



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires  
Argentina

Alvarado, Danny; Arroyo, Jessica; Chaves, Indira;  
Gutiérrez, Juan Diego; Jiménez, Mildred; Solano, Mariela  
Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación:  
actualización y revisión del principio, variantes y aplicaciones  
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 58, núm. 2, 2024, -Junio, pp. 143-154  
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires  
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53578357004>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc  
Red de revistas científicas de Acceso Abierto diamante  
Infraestructura abierta no comercial propiedad de la academia

# Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación: actualización y revisión del principio, variantes y aplicaciones

► Danny Alvarado<sup>1a</sup>, Jessica Arroyo<sup>2b</sup>, Indira Chaves<sup>3b</sup>, Juan Diego Gutiérrez<sup>4c</sup>, Mildred Jiménez<sup>5c</sup>, Mariela Solano<sup>6a\*</sup>

1. Especialidad de Posgrado en Química Clínica. (ORCID: 0000-0002-3281-1233)
2. Maestrías en Microbiología, Parasitología y Química Clínica. (ORCID: 0000-0001-9356-9199)
3. Maestría en Epidemiología aplicada a los Sistemas de Salud. (ORCID: 0000-0001-9020-1583)
4. Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. (ORCID: 0000-0002-8086-767X)
5. Maestrías en Microbiología, Parasitología y Química Clínica. (ORCID: 0000-0002-3545-0154)
6. Especialidad de Posgrado en Hematología. (ORCID: 0000-0002-8019-0187)

<sup>a</sup> Laboratorio Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo, Programa Nacional de Tamizaje, Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social.

<sup>b</sup> Asociación Costarricense para el Tamizaje y la Prevención de Discapacidades en el Niño.

<sup>c</sup> Laboratorio Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo, Programa Nacional de Tamizaje, Hospital Nacional de Niños.

\* Autora para correspondencia.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

La amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación (MLPA) es una valiosa herramienta en el estudio de alteraciones en el número de copias para distintas patologías de origen genético. La existencia de una amplia oferta de *kits* comerciales, el fácil y rápido procesamiento de laboratorio, su alta sensibilidad y, en general, los buenos resultados informados han permitido que su uso se encuentre expandido en muchos laboratorios de biología molecular alrededor del mundo. El principio de esta técnica ha sido adaptado para distintas aplicaciones como la MLPA metilación específica para el estudio de enfermedades relacionadas con la impronta epigenética y la MLPA digital que se acopla a equipos de secuenciación de nueva generación para aumentar la cantidad de regiones analizadas en un solo ensayo. Al contar con 10 años de experiencia en el uso de esta técnica en el Laboratorio Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo se realiza esta revisión con el fin de analizar los principios, variantes de la técnica, análisis de los datos, algunas aplicaciones, ventajas y desventajas de la MLPA en comparación con otras tecnologías disponibles.

**Palabras clave:** Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación; MLPA; Variación del número de copias; Deleciones; Duplicaciones

*Multiplex ligation-dependent probe amplification: update and review of principles, variants, and applications*

## Abstract

*Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is a valuable tool in the study of copy number alterations for different pathologies of genetic origin. The availability of a wide range of commercial kits, the easy and fast laboratory processing, its high sensitivity and, in general, the good results reported have allowed its use to be expanded in many molecular biology laboratories around the world. The basic principle of this technique has been adapted for different applications such as specific methylation MLPA for the study of diseases related to epigenetic imprinting and digital MLPA that is coupled to next-generation sequencing equipment to increase the number of regions analysed in a single trial. With 10 years of experience in the use*

of this technique, the National Laboratory for Neonatal and High Risk Screening performs this review in order to analyse the principles, variants of the technique, data analysis, some applications, and advantages and disadvantages of MLPA compared to other available technologies.

**Keywords:** Multiplex ligation-dependent probe amplification; MLPA; Copy number variants; Deletions; Duplications

## Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação: atualização e revisão do princípio, variantes e aplicações

### Resumo

A amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) é uma ferramenta valiosa no estudo das alterações do número de cópias para diferentes patologias de origem genética. A existência de uma ampla gama de kits comerciais, processamento laboratorial fácil e rápido, alta sensibilidade e, em geral, os bons resultados relatados, permitiram que seu uso se encontre expandido em muitos laboratórios de biologia molecular ao redor do mundo. O princípio desta técnica foi adaptado para diferentes aplicações como a MLPA metilação específica para o estudo de doenças relacionadas com o imprinting epigenético e a MLPA digital que é acoplada a equipamentos de sequenciamento de nova geração para aumentar o número de regiões analisadas em um único ensaio. Com 10 anos de experiência no uso da técnica, o Laboratório Nacional de Triagem Neonatal e de Alto Risco realiza esta revisão visando a analisar os princípios, variantes da técnica, análise dos dados, algumas aplicações, vantagens e desvantagens da MLPA comparado com outras tecnologias disponíveis.

**Palavras-chave:** Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação; MLPA; Variação do número de cópias; Deleções; Duplicações

## Introducción

El Proyecto del Genoma Humano permitió un avance importante para el estudio de enfermedades de carácter hereditario y el desarrollo de técnicas de laboratorio novedosas y eficientes, que además proporcionan procesos secuenciales y simultáneos con alto rendimiento y bajo costo (1).

Este impulso dado por el estudio del genoma humano permitió identificar gran cantidad de variantes que se han asociado con la variabilidad génica de los individuos, caracterización de poblaciones, susceptibilidad a algunas enfermedades, e incluso ha permitido establecer blancos de tratamiento. Estas variantes identificadas comprenden desde rearrreglos génicos complejos hasta cambios puntuales de un solo nucleótido, pequeñas deleciones e inserciones, variantes en el número de copias, entre otros (2).

Algunos grupos de investigación se han enfocado específicamente en las variantes de número de copias conocidas por sus siglas en inglés como CNV (*Copy Number Variants*) y en las técnicas de laboratorio desarrolladas para su detección. Estas CNV son variantes estructurales que pueden ser deleciones o duplicaciones con tamaños desde un kilobase hasta megabases. Se ha descrito que estas variaciones en el número de copias

constituyen alrededor del 12% del genoma humano (3) (4) y pueden influir en la expresión génica, variación fenotípica y alteración de la dosis génica (5).

Como es el caso de otros cambios a nivel de la secuencia de ADN, estas variantes estructurales contribuyen con la variabilidad genética normal pero también se han asociado hasta en un 5% con un significado clínico patológico en una gran diversidad de desórdenes genéticos (3) (4) (6). Según el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica, por sus siglas en inglés ACMG, el estudio de las CNV debería ser el primer paso para la evaluación de individuos con discapacidad intelectual, retraso en el desarrollo, espectro autista o múltiples malformaciones congénitas. También hay patologías ya caracterizadas como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la atrofia muscular espinal (AME) en donde las CNV son la causa más frecuente de alteración génica (7).

Las deleciones y duplicaciones o amplificaciones en el número de copias son mecanismos que también están implicados en el desarrollo del cáncer; por lo tanto, las tecnologías moleculares para la detección de estas variantes han sido ampliamente utilizadas en Oncología, no solo limitándose al diagnóstico, sino que también son fundamentales para la clasificación, pronóstico, elección de terapia y seguimiento de los pacientes con malignidades (8).

Pese a que el análisis de variantes genómicas estructurales fue inicialmente abordado desde el estudio de los cromosomas bajo el microscopio, con el avance en las técnicas de biología molecular se desarrollaron distintas estrategias para estudiarlas (9). Dentro de las técnicas que se han popularizado mayoritariamente por su gama de aplicación clínica y facilidad en el procedimiento de montaje está la amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación conocida por sus siglas en inglés como MLPA.

La empresa ©MRC Holland trabajó en el diseño de la MLPA desde 1997 y ya para 2002 realizó la primera publicación de esta metodología. A partir de ahí, la MLPA se ha convertido en un estándar de oro para la detección del número de copias en ciertas patologías y se ha popularizado su uso en laboratorios alrededor del mundo (10).

Costa Rica no ha sido ajena a los avances en genética y aplicación de técnicas de laboratorio enfocadas a la investigación y diagnóstico clínico, ni a esta técnica en particular. Ejemplo de ello es la División de Genética Molecular del Laboratorio Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo (LAB-PNT), perteneciente al Programa Nacional de Tamizaje (PNT), ubicado en el Hospital Nacional de Niños (HNN) de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), donde la técnica de MLPA se empezó a utilizar a partir del año 2012 para el apoyo en el diagnóstico de la DMD.

Actualmente se utilizan más de 10 *kits* diferentes de MLPA para enfermedades como Charcot Marie Tooth (CMT), síndromes asociados a microdeleciones (MD), AME, hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), hemoglobinopatías (HBB), síndrome de Prader Willi/síndrome de Angelman (PW/AS) y síndrome Beckwith Wiedemann/síndrome Russell Silver (BWS/RSS). Además, se tiene la capacidad de implementar otros *kits*, según la demanda.

Debido a la experiencia del laboratorio por casi 10 años, donde se han procesado alrededor de 1500 determinaciones, es que este trabajo pretende profundizar y divulgar la técnica de MLPA, su principio, alcances, así como ventajas y limitaciones al utilizar este método de análisis de dosis génica y su aplicación en el diagnóstico.

## Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación

La Amplificación de Sondas Múltiples Dependientes de Ligación o MLPA es una técnica de alta resolución basada en una PCR múltiple para cuantificación de la dosis génica en regiones de interés o regiones blanco. En general es una técnica fácilmente reproducible en laboratorios de biología molecular, debidamente equipados, que cuenten con al menos un termociclador y un equipo de electroforesis capilar.

Esta técnica permite la amplificación de regiones blanco mediante el uso de sondas específicas. Lo anterior se logra en una sola reacción que puede incluir hasta 60 sondas para diversas regiones genómicas (11) (12).

Debido a estas características y a la posibilidad de desarrollar sondas prácticamente para cualquier región del genoma, la MLPA se puede utilizar para el diagnóstico molecular de muchas enfermedades en las que el mecanismo de patogénesis consista en alteraciones en el número de copias o bien en patrones anormales de metilación (6).

La secuencia complementaria a la región de interés de cada sonda tiene un tamaño de 60 a 80 nucleótidos y cada *kit* puede tener hasta 60 sondas. La casa comercial tiene a disposición una gran cantidad de sondas específicas según grupo de enfermedades; sin embargo, existe la posibilidad de que los laboratorios o investigadores diseñen sus propios *kits* con sondas personalizadas (10).

## Principio de la amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación

El principio de la MLPA se basa en colocar en una misma reacción la muestra de ADN desnaturalizado con la SALSA *probemix* (reactivo que contiene la mezcla de sondas capaces de hibridar con la región de interés o región blanco); si existe complementariedad de bases las sondas hibridan con la región blanco. Cada sonda está conformada por dos oligonucleótidos adyacentes separados. Si se da una hibridación correcta, ambas sondas son ligadas mediante un proceso enzimático para después ser amplificadas. Solamente las sondas ligadas se amplificarán (Fig. 1) (14).

La particularidad de las sondas es que, además de incluir la secuencia complementaria a la región de interés, tienen una secuencia de unión para *primers* o cebadores universales, los cuales permiten el inicio de la amplificación; además, las sondas contienen una secuencia de relleno (*stuffer*), de longitud variable y única, que permite diferenciarlas por tamaño (3) (Fig. 2).

Durante el proceso de amplificación, el *primer forward* está marcado con un fluoróforo de manera que todos los fragmentos amplificados que contengan dicho *primer* van a emitir una señal. Cuando no hay complementariedad y las sondas no hibridan adecuadamente, no se detectará la fluorescencia; esta ausencia de señal puede deberse a: deleciones en las regiones blanco, o cambios de un solo nucleótido cerca o en el sitio de ligación, además de contemplar errores técnicos, que son poco frecuentes si se sigue de manera estricta el protocolo provisto por la casa comercial (15).

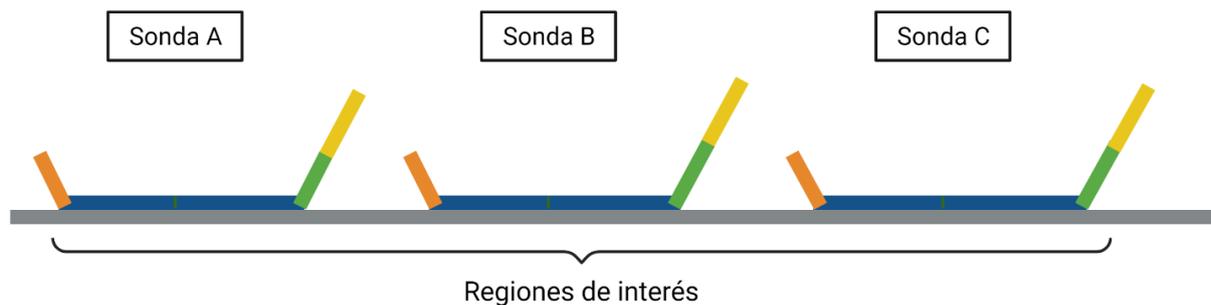


Figura 1. Representación de distintas sondas de MLPA. Se pueden diseñar varias sondas dirigidas a una región de interés en la cual se requiera tener una mejor cobertura. Elaborado con BioRender.com (13)

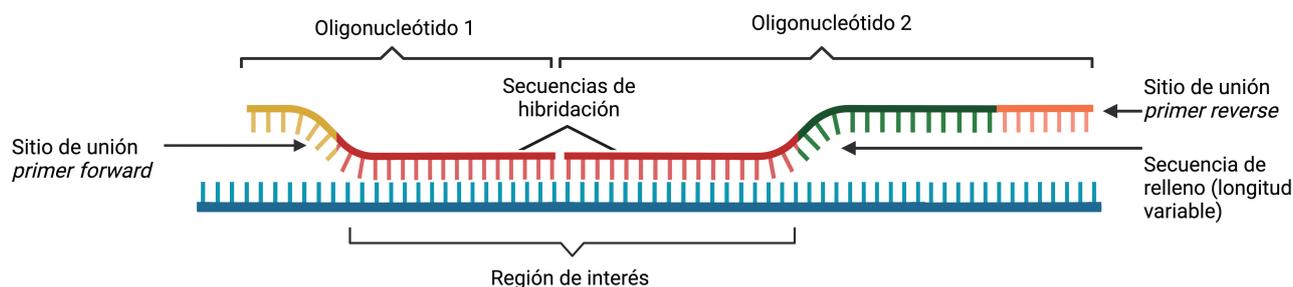


Figura 2. Representación de una sonda de MLPA. Elaborado con BioRender.com (13)

Posteriormente a la amplificación, se obtiene un conjunto de fragmentos de entre 64 y 500 nucleótidos de longitud que pueden ser separados mediante electroforesis capilar (16).

Como se mencionó anteriormente, las sondas amplificadas van a generar productos de un tamaño específico que permiten identificar cada sonda según el tamaño detectado en la electroforesis. Los datos generados por el analizador genético son estudiados mediante un *software* para análisis de fragmentos; la División de Genética molecular utiliza el programa *Coffalyser*, el cual es de acceso libre y provisto por la casa comercial ©MRC Holland.

## Flujo de trabajo de la MLPA

Cada corrida se inicia con la preparación de las muestras de referencia (con un número normal de copias) que se deben incluir para el proceso de normalización de los datos, sobre el cual se va a profundizar más adelante. Además, se recomienda utilizar controles positivos para la verificación de la corrida; estos controles positivos pueden ser materiales de referencia certificados o muestras con genotipo ya caracterizado.

Según el método de extracción o el *kit* SALSA *probemix* que se esté utilizando, se podrían requerir tratamientos previos. Es importante además verificar la

calidad y concentración del ADN antes de iniciar el procesamiento técnico de la reacción de MLPA, que tarda aproximadamente 24 horas (11); en la Tabla I se detalla cada uno de estos pasos.

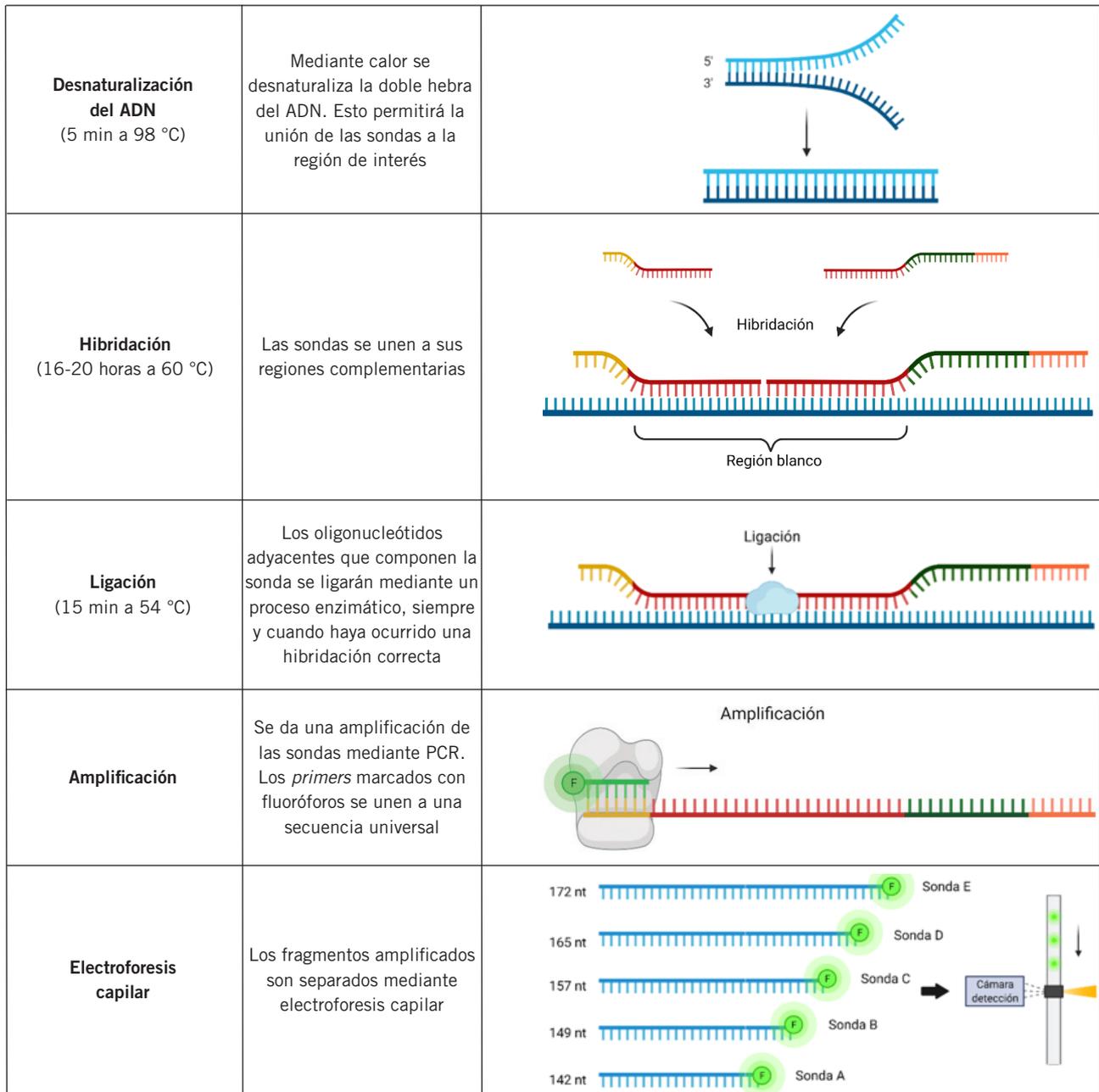
El análisis de los datos se inicia con una revisión de los datos crudos para valorar calidad del ADN, la corrida de electroforesis, la eficiencia del proceso de desnaturalización y la PCR, entre otros. Todos los *kits* de reactivos SALSA *probemix* contienen fragmentos de control de calidad (Fig. 3) que permiten valorar algunos de esos parámetros. A continuación se detalla la función de los mismos:

- Fragmento de referencia: tamaño de 92 nucleótidos (nt). Se utiliza como punto de referencia para comparar la altura de los otros fragmentos de calidad (16).
- Fragmentos Q: tamaños de 64, 70, 76, 82 nt. Sirven para valorar la cantidad de ADN de la muestra y actividad de la enzima ligasa. Éstos deben ser menores que el fragmento de referencia de 92 nt (16).
- Fragmentos D1 y D2: tamaños de 88 y 96 nt respectivamente. Estos sirven para visualizar si el proceso de desnaturalización fue adecuado; si esto no ocurre las sondas no podrán hibridarse de manera correcta. Estos fragmentos deben presentar una señal mayor con respecto al fragmento de referencia de 92 nt (16).

Tabla I. Técnicas para el estudio de variantes estructurales y CNVs

Técnica	Principio	Resolución	Limitantes	Aplicaciones
<b>Cariotipo</b>	Microscopía	5-10 Mb (32)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resolución es muy baja</li> <li>Se necesita un microscopista experimentado</li> <li>Se necesita cultivo de células en metafase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detección de aneuploidías, traslocaciones, inversiones, anillos, CNVs de gran escala</li> <li>Infertilidad o abortos a repetición (29)</li> </ul>
<b>FISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> y microscopía de fluorescencia	100-200 kb (33)	<ul style="list-style-type: none"> <li>No puede detectar CNVs pequeñas (&lt;100 kb)</li> <li>Número limitado de sondas</li> <li>Costo elevado para un análisis dirigido (6)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detección de anomalías cromosómicas como aneuploidías, algunas microdelecciones y microduplicaciones y rearrreglos cromosómicos</li> <li>Puede detectar traslocaciones balanceadas (33)</li> </ul>
<b>CGH Array</b>	Microarreglos	Alta resolución, es variable dependiendo del diseño y cobertura del análisis (34)	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se pueden detectar alteraciones balanceadas</li> <li>Costo, resolución y cobertura dependen de la densidad de las sondas (35)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detección de aneuploidías y CNVs a nivel genómico (36)</li> <li>Indicado para retraso en desarrollo, discapacidad intelectual y anomalías congénitas múltiples (33)</li> </ul>
<b>SNP Array</b>	Microarreglos	10-100 kb (dependiendo de la plataforma) (29)	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se pueden detectar traslocaciones balanceadas o genes de fusión (37)</li> <li>Resolución limitada por la distribución de SNPs en el genoma (38)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CNVs según diseño</li> <li>Permite detección de mosaicismo, quimerismo y disomía uniparental (38)</li> </ul>
<b>MLPA</b>	PCR <i>Multiplex</i>	Generalmente a nivel de exones <sup>a</sup> (6)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Método de bajo rendimiento (limitado a disponibilidad de sondas) (35)</li> <li>No permite detectar alteraciones balanceadas (39)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detección de CNVs ya descritos previamente</li> <li>Estudio de desórdenes de impronta</li> <li>Algunas variantes puntuales específicas (29)</li> </ul>
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa	100 pb <sup>a</sup> (30)	<ul style="list-style-type: none"> <li>La capacidad de análisis de varios <i>loci</i> está limitada por la cantidad de fluoróforos disponibles (30)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Permite cuantificación génica absoluta o relativa (30)</li> </ul>
<b>NGS</b>	Secuenciación masiva en paralelo	Variable según tamaño de lecturas y cobertura en la región (35)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aplicación clínica limitada por pocos estudios robustos de validación</li> <li>Fluctuaciones en la cobertura afecta la detección de variantes</li> <li>Los hallazgos requieren confirmación por otro método (35)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Método de alto rendimiento, permite análisis de CNVs y variantes puntuales de múltiples regiones en el mismo ensayo</li> <li>Permite una detección más precisa de los puntos de corte de las CNVs (35)</li> </ul>
<b>Mapeo óptico genómico</b>	Mapeo óptico de regiones marcadas con fluorescencia	Desde 500 pb (40)	<ul style="list-style-type: none"> <li>La cobertura de ciertas regiones genómicas está limitada por la dependencia de los <i>motifs</i> de reconocimiento de enzimas (40)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detección de variantes estructurales a nivel genómico</li> <li>Complemento para tecnologías de secuenciación de lecturas cortas, para lograr ensamblajes a nivel de cromosomas</li> <li>Detección de alteraciones cromosómicas balanceadas (40)</li> </ul>

<sup>a</sup> La resolución mínima depende del tamaño de las sondas utilizadas.



Fuente: Elaboración propia, información tomada de (10) (16). Elaborado con Biorender.com (13)

Figura 3. Fases de la etapa práctica del análisis mediante MLPA

Una vez verificados los fragmentos de calidad, el *software* toma en cuenta estos parámetros y otras medidas internas como intensidad de señal, línea base de los picos de los fragmentos, e identifica cada uno de los picos, según el tamaño detectado, para realizar el análisis (17) (Fig. 4).

Al final de este proceso se calcula un puntaje de separación de fragmentos por sus siglas en inglés FRSS y un puntaje de reacción del MLPA conocido también por la sigla en inglés como FMRS. Estos puntajes permiten

visualizar si ocurrió algún error en la corrida de electroforesis o en la reacción de MLPA respectivamente, y decidir si se acepta o no la corrida o una muestra específica (17).

El *software* realiza una normalización de datos y evaluación de la dosis génica de las regiones estudiadas. Dicho proceso considera la variación sistemática no biológica que existe entre muestras y se utiliza para calcular el número de copias detectado por cada sonda (18). Con esto se pretende reducir la interferencia en el análisis dada por la variabilidad que pueden introducir los métodos

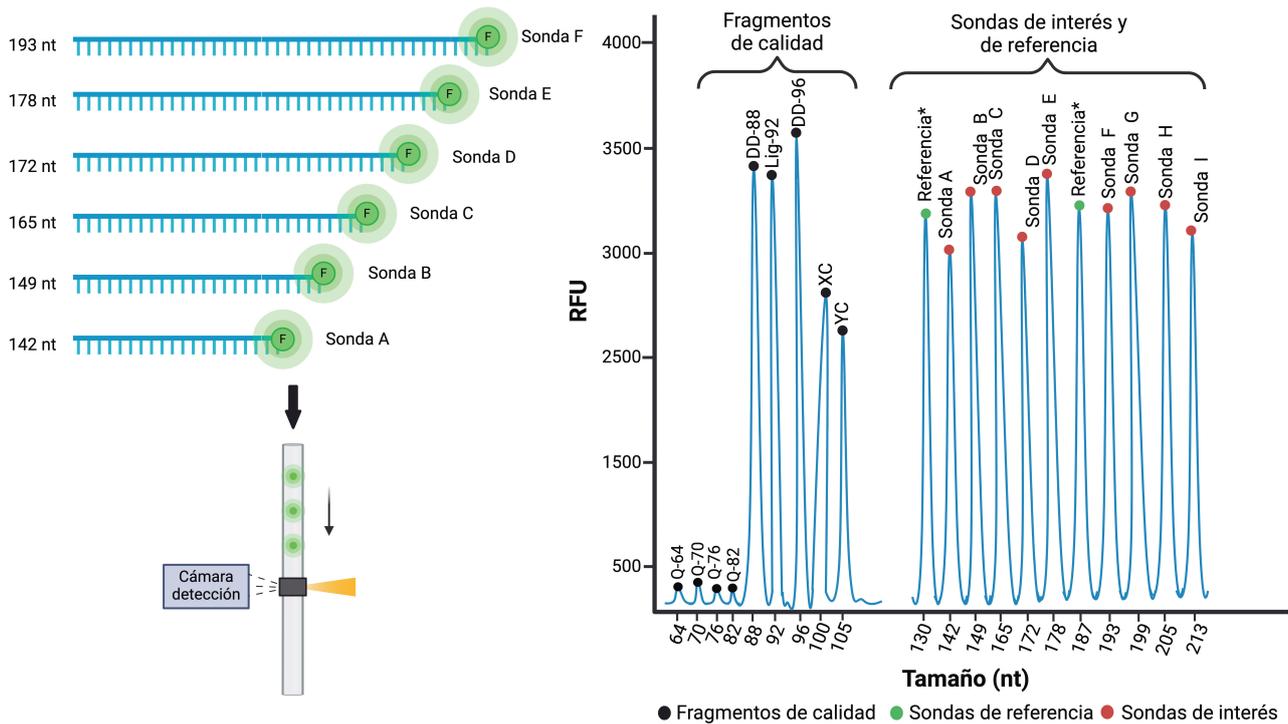


Figura 4. Electroferograma de MLPA. Patrón esperado de fragmentos de calidad que indican la cantidad de ADN y la desnaturalización adecuadas y las señales (picos) de las sondas de referencia y de interés separadas según tamaño. Elaborado con Biorender.com (13)

de extracción utilizados, presencia de contaminantes, calidad de la reacción del MLPA y calidad de la separación de fragmentos en la electroforesis capilar (10).

Esta normalización requiere de varios elementos: 1) **sondas de referencia**, dirigidas a una región conocida, no de interés; la señal de estas sondas se utiliza para la normalización intramuestra; 2) **muestras de referencia**, deben tener un número de copias normal, sirven para determinar el número de copias al comparar la señal de cada sonda en las muestras con la señal de las sondas correspondientes en las muestras de referencia. Se requiere un mínimo de tres muestras de referencia de diferentes individuos en cada ensayo, para la elección de estas muestras; algunos *kits* incluyen un reactivo (SALSA *Reference Selection* DNA) que permite identificar muestras de referencia con el genotipo deseado. Además, cuando se trabaja con sondas ubicadas en los cromosomas sexuales, es recomendable que las muestras de referencia provengan de individuos del mismo sexo que las muestras a analizar (17).

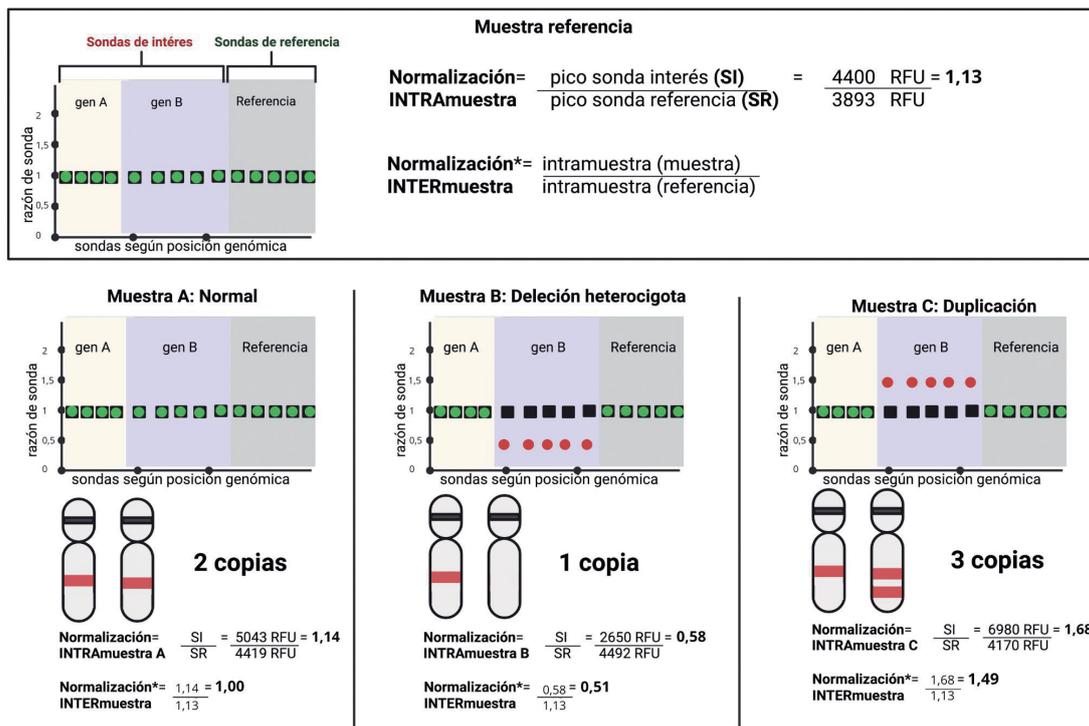
El proceso de normalización contempla la **normalización intramuestra**: sirve para normalizar la señal de cada una de las sondas de interés; para ello se calcula una **razón de sondas** mediante la relación de la altura del pico de la sonda de interés y la altura del pico de la sonda de referencia.

El otro tipo de normalización es la **normalización intermuestra**: compara las razones de sonda de las muestras con las razones de sonda de las muestras de referencia, para así determinar los cambios en el número de copias.

Una vez realizado el proceso de normalización se procede al análisis comparativo donde se observa el resultado del radio intermuestra, el cual brinda la información del número de copias o ploidía, en donde una razón de 1 se considera normal (diploide, número de copias normal), una razón de 0,5 (1 copia, delección heterocigota), 1,5 (3 copias, duplicación heterocigota) y así sucesivamente. Existen desviaciones estándar en cada uno de los rangos que facilitan la cuantificación del número de copias de las sondas (11) (19) (Fig. 5).

## Variantes MLPA

Basadas en esta técnica se han desarrollado variaciones de la misma que permiten estudios a nivel de expresión génica al trabajar a partir de ARN, ver patrones de metilación y analizar gran número de sitios blanco en combinación con tecnologías de secuenciación masiva en paralelo, conocidas como secuenciación de nueva generación (NGS).



\*La normalización intermuestra se realiza para cada una de las muestras, utilizando constante la normalización intramuestra de la muestra de referencia.

**Muestra de referencia:** Dosis normal en regiones diploides. Para la normalización intramuestra se utiliza la razón de la señal RFU (unidades relativas de fluorescencia) emitida por las sondas de las regiones de interés y sondas de referencia, en la muestra de referencia. En este caso la razón de 1 corresponde a la presencia de dos copias (diploide). Este valor se mantiene constante en todos los análisis comparativos para cada muestra, ya que se necesitan muestras de referencias con número de copias normales.

- A) Muestra con dosis normal: la normalización intramuestra tiene una razón igual a 1. Para la normalización intermuestra se debe comparar la razón intramuestra del paciente B entre la razón de la intramuestra de la muestra referencia (A). Por lo tanto, esta última tiene una razón de 1, lo que corresponde a dos copias.
- B) Muestra con delección en heterocigosis: la normalización intramuestra igual a 0,5 indica una copia de la región de interés y dos copias de las sondas de referencia. La normalización intermuestra es de 0,5 y corresponde a una copia.
- C) Muestra duplicación. La normalización intramuestra igual a 1,5 indica tres copias de la región de interés y dos copias de las sondas de referencia. La normalización intermuestra es de 1,5 y corresponde a tres copias para la región detectada.

Figura 5. Normalización de datos. Elaborado con Biorender.com (13)

### MLPA específica de metilación (MS-MLPA)

Las causas de enfermedades genéticas no se limitan a cambios en la secuencia de ADN; actualmente se sabe que mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la expresión génica son la causa de ciertas patologías. Dentro de los mecanismos epigenéticos más estudiados están los patrones de metilación del ADN (20).

Existen técnicas de biología molecular que permiten el estudio de estos patrones de metilación; muchas de estas metodologías se basan en la conversión de citosinas no metiladas a uracilo mediante una reacción con bisulfito; sin embargo, este procedimiento no siempre es eficiente o apto para todo tipo de muestras (21).

El MS-MLPA permite determinar patrones de metilación al utilizar sondas que contienen sitios de reconocimiento para enzimas sensibles a la metilación, en donde la enzima *HhaI* digiere las sondas unidas a regiones de ADN no metiladas; esas sondas digeridas no pueden amplificarse ni generar señal (Fig. 6A). Por lo tanto, únicamente los sitios del ADN no digeridos emitirán una señal (22).

Para el análisis de datos del MS-MLPA, además de los parámetros de calidad ya mencionados, se utilizan sondas control de digestión dirigidas a islas CpG (regiones ricas en citosinas y guaninas); estas regiones estarán metiladas y no podrán ser digeridas por la enzima *HhaI*, por lo tanto se dará la amplificación de dichas sondas y se generará la señal de esas sondas control de digestión (22).

## RT-MLPA

El estudio de la expresión génica a través del análisis del ARN es una herramienta muy útil en la investigación de genes candidatos de enfermedades, en el análisis del efecto de variantes genéticas y como biomarcador de ciertas enfermedades para su clasificación, pronóstico y tratamiento. Por lo anterior, se han ideado múltiples estrategias de alta eficiencia para la cuantificación y caracterización del ARN, como la RT-PCR, microarreglos, secuenciación de ARN y RT-MLPA (23) (24).

El análisis de ARN mediante el protocolo convencional de la MLPA no es posible debido a que la enzima empleada en el proceso de ligación solamente es capaz de ligar las sondas en ADN de doble banda. Sin embargo, los *kits* convencionales se pueden utilizar si se realiza una primera etapa de retrotranscripción, con la que se pueden obtener moléculas de ADN copia para continuar con la hibridación y el resto del protocolo descrito en el Tabla I (25) (Fig. 6B). Esta metodología es de gran utilidad cuando se requiere un estudio dirigido. Se debe aclarar que esta variante de la MLPA no fue diseñada por la casa comercial MRC-Holland, pero los *kits* se pueden utilizar de manera regular con ADN copia (23).

## MLPA-digital

El análisis mediante MLPA tiene la limitante de que no permite el uso de más de 60 sondas por reac-

ción. Si se tiene en cuenta que algunas de esas sondas son de referencia, esa cantidad puede ser una limitante a la hora de realizar estudios en más genes o en más regiones de ciertos genes. La MLPA-digital combina la tecnología de la MLPA convencional con NGS para la cuantificación de amplicones mediante la plataforma Illumina®, lo que permite aumentar el número de regiones analizadas, ya que tiene el potencial de incluir hasta 1000 sondas en una sola reacción (26).

En esta variación de la técnica, previo al paso de desnaturalización del ADN, se agregan adaptadores que contienen 3 elementos: 1) una región índice para la identificación de la muestra, 2) una secuencia de unión para el *primer* de amplificación y 3) una secuencia de unión para el *primer* de secuenciación. Estos adaptadores posteriormente se van a unir a las sondas que hibridan con la región de interés, para después ser amplificadas. Además, esta sonda incluye una secuencia identificadora única homóloga a la secuencia de relleno del MLPA convencional (26) (Fig. 6C).

La MLPA digital permite investigar muchas más regiones genómicas que el MLPA tradicional. Sin embargo, algunas limitantes de la MLPA aún no se pueden resolver, como la detección de alteraciones balanceadas, inversiones u otras alteraciones para las que no se tengan sondas (27).

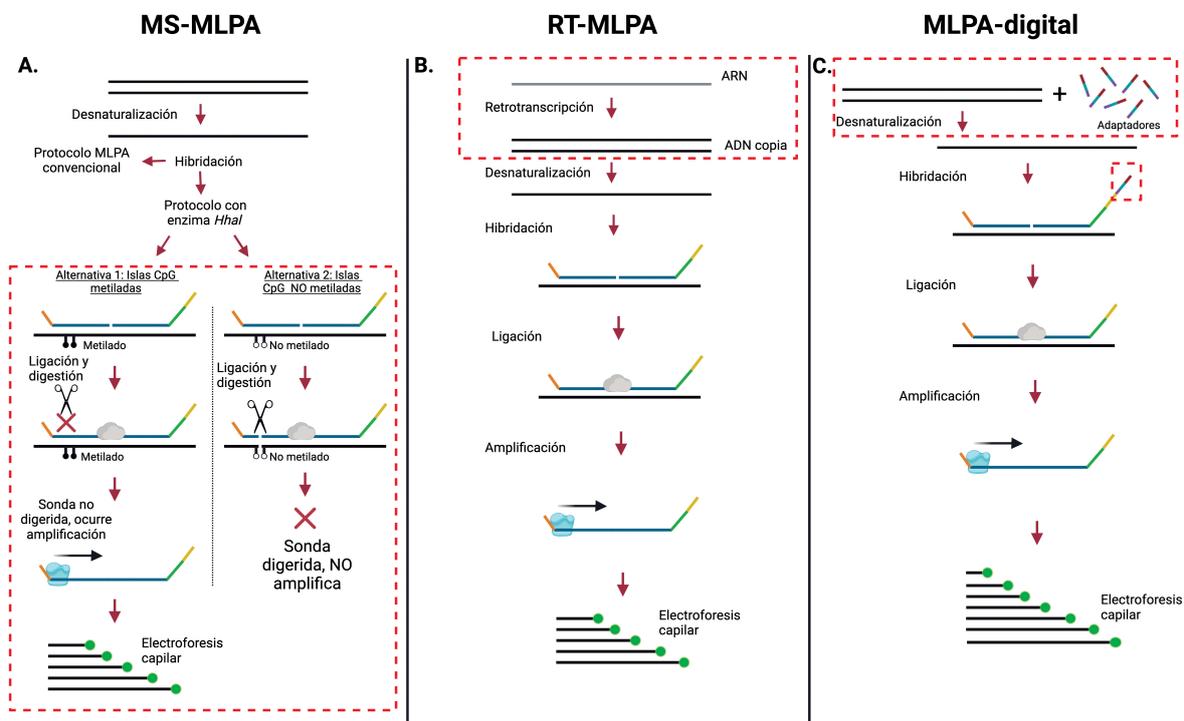


Figura 6. Comparación de distintos ensayos de MLPA. A) MS-MLPA, alternativa 1: región metilada y alternativa 2: región no metilada. B) RT-MLPA C) MLPA-digital. Se señalan en cuadros rojos las diferencias principales entre cada metodología con el ensayo de MLPA convencional. Elaborado con Biorender.com (13)

## Comparación de técnicas para el estudio de variantes estructurales

La variación genética interindividual inicialmente se ha estudiado desde la diversidad en variantes puntuales; sin embargo, se ha establecido que las variantes estructurales tienen gran influencia en la variación humana (28).

El estudio de enfermedades genéticas causadas por variantes estructurales, variantes en el número de copias y otros rearrreglos cromosómicos se puede realizar mediante distintas técnicas; algunas se han utilizado por mucho tiempo como el *Southern blot* y el cariotipo; otras surgieron dentro de la denominada citogenética molecular, lo que permitió lograr una mayor sensibilidad para detectar cambios más pequeños (29).

Actualmente la mayoría de las metodologías para la detección de CNV utilizan dos principios: unos basados en microarreglos y otros en la cuantificación de dosis; estos últimos se basan fundamentalmente en la PCR. La elección de la técnica ideal para un estudio debe tener en cuenta que, si se quiere un análisis dirigido se recomendaría un método basado en PCR. Por el contrario, si se desea un estudio más amplio a nivel genómico, sería más apropiado utilizar un método basado en microarreglos (9). Las características de algunas de las técnicas más empleadas se detallan en la Tabla I.

## Alcances y limitaciones

El uso de la técnica de MLPA en los laboratorios se ha popularizado cada vez más debido a su relativo bajo costo, alta sensibilidad, reproducibilidad y su fácil implementación en los centros de biología molecular. Como se mencionó en apartados anteriores, la MLPA ya no se limita a la cuantificación del número de copias de sondas específicas, sino que también es capaz de cuantificar la expresión génica, detectar patrones de metilación, e incluso detectar SNP de importancia clínica conocida (2) (30).

Al comparar la MLPA con otras técnicas citogenéticas se destaca que es un proceso menos laborioso, más sensible y ajustable a flujos de trabajo pequeños y medianos. Esta metodología no sustituye a otras técnicas; por el contrario, sirve como complemento de otras tecnologías de biología molecular. Como ejemplo de ello, en la división de Genética Molecular del LAB-PNT se utiliza como complemento para el apoyo en el diagnóstico de ciertas enfermedades como HSC. En otros casos, como en DMD y AME, se usa únicamente la MLPA.

Dentro de las desventajas de la MLPA se debe mencionar que su uso se limita a las sondas de interés incluidas en el *kit*, ya sea comercial o personalizado. También se debe tomar en cuenta que ciertos métodos de extracción influyen en los resultados del MLPA, por lo que la casa comercial brinda una lista de métodos recomenda-

dos cuyo rendimiento permite obtener ADN con baja concentración de contaminantes (11).

Otro aspecto importante es el riesgo de resultados falsamente positivos cuando hay variantes puntuales en los sitios de unión que impiden la hibridación, ligación y amplificación de las sondas (11) generando resultados semejantes a una delección en única sonda. En estos casos el laboratorio debe corroborar esto con otra metodología o aclarar dicha limitación en el informe.

Se suma a las limitaciones la imposibilidad de trabajar con células individuales, donde la MLPA no permite detectar ciertos grados de mosaïcismo o fracciones bajas de células tumorales (31). Tampoco brinda la ubicación exacta ni la orientación del aumento del número de copias, situación importante cuando se trata de rearrreglos genómicos balanceados (2).

## Aplicaciones en la División de Genética Molecular del LAB-PNT

La División de Genética Molecular (LAB-PNT) trabaja desde varias aristas: confirma el diagnóstico de las enfermedades detectadas por el PNT, como variantes de hemoglobinas, orina con olor a jarabe de arce, galactosemia y fenilcetonuria, entre otras. También apoya el diagnóstico molecular en los análisis solicitados por los especialistas de todos los hospitales del país, previa coordinación con el laboratorio o médicos especialistas del servicio de Genética del HNN. Este apoyo diagnóstico se hace para pacientes pediátricos y adultos y se complementa con los estudios familiares necesarios. Además, se trabaja en la implementación de nuevos paneles para el diagnóstico de otras miopatías, enfermedades neurodegenerativas y patologías asociadas con retraso del desarrollo cognitivo.

Las principales patologías abordadas mediante MLPA son la atrofia muscular espinal, la distrofia muscular de Duchenne, el síndrome de Prader Willi/síndrome de Angelman, beta-hemoglobinopatías, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (gen *PMP22*), el síndrome Beckwith-Wiedemann y Silver Russell, la enfermedad de Wilson, la diabetes tipo Mody, la hiperplasia suprarrenal congénita y algunos síndromes asociados a microdelecciones, entre otras. Cabe destacar que el LAB-PNT participa en programas de aseguramiento de la calidad externos del Colegio Americano de Patólogos (CAP) y en la Red Europea de Calidad de Genética Molecular (EMQN) para la mayoría de estas enfermedades.

## Conclusiones

Las técnicas de biología molecular para el estudio de enfermedades genéticas se mantienen en constante innovación; cada día se implementan nuevas tecnologías

y protocolos que permiten estudiar el genoma humano con mayor profundidad y desde distintas perspectivas. El estudio de las variantes genómicas estructurales se puede realizar con múltiples tecnologías; por lo tanto, la implementación de una u otra requiere de un riguroso proceso de elección.

La MLPA representa una estrategia robusta para el estudio dirigido de dosis génica y, a pesar de que no permite realizar análisis a nivel genómico, hay una amplia disponibilidad de sondas que facilitan el estudio de una gama de enfermedades. En un país con recursos económicos limitados estos análisis dirigidos pueden resultar de gran utilidad. Pese a que la técnica y el análisis de datos requieren personal calificado, este proceso se ve simplificado debido al número limitado de sondas para regiones cuyo significado clínico está bien descrito, y esto facilita el proceso de interpretación de resultados.

La combinación de otras metodologías con la MLPA ha permitido ampliar la cantidad de aplicaciones, la MS-MLPA, la RT-MLPA y la MLPA-digital han expandido no solamente el número de enfermedades que se analizan, sino que han permitido que la técnica compita con otras tecnologías que analizan alteraciones a nivel genómico.

Para países en vías de desarrollo como Costa Rica, es de gran importancia mantenerse a la vanguardia en las tecnologías de laboratorio implementadas para el diagnóstico clínico. Sin duda alguna, la genética molecular cada vez tendrá un mayor papel en este proceso diagnóstico, por lo que resulta fundamental estar actualizados e implementar, dentro de las posibilidades de cada laboratorio, el uso de nuevas tecnologías que permitan obtener información relevante, que se traduzca en una mejora en el abordaje de los pacientes.

## Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

## Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

## Correspondencia

Dra. MARIELA SOLANO VARGAS

Centro de Prevención para Discapacidades, Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica.

Correo electrónico: masolanv@ccss.sa.cr

## Referencias bibliográficas

- Solano-Vargas M, Molina-Mora J. Tecnologías de secuenciación de nueva generación: principios, aplicaciones y escenario en Costa Rica. *Rev Col Microbiólogos y Químicos Clínicos* 2017; 23: 111-9.
- Shen Y, Wu B. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J Genet Genomics* 2009; 36 (4): 257-65.
- Saxena S, Gowdhaman K, Kkani P, Vennapusa B. Improved multiplex ligation-dependent probe amplification (i-MLPA) for rapid copy number variant (CNV) detection. *Clin Chim Acta* 2015; 450: 19-24.
- Perné A, Zhang X, Lehmann L, Groth Ma, Stuber F, Book M. Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and real-time PCR accuracy for gene copy number quantification using the  $\beta$ -defensin locus. *Short Tech Reports* 2009; 47 (6): 1023-8.
- National Center for Biotechnology Information USNL of M. Glossary [Internet]. Commonly Used Genome Terms. 2007. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/glossary.shtml> (fecha de acceso: 20 de junio de 2022).
- Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* 2012; 13 (3): 3245-76.
- Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, *et al.* ACMG Technical standards. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource. *Genet Med* 2020; 22 (2): 245-57.
- Cusenza VY, Bisagni A, Rinaldini M, Cattani C, Frazzi R. Copy number variation and rearrangements assessment in cancer: comparison of droplet digital PCR with the current approaches. *Int J Mol Sci* 2021 Apr 29; 22 (9): 4732.
- Carson AR, Feuk L, Mohammed M, Scherer SW. Strategies for the detection of copy number and other structural variants in the human genome. *Hum Genomics J* 2006; 2 (6): 403-14.
- ©MRC Holland. MRC Holland [Internet]. About us. 2020. Disponible en: [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com) (fecha de acceso: 9 de octubre de 2022).
- Petra E, Schouten JP. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for detection of copy number variation in genomic sequences. En: Bimai T, Ralph R, editores. *PCR mutation detection protocols, methods in molecular biology*. 2nd ed. Humana Press; 2011. p. 97-126.
- Rotman J, Van Gils W, Butler D, Spaink HP, Meijer AH. Rapid screening of innate immune gene expression in zebrafish using reverse transcription-multiplex ligation-dependent probe amplification. *BMC Res Notes* 2011 Jun 15; 4: 196.
- Biorender. Biorender [Internet]. 2021. 2021. Disponible en: [www.biorender.com](http://www.biorender.com) (fecha de acceso: 20 de marzo de 2024).
- Carrasco P, Martín I. MLPA en el diagnóstico de enfermedades hereditarias. *Soc Española Med Lab* 2018; 37: 26-32.
- Mrc-holland CNET. MRC Holland [Internet]. 2021. Disponible en: [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com) (fecha de acceso: 20 de marzo de 2024).

16. Mrc-holland CNET. Protocolo General de MLPA [Internet]. Amsterdam; 2019. Disponible en: [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com) (fecha de acceso: 15 de noviembre de 2022).
17. Coffa J, Van den Berg J, Researcher I. Analysis of MLPA data using novel software Coffalyser.NET by MRC-Holland. En: Badr A, editor. Modern approaches to quality control [Internet]. IntechOpen 2011. Disponible en: [www.intechopen.com/chapters/22131](http://www.intechopen.com/chapters/22131) (fecha de acceso: 9 de octubre de 2021).
18. Cáceres A, Armengol L, Villatoro S, González JR. MLPAstats: an R GUI package for the integrated analysis of copy number alterations using MLPA data. *BMC Bioinformatics* 2011; 1-7.
19. Villamón E, Piqueras M, Berbegall AP, Tadeo I, Castel V, Navarro S, *et al.* Comparative study of MLPA-FISH to determine DNA copy number alterations in neuroblastic tumors. *Histol Histopathol* 2011 Mar; 26 (3): 343-50.
20. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2012; 38 (1): 23-38.
21. Jeuken JWM, Cornelissen SJB, Vriezen M, Dekkers MMG, Errami A, Sijben A, *et al.* MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest* 2007; 87 (Oct): 1055-65.
22. Mrc-holland CNET. MS-MLPA General Protocol [Internet]. 2020. Disponible en: [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com) (fecha de acceso: 9 de octubre de 2021).
23. van Rensburg L, Loxton AG. Transcriptomics : the key to biomarker discovery during tuberculosis? *Biomark Med* 2015; 9 (5): 483-95.
24. Li Q, Wang K. InterVar : clinical interpretation of genetic variants by the 2015 ACMG-AMP guidelines 2017; 267-80. Disponible en: <http://wintervar.wglab.org/results.php> (fecha de acceso: 5 de enero de 2022).
25. Eldering E, Spek CA, Abernson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, *et al.* Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in de @ ned signalling pathways. *Nucleic Acids Res* 2003; 31 (23): e-153.
26. Benard-Slagter A, Zondervan I, Groot K De, Ghazavi F, Sarhadi V, Van Vlierberghe P, *et al.* Digital multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of key copy number alterations in T- and B-cell lymphoblastic leukemia. *J Mol Diagnostics* 2017; 19 (5): 659-72.
27. Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, Gángó A, de Groot K, Steenkamer M, *et al.* High-throughput copy number profiling by digital multiplex ligation-dependent probe amplification in multiple myeloma. *J Mol Diagnostics* 2018; 20 (6): 777-88.
28. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 85-97.
29. Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic diagnosis for pediatric disorders: revolution and evolution. *Front Pediatr* 2020 Jul 8; 8: 1-24.
30. Cantsilieris S, Baird PN, White SJ. Genomics molecular methods for genotyping complex copy number polymorphisms. *Genomics* 2013; 101 (2): 86-93.
31. Gatta V, Gennaro E, Franchi S, Cecconi M, Antonucci I, Tommasi M, *et al.* MS-MLPA analysis for FMR1 gene: evaluation in a routine diagnostic setting. *BMC Med Genet* 2013 Aug 5; 14: 79.
32. Martin CL, Warburton D. Detection of chromosomal aberrations in clinical practice: from karyotype to genome sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2015; 16: 309-26.
33. Cui C, Shu W, Li P. Fluorescence in situ hybridization: cell-based genetic diagnostic and research applications. *Front Cell Dev Biol* 2016 Sep 5; 4: 1-11.
34. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 2005 Oct; 6 (10): 782-92.
35. Mu W, Li B, Wu S, Chen J, Sain D, Xu D, *et al.* Detection of structural variation using target captured next-generation sequencing data for genetic diagnostic testing. *Genet Med* 2019; 21 (7): 1603-10.
36. Park S, Jung EH, Ryu R, Kang HW, Chung HD, Kang H. The clinical application of array CGH for the detection of chromosomal defects in 20,126 unselected newborns. *Mol Cytogenet* 2013; 29: 1-5.
37. Shen Y, Wu B, Yu CH, Lin TK, Jou ST, Lin CY, *et al.* A simple practical guide to genomic diagnostics in a pediatric setting. En: Badr A, editor. *Genet Med*. 2<sup>nd</sup> ed. 2011; 8 (6): 1-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.07.028> (fecha de acceso: 7 de mayo de 2022).
38. Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Genomics Hum Genet* 2011; 12: 25-51.
39. Estrada-Juárez H, Fernández-Hernández L, Rivera-Pedroza C, Grether-González P. MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) en el diagnóstico perinatal rápido de las principales aneuploidías. *Perinatol y Reprod Humana* 2012; 26 (3): 172-9.
40. Yuan Y, Chung CY, Chan T. Advances in optical mapping for genomic research. *Comput Struct Biotechnol J* 2020; 18: 2051-62.

**Recibido: 13 de septiembre de 2022**

**Aceptado: 20 de marzo de 2024**