

Rol de la citogenética en pediatría

Cytogenetics role in pediatrics

Dra. Marta S. Gallego^a

RESUMEN

La citogenética ha permitido el hallazgo de múltiples anomalías cromosómicas asociadas a retardo mental y trastornos hematooncológicos. Desde sus comienzos hasta el presente y, fundamentalmente con el aporte de la biología molecular, muchos han sido los avances que han posibilitado perfeccionar las técnicas clásicas y lograr otras que nos permiten hoy efectuar un diagnóstico más certero.

El presente trabajo describirá, brevemente, las técnicas de citogenética clásica y molecular, sus ventajas y desventajas, y sus aplicaciones en el diagnóstico clínico en pediatría.

Palabras clave: técnicas citogenéticas, anomalías cromosómicas, retardo mental, hematooncolología.

SUMMARY

Cytogenetics has led to the discovery of multiple chromosomal anomalies associated with mental retardation and hemato-oncologic diseases. From the beginning till now, and with the contribution of the molecular biology, there has been an improvement of the classic cytogenetics, that allow cytogenetists to perform a more precise diagnosis.

The present study briefly describe classic and molecular cytogenetic techniques, their advantages and disadvantages, and the application to clinic pediatrics diagnosis.

Key words: cytogenetic techniques, chromosomal anomalies, mental retardation, hemato-oncology.

INTRODUCCIÓN

La citogenética, disciplina que estudia la estructura y función de los cromosomas, permite la detección de patología cromosómica asociada a retardo mental (RM), malformaciones congénitas múltiples (MCM) y trastornos hematooncológicos.

Se han publicados varios trabajos de revisión que aluden al gran avance que ha tenido la citogenética en los últimos 50 años, merced a herramientas como el microscopio y los *microarrays*.¹⁻⁵

En 1956, diferentes hallazgos que implicaron importantes avances en la técnica de obtención de las preparaciones cromosómicas permitieron a Tjio y Levan determinar que el número modal de cromosomas en la especie humana era de 46.^{6,7} Este descubrimiento,

posteriormente confirmado por Ford y Hamerton, rompió la creencia que se había tenido durante 30 años: que el número de cromosomas era 48.⁸

A partir de este hallazgo, que marcó el comienzo de la citogenética humana, muchos científicos la aplicaron al estudio de la correlación genotipo-fenotipo.

En 1959 se observó que la trisomía 21 era la causa del síndrome de Down y que anomalías en los cromosomas sexuales eran la causa de los síndromes de Turner y Klinefelter.⁹⁻¹¹

Se observaron también anomalías cromosómicas (AC) estructurales vinculadas a síndromes genéticos conocidos; la primera fue comunicada por Lejeune, quien demostró que la delección del brazo corto del cromosoma 5 se asociaba con el síndrome del grito de gato (*Cri du Chat*).¹²

En el campo de la hematooncolología, en 1960, Nowel descubrió el cromosoma Filadelfia, primera AC adquirida (no constitucional) asociada a la leucemia mieloide crónica y, trece años después, Rowley demostró que se producía como consecuencia de la traslocación 9;22.^{13,14} Se han descrito posteriormente innumerables AC asociadas a diferentes tipos de leucemias y linfomas que han servido para la localización y detección de genes implicados en diferentes tipos de cánceres.

El primer logro para poder diferenciar los cromosomas humanos fue la técnica de bandeo Q, mediante quinacrina.¹⁵ Posteriormente, Seabright desarrolló, en 1971, el protocolo para la obtención de bandas claras y oscuras, teñidas con Giemsa, de allí el nombre de bandeo G.¹⁶ En el mismo año se fijaron, en la Conferencia realizada en París, las primeras normativas de nomenclatura para el cariotipo humano.¹⁷

a. Laboratorio de Citogenética. Hospital Nacional de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Buenos Aires.

Correspondencia:
Dra. Marta S. Gallego:
mgallego@garrahan.gov.ar

Conflicto de intereses:
Ninguno que declarar.

Recibido: 9-3-2011
Aceptado: 24-5-2011

La resolución de las bandas que se empleaban hasta ese momento no era superior a 400, hasta que Yunis desarrolló la técnica de alta resolución (AR), que permitió obtener cromosomas de mayor longitud y, por ende, visualizar AC con más precisión.¹⁸ A partir de esta técnica se pudieron detectar deleciones y duplicaciones asociadas a diferentes síndromes, como Prader Willi y Angelman, entre otros.¹⁹ Sin embargo, el AR no era útil cuando el tamaño de la deleción era muy pequeño. Esto se resolvió en la década de 1980 mediante la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (*fluorescence in situ hybridization*, FISH), que marcó el comienzo de la "citogenética molecular".

La técnica de hibridación in situ fue desarrollada por Gall y Pardue en 1969 con sondas radioactivas (fragmentos de ADN), que posteriormente fueron reemplazadas por sondas marcadas con fluorocromos (FISH).^{20, 21}

En 1996 dos grupos independientes desarrollaron técnicas derivadas del FISH, el cariotipo espectral (*spectral karyotype*, SKY) y el multi-FISH (M-FISH), que permiten identificar cada cromosoma con un color diferente.^{22, 23}

La alta complejidad de los cariotipos de algunos cánceres y, fundamentalmente, la dificultad para obtener buenas preparaciones cromosómicas en los tumores sólidos, llevaron en 1992 al desarrollo de otra técnica derivada del FISH, la hibridación genómica comparativa (*comparative genomic hybridization*, CGH), que permitió la detección de desbalances genómicos, sin la necesidad de tener células en cultivo de la muestra a investigar.²⁴

Finalmente, el gran avance de los últimos años ha sido la técnica de *array* CGH (aCGH), en la que los cromosomas metafásicos son reemplazados por una matriz o *array* de miles de clones que contienen segmentos del genoma humano y que proporcionan valiosa información sobre las pérdidas y ganancias de material genómico, con alto grado de sensibilidad.^{25, 26}

El objetivo del presente trabajo es realizar una breve reseña sobre la citogenética desde sus comienzos hasta nuestros días, describir las principales técnicas citogenéticas que se realizan actualmente y comentar sus aplicaciones en la práctica clínica en pediatría.

FIGURA 1. Ideograma del cromosoma 1 mostrando el distinto nivel de resolución de bandas en la parte superior



TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSICA

El estudio citogenético se realiza a partir de cromosomas obtenidos mediante un cultivo de linfocitos de sangre periférica, pero puede también realizarse en otros tejidos. En pacientes con enfermedades hematológicas se realiza en médula ósea para detectar AC adquiridas que son aquellas presentes sólo en las células afectadas.

La técnica de bandeo G se emplea de rutina para el diagnóstico de AC. Es una técnica sencilla que se realiza mediante una digestión enzimática y posterior coloración con Giemsa, que permite la obtención de bandas claras y oscuras. Su patrón es diferente para cada cromosoma y su grado de resolución depende de que el procedimiento empleado sea el estándar o AR (Figura 1).

Los cromosomas se agrupan de a pares, conformando el cariotipo que actualmente se obtiene mediante equipos computarizados, adaptados al microscopio, que disponen del soporte informático adecuado (Figura 2).

La técnica de AR o bandeo AR se obtiene sincronizando el cultivo de linfocitos para obtener cromosomas más elongados, en estadio de prometafase, con un incremento considerable en el número de bandas de 400-550 en la técnica estándar a 750-1000 en AR (Figura 3), lo que permite estudiarlos con mayor detalle.

Se recomienda que los estudios citogenéticos de rutina en sangre periférica en pacientes con RM con retraso en el desarrollo o sin él, se realicen con un grado no menor de 550 bandas.

La guía de procedimientos del "American College of Medical Genetics" de los Estados Unidos recomienda realizar AR sólo en aquellos casos en que se sospeche un síndrome específico que requiera un grado de resolución por encima de 650 bandas.²⁷

El bandeo G ha permitido establecer que 1 de cada 150 recién nacidos vivos, 50% de los abortos del primer trimestre y 20% de los del segundo, 20% de los ovocitos, 4% de los espermatozoides, 10% de las concepciones, 8% de los mortinatos y 4% de las parejas infértiles tienen una AC.²⁸

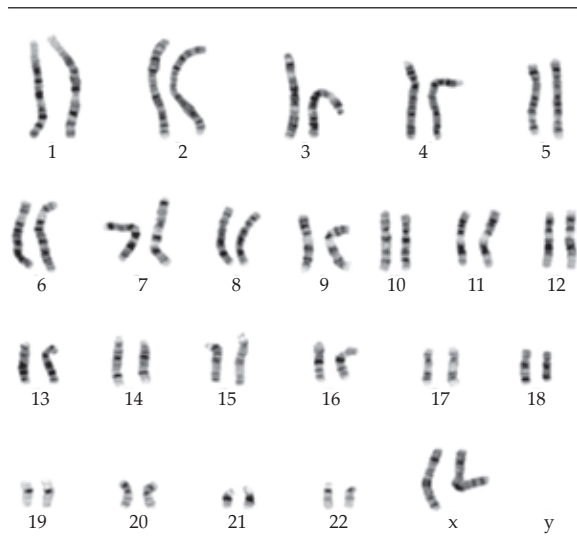
En nuestro país, el primer trabajo sobre AC en recién nacidos vivos con RM detectó un 20% de AC.²⁹

En una revisión realizada en nuestro laboratorio sobre un total de 9500 niños con RM y/o MC el 20% presentaba una AC en linfocitos de sangre periférica.³⁰

Los porcentajes varían de acuerdo a la selección de los pacientes y a las técnicas empleadas.

En enfermedades hematooncológicas el estudio cromosómico en médula ósea permite detectar AC, algunas de las cuales son recurrentes en algunas patologías y se asocian a valor diagnóstico y pronóstico, definiendo en muchos casos el tratamiento a seguir. Mediante solo bandeo G, se ha detectado que el 80% de las leucemias mieloides y el 55-90% de las leucemias linfoblásticas en pediatría, dependiendo de las series, tienen una AC.^{31,32}

FIGURA 2. Cariotipo femenino bandeado G obtenido por técnica estándar



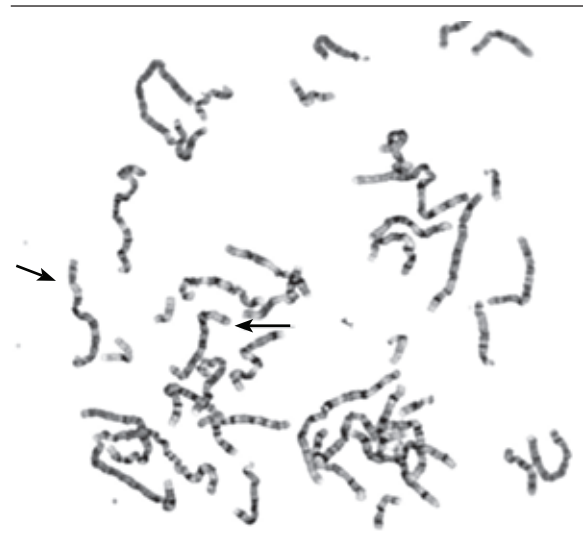
TÉCNICAS DE CITOGÉNÉTICA MOLECULAR

FISH

La técnica de FISH se basa en la propiedad de complementariedad de la doble cadena de ADN. Es una técnica rápida y sencilla. La muestra a investigar, ya sean cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos, se desnaturaliza, permitiendo que las hebras complementarias del ADN se separen. Posteriormente se agrega la sonda de interés, marcada con un fluorocromo, que se unirá al ADN de la muestra en el sitio complementario donde se volverá a formar la doble hélice, proceso que se llama hibridación. La visualización se realiza en un microscopio de fluorescencia, que actualmente se adapta a equipos computarizados analizadores de imágenes que permiten capturar las imágenes y mejorar su calidad (Figura 4). Esta técnica se emplea para detectar y clarificar rearrreglos cromosómicos crípticos, microdeleciones, microduplicaciones y para identificar material cromosómico adicional. Puede realizarse en diferentes tejidos, por ejemplo, en extendidos de la mucosa bucal; resulta una técnica rápida y no invasiva cuando por diferentes razones debe estudiarse otro tejido distinto de la sangre periférica.

Las sondas pueden adquirirse comercialmente o fabricarse en el laboratorio mediante BACS (*bacterial artificial chromosomes*), que son vectores utilizados para clonar segmentos de ADN.

FIGURA 3. Cromosomas prometafásicos obtenidos por técnica de AR. Las flechas señalan el cromosoma 6 normal (izquierda) y con deleción del brazo corto de su homólogo (derecha)



La gran ventaja de esta técnica es que la secuencia a investigar puede verse tanto en metafase como en interfase. La desventaja es que sólo detecta aquello que se está buscando sin aportar información sobre el resto del genoma.

Es importante resaltar que la sonda se selecciona en función del diagnóstico clínico presuntivo o para clarificar los hallazgos citogenéticos previos. Se pueden utilizar sondas centroméricas (marcan únicamente los centrómeros), de pintado cromosómico ("pintan" todo el cromosoma), de secuencia específica de locus (marcan una secuencia única) y subteloméricas (marcan las regiones próximas a los telómeros) (Figuras 5, 6 y 7).

Las sondas centroméricas identifican los centrómeros de los cromosomas. Se utilizan ampliamente para detectar AC numéricas, tanto en metafases como en núcleos interfásicos.

Las sondas específicas de locus o de secuencia única se conocen como sondas LSI y sirven para detectar deleciones o duplicaciones y AC como traslocaciones e inversiones. Generalmente se emplea una sonda control en el mismo cromosoma que contiene la secuencia a testear.

El número de síndromes de microdelección y microduplicación detectados mediante sondas específicas de locus ha aumentado considerablemente en los últimos años. Algunos de los síndromes que pueden diagnosticarse son: deleción1p, Wolf-Hirschhorn, Cri du Chat, Sotos, Williams, Saethre Chotzen, CHARGE, Langer Giedion, Pallister Killiam, Prader Willi/ Angelman, Rubinstein Taybi, Miller Decker, Smith Magenis, Di George/VCFS, deficiencia de sulfatasa esteroide,

Cornelia de Lange, Beckwith Wiedemann y Charcot-Marie-Tooth.³

Cabe aclarar que no todas las sondas existen en el comercio.

Actualmente, muchos de estos síndromes se diagnostican por la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) que no se describirá en esta revisión por tratarse de una técnica de biología molecular.³³

La técnica de FISH es también útil para detectar translocaciones en interfase. Rowley y Tkachuk desarrollaron una estrategia para identificar traslocaciones en interfase mediante sondas de secuencia única.^{34,35}

Las sondas de pintado se corresponden con un determinado cromosoma y permiten detectar AC estructurales y numéricas que los afecten.

Finalmente, las sondas subteloméricas contienen secuencias específicas de ADN que se encuentran aproximadamente a 100-300 kb del extremo del cromosoma y se utilizan en la identificación de deleciones y rearrreglos teloméricos submicroscópicos. Estas regiones son ricas en genes y a menudo están involucradas en rearrreglos cromosómicos.³⁶

Se ha comunicado que la frecuencia de AC subteloméricas es de 5-6% en individuos afectados con RM.³⁷⁻³⁹

M-FISH y SKY

Las técnicas de M-FISH y SKY permiten visualizar todos los cromosomas, con diferentes colores, en un único ensayo de FISH hibridando las metafases con un cóctel de 24 sondas de pintado.

FIGURA 4. Etapas de la hibridación in situ con fluorescencia

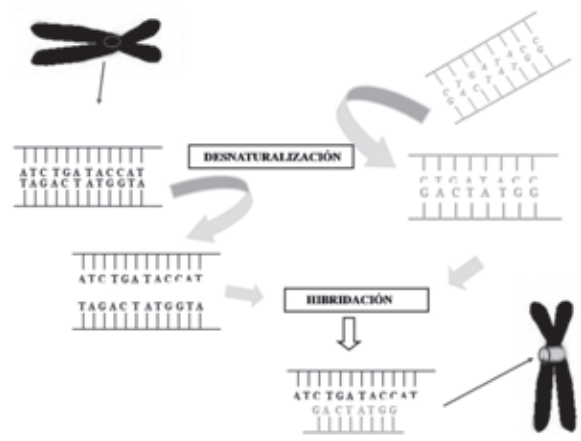
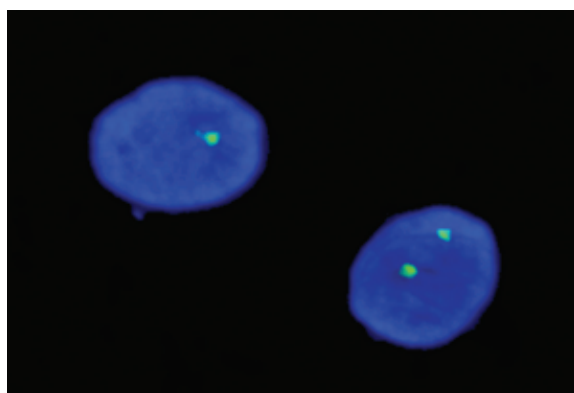


FIGURA 5. Núcleos interfásicos mostrando 1 y 2 señales para la sonda centromérica del cromosoma 7 correspondientes a monosomía y disomía, respectivamente



color ambas fotos

Las diferencias entre ambas técnicas radican solamente en el equipamiento empleado para realizarlas.^{22,23}

El cariotipo espectral es muy útil en neoplasias hematológicas y en tumores sólidos para clarificar rearrreglos complejos y para identificar el origen de material cromosómico adicional.

Sin embargo, no permite detectar rearrreglos intracromosómicos, como inversiones, deleciones y duplicaciones, ya que en ningún caso se modifica el color del cromosoma anormal. Tampoco permite precisar los puntos de rupturas de las AC.

Su alto costo, la falta de equipamiento adecuado y lo laborioso de la técnica, hace que se realice en muy pocos centros del mundo.

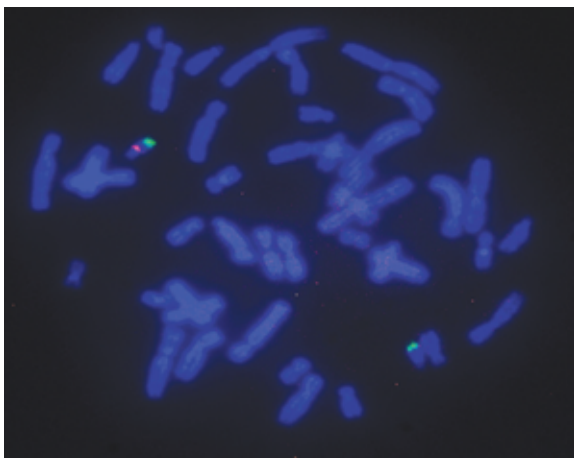
aCGH

La hibridación genómica comparativa empleando *arrays* o cariotipo molecular, como se la ha denominado, es una técnica que ha revolucionado la citogenética clínica.

Permite examinar todo el genoma en un simple chip con una gran resolución, 10 veces mayor que los cromosomas prometafásicos de 750 bandas, detectando ganancias y pérdidas de material cromosómico.

El principio de aCGH es similar al de CGH, pero la hibridación se realiza en una matriz de *arrays* inmovilizada en lugar de extendidos cromosómicos (Figura 8).

FIGURA 6. Metafase hibridada con sonda de secuencia única para detectar microdelección del cromosoma 22. Se observa un cromosoma 22 normal en la parte superior con 2 señales y otro delecionado en la inferior con ausencia de la región crítica para síndrome de microdelección 22. Se emplea una sonda control visible en otra región del mismo cromosoma



La técnica original de CGH consiste en la hibridación simultánea de dos ADN en igualdad de proporciones, tumoral y control (testigo), marcados con diferentes fluorocromos sobre una preparación cromosómica normal. Se marca el ADN del tumor con un fluorocromo verde y un ADN normal con un fluorocromo rojo. Se produce una reacción por competencia donde si la cantidad de ADN es similar (las marcas rojas y verdes son equitativas) el color resultante es amarillo. Sin embargo, en presencia de deleciones o duplicaciones existe una mayor proporción de color rojo o verde, respectivamente (Figura 8).

FIGURA 7. Metafase hibridada con sonda subtelomérica para el brazo corto del cromosoma 8, mostrando presencia de señal en un cromosoma 8 y ausencia en su homólogo

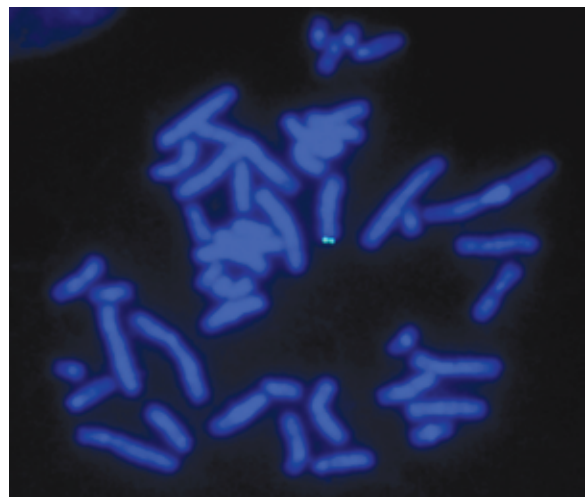
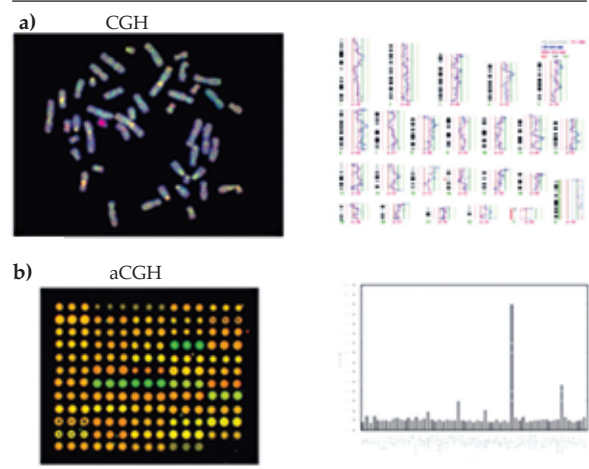


FIGURA 8. a) metafase obtenida por CGH y su análisis correspondiente; b) cariotipo molecular



La visualización se realiza mediante un *software* adecuado donde se observan las ganancias y pérdidas comparando las desviaciones de señal con respecto a un valor estándar.

La ventaja es que no necesita cromosomas metafásicos, pero tiene la gran desventaja de no dar información de AC balanceadas.

La técnica de CGH descripta ha sido reemplazada por la técnica de aCGH, en la que, como se mencionara, el principio es similar al de CGH, pero la hibridación se realiza en una matriz inmovilizada o *arrays*, en lugar de extendidos cromosómicos (Figura 8). Posteriormente, los *arrays* son escaneados y los datos analizados con un *software* adecuado que permite detectar las diferencias en el número de copias entre el ADN del paciente y el ADN control. Es una técnica enteramente molecular, con aplicación en citogenética y puede considerarse un "híbrido" de ambas para la cual deben trabajar expertos de las dos disciplinas.^{25,26}

Los dos grupos de plataformas de *arrays* usados en clínica son aCGH y polimorfismos de simple copia (*single-nucleotide polymorphism*, SNP), que miden directamente la diferencia en el número de copias entre el ADN del paciente y el ADN normal de referencia.

La mayoría de las plataformas se diseñan para detectar aneuploidias, síndromes de microdele-

ción y microduplicación, rearrreglos subteloméricos y otras AC desbalanceadas.

Las variaciones en el número de copias (*copy-number variants*, CNVs) se han detectado en individuos con RM, retraso en el desarrollo, autismo y anomalías congénitas múltiples de causa desconocida. Cuando se las encuentra "*de novo*" se las considera patogénicas, aunque en realidad deben ser interpretadas con precaución. Se han comunicado más de 5000 CNVs en la base de datos de Toronto y muchas se asocian a diferentes enfermedades. Pero también se han descripto en individuos fenotípicamente normales, heredadas de sus padres y algunas de ellas ocurren frecuentemente en la población general.^{40,41}

En los últimos años se han definido varios síndromes empleando aCGH en los que las alteraciones genómicas se corresponden con fenotipos que son en su mayoría moderados y muchas veces variables o no específicos.⁴²

También se han detectado desbalances genómicos en individuos con cariotipos aparentemente balanceados, tanto "*de novo*" como familiares.⁴³

Recientemente se ha realizado un consenso sobre el uso de aCGH como herramienta en el diagnóstico clínico de individuos con trastornos en el desarrollo o anomalías congénitas sobre un total de 21 698 pacientes provenientes de 33 estudios distintos.

TABLA 1. Ventajas y desventajas de las técnicas citogenéticas

Técnicas	Aplicaciones	Ventajas	Desventajas
Bandeo G	Identificar AC estructurales y numéricas	Bajo costo Pesquisa de todo el genoma	Requiere células en división Baja eficiencia en cariotipos complejos
Bandeo G alta resolución	Identificar AC estructurales y numéricas Precisar puntos de ruptura	Bajo costo Pesquisa de todo el genoma	El análisis de todo el cariotipo es muy tedioso
FISH	Determinar la presencia, número de copias y localización de secuencias de ADN	Su costo no es demasiado elevado Es rápida y sencilla Se aplica a células en interfase y en división	Solo es informativa de la secuencia que se desea investigar
Multi FISH cariotipo espectral	Detecta rearrreglos cromosómicos complejos que involucran más de un cromosoma e identifica cromosomas marcadores	Pesquisa de todo el genoma Clarifica rearrreglos cromosómicos complejos	Es laboriosa y de alto costo Requiere células en división y de muy buena calidad No detecta intracromosómicas
aCGH	Detecta pérdidas y ganancias de secuencias de ADN	Pesquisa de todo el genoma No necesita células en división	Tanto el equipamiento como los reactivos son costosos Las AC que se detectan deben ser confirmadas por FISH No detecta AC balanceadas

De este trabajo surgieron las siguientes recomendaciones:

1. Se debe realizar aCGH como primer estudio diagnóstico en pacientes con RM, retraso en el desarrollo, autismo y MCM de causa desconocida, considerando que tiene además una ventaja diagnóstica de 15-20% más que el bandeado G.
2. El bandeado G sigue siendo prioritario en pacientes con síndrome de Down y otros síndromes cromosómicos clínicamente reconocidos.
3. No detecta mosaicismos (presencia de dos o más líneas celulares de diferente composición genética) bajos ni AC balanceadas, pero como estos solo contribuyen en un 1% a la etiología del RM, aCGH es la técnica de elección para el estudio del RM.
4. El bandeado G debería reservarse para pacientes con abortos espontáneos, síndromes cromosómicos reconocidos o historia familiar de AC.⁴⁴

Sin embargo, la falta de uniformidad en el empleo de aCGH en términos de resolución y de cobertura, ya sea de todo el genoma o de un locus específico hace que aún no esté estandarizada para uso clínico. Debe recopilarse más información para comparar los datos de diferentes laboratorios en los cuales la interpretación de los resultados es disímil. Ese es el desafío para los próximos años.

Esta tecnología también es prometedora en hematooncología, ya sea con fines diagnósticos y pronósticos como para contribuir en la clasificación de algunas enfermedades malignas.⁴⁴

Finalmente, en la *Tabla 1* se resumen las aplicaciones, ventajas y desventajas de las técnicas descriptas. Debe resaltarse que todas son complementarias, pero no excluyentes.

Es importante que el lector sepa que no todas las técnicas descriptas en esta revisión se realizan en la Argentina. Solo algunos laboratorios realizan FISH con fines diagnósticos, debido al costo de reactivos y equipamiento.

Con respecto a la técnica de aCGH, su alto costo hace que aún no se realice en nuestro país.

En el campo de la hematooncología, que ameritaría un capítulo aparte, cabe destacar que el bandeado G y el FISH siguen siendo las técnicas de elección en la mayoría de los laboratorios altamente especializados; pero, en algunos, se dispone de las otras técnicas para poder completar el estudio o con fines de investigación.

CONCLUSIÓN

Como se ha podido ver, desde sus comienzos hasta nuestros días, muchos han sido los avances

en el perfeccionamiento de las técnicas que les permiten a los citogenetistas trabajar en un mundo que nunca hubiesen podido imaginar.

Esperamos que, en un futuro no lejano, podamos ver cómo este gran progreso que se está dando a nivel mundial pueda incorporarse a nuestro país. A las futuras generaciones les queda el desafío de luchar por lograrlo, más allá de los obstáculos.

Agradecimientos y reconocimiento

A la Dra. Cristina Barreiro por su valioso aporte en los comentarios de este trabajo.

A mis colaboradores del Laboratorio de Citogenética del Hospital Garrahan por su contribución al material fotográfico de preparaciones cromosómicas realizadas en nuestro laboratorio.

Finalmente deseo efectuar un especial reconocimiento a mi maestro, el Dr. Roberto Coco, pionero de la citogenética en la Argentina. ■

BIBLIOGRAFÍA

1. Trask B. Human Cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002; 3(10):769-78.
2. Smeets D. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarrays. *Clin Biochem* 2004; 37(6):439-46.
3. Dave B, Sanger W. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetics imbalances. *Semin Pediatr Neurol* 2007; 4(1):2-6.
4. Andrieux J. Array-CGH for routine diagnosis of cryptic chromosomal imbalances. *Pathol Biol (Paris)* 2008; 56(6):368-74.
5. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1151:157-66.
6. Tjio JH, Levan A. The chromosome number in man. *Hereditas* 1956; 42:1-6.
7. Ford CE, Hamerton JL. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol* 1956; 31(6):247-51.
8. Ford CE, Hamerton L. The chromosomes of man. *Nature* 1956; 178(4541):1020-3.
9. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfant mongoliens. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1959; 248(11):1721-2.
10. Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959; 1(7075):711-3.
11. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959; 183(4657):302-3.
12. Lejeune J, Lafourcade J, De Grouchy J, Berger R, et al. Partial Deletion of the short arm of chromosome 5. Individualization of a new morbid state. *Sem Hop* 1964; 40:1069-79.
13. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132:1497-501.
14. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243(5405):290-3.

15. Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1968; 49(1):219-22.
16. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 2(7731):971-2.
17. Paris Conference Standardization in Human Cytogenetics. *Birth Defects: Original* 1971.
18. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science* 1976; 191(4233):1268-70.
19. Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, et al. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* 1981; 304(6):325-9.
20. Langer-Safer PR, Levine M, Ward D. Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(14):4381-5.
21. Rudkin GT, Stollar BD. High resolution of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 1977; 265(5593):472-3.
22. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; 12(4):368-75.
23. Shrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273(5274):494-7.
24. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258(5083):818-21.
25. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, et al. Matrixbased comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20(4):399-407.
26. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20(2):207-11.
27. Shaffer LG. American College of Medical Genetics. Professional Practice and Guidelines Committee. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med* 2005; 7(9):650-4.
28. Queisser-Luft A, Stolz G, Wiesel A, Schlaefer K, Spranger J. Malformations in newborn: results based on 30,940 infants and fetuses from the Mainz congenital birth defect monitoring system (1990-1998). *Arch Gynecol Obstet* 2002; 266(3):163-7.
29. Coco R, Penchaszadeh VB. Cytogenetic findings in 200 children with mental retardation and multiple congenital anomalies of unknown cause. *Am J Med Genet* 1982; 12(2):155-73.
30. Gallego M, Herrera J, Baialardo E, Zelaya G, et al. Hallazgos citogenéticos en 8808 niños con malformaciones congénitas múltiples con o sin RM. VI Jornadas Multidisciplinarias Hospital de Pediatría" Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Libro de Actas; 2005. Pág.42.
31. Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev* 2001; 15(1):49-59.
32. Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol* 2010; 28(16):2674-81.
33. Kearney L. Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenet Genome Res* 2006; 114(3-4):189-98.
34. Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R 3rd, Patel YD, et al. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(23):9358-62.
35. Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, et al. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science* 1990; 250(4980):559-62.
36. Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G, et al. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(11):4913-7.
37. Knight SJL, Flint J. Perfect ending: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000; 37(6):401-9.
38. de Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 38(3):145-50.
39. Anderlid BM, Schoumans J, Ameren G, Sahlén S, et al. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 2002; 107(4):275-84.
40. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006; 7(2):85-97.
41. Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet* 2009; 84(2):148-61.
42. Li M, Andersson H. Clinical application of microarray-based molecular cytogenetics: An emerging new era of genomic medicine. *J Pediatr* 2009; 155(3):311-7.
43. Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, et al. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Mol Cytogenet* 2008; 1:15.
44. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86(5):749-64.