han estudiado indirectamente esta posible conexión. Una reciente revisión afirma que la exposición gestacional a los inhibidores de la receptación de serotonina (fármacos antidepresivos), puede provocar abortos espontáneos (Broy et al, 2010). Además, en relación a la fertilidad masculina, se sabe que la toma de dichos antidepresivos provoca cambios en parámetros seminales (oligospermia, movilidad reducida y morfología anormal) como refleja el estudio de Tanrikut et al (2007) y daño en la integridad del DNA espermático (Safarinejad, 2008). Esto nos hizo pensar sobre la implicación que podría tener el sistema serotoninérgico en la fertilidad.

Objetivos: Nuestra hipótesis de trabajo se resume en que el polimorfismo HTTLPR5 (serotonin-transporter-linked polymorphic region) del gen *SLC6A4*, influye en la viabilidad fetal, siendo una posible causa de aborto espontáneo (AE). El objetivo que nos marcamos, por tanto, es estudiar la relación entre el polimorfismo HTTLPR5 del recaptador de serotonina con el AE de causa desconocida.

Material y métodos: Se propone un estudio observacional de casos-control. El grupo de casos se constituyó de 61 muestras de tejido parafinado fetal de AE de causa desconocida. El grupo control constó de 89 muestras de sangre periférica de estudiantes de medicina caucásicos, con una media de edad de 22 \pm 1,58 años. Se extrajo el DNA de las muestras de ambos grupos mediante kit comercial. Se amplificó el fragmento de DNA específico mediante reacción en cadena de la polimerasa. Posteriormente se procedió a la identificación del genotipo estudiado mediante electroforesis capilar en el autoanalizador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®]).

Resultados: A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico aplicado a los datos del grupo fetal y del grupo control. Se calculó la frecuencia genotípica y alélica para ambos (tablas 1 y 2). No se observaron diferencias entre los dos grupos de comparación en relación a la frecuencia alélica obtenida. En cuanto a la frecuencia genotípica vimos un aumento en la proporción del genotipo heterocigoto S/L del grupo fetal con respecto al control. La asociación entre el polimorfismo objeto de estudio y la variable respuesta AE se representa en la tabla 3. Según el análisis estadístico llevado a cabo, el modelo genético que mejor se ajusta a la población de abortos espontáneos para el polimorfismo HTTLPR-5 sería el sobredominante, con un valor p de 0,049.

Conclusiones: Existe relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo HTTLPR-5 S/L del recaptador de serotonina con el AE de causa desconocida.

Tabla 1. Frecuencia genotípica HTTLPR-5 (n = 150)

Todos los sujetos			Grupo fetal		Grupo control	
Genotype	n	Proporción	n	Proporción	n	Proporción
L/L	32	0,21	10	0,16	22	0,25
S/L	74	0,49	36	0,59	38	0,43
S/S	44	0,29	15	0,25	29	0,33

Tabla 2. Frecuencia alélica HTTLPR-5 (n = 150)

Todos los sujetos			Grupo fetal		Grupo control	
Alelo	n	Proporción	n	Proporción	n	Proporción
S	162	0,54	66	0,54	96	0,54
L	138	0,46	56	0,46	82	0,46

Tabla 3. Asociación entre HTTLPR-5 y AE

Modelo	Genotipo	Grupo fetal	Grupo control	OR (IC95%)	Valor p	AIC	BIC
Codominante	S/S	15 (24,6%)	29 (32,6%)	1,00	0,14	204,7	213,8
	S/L	36 (59%)	38 (42,7%)	0,55 (0,25-1,18)			
	L/L	10 (16,4%)	22 (24,7%)	1,14 (0,43-3,01)			
Dominante	S/S	15 (24,6%)	29 (32,6%)	1,00	0,29	205,6	211,6
	S/L-L/L	46 (75,4%)	60 (67,4%)	0,67 (0,32-1,40)			
Recesivo	S/S-S/L	51 (83,6%)	67 (75,3%)	1,00	0,22	205,2	211,2
	L/L	10 (16,4%)	22 (24,7%)	1,67 (0,73-3,85)			
Sobredominante	S/S-L/L	25 (41%)	51 (57,3%)	1,00	0,049	202,8	208,8
	S/L	36 (59%)	38 (42,7%)	0,52 (0,27-1,00)			
Log-additive	---	---	---	1,01 (0,64-1,60)	0,98	206,7	212,7

0065. LIPOIDOPROTEINOSIS. IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL GEN ECM1

R. Mondéjar García, R. Rubio, M. Delgado, B. Fernández Pérez, F. Solano y M. Lucas

Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

Introducción: La lipoidoproteínosis (LP) es una enfermedad rara con un patrón hereditario autosómico recesivo. Se caracteriza histológicamente por el depósito de material hialino PAS-positivo en la piel, tracto respiratorio superior y órganos internos. Sus características clínicas incluyen la presencia de pápulas en párpados, cicatrización de la piel, infiltración de cuerdas vocales y anomalías neuropsiquiátricas. La base molecular de la enfermedad ha sido recientemente aclarada y se ha mostrado su origen en el gen Ecm1. Se ha postulado que la proteína Ecm1 puede tener una función de transportador proteico o estar involucrada en la unión de factores de crecimiento o diferenciación. Además, esta proteína sería clave para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la piel, ya que actúa anclando a los principales componentes de la matriz extracelular, a modo de “pegamento biológico”. Por tanto, mutaciones en el gen Ecm1 que provocan la pérdida de su función, causan esta enfermedad.

Objetivos: Análisis molecular del gen Ecm1 en un caso de lipoidoproteínosis.

Material y métodos: La paciente de 35 años, de padres no emparentados, presentaba las características clínicas de la enfermedad: voz ronca, pápulas en párpados, infiltración en lengua, frenillo y laringe, alopecia, pérdidas de memoria y calcificaciones intracraniales bilaterales. Se obtuvo ADN de la paciente y los padres mediante una extracción manual empleando un método salino. Se amplificaron los 10 exones del gen Ecm1 mediante PCR y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Se purificaron los amplicones y se analizaron mediante secuenciación directa en un secuenciador ABI 3130.

Resultados: La secuenciación del exón 7 reveló en la paciente una sustitución homocigota de un nucleótido (G→A) en la posición 1076. Dicha transición cambia el residuo triptófano (TGG) por un codón de terminación (TAG), designado como (W359X). Ambos padres mostraban la mutación heterocigota. La mutación fue confirmada mediante la enzima de restricción NlaIII (PCR-RFLP), la cual pierde el sitio de corte para la enzima de restricción. No se detectó ningún alelo mutado en 106 cromosomas de sujetos controles estudiados.

Conclusiones: En este estudio se ha encontrado una nueva mutación en el gen Ecm1, no descrita en la literatura. La mutación predice una proteína truncada de 358 aminoácidos, la cual pierde sitios de interacción con diversas moléculas de la matriz extracelular, lo que se traduce en la pérdida de su función.

0066. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DEL ONCÓGEN K-RAS PREVIO A LA TERAPIA CON ANTI-EGFR

D. Herranz Amo, C. Ortiz García, Á.M. Díaz Díaz y C. Aguilera Gámiz

Complejo Hospitalario Reina Sofía. Córdoba. España.

Introducción: El gen K-RAS desempeña un papel clave en la vía de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este receptor es una glicoproteína con actividad tirosín-kinasa que regula la diferenciación y proliferación celular. Las terapias anti-EGFR bloquean la activación de este receptor, interrumpiendo la actividad tirosín-kinasa, por lo tanto, los pacientes con cáncer de colon con el gen K-RAS no mutado (wild-type), suelen beneficiarse de estas terapias al inhibirse la señalización, aumentando la tasa de respuesta y prolongando la supervivencia sin progresión del tumor. Por el contrario, los tumores que presentan mutaciones en el gen K-RAS, no se beneficiarán de estos tratamientos.

Objetivos: Identificar a los pacientes con cáncer de colon que pueden beneficiarse del tratamiento con anti-EGFR mediante el estudio de las mutaciones del gen K-RAS.

Material y métodos: En el estudio participan 308 pacientes diagnosticados de cáncer de colon, de todos ellos se reciben una muestra de tejido tumoral paraafinado remitida desde el Servicio de Anatomía Patológica. Los cortes se desparafrinan con XILENO-ETANOL seguido de extracción de ADN y realización de PCR a tiempo real y con sondas Scorpions y ARMS (Therascreen), en un termociclador 7500 de Applied Biosystems®. Este método permite la detección de 7 mutaciones del gen K-RAS en los codones 12 y 13 (12 ASP, 12 ARG, 12 CYS, 12 SER, 12 VAL Y 13 ASP).

Resultados: De los 308 pacientes estudiados el 35% son mujeres (108 casos) y el 65% varones (198 casos) y el 1% no está informado (2 casos) debido a la presencia de escasas células tumorales. La edad media fue de 66,99 años (en mujeres: 65,77 años y en varones: 68,62 años). Los resultados del estudio de las mutaciones del oncogén K-RAS detectadas fueron las siguientes: wild-type (fenotipo salvaje): 57,14% (176 casos) de las cuales el 68,18% se detectaron en varones (120 casos) y el 31,81% en mujeres (56 casos); encontramos 130 mutaciones lo que representa el 42,86% (130 casos) de las cuales el 60% son varones (78 casos) y el 40% mujeres (52 casos). De entre los mutados 14 casos presentan doble mutación lo que representa el 10,76% de ellos, 4 casos aparecen en mujeres (28,57%) y 10 casos corresponden a varones (71,42%). La frecuencia de las distintas mutaciones estudiadas fueron: 12 ASP: 36,15% (47 casos), 12 VAL: 25,38% (33 casos), 13 ASP: 21,53% (28 casos), 12 ALA: 13,07% (17 casos), 12 SER: 7,69% (10 casos) 12 CYS: 3,84% (5 casos) y 12 ARG: 2,30% (3 casos).

Conclusiones: Predomina tanto el genotipo wild-type así como el oncogén mutado en el sexo masculino, siendo la mutación 12 ASP la más frecuentemente detectada seguida de la 12 VAL y 13 ASP. Más de la mitad de los casos estudiados corresponden al genotipo

wild-type por lo que estos pacientes tienen gran probabilidad de beneficiarse del tratamiento con anti-EGFR.

0067. DELECIÓN DE 13Q EN UN PACIENTE DIAGNOSTICADO PRENATALMENTE DE ATRESIA INTESTINAL

C.M. Reillo Sánchez, A. Sánchez Muñoz y P. Blanco Soto

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

Introducción: El síndrome 13q- es un trastorno muy poco frecuente, causado por una delección de parte del brazo largo del cromosoma 13 y caracterizado por malformaciones congénitas y retraso mental. El fenotipo descrito en estos pacientes es muy variable y su gravedad radica en el tamaño y localización de la delección, de manera que podemos distinguir tres grupos. Grupo 1: pacientes con delecciones proximales que no se extienden a 13q32 que presentan retraso mental leve o moderado, anomalías menores y retraso en el crecimiento; grupo 2: pacientes con delecciones de la banda 13q32 que presentan retraso mental grave, anomalías mayores y retraso en el crecimiento; grupo 3: Pacientes con las delecciones más distales que incluyen las bandas 13q33-34 que presentan retraso mental grave pero no retraso en el crecimiento ni malformaciones estructurales. Otros síntomas y signos asociados a este síndrome son: hipertelorismo, cuello corto, orejas de implantación baja, defectos cardíacos y de esqueleto, agenesia intestinal, enfermedad de Hirschprung y riesgo significativo de desarrollar retinoblastoma.

Caso clínico: Presentamos el caso clínico de un paciente diagnosticado prenatalmente de atresia intestinal, confirmado radiológicamente al nacimiento y fenotipo peculiar con hipertelorismo, ptosis y estrabismo divergente.

Material y métodos: Se realizó estudio citogenético de cariotipo con tinción de bandas G a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica. También se realizó procedimiento hibridación in situ fluorescente (FISH) con sonda painting específica para el cromosoma 13 y sonda subtelomérica que hibrida en la región 13q34 de este mismo cromosoma.

Resultados: El estudio citogenético informó de una monosomía parcial del brazo largo del cromosoma 13. Fórmula cromosómica: 46 XX, del 13(q21-q31). El estudio de FISH con sonda painting para el cromosoma 13 (WCP-13 Metasystems chromosome painting probe) descartó la existencia de translocaciones que pudieran implicar a este cromosoma. La hibridación con la sonda subtelomérica muestra la presencia de la región 13q34. Se confirma también mediante FISH la presencia de la región 13q14 (Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe; Abbott). Por tanto concluimos que la delección observada en el cariotipo es intersticial y se estima un tamaño de delección que abarca 13(q21-q31). También se realizó estudio citogenético mediante cariotipo a los padres, siendo estos normales en ambos casos.

Discusión: Los pacientes con el síndrome 13q- presentan un fenotipo muy variable que va a depender tanto del tamaño de la delección, como de la región delecionada. Así largas delecciones van a incrementar el riesgo de daño severo en diferentes órganos y van a hacer que estos pacientes tengan una corta esperanza de vida. De ahí la importancia determinar con mayor precisión el tamaño de la delección, por lo que sería recomendable realizar estudio de CGH array.

0068. CARDIOPATÍA CONGÉNITA EN UNA PACIENTE CON DIAGNÓSTICO CITOGÉNÉTICO DE ISOCROMOSOMA X

A. Sánchez Muñoz, C.M. Reillo Sánchez, L. Valiente López y P. Blanco Soto

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

Introducción: Las cardiopatías congénitas son malformaciones frecuentes, aproximadamente 7 de cada 1000 recién nacidos presentan una malformación cardiovascular. Se encuentran en cerca de 400 síndromes, sean estos multifactoriales, de origen génico o cromosómico. Las alteraciones debidas a cambios en el número o la estructura de los cromosomas se acompañan frecuentemente de alteraciones cardíacas. La monosomía del cromosoma X, o síndrome de Turner se acompaña de defectos cardíacos en cerca del 20% de los casos, siendo la coartación de la aorta la más típica. El síndrome de Turner es un síndrome que consiste en la falta completa o parcial del cromosoma X. Es una de las anomalías más comunes con una frecuencia de 1/3.000 en recién nacidos. Al igual que ocurre con el fenotipo, el cariotipo de estas pacientes es variable. De acuerdo con los análisis citogenéticos, el 50-60% de los pacientes con síndrome de Turner presentan un cariotipo 45X, el resto presentan alteraciones estructurales de uno de los cromosomas X (46,X,i (Xq); 46,X,del (Xp); 46,X,del (Xq), 46,X,r(X), 46,X,i (Xp); translocaciones e inversiones, o más frecuentemente un mosaicismo. Presentamos a una paciente con diagnóstico de cardiopatía congénita al nacimiento (estenosis aórtica con válvula displásica) y fenotipo peculiar.

Material y métodos: Se realiza estudio de citogenética convencional de cariotipo con tinción de bandas G tras cultivo de sangre de 72 horas con feto-hemaglutinina y citogenética molecular con estudio de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sonda centromérica para el cromosoma X (DXZ1), sonda específica Vysis LSI: Di George/VCF/ARSA de la región 22q11.2 cuya delección está asociada a los síndromes englobados en el CATCH 22 y sonda Vysis LSI ELN que reconoce la región 7q11.23 cuya delección está asociada al síndrome de Williams.

Resultados: El estudio de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sonda centromérica del cromosoma X muestra la presencia de dos señales de fluorescencia en los 300 núcleos analizados. Las metafases estudiadas por FISH informan que una de las señales de hibridación se encuentra sobre un cromosoma de menor tamaño que su homólogo. La hibridación con sonda para la región 22q11.2 y 7q11.23 muestra que esta región está conservada en ambos cromosomas. El estudio citogenético mediante cariotipo con patrón de bandas G informa que un cromosoma X es normal y otro cromosoma X es recombinante, formado por la unión de dos brazos largos de un cromosoma X cariotipo: 46, X, iXq.

Conclusiones: La monosomía de todos los genes del brazo corto del cromosoma X, produce un fenotipo similar a la monosomía X completa, síndrome de Turner. A la vista de los resultados desde la Unidad de Genética se solicitan datos clínicos sobre la paciente y sus familiares así como sangre de la madre de la paciente para completar el estudio y determinar si dicha alteración genética es heredada o de novo.

0069. DELECCIÓN DEL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA 18: 18 XY DEL 18Q21-TER

A. Sánchez Muñoz, C.M. Reillo Sánchez, L. Valiente López y J. Úbeda Arades

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

Introducción: El síndrome 18q- es una alteración cromosómica muy poco frecuente que implica pérdida de material genético en el brazo largo del cromosoma 18. Suele tener lugar de forma espon-

tánea en las primeras etapas del desarrollo embrionario, y suele afectar más a hombres que a mujeres (3/2) con una frecuencia de 1 cada 40.000 nacidos vivos. La clínica de este síndrome es muy variable y depende de la mayor o menor cantidad de material genético deleciónado, lo que hace difícil su diagnóstico clínico. Entre los signos y síntomas asociados a este síndrome se encuentran talla corta, retraso mental, retraso madurativo, convulsiones, hipotonía, sordera, alteraciones craneofaciales y de extremidades y alteraciones en el comportamiento.

Caso clínico: Presentamos a un paciente de dos meses de edad con desarrollo pondoestatural (< P3), alteraciones auditivas pendientes de confirmar y pies talo-valgos no reductibles. Peso al nacimiento 1.930 g.

Material y métodos: Se realiza estudio de citogenética convencional de cariotipo con tinción de bandas G tras cultivo de sangre de 72 horas con fitohemaglutinina y citogenética molecular con estudio de hibridación in situ fluorescente (FISH).

Resultados: El estudio de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sonda del cromosoma 18 muestra la presencia de dos señales de fluorescencia en los 300 núcleos analizados. Las metafases estudiadas por FISH informan que una de las señales de hibridación se encuentra sobre un cromosoma de menor tamaño que su homólogo. El estudio citogenético mediante cariotipo con patrón de bandas G informa de una monosomía parcial del brazo largo del cromosoma 18. Fórmula cromosómica: 46,XY, del 18q21-ter.

Conclusiones: El síndrome 18q- es una alteración cromosómica que resulta de una deleción de una porción del brazo largo del cromosoma 18. En algunos casos la deleción puede ser intersticial, terminal o incluso afectar a solo un porcentaje de células del individuo. Debido a esto la clínica que presentan estos pacientes es muy variada, y va a depender del tamaño de la deleción, lo que en general, puede correlacionarse con la gravedad del fenotipo. Al igual que la variedad de signos y síntomas que pueden estar presentes en pacientes con esta patología, el pronóstico es muy variable de ahí la importancia de establecer el alcance de la alteración y así poder realizar un diagnóstico, tratamiento y pronóstico más precisos.

0070. UN NUEVO POLIMORFISMO EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN PTGDR EN EL ASMA

M. Sacristán Santos, C. Sanz Lozano, V. García Solaesa, B. García Berrocal, I. Dávila González, F. Lorente Toledano y M. Isidoro García

Complejo Hospitalario de Salamanca. España.

Introducción: En la región promotora del receptor de la prostaglandina D2 (PTGDR) se han descrito diversos polimorfismos que han sido asociados con ciertos fenotipos de asma. El objetivo de este estudio es el análisis de dicha región promotora de PTGDR en una población de pacientes con asma.

Material y métodos: En este estudio se han incluido 157 individuos, 91 pacientes con asma y 66 controles que cumplían estrictos criterios de selección. La extracción del DNA se realizó con el sistema MagNA Pure Compact (Roche) y la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa tras la que se realizó una purificación de los amplicones mediante el kit GeneClean Turbo (Q-BIOgene, Cleveland, Ohio, EEUU) para proceder a la secuenciación de los mismos en un 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, EEUU). Los resultados fueron analizados con el programa Chromaspro (2003-07; Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australia) y el software AlingX (VectorNTI Advance 10, Invitrogen CA, USA). El estudio de las variables cualitativas se realizó con paquete estadístico SPSS 18.0 y el estudio alélico mediante la plataforma Shesis.

Resultados: El análisis de los alineamientos de las secuencias obtenidas nos permitió detectar la presencia de una nueva variante en la región promotora localizada en la posición -883C > T. El

estudio de asociación génica ha permitido detectar un aumento de la frecuencia del alelo T en los controles (27%) frente a los pacientes con asma (17%) $p = 0,029$; OR = 0,54 (IC95% = 0,31-0,94). En este estudio se confirmó el cumplimiento del equilibrio Hardy-Weinberg.

Conclusiones: En este estudio se ha identificado por primera vez un nuevo polimorfismo en la región promotora del gen PTGDR. Consiste en una transición en la posición -883 T > C. Asimismo, se detecta cierta tendencia de asociación con el asma en la que se pone de manifiesto un posible carácter protector del alelo T en nuestra población.

Agradecimientos: Junta de Castilla y León proyectos HUS01A08, GRS224/A/08, GRS205/A/08, GR255. Caja de Burgos ayudas 2010, FIS P509/02068, FIS P110/01706.

0071. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES RELACIONADAS CON ENFERMEDADES MITOCONDRIALES MEDIANTE MINISECUENCIACIÓN

A. Delmiro Magdalena, I. Gómez Manjón, J.C. Rubio Muñoz, L. Rufián Vázquez, J. Arenas Barbero y M.Á. Martín Casanueva

Laboratorio Enfermedades Mitocondriales. Servicio Bioquímica Clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre. Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Madrid. España.

Introducción: La metodología de minisequenciación se utiliza desde hace varios años, especialmente en el campo de la genética forense, para la caracterización simultánea de SNPs (single nucleotide polymorphisms). Hoy en día dicha técnica se ha convertido en una herramienta robusta y accesible para los laboratorios que realicen estudios moleculares de rutina. Instrumentalmente se requiere un termociclador y un secuenciador de capilares tradicional con capacidad para análisis de fragmentos.

Objetivos: Mejorar el diagnóstico molecular de patologías mitocondriales mediante el diseño de un panel de mutaciones puntuales frecuentes y optimizar un protocolo de análisis mediante minisequenciación (SNaPshot™).

Material y métodos: Se han empleado muestras de DNA procedentes de sangre y músculo de pacientes control y portadores de mutaciones conocidas relacionadas con MELAS, MERFF, LHON, MILS, NARP entre otras. Asimismo se han testado mezclas de concentración conocida de fragmentos clonados de mtDNA con diferentes mutaciones para evaluar la capacidad de este método en la cuantificación de los niveles de heteroplasmia. Se han usado varios cebadores y sondas previamente publicados, y otros de nuevo diseño mediante las herramientas Primer3, SNPcheck, BLAST tool y Autodimer, teniendo en cuenta la posible interferencia de polimorfismos adyacentes a la mutación de interés (tablas). El primer paso comprende una PCR múltiple con todos los cebadores. A continuación, tras la purificación, se realiza la reacción de minisequenciación con 17 sondas específicas y seleccionadas para las mutaciones puntuales de interés.

Resultados: En total se han analizado 100 controles y 20 casos y se han validado 12 mutaciones diferentes de pacientes previamente diagnosticados mediante PCR-RFLP y secuenciación directa sin obtener falsos positivos ni falsos negativos. En concreto se han verificado correctamente las siguientes mutaciones puntuales: m.3460G > A, m.14484T > C, m.3243A > G, m.8344A > G, m.13513G > A, m.13514A > G, m.11778G > A, c.1399G > A, m.9176T > G, m.8993T > G, m.8993T > C, m.14487T > C. En cuanto a la evaluación de los niveles de heteroplasmia se ha observado que la altura de los picos o el área en el electroferograma no se correlacionan adecuadamente con la carga mutacional.

Conclusiones: Se ha comprobado la fiabilidad de esta técnica para el análisis de SNPs a pequeña escala y su idoneidad para el uso rutinario en un laboratorio de diagnóstico molecular. El tiempo

de análisis es de aproximadamente 3 horas de operador y 5 horas en equipos para procesar una tanda de 16 muestras. Los costes metodológicos son conmedidos y no superan los 6€ por muestra. En cambio, esta metodología no resulta adecuada para la evaluación precisa del grado de heteroplasma, dado que deberían realizarse curvas estándar para cada mutación y no puede garantizarse una cuantificación correcta por debajo de una carga mutacional del 20%.

Cebadores (Multiplex PCR)

Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	pb
tataccacacaccaccaag	gcggtgatgtagagggtgat	328
accactttcaccgctacacg	atggtgggcatcacgtagt	272
aatgccttagccacttctt	tcattaggagggtgagagg	396
tcaacacctctctagcctta	gggtaaaaggagggaattt	197
cacgggcttacatcctcatt	gggggtaaggcgaggttag	158
attggcagcttagcattagc	caggagggttagcgatgagag	132
ctccatcgtaacccacta	ttctgaatttgggggaggt	170
cagaggcacaggcactta	aaggcctggctacctctctc	110

Sondas (minisequenciación)

Mutación	Sonda 5'-3'
m.10158T > C	acaactcaacggctacatagaaaa
m.3460G > A	(GACT)2ctcttttggtgaagagttttatRg
m.14459G > A	(GACT)2GACctcaggatactcctcaatagccatc
m.10191T > C	(GACT)3cgagtgcggttcgaccctata
m.14484T > C	(GACT)3atcgctgtagtatatccaaagacaacYa
m.3243A > G	(GACT)4Gaacagggtttgttaagatggcag
m.11777C > A	(GACT)5Gcaaacacgaacgcactcacagt
m.8344A > G	(GACT)5ggcatttctactgtaaagaggtYgg
m.13513G > A	(GACT)7ttcctcacaggtttctactcctaaa
m.14487T > C	(GACT)8gttttttaattttatttaggggga
m.11832G > A	(GACT)7GACtcaactctactcccaatagctttt
t	
m.13514A > G	(GACT)10Ttgcgggtttcgatgatgtgg
m.11778G > A	(GACT)9Gagaagtccttgagagagattatgatg
c.1399G > A	(GACT)10gagatgaagaagtcgttgatggatctg
m.9176T > C/G	(GACT)11Gatccaagcctacgttttcacattc
m.14482C > A/G	(GACT)11atcgctgctgtagtatatccaaagacaac
m.8993T > G/C	(GACT)13GcctactcattcaaccaatagcYc

0072. DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE ANÁLISIS MEDIANTE MINISECUENCIACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL HAPLOGRUPO MITOCONDRIAL

A. Delmiro Magdalena, J.C. Rubio Muñoz, L. Hernando Orden, A. Blázquez Encinar, J. Arenas Barbero y M.Á. Martín Casanueva

Laboratorio Enfermedades Mitocondriales. Servicio Bioquímica Clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre. Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Madrid. España.

Introducción: En los últimos años diversos estudios han puesto de manifiesto la influencia del haplogrupo del ADN mitocondrial (mtDNA) en las manifestaciones clínicas de diversas patologías mitocondriales. El haplogrupo está determinado por una serie de SNPs (single nucleotide polymorphisms) que tradicionalmente se han estudiado mediante protocolos secuenciales de PCR-RFLP. En la actualidad la técnica de minisequenciación permite el estudio simultáneo de varios SNPs y podría resultar adecuada para la caracterización de los principales haplogrupos del continente europeo y del americano.

Objetivos: Diseñar un panel de SNPs característicos que permitan definir los principales haplogrupos mitocondriales y optimizar su análisis mediante un protocolo de minisequenciación (SNAPs-hot™).

Material y métodos: Se han empleado muestras de DNA procedentes de sangre y músculo esquelético de controles cuyo haplogrupo se determinó mediante secuenciación completa del mtDNA. Se han diseñado los cebadores y sondas correspondientes mediante las herramientas Primer3, SNPcheck, BLAST tool y Autodimer teniendo en cuenta la posible interferencia de polimorfismos adyacentes a la mutación de interés (tablas 1 y 2). La selección de SNPs se ha basado en la clasificación recogida en la base de datos online MITOMAP. El primer paso comprende una PCR múltiple con todos los cebadores. Posteriormente se realiza la reacción de minisequenciación con las sondas específicas seleccionadas para los SNPs característicos de cada haplogrupo. Para el análisis post-ensayo se ha configurado una tabla en Ms. Excel que, tras la introducción de los resultados, informa automáticamente del haplogrupo obtenido. El diseño propuesto caracteriza de manera directa los siguientes haplogrupos: L3, M*, C, D, M3, N*, A, U*, K, Tj*, J*, T*, HV*, V, H* y de forma indirecta el haplogrupo G.

Tabla 1. Cebadores (Multiplex PCR)

Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	pb
ccctaacaccagcctaacca	aggctaagcggtttgagctg	426
gattccgctacgaccaactc	caactgcctgctatgatgga	828
caaacccagctacgcaaat	gagaggagggtggatggaat	236
ggcctgactggcattgtatt	agcgaaggcttctcaaatca	378
actgcaggccactactcat	gaggagcgttatggagtga	317
ccctaccatgagccctacaa	tcactggataagtggtggtt	741
atgccccatgtcttaaac	tggtcagtgctcagttcgag	311
ccccctagcagaaatagcc	gcgagggtgtgagttttag	684
tctcgacggactacaacc	aggagtgaagcgaagtcca	180

Resultados: Se ha realizado la validación con 16 muestras de pacientes de los que se disponía de la secuenciación completa del mtDNA. Todos los casos han sido correctamente asignados y se han podido verificar 9 haplogrupos diferentes: H*, U*, T*, J*, V, C, K, G y L3.

Conclusiones: Este protocolo de análisis permite una identificación fiable y rápida (tiempo de procesamiento total de aproximadamente 8 horas) de los haplogrupos mitocondriales principales con un coste metodológico razonable de 6€ por muestra.

0073. IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL GEN EMD EN UN PACIENTE CON SOSPECHA CLÍNICA DE DISTROFIA MUSCULAR DE EMERY-DREIFUSS

A. Escudero López^a, P. Carrasco Salas^a, P. Martínez Montero^a, L. Fernández^a, S.I. Pascual Pascual^b, M. Gutierrez Molina^c y J. Molano Mateos^a

^aINGEMM; ^bNeuropediatría; ^cAnatomía Patológica. Hospital Universitario La Paz. España.

Introducción: La distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED) es una enfermedad hereditaria rara que se caracteriza por: 1) contracciones articulares que aparecen en los primeros años de vida, 2) debilidad muscular con distribución escapulo-humeral, de aparición más tardía y 3) defectos de conducción cardíaca, arritmias y cardiomiopatía, de aparición en la edad adulta. La enfermedad puede seguir un patrón de herencia ligada al cromosoma X, como resultado de mutaciones en el gen *EMD*, que codifica la proteína emerina, o de mutaciones en el gen *FHL1*, que codifica la proteína FHL1; o una herencia autosómica dominante o autosómica recesi-

Tabla 2. Sondas minisequenciación

Haplogrupo	SNP	Sonda 5'-3'
A	A663G	(GACT)ccccataaacaataggtttgtcct
C	A13263G	(GACT)GGaaatcgtagccttctccacttcaagYca
D	C5178A	(GACT)GATggatggaattaagggtgttagtcatgtta
H*	T7028C	(GACT)2GAagctcctattgataggacatagtggaagtg
HV-group*	C14766C	(GACT)4GTcaccaatgacccaataacgcaaaa
V	G4580A	(GACT)3gattttttacctgagtaggcctagaaataaacat
UK-group* (U*)	A12308G	(GACT)6GActatccattggtccttaggcccacaa
K (Uk)	A12308G	(GACT)6GActatccattggtccttaggcccacaa
	G9055A	(GACT)6GAccacactactcatgcacctaattggaaRc
J*	G13708A	(GACT)8GAcctgcgaataggcttccggcYg
T*	A4917G	(GACT)7tctcaatcatatacctaattctctccctacta
TJ-group*	T4216C	(GACT)9ctggagattgtaagggtatggagacat
M*	C10400T	(GACT)7agtcgaaatcattcgtttgttttaactatatacceaYtc
	A10398G	(GACT)10cctatgagtgactacaaaaggattagactga
M3	C10400T	(GACT)7agtcgaaatcattcgtttgttttaactatatacceaYtc
	T10873C	(GACT)11Gtcccacagcctaattattagcatcatccc
	G4580A	(GACT)3gattttttacctgagtaggcctagaaataaacat
N*	C10400C	(GACT)7agtcgaaatcattcgtttgttttaactatatacceaYtc
	A10398A	(GACT)10cctatgagtgactacaaaaggattagactga
	T10873T	(GACT)11GTcccacagcctaattattagcatcatccc
L3	C10400C	(GACT)7agtcgaaatcattcgtttgttttaactatatacceaYtc
	T10873C	(GACT)11GTcccacagcctaattattagcatcatccc

va, por mutaciones en el gen *LMNA*, localizado en 1q21, que codifica la lamina A/C. Las deleciones descritas en el gen *EMD* son, en la mayoría de los casos, o deleciones pequeñas (10-25 pb) o grandes deleciones, que implican normalmente al gen entero, aunque hay algunos casos descritos con deleción de algunos de los 6 exones del gen *EMD*.

Objetivos: Establecer el diagnóstico de un paciente varón de 16 años con implante de marcapasos endovenoso secuencial por bloqueo aurículo-ventricular de grado avanzado, que en la exploración física presenta además una ligera debilidad facial, contracciones articulares en codos y caderas, leve acortamiento aquileo y leve atrofia supraescapular.

Material y métodos: Se solicitó analítica completa (hemograma, bioquímica y gasometría), electromiograma (EMG), biopsia muscular y estudio genético de DMED. El estudio genético se realizó mediante secuenciación de los genes *LMNA* y *EMD*. La cuantificación de la dosis génica del gen *EMD* se realizó mediante la técnica de Multiplex Ligation Probe-Dependent Amplification (MLPA) con sondas diseñadas específicamente para este diagnóstico.

Resultados: En la analítica destaca la elevación de las enzimas séricas GOT (54 UI/L), LDH (380 UI/L) y CPK (1320 UI/L), resto normal. La biopsia muscular reveló una miopatía de mínimos cambios. Sin embargo, inmunohistoquímicamente se detectó una ausencia de Emerina lo que sugirió el diagnóstico de DMED. La secuenciación del gen *LMNA* descartó cualquier alteración puntal en este gen. Sin embargo, después de intentar secuenciar los exones del gen *EMD* no se consiguieron amplificar los exones 1 y 2, lo que sugería una posible deleción que comprendía esta zona. Este resultado coincidía con los resultados de la inmunohistoquímica. El abordaje experimental actual es establecer la extensión de la deleción. Hemos comprobado mediante PCR que el gen adyacente al gen *EMD* hacia el extremo 5', el gen que codifica la filamina (gen *FLN*), no estaba delecionado. Este hallazgo limita la extensión de la deleción a menos de 10 Kb, que es la distancia entre ambos genes.

Conclusiones: Aunque la mayoría de las mutaciones descritas en los genes implicados en la DMED son mutaciones puntuales, no hay que descartar la posibilidad de que existan deleciones o duplicaciones de algún exón del gen o del gen entero. Por eso debe completarse la secuenciación de los genes implicados en DMED con otro método cuantitativo, como la técnica de Multiplex Ligation-

dependent Probe Amplification (MLPA), o arrays-CGH específicos, sobre todo en el caso de mujeres portadoras de DMED ligada al X.

0074. ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN CFTR EN PACIENTES CON AZOOSPERMIA EN NUESTRO ENTORNO HOSPITALARIO

A. Pérez-Alija Fernández, M. Martínez López, M.C. García Rivera, R. Coscojuela Berga, F. Ben Jelloun, M. López Melchor, A. Guzmán Olmedo y J.V. García Lario

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva común que afecta a una de cada 2.500 personas en la población caucásica. La enfermedad está producida por mutaciones en el gen CFTR. Uno de los síntomas que presenta la enfermedad es la infertilidad masculina, ya que la gran mayoría de los pacientes afectados de FQ presentan azoospermia obstructiva provocada por alteraciones en los vasos deferentes. Diferentes estudios han demostrado una mayor frecuencia de mutaciones en CFTR en pacientes con agenesia bilateral de vasos deferentes, CBAVD. El alelo 5T, del intrón 8 del gen, conduce a una mayor proporción de RNAm carente del exón 9 que las otras dos variantes 7T y 9T. Esta variante 5T es la mutación más frecuente asociada CBAVD.

Objetivos: Estudiar las mutaciones del gen CFTR, así como la sección de poli T asociada al intrón 8 en pacientes provenientes con problemas reproductivos y compararlos con población sana para observar las posibles diferencias.

Material y métodos: Analizamos las muestras obtenidas de 90 pacientes masculinos provenientes de la consulta de reproducción con diagnóstico de azoospermia y las comparamos con los resultados obtenidos en 100 personas sin patología conocida. Consideramos la presencia de un solo alelo mutado como presencia de riesgo para la CBAVD al igual que la del alelo 5T. El estudio de las mutaciones se realizó mediante PCR seguido de ensayo de ligación con oligonucleótidos y análisis mediante electroforesis capilar. Los datos obtenidos en el estudio se trataron con el programa R.

Resultados y conclusiones: Entre la población sana se obtuvieron un total de 5 personas con al menos una mutación o el alelo 5T,

mientras que en los pacientes con problemas reproductivos esta cifra subía a 16. Se realizó un test chi cuadrado con corrección de Yates y a 0,05, comprobándose que existen diferencias significativas, $p < 0,05$ entre ambos grupos poblacionales. De esta manera podemos afirmar que la presencia del alelo 5T o ser portador de una mutación en CFTR aumenta el riesgo de padecer problemas reproductivos en varones por azoospermia obstructiva.

0075. ESTUDIO DE MUTACIONES GERMINALES EN EL "EXÓN 4" DE BRCA1 EN FAMILIAS CON SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y/U OVARIO

I. Ortega Madueño, M. de la Hoya, A. Díaz Díaz, F. Maciñeira Bertrán de Lis, T. Caldés y M. Arroyo Fernández

Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

Introducción: De todos los casos de cáncer de mama, del 5 al 10%, presentan un componente genético atribuible a mutaciones heredadas de forma autosómica dominante. Se han identificado dos genes principales de susceptibilidad: *BRCA1* (17q21) y *BRCA2* (13q12). *BRCA1* es un gen de gran tamaño que da lugar a una proteína de 1.863 aminoácidos implicada en la reparación de lesiones del DNA. La mayoría de las mutaciones descritas en este gen, consisten en inserciones, deleciones o sustituciones de un nucleótido por otro que alteran el marco de lectura generando un codon stop prematuro o el cambio de un aminoácido. También se han identificado mutaciones patogénicas en regiones no codificantes que afectan al proceso de eliminación de intrones (splicing) generándose ARNm anormales. En cualquier caso, el resultado de la mutación será una proteína truncada o no funcional que aumenta la susceptibilidad de padecer cáncer en la persona que la presenta. Al tratarse de mutaciones germinales, el estudio genético de las pacientes y sus familiares se realiza en sangre y debido a la longitud del gen, se centra en regiones codificantes y las regiones intrónicas adyacentes. Originalmente, se describieron 24 exones en el gen *BRCA1*. Actualmente, las bases de datos describen 23 exones. La discrepancia se debe a que la secuencia genética descrita originalmente como "exón 4" no aparece en los mensajeros maduros. Por esta razón, el "exón 4" no se incluye en los protocolos de screening diagnóstico. Nosotros nos hemos planteado la siguiente hipótesis: pueden existir mutaciones germinales en el "exón 4" que transformen esta secuencia en un verdadero exón que se inserte en el mensajero maduro, lo que podría afectar a la función de la proteína.

Objetivos: Estudio de mutaciones germinales en el "exón 4" de *BRCA1* en casos índice de familias con síndrome de cáncer de mama y/o ovario en los que no se detectó ninguna mutación en *BRCA1* ni *BRCA2* en los estudios habituales.

Material y métodos: Se estudiaron 275 casos (pacientes y familiares) utilizando DNA extraído de sangre y almacenado a -20 °C. El screening de mutaciones se realizó mediante HRM (High Resolution Melt) (7500 Fast Real Time PCR System). La confirmación y caracterización de las mutaciones detectadas tras el screening se llevó a cabo mediante secuenciación utilizando el método dideoxi de Sanger (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer).

Resultados: En el análisis de las curvas de HRM, se detectó un patrón mayoritario y dos patrones alternativos. Tras la secuenciación, se comprobó que la diferencia observada en estas curvas se debía a la presencia de un polimorfismo (SNP) ya descrito (rs:75129942 C/T), de manera que uno de los patrones de HRM se debía al cambio en heterocigosis (16 pacientes (5,8%)) y el otro al cambio en homocigosis (1 paciente (0,4%)).

Conclusiones: En el estudio realizado en el "exón 4" solo se ha encontrado una mutación correspondiente a un SNP descrito en la población general. No se ha identificado ninguna mutación que pueda explicar síndrome de cáncer de mama o/y ovario en esta población.

0076. SÍNDROME DE FANCONI O VACTERL EN PACIENTE CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON: A PROPÓSITO DE UN CASO

M.M. Rodríguez Pedreira, B. Dos Santos Marcano, R. Souto Fernández, J. Peteiro Cartelle, S. García Mayo, A. Álvarez Rueda, I. Constanso Conde y B. Pedregal Arias

CHU A Coruña. España.

Caso clínico: Motivo de interconsulta a la Unidad de Genética: paciente varón con sospecha clínica de síndrome de Fanconi, antecedentes familiares de enfermedad de Huntington y patología social (régimen de acogida). Descripción del caso: varón de 16 años con criptorquidia izquierda y retraso psicomotor. Pruebas complementarias. Ecografía: riñón ectópico pélvico cruzado no funcionante. Comunicación interauricular tipo ostium secundum. Ureterografía: reflujo vesico-ureteral izquierdo grado III-IV. Radiografía: agenesia de radio derecho e hipoplasia de cúbito. Amputación del 1º dedo. Hernia diafragmática. RM: hemivértebra T3 derecha y malformación Chiari tipo I. Estudio genético: enfermedad de Huntington: genotipo 17CAG/47CAG (normal: 9-29, riesgo expansión: 30-35, penetrancia incompleta: 36-39, patológico: > 39). El número de repeticiones (CAG)_n del gen IT15 fue estudiado mediante PCR.

Discusión: El paciente no presenta síntomas en el momento del estudio para enfermedad de Huntington. Su madre biológica fue diagnosticada para esta entidad previamente por cuadro de predominio psiquiátrico. La enfermedad de Huntington es un trastorno progresivo de la función motora, cognitiva y que se acompaña de alteraciones psiquiátricas. La edad media de aparición es entre 35 y 40 años y el tiempo de supervivencia media es de 16 años tras el diagnóstico. En este caso, según la literatura, una expansión de 47 CAG se corresponde con una edad de manifestación de la enfermedad de entre 31 y 35 años. La anemia de Fanconi es una enfermedad recesiva con inestabilidad cromosómica y que afecta a 1/350.000. Se caracteriza por anemia aplásica y distintas malformaciones congénitas de aparato urinario y músculoesquelético y es debida a mutaciones en los genes FANCI. También se incluye en el diagnóstico diferencial la asociación VACTERL (Trastornos vertebrales, atresia anal, cardíacos (CIA), fistula traqueoesofágica, displasia radio y amputación 1º dedo y Chiari tipo I que aparece de forma esporádica). Se asocia también a síndrome hemolítico urémico. En este caso se plantea un problema ético de diagnóstico de enfermedad no tratable ni curable en un menor de edad. Debido a la problemática social, fueron los Servicios sociales que ostentaban la tutela, los que avalaron la realización del estudio de cara a la futura adopción por parte de la familia de acogida del menor. Además el paciente fue diagnosticado de anemia de Fanconi de forma clínica, aunque no pueda descartarse el diagnóstico de VACTERL. El estudio genético para el síndrome de Fanconi está pendiente de resultado. Se ha informado a la familia que en estos momentos ostenta ya la tutela de que esta entidad presenta un patrón de herencia autosómico dominante y por lo tanto, el riesgo de transmisión a la descendencia es del 50%. Evolución: seguimiento y control de las complicaciones derivadas del diagnóstico de anemia de Fanconi/VACTERL. Seguimiento psicológico al paciente y la familia de adopción por el diagnóstico de enfermedad de Huntington.

0077. ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR DE MICRODELECIONES DEL CROMOSOMA Y

B. Pérez Nevot^a, A. Rosales Martínez^b, M. Martínez Atienza^b, I. Delgado Salazar^b, J. Gil Valencia^b, C. Amezcua^b y S. Pedrinaci Rodríguez^b

^aComplejo Hospitalario Virgen de la Victoria. Málaga. España.

^bHospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: Se ha identificado en el cromosoma Y la región susceptible de sufrir deleciones denominada AZF (factor de azo-

ospermia), que se dividió en 3 subregiones: AZFa, AZFb y AZFc, en las que se encuentran genes relacionados con la espermatogénesis. Las microdeleciones del cromosoma Y(MDC-Y), tras el síndrome de Klinefelter, constituyen la segunda causa genética más frecuente de infertilidad masculina, estando presentes entre 2-10% de hombres estériles. Esta incidencia puede aumentar si utilizamos unos criterios más estrictos de selección: oligozoospermia severa y azoospermia no obstructiva. Las microdeleciones más frecuentes son aquellas que afectan a la región AZFc (60%), seguidas por AZFb (16%) y raramente afectan a AZFa (5%). Microdeleciones mayores que afecten a 2 o 3 regiones se diagnostican en un 14% de casos. Con el reciente auge de la reproducción asistida mediante ICSI (microinyección espermática), el estudio de MDC-Y ha cobrado especial importancia debido, por un lado a la relación genotipo/fenotipo, ya que parece ser que deleciones que afectan a la región AZFc son compatibles con la existencia de espermatogénesis residual que podría permitir la recuperación de espermatozoides a partir de biopsia testicular para ser utilizadas posteriormente en ICSI; y por otro lado, debido a la posibilidad de transmitir esta alteración genética a la descendencia masculina, siendo necesario dar consejo genético a estas parejas. El estudio debe ofrecerse a aquellos pacientes que presenten oligozoospermia severa o azoospermia no obstructiva. En general no está indicado en pacientes que presenten anomalías cromosómicas, azoospermia obstructiva, hipogonadismo hipogonadotrófico y patologías como varicocele, testículos mal descendidos, infecciones.

Objetivos: Estudio descriptivo genético molecular de MDC-Y es varones con problemas de esterilidad en nuestro medio, durante el periodo de marzo de 2005 hasta marzo de 2011.

Material y métodos: Se estudiaron un total de 468 muestras desde marzo de 2005 hasta marzo de 2011. A partir de DNA de sangre periférica se realizó una amplificación mediante dos PCRs multiplex, utilizando 7 marcadores microsatélites para analizar las 3 regiones AZF del cromosoma Y: sY86 (región AZFa), sY127, sY134 (región AZFb), sY254, sY255 (región AZFc, gen DAZ). Como control interno se incluyeron los genes SRY y ZFY, posteriormente se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis capilar.

Resultados: Desde marzo de 2005 hasta marzo de 2011 se han analizado 468 muestras procedentes de varones con problemas de esterilidad de los cuales en 455 casos (97,2%) se descartó la existencia de MDC-Y. En 13 casos se diagnosticó la presencia de microdeleciones que se detallan a continuación: AZFc: 9 (69,2%). AZFb: 1 (7,7%). AZFa: 0. AZFc + AZFb: 2 (15,4%). AZFc + AZFb + AZFa: 1 (7,7%).

Conclusiones: Debido al reciente auge de la reproducción asistida mediante ICSI, el diagnóstico de las MDC-Y es muy importante, tanto por su capacidad de predecir la posible existencia de espermatogénesis residual, como por la necesidad de dar consejo genético ante la posible transmisión de la deleción a la descen-

dencia masculina. La incidencia de microdeleciones es varones con problemas de esterilidad en nuestro medio es de un 2,8%, concordando con la encontrada en la literatura.

0078. HIPOLACTASIA DE TIPO ADULTO: POLIMORFISMOS C/T-13910 Y G/A-22018

L. Vega Prado, A. Beteta López, S. Martínez Huedo, M.P. Bravo Cosgaya, F. Bustos Guadaño y M.T. Gil Ruiz

Hospital Nuestra Señora del Prado. Talavera de la Reina. España.

Introducción: La prueba más ampliamente extendida para valorar la absorción de lactosa es el test del hidrógeno espirado. Es un método no invasivo que mide el hidrógeno en el aire espirado después de una noche de ayuno y post-administración de una dosis de lactosa. En la actualidad, se ha identificado la presencia de dos polimorfismos (C/T-13910 y G/A-22018), en el gen MCM6, asociados con la no persistencia de la lactasa, condición responsable de la malabsorción de lactosa en el adulto.

Objetivos: Nuestro objetivo es estudiar en nuestro hospital la aplicabilidad de las variantes genéticas G/A-22018 y C/T-13910 en el diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto comparando el test genético con el test de hidrógeno espirado.

Material y métodos: A lo largo de este año 2011 se realizó el estudio genético de ambos polimorfismos a 14 pacientes adultos, a los cuales se les solicitó el test del hidrógeno espirado. El procedimiento fue: -Test del hidrógeno espirado: Se realizó una recogida basal (minuto 0 del test) previa a la administración de 50 g de lactosa vía oral. Después de la toma, se recogieron muestras cada 30 minutos durante 3 horas. El test se consideró positivo si los valores superan 20 partes por millón (ppm) respecto al valor basal en cualquier punto de la curva. -Estudio genético de las variantes C/T-13910 y G/A-22018: Se realizó una extracción automatizada de ADN a partir de sangre periférica con el sistema Cobas-Ampliprep (Roche), y una posterior amplificación y detección/revelado con el kit LactoStrip (Operon). Se consideró asociados a persistencia de actividad lactasa los genotipos TT y TC de la variante 13910 y AA y AG de la variante 22018, y asociados a no persistencia de actividad lactasa los genotipos CC de la variante 13910 y GG de la variante 22018.

Resultados: Los resultados del test del hidrógeno y del estudio genético de cada paciente se recogen en la tabla. El test de hidrógeno espirado fue positivo en 7 sujetos. Todos los individuos con test de hidrógeno espirado positivo presentaron el genotipo CC-13910-GG22018. Claramente la cantidad de hidrógeno espirado superó el punto de corte en algún momento de la curva respecto al valor basal en los genotipos C/C-13910 y G/G-22018. Ver tabla a pie de página.

Paciente	13910	22018	H2 ppm					
			0 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
1	C/C	G/G	15	13	30	35	35	30
2	T/T	A/G	8	9	5	3	2	2
3	C/C	G/G	2	2	4	32	28	25
4	C/C	G/G	6	26	68	77	50	53
5	C/T	A/A	1	1	1	1	0	0
6	C/T	A/G	1	2	3	3	3	2
7	C/C	G/G	2	28	8	9	7	7
8	C/C	G/G	11	6	40	65	77	39
9	T/T	A/A	0	1	2	1	2	0
10	C/T	A/G	4	3	3	2	2	3
11	C/C	G/G	9	5	5	34	50	26
12	T/T	A/A	0	0	0	0	1	0
13	C/T	A/G	0	0	0	0	0	0
14	C/C	G/G	5	6	20	27	18	23

Conclusiones: Las dos variantes relacionadas con el fenotipo de persistencia/no persistencia de la lactasa, C/T-13910 y G/A-22018, se pueden utilizar para el diagnóstico de la hipolactasia de tipo adulto. Este test resulta más cómodo para los pacientes y para el personal sanitario, dado que consume menos tiempo, no provoca síntomas gastrointestinales ni sistémicos y solo se necesita hacerlo una vez en la vida.

0079. MUTACIONES EN LA MIOTONÍA CONGÉNITA DE THOMSEN EN NUESTRA POBLACIÓN

S. Freire Franco^a, L. Muñoz Arduengo^a, M.C. Benito López^a, E. del Castillo Acedo del Olmo^a y J. López Siles^a

^aHospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. España.

^bGenetaq. Málaga. España.

Introducción: La miotonía congénita de Thomsen es una enfermedad genética muscular con una incidencia de 1/100000. Forma parte del grupo de enfermedades con afectación de los canales iónicos musculares. Se consideraba que mutaciones diferentes en el gen del canal de cloro muscular (CLCN-1) originan una miotonía de Thomsen (transmisión dominante) y una miotonía de Becker (recesiva). Recientemente se han descrito mutaciones que pueden causar ambos tipos de miotonías, estando asociadas a ambos modos de transmisión.

Material y métodos: Se revisan las sospechas clínicas de M. Thomsen que llegan a la consulta de Genética entre 2001-10. Se realiza anamnesis e historia familiar. Los estudios moleculares se realizan por la amplificación con primers específicos de 23 fragmentos correspondientes a los exones del gen CLCN1 de acuerdo a la secuencia de referencia del NCBI. Secuenciación en doble sentido de los amplicones obtenidos mediante secuenciador automático ABI 3130. Estudio posterior de la secuencia mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Los familiares de los pacientes son analizados tras haber detectado algún hallazgo.

Resultados: De los pacientes estudiados remitidos con clínica, 4 varones y 4 hembras, entre 24-49 años de edad, se determina los cambios descritos en distintas bases de datos (NCBI o HGMD). Ver tabla a pie de página.

Conclusiones: Se debe recomendar el estudio genético a pacientes con sintomatología y a familiares de primer grado que sean mayores de edad que lo soliciten. Según la familia estudiada, el modo de transmisión es dominante o recesivo.

0080. INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS HLA-ABC EN MELANOMAS

A. García Ruano, R. Carretero Coca, M. García Rivera, S. García Chileme, M. López Melchor y F. Garrido Torres-Puchol

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: Una de las características de las células tumorales es la adquisición de un estado de baja inmunogenicidad al que contribuyen factores intrínsecos de la célula tumoral y factores extrínsecos. Los factores extrínsecos pueden ser debidos a un deterioro progresivo, al menos "in situ", de la respuesta inmune antitumoral. Dentro de los factores intrínsecos el mecanismo mejor estudiado, y que contribuye a esta baja inmunogenicidad, son las alteraciones en la expresión de antígenos HLA de clase I y en la maquinaria de presentación antigénica. Para conocer si los niveles de transcripción de estos genes (HLA-A, HLA-B o HLA-C) están alterados en las células tumorales, primero deberíamos conocer cuál es el nivel de transcripción en las células normales de las que derivan estos tumores.

Objetivos: Estudiar la expresión génica de las moléculas de HLA-ABC en melanomas y en piel de personas sanas para saber cómo se comporta este tipo de tumor con respecto al sistema inmune.

Material y métodos: Medimos los niveles transcripcionales de HLA-ABC en 17 líneas celulares de melanoma (ESTDAB) mediante PCR cuantitativa en el analizador Light Cycler de Roche usando cebadores específicos y SGRB-Green. También recogimos muestras de piel normal de 6 pacientes previa obtención del consentimiento informado. Estas muestras fueron cortadas en criostato y los cortes fueron microdisectados para aislar las células de nuestro interés eliminando interferencias por estroma o infiltrados leucocitarios. Tras extraer el RNA de estos tejidos medimos los niveles de transcripción locus específicos de HLA-ABC como hemos descrito anteriormente. Usamos glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6PDH) como gen de referencia.

Resultados: Los resultados obtenidos se expresaron como media.

	LocusA/GPDH (copias/μL)	LocusB/GPDH (copias/μL)	LocusC/GPDH (copias/μL)
Piel normal	2,85	3,94	0,79
Melanomas	17,29	6,86	9,16

Conclusiones: Como podemos observar en los resultados la expresión génica de HLA-ABC en melanomas sufre un aumento con

Caso	Nucleótido cambiado	Posición	Exón	HGMD/NCBI	Mutación familia
1	A > T en homocigosis	IVS1+3	1	CS971660	+madre/+padre
2	C > A en heterocigosis	1701	15	Nd	+ hermano/+sobrino
	C > T en heterocigosis	IVS12+17		Polimorfismo	
	T > C en heterocigosis			Polimorfismo	
3	A > T en heterocigosis	IVS1+3	1	CS971660	+hermana afecta
	C > T en heterocigosis	IVS18+5	18	CS013818	+hermana afecta
	C > T en heterocigosis	IVS10-10		Polimorfismo	+hermana afecta/+ h.sano
	T > C en heterocigosis			Nd	
4	A > T en homocigosis	IVS1+3	1	CS971660	+madre/+padre/+hija
5	C > T en heterocigosis	313	3	CM950262	+madre/+hermano sano
	C > G en heterocigosis	501	4	CM940283	+madre/+hermano sano
					+hermano sano
	G > T en heterocigosis	1488	1	CM940285	
				Polimorfismo	
		IVS10-10			
	G > A en heterocigosis				
6	T > C en heterocigosis	IVS10-10		nd	no
7	G > A en heterocigosis	937	8	CM980364	-madre/+padre
8	C > T en heterocigosis	IVS18+5	18	CS013818	padre afecto ¿?

respecto a la piel normal, que se aprecia tanto en la molécula A, como en la B y la C. Los hallazgos en este tipo de tumor difieren de lo encontrado en una amplia variedad de tumores, que van cursan con una downregulación en la expresión de antígenos HLA de clase I. Las implicaciones biológicas de este hecho están aún por determinar.

0081. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE TUMORES BRCA EN CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

R. Ferreirós Martínez^a, P. Pérez Pérez^a, M. de la Hoya^a, T. Caldes Llopis^a y C. Alonso Cerezo^a

^aHospital Universitario de La Princesa. Madrid. España. ^bHospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

Introducción: En la actualidad, las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 constituyen el factor predictivo más importante de la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama o cáncer de ovario hereditario, aunque tan solo explican hasta un 20% de los casos de cáncer de mama hereditario. Al resto de casos, correspondientes a familias de alto riesgo, es decir aquellos no-BRCA1/2 se les conoce como BRCA. Diversos estudios han mostrado que estos constituyen un grupo histopatológicamente heterogéneo. Así, mientras que los tumores BRCA1 y BRCA2 presentan mayoritariamente sendos receptores hormonales (RE y RPg) negativos y positivos respectivamente, y sin sobreexpresión de HER2, los BRCA presentan niveles variables de estos receptores.

Objetivos: Con este trabajo se pretende describir las características histológicas e inmunohistoquímicas de los tumores BRCA en nuestra serie.

Material y métodos: Se ha realizado el estudio genético de 72 probandos, atendidos en la Consulta de Genética Clínica de este Hospital, pertenecientes a 67 familias con criterios de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. Se llevó a cabo la secuenciación de los genes BRCA1 y BRCA2. Las grandes delecciones o inserciones se detectaron mediante la amplificación de combinaciones de sondas de hibridación (MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification). Las variables recogidas fueron las siguientes: mutaciones, receptores hormonales, Her2 y tipo histológico.

Resultados: En los 72 casos índice estudiados, se han encontrado 6 mutaciones en el gen BCRA-1, 4 mutaciones en el gen BCRA-2 y 14 variantes de significado incierto. Se dispone de información de receptores hormonales y HER-2 de 42 tumores: 26 casos RH+/HER-2-; 5 RH+/HER-2+; 7 RH-/HER-2-; 4 RH-/HER-2+. Histología: Carcinoma ductal infiltrante (CDI), 52; Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI), 1; Carcinoma *in situ* (CIS), 7; CDI/CLI, 4; otras histologías, 2.

Conclusiones: Diferentes estudios han revelado que los tumores BRCA presentan características inmunofenotípicas diferentes de los BRCA1 y BRCA2, siendo muy similares a los tumores esporádicos y presentando una gran heterogeneidad. Este hecho hace que sea muy difícil identificar a aquellos pacientes con una mayor probabilidad de ser portadores de una mutación BRCA. En nuestra serie, sin embargo los tumores BRCA, que constituyen el 66,7% del total de las familias con estudio para BRCA1/2 y el 85,7% de los tumores con datos de receptores hormonales y HER-2, no parecen ser tan heterogéneos. Así los estudios histológicos realizados muestran mayoritariamente tumores de tipo ductal infiltrante (72,6%), con receptores hormonales positivos (72,2%). Los tumores con fenotipo basal (triple negativo) y por tanto con peor pronóstico, con quimioterapia como única opción, corresponden al 19,4% del total de los tumores BRCA con datos inmunohistoquímicos. La discrepancia observada entre nuestros resultados y aquellos recogidos en la bibliografía puede atribuirse al reducido número de casos estudiados.

0082. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE HLA-ABC EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y SU EXPRESIÓN EN SUPERFICIE CELULAR

A. García Ruano, J.M. Romero Noguera, I. Romero García, A. Guzmán Olmedo, A. Rosales Martínez y F. Ruiz-Cabello Osuna

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: Cuando estudiamos la expresión de un gen no sabemos con exactitud si va a traducirse a proteína ejerciendo por tanto su acción biológica.

Objetivos: El objetivo de nuestro estudio era comprobar que los niveles de expresión génica de las moléculas de HLA-ABC se correlacionaban con la expresión de las mismas a nivel de superficie para saber si cuantificando la expresión génica podíamos extrapolar a nivel superficial.

Material y métodos: Para comprobarlo tomamos muestras de sangre periférica de 9 personas sanas y medimos la expresión de las moléculas de HLA-ABC en la superficie de los linfocitos mediante citometría de flujo usando el anticuerpo monoclonal W6/32-PE que va dirigido contra el complejo cadena pesada/ β 2microglobulina. Además cuantificamos el mRNA de la cadena pesada de las moléculas de HLA-ABC por PCR cuantitativa en el analizador Light Cycler de Roche usando cebadores específicos y SGRB-Green. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

Muestra	Expresión en superficie	Expresión génica
1	2.553	3.488,10
2	1.251	307,88
3	1.276	194,49
4	1.358	507,38
5	1.410	506,06
6	1.347	414,63
7	1.465	24,49
8	581	21,28
9	2.383	792,86

Conclusiones: El coeficiente de correlación de Pearson (r) es igual a 0,73 lo que indica que existe una relación directa entre ambas variables. El coeficiente de determinación (r^2) fue igual a 0,532 lo que significa es que el 53,2% de la variación en los niveles de expresión en superficie de las moléculas de HLA-ABC es debida a variaciones en los niveles de transcripción de las mismas.

0083. LAS MOLÉCULAS DE HLA DE CLASE I PRESENTAN RITMO CIRCADIANO

A. García Ruano, A.I. Rodríguez Fernández, I. Romero García, M. García Rivera y F. Ruiz-Cabello

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción y objetivos: Con el fin de profundizar en el conocimiento que tenemos sobre el HLA de clase I decidimos poner en marcha un experimento para estudiar si estas moléculas presentaban ritmo circadiano.

Material y métodos: Para ello tomamos muestras de sangre periférica de ocho personas sanas de un rango de edad comprendido entre 23 y 35 años a las 8 a.m. y a las 8 p.m. Cuantificamos las moléculas de HLA-ABC expresadas en la superficie de los linfocitos. Esta medida fue realizada mediante inmunofluorescencia directa usando el anticuerpo W6/32-PE (Dako, Ref R7000) dirigido contra el complejo cadena pesada/ β 2microglobulina. La fluorescencia fue analizada con el citómetro de flujo FACS Sort (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, EEUU).

Resultados: Para el análisis estadístico aplicamos el test T para muestras apareadas (SPSS versión 15.1). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

Paciente	Media fluorescencia 8AM	Media fluorescencia 8PM
1	88.766	96.876
2	78.271	111.000
3	72.991	92.508
4	60.211	80.075
5	95.880	98.192
6	95.751	89.000
7	102.886	111.026
8	89.518	97.801

Conclusiones: Como se puede observar, existen diferencias estadísticamente ($p = 0.032$) significativas en la cantidad de HLA de clase I que expresan los linfocitos de sangre periférica siendo esta menor a las 8 am y mayor a las 8 pm con la excepción de una muestra que sucedió lo contrario. Este ritmo es inverso al que se ha observado para el cortisol ya que para esta hormona se observa un pico máximo a las 8 a.m. Uno de los efectos del cortisol en las funciones de los leucocitos es disminuir su capacidad de presentación antigénica. Este hecho es otra evidencia más de la conexión existente entre sistema endocrino y sistema inmune.

0084. INCONTINENCIA PIGMENTI: GEN NEMO-PATRÓN DE INACTIVACIÓN CROMOSOMA X

S. Franco Freire^a, L. Muñoz Arduengo^a, M.C. Benito López^a, E. del Castillo Acedo del Olmo^a, N. Matamoros Flori^b y J. López Siles^c

^aHospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. España.

^bHospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca. España.

^cGenetaq Málaga. España.

Introducción: La incontinencia pigmenti (IP) es una enfermedad genética poco frecuente, que afecta a la piel y suele estar asociada con una gran variabilidad de alteraciones en ojos, sistema nervioso central, dientes, cabello, uñas y sistema esquelético, con una expresión clínica muy variable. Se trata de una enfermedad genética dominante ligada al cromosoma X. La mutación más frecuente (80%) es la delección del gen NEMO, que incluye los exones 4 al 10. Las afectas sobreviven a la dicigosis del cromosoma X y a la inactivación temprana del cromosoma X que porta la mutación. Los varones que heredan el gen mutado no suelen sobrevivir.

Objetivos: Dado que se ha observado que la expresión clínica es muy variable y que se han descrito distintas mutaciones relacionadas, buscamos alguna asociación entre el tipo de alteración genética y la clínica en la población de nuestro entorno diagnosticada clínicamente de IP.

Material y métodos: Se revisan casos diagnosticados por Dermatología de Incontinencia Pigmenti que llegan a la consulta de Genética entre 2005-11. Se realiza anamnesis e historia familiar. La técnica utilizada es una PCR SSP, amplificando banda compatible con la presencia de la delección común del gen NEMO en todos los

casos. En algunos casos se ha realizado el estudio del sesgo de la inactivación del cromosoma X mediante el análisis del marcador polimórfico del gen AR del cromosoma X y digestión de los enzimas sensibles a metilación. Los familiares de los pacientes son analizados tras haber detectado algún hallazgo.

Resultados: Los pacientes remitidos con clínica son niñas, entre 3 meses de vida y 11 años de edad con los resultados que se muestran en la tabla a pie de página.

Conclusiones: En 62.5% de nuestros casos encontramos la mutación común en gen NEMO (menor frecuencia que la descrita por otros autores). En los casos negativos de la delección común del gen NEMO no se excluye la presencia de otras mutaciones en dicho gen. Solo se estudia la inactivación del cromosoma X en 4 casos, siendo una inactivación del 100% del cromosoma materno en 50%. De los casos con delección común positiva, el 40% son “de novo” con lo que el riesgo de repetición de esas madres es menor al 1%. Toda portadora de mutación la transmitirá al 50% de sus hijos. Los varones teóricamente no llegarán a nacer, salvo casos de mosaicismo somático o con la presencia de un cromosoma X extra. Las mujeres, el grado de afectación depende de la inactivación de un cromosoma X. Como la inactivación del cromosoma X es al azar, no existe posibilidad de determinarla prenatalmente.

0085. LOS POLIMORFISMOS *CDX-2*, *BSM I* Y *FOK I* DEL GEN *VDR* PERMITEN DISCERNIR A LOS ENFERMOS CELÍACOS DE SUS HERMANOS SANOS HLA IDÉNTICOS

J. Caballero Villarraso^a, F.J. Gavilán León^b, M.D. Ramírez Prado^c, V. Moreno Moral^b, D. Rodríguez Cano^b y F. Rodríguez Cantalejo^b

^aIMBIC. Hospital Reina Sofía. Universidad de Córdoba. España.

^bHospital Reina Sofía. Córdoba. España. ^cHospital Comarcal Virgen de la Salud. Elda. Alicante. España.

Introducción: La enfermedad celiaca es una patología crónica autoinmune caracterizado por una intolerancia al gluten en sujetos genéticamente susceptibles. Existe una asociación en los pacientes celiacos (99%) con las moléculas de histocompatibilidad DQ2 y DQ8. Debido a que los genes HLA se heredan en bloque (un haplotipo completo paterno y otro materno) y los entrecruzamientos son muy raros, existe un 25% de posibilidades de que un hermano sea HLA idéntico a otro y que un 50% sean haplo idénticos. Por tanto es bastante probable que un hermano de un paciente celiaco herede también los genes HLA de propensión para padecer la enfermedad. Por este motivo podría ser útil estudiar otros genes de susceptibilidad que se heredarán independientemente del HLA para poder diferenciar los pacientes celiacos de sus hermanos HLA idénticos sanos. Por otro lado, se ha demostrado que la vitamina D y sus análogos poseen una neta actividad inmunomoduladora. Muchas de las actividades biológicas de la vitamina D requieren de la interacción con su receptor (VDR). Este es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares.

Objetivos: Dado que se han descrito asociaciones entre distintos alelos del gen *VDR* con enfermedades autoinmunes y que los enfermos celiacos presentan con frecuencia alteraciones en el me-

Caso	Delección común (exones 4-10) gen NEMO	Inactivación cromosoma X	Delección/Inactivación cr X en madre	Afectación neurológica/ dismorfia-dientes
1	Positiva	100% del cr X materno	Positiva / ¿?	+/-
2	Positiva	100% del cr X materno	Positiva / 100% en un cr X	-/-
3	Negativa	Inactivación al azar de ambos cr X	Negativa / inactivación al azar ambos cr X	-/-
4	Negativa	100% del cr X paterno	Negativa / ¿?	+/+
5	Positiva	-	Negativa / ¿?	-/-
6	Positiva	-	Negativa / ¿?	-/-
7	Positiva	-	Positiva / ¿?	-/+
8	Negativa	-	¿?	-/-

tabolismo de la vitamina D, el presente estudio pretende evaluar si diferentes polimorfismos de gen *VDR* (*Bsm I*, *Fok I* y *Cdx-2*) suponen un riesgo añadido de padecer celiaquía y si existen diferencias entre hermanos HLA idénticos enfermos y sanos.

Material y métodos: Se realizó un estudio molecular en 33 enfermos celíacos, 48 hermanos HLA idénticos (23 con enfermedad celíaca y 25 sin esta) y 225 controles. Se realizó el tipaje de HLA DR y HLA DQ por técnicas de baja y/o alta resolución hasta que se discriminaron los dos alelos. Todos los pacientes y controles fueron genotipados para los tres diferentes polimorfismos del gen *VDR* (*Fok I*, *Bsm I* y *Cdx-2*) mediante PCR. Se estimó el análisis de asociaciones entre variantes genéticas por el método del inverso de varianza (método de Woolf) a partir de tablas de contingencia de 2 x 2 y se utilizó el test de Chi² para establecer la significación estadística.

Resultados y conclusiones: 1) La mayoría de los hermanos HLA idénticos a un paciente con celiaquía, no padecen la enfermedad. 2) Las frecuencias alélicas y genotípicas, por separado, de los polimorfismos estudiados del gen *VDR* (*Cdx-2*, *Bsm I* y *Fok I*) son semejantes entre la población celíaca y control analizadas. 3) El análisis de los polimorfismos estudiados en su conjunto, muestra que en la población celíaca no hay ningún individuo triple heterocigoto (GA Bb CT), mientras que en la población control suponen el 7,11%. Lo que parece indicar que los individuos triples heterocigotos para estos polimorfismos del gen *VDR*, tienen menos probabilidad de padecer celiaquía. 4) El análisis de los polimorfismos estudiados en su conjunto, muestra que ciertas combinaciones de genotipos (principalmente los triples heterocigotos: GA Bb CT) pueden ser de gran utilidad para diferenciar celíacos de no celíacos, en hermanos HLA idénticos.

0086. GENES DE BAJA PENETRANCIA ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES (PTC) ESPORÁDICO: IDENTIFICACIÓN MEDIANTE GENOTIPADO DE ALTA RESOLUCIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPS)

J. Caballero Villarraso^a, V. Moreno Moral^b, D. Rodríguez Cano^b, M.D. Martín del Pozo^b, M.D. Ramírez Prado^c y C. Aguilera Gámiz^b

^aIMIBIC. Hospital Reina Sofía. Universidad de Córdoba. Córdoba. España. ^bHospital Reina Sofía. Córdoba. España. ^cHospital Comarcal Virgen de la Salud. Elda. Alicante. España.

Introducción: El carcinoma papilar de tiroides (PTC) es la neoplasia maligna tiroidea más frecuente (80%) y procede de las células foliculares del tiroides. El PTC suele presentarse en mujeres (75% del total de casos), predominando la forma esporádica (95%) frente a las formas familiares (5%) (Nikiforov et al, 2002). Actualmente, se conocen cuatro mutaciones somáticas moleculares asociadas al PTC esporádico: reordenamientos cromosómicos que afectan a los oncogenes *RET* y *TRKA* (Saenko et al, 2003) y mutaciones puntuales de los oncogenes *BRAF* o *RAS*; todas estas alteraciones genéticas son mutuamente excluyentes y su mecanismo de acción común es la activación de la ruta de señalización de la MAPKinas (Knauf et al, 2005).

Objetivos: Considerando el PTC esporádico como un modelo de enfermedad compleja, en la que la susceptibilidad individual para desarrollarla depende de múltiples genes, el objetivo del presente trabajo es identificar genes de baja penetrancia relacionados con esta neoplasia.

Material y métodos: Estudio de casos y controles. Se utilizaron 216 pacientes diagnosticados de PTC (confirmado anatomopatológicamente), frente a una población control de 367 sujetos sin esta enfermedad. Tras obtención de DNA de sangre periférica de todos ellos, se procedió a genotipar 802 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) correspondientes a 132 genes; para ello, se utilizaron dos plataformas de genotipado de alta resolución: Illumina® y Taq-

Man®. Los genes seleccionados estaban relacionados con el metabolismo tiroideo, o pertenecían a la ruta de la MAKPKinas, o eran genes clave en la génesis cancerígena en general (involucrados en procesos de apoptosis, angiogénesis, reparación de DNA, adhesión celular, metástasis y ciclo celular). Con ello, se realizó el análisis de frecuencias y distribución de haplotipos en los casos frente a los controles mediante el programa informático PHASE v2.0.

Resultados y conclusiones: En el presente estudio, se han hallado ocho genes que muestran una distribución de haplotipos diferente entre casos y controles, de forma estadísticamente significativa: *RET*, *PSPN*, *ARTN*, *BRAF*, *GRB7*, *P110 beta*, *RAC (AKT1)* y *GAB1*. Estos genes son candidatos para ser considerados factores de riesgo en relación a la susceptibilidad para desarrollar un PTC y, en consecuencia, candidatos para el diseño de futuros estudios experimentales que puedan demostrar su significación biológica.

0087. DETERMINACIÓN DE K-RAS EN CÁNCER COLORRECTAL. ANÁLISIS DE COSTES

A. Martínez-Peinado^a, M. Ortiz Espejo^b, M. Olea Carrasco^c, D. Herranz Amo^d, E. Aranda Aguilar^d, C. Aguilera Gamiz^d y F. Fabiani^a

^aHospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.

^bHospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

^cHospital Universitario Carlos Haya. Málaga. España. ^dHospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España.

Objetivos: Las terapias anti-EGFR bloquean la cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK evitando la activación de este receptor. Entre otros casos, la terapia con estos fármacos tiene indicación en pacientes con cáncer de colon metastático. Pero en pacientes con K-RAS mutado (40% de los cánceres de colon) estos tratamientos no han demostrado ningún beneficio, ya que la activación de la señal se produce por debajo del receptor. El objeto de este análisis es comprobar si es coste-efectiva la detección de mutaciones en K-RAS.

Material y métodos: Entre finales de 2008 y principios de 2010, se analizaron 200 muestras consecutivas de tejido tumoral paraafinado de pacientes diagnosticados de cáncer de colon, en estadio metastático, a los que se solicitó el estudio mutacional de K-RAS. Para este análisis se utilizó el kit de PCR a tiempo real Therascreen® de DxS, siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniéndose un 40% de resultados positivos (similar a lo publicado en la literatura). Con estos datos y teniendo en cuenta el coste de reactivos y el generado por el tratamiento con cetuximab en un hospital de 3^{er} nivel, se realizó el estudio económico.

Resultados: Se presentan en la tabla.

Conclusiones: Pese a no incluirse los gastos de pretratamiento de la muestras (corte, desparafinado, extracción de ADN, etc.) ni el tiempo de técnico utilizado, se puede apreciar que la búsqueda de mutaciones en K-RAS es altamente coste-efectiva, incluso con este kit, que no es el más económico del mercado. En la práctica clínica es más correcto buscar la mutación que no hacerlo (es mejor para el paciente). Este hecho, junto al importante ahorro del gasto farmacéutico observado, justificaría la búsqueda de mutaciones en K-RAS en estos pacientes, pese al aumento del gasto en el laboratorio. Este es solo un ejemplo de lo mucho que se puede hacer en este campo.

	Det	Total	Coste/Det
Kit Therascreen KRAS DxS	20	2.942,00 €	147,10 €
Tasa media de repeticiones (confirmaciones, dudas, etc)	12,00%		167,16 €
Determinaciones hechas	200	a	167,16 €
Consumo total en kits (gastos laboratorio)			33.431,82 €

Tto con cetuximab (costes de Erbitux®; estimando que el paciente medio tiene una superficie corporal de 1,72 m²)

Coste primera dosis	500 mg/m ²	199,99 €/100 mg	1.719,91 €
Coste 2ª y ss (hasta 5)	250 mg/m ² × 4 dosis	199,99 €/100 mg	3.439,83 €
Coste total del tto por paciente	5.159,74 €		
Total mutados (no se han tratado)	80	pacientes	Ahorro en gasto farmacéutico
Ahorro neto (ahorro-consumo)	379.347,54 €		412.779,36 €

0088. MIGRAÑA HEMIPLÉJICA FAMILIAR. A PROPÓSITO DE UN CASO

B. Dos Santos Marcano, M. Rodríguez Pedreira, R. Souto Fernández, S. García Mayo, B. Rodríguez Sánchez, A. Mosquera Rey, M.L. Barreiro Daviña, J. Peteiro Cartelle, I. Constanso Conde y A. Álvarez Rueda

CHU A Coruña. España.

Caso clínico: Antecedentes personales: paciente varón de 4 años, que sufre episodio de caída, seguida de paresia en hemicuerpo izquierdo de 1 hora de duración. Antecedentes familiares: madre diagnosticada a los 4 años de epilepsia y tratada con anticonvulsivos hasta los 14 años de edad. Relata episodios de cefalea acompañados tanto de hemiparesia como de alteraciones visuales. Enfermedad actual: paresia transitoria de miembros no asociado a pérdida de la consciencia con antecedentes familiares. Pruebas complementarias: TAC, EEG con y sin privación de sueño, RMN y angioRMN normales. Estudio genético: El gen CACNA1A se considera el más frecuente y fue negativo. En el estudio del gen ATP1A2 se halló una mutación causal para esta entidad en heterocigosis (p.Arg548His) descrita por Ambrosini et al (2005). Diagnóstico diferencial: se plantean los diagnósticos de crisis parcial con paresia post ictal, accidente cerebro-vascular, así como de migraña acompañada de hemiplejia. Tras la realización de pruebas complementarias y teniendo en cuenta los antecedentes familiares se propone estudio genético de migraña hemipléjica familiar (MHF). Evolución: se informa a la familia de un riesgo de recurrencia del 50%, así como de la posibilidad de diagnóstico preimplantacional o prenatal de cara a la futura descendencia una vez identificada la mutación. Se ofrece estudio familiar a su madre y a su hermana. El paciente no ha vuelto a presentar nuevos episodios tras el diagnóstico, si bien su madre refiere haber presentado un cuadro de paresia y parestesias que inicia en mano derecha extendiéndose a hemicara y lengua ipsilateral, posteriormente aparece disfasia de 1 hora de duración seguido de dolor pulsátil en hemisferio izquierdo. Ver tabla a pie de página.

Discusión: La MHF consiste en crisis de corta duración de paresia/plejia en hemicuerpo seguido de parestesias y afasia, de ser afectado el lado dominante. A continuación aparece cefalea hemisférica pulsátil. La prevalencia para esta entidad es de 1 de cada 10.000 a 20.000 individuos, y el patrón de herencia es autosómica dominante, con una penetrancia del 90%.

0089. ESTUDIO GENÉTICO DE LA FIEBRE MEDITERRÁNEA FAMILIAR. A PROPÓSITO DE UN CASO

B. Heredia Gálvez^a, F.J. Ruiz Cosano^b, J. Nuevo García^c y J.R. Vilchez García^c

^aHospital Médico Quirúrgico Cristo Rey, Jaén. España. ^bHospital Virgen de La Vega. Murcia. España. ^cHospital General Universitario de Santa Lucía. Cartagena. España.

Introducción: La fiebre mediterránea familiar (FMF) es una enfermedad inflamatoria, rara, caracterizada por episodios breves de fiebre, artritis con inflamación de las extremidades, dolor abdominal y pleural, episodios de ascitis... Ocurre con mayor frecuencia en los países del entorno del mar mediterráneo, en particular se ven afectados los judíos, tanto sefardíes como asquenazíes, armenios, árabes, turcos e italianos. Los síntomas aparecen generalmente en la niñez o adolescencia, casi siempre antes de los 20 años. Es más frecuente en los hombres con una relación hombre/mujer de 3:2. Está provocada por una alteración genética en el gen del cromosoma 16 (puede haber más genes implicados, aún no estudiados), MEFV, del que se han descubierto más de 70 mutaciones que causan la enfermedad y aunque en un principio se creía que presentaba herencia recesiva, se ha demostrado que hay casos de dominantes e incluso mutaciones de novo. El MEFV ha sido clonado recientemente y se sabe que produce una proteína llamada pirinamarenostrina, que se expresa fundamentalmente en neutrófilos y precursores mieloides de la médula ósea, encargada de regular la respuesta inflamatoria de los granulocitos. Se considera una proteína pro-inflamatoria, por eso al estar alterada se producen trastornos en la regulación de la inflamación.

Objetivos: Mujer de 30 años, española y sin antecedentes conocidos, ingresa en la planta de Medicina Interna del Hospital Cristo Rey de Jaén para estudio de su caso. Los síntomas que presenta consisten en ataques recurrentes de fiebre alta de aparición brusca con náuseas, vómitos y fuerte dolor abdominal. Desaparecen espontáneamente a las 48-72 horas. Pérdida de peso de más de 10 kilos desde el inicio de los síntomas y anemia severa con hemoglobina de 8 g/dl. Se le realiza una amplia batería de pruebas obteniéndose como resultados más llamativos una VSG de 103 y proteinuria. Se solicita estudio genético por sospecha de FMF.

Material y métodos: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación. Se requieren 5 ml de sangre venosa total en tubo de EDTA y modelo de recogida de datos específico para

Correlación genotipo fenotipo de las MHF

	MHF 1	MHF 2	MHF 3
Localización	19p13	1q23	2q24
Gen	CACNA1A	ATP1A2	SCN1A
Proteína	Subunidad α1 Canal de Ca ⁺⁺	Subunidad α2 Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	Subunidad α1 canal Na ⁺
Expresión	Neuronal	Neuronal (infancia). Glial (adultos)	Neuronal
Manifestaciones clínicas frecuentes	Crisis MH. Crisis severa con coma. Ataxia/nistagmus atrofia cerebelosa	Crisis MH. Crisis severa con coma	Crisis MH. Crisis severas (?)
Manifestaciones clínicas raras	Epilepsia, déficit intelectual	Epilepsia, déficit intelectual, signos cerebelosos	Mal conocidos

fiebres periódicas que refleja la historia clínica del paciente. A partir del ADN obtenido de la muestra, se procede a amplificación por PCR en SMART CYCLER (Cepheid-IZASA) y posterior secuenciación de los exones y zonas intrónicas del gen MEFV (16p13.3) de la pirina-maronestrina ensecuenciador ABI 3130 DNA. (AppliedBiosystems).

Resultados: Tras unos 90 días, finalmente se emite el resultado del estudio genético y es positivo. La sensibilidad de esta prueba es del 98-99%. Se remite a la paciente a consejo genético.

Conclusiones: Las técnicas de biología molecular son ya una herramienta indispensable para identificar y diagnosticarlas enfermedades genéticas, y aun son de mayor utilidad si se trata de enfermedades tan raras y poco frecuentes como la que se ha expuesto en este caso.

0090. SÍNDROME OROFACIODIGITAL TIPO 1. A PROPÓSITO DE UN CASO

B. Dos Santos Marcano, M. Rodríguez Pedreira, R. Souto Fernández, S. García Mayo, A. Mosquera Rey, B. Rodríguez Sánchez, L. Vázquez Mourin e I. Constanso Conde

CHU A Coruña. España.

Caso clínico: Motivo de interconsulta: recién nacida con alteraciones faciales en línea media y dedos con antecedentes familiares (madre diagnosticada de síndrome orofaciodigital tipo1 (OFD1)). Descripción del caso: La paciente presenta a la exploración física: raíz nasal ancha, labio hendido fusionado, fisura del paladar blando, lengua bífida con mamelones, microrretrognatia, sindactilia del 2º y 3º dedo de ambos pies. Ecografía: riñones sin alteraciones. Quiste subependimario derecho, ventrículo lateral derecho dilatado y posible hipoplasia de cerebelo. La madre de la paciente presentó al nacimiento hendidura labial, frenillo en labio superior, múltiples bridas orales, lengua bífida, surco palatino, encía inferior dividida, clinodactilia bilateral, braquimesocefalia de los dedos 2º y 5º bilateral. En edad adulta ha desarrollado enfermedad poliquística renal.

Discusión: El OFD1 se caracteriza por malformaciones de la cara, cavidad oral (paladar hendido) y dedos (clinodactilia). Puede asociarse a retraso mental (50%). Su incidencia es de 1:250.000 nacidos vivos. Se asocia con enfermedad renal quística de desarrollo en la edad adulta. Presenta un patrón de herencia ligado a X dominante y con letalidad para hemiciotos. En el 75% no aparece historia familiar. El diagnóstico diferencial puede plantearse con otros tipos de OFD, enfermedad renal cística autosómica dominante y síndrome de Meckel-Gruber. En el momento del diagnóstico de la madre de la paciente (c.1980), se creía que este síndrome tenía un tipo de herencia autosómico recesivo y no existía estudio molecular disponible. En el momento actual se sabe que el tipo de herencia está ligado a X y es letal para los varones, lo que explica que su hija presente la misma patología. El único gen disponible para estudio molecular actualmente es el OFD1 (Xp22.3-p22.2). El estudio de este gen para la paciente no ha sido concluyente, encontrándose un cambio en heterocigosis (1-278C > G) no descrito previamente y no encontrado en estudio de controles sanos. En el estudio de la familia se ha encontrado este mismo cambio en la madre (afecta) y una tía materna (no afecta), hemiciota para el alelo normal. No se ha encontrado este cambio en el tío materno. Se ha llevado a cabo un análisis de ligamiento combinando los alelos de otro polimorfismo situado en proximidad. Este estudio revela que el cambio encontrado tendría su origen en el abuelo materno. Para poder decir que esta fuese una mutación causal, el abuelo materno debería presentar mosaicismo germinal. En cualquier caso, seguimos estudiando a la familia para poder obtener más información. En cualquier caso, la probabilidad de transmisión de una mujer afecta a su

descendencia será del 50%. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mayoría de hombres con mutación no serán viables, las probabilidades serían: 33% mujeres no afectas, 33% mujeres afectas y 33% hombres no afectados. Aun así existen casos de fetos varones con malformaciones que no sobreviven más allá del nacimiento. Esta entidad muestra alta penetrancia, pero en mujeres existe gran variabilidad en la expresión, debido posiblemente a la inactivación aleatoria del cromosoma X (hipótesis de Lyon).

0091. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN PTGDR EN PACIENTES CON ASMA

V. García Solaesa, C. Sanz Lozano, D. Benito Pescador, L. Hernández Hernández, I. San Segundo Val, M. Sacristán Santos, I. Dávila González, F. Lorente Toledano y M. Isidoro García

Complejo Hospitalario de Salamanca. España.

Introducción: El gen del receptor de la prostaglandina D2 (PTGDR) y en concreto su región promotora ha sido analizada en diversos estudios genéticos del asma. En ellos se ha encontrado asociación entre esta patología y la presencia de ciertas combinaciones haplotípicas y diplotípicas en las que se incluyen los polimorfismos presentes en dicha región promotora. El objetivo de este estudio es el análisis de la variabilidad en esta zona concreta del genoma en pacientes afectados de asma alérgica.

Material y métodos: Se realizó un análisis de la región promotora del gen PTGDR en 724 individuos estrictamente caracterizados desde el punto de vista fenotípico como pacientes con asma (473), y controles (251). La extracción del DNA se realizó mediante el sistema MagNA Pure Compact (Roche). Se realizó la amplificación mediante PCR y los amplicones fueron analizados en un gel de agarosa al 2% y purificados posteriormente mediante el GENECLEAN Turbo Kit (Q-Biogene, Cleveland, Ohio, EEUU). La secuenciación de los mismos se llevó a cabo en un 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, EEUU) y su análisis se realizó con el programa Chromaspro (2003-07; Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australia) y el software AlingX (VectorNTI Advance 10, Invitrogen CA, EEUU). Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS 12.0 y la plataforma Shesis. El análisis de las variables cualitativas se realizó mediante el test de chi-cuadrado, la prueba exacta de Fisher, y el test de Monte Carlo. Se incluyó el estudio del equilibrio de Hardy Weinberg y se empleó la regresión logística para evaluar el efecto de posibles variables de confusión como la edad o el sexo.

Resultados: El análisis de las secuencias obtenidas nos permitió detectar la presencia de 5 variantes en la región promotora localizadas en las posiciones -613C > T, -549T > C, -441C > T, -197T > C y -95G > T. Según un modelo recesivo de herencia para la variante -197T > C se ha encontrado una asociación significativa con el asma ($p = 0,034$) y el asma alérgica ($p = 0,028$). Asociación por otro lado confirmada mediante el análisis multivariante de genotipos ajustado por edad y sexo (OR, 5,94, IC95%, 1,41-24,47; $p = 0,014$). Los antecedentes familiares de asma y de atopía han sido otras dos variables que han presentado asociación con el polimorfismo -197T > C ($p = 0,009$ y $p = 0,03$ respectivamente).

Conclusiones: El polimorfismo -197T > C se asocia significativamente con el fenotipo asmático. Este hallazgo está en la línea de los resultados obtenidos en los estudios de haplotipos en los que se identificó la asociación con el fenotipo asmático de las combinaciones parciales. La variabilidad genética del promotor del gen PTGDR se mantiene como una importante área de estudio del asma y su fisiopatología, a la vez que promueve nuevos estudios con el fin de caracterizar mejor su papel en esta enfermedad multifactorial.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos: Junta de Castilla y León HU501A08, GR5224/A/08, GR5205/A/08, GR255. Caja de Burgos ayudas 2010. FIS PS09/02068. FIS PI10/01706.

0092. SÍNDROME CRI DU CHAT: REALMENTE ¿TAN POCO FRECUENTE? PRESENTACIÓN DE TRES CASOS

J. Lara Laranjeira^a, F. Espejo López^a,
I. Vallcorba Gómez del Valle^b, R. Real Terrón^a, V. Aguadero Acera^a,
I. Baena Ferrer^a, C. Fernández Pozuelo^a
y A. Fernández de los Ríos Martín^a

^aHospital de Mérida. Badajoz. España. ^bHospital de Badajoz. España.

Introducción: El síndrome Cri du Chat (maullido de gato) es una alteración cromosómica que cursa con una delección terminal o intersticial, generalmente de novo, del brazo corto del cromosoma 5 (5p-) que afecta desde 1/15.000 hasta 1/50.000 de recién nacidos vivos. La clínica de estos niños varía en función de la cantidad de material cromosómico que se pierde, pero generalmente cursa con retraso de crecimiento, trastorno general de desarrollo, hipotonía, diferentes grados de retraso mental, epicanthus, hipoplasia de laringe, microcefalia, hipertelorismo, micrognatia, y en menor frecuencia anomalías cardíacas, neurológicas y renales además de sindactilia, hipospadia y criptorquidia. En este trabajo describimos el hallazgo de tres casos de diferentes familias, sin antecedentes de consanguinidad entre ellos, en un estrecho margen de tiempo.

Material y métodos: Se realiza cariotipo de alta resolución de sangre periférica y se bandearon con técnicas bandas GTG. Para técnicas de citogenética molecular (hibridación *in situ* fluorescente (FISH)) se utilizaron sondas subteloméricas (marcadores: C84C11 y GS3508) y locus específica (LSI) de los siguientes marcadores: D5S23 y ERG1 para confirmar la sospecha citogenética tras cariotipo.

Presentamos la tabla 1 resumen de las características fenotípicas de los tres casos.

Tabla 1

Características	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
PRN	2.500 g	3.260 g	1.285 g
CIR	¿?	-	+
Epicanthus	+	+	+
Raíz nasal ancha	+	+	+
Hipertelorismo	+	+	+
Retraso madurativo	severo	leve	severo
Retraso lenguaje	+	+	+
Retraso pondoestatural	+	-	+
Microcefalia	+	-	+
Llanto débil neonatal	¿?	+	+

Referencia a las características fenotípicas de los tres pacientes siendo +: presente; -: ausente; ¿?: desconocido. PRN: peso recién nacido; CIR: retraso de crecimiento intraútero.

Resultados: En la tabla 2 presentamos los resultados donde se aprecian las diferentes delecciones confirmadas por FISH, con sus fórmulas cromosómicas escritas según normas de nomenclatura publicadas en "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, (ISCN, 2009)".

Conclusiones: Destacamos la importancia de la combinación de estudio de cariotipo de alta resolución y aplicación de diferentes técnicas de citogenética molecular para diagnosticar este síndrome cromosómico. También queremos poner de manifiesto, que aunque descrito con una frecuencia de aparición relativamente baja, quizás muchos no son diagnosticados debido a que la delección puede ser tan pequeña que con cariotipo de resolución estándar o incluso de alta resolución, si no está bien dirigido desde el punto de vista clínico, pase desapercibido y por lo tanto podría ser más frecuente que lo descrito hasta la fecha. Por ello hacer especial hincapié en técnicas cariotipo de alta resolución así como de otras técnicas de citogenética molecular (FISH, array-CGH) para la posterior confirmación de sospecha de alteraciones crípticas y seguimiento de los niños además del asesoramiento genético a los progenitores.

Tabla 2. Los pacientes 1 y 2 presentan delección subtelomérica. La paciente 3 presenta delección subtelomérica y del marcador asociado a patología maullido de gato

	Resultados
Paciente 1	46,XY,del(5)(pter→p15.2)ish5pter(C84C11x1)(D5S23x2),5qter(GS3508x2)(ERG1x2)
Progenitores 1	Pendientes cariotipos y FISH
Paciente 2	46,XY,del(5)(pter→p15.2)ish5pter(C84C11x1)(D5S23x2),5qter(GS3508x2)(ERG1x2)
Progenitores 2	Cariotipos y FISH normales
Paciente 3	46,XX,del(5)(pter→p15.2)ish5pter(C84C11x1)(D5S23x1),5qter(GS3508x2)(ERG1x2)
Progenitores 3	Cariotipo y FISH normales

0093. DIAGNÓSTICO MOLECULAR E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL SÍNDROME DE LYNCH

A.C. Muñoz Boyero^a, V. Marcos de la Iglesia^a, T. Caldes Llopis^b,
M. de la Hoya^b y C. Alonso Cerezo^a

^aHospital Universitario de La Princesa, Madrid. España. ^bHospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

Introducción: El cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch está causado por mutaciones en heterocigosis germinales en los genes reparadores de los errores de emparejamiento que se producen durante la replicación del ADN (MMR). La edad media de comienzo es de 44 años. Presenta un patrón de herencia dominante con una penetrancia del 85% y representa entre el 4-6% de todos los cánceres de colon. Se caracteriza por la aparición de un exceso de múltiples cánceres primarios, localizados en colon o extracolónicos (gástricos, endometrio, biliar, páncreas, tracto urinario, cerebro o piel). El cáncer de colon se localiza predominante proximal. Las familias que cumplen criterios de Amsterdam o Bethesda son sospechosas de HNPCC y está indicado realizar técnicas de cribado: inmunohistoquímica (IHQ) e inestabilidad de microsatélites (IMS).

Objetivos: Cuantificar nuestra experiencia mediante el estudio de IMS e IHQ de los pacientes con sospecha de síndrome de Lynch.

Material y métodos: Se analizaron 43 muestras de tejido tumoral de pacientes seleccionados por la consulta de consejo genético que cumplieran criterios de Amsterdam 1, Amsterdam 2 y Bethesda (14, 13 y 17 pacientes respectivamente). Se les realizó estudio anatomopatológico y se registró la localización, el grado de diferenciación y el tipo histológico del tumor. Se realizó IHQ para determinar la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 y la inestabilidad de microsatélites.

Resultados: El 49% de los pacientes eran hombres y el 51% mujeres, con un rango de edad de 29 a 70 años (media 50 años). De las 43 muestras estudiadas: 33 expresaban las proteínas estudiadas y eran estables. De ellos, 10 cumplían criterios de Amsterdam 1 (23%); 10 muestras eran inestables y presentaban pérdida de expresión de alguna proteína. De estas, en 5 se detectó la presencia de una mutación germinal, en 3 (7%) no se encontró una mutación y las otras 2 están pendientes de resultado. De las 39 muestras que se caracterizaron histológicamente, el tipo más frecuente fue el adenocarcinoma (79,5%), seguido del carcinoma mucinoso (17,9%) y el adenoma vellosos (2,6%). El 87,9% fue moderadamente diferenciado, el 3% bien diferenciado y el 9,1%, pobremente diferenciado. Según la localización, 33,3% en recto, 28,2% en sigma, 25,6% en colon derecho, 10,3% en colon izquierdo, y 2,6% en colon transverso.

Conclusiones: Según la literatura, el 30% de las familias que cumplen criterios de Amsterdam 1 son estables y expresión normal de las proteínas MMR por IHQ. Nosotros hemos obtenido un 23%. Además, el 7% de los tumores analizados presentaban IMS y falta de expresión de las proteínas. Es decir que el 30% de estas fami-

lias, probablemente sean portadoras de una alteración genética en otros genes no relacionados con el sistema MMR no identificados en la actualidad. Por otro lado, la edad media de diagnóstico es menor que la sugerida en los estudios más recientes (Hampel et al 2005) y el tipo histológico estudiado con más frecuencia es el adenocarcinoma.

0094. HEPATITIS C E INTERLEUKINA 28B (IL28B). ESTUDIO DE COSTE/BENEFICIO DE SU INCORPORACIÓN AL SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE Y ESTUDIO DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS EN LA PROVINCIA

M. Gutiérrez Agulló, Á. Blasco Barbero, M. Graells Ferrer, H. Manero Soler y V. Chinchilla Chinchilla

Hospital General Universitario de Alicante. España.

Introducción: La infección por el virus de la Hepatitis C (HCV) presenta un gran problema de salud. Actualmente se estiman más de 170 millones de infectados, de los cuales un 70-80% desarrollarán infección crónica, con elevado riesgo de fibrosis hepática progresiva, cirrosis y carcinoma hepatocelular. Esta condición es la causa más común de trasplante hepático en el mundo occidental, asociado además con un alto índice de recurrencia y complicaciones postrasplante. El tratamiento estándar (NIH) es una combinación de INF pegilado y ribavirina y en el genotipo 1 del HCV (el más común en la población caucásica) solo es efectivo en el 40-50% de los casos. La interleukina 28B (IL28B, OMIM 607402), junto con otras interleukinas, participan en la modulación y resolución de los procesos víricos. Recientes estudios relacionan la presencia de dos nucleótidos C/C en el locus del polimorfismo rs12979860 con una ratio dos veces mayor de aclaramiento viral espontáneo del HCV y con una mejor respuesta al tratamiento con interferón y ribavirina, en pacientes con genotipo 1 del HCV. La clasificación de los pacientes con genotipo 1 en función del genotipo de la IL28B, permitiría una terapia personalizada, evitando tratamiento innecesario en pacientes no respondedores, que pasarían directamente a otro tipo de estrategias terapéuticas.

Objetivos: Incorporación de la determinación del polimorfismo rs12979860 IL28B a la cartera de servicios del HGUA. Impacto en el coste de laboratorio, análisis de las frecuencias genotípicas en la población e implicación en la práctica clínica.

Material y métodos: Muestras procedentes de toda la provincia de Alicante: noviembre 2010-febrero 2011 (externalizadas, n = 42) y marzo 2011-mayo 2011 (incorporadas, n = 61). Genotipado por curvas de melting del rs12979860 por PCR a tiempo real (LightCycler 2.0, Roche®). Resultados: sistema informático del laboratorio y base de datos (OMEGA3000 y OMNIUM, Roche®). Tratamiento estadístico: Excel.

Resultados: El coste de externalización de la prueba es de 150€/paciente con un tiempo de respuesta de 15-20 días. El coste de realizar la prueba en el laboratorio es de 50€/paciente con un tiempo de respuesta de 7-10 días. El coste medio anual del tratamiento (ribavirina + IFN) es de 8,456€/paciente. Frecuencias genotípicas (tabla).

Frecuencias Genotípicas rs12979860

Alelo	C/C	C/T	T/T
Total (n = 103)	0,26	0,56	0,18
Masculino (73,79%)	0,30	0,52	0,18
Femenino (26,21%)	0,15	0,67	0,18

Conclusiones: Las frecuencias genotípicas son similares a las descritas para la población general, pero la frecuencia del alelo C/C es dos veces más frecuente en hombres que en mujeres. La incorporación de la técnica supone un ahorro aproximado de 20.600€ anuales. Un 26% de los pacientes con HCV se beneficiarán

de la seguridad en la eficacia del tratamiento. El 74% de pacientes restantes no sufrirán los efectos secundarios del tratamiento estándar, pasando directamente a otras líneas terapéuticas y suponiendo un ahorro de 624.000€ anuales de tratamiento innecesario con ribavirina e interferón.

0095. ESTUDIO GENÉTICO DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA TIPO I EN EL HGUA. ANÁLISIS DE LA DEMANDA Y GENOTIPOS ESTUDIADOS

M. Gutiérrez Agulló, Á. Blasco Barbero, M. Graells Ferrer, H. Manero Soler y V. Chinchilla Chinchilla

Hospital General Universitario de Alicante. España.

Introducción: La hemocromatosis hereditaria tipo I (HHI) es la enfermedad genética más frecuente en caucásicos. Pertenecce a un grupo heterogéneo de enfermedades relacionadas con la deficiencia de la regulación de la homeostasis del Fe, todas ellas caracterizadas por el depósito de hierro en diferentes órganos, principalmente hígado, páncreas y corazón, que puede conducir a la aparición de manifestaciones clínicas graves y potencialmente letales. Se caracteriza por alteraciones en el gen HFE; en el 95% de los casos la mutación C282Y en homocigosis es responsable de la enfermedad. El 5% restante son debidos a otras alteraciones, principalmente en el alelo H63D o S65C con C282Y en heterocigosis, por lo que son los alelos más estudiados, pero hay más de 30 variables descritas. Los criterios bioquímicos de hemocromatosis (HMC) con mayor sensibilidad y especificidad son el índice de saturación de la transferrina (IST, $\geq 45\%$) y la ferritina ($\geq 250 \mu\text{g/dl}$).

Objetivos: Población estudiada en el año 2010: análisis y adecuación de la demanda, distribución de genotipos, relación genotipo-fenotipo y análisis del polimorfismo H63D, cuya implicación en la HHI está muy discutida.

Material y métodos: Muestra: 230 pacientes de la provincia de Alicante. Genotipado por curvas de melting de los alelos C282Y, H63D y S65C del gen HFE por PCR a tiempo real (LightCycler 2.0, Roche®). Datos de IST, ferritina y transferrina (n = 107): Sistema Informático del laboratorio y Base de datos (OMEGA3000 y OMNIUM, Roche®). Tratamiento estadístico: Excel, SPSS.

Resultados: Los genotipos más frecuentes fueron C282 H63 S65 (38,3%) y C282 63D S65 (21,5%). La frecuencia de homocigotos 282Y fue de 20,5% y el porcentaje de genotipos con marcadores bioquímicos elevados 16,9%. El 68% del total de muestras analizadas presentaban valores críticos de ferritina y un 57% de IST, pero solo un 21% cumplían ambos criterios. El 89% de los pacientes con genotipo patológico presenta criterios bioquímicos de HMC (rendimiento diagnóstico). El 28% de los pacientes con genotipo no patológico presenta criterios bioquímicos de HMC. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de IST y ferritina de los pacientes con alguna alteración en el alelo H63D. No obstante, un 30% de este grupo presentaba criterios bioquímicos de HMC.

Conclusiones: El rendimiento diagnóstico es elevado a pesar de desconocer los casos de estudios familiares (detección precoz). El alelo H63D no está asociado a mayores cifras de IST o transferrina respecto a la población control, no obstante, la falta de significación puede deberse a un bajo tamaño muestral. Un tercio de los pacientes estudiados son candidatos a continuar el estudio genético (mutaciones poco frecuentes de HFE u otros tipos de hemocromatosis), por presentar criterios bioquímicos de HMC. Un 28% de los estudios no cumplen criterios bioquímicos de HMC, por lo que podemos estar ante una demanda inadecuada. La restricción de la prueba a pacientes que cumplan criterios bioquímicos de HFE (excepto estudios familiares) permitiría reducir el coste. El coste ahorrado se podría invertir en continuar el estudio genético en pacientes candidatos.

0096. FRECUENCIA DIAGNÓSTICA DE LAS MUTACIONES DE HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA

G.M. Varo Sánchez, V. Puertas Echevarría, J. Ontañón Rodríguez, R. Rada Martínez, D. Antón Martínez y L. Navarro Casado

Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. España.

Introducción: La Hemocromatosis Hereditaria (HH) es el desorden genético más frecuente de transmisión autosómica recesiva asociado a la mutación del gen HFE (brazo corto del cromosoma 6). Se caracteriza por un aumento de la absorción férrica en el intestino, y consecuentemente, por una acumulación de hierro tisular, cuya expresividad clínica depende de factores genéticos y otros factores (dieta, alteraciones hematológicas, consumo de alcohol, infecciones virales, etc.). Las pruebas analíticas para el diagnóstico de HH son el índice de saturación de transferrina (IST) > 45%, la ferritina sérica > 300 ng/ml y la biopsia hepática. Actualmente, se dispone del análisis de las mutaciones más frecuentes (C282Y, H63D y S65C) del gen HFE.

Objetivos: El objetivo es conocer la frecuencia de las mutaciones del HFE en el área sanitaria de Albacete, y evaluar el poder predictivo de los marcadores bioquímicos de los pacientes.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de todos los pacientes con petición de las mutaciones C282Y, H63D y S65C de HFE durante cinco años. El método empleado fue una PCR seguida del kit PRONTO® Diagnostics basado en un enzimoimmunoanálisis. El análisis estadístico se realizó con SPSS 15.0.

Resultados: De los 424 pacientes, un 77% fueron hombres, con una edad media de 51,7 (DE: 19,1) años. Los resultados de las mutaciones de HFE se recogen en la tabla 1. Se estudió el poder predictivo de los marcadores bioquímicos en los pacientes que presentaban alguna mutación del gen HFE, obteniendo (tabla 2).

Conclusiones: La mutación más frecuentemente hallada en nuestra área sanitaria es heterocigota H63D. Asimismo, se confirma que IST junto con la ferritina es útil para el screening bioquímico de detección de mutaciones del gen HFE, suponiendo su uso un mejor rendimiento coste-beneficio en la orientación diagnóstica de la enfermedad. La HH es un desorden genético con morbilidad y

mortalidad elevadas, las cuales pueden reducirse con la ayuda de un diagnóstico genético y bioquímico temprano.

0097. DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE WOLF-HIRSCHHORN EN RECIÉN NACIDO POLIMALFORMADO

R. Abellán^a, A. Cuesta Peredo^b, P. Laporta Martín^b, M. Tormos Muñoz^b, J. Fons Moreno^b, F.J. Chaves^c y A. Carratalá Calvo^c

^aFundación Hospital Clínico Universitario Valencia. España.

^bHospital Clínico Universitario de Valencia. España. ^cFundación Hospital Clínico Universitario de Valencia. España.

Introducción: El síndrome de Wolf-Hirschhorn es una enfermedad rara causada por una anomalía cromosómica debida a una microdelección distal del brazo corto del cromosoma 4, siendo sus principales manifestaciones clínicas: malformación craneofacial, retardo psicomotor y del desarrollo severo, y alteraciones neurológicas diversas entre las que destacan las convulsiones. Se presenta con una frecuencia de 1 por cada 50,000 nacidos vivos, siendo el doble la incidencia en mujeres.

Objetivos: Identificación de alteraciones citogenéticas crípticas, microdelecciones o grandes reordenamientos cromosómicos mediante técnicas de citogenética molecular en un paciente neonatal que presenta un cuadro de anomalías orgánicas múltiples con fenotipo polimalformado.

Resultados: Paciente nacida de forma prematura (semana 30+6) con retraso de crecimiento intrauterino y seguimiento exhaustivo durante todo el embarazo. Se observa un mayor retraso del crecimiento en torno a la semana 21. Ante este hecho, se le realiza una amniocentesis obteniéndose como resultado un cariotipo con fórmula cromosómica: 46,XX (normal de mujer). Diagnóstico clínico al nacimiento: niña con hipotonía y cianosis. Recuperación parcial tras estímulo requiriendo ventilación e intubación traqueal. Peso al nacer 874 g y talla 34 cm. APGAR 4/8/8. Enfermedad de membrana hialina, agenesia riñón izquierdo, convulsiones y comunicación interauricular. Fenotipo anómalo no encuadrado clínicamente en

Tabla 1

Población de estudio HFE		N muestras (%)	
Normal Mutada 305 (72%)	Homocigoto (25,9%)	119 (28%)	
		C282Y	24 (30,4%)
		H63D	55 (69,6%)
	Heterocigoto (53,1%)	C282Y	26 (16%)
		H63D	128 (79%)
		S65C	8 (5%)
	Doble heterocigoto (21%)	C282Y/H63D	57 (89%)
		H63D/S65C	6 (9,4%)
		C282Y/S65C	1 (1,6%)

Tabla 2

Mutación HFE		IST (N, %)		Ferritina (N, %)		% IST > 45 y/o ferritina > 300 (N, %)
		≤ 45	> 45	≤ 300	> 300	
Homocigoto	C282Y	1 (4,2%)	23 (95,8%)	6 (25%)	18 (75%)	23 (95,8%)
	H63D	13 (23,6%)	42 (76,4%)	19 (34,5%)	36 (65,4%)	50 (90,9%)
Heterocigoto	C282Y	4 (15,4%)	21 (80,7%)	11 (3,1%)	14 (69,8%)	23 (88,5%)
	H63D	17 (13,7%)	107 (86,3%)	30 (24,2%)	94 (75,4%)	118 (92,2%)
	S65C	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	6 (75%)	8 (100%)
Doble heterocigoto	C282Y/H63D	6 (10,5%)	51 (89,5%)	12 (21,1%)	45 (78,9%)	56 (98,3%)
	H63D/S65C	-	6 (100%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6 (100%)
	C282Y/S65C	-	1 (100%)	-	1 (100%)	1 (100%)

ningún síndrome concreto. Se realiza cariotipo de alta resolución obteniéndose un cariotipo normal, 46,XX (normal de mujer), confirmando así el resultado obtenido en líquido amniótico. Sin embargo, existen una gran variedad de anomalías genéticas que no están descritas como causantes de un síndrome específico siendo la causa más frecuente de estas patologías y por ello, es necesario identificarlas para poder ofrecer un asesoramiento genético a los pacientes y familiares. Por tanto, se decide realizar un estudio de hibridación genómica comparada sobre un array-CGH que contiene aproximadamente 60.000 sondas oligonucleotídicas repartidas por todo el genoma, con mayor cobertura en regiones pericentroméricas, subteloméricas e implicadas en trastornos genómicos recurrentes. Se obtiene como resultado: delección de 8.67 megabases en 4p (en esta región cromosómica se encuentran incluidos los genes WHSC1 y WHSC2) y duplicación de 6.69 megabases en 8p. Este hallazgo sugiere una traslocación desequilibrada entre los cromosomas 4 y 8 en proceso de estudio por otras técnicas de citogenética molecular (hibridación in situ fluorescente) tanto en la paciente como en ambos progenitores. La delección en la región cromosómica 4p en la cual se encuentran incluidos los genes WHSC1 y WHSC2, lo cual relaciona clínicamente esta delección con el síndrome de Wolf-Hirschhorn.

Conclusiones: 1. El array-CGH es una técnica diagnóstica de gran utilidad en pacientes con retraso mental y/o anomalías congénitas múltiples y dismorfia de origen desconocido. 2. El diagnóstico temprano de las alteraciones de origen genético permite un asesoramiento genético precoz así como establecer, en algunos casos, una correlación genotipo-fenotipo, con la consecuente mejora en el manejo clínico de ese tipo de pacientes y el apoyo a familiares.

0098. CONCORDANCIA FENOTIPO-GENOTIPO EN EL DÉFICIT DE ALFA 1 ANTITRIPSINA

M. Rodríguez Pedreira, B. Dos Santos Marcano, S. García Mayo, L. Vázquez Mourín, A. Mosquera Rey y A. Álvarez Rueda

CHU A Coruña. España.

Introducción: El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno hereditario frecuente e infradiagnosticado asociado a patología hepática y respiratoria. El retraso en el diagnóstico (hasta 7 años) representa la progresión anatomopatológica de las lesiones. El alelo Z y otros menos frecuentes como Malton se relacionan con enfermedad hepática por polimerización intrahepatocitaria, mientras que el resto producen enfermedad respiratoria por desequilibrio de la acción proteasa-antiproteasa.

Objetivos: Estimar la concentración de AAT y posibles diferencias entre los diferentes genotipos en pacientes remitidos por sospecha clínica de DAAT.

Material y métodos: Se incluyen 57 pacientes (30 hombres, 27 mujeres) con sospecha de DAAT o antecedentes familiares (edad media de 37.23 años con un rango de edades de 2 a 69 años). Se realiza un árbol genealógico y se determina el nivel de AAT (inmunonefelometría). También se realizó genotipo de AAT con kit comercial (Sequence specific primer-based PCR (PCR-SSP)) para detección de alelos deficientes S y Z. En caso de discordancia fenotipo-genotipo, se procede a secuenciación del gen SERPINA1 (PCR de la región codificante y zonas flanqueantes y caracterización de los fragmentos mediante secuenciación cíclica bidireccional) en busca de mutaciones no frecuentes.

Resultados: La concentración media de AAT en estos pacientes fue de 81,55 mg/dl y error típico de 5,25. El valor más alto fue de 237 mg/dl y el menor de 14,5 mg/dl. De estos pacientes, 6 fueron clasificados como genotipo ZZ, con una media de concentración de AAT de 21,73 mg/dl, Error típico 2,60. Otros 10 fueron clasificados como SZ, con una media de 66,71 mg/dl y error típico 2,60. Dentro los clasificados como MS, se halló una concentración media de AAT de 91,04 mg/dl y error típico 10,86 en 9 pacientes. En el grupo con

genotipo MM la media de AAT fue de 130,9 mg/dl, con error típico 14,99 en 10 pacientes. En el grupo MZ, se halló una media de AAT de 82,2 mg/dl y error típico 3,36 en un total de 17 pacientes. Por último en el grupo SS, formado solo por dos pacientes, la media fue 82,5 y error típico 11,8. El genotipo más frecuente fue el MZ y no el MM (considerado como normalidad), que se explica teniendo en cuenta de que se trata de una población seleccionada. Si es importante comentar que, siendo el alelo S el más frecuente en nuestra población, tanto que incluso se sospecha de su posible origen español, no tenga más representación en nuestra muestra (ejemplo claro de paradoja de Berkson). Los genotipos no frecuentes se encontraron en un 5% de los casos, mientras que el genotipo ZZ se halló en un 9%. Se aplicó un ANOVA tomando como variable dependiente la AAT y como variable independiente el genotipo. Para esta muestra sí existen diferencias entre los distintos genotipos estudiados y es estadísticamente significativo con una $p < 0,0001$.

Conclusiones: Efectivamente, los valores de AAT correlacionan con el genotipo de DAAT, por lo tanto su determinación aporta el algoritmo diagnóstico en la clínica compatible con esta noxa.

0099. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GSTT1 DE LA ENZIMA GLUTATIÓN TRANSFERASA COMO RIESGO AL DESARROLLO DE NEOPLASIAS DE CÉLULAS B MADURAS

F.J. Ruiz Cosano^a, B. Heredia Gálvez^a, J. Nuevo García^a, P. Conesa Zamora^a, J.M. Sicilia Piñero^b y M. Pérez Guillermo^b

^aHospital Universitario Santa Maria de Rosell. Cartagena. España.

^bHospital de los Arcos. España.

Introducción y objetivos: La enzima glutatión-S-transferasa (GSTT1) participa en la desactivación de carcinógenos, reactivos tóxicos y xenobióticos, codifica para variantes de actividad enzimática normales (silvestre) o actividad nula (null), tiene una prevalencia en su variante nula ausente en el 38% de la población europea y en el 20% en la Norteamericana. La deficiencia de este gen se correlaciona con la inestabilidad de reacción del glutatión a moléculas tóxicas, se ha elucidado que la deficiencia enzimática puede estar asociado con el riesgo al desarrollo de enfermedades hematológicas de células B maduras (Wan H.42 y Chang YL). El objetivo de nuestro trabajo ha sido estudiar la posible relación causal de este polimorfismo del gen de GSTT1 en el desarrollo de neoplasias de células B maduras (NCBM).

Material y métodos: Estudio retrospectivo sobre 392 sujetos, de los cuales 175 son casos (enfermos) y 214 controles (sanos). Considerando a enfermos a aquellos que se incluyen dentro del criterio de enfermos de células B maduras de la REAL/WHO, realizando grupos según el tipo de neoplasia de células B maduras (NCBM) que padece. A ambos grupos se les genotipo mediante una novedosa PCR multiplex con B-globina como control interno, el resultado se visualizó empleando matrices de separación de alta resolución (Qiaxcell, Alemania). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el SPSS V.15 (Chicago, Illinois, EEUU).

Resultados: Controles: GSTT1-Null 33 (43,4%), GSTT1-Press 181 (57,3%) Total 214. Casos: GSTT1-Null 43 (56,6%) GSTT1-Press 135 (42,7%) Total 178. Estadísticos: $p = 0,0165$; $R = 0,195$ (IC95%: 1,79 (1,08-2,96). Posteriormente se evaluó el papel de estos genotipos de acuerdo al diagnóstico de enfermedades de células B maduras (MBCM); clasificándolas según enfermedades. Linfomas de células B (BCL): Press: 118 (84,6%), Null 40 (25,3%); $p = 0,013$ (OR: IC95% (1,86: 1,11-3,09)). -Linfomas no Hodgkin (LNH): Press: 105 (76,1%), Null: 33 (23,9%); $p = 0,033$, IC 1,72; 10,10-2,94). -Linfomas Hodgkin (LH): Press: 13 (65%), Null: 7 (35%); $p = 0,035$; IC (2,95: 1,15-7,91). -Linfomas foliculares (FL): Press 71 (78%), Null 20 (22,0%); $p = 0,113$; IC (1,55: 0,84-2,87). -Linfoma difuso de células B grande (DLBC): Press 23 (88,5%); Null 3 (11,5%), $p = 0,429$; IC (0,81: 0,25-2,63). -Gammopatías monoclonales (MG): Press 14 (82,4%), Null 3 (17,6%), $p = 0,513$; IC (1,31: 0,38-4,45).

Conclusiones: A la vista de los resultados cuando comparamos grupos de casos y controles según genotipo, extraemos una diferencia significativa ($p: 0,0165$) con una Odds Ratio de 1,79 (1,08-2,96); resultados que sugieren que el genotipo GSTT1 Null parece estar asociado con un incremento de riesgo al desarrollo de enfermedades de células B maduras, así además lo indica la OR pues es 1,79. Los resultados en las diferentes tipos de NCBM apoyan una asociación entre el genotipo GSTT1-null y un aumento de la susceptibilidad a desarrollar LH como así lo atestigua el grado de significación que es menor de 0,05; las ODs para NCBM (1,79), el linfoma de células B (1,86), NHL (1,72) y HL (2,95). Lo cual hace pensar que puede existir una relación entre desarrollo de esta enfermedad y ausencia de genotipo.

0100. EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA-1-ANTITRIPSINA POR INMUNONEFELOMETRÍA EN RELACIÓN AL GENOTIPO

B. dos Santos Marcano, M. Rodríguez Pedreira, S. García Mayo, L. Vázquez Mourín, B. Rodríguez Sánchez y R. Souto Fernández
CHU A Coruña. España.

Introducción: La alfa-1-antitripsina (AAT) es una proteína que ejerce una acción protectora en el pulmón bloqueando la actividad de la elastasa de los neutrófilos. La disminución en la concentración sérica de esta proteína se asocia a la presencia de alelos deficientes en el gen SERPINA1. El genotipo ZZ es el que de forma habitual presenta mayor severidad. Cursa con patología hepática por depósito intracelular de ZAAT y posterior autólisis de los hepatocitos. También cursa con patología pulmonar obstructiva por aumento de compliance atribuible a esta disminución en la concentración. Otros genotipos no se asocian con patología hepática, ya que no se produce polimerización en el retículo endoplásmico de las células hepáticas. Todas tienen en común que distintos cambios de aminoácidos provocan una alteración del sitio activo impidiendo un correcto plegamiento y que genera una conformación terciaria incompatible con la catálisis de la reacción enzimática. Se ha informado de otros tipos de patologías asociadas como la paniculitis necrosante con vasculitis secundaria, pero son consideradas muy poco frecuentes y no se ha establecido una fuerte relación causal.

Objetivos: Determinar si los valores de AAT en la muestra evaluada se correlacionan con los informados por la literatura para los distintos genotipos.

Material y métodos: Se determina la concentración de AAT en 57 muestras correspondientes a pacientes con sospecha de Déficit de AAT o antecedentes familiares por inmunonefelometría (Beckman Coulter IMMAGE®). El genotipo se determinó con kit comercial (PCR-SSP) para detección de alelos deficientes S y Z. Se tomaron como referencia valores publicados en la literatura para cada genotipo, definidos como valores esperados. Los datos fueron tratados estadísticamente.

Resultados: Con el propósito de comparar los valores obtenidos para alfa 1 antitripsina en nuestra muestra se realizó una regresión entre estos valores y los descritos en la literatura (tabla). El coeficiente de regresión fue de 0,698 con un intervalo de confianza ($p < 0,05$) de 0,18 a 0,52, lo que representa una correlación fuerte y estadísticamente significativa.

Concentraciones medias para los distintos genotipos y valores esperados en mg/dl.

Genotipo	Concentración alfa 1 antitripsina rango	Concentración AAT media hallada	Concentración AAT esperado
MM	71,70-237,00	130,90	103-200
MS	72,90-177	91,04	91.04
SS	70,70-94,30	82,50	70-105
MZ	69,30-112,10	82,23	66-120
SZ	56,20-84,30	66,71	45-80
ZZ	14,50-30,60	21,73	10-40

Conclusiones: Los niveles de AAT agrupados por genotipo para la población remitida a la Unidad de Genética son consistentes con aquellos publicados previamente, lo que sugiere que la relación fenotipo-genotipo encontrada en nuestra población es típica y concordante con la descrita en la literatura. Sugerimos dos posibles explicaciones a este hallazgo: que la expresión de estas mutaciones no varía con los factores ambientales, o bien que los factores ambientales presentes en nuestra población coinciden con los presentes en la población de referencia.

0101. CASO CLÍNICO: MONOSOMÍA PARCIAL DEL BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 9

M.I. Enguita del Toro^a, V. García Moreira^a, A. Encinas Madrazo^b, B. Peredo López^a y E. Fernández Rodríguez^a

^aHospital de Cabueñes. Gijón. España. ^bHospital Central de Asturias, Oviedo. España.

Introducción: La diferenciación sexual requiere concordancia entre varios niveles biológicos: genético, gonadal y genital. A nivel genético existen múltiples genes implicados en la diferenciación testicular. Uno de los más estudiados es el gen SRY, en el cromosoma Y, que actúa sobre la gónada bipotencial activando la diferenciación testicular. Posteriormente se estudiaron nuevos genes como el DMRT1 Y DMRT2 localizados en el brazo corto del cromosoma 9. Hasta la fecha hay descritos alrededor de 120 casos de pacientes con monosomía 9p que puede sospecharse desde el nacimiento, por las características fenotípicas faciales y cierto grado de ambigüedad sexual. A continuación se describe el caso de un varón recién nacido con genitales externos de pequeño tamaño.

Caso clínico: Recién nacido, mediante cesárea con test de Apgar 9/10. Sin antecedentes familiares de interés. Gestación controlada con leve HTA en el último trimestre. Peso al nacimiento 2.815 g. Examen físico: leve micrognatia, orejas de implantación ligeramente baja, pene morfológicamente normal pero de tamaño pequeño e hidrocele bilateral. Se palpan testes más pequeños de lo habitual. Resto dentro de la normalidad. Analítica: 17-hidroxiprogesterona: 8,9 ng/mL (1,10-40); androstendiona > 10 ng/mL (0,7-3,6). Se solicitó estudio cromosómico a fin de identificar la etiología. El estudio citogenético fue llevado a cabo en sangre periférica mediante el cultivo de linfocitos, estimulados con fitohemaglutinina. Fueron analizadas 20 metafases con bandas G, donde se reveló la presencia de una delección en el brazo corto de uno de los cromosoma 9, mostrando una fórmula cromosómica de 46,XY, del (9) (p22). Se realiza ecografía escrotal y abdominal evidenciándose la presencia de ambos testículos en bolsa escrotal, con ecogenicidad y morfología normal, pero de pequeño tamaño. Pene de características y morfología normales. No se observan genitales femeninos. Se decide iniciar tratamiento con testosterona y revisiones en los servicios de Endocrino y Genética, para seguimiento y valoración del pronóstico del paciente así como para realizar asesoramiento genético familiar.

Discusión: La delección parcial de la zona distal del brazo corto del cromosoma 9 fue descrita por primera vez por Alfi et al en 1973. Es una alteración cromosómica estructural poco frecuente, normalmente debida a una mutación de novo, esporádica y espontánea, generalmente en la porción del cromosoma 9p22. Esta

deleción está asociada con un síndrome caracterizado por retraso mental, craneosinostosis con afectación de sutura metópica, fisuras palpebrales pequeñas, micrognatia, orejas dismórficas de implantación baja y, cuello corto y ancho con implantación del cabello baja. Se ha descrito la presencia de genitales ambiguos en el 70% de individuos XY con monosomía parcial del brazo corto del cromosoma 9. Existe variabilidad en el sitio de ruptura, pero la región crítica corresponde a un intervalo de 4-6 Mb conocida como región 9p22, la misma deleción encontrada en este paciente, utilizada como consenso para la delimitación del fenotipo. Es importante destacar que alteraciones en el cromosoma 9p también han sido descritas como causantes de retraso mental y alteraciones del comportamiento en mujeres con cariotipo 46XX y varones con cariotipo 46XY con desarrollo sexual normal.

0102. SÍNDROME DE ONDINE: DIAGNÓSTICO GENÉTICO MOLECULAR DE UN CASO DE NOVO

A. Rodríguez Valle, M.D. Miramar Gallart, M.T. Calvo Martín, S. de Miguel García, E. Barrio Ollero y A. Marco Rived

Hospital Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: El síndrome de Ondine (SHCC) o síndrome central congénito de hipoventilación alveolar (OMIM 209880), es una enfermedad caracterizada por la ausencia congénita del control central de la respiración y por la disfunción del sistema nervioso autónomo. Es una enfermedad genética autosómica dominante rara, cuya incidencia se estima en aproximadamente 1 de cada 200.000 nacimientos. En el 90% de los pacientes se encuentra una mutación en heterocigosis en el gen PHOX-2B (4p12). Se asocia a la enfermedad de Hirschsprung en el 16% de los casos. El pronóstico es grave y presenta una elevada tasa de mortalidad y una dependencia de por vida a la ventilación mecánica nocturna.

Objetivos: Estudio genético molecular del gen PHOX-2B para confirmar el diagnóstico clínico de sospecha en una paciente de 5 años.

Pacientes y métodos: Desde la consulta de neumología infantil es remitida a nuestra consulta de genética clínica, una paciente de 5 años con diagnóstico clínico de SHCC y sin antecedentes familiares de interés. El cuadro clínico debutó al mes de vida, presentando cianosis labial y periférica que tras observación se objetivó la ausencia de síntomas en vigilia pero al dormirse presentaba desaturaciones de oxígeno junto con apnea y bradipnea que cedían al estimularla y despertarla. Actualmente la niña recibe apoyo ventilatorio nocturno mediante un ventilador Legendair. Se procede a la extracción de una muestra de sangre periférica de la paciente y de sus padres y hermano de 13 años para su envío al H. U. La Paz (Madrid) para participar en un estudio centralizado nacional de diagnóstico genético molecular del SHCC mediante "High Resolution Melting" (HRM) y posterior secuenciación de las variantes detectadas.

Resultados: La paciente presenta una duplicación de 15 nucleótidos c.741-755dup en el exón 3 del gen PHOX2B en heterocigosis. Dicha mutación genera una expansión de +5 alaninas, p.Ala256_Ala260dup, en el segmento de 20 alaninas localizado en el extremo carboxiterminal del homeodominio de la proteína PHOX2B.

Conclusiones: Este resultado es confirmatorio del cuadro clínico de SHCC en la paciente. Las expansiones cortas de +5 y +7 alaninas del segmento de 20 alaninas de PHOX2B son las mutaciones más frecuentes halladas en pacientes con SHCC. La paciente tiene un riesgo de transmitir a su descendencia dicha mutación del 50%, por lo que cuando alcance la madurez sexual deberá recibir el pertinente asesoramiento genético. Tras el hallazgo de la mutación en el caso índice se prosiguió con el estudio familiar, siendo no portadores tanto los progenitores como el hermano de la paciente. A la familia se les informó que el 90% de los casos son "casos de novo" aunque se han descrito casos (1-10%) de progenitores de pacientes

con SHCC con mosaicismos somáticos, debidos a mutaciones postzigóticas, por lo que en caso de una nueva gestación se les recomendó el diagnóstico genético prenatal o incluso preimplantacional.

0103. ESTUDIO DE DELECIONES DE LOS GENES DE LA α -GLOBINA MEDIANTE MLPA EN PACIENTES CON α -TALASEMIA

C. Alcalá Salmerón, S. Palanca, E. Barragán, M.L. Pérez, B. Argiles y P. Bolufer

Hospital Universitario La Fe. Valencia. España.

Introducción: La α -talasemia es la anomalía monogénica más común de la hemoglobina. Deleciones genómicas que afectan a la región de agrupamiento de los genes de la α -globina (*HbA1* y *HbA2*) en el locus 16p13.3 son las causas moleculares más frecuentes de la enfermedad. La severidad de la clínica se correlaciona con el número de genes funcionales, desde un estado silente (1 gen afectado), a un "rasgo" α -talasémico (2 genes afectados), a la enfermedad de la HbH (3 genes afectados) o hasta la forma más severa de anemia, la Hb de Bart's (los 4 genes a afectados), que causa la muerte en el período neonatal (hydrops fetal).

Objetivos: Estudiar deleciones raras o poco comunes en nuestro entorno de los genes *HbA1* y *HbA2* en un grupo de pacientes con fenotipo α -talasémico que han resultado previamente negativos para la deleción - $\alpha^{3.7}$ por métodos moleculares convencionales.

Material y métodos: El estudio incluye 22 pacientes, de nacionalidad española, 9 mujeres y 13 hombres, de edades comprendidas entre 3-43 años. Todos ellos presentaron fenotipo α -talasémico (VCM < 80 fl, HCM < 27 pg), con metabolismo férrico (ferritina y hierro sérico) y HPLC de Hbs (*HbA2* \leq 3% y *HbF* \leq 1%) normales. Para el estudio de deleciones en los genes de la α -globina se ha puesto a punto el método de "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification" (MLPA). El ensayo se ha realizado con la SALSA MLPA kit 140-B2 HBA (MRC-Holland, Países Bajos).

Resultados: Tres de los 22 pacientes estudiados mediante MLPA (P2, P9 y P18) mostraron deleciones para en los genes de la α -globina. Las tres deleciones afectaron únicamente a uno de los genes alfa y ninguna había sido identificada previamente. La deleción del P2 de χ asi920 pb, comprendía desde el exón 1 al exón 3 del gen *HbA2* (sondas 142, 160, 240 y 166 delecionadas). El P9 presentó una deleción que abarcaba χ asi1180 pb, desde el exón 1 al exón 3 del gen *HbA1* (sondas 142 y 166 delecionadas). Finalmente, la deleción del paciente P18 que resultó de χ asi4.0 Kb, comprendió la región situada entre los genes *HbA1P* y *HbA1* (sondas 201, 214, 229, 142, 160, 240, 196 y 190 delecionadas).

Conclusiones: El método de MLPA ha permitido detectar en pacientes con fenotipo α -talasémico tres nuevas deleciones no descritas hasta el momento. Estas deleciones, que afectan a un solo gen alfa, como ocurre con la talasemia - $\alpha^{3.7}$ que es la más frecuente en nuestro medio presentan ligeras alteraciones hematológicas (VCM y HCM), con una escasa repercusión clínica (estado silente). No obstante, definir rasgos talasémicos a nivel molecular, puede resultar especialmente importante en áreas geográficas con población inmigrante donde las hemoglobinopatías están empezando a ser un problema de salud pública.

0104. SÍNDROME DE QT LARGO CONGÉNITO: ESTUDIO GENÉTICO FAMILIAR

A. Rodríguez Valle, M.D. Miramar Gallart, M.T. Calvo Martín, S. de Miguel García y E. Barrio Ollero

Hospital Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: El Síndrome de QT largo congénito (SQTL) es una de las principales causas de muerte súbita entre los jóvenes. La presentación clínica puede variar, desde pacientes asintomático,

a cuadros de síncope, convulsiones, arritmias ventriculares malignas, fibrilación ventricular y típicamente "torsade de pointes". La prolongación del intervalo QT puede surgir por una disminución en las corrientes repolarizadoras de potasio o por una inapropiada demora de la entrada de sodio en el miocito. Hay más de 500 mutaciones y 130 polimorfismos asociados a los 10 tipos distintos de SQTLC. La mayoría de estas canalopatías se deben a alteraciones del canal del potasio.

Objetivos: Estudio genético molecular de los genes KCNH2, KCNQ1, KCNE1, KCNE2, KCNJ2 para confirmar el diagnóstico clínico de sospecha y poder emitir el asesoramiento genético pertinente.

Pacientes y métodos: A nuestra consulta de genética clínica, son derivados desde la consulta de cardiología infantil dos hermanos de 4 y 1 años, diagnosticados de SQTLC, el mayor a las 31 semanas de gestación se le detectó un bloqueo auriculoventricular intermitente de segundo grado que alternaba con fases de ritmo sinusal normal, tras el nacimiento en la 38 semana de gestación por cesárea se confirmó el diagnóstico de SQTLC; en el pequeño el diagnóstico se realizó en los primeros meses de vida. Antecedentes familiares: la madre a los 23 años sufrió un cuadro típico de muerte súbita con parada cardiorrespiratoria que tras reanimación e ingreso en la UCI fue diagnosticada de un SQTLC tipo 3 y se le implantó un desfibrilador; un tío de la madre está diagnosticado de un sd. de Brugada. Dados los antecedentes familiares, se procede a realizar el estudio genético molecular en la madre, para lo cual se procede a la extracción de una muestra de sangre periférica y su posterior envío a un laboratorio externo solicitándose la secuenciación directa de los genes más frecuentemente relacionados con el SQTLC.

Resultados y conclusiones: La paciente resultó ser portadora en heterocigosis de la mutación patogénica tipo missense N633S (g26432A > G) en el exón 7 del gen KCNH2. El gen KNCH (canal HERG) codifica la subunidad alfa del complejo IKr que es el mayor inductor de la repolarización rápida de la fase 3. Mutaciones en este gen producen la pérdida de la función del canal IKr y suponen un 35-45% del denominado SQTLC Tipo 2, de modo que el resultado obtenido se correlaciona con la clínica de la paciente y acota el diagnóstico clínico de sospecha inicial quedando diagnosticada de un SQTLC TIPO2 y no 3 como se hizo inicialmente. Ante este hallazgo se procedió al envío de las muestras de los dos hijos de la paciente resultando ambos portadores de la misma mutación lo cual confirmó el diagnóstico clínico en los niños. La paciente fue informada que tanto ella como sus hijos transmitirán dicha mutación a su descendencia en el 50% de los casos. En caso de deseo de una nueva gestación se le recomendó el diagnóstico genético prenatal o preimplantacional. Además se recomendó el estudio en familiares directos.

0105. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL GEN FMR1 EN VARONES ESTUDIADOS EN NUESTRO CENTRO ENTRE 2007 Y 2010

A. Poyatos Andújar, J. Mora Vallengano, A. Antúnez Estévez, S. García Linares, N. Coronado Álvarez y L. Papay Ramírez

Hospital Universitario San Cecilio. Granada. España.

Introducción: El síndrome de X frágil es la causa de retraso mental congénita más frecuente tras el síndrome de Down. Afecta preferentemente a varones. Su patogenia reside en la existencia de repeticiones de tripletes CGG que se localizan en una región no traducida anterior al primer exón 1 del gen FMR-1, en el sitio FRAXA del cromosoma X, en la región Xq27.3. En personas no afectadas el número de repeticiones es inferior a 55. La mutación consiste en la amplificación del número de repeticiones de triplete CGG que ocasiona la inactivación por metilación de la transcripción de dicho gen. Esta metilación ocurre cuando el número de repeticiones supera un valor umbral.

Objetivos: Revisar el número de casos estudiados en varones y establecer las frecuencias alélicas del gen FRAXA1 detectadas en nuestro medio.

Material y métodos: Criterio de inclusión: Todos los estudios de X-frágil realizados en nuestro laboratorio desde octubre de 2007 a diciembre de 2010 a varones remitidos por sospecha clínica de retraso mental. El estudio del gen FMR1 se ha realizado con el kit FMR1 Sizing PCR (Abbott Molecular) siguiendo los protocolos y reactivos suministrados por el fabricante. El análisis de los fragmentos se realizó en un equipo ABI 310 (Applied Biosystems) de electroforesis capilar con detección fluorescente de los productos amplificados por PCR. La determinación del tamaño se realizó con el software Genemapper v. 4.0 (Applied Biosystems). Se clasificaron los resultados según el siguiente criterio: Normal (< 44 repeticiones), Zona gris (45-54 rep), Premutación (55-200 rep) y Mutación (> 200 rep).

Resultados: Hemos recogido 353 estudios de X frágil realizados a varones en el período de estudio (tabla en página siguiente).

Conclusiones: El 96% de nuestros resultados se encuentran comprendidos dentro del rango de normalidad. Los alelos 29, 30 y 31 representan más del 50% de las frecuencias encontradas. No hemos encontrado alelos con menos de 18 repeticiones en nuestra serie.

0106. SÍNDROME DE STICKLER TIPO 2: IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL GEN COL11A1

A. Rodríguez Valle, M.D. Miramar Gallart, M.T. Calvo Martín, M.J. Alcaine Villaroya, M. Bassecourt Serra, S. de Miguel García y E. Barrio Ollero

Hospital Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: El síndrome de Stickler (SDS) es una vitreoretinopatía hereditaria autosómica dominante caracterizada por la asociación de síntomas oculares con formas más o menos completas de la secuencia de Pierre-Robin (retrognatia, glosotoposis y fisura palatina), afecciones óseas y sordera neurosensorial (10% de los casos). La incidencia al nacimiento se ha estimado alrededor de 1/7.500. Se diferencian 3 cuadros clínicos: el tipo 1 está causado por mutaciones en el gen COL2A1 (12q13.11-q13.2), el tipo 2 (presenta manifestaciones oftalmológicas más severas) está causado por mutaciones en el gen COL11A1 (1p21) y el tipo 3 o displasia otoespándilo-megaepifisiaria (sin signos oculares) está causado por mutaciones del gen COL11A2 (6p21.3). El gen COL11A1 tiene un tamaño aproximado de 232Kb, consta de 67 exones que codifican la cadena alfa 1 del colágeno tipo XI, una proteína específica de los tejidos cartilaginosos y que parece desempeñar un papel esencial en la fibrillogénesis, controlando el crecimiento lateral de las fibrillas tipo II.

Objetivos: Estudio genético molecular del gen COL11A1 para confirmar el diagnóstico clínico de sospecha y poder emitir el asesoramiento genético pertinente.

Pacientes y métodos: A nuestra consulta de genética clínica, acude un paciente en busca de asesoramiento genético reproductivo con sospecha clínica de SDS. El paciente, sin antecedentes familiares de interés, presenta un fenotipo peculiar: cara plana, puente nasal plano, micrognatia, paladar hendido, sordera neurosensorial, problemas articulares en extremidades inferiores y grave afectación oftalmológica (catarata bilateral, glaucoma, desprendimiento de retina bilateral, ptosis bulbis de ojo izquierdo) cumpliendo criterios de SDS tipo 2 por lo que se procede a la extracción de sangre periférica del paciente y su envío a un laboratorio externo para estudio genético molecular del gen COL11A1 mediante secuenciación directa.

Resultados: El paciente resultó ser portador en heterocigosis de la mutación IVS48-2A > G (c.3709-2A > G) en el intrón 48 del gen COL11A1. Dicha mutación no ha sido descrita previamente asociada al desarrollo del SDS tipo 2 que afecta al sitio aceptor del spli-

Frecuencias alélicas gen FMR1 en hombres (octubre 2007 a diciembre 2010)

n = 353	Número de Repeticiones CGG	Número de alelos	Porcentaje	Porcentaje acumulado	Porcentaje relativo al total
Normal (< 44 rep)	18	1	0,3	0,3	95,9%
	19	3	0,8	1,1	
	20	19	5,4	6,5	
	21	10	2,8	9,3	
	22	3	0,8	10,2	
	23	14	4	14,2	
	24	7	2	16,1	
	25	1	0,3	16,4	
	27	3	0,8	17,3	
	28	11	3,1	20,4	
	29	54	15,3	35,7	
	30	120	34	69,7	
	31	38	10,8	80,5	
	32	20	5,7	86,1	
	33	7	2	88,1	
	35	3	0,8	89	
	36	3	0,8	89,8	
	37	6	1,7	91,5	
	38	7	2	93,5	
	39	3	0,8	94,3	
	41	2	0,6	94,9	
	42	3	0,8	95,8	
	43	1	0,3	96	
Zona gris (45-54 rep)	51	1	0,3	96,3	0,3%
Premutación (55-200 rep)	55	1	0,3	96,6	1,8%
	57	1	0,3	96,9	
	68	1	0,3	97,2	
	73	1	0,3	97,5	
	80	1	0,3	97,7	
	99	1	0,3	98	
Mutación (> 200 rep)	> 200	7	2	100	2,0%
Total	353	100,0	100,0	100,0	

cing, produciendo una delección completa del exón 48 del gen, por lo que se considera patogénica.

Conclusiones: Este resultado confirma el diagnóstico clínico del paciente. El paciente fue informado de que dicha mutación la transmitirá a su descendencia en el 50% de los casos. Ante el deseo de tener descendencia libre de la enfermedad, recomendamos el estudio prenatal o preimplantacional en futuras gestaciones.

0107. TETRASOMÍA X (48,XXXX) EN UNA NIÑA NACIDA TRAS GESTACIÓN CON DONACIÓN DE OVOCITOS

M. Bassecourt Serra, M.J. Alcaine Villarroja, R. Gracia Matilla, S. Perea Tenza, S. Izquierdo Álvarez y M.T. Calvo Martín

Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: Las anomalías numéricas de los cromosomas sexuales ocurren en 1/400 nacimientos, siendo los cariotipos más frecuentes 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY y 45,X disponiendo de gran cantidad de información en la literatura especializada, no ocurriendo lo mismo con el resto de polisomías. Por lo que se refiere a la constitución cromosómica 48,XXXX, existen aproximadamente 50 casos descritos, siendo el fenotipo muy heterogéneo, no existiendo rasgos patognomónicos, se citan algunas malformaciones menores como: epicantus, micrognatia, cataratas, hipertelorismo, hipotonía. En realidad representa una acentuación del cuadro del triplo X, especialmente en cuanto al grado de retraso mental, que es mayor, así como en los trastornos del lenguaje.

Objetivos: Presentar una paciente de siete meses, que nos remiten a genética por presentar hipotonía y cuyo cariotipo mostró esta infrecuente aneuploidia cromosómica y la dificultad para detectar el origen parental de dicha polisomía al tratarse de una gestación con donación de ovocitos.

Métodos: Se realiza doble cultivo de linfocitos para obtención de cariotipo de alta resolución y técnica de bandas convencionales GTG, junto a técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sondas de secuencia única Kallman, painting del cromosoma X y centromérica del cromosoma X (Vysis®). Cariotipo padre. Cariotipo hermana nacida de anterior embarazo tras ciclo FIV-ICSI con ovocitos procedentes de la misma donante.

Resultados: Cariotipo paciente: 48, XXXX. Cariotipo hermana: 46, XX. Cariotipo paterno: 46 XY sin alteraciones estructurales.

Conclusiones: El interés del caso reside en la rareza de la alteración cromosómica y en la dificultad de detectar el origen parental de la polisomía al tratarse de un embarazo con ovocitos donados. En los casos 48, XXXX, los mecanismos de producción son diversos. Puede ser que los cuatro cromosomas sean de origen materno e iguales dos a dos (por una no-disyunción sucesiva en meiosis I y II), a su vez el espermatozoide debería ser nulisómico para el cromosoma sexual. El más frecuente es aquel en el que el padre aporta un cromosoma X y la madre tres, generalmente dos iguales y uno distinto (por una no-disyunción en meiosis I). La causa más frecuente de no disyunción meiótica de los cromosomas X es la ausencia de recombinación y, por tanto, la formación de tétradas aquíasmáticas, incompatible con una normal segregación cromosómica. El no disponer de datos maternos nos llevó a realizar un estudio comparativo de los cariotipos padre - hermana que nos llevó a determinar

de momento que en este caso el padre aportó un cromosoma X (grupo más frecuente) ya que ambas tienen un cromosoma muy similar al del padre quedando no obstante por demostrar la presencia de alelo paterno por otras pruebas moleculares.

0108. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO -565 G > A DEL GEN IL6 EN PACIENTES CON ASA TRIADA

M.L. Rivera Reigada^a, M. Isidoro García^a, J.R. Padrón Morales^b, C. Sanz Lozano^a, E. Moreno Rodilla^a e I. Dávila González^a

^aHospital Universitario de Salamanca. España. ^bLaboratorio Privado en Gran Canaria. España.

Introducción: El asa triada o enfermedad de la aspirina se caracteriza por intolerancia a la aspirina (IA), asma bronquial y poliposis nasal. La prevalencia de IA en la población general es de aproximadamente 6%, pero estudios han revelado que hasta 78% de los pacientes con poliposis nasal padecen la triada. Se han descrito diversas citocinas implicadas en el proceso fisiopatológico que subyace en la intolerancia a la aspirina.

Objetivos: El objetivo de este estudio es analizar la posible asociación entre el asa triada y determinados polimorfismos de genes de citocinas que participan en las reacciones inflamatorias.

Material y métodos: Se han analizado 22 polimorfismos de 13 citocinas diferentes en 228 individuos, (156 controles y 72 pacientes), un total de 5016 polimorfismos analizados, utilizando un sistema denominado "Cytokine genotyping Kit" basado en la reacción en cadena de la polimerasa mediante cebadores específicos de secuencia SSP-PCR. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 2%. El análisis de los datos se ha realizado utilizando el paquete estadístico SPSS 19.0.

Resultados: En nuestro estudio hemos encontrado cierta asociación entre el polimorfismo -565 G > A del gen de IL6 y el fenotipo de ASA triada, en concreto detectamos una disminución del alelo A en los pacientes con asa triada respecto a los controles p-Fisher = 0,04; OR: 0,62 (0,40-0,97). También hemos encontrado asociación estadísticamente significativa (p-Fisher < 0,05) para la frecuencia alélica de los polimorfismos IL4 -590, IL4-1098, IL12-1188, TNFa308, TGFb1 c25.

Conclusiones: La interleucina 6 (IL-6) es un importante mediador de la respuesta de fase aguda y la inflamación crónica, y ejerce efectos pro- y anti-inflamatorios gracias a la unión con su receptor (IL6Rα). En este estudio se detecta cierta tendencia de asociación que pone de manifiesto un posible carácter protector de este SNP en los pacientes con Asa triada.

Agradecimientos: Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Fundación para la Investigación Caja de Burgos.

0109. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR D2 DE DOPAMINA (DRD2) EN LA DEPENDENCIA A COCAÍNA

M. Santamaría González^a, S. Menao Guillén^a, A. Ferrer Dufol^a, V. Sorribas Alejalde^b y A. Gurrea Escajedo^c

^aHospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza. España.

^bUniversidad de Zaragoza. España. ^cUnidad de Atención y Seguimiento de Adicciones de Huesca. España.

Introducción: La drogodependencia, surge de una interacción compleja entre factores ambientales y genéticos. Existen diversos estudios en los que se demuestra una asociación directa entre la dependencia a sustancias y diferentes variaciones genéticas. Los estudios neurobiológicos de las adicciones han demostrado que el *substratum* cerebral de los trastornos adictivos, se localiza en una zona del cerebro donde se encuentra el Circuito de Recompensa Cerebral. El receptor D2dopamina está implicado en este circuito,

por lo que es lógico pensar que mutaciones en este gen pudieran estar implicadas en las diferentes adicciones.

Objetivos: Con este estudio, se pretende valorar la importancia que adquiere la herencia genética en este contexto mediante la evaluación del polimorfismo genético TaqIA, concretamente el alelo A₁⁺, localizado cerca del gen que codifica para DRD2 en pacientes con un grado de dependencia a la cocaína.

Pacientes y métodos: El grupo a estudio lo forman 20 individuos adictos a cocaína reclutados de Unidades de Atención y Seguimiento de Adicciones, que fueron comparados con un grupo control que no presenta ningún tipo de dependencia a drogas. A todos los pacientes se les realizó una entrevista clínica para comprobar si cumplían los criterios del DSM-IV para dependencia a cocaína y donde proporcionaron consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. Se procedió a la extracción de ADN genómico a partir de sangre venosa. Seguidamente se amplificó el fragmento de DNA donde se encuentra el polimorfismo TaqIA mediante PCR. Se realizó el análisis del polimorfismo mediante el enzima de restricción TaqI y se visualizó en geles de agarosa. Los resultados obtenidos fueron comparados estadísticamente mediante el software Statgraphics 5.1 con el fin de encontrar asociación entre el polimorfismo TaqIA y la adicción a cocaína.

Resultados: La edad media de los 20 pacientes fue 37 años (DT = 9,6 años, intervalo = 23-50 años). Se obtuvieron tres genotipos A₁/A₁ (n = 0), A₁/A₂ (n = 5) y A₂/A₂ (n = 15) y otros tres para los controles A₁/A₁ (n = 1), A₁/A₂ (n = 7) y A₂/A₂ (n = 12). Los sujetos con alelo A₁⁺ eran los que tenían el genotipo A₁/A₁ o A₁/A₂; los sujetos sin alelo A₁⁺ tenían el genotipo A₂/A₂. Por tanto, había 5 pacientes con alelo A₁⁺ (el 25%) y 15 sin alelo A₁⁺ (el 75%). No hubo diferencias significativas en los genotipos ($\chi^2 = 2,31$, p = 0,32) o en la frecuencia del alelo A₁⁺ (χ^2 con corrección de Yates = 0,99, p = 0,32) entre los sujetos a estudio y el grupo control.

Conclusiones: No se ha encontrado asociación entre el polimorfismo ligado al gen DRD2 y la dependencia a cocaína, pero no se puede afirmar que no la haya, puesto que el carácter multifactorial que conlleva la dependencia a sustancias hace imprescindible la elección de una muestra más grande para no subestimar ni sobrevalorar los resultados obtenidos. Además es necesario manejar haplotipos y no polimorfismos específicos, que estimen con mayor precisión la asociación con el carácter cuantitativo estudiado. Son necesarios, por lo tanto, más estudios en otros genes y para otras variantes para poder explicar la importancia que adquiere la herencia genética en relación a la dependencia de cocaína.

0110. SÍNDROME DE CRI-DU-CHAT POR REORGANIZACIÓN COMPLEJA ENTRE LOS CROMOSOMAS 5 Y 16

M. Bassecourt Serra, M.J. Alcaine Villarroja, S. Perea Tenza, R. Gracia Matilla, S. Izquierdo Álvarez y M.T. Calvo Martín

Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: El Síndrome de Cri du chat resulta de la pérdida variable de material genético en un segmento del brazo corto del cromosoma 5. Su incidencia varía de 1/15.000 a 1/50.000 recién nacidos vivos, aunque es posible que su frecuencia sea mayor. Mas del 80-85% se deben a deleciones esporádicas de novo de 5p. Aproximadamente un 10-15% lo son por translocaciones en los padres. Menos del 10% de los casos son por aberraciones citogenéticas raras (deleciones intersticiales, mosaicos, anillos, translocaciones de novo).

Objetivos: Presentar un recién nacido remitido para estudio por presentar llanto peculiar y cuyo cariotipo complejo, con translocación desequilibrada (5;16), deleción 5p13.3 y anillo del cromosoma 16 implicado parece entrar en este 10% de casos por aberraciones citogenéticas raras.

Métodos: Se realiza doble cultivo de linfocitos, cariotipo de alta resolución y bandeo convencional GTG, junto a técnicas de FISH

con sonda de secuencia única LSI EGR1 (5q31)/D5S21 y D5S23, cromosoma 5, teloméricas (5pter, 16pter y 16qter) y centromérica del cromosoma 16 (Vysis®). Cariotipo a ambos progenitores.

Resultados: Fórmula cromosómica. Paciente: 46, XX, der(16)t(5;16)(p15.3;p11.2)del(5)(p15.3) r(16)(p11.2.q24) "e novo. La paciente presenta una translocación desequilibrada (5;16) cuyo resultado es la modificación estructural de los mismos con puntos de rotura y reunión en las bandas p15.3 y p11.2 de brazos cortos de ambos cromosomas, con pérdida de material genético correspondiente a la región 5p15.3 que justifica la clínica que presentaba, motivo del estudio. El cromosoma 16 implicado presenta una estructura en anillo producido por rotura y reunión en las bandas p11 y p24 de brazo corto y largo de dicho cromosoma, con translocación de brazo corto 16p11.2 al brazo corto del cromosoma 5, produciéndose en este intercambio la delección arriba descrita. Cariotipo materno: 46, XX. Cariotipo paterno: 46 XY.

Conclusiones: De interés destacar la gran ayuda de las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH), debido a la capacidad de detectar anomalías cromosómicas con puntos de ruptura imposibles de caracterizar con las técnicas convencionales. Igualmente dichas técnicas nos han permitido descartar el carácter de portadores de ambos progenitores y dar el correspondiente consejo genético. El tamaño de la delección puede variar desde fragmentos tan pequeños como la región 5p15.3 hasta todo el brazo corto del cromosoma 5. Los estudios de Overhauser et al determinaron que la delección localizada en 5p15.2 estaba correlacionada con el dismorfismo facial, microcefalia y retraso mental, y que la delección en 5p15.3 era responsable del llanto característico. Estudios adicionales publicados por Zhang et al, localizaba la región del maullido de gato en 5p15.31 entre los locus D5S2054-D5S656, el retraso mental en 5p15.3 entre los locus D5S417-D5S635, y el dismorfismo facial en la región 5p15.2 a 5p15.3 entre los locus D5S208-D5S2887. La translocación desequilibrada con pérdida muy pequeña de brazo corto del cromosoma 5(p15.3) que presenta la paciente (tras amplia revisión bibliográfica) se correlaciona con las características fenotípicas y el llanto característico motivo del estudio. Pendiente de resultados por Array CGH.

0111. REESTRUCTURACIONES CROMOSÓMICAS COMPLEJAS (CCRS) DE ORIGEN FAMILIAR

M. Bassecourt Serra, M.J. Alcaine Villarroja, M.D. Miramar Gallart, S. Izquierdo Álvarez, A. Rodríguez Valle y M.T. Calvo Martín

Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: Las alteraciones cromosómicas que involucran a las regiones subteloméricas son el factor genético causante en el 5-7% de los individuos con retraso mental. El cribado de los subtelómeros es una herramienta de gran valor diagnóstico en familias como la que presentamos con diferentes desestructuraciones cromosómicas y demostrar que las aberraciones identificadas mediante MLPA pueden ser confirmadas posteriormente mediante análisis de FISH con sondas específicas y a la inversa, es decir son complementarias y deberían ser utilizadas conjuntamente en el screening de pacientes con retraso mental, dismorfia facial y retraso psicomotor. **Material y métodos:** Estudio citogenético y molecular en once miembros de una misma familia: Las metafases se obtuvieron con técnicas convencionales. El análisis de FISH se llevó a cabo según el protocolo estándar con las sondas de secuencia única LSI WHS y Telomérica 20p, (Vysis®). El DNA genómico se obtuvo de sangre total siguiendo el procedimiento estándar y el análisis de MLPA empleando el Kit SALSA P036.

Resultados: El diagnóstico de una translocación desequilibrada entre las regiones subteloméricas de brazos cortos de los cromosomas 4p y 20p en la primera paciente, nos permitió llegar al diagnóstico de portador de una translocación equilibrada en el padre, tía y abuelo paterno, así como a la identificación de otro tipo de

reestructuración desequilibrada en tres tíos y sobrina paternos. El fenotipo clínico de síndrome de Wof-Hirschhorn de la primera paciente y una prima tiene su origen en la monosomía parcial del segmento p16.3→pter del cromosoma cuatro y trisomía parcial de 20p que presentan, han heredado del padre el cromosoma 4 anómalo y el cromosoma 20 normal. MLPA: Se encontró un número anormal de copias en la región subtelomérica 4p (delección) y 20p (amplificación). Los tíos tienen otro tipo de trastorno mental motivado por una trisomía parcial del cromosoma 4p y monosomía parcial del cromosoma 20p, los tres han heredado del padre el cromosoma 20 anómalo y el cromosoma 4 normal. En estos últimos el resultado del MLPA muestra en 4p (amplificación) y en 20p (delección).

Conclusiones: Los reordenamientos no balanceados detectados por MLPA en el caso índice nos proporcionaron la información para realizar análisis adicionales por FISH en ella y los progenitores. Estos análisis nos permitieron: detectar la *reorganización cromosómica equilibrada* en el padre, proporcionarle el consejo genético apropiado; ofrecerle la aplicación de dichas técnicas como diagnóstico prenatal en futuros embarazos, así como hacer extensivo el estudio a otros familiares detectando portadores (una hermana y su padre) y afectos (tres hermanos con diferente reestructuración y una sobrina con igual reestructuración que su hija) dando así a todos ellos el correspondiente consejo genético, realizando una actuación preventiva en esta y otros posibles familiares cuya importancia es incuestionable.

0112. ESTUDIO DEL ESTADO MUTACIONAL DE LOS GENES K-RAS Y B-RAF EN PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL METASTÁSICO DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

R. Abellán^a, A. Cuesta^b, R. Hilario^a, V. Adam^a, S. Blesa^a, S. Roselló^b, F.J. Chaves^a y A. Carratalá^b

^aFundación Investigación Clínico de Valencia-INCLIVA. Valencia. España. ^bHospital Clínico Universitario de Valencia. España.

Introducción: El cáncer colorrectal es hoy en día la primera causa de muerte por cáncer en España. A la utilización de la quimioterapia tradicional se le ha sumado la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores de membrana. Los anticuerpos actúan bloqueando el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) que se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los cánceres colorrectales. Sin embargo, el tratamiento solo es efectivo si en la ruta de la señalización del EGFR no existen mutaciones en las proteínas de la vía que actúan a nivel intracelular. El definir que pacientes se beneficiarán con tratamientos noveles permitirá evitar toxicidad innecesaria y gastos desmesurados. Estudios previos en otras poblaciones, describen la presencia de mutaciones en los genes K-RAS y B-RAF en aproximadamente el 40% y el 10%, respectivamente, de los pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal metastásico, siendo las mutaciones de K-RAS mutuamente excluyentes de las mutaciones de B-RAF.

Objetivos: Analizar la frecuencia de pacientes con mutaciones de los genes K-RAS y B-RAS, e identificar la frecuencia de las mutaciones analizadas en nuestra población.

Material y métodos: Se analizaron 403 muestras de tejido incluido en parafina, de ambos sexos, referidos por el Servicio de Oncología del Hospital Clínico de Valencia, con diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma colorrectal. El análisis de mutaciones incluye: 1) Selección de pacientes susceptibles de análisis. 2) Selección del área tumoral de interés, llevado a cabo por el Servicio de Anatomía Patológica. 3) Extracción del ADN con el kit comercial de Qiagen. 4) Análisis de las mutaciones de K-RAS utilizando el kit comercial TheraScreen K-RAS (DxS Diagnostic Innovations). El test detecta siete mutaciones (G12A, G12D, 12R, G12C, G12S, G12V y G13D) del oncogén K-RAS mediante PCR a tiempo real con sondas Scorpion alelo-específicas. 5) Para aquellas muestras K-RAS negati-

vas, análisis de las mutaciones de B-RAF utilizando el kit comercial de Applied BioSystems para B-RAF. El test detecta tres mutaciones (V600E, V600A y V600G) del oncogén B-RAF mediante análisis de fragmentos.

Resultados: De los 403 casos remitidos al laboratorio, se detectaron mutaciones de K-RAS en 168 pacientes, lo que supone un 42% del total. En todos los casos enviados al laboratorio para su análisis fue posible realizar el estudio genético. Respecto a la frecuencia de las mutaciones de k-RAS encontradas: en 55 pacientes se detectó la mutación G12D (32,7%), en 49 la mutación G12V (29,2%), en 28 la mutación G13D (16,7%), en 14 la mutación G12C (8,3%), en 11 la mutación G12S (6,5%), en 10 la mutación G12A (6,0%), y en 1 la mutación G12R (0,6%). El análisis de mutaciones de B-RAF se realizó a 145 pacientes negativos para k-RAS y se detectó la mutación V600E en 12 de ellos, un 8,3% de las muestras analizadas.

Conclusiones: Los resultados obtenidos en el análisis genético de los genes K-RAS y B-RAF en nuestra población coincide con lo descrito actualmente en la bibliografía, tanto en el porcentaje de pacientes portadores de mutación en K-RAS y B-RAF, como para la frecuencia de las mutaciones detectadas.

0113. SÍNDROME DE WOLFRAM (WFS1): A PROPÓSITO DE UN CASO

L. Muñoz Arduengo^a, S. Franco Freire^b, M.C. Benito López^b, E. del Castillo Acedo del Olmo^b y J. López Siles^c

^aHospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

^bHospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga. España.

^cGenetaq. España.

Introducción: El síndrome de Wolfram (SW) es una enfermedad neurodegenerativa, de herencia autosómica recesiva caracterizado por aparición de diabetes mellitus (DM) y atrofia óptica, generalmente antes de los 15 años. Frecuentemente presentan diabetes insípida, anormalidades renales, desórdenes psiquiátricos (síndromes depresivos en 60% de homocigotos) y síntomas neurológicos como sordera, ataxia o neuropatía periférica. Variabilidad clínica elevada, incluso en la misma familia. Las mutaciones encontradas están asociadas al gen WFS1 (cromosoma 4p16.1) presentándose generalmente en el exón 8 (descritas unas 150 mutaciones) Prevalencia: 1/160.000. El gen WFS1 codifica para la wolframina, en células de todo el organismo, (concentraciones altas en corazón, cerebro, pulmones y páncreas) Todavía de función desconocida, parece actuar en el procesamiento de otras proteínas y en la supervivencia de células nerviosas y pancreáticas.

Caso clínico: Mujer de 27 años, consanguinidad entre abuela paterna y abuelo materno (primos). Con DM insulinodependiente desde los 16 años, poliuria progresiva desde los 5 años con diagnóstico de diabetes insípida central a los 10 años. Múltiples ITUs y neumonías aspirativas complicadas de repetición. Vejiga neurogénica y espástica con incontinencia esfinteriana vesical y anal. Trastornos en ventilación requiriendo oxigenoterapia, aspiración de secreciones y traqueotomía con 25 años. Gastrostomía por disfagia y atragantamientos frecuentes. Síndrome depresivo. Examen oftalmológico: atrofia óptica bilateral y midriasis arreactiva, alteración severa de la agudeza óptica. Examen neurológico: inexpressión facial. Cierta retraso mental. RMN craneal con imágenes de atrofia cerebelosa moderada, atrofia tronco-cerebral y bulbo-protuberancial. Ausencia de señal en neurohipófisis. Dificultad de la marcha. Electromiograma con anomalías en todas las vías examinadas (excepto vías somato-sensoriales de EESS). Estudio genético: realizado por Genetaq: amplificación con primers específicos de 9 fragmentos correspondientes a la región codificante y zonas flanqueantes del gen WFS1 (exones del 2 al 8) Posterior secuenciación en doble sentido de los productos de amplificación obtenidos mediante secuenciador automático ABI 3130. Estudio de la secuencia obtenida mediante BLAST y Human Gene Mutation Database (HGMD) y estudio de la

mutación puntual con primers específicos de un fragmento correspondiente a parte del exón 8, conteniendo las posiciones diana de mutación G736S según la secuencia de referencia del NCBI. Se observa un cambio G > A en homocigosis en la posición 2206 del cDNA que provoca un cambio aminoacídico Gly736Ser (G736S).

Discusión: Aunque la DM suele aparecer en el SW en la primera década de vida, nuestra paciente comienza con diabetes insípida. Nuestra paciente no tiene síntomas de pérdida auditiva aunque en 2/3 de los afectados aparece sordera sensorial, bilateral y simétrica. Con esto podemos diagnosticar el caso como un SW incompleto. Podemos asociar las neumonías de repetición a la disfunción bulbar observada.

Conclusiones: Es interesante el estudio genético por la posibilidad de diagnóstico prenatal. Útil también para diagnóstico diferencial con diabetes tipo I autoinmune y con atrofia óptica de Leber, ya que el tratamiento sintomático temprano de las afectaciones del SW mejora el pronóstico enormemente. Interesante también el estudio genético de familiares de pacientes, ya que heterocigotos portadores tienen mayor riesgo de sordera neurosensorial y DM, así como de alteraciones psiquiátricas, respecto a no portadores.

0114. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE LOS COMPONENTES DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y EXPRESIÓN SUPERFICIAL DE MOLÉCULAS MHC DE CLASE I

I. Romero García, A.B. García Ruano, I. Linares, A.B. Rodríguez Martín, M. Martínez López y F. Garrido Torres-Puchol

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Introducción: La regulación a la baja o la pérdida de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) se asocia con lesiones invasivas y metastásicas. La aparición de estas variantes defectuosas es consecuencia de la escultura inmunológica de las lesiones tumorales. Los mecanismos que intervienen en la pérdida de expresión de MHC-I incluyen entre otros, la regulación a la baja de algunos de los genes implicados en la formación y estabilización de las moléculas del MHC (APM). En nuestro laboratorio hemos seleccionado cuatro líneas de fibrosarcoma murino: GR9-A7 (control positivo; expresión positiva para las tres moléculas MHC-I K^d, D^d y L^d), GR9-B7 (expresión positiva pero débil), GR9-C5 (expresión positiva únicamente de moléculas K^d y D^d) y por último la línea celular GR9-B11 (expresión débil de molécula K^d). Estas líneas proceden del tumor primario de un fibrosarcoma murino inducido químicamente con metilcolantreno, fueron establecidas a cultivo sin ningún pase in vivo y clonadas por el método de pesca.

Objetivos: Establecer si existe correlación entre los niveles de expresión en membrana de las moléculas MHC-I y los niveles transcripcionales de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico de péptidos (APM): Tap-1, Tap-2, LMP-2, LMP-7, tapasina, calreticulina y calnexina. Además de, cadenas pesadas (K^d, D^d y L) y β2-microglobulina.

Material y métodos: Estudio de expresión superficial: citometría de flujo: anticuerpos contra las cadenas pesadas H-2 K^d (K 9.18), D^d (34.5.8) y L^d (28.14.8) obtenidos de la ATCC. Software CellQuest. Extracción de mRNA: Kit Mlyltenyo-Biotech a partir de los cultivos celulares de las cuatro líneas en condiciones basales. El cDNA fue sintetizado usando el kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystem). Análisis de los niveles transcripcionales: RT-PCR a tiempo real: análisis semicuantitativo en tiempo real para los genes por medio del Sistema Fast 7500 (Applied Biosystems). Como genes control GAPDH y β-actina. Los valores se expresaron como media ± DE. Los resultados representan la media de tres experimentos realizados con lotes diferentes de las mismas líneas celulares.

Resultados: Al estudiar la expresión en superficie de las moléculas MHC-I por citometría de flujo, en todos los casos, la expresión de las tres moléculas MHC-I fueron inducidas después del tratamiento con IFN- γ , lo que indica la ausencia de defectos estructurales. Analizando los niveles transcripcionales de los genes estudiados, encontramos que la línea celular GR9-B7 presenta unos niveles menores de los genes calreticulina, LMP2 y LMP7 al fibrosarcoma GR9-A7 (mayor expresión MHC-I). En la línea celular GR9-C5 se encontraron bajos niveles de los genes Tap-1, Tap-2 y Tapasina en comparación con GR9-A7. Finalmente, la línea celular GR9-B11 (MHC-I prácticamente negativa) los genes regulados negativamente fueron: calreticulina, LMP2, Tap-1 y tapasina. Los niveles de cadena pesada L α si correlacionaron con la expresión en superficie del complejo MHC.

Conclusiones: Los fenotipos MHC-I observados en los clones B7, C5 y B11 son consecuencia de la regulación negativa de algunos de los componentes del APM. Estos resultados explican las diferencias encontradas en los niveles de expresión superficial del complejo MHC-I entre las cuatro líneas celulares.

0115. SÍNDROME DE PHELAN MCDERMID: CASO CLÍNICO DE DELECIÓN 22Q13

M.D. Miramar Gallart, A. Rodríguez Valle, M. Bassecourt Serra, M.J. Alcaine Villarroja, M.T. Calvo Martín, L. Monge, J.L. Peña Segura y J. López Pisón

Hospital Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: La monosomía 22q13 (delección 22q13 o síndrome de Phelan-McDermid) es un síndrome de microdelección cromosómica caracterizado por hipotonía neonatal, retraso global del desarrollo, ausencia o retraso grave en la adquisición del habla y rasgos dismórficos menores. Puede incluir otras características como crecimiento normal o acelerado, comportamiento similar al autista con disminución de la percepción del dolor, estrabismo o convulsiones. Está implicada una delección en 22q13, la cual puede tener un tamaño variable, desde 160Mb a 9Mb. La región crítica mínima incluye los genes SHANK3, ACR y RABL2B. El gen SHANK se considera el principal responsable de las características fenotípicas del síndrome, especialmente los síntomas neurológicos. Las proteínas codificadas por los genes Shank juegan un rol importante en la maduración y estabilización de las sinapsis entre neuronas en el cerebro. Estas proteínas proveen el soporte estructural para el ensamblaje de los receptores de glutamato con el aparato de señalización intracelular y el citoesqueleto en la densidad postsináptica.

Objetivos: Se evalúa un caso clínico remitido a la Consulta de Genética por retraso psicomotor, asimetría craneal y estrabismo.

Material y métodos: Niña de 18 meses con retraso psicomotor, asimetría craneal, estrabismo y ausencia de lenguaje. Se estudió mediante MLPA el número de copias de las regiones subteloméricas. Posteriormente se analizó mediante MLPA la región 22q13 correspondiente al Síndrome de Phelan-McDermid (microdelecciones y específico de la región 22q13). Se realizó el estudio citogenético en la paciente y en muestras parentales mediante cariotipo de alta resolución y FISH con sondas painting XCP Cr 22 y XCP Cr 16; teloméricas y de secuencia única LSI (22q11.2) (control de esta sonda situado en 22q13). El análisis CGH array se realizó a través de un laboratorio externo.

Resultados: Mediante análisis MLPA de regiones subteloméricas se observó una delección en 22q, correspondiente a la región subtelomérica del cromosoma 22. Posteriormente con MLPA de microdelecciones y específico de 22q13 se corroboró la presencia de una delección en la región 22q13, la cual afecta a varios genes, entre ellos GTSE1, ALG12, MLC1, PLXNB2, SBF1, ECGF1, CPT1B, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B, extendiéndose en 22q hasta el final del cromosoma, como confirmó posteriormente el es-

tudio citogenético, con fórmula cromosómica 46, XX, del(22)(q13)16h+. Para delimitar la región afectada se realizó el estudio mediante análisis por CGH array, obteniendo un cariotipo molecular: arr 22q13.31q13.33 (44,840,049-49,566,016)x1, correspondiente a una monosomía segmentaria de 4,7 Mb. El análisis citogenético y molecular de muestras parentales confirmó que se trata de una alteración "de novo".

Conclusiones: Debe sospecharse el diagnóstico del síndrome de monosomía 22q13 en todos los casos de hipotonía de etiología desconocida y en aquellos individuos que presenten ausencia de lenguaje oral. El análisis conjunto con MLPA de regiones subteloméricas, MLPA de síndromes por microdelección, FISH y CGH array permite ofrecer un diagnóstico genético y un asesoramiento genético prenatal o preimplantacional. Con un diagnóstico precoz los pacientes se benefician de programas de intervención temprana, terapias ocupacionales y terapias destinadas a reforzar los músculos y las habilidades comunicativas.

0116. SÍNDROME DE SILVER-RUSSELL. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

L. Foj, I. Madrigal, C. Badenas, L. Rodríguez-Revenga y M. Milà

Hospital Clínic de Barcelona. España.

Introducción: El síndrome de Silver-Russell (SRS) es un defecto congénito de imprinting, clínica y genéticamente heterogéneo, caracterizado principalmente por un retraso severo de crecimiento intrauterino (CIR) y de crecimiento postnatal, con riesgo significativo de trastorno del desarrollo y del aprendizaje. Los signos clínicos consisten en: talla baja, perímetro craneal normal, clinodactilia del 5º dedo, facies triangular típica, asimetría de extremidades, que podría ser resultado de una hemihipotrofia. La incidencia varía de 1/3.000 a 1/100.000 recién nacidos. No hay distinción por sexos. La alteración genética responsable del síndrome puede afectar a dos cromosomas distintos: entre el 5-10% de los individuos afectados presentan una disomía uniparental materna (mUPD) del cromosoma 7, y en el 40-60% de los casos se detecta una hipometilación de la región 1 de control de imprinting (ICR 1) del cromosoma 11, concretamente de la región 11p15. Finalmente, en un 30% de los niños diagnosticados clínicamente no se detecta la causa genética. La mayor parte de los casos son esporádicos, siendo el riesgo de recurrencia dentro de la misma familia menor del 1%. SRS es el único trastorno que implica defectos de impronta en 2 cromosomas diferentes (7 y 11).

Objetivos: Evaluar el análisis molecular de 75 pacientes con el diagnóstico clínico de SRS.

Material y métodos: Se evaluaron 62 pacientes (33 hombres; 29 mujeres) remitidos a nuestro centro por sospecha clínica o historia familiar de SRS y 13 muestras prenatales (10 líquidos amnióticos; 3 biopsias de vellosidad corial) enviadas por CIR o trisomía 7. El estudio consistió en aplicar la técnica de Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) específica de metilación y/o el estudio de segregación de marcadores microsatélites situados en el cromosoma 7 para evaluar la mUPD 7.

Resultados: En 13 de 75 casos (17%) se determinó la alteración genética por análisis molecular (79% MLPA alterado-hipometilación H19, duplicación 11p15 o delección IGF/CDKN1C- y 21% mUPD 7). En ninguna de las 13 muestras prenatales se determinó alteración genética. La evaluación clínica de estos pacientes muestra que los rasgos más significativos son: retraso de crecimiento postnatal (64% de los casos confirmados de SRS); CIR (43%); clinodactilia del 5º dedo, facies triangular y frente prominente (29%); asimetría de extremidades (21%).

Conclusiones: Los estudios combinados de metilación y disomía uniparental permiten un diagnóstico molecular eficiente. Aunque el CIR es una de las manifestaciones clínicas más frecuentes, ninguna de las muestras prenatales fue positiva. La sospecha clínica

se basa en la asociación variable de CIR, retraso de crecimiento postnatal, facies triangular y asimetría corporal.

0117. CARIOTIPO 4Q- E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO SUBTELOMÉRICO

L. Muñoz Arduengo^a, S. Franco Freire^b, M.C. Benito López^b, E. del Castillo Acedo del Olmo^b y J. López Siles^c

^aHospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander. España.

^bHospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. España.

^cGenetaq. España.

Caso clínico: Recién nacido, varón, ingresado tras nacimiento por síndrome polimalformativo. Presenta: fisura palatina bilateral, retromicrognatia, pliegue simiesco en ambas manos. Estudio radiológico: pulgar de ambas manos con anquilosis de la interfalángica proximal, por acortamiento de metacarpo y de primera falange. No se observan fusiones óseas. Ecografía craneal: sin alteraciones. Ecografía abdominal: uréteres de 3-4 mm de diámetro con engrosamiento mínimo del endotelio y leve dilatación de las pelvis renales que podrían indicar reflujo vésico-uretral. Estudio cardíaco: soplo sistólico piante en BEI, CIA ostium secundum amplia, probable drenaje venoso pulmonar anómalo parcial (DVPA) y ductus grande. Desarrollo psicomotor: no pueden realizarse estudios por tratarse de un recién nacido. Análisis genético: realizamos estudio cromosómico en células obtenidas de una muestra de sangre periférica, y tras cultivo de 72 horas con medios convencionales con aplicación de bandas G y C observamos un acortamiento del brazo q del cromosoma 4 que podía corresponder con las bandas terminales, más concretamente con el fragmento 4q31.3-q35. Realizamos estudio cromosómico a los padres, observando en ambos cariotipo normal. Para comprobar si la delección era terminal o intersticial se realizó un estudio subtelomérico (laboratorio Genetaq) usando la técnica MLPA (SALSA MPLA P070) para detectar delecciones y amplificaciones en los 46 cromosomas del complemento humano (brazo p y q) Esta técnica semicuantitativa identifica delecciones y/o duplicaciones en homo o heterocigosis pero no detecta translocaciones subteloméricas. La técnica incluye sondas para regiones subteloméricas de los cromosomas 1 al 22 y para regiones pseudoautosómicas de los cromosomas sexuales (X/Y) En este estudio se observó que todas estas regiones eran normales, exceptuando el 4q (gen FQG1) que presentaba un perfil compatible con una delección en heterocigosis, comprobando que la delección observada citogenéticamente era de tipo terminal. Aparecieron también alteraciones en el cromosoma 10q (gen ECHS1) presentando un perfil compatible con una duplicación en heterocigosis.

Discusión: Los pocos casos similares descritos poseen retraso del crecimiento y mental de distintos grados, que nosotros no hemos podido valorar por tratarse de un recién nacido de 40 días; así como alteraciones esqueléticas de las primeras falanges. En la mayoría existe fisura palatina y defectos cardíacos, además de micrognatia, alteraciones craneales y genitourinarias. Respecto a la duplicación del 10q en su región terminal, un caso similar describe un síndrome caracterizado por fascies mongoloides, frente grande, cara redonda y plana, hipertelorismo, orejas de implantación baja, paladar hendido, micrognatia, puente nasal plano, microcefalia, hipotonía, clinodactilia, escoliosis, retraso en el crecimiento, trastornos psicomotores, y anomalías cardíacas, oculares y renales.

Conclusiones: El estudio citogenético de recién nacidos polimalformados, así como los estudios moleculares que completan la información, son la base para un adecuado informe genético, útil, por ejemplo, para realizar un buen consejo genético familiar ante la posibilidad de futuros embarazos. También interesante para comparar nuestro caso con otros similares descritos, orientando así el pronóstico y controlando la evolución de nuestro paciente, resultando muy aconsejable la publicación y puesta en común de

estas alteraciones genéticas raras para ampliar el pool de datos recogidos en estos casos de tan escasa incidencia.

0118. FRECUENCIA GENOTÍPICA DEL SNP RS 12979860 EN PACIENTES CON VHC. RESULTADOS PRELIMINARES

M. Blanco Pérez, M. Pombar Pérez, M. González Quintela, P. Esteban Domínguez y A. Andrade Olivie

CHUVI-Xeral. Vigo. España.

Introducción: El SNP rs 12979860 en la región del gen IL28B predice la respuesta al tratamiento con interferón alfa pegilado y ribavirina (PEG-IFN/RVB) en pacientes con infección crónica por VHC y en pacientes coinfectados VHC/VIH. También se relaciona con la probabilidad de aclaramiento viral espontáneo en pacientes infectados con VHC. El genotipo C/C del polimorfismo rs 12979860 en IL28B se asocia con una mayor probabilidad de lograr respuesta virológica sostenida en pacientes mono infectados con VHC y coinfectados VHC/VIH tratados con PEG-IFN/RVB. Los genotipos C/T y T/T predicen una menor probabilidad con respecto al genotipo C/C. En pacientes de origen europeo, el genotipo favorable C/C se asocia con 2 veces (95 IC 1,8-2,3) mayor tasa de respuesta al tratamiento en pacientes con genotipo T/T.

Objetivos: I. Implementar un método para determinar el SNP rs 12979860 en la región del gen IL28B. II. Estudiar la frecuencia de los genotipos del SNP rs 12979860 en los pacientes analizados.

Material y métodos: Muestras de sangre total de 54 pacientes (42 hombres y 12 mujeres) infectados con VHC (39 con genotipo viral 1 y 7 con genotipo viral no 1) provenientes de las consultas de especializada de nuestro complejo hospitalario. Además 6 de estos pacientes presentaban coinfección VHC/VIH. Equipo semiautomatizado de extracción de ADN QIACube® de Quiagen. Equipo de PCR a tiempo real LightCycler® 2.0 de Roche Diagnostics. Sondas de hibridación y primers LightMix® Kit IL28B de Roche Diagnostics. Sondas de hibridación y primers Imegen® IL28B de Imegen.

Resultados: Los ADN de los 54 pacientes se analizan en LightCycler® 2.0 con los dos juegos de sondas y primers según el protocolo específico para cada uno. Los valores de temperatura de melting (Tm) varían $\pm 1^\circ\text{C}$ entre los diferentes experimentos con respecto a las Tm establecidas por el fabricante. Se observa un 100% de concordancia entre ambos métodos. Los genotipos de pacientes rs 12979860 en IL28B agrupados según se muestran en la tabla 1. Las frecuencias genotípicas se muestran en la tabla 2.

Tabla 1

	C/C	C/T	T/T
Genotipo viral 1a	4	9	4
Genotipo viral 1b	4	15	3
Genotipo viral 3	1	2	0
Genotipo viral 4	1	2	1
VHC/VIH	1	4	1

Tabla 2

	n	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	C/T + T/T (%)
Hombres	42	11 (26,2)	22 (52,4)	9 (21,4)	31 (73,8)
Mujeres	12	1 (8,3)	10 (83,4)	1 (8,3)	11 (91,7)
Total	54	12 (22,2)	32 (59,3)	10 (18,5)	42 (77,8)

Conclusiones: 1. Los protocolos Imegen® IL28B de Imegen y LightMix® Kit IL28B de Roche Diagnostics para LightCycler® 2.0 detectan de forma inequívoca el polimorfismo rs 12979860 en IL28B. 2. En esta muestra encontramos un 22,2% de pacientes con genotipo favorable C/C. Este % es menor al esperado según datos de la literatura reciente. 3. Los genotipos C/T y T/T que predicen

una menor probabilidad de lograr respuesta virológica sostenida en pacientes tratados con PEG-IFN/RVB suman el 77,8%. 4. Continuaremos este estudio, incluyendo más pacientes, para obtener los resultados definitivos.

0119. DELECIÓN INTERSTICIAL DEL CROMOSOMA 18Q

L. Muñoz Arduengo^a, M.C. Benito López^b, S. Franco Freire^b, E. del Castillo Acedo del Olmo^b y J. López Siles^c

^aHospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

^bHospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. España.

^cGenetaq. España.

Caso clínico: Paciente de género femenino de 17 meses, es derivada a la consulta de genética por tener ligero retraso madurativo global. Posee fascies peculiares, con pabellones auriculares de implantación baja y asimétricos en tamaño. Valoración cardiológica normal. RMN craneal con mínima atrofia córtico-subcortical, aunque dentro de los rangos de normalidad, que se asocia a que a los 4 meses de vida sufrió un cuadro apneico, debido a un proceso infeccioso respiratorio agudo, en el que tuvo que ser reanimada. En la actualidad presenta hipotonía axial leve y aunque a los cinco meses poseía sostén cefálico a los 17 meses todavía no mantiene la cabeza sostenida de manera continuada. Sedestación positiva con apoyos anteriores e hipertonia de extremidades. Análisis genético: al realizar el estudio cromosómico en células obtenidas de una muestra de sangre periférica, y tras cultivo de 72 horas con medios convencionales con aplicación de bandas G y C se observó un acortamiento del brazo q del cromosoma 18 que podría corresponder a las bandas 18q 21.2-q21.3. Se estudiaron posteriormente los subtelómeros (realizados por Genetaq) aplicando la técnica MLPA (SALSA MPLA P070) para la detección de deleciones y ampliaciones de las regiones subteloméricas en los 46 cromosomas del complemento humano (brazo p y q) indicando normalidad, por lo que se trata de una deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 18. Esta técnica semicuantitativa permite la identificación de deleciones y/o duplicaciones en homo o heterocigosis pero no permite detectar translocaciones subteloméricas. La técnica utilizada incluye sondas para cada una de las regiones subteloméricas de los cromosomas 1 al 22, además de para las regiones pseudoautosómicas de los cromosomas sexuales (X/Y).

Discusión: Otros casos descritos en los que se habla del síndrome 18q-, se caracterizan por retraso mental, baja estatura, hipotonía y alteraciones cráneo-faciales. Más específicamente se diferencia entre deleciones terminales e intersticiales; en nuestro caso, con deleción intersticial, los casos descritos hasta el momento señalan retraso mental severo en asociación con convulsiones y leves manifestaciones faciales. De estos pacientes, los que coinciden en las regiones delecionadas con nuestro caso poseen retraso en el crecimiento y retraso psicomotor medio o significativo, hipotonía, y presentan cabeza pequeña y asimétrica. Además, uno de ellos presenta criptorquidia y convulsiones. En nuestra paciente no está presente la talla baja ni las convulsiones.

Conclusiones: Por lo descrito, los pacientes con deleción en la banda 18q21 poseen de medio a profundo retraso mental además de malformaciones cráneo-faciales, aunque las características clínicas no son específicas por lo que no puede definirse un fenotipo típico en la deleción de esta región concreta.

0120. MONOSOMÍA 15Q CON TRISOMÍA 7P DE ORIGEN FAMILIAR POR TRANSLOCACIÓN CROMOSÓMICA (7;15) MATERNA

M.D. Miramar Gallart, M. Bassecourt Serra, A. Rodríguez Valle, M.J. Alcaine Villarroya, M.T. Calvo Martín y J.I. Labarta

Hospital Miguel Servet. Zaragoza.

Introducción: La aplicación de las nuevas técnicas moleculares como MLPA e Hibridación Genómica Comparada mediante array (CGH array) para el diagnóstico genético de casos pediátricos con retraso pondoestatural sin causa identificada y fenotipo dismórfico está revelando regiones genéticas que no se conocían con anterioridad implicadas en patología y está permitiendo identificar genes cuya función está relacionada con el desarrollo.

Objetivos: Estudio genético de un caso clínico remitido a la Consulta de Genética por retraso pondoestatural y fenotipo dismórfico, con antecedentes familiares de hermana fallecida con alteraciones morfológicas cardíacas.

Material y métodos: Niño de 15 meses remitido a la consulta de Genética desde la Consulta de Endocrinología infantil por con fenotipo peculiar y retraso pondoestatural ($p < 3$). Se estudiaron mediante MLPA el número de copias de las regiones subteloméricas de los cromosomas 1 al 22 más las regiones pseudoautosómicas de los cromosomas X e Y. Se realizó un estudio de hibridación genómica comparada sobre array (CGH array) a través del laboratorio QGenomics mediante un array que contiene aproximadamente 60.000 sondas oligonucleotídicas (qChip Post (8x60K)) repartidas por todo el genoma, con mayor cobertura en regiones pericentroméricas, subteloméricas e implicadas en trastornos genómicos recurrentes. Se realizó un estudio citogenético mediante cariotipo de alta resolución y FISH con sondas painting XCP 15 y telomérica Cr 7p.

Resultados: El análisis de regiones subteloméricas puso de manifiesto la trisomía de la región subtelomérica 1q. El cariotipo molecular del paciente es arr 7p22.3p22.1(178,208-5,337,472)x3, arr 15q26.3(98,010,522-100,201,137)x1. Se trata de una deleción terminal de aproximadamente 2.2Mb del extremo distal del brazo largo del cromosoma 15 y una trisomía segmentaria de 5.1Mb del extremo distal del brazo corto del cromosoma 7. El estudio citogenético reveló una fórmula cromosómica: 46, XY, der(15) t(7;15) (p22;q26)mat, con fórmula cromosómica de su madre: 46, XX t(7;15) (p22;q26). El paciente ha heredado de la madre el cromosoma 15 anómalo y el cromosoma 7 normal, lo que ha dado lugar a una deleción de la región 15q26 del cromosoma 15, así como una trisomía de la región 7p22 del cromosoma 7, con translocación no recíproca 7p a 15q. Estas alteraciones justifican el cuadro clínico del paciente. Su hermano presenta la misma translocación balanceada que su madre.

Conclusiones: Se ha identificado la alteración genética responsable de la patología de la paciente. Las duplicaciones terminales en el brazo corto del cromosoma 7 se asocian con dismorfismo facial específico (retraso en el cierre de las fontanelas, hipertelorismo, micrognatia, orejas de implantación baja y puente nasal deprimido), además de retraso mental, hipotonía, bajo peso al nacer, criptorquidia y defectos cardíacos. En la literatura se han descrito varias deleciones distales 15q en pacientes con retraso del crecimiento pre y postnatal, defectos cardíacos, retraso del desarrollo y rasgos dismórficos. Las translocaciones desequilibradas pueden tener repercusión en la futura descendencia en forma de aborto de repetición, feto normal, feto portador o feto con cariotipo desequilibrado. Se concluye la importancia del estudio genético mediante MLPA, CGH array y FISH para el estudio de pacientes con retraso pondoestatural y fenotipo dismórfico.

0121. REVISIÓN DE DOS CASOS CON FALSOS POSITIVOS EN EL ANÁLISIS DE MLPA EN BRCA2

A. Pérez Caballero^a, R. Poh^b, S. Butler^b y R. Taylor^b

^aHospital Universitario Infanta Cristina. Badajoz. España.

^bSt George's Hospital, Londres. Reino Unido.

Introducción: La amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (Multiple Ligation Probe Amplification- MLPA) es una técnica de PCR múltiple que detecta anomalías en el número de copias de una secuencia de ADN o de ARN, pudiendo distinguir entre secuencias que difieren un solo nucleótido. Existen distintos kits en el mercado, estando entre ellos los que analizan BRCA1 y BRCA2. El cáncer de mama es uno de los cánceres más frecuentes en la población femenina, una de cada diez mujeres lo desarrollarán a lo largo de su vida. Parece que solo entre un 5-10% de los casos son hereditarios. Los pacientes que se someten a estudio molecular en SW Thames Regional Genetics Laboratory presentan alta sospecha de cáncer de mama/ovario hereditario. En estos pacientes se lleva a cabo el estudio de secuenciación bidireccional de los genes BRCA además de MLPA para la identificación de grandes deleciones y duplicaciones.

Objetivos: Presentación de dos casos en los que mutaciones en la región de unión de la sondas de MLPA dieron lugar a resultados falsos positivos de MLPA.

Material y métodos: Para la extracción de ADN de los pacientes se utilizaron bolas magnéticas (Invitrogen Genecatcher). Se llevó a cabo la secuenciación bi-direccional de las regiones codificantes de BRCA1 y BRCA2. En el caso de MLPA se usaron los kits de MCR-Holland (BRCA1 P002-C1 y BRCA2 P045-B2).

Resultados: Caso 1: el análisis de MLPA indicó la existencia de una deleción del exón 9 en BRCA2. El estudio de secuenciación reveló la existencia de la mutación c.755_758delACAG (p.Asp252Valfs22X) en heterocigosis en el exón 9 de BRCA2. Esta mutación se localiza 17 pares de bases por encima del lugar de ligación. Parece que esta mutación reduce la unión de la sonda dando como resultado la aparición de una supuesta deleción del exón 9. Caso 2: tras el estudio de MLPA, se reveló la existencia de una deleción del exón 24 de BRCA2. La reacción de secuenciación evidenció la presencia de la mutación c.9235G > A (p.Val9463Ile) en heterocigosis. Esta mutación se localiza a 8 pares de bases después del lugar de ligación, dentro de la región que hibridaría con la sonda, dando lugar a una deleción del exón 24 que no es real.

Conclusiones: En el caso 1 la mutación identificada c.755_758delACAG es una mutación de cambio de marco de lectura con carácter patogénico. La deleción de 4 pares de bases podría dar lugar a problemas a la hora de la hibridación con la sonda. En el caso 2, la mutación c.9235G > A (p.Val9463Ile) es de significado desconocido según las bases estando localizada en la región de unión de la sonda, pudiendo esto dar lugar a una disminución de la señal de la misma. En ambos casos la identificación de una mutación mediante secuenciación pone de manifiesto la importancia de confirmar mediante secuenciación la existencia de una deleción cuando esta solo implica a un exón mediante técnicas de MLPA.

0122. ENCEFALOPATÍA EPILEPTICA CON TRISOMÍA PARCIAL DEL CROMOSOMA 1 Y MONOSOMÍA PARCIAL DEL CROMOSOMA 7

M.D. Miramar Gallart, M. Bassecourt Serra, A. Rodríguez Valle, M.J. Alcaine Villarroja, M.T. Calvo Martín, J.L. Peña Segura y J. López Pisón

Hospital Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción: El retraso mental (RM) y el trastorno del espectro autista (TEA) son motivos frecuentes de consulta en Neuropediatría. Se estima que existe una prevalencia en la población de RM entre 1-10% y entre el 50-80% quedan sin diagnóstico etiológico.

Las anomalías detectadas por citogenética convencional son responsables de aprox 10% RM leve y 40% del RM grave. La aparición de nuevas técnicas moleculares, como MLPA y arrayCGH, está aumentando el porcentaje de RM y TEA atribuido a causas genéticas.

Objetivos: Se expone el caso clínico de una niña remitida a la Consulta de Genética por retraso psicomotor y macrocefalia con encefalopatía epiléptica no filiada cuya alteración genética se ha diagnosticado mediante técnicas moleculares (MLPA y CGH array) y citogenéticas (cariotipo y FISH).

Material y métodos: Niña de 7 años con fenotipo peculiar, macrocefalia (PC > +3) con hidrocefalia y discreta dilatación de astas anteriores en ecografía transfontanelar. En tratamiento con metilfenidato por trastorno por déficit de atención con hiperactividad. Controlada desde los 8 por retraso psicomotor en la Consulta de Neuropediatría. Se estudiaron mediante MLPA el número de copias de las regiones subteloméricas de los cromosomas 1 al 22 más las regiones pseudoautosómicas de los cromosomas X e Y. Se realizó un estudio de hibridación genómica comparada sobre array (CGH array) a través del laboratorio QGenomics mediante un array que contiene aproximadamente 60.000 sondas oligonucleotídicas (qChip Post (8x60K)) repartidas por todo el genoma, con mayor cobertura en regiones pericentroméricas, subteloméricas e implicadas en trastornos genómicos recurrentes.

Resultados: El análisis de regiones subteloméricas puso de manifiesto la trisomía de la región subtelomérica 1q. El cariotipo molecular de la paciente resultó 1q42.2q44(229,505,714-247,164,526)x3, 7p22.3(141,377-323,057)x1, que se corresponde con una trisomía de 17,66 Mb en brazo largo del cromosoma 1 y monosomía de 182Kb en brazo corto del cromosoma 7. La fórmula cromosómica es: 46, XX, der(7) t(1;7) (q43;p22)mat. Su madre es portadora de una translocación recíproca entre los cromosomas 1 y 7, cuyo resultado es la modificación estructural de los mismos, con rotura y reunión en las bandas q43 y p22 en los brazos largo y corto de ambos cromosomas, respectivamente, y su fórmula cromosómica es 46, XX t(1;7) (q43;p22). Por tanto la paciente ha heredado de su madre el cromosoma 1 normal y el cromosoma 7 con material procedente del cromosoma 1, lo cual genera una monosomía parcial del cromosoma 7 y una trisomía parcial de cromosoma 1.

Conclusiones: Se ha identificado la alteración genética responsable de la patología de la paciente. Se concluye la importancia del estudio genético mediante MLPA, CGH array y FISH para el estudio de pacientes con encefalopatía epiléptica no filiada.