

Anexo 1: Enfermedades monogénicas diagnosticadas hasta la fecha, en España, mediante DGP (Fuente: datos propios del grupo de interés en DGP de ASEBIR).

Enfermedad	Herencia	Frecuencia poblacional Orphanet	Edad de inicio o aparición	Penetrancia
Acidemia propiónica	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Aciduria 3hidroxi-3-metilglutárica	autosómica recesiva	Desconocido	Neonatal/infancia	
Acondroplasia	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Adrenoleucodistrofia, ligada al X	ligada al sexo	5 / 100 000	Variable	
Agammaglobulinemia, ligada al X	recesiva ligada al sexo	1-9 / 1 000 000	Neonatal/infancia	
Alfa-sarcoglicanopatía de cinturas con déficit de alfa-sarcoglicano	autosómica recesiva	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Alport, ligada al X	ligada al sexo	1-9 / 100 000	Infancia	
Anemia de Fanconi	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Infancia	
Angioedema hereditario	autosómica dominante	1-9/ 100 000	Variable	
Aniridia (PAX6)	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Ataxia apraxia oculomotora	autosómica recesiva	Desconocido	Infancia	
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	autosómica dominante	0,57 / 100 000	Edad adulta	100% (si viven suficiente)
Ataxia espinocerebelosa tipo 3	autosómica dominante	0,7 / 100 000	Edad adulta	100% (si viven suficiente)
Atrofia muscular espinal enfermedad de Werdnig Hoffmann o atrofia muscular espinal infantil tipo I	autosómica recesiva	10 / 100 000	Neonatal/infancia	
Beta talasemia	autosómica recesiva	2 / 100 000	Neonatal/infancia	
Charcot-Marie-Tooth, CMTX	ligada al sexo	1-5 / 10 000	Infancia en varones/Adulta en hembras portadoras	100% en varones portadores de mutación

Charcot-Marie-Tooth 1A, DEMYELINATING, TYPE 1A; CMT1A	autosómica dominante	32,5 / 100 000	Variable	100% (en función de cuando aparece la sintomatología)
Defecto congénito de la glicosilación (CDG), tipo Ia; CDG1A	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD)	autosómica recesiva	1 / 100 000	Neonatal/infancia	
Déficit de Glutaril-CoA Deshidrogenasa	autosómica recesiva	1-9 / 1 000 000	Neonatal/infancia	
Deficiencia de Ornitina transcarbamilasa (OTC)	recesiva ligada al sexo	2,5 / 100 000	Infancia	
Deficiencia de POR (citocromo P450 oxidoreductasa), Síndrome ANTTLEY-BIXLER-LIKE	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
depleción del ADN mitocondrial (ADNmt) causado por mutación en MPV17	autosómica recesiva	Desconocido	Neonatal/infancia	
Displasia campomélica	Autosómica dominante	Excepcional	Neonatal/infancia	
Displasia ectodérmica, hidrótica (S. Clouston o HED2)	autosómica dominante	1 / 100 000	Infancia	
Displasia epifisaria múltiple tipo 1	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Distonía de torsión	autosómica dominante	4 / 100 000	Infancia	
Distrofia miotónica 1 (Steinert)	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Distrofia muscular Duchenne/Becker	ligada al sexo	5 / 100 000	Infancia	
Distrofia Muscular Emery Dreifuss, AD; EDMD2	autosómica dominante	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Distrofia muscular facio-escápulo-humeral	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Drepanocitosis (Anemia falciforme)	autosómica recesiva	1-5 / 10 000	Variable	
Enfermedad de Huntington	autosómica dominante	6,2 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Enfermedad de Fabry	recesiva ligada al sexo	1-9 / 100 000	Infancia	
Enfermedad de Norrie (pseudoglioma)-	recesiva ligada al sexo	Excepcional	Neonatal/infancia	

Epidermolisis bullosa, juntural	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
Esclerosis tuberosa tipo 1 TSC1 CROMOSOMA 9	autosómica dominante	8,8 / 100 000	Variable	
Esclerosis tuberosa tipo 2 TSC2 CROMOSOMA 16	autosómica dominante	8,8 / 100 000	Variable	
Exostosis múltiple hereditaria tipo 1 Exostoses, multiple	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Infancia	
Fibrosis quística	autosómica recesiva	12 / 100 000	Infancia	
Gangliosidosis GM1	autosómica recesiva	Desconocido	Infancia	
Glucogenosis tipo 1A	autosómica recesiva	Desconocido	Neonatal/infancia	
Glucogenosis tipo 2 (Síndrome de Pompe)	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Variable	
Granulomatosis crónica	recesiva ligada al sexo	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Hemofilia A	ligada al sexo	7,7 / 100 000	Infancia	
Hipercolesterolemia familiar	autosómica dominante	>1 / 1000	Variable	
Hiperplasias suprarrenal congénita (HSC) mutación especialmente prevalente Val281Leu	autosómica recesiva	10 / 100 000	??????	
Homocistinúria	autosómica recesiva	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Incontinentia Pigmenti	dominante ligada al sexo	0,2 / 100 000	Infancia	
Inmunodeficiencia severa combinada (RAG2) T- B-	autosómica recesiva	0,35 / 100 000	Neonatal/infancia	
Leucodistrofia metacromática (deficiencia ARSA)	autosómica recesiva	0,16 / 100 000	Variable	
Lipo fuscinosi neuronal ceroida tipo 2	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Infancia	
Miocardopatía hipertrófica familiar	autosómica dominante	>1 / 1000	Variable	
Miopatía Miotubular	recesiva ligada al sexo	Desconocido	Neonatal/infancia	
Neoplasia múltiple endocrina: MEN 1	autosómica dominante	11 / 100 000	Variable	
Neoplasia múltiple endocrina: MEN2A	autosómica dominante	3,3 / 100 000	Infancia	

Neurofibromatosis I	autosómica dominante	25 / 100 000	Variable	
Neuropatía hereditaria con susceptibilidad a parálisis por presión	autosómica dominante	1-9 / 100 000	La edad adulta	
Osteogénesis imperfecta tipo I	autosómica dominante	6,5 / 100 000	Neonatal/infancia	
Osteopetrosis, AR Osteopetrosis, malignant	autosómica recesiva	0,75 / 100 000	Neonatal/infancia	
Parálisis periódica hipocalémica	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Infancia	
Paramiotonía Congénita de VON EULENBURG; PMC	autosómica dominante	Desconocido	adolescencia/edad adulta	
Polineuropatía Amiloídótica Familiar (PAF) o enfermedad de Andrade	autosómica dominante	100 / 100 000	Edad adulta (pobl. Ibérica 33.5+/-9.4a)	Variable
Poliposis adenomatosa familiar	autosómica dominante	5,25 / 100 000	La edad adulta	
Poliquistosis renal, AD PKD1	autosómica dominante	0,11 / 100 000	Variable	
Poliquistosis renal, autosomal recessive	autosómica dominante	6,5 / 100 000	Infancia	
Poliquistosis renal, AD, PKD2	autosómica dominante	0,11 / 100 000	Variable	
Retinosis pigmentaria (gen rodopsina)	autosómica dominante	27,5 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Retinosis pigmentaria ligada al X	ligada al sexo		Infancia	
Síndrome de Lynch I	autosómica dominante	0,48 / 100 000	Edad adulta	
Síndrome de Holt-Oram; HOS	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Hunter (mucopolisacaridosis II)	ligada al sexo	0,6 / 100 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Asperger	multifactorial	20 / 100 000	Infancia	
Síndrome de diGeorge	autosómica dominante	1-5 / 10 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Bruton (agammaglobulinemia ligada al X)	ligada al sexo		Infancia	
Síndrome de Gorlín	autosómica dominante	1-9 / 100 000	adolescencia/edad adulta	
Síndrome de hipersensibilidad a los andrógenos	ligada al sexo	1-5 / 10 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Kell			Neonatal	

Síndrome de Marfan tipo I; MFS1	autosómica dominante	30 / 100 000	Infancia	
Síndrome de Noonan	autosómica dominante	1-5 / 10 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Peutz-Jeghers	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Variable	
Síndrome de Pfeiffer	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de von Hippel-Lindau	autosómica dominante	1-9 / 100 000	La edad adulta	
Síndrome de Wiscott-Aldrich	ligada al sexo	0,15 / 100 000	Infancia	
Síndrome de X frágil	ligada al sexo	14,25 / 100 000	Infancia	
S. del gen contíguo (poliquistosis renal /esclerosis tuberosa) OMIM #600273	autosómica dominante	Excepcional	Infancia	
Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X o enfermedad de Duncan	recesiva ligada al sexo	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Síndrome de Treacher Collins-Franceschetti	autosómica dominante	6 / 100 000	Neonatal/infancia	
Sordera AR Usher	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Tirosinemia	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
Vitreo-Retinopatía Exudativa Familiar	varias	Desconocido	Variable	

Anexo2: Ejemplo de protocolo para translocaciones

DGP en Translocaciones Robertsonianas

Protocolo I: [ej. 45, XX,t(13;14)(q10;q10)]

- Realizar un círculo en el portaobjetos con lápiz de diamante para señalar el área en la que se ha fijado el núcleo/núcleos. Anadir como control un portaobjetos con una extensión de linfocitos o amniocitos, a ser posible del paciente portador de la translocación motivo de estudio.

- Deshidratar las extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol (Merck), colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta. Dejar secar a temperatura ambiente.

- Preparar la mezcla de sondas en un *Eppendorf* siguiendo la proporción indicada por la casa comercial. Para un volumen final de 10 ml: 1 ml LSI 13 (*Spectrum Green*) + 1 ml tel 14q (*Spectrum Orange*)+ 1 ml agua tridestilada + 7 ml tampón.

- Colocar 1 ml de la mezcla de sondas sobre el círculo señalado en el portaobjetos, cubrir con cubre de 10 mm de diámetro y sellar con cola.
- Co-desnaturalizar en placa calefactora (Thermobrite, Vysis Inc.) durante 5 minutos a 73oC e hibridar a continuación durante 8-12 horas a 37oC.
- Retirar la cola y el cubre con cuidado. Sumergir los portaobjetos durante 2 minutos en una cubeta *coplin* con 0.4x SSC atemperado a 73oC en un baño térmico. Realizar un segundo lavado de 30 segundos en una cubeta con 2x SSC/ 0.1% NP-40 a temperatura ambiente. Aplicar 7 ml de DAPI II (Vysis Inc.) sobre el área de hibridación para visualizar toda la cromatina y cubrir con un cubre de 20x20 mm.
- Analizar con microscopio de fluorescencia utilizando los filtros adecuados.

DGP en Translocaciones recíprocas

Protocolo II: [ej. 46, XY,t(8;9)(q13;q21)]

- Realizar un círculo en el portaobjetos con lápiz de diamante para señalar el área en la que se ha fijado el núcleo/núcleos. Anadir como control un portaobjetos con una extensión de linfocitos o amniocitos, a ser posible del paciente portador de la translocación motivo de estudio.
- Deshidratar las extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol (Merck), colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Preparar la mezcla de sondas en un *Eppendorf* siguiendo la proporción indicada por la casa comercial. Para un volumen final de 10 ml: 1 ml CEP 8 (*Spectrum Aqua*) + 1 ml CEP 9 (*Spectrum Green*) + 1 ml LSI c-myc 8 (*Spectrum Orange*) + 7 ml tampón.
- Colocar 1 ml de la mezcla de sondas sobre el círculo señalado en el portaobjetos, cubrir con portaobjetos de 10 mm de diámetro y sellar con cola.
- Co-desnaturalizar en placa calefactora (Thermobrite, Vysis Inc.) durante 5 minutos a 73oC e hibridar a continuación durante 8-12 horas a 37oC.
- Retirar la cola y el cubre con cuidado. Sumergir los portaobjetos durante 2 minutos en una cubeta *coplin* con 0.4x SSC atemperado a 73oC en un baño térmico. Realizar un segundo lavado de 30 segundos en una cubeta con 2x SSC/ 0.1% NP-40 a temperatura ambiente.
- Aplicar 7 ml de DAPI II (Vysis Inc.) sobre el área de hibridación para visualizar toda la cromatina y cubrir con un cubre de 20x20 mm.
- Analizar con microscopio de fluorescencia utilizando los filtros adecuados. En algunos casos, cuando no se dispone de sondas marcadas con tres fluorocromos diferentes se realizan dos rondas de hibridación (FISH secuencial).

Anexo3: Protocolo de aCGH con plataforma BACs 24sure (BlueGnome)

A modo de ejemplo, se describe a continuación el protocolo de aCGH utilizando la plataforma de BACs 24sure (BlueGnome) para estudio de aneuploidías de 24 cromosomas. El proceso se realiza en condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar limpiada previamente con alcohol y con luz UV durante 10-15 minutos.

1. Amplificación:

-Tras introducir los blastómeros a amplificar en el tubo de PCR ("tubing"), se añade 3 µl de "Cell Extraction Buffer" a cada tubo y 5 µl del mix compuesto por 4,8 µl de "Dilution buffer" y 0,2 µl de "Extraction Enzyme" (Kit Sureplex), se introducen los tubos en el termociclador con el ciclo de temperaturas de amplificación establecido por la casa comercial.

-Seguidamente se centrifugan los tubos y se añade a cada uno 5 µl del mix compuesto por 4,8 µl de "Preamplification buffer" y 0,2 µl de "Pre-amplification Enzyme" (Kit Sureplex). Se introducen los tubos en el termociclador con el ciclo de temperaturas de amplificación establecido por la casa comercial.

Tras centrifugar los tubos se añade a cada uno 60 µl del mix compuesto por 34,2 µl de H₂O, 25 µl de "Amplification buffer" y 0,8 µl de "Amplification Enzyme" (Kit Sureplex). Se introducen los tubos en el termociclador con el ciclo de temperaturas de amplificación establecido por la casa comercial.

-Finalmente, se realiza una electroforesis en gel para comprobar la amplificación.

2. Marcaje:

-Se preparan 2 tubos de PCR por blastómero a analizar. En el primer tubo (muestra) se añaden 16 µl del mix compuesto por 5 µl de "Reaction buffer", 5 µl de "Primer solution", 5 µl de "dCTP mix" y 1 µl de "fluoróforo Cy3 dCTP" (*Kit Labelling system*). En el segundo tubo (control) se añaden 16 µl del mix compuesto por 5 µl de "Reaction buffer", 5 µl de "Primer solution", 5 µl de "dCTP mix" y 1 µl de "fluoróforo Cy5 dCTP".

-Seguidamente se añaden 8 µl del producto amplificado del blastómero en el tubo de PCR Cy3 (muestra), y 8 µl de ADN control (*SureRef male DNA*) en el tubo de PCR Cy5 (control), se introducen los tubos en el termociclador y se desnaturaliza el ADN a 94°C durante 5 minutos.

-Posteriormente se extraen los tubos del termociclador y se dejan en gradilla refrigerada o en hielo a 4°C durante 5 minutos. Se añade 1 µl de enzima de marcaje Klenow (*Kit Labelling system*) a cada tubo y se introducen en el termociclador para marcar a 37°C durante 2 horas.

3. Precipitación:

-Finalizado el marcaje, se extraen los tubos del termociclador y se detiene la reacción añadiendo 2.5 µl de EDTA en cada tubo de reacción. Seguidamente se añade a cada tubo de muestra Cy3 los 27.5 µl de uno de los controles Cy5 y el mix obtenido se purifica en columna, centrifugando 1 minuto a 2000g.

-Posteriormente se añaden 25 µl de COT Human DNA, 7,5 µl de acetato de sodio 3M y 187,5 µl de etanol absoluto frio a cada muestra, y se deja precipitar el ADN durante 10 minutos a -80oC.

4. Hibridación:

-Tras la precipitación se centrifuga cada muestra 10 minutos a máxima velocidad para obtener el pellet de ADN marcado. Seguidamente se lava el ADN con 70% etanol, centrifugando 5 minutos a máxima velocidad.

-Se descarta el sobrenadante y se deja secar el tubo durante 2 minutos. Posteriormente se resuspende el *pellet* con 21 µl de tampón de hibridación atemperado a 75oC en termobloque y se desnaturaliza 10 minutos a 75oC.

-Tras dejar enfriar, y en campana de extracción de gases, se añaden 18 de cada muestra a un cubreobjetos de 22x22 mm, y se montan sobre el área de hibridación del array.

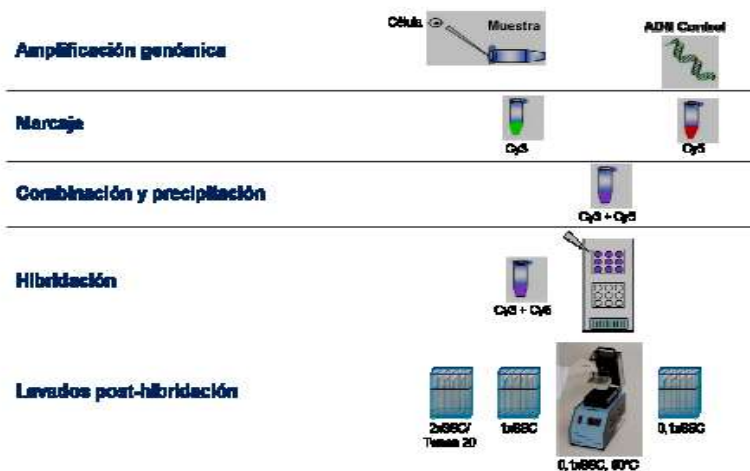
-Se colocan los array en la cámara de hibridación y se hibridan incubando en baño térmico a 47oC durante 8-16 horas.

5. Detección:

-En campana de extracción de gases, se extraen los array de la cámara de hibridación y se sumergen en la solución 2xSSC/0,05% Tween20 agitando ligeramente para eliminar el cubreobjetos por deslizamiento.

-Sin dejar secar, se lavan 10 minutos en 2xSSC/0,05% Tween20 y 10 minutos en 1xSSC agitando a 1000 rpm. Posteriormente, se lavan 5 minutos en la solución 0,1xSSC atemperada en Hybex a 60oC, y 1 minuto en 0,1xSSC a temperatura ambiente.

-Finalmente, se secan los array centrifugándolos 3 minutos a 170 g, y se almacenan a temperatura ambiente hasta su lectura.



Esquema del protocolo de arrays de CGH para el estudio de aneuploidías de 24 cromosomas sobre blastómeros

