

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Características clínicas y relación genotipo-fenotipo en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y anomalías congénitas causados por reordenamientos genómicos.

Tesis doctoral

Mónica Pilar Roselló Piera

Valencia, 2014

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN PACIENTES CON TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO Y ANOMALÍAS CONGÉNITAS CAUSADOS POR REORDENAMIENTOS GENÓMICOS.

Tesis doctoral que presenta para optar al título de Doctor por la Universitat de Valencia la Licenciada en Medicina y Cirugía

Mónica Pilar Roselló Piera

Directores de Tesis

Dra. María del Carmen Orellana Alonso

Dr. Francisco Martínez Castellano

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal

Hospital Universitari i Politècnic "La Fe"

Grupo de Investigación Traslacional en Genética (IIS La Fe)

LaFe
Hospital
Universitari
i Politècnic



Valencia, 2014

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Título de la tesis: Características clínicas y relación genotipo-fenotipo en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y anomalías congénitas causados por reordenamientos genómicos.

Directores de tesis: Dra. María del Carmen Orellana Alonso
Dr. Francisco Martínez Castellano

Estudios de doctorado: Biología Molecular i Genètica (556 030F)

Tutora: Dra. M^a José Martínez Sebastián

Doctoranda: Mónica Pilar Roselló Piera

Fdo. doctoranda: Mónica Pilar Roselló Piera

LaFe
Hospital
Universitari
i Politècnic

LaFe
Hospital
Universitari
i Politècnic

IIS
Instituto de
Investigación
Sanitaria



La Dra. Carmen Orellana Alonso y el Dr. Francisco Martínez Castellano de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitari i Politècnic “La Fe” de Valencia, como directores,

CERTIFICAN

Que la memoria titulada “**Características clínicas y relación genotipo-fenotipo en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y anomalías congénitas causados por reordenamientos genómicos**”, ha sido realizada por doña Mónica Pilar Roselló Piera en la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, del Hospital Universitari i Politècnic “La Fe” de Valencia, en el seno del Grupo de Investigación Traslacional en Genética, del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

Que la memoria se considera satisfactoria y apta para ser presentada como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de Valencia.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado, que ratifica la tutoría de los cursos de doctorado, en Valencia a 1 de abril de 2014.

Fdo. Dra. María del Carmen Orellana Alonso

Fdo. Dr. Francisco Martínez Castellano

Fdo. Dra. M^a José Martínez Sebastián

A mi familia,

a mi padre por su fe en mí,

a mi madre por inculcarme la constancia y el amor por el trabajo
bien hecho,

a mi hermana por enseñarme a ver el mundo desde otro punto de
vista,

a Héctor por su apoyo, siempre incondicional.

A los pacientes y a sus familias

Gracias a todos los profesionales, sanitarios y no sanitarios, que de alguna forma participan, no sólo en la asistencia, sino en el día a día de estas familias.

Gracias a todos los compañeros que nos habéis remitido a los pacientes para realizar los estudios genéticos.

Gracias a todo el personal del **Servei de Laboratori del Consorci Hospitalari Parc Taulí de Sabadell**. Especialmente, a la cap de servei Dra. Montse Torra, al tutor de residents Dr. Eugenio Berlanga y a la Dra. Miriam Guitart, con quien empecé en el mundo de la genética. Gracias a la Dra. Elisabet Gabau por enseñarme a ver a estos niños en una consulta. Con vosotros pasé cinco años de los que guardo un grato recuerdo.

Gracias al **Hospital Universitari i Politècnic "La Fe" de Valencia**, como institución, por la oportunidad que me brindó no sólo al incorporarme al trabajo, sino por permitirme realizar esta tesis doctoral.

A todos los compañeros de la **Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal**, agradeceros vuestra colaboración y participación.

Al **Grupo de Investigación Traslacional en Genética**, a los que habéis formado parte, Irene, y a los que estáis todavía Sonia, Sandra, Silves, con el trabajo de todos hemos sacado esto adelante.

A mis directores de tesis y a sus familias, gracias por vuestro sacrificio y por las horas que me habéis dedicado. Gracias, Carmen y Paki, porque además de tener mucha ciencia en la cabeza, tenéis mucho sentido común, imprescindible también para investigar. Al **Dr. Francisco Martínez**, por ser un excelente científico e investigador. A la **Dra. Carmen Orellana** por su exquisitez en el trabajo y ser una gran profesional. Carmen, aunque estés entre los últimos de esta lista de agradecimientos, no significa que tenga menos que agradecerte, sino todo lo contrario, gracias por ser una gran compañera en el trabajo diario.

Gracias a todos los que de un modo u otro estáis a mi lado.

ÍNDICES

ÍNDICES	i
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>vii</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>xi</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>xv</i>
<i>PÁGINAS WEB</i>	<i>xix</i>
INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>La discapacidad intelectual y sus causas</i>	3
1.2 <i>La discapacidad intelectual de origen genético</i>	5
1.2.1 <i>Causas cromosómicas que originan discapacidad intelectual</i>	6
1.2.2 <i>Discapacidad intelectual ligada al cromosoma X</i>	8
1.2.2.a <i>Discapacidad intelectual ligada al cromosoma X sindrómica</i>	8
1.2.2.b <i>Discapacidad intelectual ligada al cromosoma X no sindrómica o inespecífica</i>	10
1.2.3 <i>Discapacidad intelectual de herencia autosómica</i>	13
1.2.3.a <i>Enfermedades de herencia autosómica dominante con discapacidad intelectual</i>	13
1.2.3.b <i>Enfermedades de herencia autosómica recesiva con discapacidad intelectual</i>	13
1.2.3.c <i>Enfermedades de herencia autosómica dominante modificada por la impronta genética</i>	14
1.2.4 <i>Síndromes de microdeleción</i>	14
1.3 <i>Defectos congénitos</i>	16
1.4 <i>Estudio citogenético clásico de la discapacidad intelectual</i>	21
1.5 <i>Estudios de citogenética molecular para la detección de desequilibrios genómicos. Impacto de las nuevas tecnologías</i>	22
HIPÓTESIS DE TRABAJO	27
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	35

<i>1.1 Sujetos de estudio</i>	37
1.1.1 Origen y selección de los pacientes.....	37
1.1.2 Aspectos ético-legales.....	42
1.1.3 Características demográficas de los pacientes.....	43
1.1.3.a Edad y género de los pacientes.	43
1.1.3.b Edad de los progenitores.	44
1.1.4 Estudios genéticos.....	45
1.1.4.a Extracción de ADN de sangre periférica.....	45
1.1.4.b Obtención de células en metafase.....	45
1.1.4.c Hibridación in situ fluorescente.....	45
1.1.4.d Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación.....	46
1.1.4.e Array-CGH.	46
1.1.4.e.I Array BACs.	47
1.1.4.e.II Array OLIGOS.	47
1.1.4.f Otros estudios genéticos.	48
1.1.4.f.I Análisis de segregación de marcadores polimórficos.....	48
1.1.4.f.II Estudio de inactivación del cromosoma X.	48
1.1.4.g Interpretación de los resultados.....	49
<i>1.2 Base de datos</i>	51
1.2.1 Registro general del paciente.....	51
1.2.2 Registro de datos clínicos.....	53
1.2.2.a Datos generales.....	53
1.2.2.b Gestacionales y neonatales.....	54
1.2.2.c Rasgos dismórficos faciales.....	56
1.2.2.d Defectos congénitos.....	58
1.2.2.e Rasgos neurológicos.....	60
1.2.2.f Antecedentes familiares.....	62
1.2.3 Registro de resultados.....	63
<i>1.3 Análisis estadístico</i>	66

1.3.1	Análisis de variables clínicas.	66
1.3.2	Análisis bioinformático.	67
RESULTADOS	69
<i>1.1</i>	<i>Clasificación de los resultados genéticos.</i>	<i>71</i>
1.1.1	Descripción de los resultados en función de la metodología utilizada..	72
1.1.2	Clasificación de los resultados en función de la CNV detectada.	73
1.1.2.a	Casos con CNVs causales.	75
1.1.2.a.I	Alteraciones subteloméricas complejas.	75
1.1.2.a.II	Síndromes clínicos de microduplicación y microdelección.....	77
1.1.2.a.III	CNVs causales halladas en los pacientes restantes.	79
1.1.2.b	Casos con CNVs benignas.	81
<i>1.2</i>	<i>Estudio de las variables genéticas.</i>	<i>82</i>
1.2.1	Distribución en el genoma.	82
1.2.2	Herencia y origen.	84
1.2.3	Tipo de alteración (ganancia/pérdida).	89
1.2.4	Localización dentro del cromosoma (intersticial o subtelomérica).....	93
1.2.5	Relación entre el tipo de alteración (ganancia/pérdida) y localización dentro del cromosoma (intersticial/subtelomérica).....	94
1.2.6	Número de pCNVs por caso.	95
<i>1.3</i>	<i>Estudio de las variables clínicas.</i>	<i>97</i>
1.3.1	Variables demográficas.	97
1.3.1.a	Edad de los pacientes.....	97
1.3.1.b	Género de los pacientes.....	97
1.3.1.c	Edad de los progenitores.....	97
1.3.2	Variables clínicas en la serie global.	105
1.3.2.a	Características clínicas principales.	105
1.3.2.b	Somatometría: percentiles de talla, peso y perímetro cefálico...	106
<i>1.4</i>	<i>Estudio de las características genéticas y genómicas de las CNVs identificadas y su relación con variables clínicas.....</i>	<i>110</i>
1.4.1	Asociación de variables clínicas.	110

1.4.2 Comparación de frecuencias.....	115
1.4.3 Análisis de variables cuantitativas. Regresión lineal.	121
1.4.4 Cálculo de la puntuación clínica según de Vries.....	123
1.4.5 Desarrollo de un nuevo modelo predictivo de reordenamientos genómicos mediante regresión logística.....	128
1.4.5.a Aplicación del modelo a la serie global de pacientes.....	132
1.4.5.b Serie de seguimiento.	137
1.5 Análisis de enriquecimiento funcional de los genes implicados en las pCNVs.	142
DISCUSIÓN.....	149
1.1 Rendimiento diagnóstico.....	151
1.2 Características clínicas de los pacientes: obtención de un modelo predictivo.	157
1.2.1 Características clínicas generales de los pacientes.	158
1.2.2 Cardiopatía congénita.	159
1.2.3 Trastornos del crecimiento.....	161
1.2.4 Anomalías genitales.	164
1.2.5 Anomalías de los dedos.....	164
1.2.6 Asociación de rasgos clínicos frecuentes. Propuesta de una nueva secuencia clínica indicativa de Neurocristopatía.....	165
1.2.7 Obtención de un modelo predictivo.....	173
1.2.7.a Evaluación de la puntuación propuesta por de Vries en 2001. ...	176
1.2.7.b Propuesta de un nuevo modelo predictivo.	177
1.3 Factores de predisposición.	180
1.3.1 Duplicaciones segmentarias.	180
1.3.2 Género de los pacientes.	181
1.3.3 Origen parental de las pCNVs.	183
1.3.4 Edad de los progenitores.	185
1.3.5 Riesgo de alteraciones recurrentes.	187

1.4 Proteínas que actúan como “interruptores moleculares” en la transmisión de señales celulares y su importancia en la modulación de la conducta y el comportamiento humano.....	191
1.5 Otros estudios genéticos realizados en pacientes con array normal.	198
1.6 Revisión y perspectiva del estudio de las variantes genómicas en la discapacidad intelectual.	202
CONCLUSIONES	209
BIBLIOGRAFIA	213
ANEXOS.....	249
ANEXO I	251
Hoja de recogida de datos clínicos. Proyecto de investigación en trastornos del desarrollo/ retraso psicomotor.....	253
ANEXO II	255
Nota informativa del proyecto de investigación sobre el origen genético de los trastornos del desarrollo.....	257
Consentimiento informado para estudio genético.....	258
ANEXO III.....	259
Resumen de las principales características clínicas y variantes de dosis en los 73 pacientes en los que se detectó alguna CNV causal (91 CNVs).....	261
ANEXO IV	271
Financiación.....	273

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Causas de DI según diversas revisiones de la literatura (modificada de <i>Curry et al.</i> , 1997) y su incidencia relativa.....	5
Tabla 2. Causas genéticas de la DI y prevalencia relativa estimada (datos extraídos y adaptados de Ropers 2010).....	6
Tabla 3. Síndromes clínicos causados por microdeleciones cromosómicas más frecuentes. Adaptado del listado de síndromes presente en DECIPHER (https://decipher.sanger.ac.uk/).	15
Tabla 4. Malformaciones congénitas más frecuentes descritas en pacientes con alteraciones genéticas. Extraído de diversas publicaciones de los Boletines del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas.	20
Tabla 5. Centros hospitalarios públicos valencianos por provincias que remitieron propuestas para incluir a pacientes en el estudio genético de investigación sobre trastornos del neurodesarrollo.	40
Tabla 6. Resultados generales obtenidos tras el estudio genético de los 246 pacientes de la serie.	73
Tabla 7. Resultados detallados de las pCNVs detectadas en los 73 pacientes en función de las tres clasificaciones utilizadas.	74
Tabla 8. Pacientes con CNVs consideradas como alteraciones subteloméricas complejas.	75
Tabla 9. Pacientes con CNVs responsables de síndromes clínicos de microduplicación y microdelección.	77
Tabla 10. Pacientes con otras CNVs consideradas patológicas.	80
Tabla 11. Herencia y origen de las CNVs de delección y de duplicación.	84
Tabla 12. Herencia y origen de las CNVs de localización intersticial y subtelomérica.	85
Tabla 13. Herencia y origen de las CNVs simples y complejas.	85
Tabla 14. Cambios genómicos heredados o de origen tanto materno como paterno.	86
Tabla 15. Reordenamientos genómicos presentes en 28 pacientes heredados de un progenitor y su interpretación.	88
Tabla 16. Tamaño, número de genes y de elementos ultraconservados para las CNVs de delección y de duplicación.	90

Tabla 17. Resultados del análisis de la regresión lineal univariante para las pCNVs de delección.....	91
Tabla 18. Resultados del análisis de la regresión lineal univariante para las pCNVs de duplicación.	92
Tabla 19. Tamaño, número de genes y de elementos ultraconservados para las pCNVs de localización subtelomérica e intersticial.....	93
Tabla 20. Tamaño, número de genes y de elementos ultraconservados para las pCNVs de delección y de duplicación en función de su localización subtelomérica o intersticial.....	94
Tabla 21. Edad media en años para la maternidad y para la paternidad en la población general para el período comprendido entre 1987 y 2009.....	102
Tabla 22. Edad a la maternidad y a la paternidad para la población general, para la serie global de pacientes y por grupos en función de la detección de alguna pCNV.	104
Tabla 23. Edad media a la maternidad y a la paternidad para las madres y padres de pacientes con pCNVs <i>de novo</i>	105
Tabla 24. Criterios clínicos establecidos para la inclusión de los pacientes en el estudio de investigación de trastornos del neurodesarrollo.....	106
Tabla 25. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una <i>odds ratio</i> superior a 2 para los pacientes con pCNVs.....	107
Tabla 26. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una <i>odds ratio</i> superior a 2 para los casos con pCNVs de delección pura o de delección y duplicación en el mismo paciente.....	108
Tabla 27. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una <i>odds ratio</i> superior a 2 para los pacientes con pCNVs de localización subtelomérica o intersticial.	108
Tabla 28. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una <i>odds ratio</i> superior a 2 para los pacientes pCNVs simples o complejas.	109
Tabla 29. Análisis de frecuencias de los rasgos clínicos para la serie global y para los pacientes con pCNVs.....	115
Tabla 30. Rasgos clínicos más significativos por su valor p o por la <i>odds ratio</i> para el grupo de las deleciones puras, duplicaciones puras y deleciones con duplicación.....	119

Tabla 31. Rasgos clínicos más significativos por su valor p o por la <i>odds ratio</i> para el grupo de pCNVs de localización intersticial o subtelomérica.	120
Tabla 32. Rasgos clínicos más significativos por su valor p o por la <i>odds ratio</i> para el grupo de pCNVs simples o complejas.	121
Tabla 33. Puntuación media, mediana, moda, mínimo y máximo según la publicación propuesta por de Vries en 2001 para los pacientes de la serie en función del resultado genético obtenido.	123
Tabla 34. Resultados de la regresión logística en el programa SPSS con las variables clínicas con resultado significativo.	129
Tabla 35. Variables clínicas que forman el modelo predictivo propuesto para orientar cuándo se espera obtener un resultado normal o alterado mediante el estudio con <i>arrays</i>	132
Tabla 36. Puntuación media, mediana, moda, mínimo y máximo según el modelo con la puntuación clínica propuesta para los pacientes de la serie en función del resultado genético obtenido.	133
Tabla 37. Función molecular que hace referencia a las proteinquinatas de tipo serina/treonina (GO: 0004674) y función molecular de proteínas de unión a GTP (GO: 0005525). Se muestran los 16 genes que hacen referencia a cada GO junto con los 21 pacientes con trastorno de conducta y de comportamiento cuyas pCNVs contienen dichos genes.	144
Tabla 38. Criterios para la asignación de la patogenicidad o benignidad, adaptado de Miller <i>et al.</i> , 2010.	154
Tabla 39. Pacientes con la secuencia RHO y con variantes de dosis consideradas patológicas.	172
Tabla 40. Puntuación propuesta por de Vries y colaboradores para la selección de pacientes con sospecha de reordenamientos subteloméricos. Adaptado de Vries <i>et al.</i> , 2001.	174
Tabla 41. Variables clínicas que forman el modelo predictivo propuesto para orientar cuándo se espera obtener un resultado normal o alterado mediante el estudio con <i>arrays</i>	177
Tabla 42. Listado de genes obtenido tras realizar una búsqueda en la base de datos OMIM con los criterios de búsqueda trastorno del neurodesarrollo y quinasas de serina/treonina.	192
Tabla 43. Listado de genes obtenido tras realizar una búsqueda en la base de datos OMIM con los parámetros trastorno del neurodesarrollo y proteína de unión a GTP.	194

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Genes localizados en el cromosoma X asociados a formas sindrómicas de discapacidad intelectual. Adaptada de la página web del Greenwood Genetic Center en su última revisión, marzo 2013 (www.ggc.org).	9
Figura 2. Genes localizados en el cromosoma X asociados a formas inespecíficas de discapacidad intelectual. Adaptada de la página web del Greenwood Genetic Center en su última revisión, marzo 2013 (www.ggc.org)	11
Figura 3. Genes localizados en el cromosoma X asociados a formas sindrómicas y no sindrómicas de discapacidad intelectual.....	12
Figura 4. Distribución de las principales variantes estructurales benignas.	25
Figura 5. Pacientes incluidos en el presente estudio a lo largo de los 9 años.	39
Figura 6. Listado con los 32 profesionales sanitarios (por orden alfabético) y número de pacientes remitido por cada uno de ellos.	41
Figura 7. Distribución de los pacientes según la edad al momento de inclusión en el proyecto.....	44
Figura 8. Metodología utilizada para la detección de reordenamientos genómicos a lo largo de estos años y número de pacientes estudiados con cada una de estas técnicas.	48
Figura 9. Imagen de la pantalla del formulario de registro general de pacientes en la base de datos de proyectos de investigación en retraso mental.	52
Figura 10. Imagen de la pantalla del formulario con los cinco subformularios principales.....	53
Figura 11. Imagen de la pantalla del formulario de datos generales del paciente recogidos en el momento de inclusión en el estudio.	54
Figura 12. Imagen de la pantalla del formulario de datos referentes a las variables recogidas durante la gestación y la época neonatal.	55
Figura 13. Imagen de la pantalla del formulario de datos referentes a las variables clínicas que hacen referencia a los rasgos dismórficos.....	57
Figura 14. Imagen de la pantalla del formulario de datos referentes a las variables clínicas que hacen referencia a defectos congénitos.....	58
Figura 15. Imagen de la pantalla del formulario de datos con las variables clínicas referentes a los principales rasgos neurológicos.....	61

Figura 16. Imagen de la pantalla del formulario de datos con las variables que recogen los antecedentes familiares más significativos.	62
Figura 17. Imagen de la pantalla del registro de resultados genéticos.	64
Figura 18. Imagen de las relaciones establecidas entre las diferentes tablas, con variables clínicas y resultados genéticos, creadas en la base de datos.....	65
Figura 19. Periodo de inclusión y estudio de los pacientes para el diagnóstico genético.	72
Figura 20. Idiograma donde se muestra la localización cromosómica de las 91 pCNVs detectadas en los 73 pacientes.	83
Figura 21. CNVs en función de la herencia y el origen de las mismas.	87
Figura 22. Distribución normal de la edad de los progenitores a la maternidad (A) y a la paternidad (B).	98
Figura 23. Período de años en el que nacieron los 246 pacientes.	99
Figura 24. Edad media a la maternidad (en rojo) y a la paternidad (en azul) por año de nacimiento de los pacientes.	99
Figura 25. Edad media a la maternidad (A) y a la paternidad (B) en la población general para el período de 1987 al 2009, obtenida a partir de los datos demográficos del INE, directos para la maternidad y calculados para la paternidad.....	103
Figura 26. Correlaciones entre las variables clínicas recogidas durante la gestación y la etapa de neonato.....	111
Figura 27. Correlaciones entre las variables clínicas referidas a los rasgos dismórficos faciales.....	112
Figura 28. Correlaciones entre las variables clínicas que hacen referencia a los defectos congénitos.....	113
Figura 29. Correlaciones entre las variables clínicas referidas a los rasgos neurológicos.....	114
Figura 30. Gáfico de barras agrupadas que muestra las variables clínicas con significación estadística.....	118
Figura 31. Distribución de los 246 pacientes según la puntuación propuesta por de Vries en 2001.....	124
Figura 32. Cálculo de la puntuación de Vries para los pacientes con pCNVs y para el grupo con resultado normal.....	124
Figura 33. Box-plot con la representación de la puntuación de Vries en los pacientes en función del resultado.	126

Figura 34. Curva ROC que muestra la sensibilidad y la especificidad para nuestra serie según la puntuación propuesta por de Vries.	127
Figura 35. Curva ROC y diagrama de cajas que representa la puntuación en los pacientes de la serie según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo en función del resultado obtenido tras el estudio genético.	134
Figura 36. Curva ROC y diagrama de cajas que representa la puntuación en los pacientes de la serie, sin los ocho casos considerados patológicos de penetrancia incompleta, según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo en función del resultado obtenido tras el estudio genético.	136
Figura 37. Curva ROC y diagrama de cajas de los pacientes de la serie de seguimiento según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo.	138
Figura 38. Curva ROC y diagrama de cajas que representa la puntuación en los pacientes de la serie de seguimiento según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo excluyendo los cuatro casos patológicos de penetrancia incompleta.	140
Figura 39. Representación gráfica de las funciones moleculares significativas de los genes conservados contenidos en las pCNVs de los pacientes con alteraciones de conducta y de comportamiento.	148
Figura 40. Algoritmo para el diagnóstico genético en pacientes con discapacidad intelectual, anomalías congénitas múltiples y trastorno del espectro autista (de Miller y colaboradores 2010).....	205

ABREVIATURAS

A continuación se enumeran las abreviaturas utilizadas en la presente tesis:

ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
Array-CGH	hibridación genómica comparada basada en <i>arrays</i>
bCNV	variante de número de copias benigna
CI	coeficiente de inteligencia
CGH	hibridación genómica comparada
CIA	comunicación interauricular
CIE	clasificación internacional de enfermedades
CIV	comunicación interventricular
CNVs	variaciones de número de copias
DC	defectos congénitos
Del	delección
DI	discapacidad intelectual
DILX	discapacidad intelectual ligada al cromosoma X
dn	<i>de novo</i>
DS	duplicaciones segmentarias
Dup	duplicación
EEG	electroencefalograma
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente (del inglés <i>fluorescence in situ hybridization</i>)
GH	hormona de crecimiento
GOs	funciones moleculares según <i>gene ontology</i>
HR-CGH	hibridación genómica comparada de alta resolución
INE	instituto nacional de estadística
M	materno
MAPH	amplificación e hibridación múltiple de sondas (del inglés <i>multiplex amplification and probe hybridization</i>)
MLPA	amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (del inglés <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)

OR	<i>odds ratio</i>
OSIP	observatorio de salud infantil y perinatal de la Conselleria de Santitat de la Comunidad Valenciana
P	paterno
pb	pares de bases
PC	perímetro cefálico
pCNV	variante de número de copias patogénica
PDA	persistencia del <i>ductus</i> arterioso
pipCNV	variante de número de copias patogénica de penetrancia incompleta
ppCNV	variante de número de copias probablemente patológica
PTE	portador de translocación equilibrada
RCIU	retraso de crecimiento intrauterino
RHO	raíz nasal hundida, hipertelorismo, implantación baja de las orejas
RD	rasgos dismórficos
RGD	retraso global del desarrollo
ROC	receiver operating characteristic
SNC	sistema nervioso central
SXF	síndrome del cromosoma X frágil
TAC/RMN	tomografía axial computerizada/resonancia magnética nuclear
TEA	trastorno del espectro autista
TF	tetralogía de Fallot
TGV	transposición de los grandes vasos
TI	translocación insercional
Trip	triplicación
UCE	elemento ultraconservado
VOUS	variante de número de copias de significado incierto

PÁGINAS WEB

- Agilent: *array* de oligonucleótidos de diseño propio
<https://earray.chem.agilent.com/earray/>
- Babelomics <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>
- CIE-10
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=2641&Itemid=2560
- Database of Genomic Variants <http://dgv.tcag.ca/>
- Database of Human Variation
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/studies/nstd37/>
- DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources)
<https://decipher.sanger.ac.uk/>
- ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations)
<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>
- Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>)
- GeneReviews <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>
- Greenwood Genetic Center www.ggc.org
- INE (Instituto Nacional de Estadística) <http://www.ine.es>
- ISCA (International Standard Cytogenomic Array Consortium)
<https://www.iscaconsortium.org/>
- MLPA: sondas comerciales y para diseño propio
<http://www.mlpa.com>
- MRC-Holland <http://www.mrc-holland.com>
- NCBI (National Center for Biotechnology Information):
pathway WP2064
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/672460>
- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)
www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim
- OSIP (Observatorio Salud Infantil y Perinatal de la Conselleria de Sanitat Valenciana) www.sp.san.gva.es
- PubMed www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
- STRING <http://string-db.org/>
- UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/>

INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1 La discapacidad intelectual y sus causas.

La discapacidad intelectual (DI), hasta hace relativamente poco retraso mental es, en nuestra sociedad, la patología más frecuente dentro de los trastornos del desarrollo, y se pone de manifiesto desde la infancia. La DI se caracteriza por un funcionamiento intelectual significativamente por debajo de la media, y coexiste con limitaciones en al menos dos de las siguientes habilidades: comunicación, cuidado personal, convivencia familiar, habilidades sociales y convivencia en la comunidad, autodeterminación, percepción de salud/enfermedad, propia seguridad, rendimiento académico, ocio y trabajo (Curry *et al.*, 1997).

Según la *American Association of Mental Retardation* (10th edition) y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) en su 10ª versión ([http://www.paho.org/hq/index.php? Option = com_content&view=category&layout=blog&id=2641&Itemid=2560](http://www.paho.org/hq/index.php?Option=com_content&view=category&layout=blog&id=2641&Itemid=2560)), la DI se define en función del coeficiente de inteligencia (CI), tras medirse éste de forma segura y válida. El CI sigue una distribución normal en la población; la media es de 100. Se considera que existe una DI siempre que dicho CI tome valores menores o iguales a 70 en personas jóvenes (menores de 18 años). Esta definición, impecable desde el punto de vista matemático, entraña tremendas dificultades de medida en la práctica clínica. La determinación del CI puede verse influenciada por multitud de factores: el género, la edad, la escala de medida, las características socioeconómicas, las características del núcleo sociofamiliar, el idioma, el profesional que realiza el test, etc. De hecho, el CI es muy difícil de medir en niños menores de 3 o incluso de 5 años. En dicho intervalo de edad, el diagnóstico de DI tiene un fuerte componente de subjetividad (reconocido por la CIE-10) por parte del profesional que realiza dicho diagnóstico según su apreciación de algún tipo de retraso del desarrollo. Para estos casos se habla hoy en día de retraso global del desarrollo (RGD) (Shevell *et al.*, 2003).

La DI puede clasificarse, según la CIE-10, en diferentes grados en función del CI:

Introducción

- Leve (CI 50-69): presentan algunas dificultades de aprendizaje en la escuela. Muchos adultos son capaces de trabajar, mantener buenas relaciones sociales y contribuir a la sociedad.
- Moderado (CI 35-49): retraso marcado del desarrollo en la infancia, pero la mayoría aprenden a desarrollar un cierto grado de independencia en el cuidado personal, así como habilidades académicas y de comunicación. Los adultos necesitarán distintos niveles de ayuda para vivir y trabajar en la comunidad.
- Grave (CI 20-34): necesidad casi permanente de ayuda.
- Profundo (CI <20): graves limitaciones en el cuidado personal, continencia, comunicación y movilidad.

La prevalencia precisa de la DI o del RGD no se conoce exactamente, pero la OMS estima que en las poblaciones industrializadas afecta aproximadamente al 3% de la población (Roeleveld *et al.*, 1997). Como en la mayoría de los pacientes la DI se hace evidente durante los primeros años de vida (retraso psicomotor), son casi siempre los pediatras los primeros especialistas que se enfrentan al problema y quienes inicialmente pueden atribuir ese retraso a un “problema madurativo”, que en la mayoría de los casos se resuelve con el tiempo. Esto puede ser cierto en muchos casos, pero en otros, tras un período de espera razonable, es necesario orientar adecuadamente el caso, con el fin de aclarar la posible etiología del retraso.

La DI es un trastorno muy heterogéneo en cuanto a las causas que lo determinan y supone un impacto importante tanto para el individuo que lo padece como para su familia, a la vez que representa una importante carga social. Determinar su etiología es fundamental para establecer las posibilidades de recurrencia, el pronóstico y las posibilidades terapéuticas (Van Karnebeek *et al.*, 2005). A pesar del gran número de estudios que existen, muchas de las causas que originan la DI aún se desconocen, y tan sólo se identifica su etiología en alrededor de un 50% de los afectados. Entre las causas que originan la DI, al menos un 30% parece ser de origen genético (cromosómico, monogénico y multifactorial) y un 15% de origen ambiental (como la asfixia neonatal y las infecciones).

La prevalencia de la DI grave es muy inferior a la del retraso leve (0,4% frente al 2,5-3%), pero sus causas parecen estar mucho mejor definidas. En la DI leve, los condicionamientos familiares, socioculturales y biomédicos resultan mucho más frecuentes.

Tabla 1. Causas de DI según diversas revisiones de la literatura (modificada de *Curry et al.*, 1997) y su incidencia relativa.

Causas de discapacidad intelectual	Incidencia
Anomalías cromosómicas	4-28%
Anomalías estructurales del SNC	7-17%
Origen ambiental (teratógenos, infecciones,...)	5-13%
RM familiar/cultural	3-12%
Complicaciones de prematuridad	2-10%
Enfermedades monogénicas conocidas	3-9%
Síndromes reconocibles	3-7%
Enfermedades metabólicas/endocrinas	1-5%
Desconocida	30-50%

1.2 La discapacidad intelectual de origen genético.

El estudio de la DI es uno de los campos más complejos de la genética humana debido a la alta heterogeneidad clínica y genética que presenta. Las causas genéticas que determinan la DI y el RGD incluyen anomalías cromosómicas, monogénicas y síndromes de microdelección o síndromes de genes contiguos.

Introducción

Tabla 2. Causas genéticas de la DI y prevalencia relativa estimada (datos extraídos y adaptados de Ropers 2010).

Causas genéticas de DI		Prevalencia
Anomalías cromosómicas		15%
Monogénicas ligadas al cromosoma X	X-frágil	2-2,5% varones
	DILX sindrómica	5-7% varones
	DILX inespecífica	7-10% varones
Monogénicas autosómicas (dominantes y recesivas)		5-8%
Síndromes de microdelección		3-5%

DILX: discapacidad intelectual ligada al cromosoma X.

1.2.1 Causas cromosómicas que originan discapacidad intelectual.

Las anomalías cromosómicas numéricas y estructurales son uno de los factores que contribuye más significativamente al origen de la DI. Estas alteraciones, además, se asocian mayoritariamente a problemas en el crecimiento, a una gran gama de anomalías menores como son los rasgos dismórficos faciales y a otras malformaciones estructurales de diferentes sistemas: cardíaco, urogenital y extremidades; al conjunto de estas características se le denomina fenotipo cromosómico. Cuando la DI no se presenta de forma aislada, sino que se asocia a malformaciones o anomalías dando lugar a un cuadro clínico más complejo, se le denomina DI sindrómica.

Las anomalías cromosómicas se observan en una mayor proporción en los sujetos con DI grave (40%) y con un fenotipo polimalformativo. No obstante, algunas anomalías cromosómicas también pueden identificarse en pacientes con DI y con un fenotipo dismórfico leve (10%) (Guitart-Feliubadaló *et al.*, 2006).

La causa genética conocida que se asocia con mayor frecuencia a DI es una alteración cromosómica, la trisomía 21 o síndrome de Down (1 de cada 750-800 nacidos vivos). La prevalencia de la trisomía 21 en diversas series publicadas presenta cifras muy variables que pueden llegar hasta el 12% de alteraciones cromosómicas que causan DI (Ropers 2010). Hay que tener en cuenta que la incidencia de síndrome de Down ha descendido notablemente en diversos países a lo largo de estos últimos años, debido a la implantación de los programas de diagnóstico prenatal y a los cambios introducidos en la legislación de la interrupción del embarazo.

Se han encontrado alteraciones asociadas a DI en prácticamente todos los cromosomas. Estas anomalías pueden ser numéricas, por pérdida o ganancia de cromosomas enteros (monosomía o trisomía), o estructurales cuando afectan a fragmentos cromosómicos (deleción o duplicación), así como intercambios de fragmentos de un cromosoma con otro (translocaciones). Así pues, en la DI sindrómica predominan las aneuploidías, las alteraciones estructurales con pequeñas deleciones o duplicaciones terminales e intersticiales, los cromosomas marcadores extras, las traslocaciones desequilibradas y las traslocaciones recíprocas aparentemente equilibradas, sobre todo, las que son *de novo* podrían tener una relación causal (Battaglia *et al.*, 1999; Van Karnebeek *et al.*, 2002; Gribble *et al.*, 2005).

Introducción

1.2.2 Discapacidad intelectual ligada al cromosoma X.

Los defectos genéticos ligados al cromosoma X se han considerado, desde hace tiempo, importantes en la discapacidad intelectual (DILX). Esta idea se apoya en el exceso de varones afectados y en la identificación de un patrón de herencia ligada al X en un gran número de familias (Turner *et al.*, 1974; Herbst *et al.*, 1980; Croen *et al.*, 2001). Hasta la fecha se han encontrado muchos más genes relacionados con la función cognitiva en el cromosoma X que en cualquier autosoma (Chiurazzi *et al.*, 2008). Los defectos genéticos, por sí solos, podrían explicar la discapacidad en un 10-12% de varones que la padecen (Ropers 2010).

La DILX se ha dividido clásicamente en sindrómica, cuando se asocia a un patrón específico de anomalías físicas, neurológicas o metabólicas, y no sindrómica o inespecífica.

1.2.2.a Discapacidad intelectual ligada al cromosoma X sindrómica.

Hasta la fecha se han descrito en torno a 140 formas sindrómicas de DILX, y se conocen las mutaciones genéticas causales en poco más del 50% de ellas. Se han identificado aproximadamente 85 genes de DILX mediante análisis de ligamiento y clonación posicional, análisis de genes candidatos o estudios citogenéticos (Tarpey *et al.*, 2009). En la figura 1 se muestran algunos genes localizados en el cromosoma X asociados a formas sindrómicas de discapacidad intelectual.

Introducción

presentan prolapso de la válvula mitral y una ligera dilatación de la aorta ascendente.

Superado en frecuencia por el síndrome de Down, que es esporádico y dependiente de la edad materna, el SXF constituye la causa de DI hereditaria más importante en la población, con una frecuencia de 1/4.500 varones y de 1/9.000 mujeres, y una penetrancia del 30 y del 80% en mujeres y hombres respectivamente. La mutación asociada al SXF consiste en una expansión, mayor a 200 repeticiones, del trinucleótido CGG en el primer exón del gen *FMR1*. Esta mutación dinámica pasa por una fase previa de expansiones de menor tamaño que no ocasionan el síndrome, denominadas premutaciones. La ausencia de la proteína FMRP, producto del gen *FMR1*, se considera la causa del SXF. Es importante determinar el tamaño de la secuencia repetitiva CGG de cada individuo para incluirlo en la categoría alélica correspondiente: normal, premutación y mutación completa y mosaico.

1.2.2.b Discapacidad intelectual ligada al cromosoma X no sindrómica o inespecífica.

La DILX no sindrómica se presenta de forma aislada sin ninguna otra característica distintiva. Este hecho hace que, en muchos de los casos, sea más difícil alcanzar un diagnóstico etiológico en estos pacientes. Sobre la base de los estudios de clonación posicional, análisis de genes candidatos y otros genes ya descritos para formas sindrómicas, se han identificado hasta más de 40 mutaciones distintas implicadas en DILX inespecífico (figura 2). Los genes identificados codifican para proteínas con funciones muy diversas, aunque algunos de ellos pueden agruparse en diferentes categorías funcionales como la regulación del citoesqueleto de actina, el control transcripcional, la adhesión celular, la ubiquitinación, el transporte de iones sodio y la sinapsis neuronal, entre otros (Frints *et al.*, 2002; Ropers y Hamel 2005; Ropers 2010).

Algunos de los genes que causan DILX inespecífica también causan formas sindrómicas, por lo que en ocasiones la separación entre DILX sindrómica o inespecífica no resulta fácil (figura 3). Esto ocurre por ejemplo para genes como *OPHNI* (oligofrenina). Este gen fue uno de los primeros implicados en formas no sindrómicas de DILX, y

posteriormente, se describió en pacientes con ataxia, epilepsia e hipoplasia cerebelar (Bergmann *et al.*, 2003).

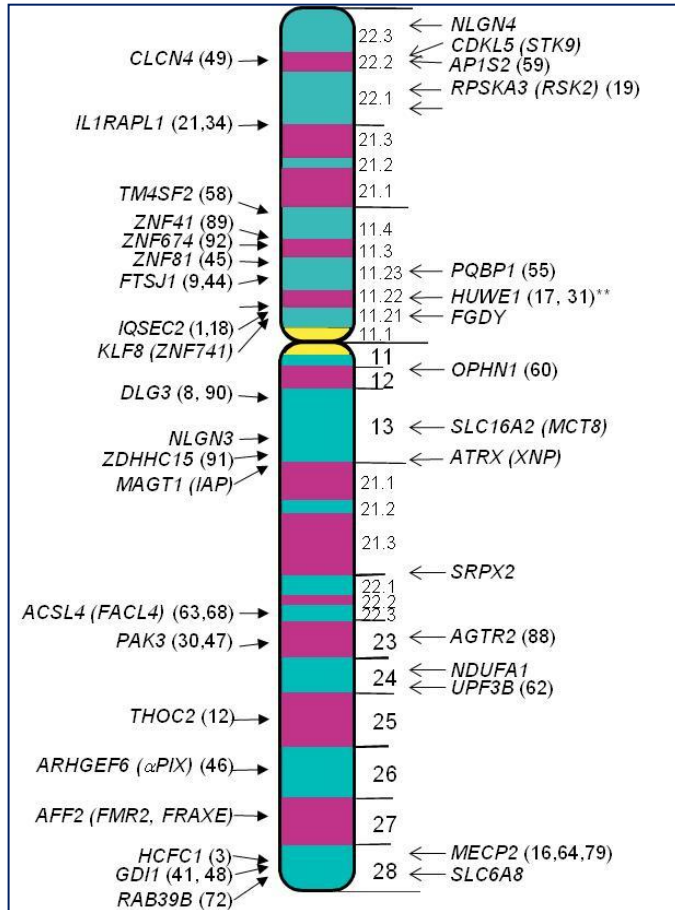


Figura 2. Genes localizados en el cromosoma X asociados a formas inespecíficas de discapacidad intelectual. Adaptada de la página web del Greenwood Genetic Center en su última revisión, marzo 2013 (www.ggc.org)

Introducción

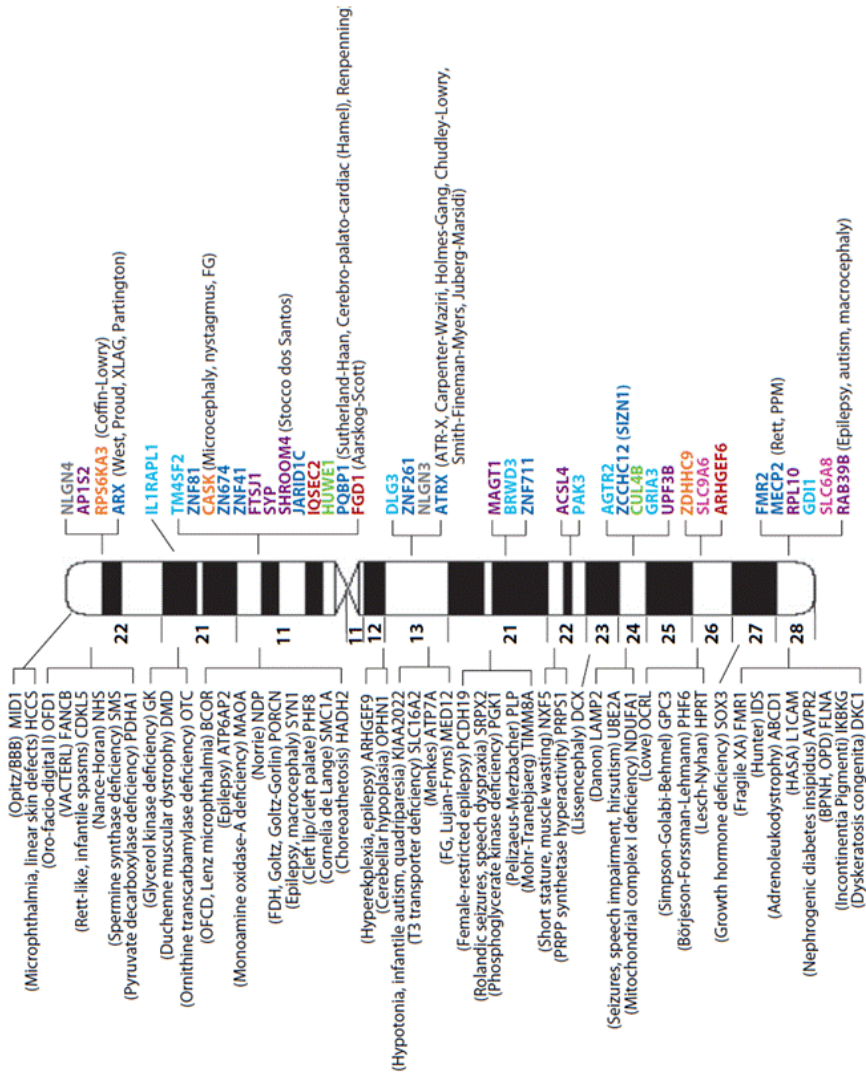


Figura 3. Genes localizados en el cromosoma X asociados a formas sindrómicas y no sindrómicas de discapacidad intelectual.

A la derecha se muestran algunos de los genes implicados en DILX inespecífica con un código de colores asociado a la función que se ha relacionado con el gen (gris, adhesión celular; azul oscuro, regulación transcripcional; rosa, actividad quinasa y modificación postraduccional; azul claro, transducción de señal; verde, ubiquitinación; rojo, regulación del citoesqueleto de actina; naranja, transporte de ión sodio; y morado para otras funciones). Adaptada de Ropers 2010.

1.2.3 Discapacidad intelectual de herencia autosómica.

1.2.3.a Enfermedades de herencia autosómica dominante con discapacidad intelectual.

Los genes *NF1*, *TSC2* y *DMPK*, implicados en la neurofibromatosis tipo 1, la esclerosis tuberosa y la distrofia miotónica de Steinert, respectivamente, son ejemplos bien conocidos de enfermedades monogénicas de transmisión autosómica dominante que, entre otras manifestaciones, presentan diferentes grados de discapacidad intelectual (Sánchez-Díaz *et al.*, 2006). Recientemente se han empezado a describir genes cuya alteración ocasiona DI como principal manifestación (*RAI1*, *ZEB2*, *CREBBP*, *HDAC4* o *EMP*). Llama la atención que muchos de estos genes, al igual que los que codifican para los de la DILX, son factores de transcripción o factores modificadores de la cromatina. En mucha menor medida se conocen genes de herencia autosómica dominante causante de DI no sindrómica (*SYNGAP1*) (Hamdan *et al.*, 2011).

1.2.3.b Enfermedades de herencia autosómica recesiva con discapacidad intelectual.

Los síndromes clásicos y característicos de enfermedades genéticas de herencia autosómica recesiva son los errores congénitos del metabolismo. Son responsables de muchos casos de DI en los que la discapacidad es el único o principal rasgo clínico (García-Cazorla *et al.*, 2009). Las metabolopatías son alteraciones bioquímicas de origen genético, ocasionadas en muchos casos, por un fallo específico en la estructura o en la función de las moléculas proteicas (enzimas) producto del gen. Entre ellas, la fenilcetonuria ha sido la más estudiada no sólo por su alta prevalencia sino por el hecho de que su detección neonatal con posterior tratamiento y seguimiento evita la DI.

Las formas de DI con herencia autosómica recesiva son trastornos extremadamente heterogéneos desde el punto de vista genético (Najmabadi *et al.*, 2007). La investigación en los últimos años de esta forma de discapacidad ha permitido la identificación de multitud de

Introducción

mutaciones en genes que participan en funciones celulares indispensables como la transcripción del ADN, la degradación de proteínas, el metabolismo energético, así como la síntesis de ácidos grasos. Estos genes se han relacionado con formas sindrómicas y no sindrómicas de discapacidad intelectual. Al igual que ocurre con las formas autosómico dominantes y con la DILX, es importante destacar que muchos de estos genes, son factores de transcripción o factores modificadores de la cromatina (Kuss et al., 2011; Najmabadi *et al.*, 2011).

1.2.3.c Enfermedades de herencia autosómica dominante modificada por la impronta genética.

Los más conocidos son los síndromes de Prader-Willi y Angelman, éste último debido a mutaciones puntuales, delección o ausencia de expresión del gen *UBE3A*. Otros ejemplos de enfermedades debidas a la impronta genética son las originadas por la disomía uniparental del cromosoma 14 tanto materna como de origen paterno (Hoffmann y Heller 2011).

1.2.4 Síndromes de microdelección.

Muchos de los síndromes tipificados clínicamente están causados por deleciones mínimas (terminales o intersticiales), en general no detectables por métodos citogenéticos, que involucran a una región cromosómica bastante uniforme en un determinado *locus* cromosómico (tabla 3). Estas deleciones causan malformaciones y DI y constituyen un grupo de síndromes con un fenotipo clínico específico. Para algunas de estas regiones cromosómicas, además de la microdelección, se ha descrito la microduplicación como causa de DI (Ropers 2010). Esto ocurre por ejemplo para la región cromosómica asociada a los síndromes de Williams-Beuren (Orellana *et al.*, 2008), Smith-Magenis, microdelección 17q21.31 y DiGeorge.

Tabla 3. Síndromes clínicos causados por microdeleciones cromosómicas más frecuentes. Adaptado del listado de síndromes presente en DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>).

Síndrome	Localización (GRCh/19, feb 2009)	Gen
Microdelección 1p36	Chr1: 10001-12840259	-
Microdelección 2q33.1	Chr2: 196925121-205206939	SATB2*
Microdelección 2q37	Chr2: 239969863-240322643	HDAC4
Wolf-Hirschhorn	Chr4: 1569197-2110236	WHSC1
Cri du Chat	Chr5: 10001-12533304	TERT
Sotos	Chr5: 175724636-177052116	NSDI
Williams-Beuren	Chr7: 72744455-74142672	ELN
Kleefstra	Chr9: 140513443-140730578	EHMT1
Potocki-Shaffer	Chr11: 43994800-46052450	EXT2* ALX4*
Angelman	Tipo I	UBE3A
Prader-Willi	Chr15: 22749354-28438266 Tipo II Chr15: 23619912-28438266	SNRPN, NDN
ATR-16	Chr16: 60001-834372	HBA1, HBA2
Rubinstein-Taybi	Chr16: 3775055-3930121	CREBBP
Miller-Dieker	Chr17: 1-2588909	LIS1
Smith-Magenis	Chr17: 16773072-20222149	RAI1
Neurofibromatosis I	Chr17: 29107097-30263321	NF1
Koolen-De Vries	Chr17: 43705166-44294406	KANSL1
Velocardiofacial / DiGeorge	Chr22: 19009792-21452445	TBX1
Phelan-Mcdermid	Chr22: 51045516-51187844	SHANK3

* Gen presumiblemente responsable del síndrome clínico.

Introducción

1.3 Defectos congénitos.

Los defectos congénitos (DC) incluyen cualquier alteración del desarrollo embrionario y fetal, sea física, psíquica, funcional o sensorial. Según los conceptos de la dismorfología (Opitz 1993; Martínez-Frías *et al.*, 1998; Martínez-Frías *et al.*, 2000) las alteraciones del desarrollo incluidas en la denominación de “defectos congénitos” hacen referencia a estos cuatro conceptos:

- Malformaciones congénitas: se refiere a las alteraciones intrínsecas del desarrollo embrionario, esencialmente morfológico. Éstas pueden presentar distintas manifestaciones, como:
 - Alteración de la forma o estructura física normal de un órgano o parte corporal (por ejemplo la tetralogía de Fallot).
 - Alteración patológica del tamaño normal, tanto por exceso como por defecto, de un órgano o parte corporal (por ejemplo la microcefalia).
 - Alteración de la posición de un órgano o parte corporal (por ejemplo la dextrocardia).
- Deformaciones: son alteraciones de la forma de distintas estructuras corporales (y por tanto físicas), que tienen un desarrollo embrionario inicial normal. Sin embargo, posteriormente durante el periodo fetal esas estructuras bien desarrolladas, se deforman. Estas deformaciones pueden ser de origen interno en el propio feto (por ejemplo, si hay una grave malformación del sistema nervioso central, el feto no se moverá, y los miembros presentarán deformaciones y rigidez articular), pero también por causas externas (por ejemplo por problemas uterinos o por pérdida de líquido amniótico).
- Disrupciones: al igual que las deformaciones, son alteraciones físicas, en las que las diferentes partes y órganos se formaron bien en el embrión, pero se destruyeron, la mayoría de las veces, durante el período fetal. Las causas son de muy diversos tipos (por ejemplo bridas amnióticas), pero la patogenia que da lugar a la “destrucción” es siempre consecuencia de una

drástica reducción del aporte sanguíneo, por lo que el órgano, o parte corporal afectada, se necrosa y puede llegar a desaparecer. Esto hace que, a veces, sea muy difícil distinguir una disrupción de una verdadera malformación. Sólo cuando el proceso se produce muy avanzado el embarazo, pueden persistir zonas de necrosis que facilitan su identificación.

- Displasias: son alteraciones del desarrollo de los tejidos. Dependiendo del tipo de tejido afectado, su identificación puede ser más o menos precoz, o sólo hacerse evidente durante el crecimiento postnatal. Por ejemplo, ciertos tipos de displasias esqueléticas en las que los niños no muestran características particulares al nacimiento que permitan su detección, pero que se hacen patentes con el crecimiento postnatal.

Desde el punto de vista genético nos interesa reconocer en los pacientes los errores de la morfogénesis o malformaciones congénitas, los cuales se producen desde el momento de la fecundación hasta el final de la octava semana de gestación. Las alteraciones del desarrollo que se producen durante la blastogénesis (28 primeros días desde la formación del cigoto) son malformaciones muy graves, frecuentemente letales, afectan a la línea media embrionaria, y suelen implicar a muchos órganos. Las malformaciones que se producen durante la organogénesis (de la 5 a la 8 semanas, ambas incluidas) suelen ser proporcionalmente menos graves que en la blastogénesis, con más frecuencia afectan a un solo órgano o sistema y tienen menor índice de letalidad.

En muchas ocasiones es difícil diferenciar las malformaciones del resto de DC (deformaciones, disrupciones y displasias) que ocurren posteriormente en el período fetal. Durante este largo período (30 semanas) se desarrolla la histogénesis, la maduración de los diferentes órganos y la adquisición de sus funciones. En términos generales, suelen ser alteraciones histológicas y funcionales.

Los DC se clasifican en función del tipo de presentación clínica (Opitz 1993, Martínez-Frías *et al.*, 1998, Martínez-Frías *et al.*, 2000) en:

Introducción

- Aislados: se refiere a pacientes que presentan un solo DC.
- Polimalformados: son pacientes que presentan varios DC afectando a sistemas u órganos distintos, que no se corresponden con ningún síndrome conocido, o algún tipo de causa identificada.
- Síndromes: son niños con diferentes DC cuya causa se conoce, o sospecha, que es debida a una alteración genética de cualquier tipo. En algunos niños, el diagnóstico es sólo clínico y se basa en la semejanza clínica entre los niños afectados. En otros casos, el diagnóstico es de certeza, por haber pruebas biológicas objetivas que lo documentan. Aunque no son exactamente síndromes, en este grupo se incluyen casos cuya causa es ambiental (DC producidos por factores ambientales que llegan al embrión o feto a través de la madre, y alteran su desarrollo), como por ejemplo, el síndrome alcohólico fetal.
- Secundarios: Se refiere a aquellos DC que, en realidad, no son alteraciones primarias (o intrínsecas) del desarrollo de la estructura de que se trate, sino que se producen como consecuencia de la presencia de otro defecto, que sería la auténtica alteración primaria del desarrollo (por ejemplo, una ausencia de partes de las extremidades como consecuencia de una alteración vascular que impidió un flujo sanguíneo adecuado, dando lugar a la amputación de la parte distal).

Dentro de los DC cabe destacar por su importancia las dismorfias. Se trata de trastornos del crecimiento que ocurren entre la semana 9 y 38 de gestación. Es crucial documentar y describir con detalle estos rasgos. Existen varias fuentes de listados de rasgos dismórficos (RD), siendo las más comunes las bases de datos de *London Medical Databases* y el *Diagnostic Dysmorphology*. Las dismorfias incluyen la constitución corporal y la talla, así como los rasgos craneofaciales. Las dismorfias pueden clasificarse en:

- Cuantitativas, requieren medidas y tablas con percentiles, por ejemplo, el hipertelorismo.
- Cualitativas, son más subjetivas e incluyen por ejemplo la forma de la boca o la retromicrognatia.

La frecuencia global de recién nacidos con defectos congénitos en España es del 1,5% (Bermejo *et al.*, 2010). Esta frecuencia global no se ha mantenido constante a lo largo del tiempo, sino que ha experimentado un descenso progresivo. En el período de 1980-1985 el porcentaje de recién nacidos con DC se situaba en el 2,22%, en un período posterior (1986-2008) la frecuencia registrada fue del 1,4%, y en 2009 se sitúa en su valor mínimo del 0,98%. Se considera que este descenso de la frecuencia es debido, fundamentalmente, al impacto de las interrupciones voluntarias del embarazo tras la detección de alteraciones en el feto, condicionado por la aprobación en España, en 1985, de la Ley Orgánica 9/1985, por la que dejó de ser punible la interrupción del embarazo en determinados supuestos, siendo uno de ellos la existencia de DC en el feto.

Los DC más frecuentes son las cardiopatías congénitas y anomalías de grandes vasos (14,69%) seguidas del hipospadias (10,51%). Otras anomalías también comunes incluyen angiomas y nevus cutáneos, anomalías de miembros superiores e inferiores, labio leporino/fisura palatina, apéndice preauricular y micrognatia o retrognatia. En la tabla 4 se muestran las malformaciones congénitas más comunes asociadas a las alteraciones genéticas.

El desarrollo embrionario y fetal puede ser alterado por diversos factores. Un 20% de las anomalías congénitas son causadas por alteraciones genéticas (cromosómicas y génicas), menos del 5% por factores ambientales (radiaciones, sustancias químicas y tóxicas, infecciones, medicamentos,...), un 20-25% son de origen multifactorial y el 40-60% restante, son malformaciones congénitas que no se pueden encuadrar en alguno de los apartados anteriores, por lo que se consideran idiopáticas.

Las malformaciones múltiples y síndromes ocurren con mayor frecuencia en pacientes con DI que en individuos de la población general (Kirby *et al.*, 1995; Decouflé *et al.*, 2001).

Introducción

Los pacientes con anomalías genéticas suelen presentar con frecuencia una asociación clínica característica que agrupa cuatro parámetros:

- retraso de crecimiento intrauterino y postnatal
- rasgos dismórficos, especialmente de la cara (tamaño anormal, forma y posición de las orejas, aumento o disminución de la distancia interocular, forma y tamaño de nariz y mandíbula aberrantes, configuración anómala del paladar)
- malformaciones (generalmente múltiples), que si afectan a la función de órganos internos como cerebro, corazón y riñones pueden modificar el pronóstico y la supervivencia.
- DI o retraso del desarrollo.

Tabla 4. Malformaciones congénitas más frecuentes descritas en pacientes con alteraciones genéticas. Extraído de diversas publicaciones de los Boletines del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas.

Malformaciones comunes asociadas a alteraciones genéticas:

Cardiacas y anomalías de los grandes vasos
Renales y del tracto genitourinario; hipospadias
Fisura palatina, labio leporino o ambos
Atresia esofágica, fístula traqueoesofágica; atresia anal con fístula
Malrotación del intestino; onfalocele
Cerebrales, sobre todo holoprosencefalia y agenesia del cuerpo calloso
Ausencia o hipoplasia de radio y pulgar
Hexodactilia postaxial
Microftalmia, coloboma ocular
Espina bífida (occipital o lumbar)

Además, las familias de estos pacientes en ocasiones presentan agregación de antecedentes de abortos de repetición, infertilidad y neonatos, generalmente prematuros, con múltiples malformaciones que suelen fallecer al poco tiempo tras el nacimiento (Schinzel 2001).

1.4 Estudio citogenético clásico de la discapacidad intelectual.

El estudio de la DI es uno de los campos más complejos en genética humana, debido a que presenta una heterogeneidad genética muy elevada.

A partir del desarrollo de las técnicas citogenéticas y particularmente tras la introducción de las técnicas de bandeado quedó bien establecido que el cariotipo se debía realizar de forma sistemática en todo paciente con DI sin otra causa obvia. Además, con la recomendación de obtener un nivel mínimo de resolución de 550 bandas. Los análisis rutinarios han de identificar las alteraciones numéricas y el mayor número de alteraciones estructurales con una resolución suficiente para detectar alteraciones de un tamaño mínimo de 5-10 Mb (Curry *et al.*, 1997).

Posteriormente, tras la descripción de diversos síndromes de microdelección, no identificables mediante la citogenética convencional, en los casos en los que el fenotipo clínico era sugestivo de un trastorno particular, se aplicaban técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con diferentes sondas (específicas de *locus*). Esta técnica de FISH permite la detección de alteraciones mínimas a partir de 100-150 Kb; sin embargo, es necesario conocer de antemano las regiones de los cromosomas implicados en el reordenamiento. De la misma forma, en los casos en los que se sospechaba un síndrome monogénico causado por mutaciones en un gen conocido se procedía al estudio mutacional del gen correspondiente.

Más recientemente se han aplicado técnicas de hibridación genómica comparada (CGH) sobre extensiones de células en metafase. La CGH es una técnica surgida en los años noventa, para el análisis citogenético de los tumores sólidos, que permite la detección de desequilibrios cromosómicos en un solo experimento. Aunque

Introducción

constituyó un gran avance sobre las técnicas de citogenética y moleculares utilizadas hasta el momento para el diagnóstico, su principal limitación es la resolución. La CGH sobre metafases no detecta alteraciones cromosómicas menores de 3-4 Mb, ni reordenamientos equilibrados (Kallioniemi *et al.*, 1992).

1.5 Estudios de citogenética molecular para la detección de desequilibrios genómicos. Impacto de las nuevas tecnologías.

En la última década, la aplicación de las técnicas moleculares al estudio de los cromosomas ha permitido realizar un espectacular avance en el campo de la citogenética clínica. Al superarse las limitaciones del cariotipo convencional, se ha podido llegar al diagnóstico de reordenamientos crípticos, que están por debajo del límite de resolución del microscopio óptico. Técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente con multisondas subtelo méricas, la hibridación genómica comparada de alta resolución (HR-CGH) y otras más recientes como la técnica de amplificación múltiple e hibridación (MAPH), la técnica de ligación múltiple dependiente de amplificación (MLPA) y la hibridación genómica comparada basada en *arrays* (*array*-CGH) permiten evaluar pequeñas pérdidas y ganancias de material genético con una elevada resolución (Bocian *et al.*, 2004; Orellana *et al.*, 2007; Koolen *et al.*, 2004; Monfort *et al.*, 2006b; Jaillard *et al.*, 2010). Actualmente hay estudios que ponen de manifiesto la gran relevancia que tienen los reordenamientos cromosómicos subtelo méricos e intersticiales submicroscópicos en la etiología de la DI (Ravnan *et al.*, 2006; Rodríguez-Revenga *et al.*, 2013).

La aplicación de estas técnicas moleculares al estudio de pacientes con DI ha supuesto un importante avance en el conocimiento de las causas que lo pueden originar. Se han descrito nuevos síndromes de microdelección y microduplicación, en sujetos con un fenotipo característico (Stewart y Kleefstra 2007; Koolen *et al.*, 2008; Molin *et al.*, 2012). Los pacientes con deleciones tienden a presentar un retraso del desarrollo que varía desde leve hasta grave y un fenotipo conductual característico además de múltiples anomalías físicas. Las

duplicaciones se conocen menos, pero quizás el espectro clínico es más variable y más benigno en general (Portnoi 2009).

Desde 1995, se reconoce que una de las causas más prevalentes de la DI idiopática son las alteraciones crípticas en las regiones subteloméricas que producen ganancias o pérdidas y provocan un desequilibrio de dosis génica (Flint *et al.*, 1995). Ello ha propiciado el desarrollo de distintas técnicas (FISH, MLPA, *array*-CGH) para abordar el estudio de los reordenamientos subteloméricos. Actualmente hay varios estudios en series amplias de DI idiopática con malformaciones que coinciden en que la frecuencia de alteraciones es del 5-7% de los casos (Van Karnebeek *et al.*, 2002; De Vries *et al.*, 2003; Koolen *et al.*, 2004; Rooms *et al.*, 2005). Este rango de frecuencia puede variar en función del tamaño de la serie estudiada y de los criterios de selección utilizados para la inclusión de los pacientes en estos estudios (rasgos dismórficos, tipo y severidad de anomalías congénitas). De esta forma, se podría plantear que la preselección clínica aumenta el porcentaje de alteraciones detectadas.

Se ha descrito que las características clínicas más habituales observadas en los reordenamientos subteloméricos corresponden con antecedentes familiares, retraso de crecimiento prenatal, alteraciones en el crecimiento postnatal, dos o más rasgos dismórficos faciales y uno o más defectos congénitos no faciales; la microcefalia es la anomalía más frecuente. En los estudios de la DI idiopática que analizan las alteraciones subteloméricas y seleccionan a los pacientes teniendo en cuenta estos indicadores con una puntuación de tres o más, la frecuencia de reordenamientos aumenta hasta el doble (De Vries *et al.*, 2001). En los primeros trabajos se observó que el mayor porcentaje de alteraciones subteloméricas se encontraba en pacientes con RM grave (Knight *et al.*, 1999; Riegel *et al.*, 2001); no obstante, en estudios más recientes se ha podido comprobar que una gran proporción de alteraciones a menudo se asocia a DI leve (Bocian *et al.*, 2004; Rodríguez-Revenga *et al.*, 2004).

Un gran porcentaje de las anomalías subteloméricas, alrededor del 50%, son alteraciones heredadas. Entre ellas, la mayoría corresponden a cromosomas derivados de una traslocación equilibrada parental. La caracterización de la causa de la DI en estos casos, es de vital importancia para ofrecer un asesoramiento genético y un diagnóstico

Introducción

prenatal a la familia, dado el elevado riesgo de recurrencia que presentan. En los casos familiares con una deleción/duplicación heredada de uno de los progenitores, éste en general presenta unas características clínicas más leves comparadas con las que presenta el hijo e incluso hay casos sin una clínica evidente (Weis et al., 2008; Ullmann et al., 2007; Ciuladaitè *et al.*, 2011). Muchas de estas anomalías podrían corresponder a polimorfismos benignos sin ninguna relación causal (figura 4), mientras que en otros casos se trataría de alteraciones con expresión variable, modificada por el entorno genético o por el efecto de la impronta genómica (Girirajan *et al.*, 2012).

Los estudios que analizan el genoma global con técnicas de alta resolución (*array*-CGH) en pacientes con DI idiopática, detectan que el porcentaje de alteraciones es del 7-20%, y son las intersticiales más frecuentes que las subtelerómicas (Vissers *et al.*, 2003; Shaw-Smith *et al.*, 2004; Schoumans *et al.*, 2005).

En algunos casos, las características clínicas asociadas a la deleción o duplicación de una determinada región han permitido definir clínicamente los síndromes asociados (Stewart y Kleefstra 2007; Koolen *et al.*, 2008). Sin embargo, en la mayoría de los casos se observa una gran heterogeneidad clínica que varía desde individuos sanos hasta la presencia de un fenotipo muy acusado (Weiss *et al.*, 2006; Girirajan *et al.*, 2012). Esta variabilidad clínica se acentúa todavía más en regiones cromosómicas como 16p (Weis *et al.*, 2008; Ullmann *et al.*, 2007). Este amplio abanico hace que la interpretación clínica de estas alteraciones genómicas (deleciones y duplicaciones) conocidas como variantes de número de copias (CNVs), sea en muchas ocasiones compleja. En la identificación e interpretación de las CNVs es importante tener en cuenta varios aspectos, como su tamaño, características y funciones de los genes, la herencia o aparición *de novo* en el paciente y la presencia de las mismas en población control (Miller *et al.*, 2010; Kearney *et al.*, 2011b). Por ello, es de gran importancia profundizar en el conocimiento de estos reordenamientos genómicos tanto desde un punto de vista molecular como clínico.

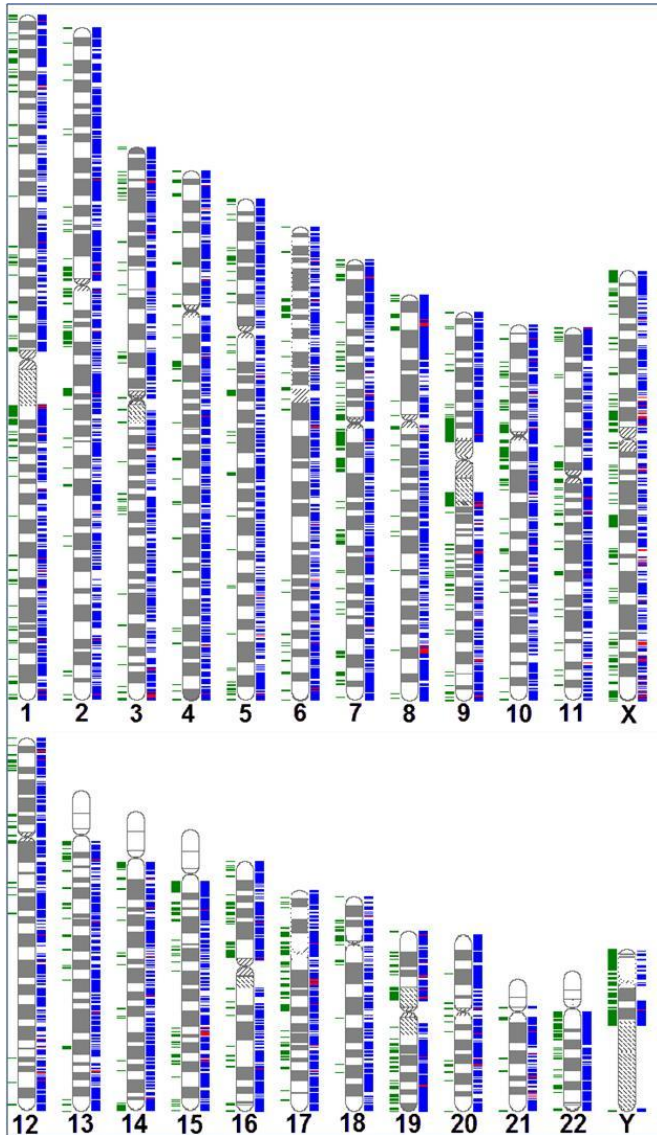


Figura 4. Distribución de las principales variantes estructurales benignas.

Estas variantes que hacen referencia a 238 inversiones estructurales (en color rojo) y 109863 CNVs (en color azul), recogidas a partir de 55 estudios diferentes. Datos de la última versión (junio 2012) del catálogo de la base de datos *Database of Genomic Variants* (<http://dgv.tcag.ca/>). Las barras de color verde representan las duplicaciones segmentarias.

Introducción

Los estudios clínicos y genéticos son imprescindibles para llegar al conocimiento de las vías involucradas en la DI. Las nuevas tecnologías desarrolladas en el campo de la biología molecular, constituyen una herramienta muy importante para el estudio de los pacientes con DI idiopática. El estudio de estas anomalías contribuye a determinar las causas genéticas de estos trastornos y permite establecer correlaciones genotipo-fenotipo, así como definir las principales características clínicas y conductuales de estos síndromes de microduplicación y de microdelección. Pero hay que considerar el coste y la disponibilidad de las mismas en los centros diagnósticos; por ello, es crucial realizar una preselección clínica de los pacientes con DI idiopática con “fenotipo cromosómico” o con historia familiar positiva. Además, dada la fuerza con que está irrumpiendo la secuenciación masiva en el mundo de la genética de los trastornos del neurodesarrollo, en un futuro cercano, será necesario establecer protocolos y algoritmos que nos permitan, ante un paciente dado priorizar el estudio genético que pueda proporcionar mayor rendimiento diagnóstico.

El presente trabajo no sólo es un reto personal, sino también una obligación de los profesionales que trabajamos en este campo para poder dar un diagnóstico específico, lo que posibilita un asesoramiento genético preciso que permita a la familia tomar decisiones reproductivas informadas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis

La discapacidad intelectual, y en general los trastornos del neurodesarrollo, son patologías muchas veces multidisciplinarias, que demandan gran cantidad de estudios genéticos que puedan explicar su causa, aunque hoy en día sólo se encuentra un diagnóstico etiológico en aproximadamente la mitad de los casos.

En los últimos años, la utilización de herramientas de análisis genético como los *arrays* de CGH en el diagnóstico, ha supuesto una revolución para los profesionales sanitarios y las familias, dado que ha permitido conocer la causa del trastorno en muchos casos, considerados hasta ahora de etiología desconocida. El diagnóstico correcto permite un manejo clínico adecuado del paciente y al mismo tiempo facilita un asesoramiento genético preciso para las familias.

Desde 2007 se han publicado grandes series de pacientes estudiados mediante *arrays*, quedando claramente establecido que se trata de una técnica con alto potencial diagnóstico. Considerando el elevado rendimiento diagnóstico de los *arrays*, y ante la falta hoy en día de técnicas alternativas, existe la tendencia del clínico a solicitar estudios de *arrays* ante cualquier paciente con un trastorno del neurodesarrollo.

No obstante, para la incorporación de una técnica diagnóstica de rutina en la práctica clínica, y teniendo en cuenta además, la fuerza que están adquiriendo los sistemas de secuenciación masiva, será necesario disponer de unos criterios clínicos que orienten los estudios genéticos para su aplicación en la práctica médica.

Como hipótesis de trabajo nos planteamos que a pesar de la elevada heterogeneidad clínica y genética que se encuentra en los trastornos del neurodesarrollo, los reordenamientos genómicos se asocian preferentemente a determinadas características clínicas que conforman un “fenotipo cromosómico”. Esto es, la pérdida o ganancia de dosis de bloques de genes y elementos reguladores del genoma (microRNAs, potenciadores, inhibidores, etc.) presentan, en conjunto, algunas características clínicas diferenciales en relación con las asociadas a las mutaciones puntuales en genes individuales. Debido a la naturaleza sumamente heterogénea de los trastornos del neurodesarrollo de origen genético, dichas características diferenciales solo se evidencian a nivel estadístico, pero pueden resultar útiles como marcadores predictivos de reordenamientos genómicos.

Hipótesis

Por otra parte, el estudio de las características clínicas comunes y los genes con desequilibrio de dosis puede ayudar a establecer relaciones funcionales entre genes que participan en procesos comunes.

OBJETIVOS

Objetivos

1. Definir las **características clínicas** asociadas más frecuentemente a síndromes de microdelección y microduplicación. Establecer criterios de selección de los pacientes en función de diferentes parámetros clínicos: somatometría, perímetro cefálico, grado de retraso, epilepsia, perfil conductual (rasgos autistas, hiperactividad, agresividad), anomalías en diferentes órganos y sistemas, rasgos dismórficos y antecedentes familiares (anomalías congénitas, discapacidad intelectual, abortos).

2. Estudio de posibles **factores de predisposición** como el origen parental, la edad paterna o materna o la presencia de duplicaciones segmentarias en:

2a) los casos con alteraciones *de novo*,

2b) los diferentes tipos de alteraciones:
microdeleciones, microduplicaciones y/o translocaciones,

2c) las distintas localizaciones de las alteraciones:
subteloméricas y/o intersticiales.

3. Estudio del **valor predictivo de los reordenamientos genómicos sobre el fenotipo**:

3a) correlación con el tamaño de la delección/duplicación,

3b) correlación con el número de genes afectados,

3c) correlación con elementos ultraconservados,

3d) revisión y búsqueda bibliográfica de las funciones de los genes contenidos en las CNVs patológicas y su posible relación con las manifestaciones clínicas de los pacientes.

3e) búsqueda de rutas funcionales comunes en grupos de pacientes que comparten rasgos fenotípicos mediante un análisis de enriquecimiento funcional de genes incluidos en reordenamientos cromosómicos.

Objetivos

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

1.1 Sujetos de estudio.

1.1.1 Origen y selección de los pacientes.

Los pacientes estudiados en el presente trabajo han sido remitidos a la Unidad de Genética del Hospital Universitari i Politècnic “La Fe”, por diferentes profesionales de los Servicios de Pediatría de distintos hospitales de la Comunidad Valenciana. También han sido incluidos pacientes remitidos a nuestra Unidad para realizar cualquier tipo de estudio genético, en la mayoría de los casos por presentar algún trastorno del desarrollo.

La totalidad de las propuestas remitidas a la Unidad tuvieron como objetivo disponer del suficiente número de pacientes para llevar a cabo los proyectos “**Aplicación de la CGH-array para la detección de reordenamientos genómicos responsables de retraso mental de causa desconocida**” (PI040421) y “**Rastreo genómico de alta resolución en genes candidatos de trastornos del neurodesarrollo**” (PI080648).

Los criterios clínicos de inclusión de los pacientes fueron:

- a. Retraso del desarrollo/DI o trastornos del neurodesarrollo de etiología no aclarada.**
- b. Defectos congénitos.**
- c. Rasgos dismórficos.**
- d. Antecedentes familiares de DI, anomalías congénitas o abortos de repetición.**

Un criterio adicional necesario para incluir al paciente fue la disponibilidad y conformidad de ambos progenitores biológicos.

Se consideraron criterios de exclusión:

- La presencia de una alteración citogenética patológica.
- El diagnóstico clínico de certeza de un síndrome específico.

Material y métodos

Se estableció un circuito bien definido cuyo objetivo fue la inclusión de los pacientes en el estudio:

1. Elaboración de una hoja de recogida de datos clínicos necesaria para la posterior valoración del caso (anexo I). Este documento se envió a diferentes Servicios Clínicos de los hospitales públicos de la Comunidad Valenciana.
2. Remisión de dicho documento cumplimentado a la Unidad de Genética, donde tras valorar la propuesta en función de las características clínicas del paciente y los criterios de inclusión establecidos, se decidía aceptar o no al paciente para el estudio. En la mayoría de los pacientes se había descartado el síndrome del cromosoma X frágil y el estudio del cariotipo, con un nivel de resolución de 500 bandas G, había resultado normal.
3. Los pacientes candidatos para el estudio se citaron junto con sus padres en la Unidad de Genética donde tras explicarles los objetivos del proyecto y completar la historia clínica y el árbol genealógico, en caso de estar de acuerdo en participar en el estudio, firmaron el documento de consentimiento informado (anexo II) y se les extrajo una muestra de sangre periférica (tanto al paciente como a sus padres).

Todos los pacientes, por tanto, tuvieron una primera consulta con el profesional que lo remitía para el estudio, otra en la Unidad de Genética para completar la historia, extracción de sangre y firma del consentimiento, y consultas sucesivas para estudios complementarios, entrega de resultados y asesoramiento genético.

La serie estudiada está formada por 246 pacientes seleccionados en nuestra Unidad desde octubre de 2001 hasta diciembre de 2010 (figura 5) remitidos por 32 profesionales diferentes (figura 6).

Los pacientes estudiados procedían de 13 hospitales de la Comunidad Valenciana, siendo el grupo más numeroso de pacientes el que corresponde a nuestro propio hospital tal como se detalla en la tabla 5.

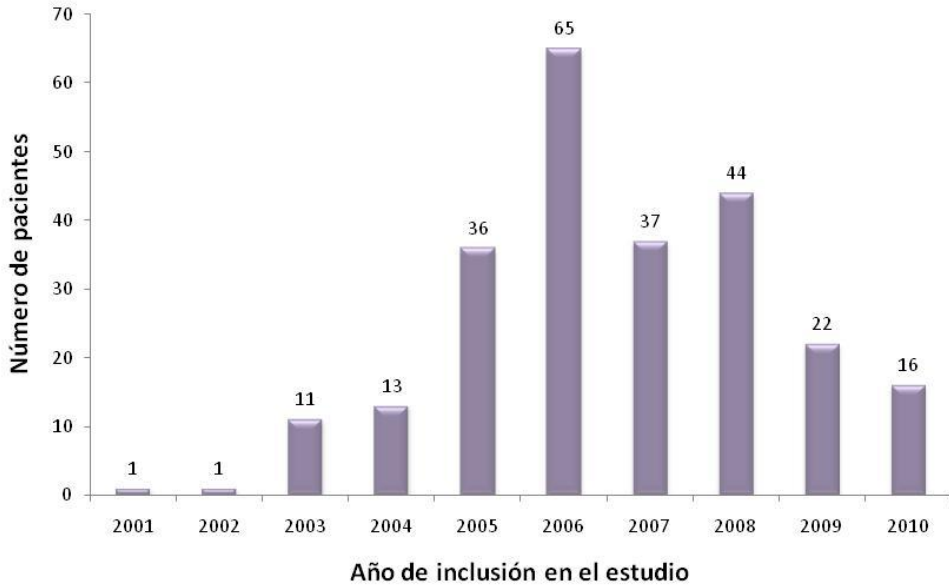


Figura 5. Pacientes incluidos en el presente estudio a lo largo de los 9 años.

Como se observa en el gráfico, la mayoría de pacientes se incluyeron entre los años 2005 al 2010.

Material y métodos

Tabla 5. Centros hospitalarios públicos valencianos por provincias que remitieron propuestas para incluir a pacientes en el estudio genético de investigación sobre trastornos del neurodesarrollo. Excepto para el Hospital Universitari i Politècnic “La Fe”, en el que se especifican los 5 servicios a los que pertenecen los profesionales, el resto son mayoritariamente neuropediatras.

Provincia	Centros hospitalarios	Servicio/Profesionales	Número de pacientes
Valencia	Hospital Universitari i Politècnic “La Fe”	Genética: Dra. Orellana, Dr. Martínez Castellano, Dra. Roselló	62
		Neonatología: Dr. Pérez-Aytes	19
		Endocrinología: Dra. Moreno, Dra. Carles	5
		Neumología: Dr. Cortell	1
		Neuropediatría: Dra. Smeyers, Dr. García Tena, Dr. Tomás, Dr. Barbero, Dr. Mulas	11
	Consorsí Hospital General Universitari València	Dra. Aleu	36
	Hospital Clínic Universitari	Dra. Andres, Dra. Castelló	38
	Hospital Doctor Peset	Dra. Sanchis, Dr. Cánovas, Dr. Bretón	18
	Hospital Francesc de Borja de Gandia	Dr. Tomás	3
	Hospital Universitari de la Ribera	Dra. Pitarch, Dr. González de la Rosa	2
Hospital de Requena	Dr. Martínez Carrascal	1	
Hospital General d’Ontinyent	Dr. Climent	11	

Alicante	Hospital General Universitari d'Alacant	Dra. Jdraque, Dra. Escudero, Dra. Sempere, Dra. Feret	23
	Hospital General de Elda	Dra. Teva, Dr. Aleixandre, Dr. Jover	6
	Hospital de Torrevieja	Dr. Ibáñez, Dra. Escudero	4
	Hospital Universitari San Joan d'Alacant	Dr. Carratalá	2
Castellón	Hospital la Plana	Dr. Pantoja	4

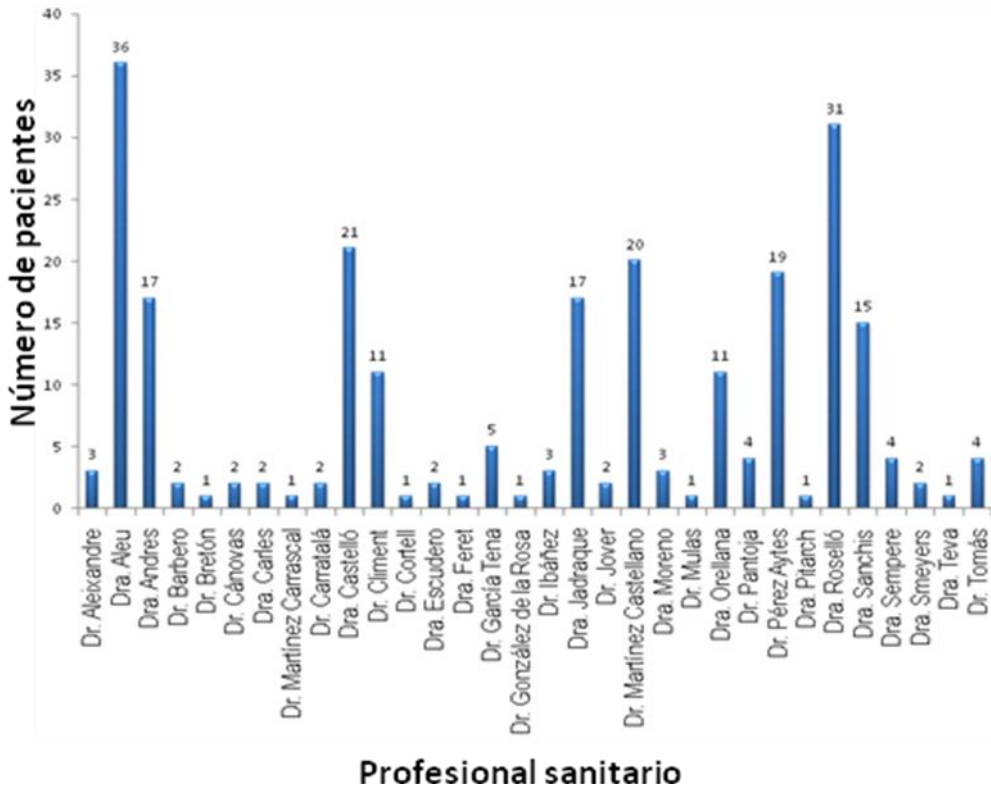


Figura 6. Listado con los 32 profesionales sanitarios (por orden alfabético) y número de pacientes remitido por cada uno de ellos.

Material y métodos

1.1.2 Aspectos ético-legales.

El presente trabajo cuenta con la aprobación del comité ético del hospital, cumpliendo por tanto con el tratado acordado en 1964 en Helsinki por la Organización Médica Mundial sobre los principios éticos de la investigación en humanos con fines médicos y posteriores revisiones del mismo (2004), así como el Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y la medicina (Consejo de Europa, Oviedo 1997).

Se solicitó a todos los pacientes o a sus padres/representantes legales consentimiento informado escrito para la toma de muestra de sangre y, en algunos casos, de fotografías tal y como requieren la Ley Básica reguladora de la Autonomía de Paciente y de Derechos y Obligaciones en materia de información y documentación clínica (Ley 41/2002, de 14 de noviembre) y la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, de 3 de julio).

Se informó a los padres de la posibilidad de no detectar alteraciones, de encontrar alteraciones causales o de detectar alteraciones del número de copias de significado incierto.

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción periférica. En la mayoría de los casos se realizaron estudios genéticos a los padres para averiguar la herencia y el origen de la alteración detectada. Así mismo, en aquellos casos necesarios, se realizaron estos mismos estudios a otros miembros de la familia.

Toda la información clínica y de laboratorio se mantiene con la confidencialidad habitual que requieren los datos de los registros sanitarios para investigación.

Los padres o representantes legales de los pacientes tienen la opción de solicitar en cualquier momento que sus datos clínicos y genéticos, fotografías o material biológico sean retirados de la base de datos creada a partir de este proyecto de investigación.

1.1.3 Características demográficas de los pacientes.

1.1.3.a Edad y género de los pacientes.

La serie estudiada está formada por 246 pacientes, 136 varones y 110 mujeres. En general se estudiaron pacientes en edad pediátrica (figura 7). La edad media es de 82,3 meses (6,8 años) y la mediana 62 meses (5,1 años) con un rango que abarca desde los 11 días de vida hasta los 20 años. Según el género podemos diferenciar entre:

- Varones: la media de edad al momento de incluir al paciente en el proyecto fue de 81,2 meses (6,8 años) y la mediana 63,5 meses (5,3 años) con un rango desde los 111 días a los 19 años.
- Mujeres: la media se sitúa en 83,6 meses (7 años) y la mediana 62 meses (5,2 años) teniendo la más pequeña 11 días de vida y la de mayor edad 20 años.

Material y métodos

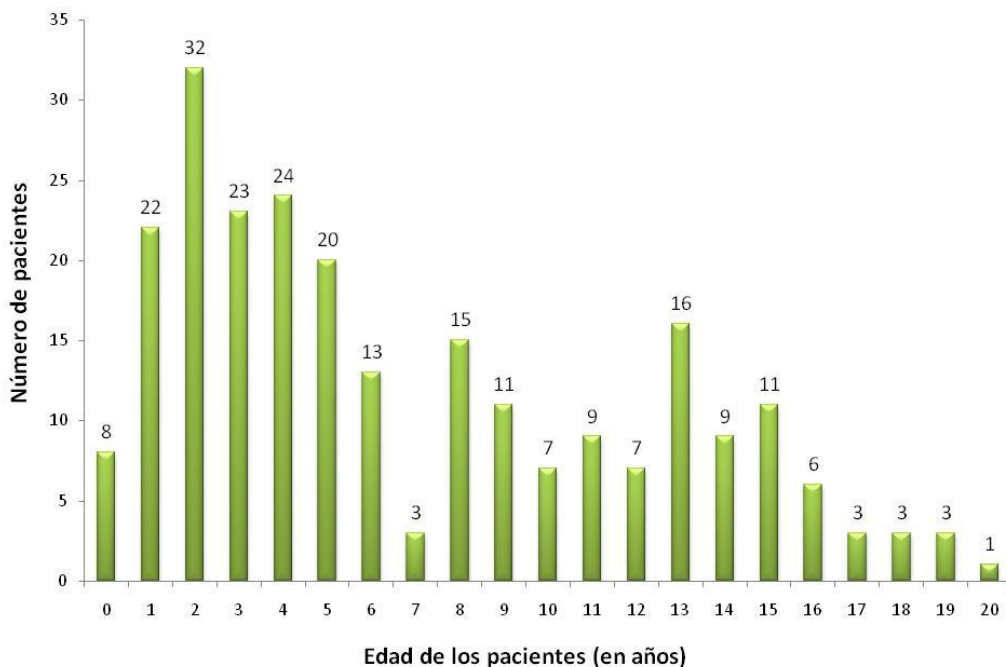


Figura 7. Distribución de los pacientes según la edad al momento de inclusión en el proyecto.

Cada barra del histograma representa el número de pacientes con la misma edad (en años).

3.1.3.b Edad de los progenitores.

Se realizó el cálculo de las edades de los progenitores en el momento de la maternidad y la paternidad a partir de la fecha de nacimiento de los mismos y del paciente, excepto para 44 madres y 49 padres de los que no disponíamos de dicho dato. La edad a la maternidad en nuestra serie empezaba a los 14,8 años hasta los 45,4 años. La edad a la paternidad abarcaba desde los 21,4 hasta los 52,2 años.

1.1.4 Estudios genéticos.

A lo largo de estos años, la metodología utilizada para la detección de reordenamientos genómicos ha cambiado en función de la descripción, aplicación e incorporación de las nuevas técnicas de genética molecular para el diagnóstico (figura 8).

1.1.4.a Extracción de ADN de sangre periférica.

Se realizó extracción de ADN genómico a partir de una muestra de sangre periférica recogida con anticoagulante EDTA (1mM) tanto al paciente como a sus progenitores. Se realizó lavado de la sangre, lisis celular, fenolización y precipitación del ADN según el protocolo de extracción fenólica descrito por Miller en 1988.

1.1.4.b Obtención de células en metafase.

Se realizó cultivo de linfocitos a partir de una muestra de sangre periférica obtenida en un tubo de extracción con 0.1% de heparina sódica. Tras la siembra, sacrificio, choque hipotónico y fijación, se realizaron las extensiones sobre portaobjetos que se conservaron a -20°C hasta su utilización.

1.1.4.c Hibridación in situ fluorescente.

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) fue la primera que se aplicó para la detección de reordenamientos genómicos subteloméricos en los primeros 30 pacientes. Se utilizaron las sondas para las regiones subteloméricas TotalVysion TM Multi-Color (VYSIS, Downers Grove, IL) siguiendo las recomendaciones del fabricante con pequeñas modificaciones (Monfort *et al.*, 2006a). Posteriormente, a partir de la aplicación del resto de tecnologías (MLPA y *arrays*), la técnica de FISH se utilizó para la confirmación de algunos resultados, así como para el estudio de alteraciones

Material y métodos

estructurales equilibradas, principalmente translocaciones, en los progenitores de pacientes en los que se detectaron reordenamientos subteloméricos. Se utilizaron sondas subteloméricas, de pintado cromosómico, de secuencia única y sondas no comerciales que se obtuvieron a partir de clones de BACs.

1.1.4.d Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación.

Mediante la técnica de amplificación de sondas dependiente de ligación (MLPA) se estudiaron 168 muestras de ADN extraído a partir de sangre periférica con kits de diversas sondas (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands, <http://www.mrc-holland.com>), fundamentalmente para regiones subteloméricas (SALSA P036, SALSA P019 y SALSA P020, SALSA P070) y de síndromes de microdeleción (SALSA P245, SALSA P064 y SALSA P096). Mediante esta técnica se realizó un rastreo de reordenamientos subteloméricos y de síndromes de microdeleción en un total de 168 pacientes (26 ya estudiados por FISH con resultado normal y 142 pacientes nuevos). Se utilizó el protocolo descrito por Schouten y colaboradores en 2006 con modificaciones en el análisis de los datos (Monfort et al., 2006b). También se utilizó la técnica de MLPA para confirmar resultados obtenidos con array-CGH y para el estudio de los progenitores. En algún caso fue necesario utilizar otro tipo de sondas no comerciales, así como sondas a la carta para MLPA diseñadas siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante.

1.1.4.e Array-CGH.

Sólo se aplicó esta metodología en aquellos pacientes cuyo resultado tras el estudio mediante FISH o MLPA fue normal, o en los que aún manifestando un aumento o disminución de dosis de alguna sonda con la técnica de MLPA se consideró

interesante conocer el tamaño de la alteración y los genes contenidos en la misma.

Se han empleado dos tipos de *arrays*:

1.1.4 e.I Array BACs.

El primero que se utilizó estaba formado por 6.465 clones obtenidos tanto de cromosomas artificiales de bacterias (BACs) como de cromosomas artificiales basados en P1 (PACs) distribuidos uniformemente por todo el genoma humano salvo las regiones subteloméricas que se encontraban más cubiertas, con una resolución media de de 1 Mb. Este *array* se aplicó a 50 muestras de ADN (Monfort *et al.*, 2008).

1.1.4.e.II Array OLIGOS.

El segundo que se utilizó consta de poco más de 43.000 secuencias codificantes y no codificantes distribuidos uniformemente por todo el genoma humano, con una resolución de 43 Kb (Agilent Human Genome CGH Microarray 44K). El cristal 4x44K utiliza la tecnología 60-mer SurePrint de Agilent. La hibridación y el escaneado de las muestras se realizó en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (Dr. David Blesa), mientras que el resto del proceso tuvo lugar en la propia Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal. Con este *array* se estudiaron 211 muestras de ADN. Algunos de los casos ya estaban estudiados mediante FISH, MLPA y/o *array* de BACs y no se había detectado ningún cambio de dosis, y en otros, ya se había detectado alguna variante, pero se consideró interesante su caracterización mediante este tipo de *array*.

En casos concretos, para la confirmación y la caracterización de alteraciones genómicas específicas, se utilizó un *array* de oligonucleótidos de diseño propio centrado en regiones de interés y de muy alta resolución. Este *array* a la carta se diseñó

Material y métodos

siguiendo las instrucciones indicadas en la página web de Agilent (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>).

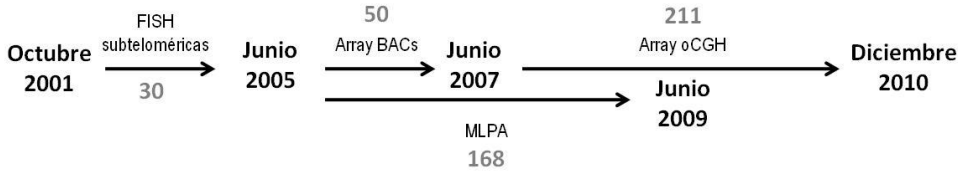


Figura 8. Metodología utilizada para la detección de reordenamientos genómicos a lo largo de estos años y número de pacientes estudiados con cada una de estas técnicas.

Array oCGH: *array* de oligonucleótidos.

1.1.4.f Otros estudios genéticos.

1.1.4.f.I Análisis de segregación de marcadores polimórficos.

Esta técnica se empleó como método confirmatorio de algunas de las alteraciones detectadas por FISH, MLPA y *array*-CGH. Se utilizaron marcadores microsátelites (la mayoría descritos en la base de datos NCBI) para determinar la herencia y el origen parental de los reordenamientos genómicos detectados en los pacientes. Se realizó la amplificación por PCR, electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.

1.1.4.f.II Estudio de inactivación del cromosoma X.

Se utilizó en la mayoría de reordenamientos genómicos localizados en el cromosoma X para interpretar y justificar la patogenicidad de las variantes de dosis detectadas. El patrón de inactivación se estudió mediante el ensayo de metilación del gen del receptor androgénico (Allen *et al.*, 1992) con algunas modificaciones.

Tanto la aplicación de la técnica de FISH con sondas para las regiones subtelo méricas, como la puesta a punto del protocolo, la validación y la realización de las técnicas de MLPA a la carta y de *array*-CGH de BACs, se llevaron a cabo en la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal por la Dra. Sandra Monfort como parte de su trabajo de tesis doctoral. En la parte técnica y de interpretación de resultados han participado todos los miembros del Grupo de Investigación Traslacional en Genética.

1.1.4.g Interpretación de los resultados.

Para la interpretación de los resultados se utilizaron y consultaron diferentes bases de datos y fuentes bibliográficas con publicaciones de interés científico:

- Database of Genomic Variants: <http://dgv.tcag.ca/>
- UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/>
- ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations): <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>
- DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources): <https://decipher.sanger.ac.uk/>
- ISCA (International Standard Cytogenomic Array Consortium): <https://www.iscaconsortium.org/>
- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim
- PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
- GeneReviews: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>

Material y métodos

Se clasificaron las variantes de acuerdo a los criterios consensuados por el consorcio ISCA y publicados en 2010 por Miller y colaboradores. La interpretación de las CNVs y la elaboración de informes se realizaron según las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica publicadas por Kearney y colaboradores en 2011 (Kearney *et al.*, 2011a; Kearney *et al.*, 2011b). Teniendo en cuenta la herencia, el tamaño y los genes localizados en la CNV, así como la publicación de otros pacientes con la misma variante de dosis, los reordenamientos genómicos se clasificaron en varios grupos:

- Variante patogénica (pCNV) si está asociada ya a algún fenotipo clínicamente reconocido, si el tamaño de la variante es grande, si es rica en genes o contiene genes cuya función se puede relacionar con la patología, si es *de novo* o la variante patogénica segrega con la enfermedad en la familia.
- Variante probablemente patogénica (ppCNV) la alteración genética no cumple estrictamente los criterios de patogenicidad establecidos, pero las evidencias que existen sugieren que es la causa de las manifestaciones clínicas del paciente.
- Variante patogénica de penetrancia incompleta (pipCNV) puede estar presente en individuos control, pero se asocian preferentemente con condiciones patológicas (aparecen más frecuentemente en pacientes).
- Variante de significado incierto (VOUS del inglés *Variant of Uncertain Significance*) aquella en la que el cambio de dosis no cumple criterios de variante patogénica ni benigna.
- Variante benigna (bCNV) aquella que no cumple los criterios mencionados en el párrafo anterior o si está descrita en la literatura como polimorfismo en individuos sanos.

El sistema de nomenclatura citogenética empleado a lo largo del presente trabajo responde al establecido según la nomenclatura ISCN en su última revisión de 2013 (Shaffer 2013).

1.2 Base de datos.

En febrero de 2006 se diseñó y construyó una base de datos, con el gestor de bases de datos Access (Access 2007 Microsoft OfficeTM), para recoger los datos clínicos y los resultados de los diferentes estudios genéticos que se realizaron a los pacientes.

A grandes rasgos, la base de datos consta de tres partes:

1. Registro de datos generales del paciente y registro de los familiares (principalmente progenitores y hermanos).
2. Registro de datos clínicos.
3. Registro de resultados de estudios genéticos.

A lo largo de los años se han realizado cambios y modificaciones en los registros según las necesidades, de forma que en 2010 queda construida la última versión de la base de datos tal como se detalla a continuación.

1.2.1 Registro general del paciente.

Se realizó en primer lugar un proceso de disociación de los datos personales. Por tanto, los datos de identificación del paciente y de los familiares están disociados del resto de datos clínicos y genéticos. Además, el acceso a la documentación digital se limita exclusivamente al personal autorizado, que precisa de una clave identificativa para acceder a la base de datos.

En esta parte del registro consta el código de identificación asignado en nuestra Unidad, que es la clave principal de la base de datos, fecha de nacimiento, número de familia asignado y fecha de nacimiento del familiar. Así mismo, también se registran varios números de identificación en función de los estudios realizados

Material y métodos

(FISH, MLPA), si se trata de caso índice en aquellas familias en las que se han incluido datos clínicos de varios hermanos y si se ha guardado muestra adicional del paciente en el biobanco del Hospital Universitari i Politècnic “La Fe”. A modo de resumen de los estudios realizados, consta el resultado definitivo del estudio genético y la fecha de informe (figura 9).

The screenshot shows a Microsoft Access database interface for 'REGISTRO PACIENTES PIRM'. The main form, 'REGISTRO DE PACIENTES', includes the following fields and values:

- ID_MOLEC: 000062
- NUM_FAMILIA: PI7
- ID_CITOG: 34576
- REGISTRO FISH: 134
- REGISTRO MLPA: 45
- PIRM: SI
- A Areces: SI
- BIOBANCO: SI
- Hermano: No
- FECHA DE NACIMIENTO: 12/03/2008
- RESULTADO ARRAY: 40000 OLIGOS
- RESULTADO DEFINITIVO: Patológico
- INFORME: 12/3/2011

Below this is a sub-form, 'REGISTRO DE FAMILIARES', with the following fields and values:

- ID_MOLEC_FAM: 000059
- ID_MOLEC PACIENTE: 000062
- PARENTESCO: PADRE
- FECHA DE NACIMIENTO DE FAMILIAR: 13/07/1971

The interface includes a ribbon with 'Inicio', 'Crear', 'Datos externos', 'Herramientas de base de datos', and 'Acrobat'. A 'Panel de exploración' is visible on the left, and a status bar at the bottom shows 'Registro: 1 de 2'.

Figura 9. Imagen de la pantalla del formulario de registro general de pacientes en la base de datos de proyectos de investigación en retraso mental.

1.2.2 Registro de datos clínicos.

Es la parte más amplia de la base de datos. Se encuentra estructurada en diversas tablas que corresponden a apartados diferentes que recogen información relevante de la historia clínica del paciente en diversos aspectos tal como muestra la figura 10.

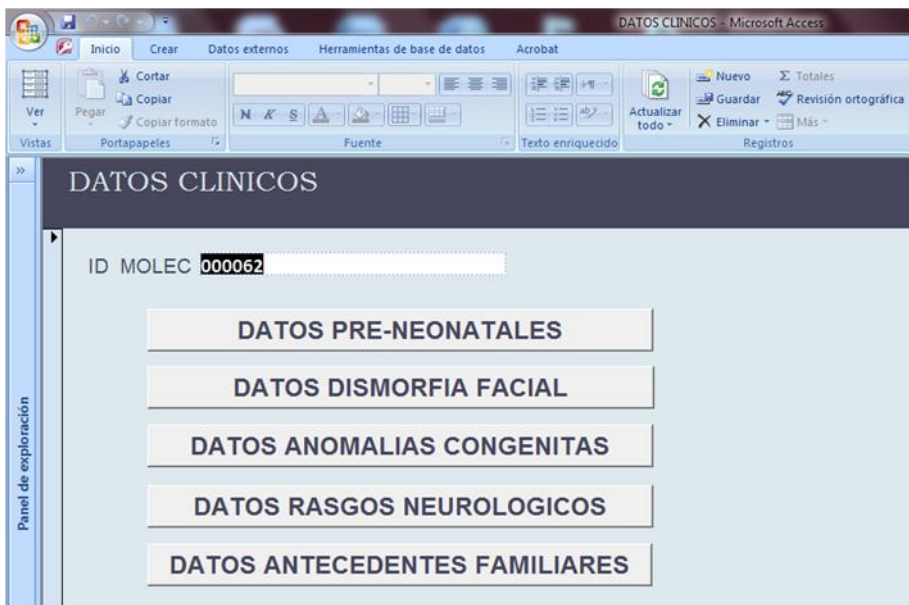
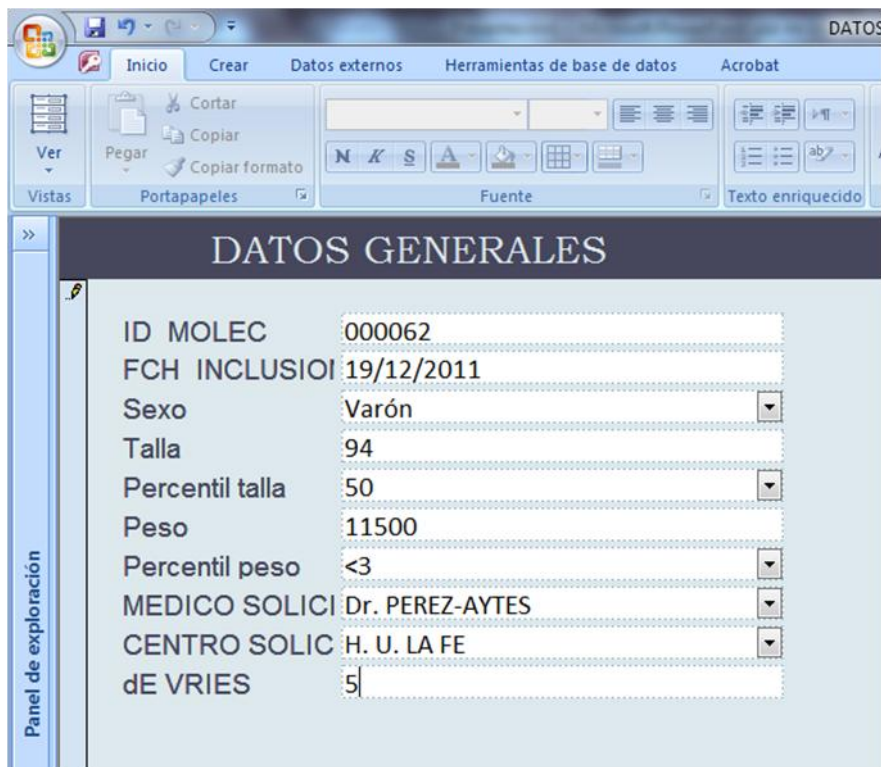


Figura 10. Imagen de la pantalla del formulario con los cinco subformularios principales.

1.2.2.a Datos generales.

Recogidos en el momento de inclusión del paciente en el estudio: género, talla (en centímetros y percentil), peso (en gramos y percentil), médico solicitante, servicio y centro hospitalario del que proviene y puntuación global asignada en función de diversos parámetros clínicos publicados por de Vries en 2001 (figura 11).

Material y métodos



The image shows a screenshot of a web browser displaying a data entry form. The browser's address bar shows 'DATOS'. The menu bar includes 'Inicio', 'Crear', 'Datos externos', 'Herramientas de base de datos', and 'Acrobat'. The toolbar contains various icons for editing and viewing. The form itself is titled 'DATOS GENERALES' and contains the following fields:

Variable	Valor
ID MOLEC	000062
FCH INCLUSIO	19/12/2011
Sexo	Varón
Talla	94
Percentil talla	50
Peso	11500
Percentil peso	<3
MEDICO SOLICI	Dr. PEREZ-AYTES
CENTRO SOLIC	H. U. LA FE
dE VRIES	5

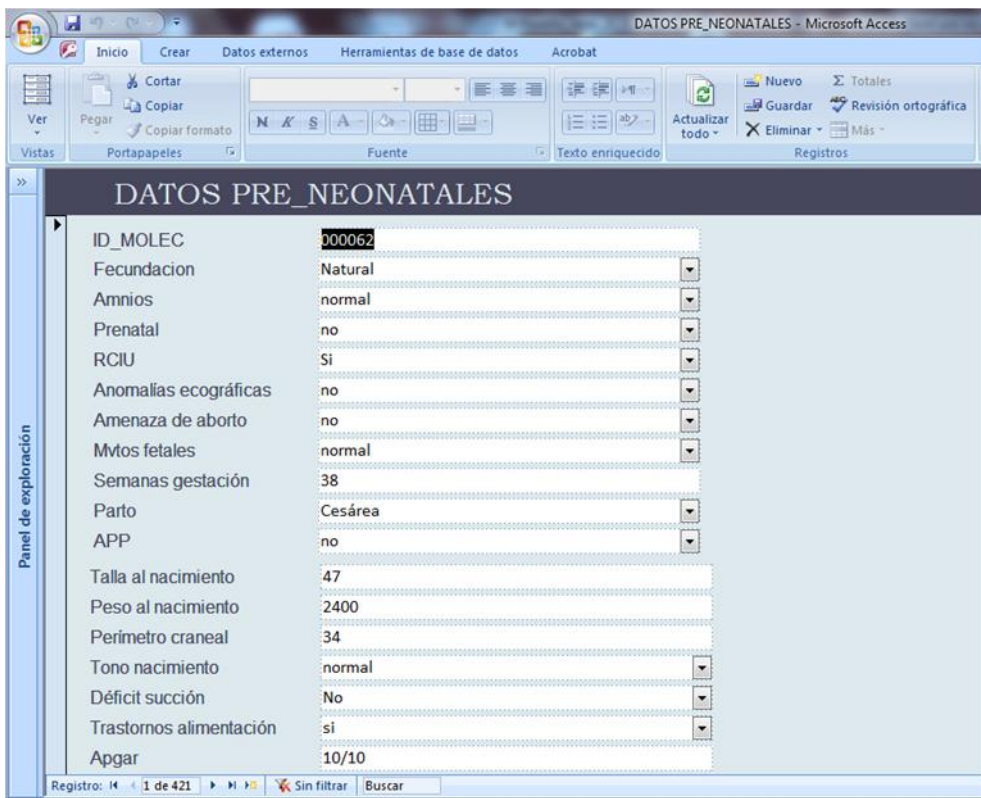
Figura 11. Imagen de la pantalla del formulario de datos generales del paciente recogidos en el momento de inclusión en el estudio.

1.2.2.b Gestacionales y neonatales.

Se recogen variables que hacen referencia a: tipo de fecundación (natural o artificial: inseminación, fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática, en éstos últimos se hace constar la procedencia de los gametos, que dado el último criterio de inclusión establecido para el estudio, son gametos de la pareja), amenaza de aborto o de parto prematuro, movimientos fetales, retraso de crecimiento intrauterino (RCIU) y cualquier otra anomalía ecográfica detectada, estudio

Material y métodos

genético prenatal, motivo y resultado, semanas de gestación, tipo de parto (natural o cesárea y motivo de ésta), incidencias al nacimiento, talla (en centímetros y percentil), peso (en gramos y percentil) y perímetro cefálico (en centímetros y percentil) al nacimiento, tono muscular, Apgar al minuto y a los cinco minutos, trastornos de succión o alimentación y cualquier tipo de comentario referente tanto a la gestación como al recién nacido (figura 12).



Variable	Valor
ID_MOLEC	000062
Fecundacion	Natural
Amnios	normal
Prenatal	no
RCIU	Si
Anomalias ecográficas	no
Amenaza de aborto	no
Mtos fetales	normal
Semanas gestación	38
Parto	Cesárea
APP	no
Talla al nacimiento	47
Peso al nacimiento	2400
Perímetro craneal	34
Tono nacimiento	normal
Déficit succión	No
Trastornos alimentación	si
Apgar	10/10

Figura 12. Imagen de la pantalla del formulario de datos referentes a las variables recogidas durante la gestación y la época neonatal.

Material y métodos

1.2.2.c Rasgos dismórficos faciales.

De forma general se recogen variables clínicas que hacen referencia a la asimetría, el aspecto general de la cara como facies tosca, triangular, alargada,..., así como si existe similitud con los rasgos faciales característicos de algún síndrome conocido (Down, Williams, Cornelia de Lange, Noonan, ...).

De forma más específica se hacen constar rasgos que se refieren a:

- Frente amplia.
- Cejas: posición (altas, bajas), densidad (ralas, escasas o muy pobladas), forma (rectas, en arco, con pico), sinofridia.
- Ojos: hiper o hipotelorismo, coloboma, defectos de refracción (miopía o hipermetropía), nistagmus, estrabismo (convergente o divergente), protusión ocular, fisuras palpebrales hacia arriba o abajo, estrechas, alargadas, epicantus, telecantus, ptosis palpebral, pestañas escasas o abundantes.
- Nariz: forma (larga/afilada, en gancho, bulbosa, punta nasal prominente o hundida) y tamaño (grande, pequeña, ancha y aplanada); raíz nasal ancha, hundida o prominente; narinas antevertidas.
- Filtrum: largo, corto, ancho, liso-plano, marcado.
- Labios: grosor (fino/grueso tanto para el labio superior como el inferior), posición (labio superior evertido), forma (en V invertida, comisuras hacia abajo).
- Boca: labio leporino, fisura palatina, paladar ojival.
- Lengua: macroglosia, tendencia a sacar la lengua.
- Dientes: ausencia o aumento de número de dientes, implantación anómala (diástasis, malaoclusión),

Material y métodos

retraso erupción, esmalte dental (oscuro, translúcido, manchas).

- Maxilar superior hipoplásico o protruente.
- Mandíbula: micrognatia, retrognatia, prognatismo, secuencia de Pierre Robin.
- Orejas: tamaño (grandes/pequeñas), dismórficas, de implantación baja, en rotación posterior, evertidas, asimétricas, alteraciones del lóbulo o del hélix.

Y además se registra cualquier comentario adicional referente a cada uno de los rasgos dismórficos faciales (figura 13).

The screenshot shows a Microsoft Access database form titled "DATOS DISMORFIA FACIAL". The form is displayed in a window with the title bar "DATOS DISMORFIA FACIAL - Microsoft Access". The ribbon includes "Inicio", "Crear", "Datos externos", "Herramientas de base de datos", and "Acrobat". The form itself has a dark header with the title "DATOS DISMORFIA FACIAL". On the left side, there is a vertical "Panel de exploración" (Navigation Pane) with the text "Panel de exploración" written vertically. The main area of the form is a table with the following data:

Variable	Valor
ID MOLEC	000062
Asimetría	No
Telorismo	hipertelorismo
Fisuras palpebrales	abajo
Orejas dismórficas	Si
Orejas bajas	Si
Orejas rotadas	rot posterior
Tamaño orejas	grandes
Coloboma	No
Estrabismo	No
Ptosis palpebral	no
Nistagmus	no
Defectos de refracción	no
Protusión	no
Pestañas	abundantes
Posición cejas	altas
Sinofridia	no
Densidad cejas	muy pobladas
Forma cejas	en arco
Gnatismo	prognatismo
Raiz nasal	ancha
Forma nariz	bulbosa
Tamaño	grande
Narinas	antevertidas
Forma labios	arco cupido
Labio leporino	No
Fisura palatina	No
Lengua	macroglosia
Paladar ojival	si
Esmalte dental	oscuro

Figura 13. Imagen de la pantalla del formulario de datos referentes a las variables clínicas que hacen referencia a los rasgos dismórficos.

Material y métodos

1.2.2.d Defectos congénitos.

De forma general se recogen variables clínicas referidas al desarrollo somático y a los defectos congénitos más frecuentes (figura 14).

Variable	Valor
ID_MOLEC	000062
Microcefalia	Si
Macrocefalia	No
Hidrocefalia	no
Forma craneo	braquicefalia
Malformación cerebral	
Cuerpo calloso	Agenesia
Hipertricosis	No
Impl baja pelo	No
Ralo	Si
Desarrollo somático	obesidad
Manos	braquidactilia
Pulgares	adduccion
Dedos manos	alt falanges
Pies	pequeños
Alt uñas	si
Cardiopatía	si

Figura 14. Imagen de la pantalla del formulario de datos referentes a las variables clínicas que hacen referencia a defectos congénitos.

- Desarrollo somático: macrosomía, obesidad, hemihipertrofia.
- Pelo: implantación baja anterior/posterior, hipertricosis, pelo ralo.
- Cráneo-cerebrales: micro/macrocefalia, hidrocefalia, hipoplasia o agenesia de cuerpo calloso, forma del

Material y métodos

- cráneo (asimetría, occipucio plano, biparietal estrecho, craneosinostosis, cierre precoz/tardío de fontanelas).
- Miembros superiores: manos (grandes, pequeñas, toscas, almohadilladas, cortas, cerradas-trisómicas); dedos (polidactilia, sindactilia, clinodactilia, braquidactilia, arcnodactilia, dedos afilados, alteración de falanges); pulgares (ancho, en resorte, de implantación baja, en oposición); uñas displásicas.
 - Miembros inferiores: pies (anchos, pequeños, valgos, zambos), para los dedos y las uñas se recogieron algunas variables comunes al apartado anterior. Las alteraciones de miembros superiores e inferiores que no sean de manos y pies se recogieron como variables clínicas dentro de anomalías del esqueleto.
 - Cardiocirculatorio: cardiopatía y tipo (comunicación interauricular (CIA), comunicación interventricular (CIV), persistencia del *ductus* arterioso (PDA), Tetralogía de Fallot (TF), transposición de los grandes vasos (TGV), estenosis/hipertensión pulmonar, estenosis/coartación/dilatación aorta, estenosis mitral, alteraciones del ritmo cardíaco). Se registró la presencia de soplo funcional o inocente pero no se tuvo en cuenta como un defecto cardíaco con repercusión en el paciente.
 - Genitourinario: agenesia, ectasia, reflujo, hipoplasia e hidronefrosis renal; hernia inguinal, hidrocele, testes pequeños, en ascensor, criptorquidia, macroorquidismo, micropene, hipospadias, hipertrofia de clítoris, hipertrofia/hipoplasia de labios mayores y menores, ano anterior.
 - Esquelético: cifosis, escoliosis, lordosis, alteraciones vertebrales (vértebras en mariposa), espina bífida, tórax en escudo, *pectum excavatum*, luxación congénita de caderas, enfermedad de Perthes, asimetría de miembros superiores e inferiores, artrogriposis, pterigium colli, osteoporosis, hiperlaxitud ligamentosa.

Material y métodos

- Piel: alteraciones de la pigmentación (piel clara/oscura no familiar), cutis laxa, angiomas, nevus, aplasia cutis. Aunque se recogió la dermatitis atópica, no se incluyó como una alteración cutánea.
- Otras variables clínicas: hernia umbilical, problemas respiratorios, infecciones de repetición, alteraciones endocrinas (hipo/hipertiroidismo, diabetes mellitus, déficit de hormona de crecimiento (GH), anomalías de glándulas suprarrenales y del colesterol) y del sistema gastrointestinal la presencia de forma continuada de reflujo gastroesofágico, estreñimiento o diarrea.

1.2.2.e Rasgos neurológicos.

Estas variables clínicas recogen los rasgos clínicos más relevantes del área neurológica (figura 15).

- Desarrollo psicomotor normal o alterado: sostén cefálico, sedestación y deambulación (en meses).
- Lenguaje: primeras palabras y primeras frases (en meses), ausencia de lenguaje, ecolalias.
- Discapacidad intelectual: leve, moderada o grave, junto con el valor del coeficiente intelectual en aquellos pacientes en que fue posible la obtención del dato.
- Trastorno del espectro autista (TEA).
- Tono muscular (hipotonía, hipertonía o ambas con predominio axial o de miembros).
- Convulsiones febriles, ausencias, tónico-clónicas.
- Trastornos del sueño.
- Estereotipias, trastornos de la conducta o del comportamiento: cariñoso, sociable, hiperactividad, agresividad hacia uno mismo, hacia los demás o ambas.

Material y métodos

- Otros rasgos neurológicos: potenciales evocados, hipoacusia, ceguera, bruxismo, babeo, control de esfínteres.
- También se recogió el resultado de diversos estudios realizados: test psicológicos, TAC/RMN cerebral (fundamentalmente afectación de la sustancia blanca, anomalías de los ventrículos, alteración del cerebelo), EEG, biopsia muscular, electromiograma y estudios metabólicos.

The image shows a screenshot of a web-based data entry form for neurological symptoms. The form is titled "DATOS RASGOS NEUROLOGICOS" and is displayed within a browser window. The form contains various fields for recording clinical data, including dropdown menus for symptoms like "Retraso mental", "Desarrollo psicomotor", "Trastorno sueño", "TAC/RMN", "Esterotipias", "Hiperactividad", "Agresividad", "Bruxismo", "Babeo", and "Control esfínteres". Some fields have numerical values entered, such as "Sosten cefálico" (8), "Sedestación" (19), and "Deambulación" (30). The form also includes text input fields for "Comentario TAC/RMN", "Comentario convulsiones", and "Comentario EEG". The browser's address bar shows "DATOS RASGOS NEUROLOGICOS" and the page title is "DATOS RASGOS NEUROLOGICOS". The browser's menu bar includes "Inicio", "Crear", "Datos externos", "Herramientas de base de datos", and "Acrobat". The browser's toolbar includes "Ver", "Pegar", "Copiar", "Copiar formato", "N", "K", "S", "A", "Fuente", "Texto enriquecido", "Actualizar todo", "Nuevo", "Guardar", and "Eliminar".

ID MOLEC		000062	
Retraso mental	moderad	CI	
Autismo	Si	Tono muscular	normal
Desarrollo psicomotor	alterado	Sosten cefálico	8
		Sedestación	19
		Deambulación	30
		Prim palabras	
		Prim frases	
		ausencia lenguaje	Si
		ecolalia	
Trastorno sueño	no	Hipoacusia	No
		Ceguera	No
TAC/RMN	normal	Comentario TAC/RMN	
Convulsiones	No	Comentario convulsiones	
EEG	normal	Comentario EEG	
Alteraciones conducta	Si	Esterotipias	Si
		Hiperactividad	Si
		Agresividad	Hacia los demas
		Bruxismo	si
Babeo	no		
Control esfínteres	no		

Figura 15. Imagen de la pantalla del formulario de datos con las variables clínicas referentes a los principales rasgos neurológicos.

Material y métodos

1.2.2.f Antecedentes familiares.

Se recogen las variables clínicas (figura 16) que hacen referencia a consanguinidad, antecedentes de abortos, de anomalías congénitas o de discapacidad intelectual, reflejando además si este último antecedente es compatible o no con herencia tipo mendeliana, para así poder calcular uno de los ítems recogidos por de Vries en su puntuación.

DATOS ANTECEDENTES FAMILIARES

ID MOLEC 000062

Consanguinidad No

Coment consanguinidad

Ant anomalias congénitas No

Coment anomalias cong

Ant retraso mental Si

Herencia mendeliana si

Coment retraso ment

Ant abortos Si

Coment Ant abortos

Figura 16. Imagen de la pantalla del formulario de datos con las variables que recogen los antecedentes familiares más significativos.

1.2.3 Registro de resultados.

En esta parte de la base de datos se encuentran registrados todos los resultados genéticos derivados de los estudios realizados en los pacientes (figura 17). Estos resultados, distribuidos en varias tablas, engloban cambios en el número de copias detectadas por las técnicas de FISH, MLPA o *array*-CGH de BACs o de oligonucleótidos. Pero también se registró cualquier otro tipo de estudio genético, como test de fragilidad cromosómica, estudios de metilación, detección de mutaciones puntuales, que realizados de forma paralela a estos estudios englobados en diferentes proyectos de investigación, han permitido obtener un diagnóstico genético en el paciente.

El registro de resultados contiene las siguientes variables de interés: fecha de análisis, técnica de detección (FISH subtelo méricas, MLPA subtelo méricas, MLPA síndromes de microdelección, *array* de BACs, *array* de oligonucleótidos), técnica de máxima resolución, número de alteraciones, cromosoma, banda cromosómica, tipo de CNV (delección, duplicación), localización de la CNV en el cromosoma (subtelomérica, intersticial), alteración genética simple (una pCNV única) o compleja (generalmente 2 pCNVs), mapa génico (mayoritariamente se utilizó NCBI36/hg18, marzo 2006), posición inicial, final y tamaño en pares de bases, interpretación y justificación de la CNV, herencia y origen, genes (número, patológicos, candidatos, genes con impronta), elementos ultraconservados (UCEs), microRNA (miRNA, shoRNA, scaRNA, HacaRNA), islas CpG, así como el resultado final definitivo que incluye cualquier resultado genético obtenido también por otro tipo de estudios, generalmente realizados *a posteriori* (mutaciones puntuales, estudios de metilación, test de fragilidad cromosómica).

Material y métodos

TECNICA DETEC	MÁXIMA RESOLUCI	RESULTADO FINAL	ALTERACION	LOCAL ALT	TIPO ALT	CROMOSOM	BANDA	INICIO Kb	FINAL Kb
ARRAY_OLIGOS	ARRAY_OLIGOS	NORMAL							
MLPA MICRODEL	ARRAY_BACS	PATOLOGICO	DUPLICACION	INTERSTICIAL	Simple	7	q11.3	73.481	74.984
MLPA SUBTEL	MLPA	PATOLOGICO	DEL+DUP	SUBTELOMERICA	Compleja	5/10	pter/qter	0/129,774,730	11.500/135,374,737
MLPA SUBTEL	ARRAY_OLIGOS	PATOLOGICO	DELECION	SUBTELOMERICA	Simple	9	q34.2	138.913	140.128
ARRAY_OLIGOS	ARRAY_OLIGOS	NORMAL							
ARRAY_OLIGOS	ARRAY_OLIGOS	NORMAL_POLIMORFISMO							
MLPA SUBTEL	ARRAY_OLIGOS	PATOLOGICO	DELECION	SUBTELOMERICA	Simple	9	q34.2	139.119	140.128
ARRAY_OLIGOS	ARRAY_OLIGOS	NORMAL							
ARRAY_OLIGOS	ARRAY_OLIGOS	PATOLOGICO	DELECION	INTERSTICIAL	Simple	6	q16.1-16.3	93.800	103.000
ARRAY_OLIGOS	ARRAY_CUSTOM_1#V	NORMAL_POLIMORFISMO							
ARRAY_OLIGOS	ARRAY_CUSTOM_1#V	DESCONOCIDO	DUP+DUP	INTERSTICIAL	Compleja	6/17	q14/q12	80.423,000/ 34.663,000	80.808,000 /34.751,00

Figura 17. Imagen de la pantalla del registro de resultados genéticos.

Se anotaron en total 264 variables en diferentes tablas entre las que se establecieron relaciones que se muestran en la figura 18. Estas variables hacen referencia a:

- 39 variables con datos generales.
- 190 variables clínicas que recogen 293 rasgos clínicos diferentes.
- 35 variables genéticas que hacen referencia a los resultados de los estudios.

Material y métodos

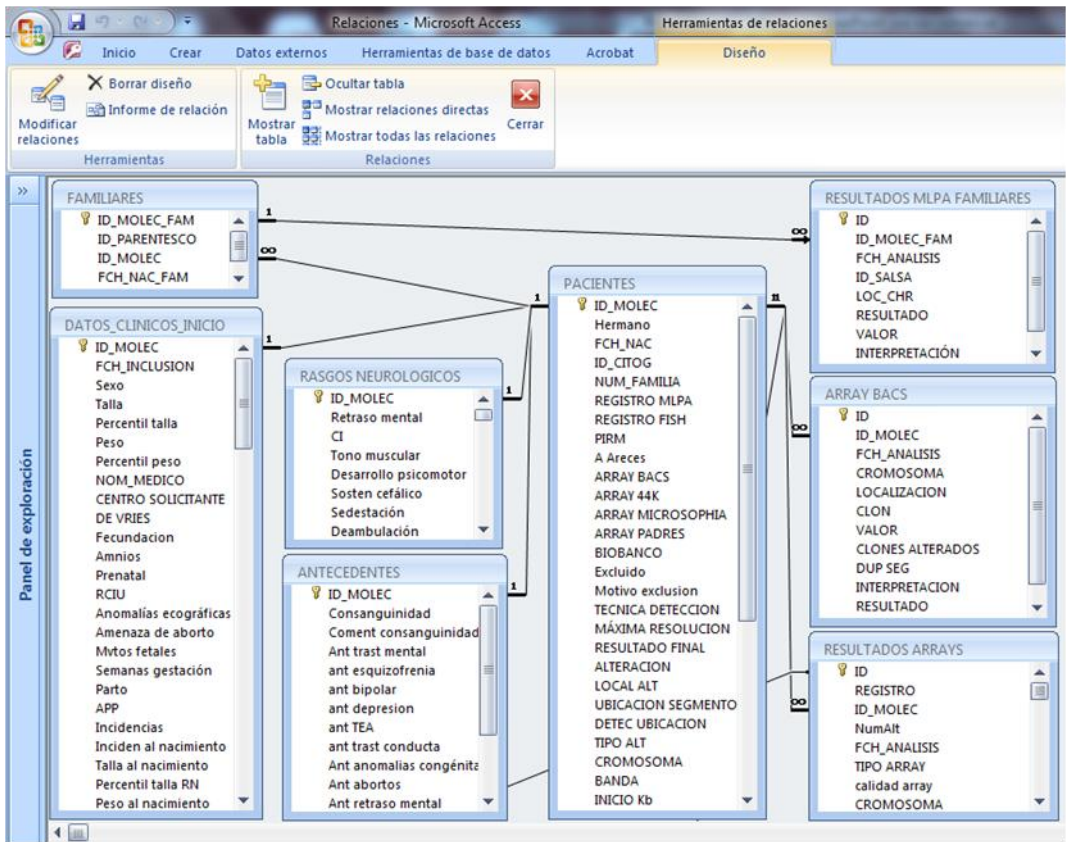


Figura 18. Imagen de las relaciones establecidas entre las diferentes tablas, con variables clínicas y resultados genéticos, creadas en la base de datos.

Material y métodos

1.3 Análisis estadístico.

1.3.1 Análisis de variables clínicas.

Todas las variables, tanto clínicas como genéticas, fueron recopiladas en una base de datos Access. Esta recogida de datos, exhaustiva y minuciosa, permitió la realización de la mayor parte de los análisis utilizando el programa SPSS. Los datos fueron analizados con la versión SPSS 17.0 para Windows.

Se realizó un análisis estadístico para determinar si alguna de las variables era indicador de la presencia de reordenamientos genómicos. Se llevaron a cabo análisis descriptivos de asociación entre las diferentes variables clínicas a través de correlaciones bivariadas.

Se realizó un análisis de frecuencias de las variables clínicas en el global de la serie y en grupos de pacientes en función de la presencia o ausencia de las variantes de dosis detectadas. Para determinar si alguna de estas variables se relacionaba con la presencia de reordenamientos genómicos, se utilizó el test Chi cuadrado. Se establecieron tablas de contingencia de 2x2 y análisis mediante prueba de Fisher en los casos que se requirió. Dado el elevado número de variables, y por tanto, de análisis estadísticos realizados, se consideró un nivel de significación estadística con un valor de $p < 0,001$.

Se realizaron estudios de regresión lineal y logística. Para las variables independientes de tipo cuantitativo (tamaño de la alteración, número de genes y de elementos ultraconservados), el análisis adoptado fue el de regresión lineal. Se aplicó la regresión logística para construir un modelo predictivo de una respuesta (reordenamiento genómico patológico si/no), a partir de un conjunto de variables clínicas predictoras. Este modelo, obtenido a partir del análisis de las variables en la serie de 246 pacientes se aplicó a una serie de seguimiento formada por 101 pacientes.

1.3.2 Análisis bioinformático.

Se realizó una selección de nueve variables clínicas de interés: hipertelorismo, orejas de implantación baja, cardiopatía, anomalías de los dedos (de manos o pies), anomalías urogenitales, malformaciones cerebrales (detectadas por RMN), trastornos de conducta y de comportamiento, el perímetro cefálico (y por tanto la microcefalia y la macrocefalia) y la talla, tanto baja como alta. Se valoraron estas dos últimas variables tanto al nacimiento como en el momento de inclusión del paciente en el estudio de investigación.

Para cada una de las variables descritas y considerando la presencia o ausencia de dicha característica clínica en el grupo de pacientes con pCNVs, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional sobre los genes contenidos en las mismas.

El software utilizado fue R (R Core Team 2013) versión 3.0.2 (<http://www.R-project.org/>) y la herramienta web Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>), diseñada por el equipo del departamento de Bioinformática y Genómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Medina *et al.*, 2010). Se utilizó fundamentalmente la base de datos Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>) que organiza las funciones biológicas a través de jerarquías en tres grupos: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares.

El análisis bioinformático se ha realizado en colaboración con Francisco García y David Montaner del Departamento de Genómica Computacional del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

Material y métodos

RESULTADOS

Resultados

1.1 Clasificación de los resultados genéticos.

Se ha estudiado un total de 246 pacientes. En 72 de ellos se detectó una alteración genética que se consideró responsable de la clínica del paciente. De los 174 restantes, en 166 no se detectó ningún cambio genómico que pudiera ser la causa de la DI, y en 8 casos, el resultado se clasificó como incierto por detectarse una CNV tipo VOUS.

Para dar una verdadera utilidad clínica y facilitar el análisis de los resultados, se ha tratado de otorgar un valor a las VOUS, asignándoles un significado probablemente benigno o causal, consiguiendo así, una reclasificación más útil de las variantes genómicas encontradas. Tras esta reevaluación, se añadió al grupo de CNVs patológicas, una variante de dosis VOUS a la que pudimos otorgar un valor de probablemente causal (CGM2428), haciendo un total de 73 casos (29,7%) con CNVs patogénicas (anexo III). El resto de CNVs tipo VOUS se consideraron como benignas (bCNVs) por no encontrarse de momento relación con la patología que presentaban los pacientes.

El análisis de variables clínicas y su relación con las variantes genómicas encontradas, se centró en el grupo de 73 pacientes con variantes de dosis claramente causales, probablemente patológicas (ppCNVs) y de penetrancia incompleta (pipCNVs). De aquí en adelante y para simplificar la exposición, se agruparán estos 3 tipos de CNVs en un único grupo de variantes de dosis consideradas patológicas (pCNVs).

Resultados

1.1.1 Descripción de los resultados en función de la metodología utilizada.

El estudio genético de la serie de pacientes incluida en el presente trabajo se realizó utilizando diversa tecnología conforme se describieron e implantaron las diferentes técnicas de citogenética molecular tal, como se ha descrito en el apartado de material y métodos (ver figura 8 de material y métodos con la metodología utilizada y el cronograma). Por tanto, aunque la mayoría de los casos se estudiaron con más de una técnica, para la confirmación y la caracterización de las CNVs detectadas, la técnica de detección inicial del reordenamiento genómico no ha sido la misma en todos los pacientes.

A continuación se muestra una figura (figura 19) con el número de pacientes con variantes de dosis consideradas patológicas y la técnica inicial de detección de las mismas.

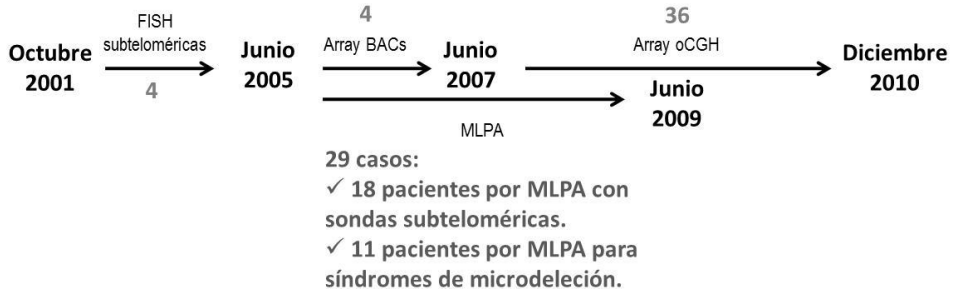


Figura 19. Periodo de inclusión y estudio de los pacientes para el diagnóstico genético.

El número situado junto a cada técnica hace referencia al número de pacientes diagnosticados por la misma.

Array oCGH: *array* de oligonucleótidos.

1.1.2 Clasificación de los resultados en función de la CNV detectada.

El resultado genético se ha clasificado en función de la repercusión patológica de las CNVs detectadas (tabla 6).

Tabla 6. Resultados generales obtenidos tras el estudio genético de los 246 pacientes de la serie.

Resultado	Nº de pacientes	%	Resultado global
Normal	118	48	Normales 173 (70,3%)
bCNV ¹	55	22,3	
CNVs causales	63	25,6	Casos patológicos 73 (29,7%)
pipCNVs ²	8	3,3	
ppCNVs ³	2	0,8	

¹bCNV: la variante en el número de copias (duplicación o delección) se ha detectado en individuos controles y no aparenta relación con la patología.

²pipCNVs: pueden estar presentes en individuos control, pero se asocian preferentemente con condiciones patológicas (aparecen más frecuentemente en pacientes).

³ppCNVs: la alteración genética no cumple estrictamente los criterios de patogenicidad pero las evidencias que existen sugieren que es la causa de las manifestaciones clínicas del paciente.

Así mismo, las pCNVs se han clasificado en base a 3 criterios de la siguiente manera (tabla 7): clasificación I según el tipo de desequilibrio (delección, duplicación o ambas), clasificación II según la localización (subtelomérica o intersticial) y clasificación III según el número de CNVs por paciente (simple si es una única CNV causal o compleja si se ha detectado más de una CNV).

Resultados

Tabla 7. Resultados detallados de las pCNVs detectadas en los 73 pacientes en función de las tres clasificaciones utilizadas.

		Nº de pacientes	%
<u>Clasificación I.</u> Tipo de desequilibrio genómico.	Deleciones puras	35	47,95
	Duplicaciones puras	20	27,4
	Delección+Duplicación	15	20,55
	Delección+Delección	2	2,74
	Duplicación+Triplicación	1	1,36
<u>Clasificación II.</u> Localización cromosómica.	Subteloméricas	30	41,1
	Intersticiales	43	58,9
<u>Clasificación III.</u> Número de regiones.	Simples	55	75,34
	Complejas	18	24,66

Se analizó si existían diferencias en la frecuencia de cada tipo de CNV en función del género, y aunque, el porcentaje es ligeramente superior en varones, no se encontraron diferencias significativas.

1.1.2.a Casos con CNVs causales.

Los 73 casos con 91 pCNVs causales detectadas quedan clasificados y resumidos en las siguientes tres tablas (tabla 8, 9 y 10).

1.1.2.a.I Alteraciones subteloméricas complejas.

En los 15 pacientes que se presentan a continuación (tabla 8), se detectaron 30 CNVs (dos CNVs por paciente) en regiones subteloméricas. Aunque en la mayoría de casos se trata de una CNV de delección y otra CNV de duplicación, en el paciente CGM305 se detectaron dos CNVs de delección contiguas en el brazo largo del cromosoma 22. Así mismo, la paciente CGM2040 presentaba una duplicación y una triplicación también contiguas en la región terminal del brazo largo del cromosoma X.

Tabla 8. Pacientes con CNVs consideradas como alteraciones subteloméricas complejas.

Paciente	CNV	Localización	Inicio (kb)→ Fin (kb) Mapa génico Hg18	Tamaño (kb)	Nº de genes	Herencia	Técnica de detección
CGM1160*	Del	12pter	0→5000	5000	108	madre PTE	FISH subtelomé ricas
	Dup	13qter	109140→114100	4960	55		
CGM245	Del	13q34qter	112809→114077	1268	29	madre PTE	MLPA subtelomé ricas
	Dup	15q25qter	82964→100168	17202	175		
CGM1819	Del	14q32.33	102993→106329	3336	66	padre PTE	MLPA subtelomé ricas
	Dup	8q24.24	140699→146250	5551	164		
X3361	Dup	17p13.2pter	48→4167	4119	136	madre PTE	MLPA subtelomé ricas
	Del	21q22.2qter	45115→46892	1776	55		
XF2337*	Del	2 qter	231100→242100	11000	204	dn	FISH subtelomé ricas
	Dup	1qter	239100→245100	6000	42		

Resultados

Paciente	CNV	Localización	Inicio (kb)→ Fin (kb) Mapa génico Hg18	Tamaño (kb)	Nº de genes	Herencia	Técnica de detección
XF2463	Del	2pter	0→2757	2757	17	dn	MLPA subtelomé ricas
	Dup	2qter	230702→242690	11988	191		
CGM1525	Del	4 pter	0→1323	1323	40	dn	MLPA subtelomé ricas
	Dup	4p16.3	1379→2474	1093	35		
CGM897	Del	4p16.2pter	62→3740	3678	104	padre PTE	MLPA subtelomé ricas
	Dup	11p15.5pter	187→3339	3152	164		
CGM2405	Del	4pter	0→1905	1905	61	padre PTE	MLPA subtelomé ricas
	Dup	21qter	42050→46944	4894	178		
CGM1387	Del	5pter	0→11500	11500	99	madre PTE	MLPA subtelomé ricas
	Dup	10qter	129774→135374	5600	62		
CGM935*	Del	5pter	0→13500	13500	100	padre PTE	FISH subtelomé ricas
	Dup	9pter	0→6200	6200	64		
CGM967*	Del	6pter	0→6900	6900	73	madre PTE	FISH subtelomé ricas
	Dup	3qter	195100→199000	3900	70		
CGM1313	Del	8 p23	0→6720	6720	33	dn	MLPA subtelomé ricas
	Dup	8p22p12	12772→35784	23012	269		
CGM305	Del	22q13.1	36271→37282	1011	68	dn	aCGH BACs
	Del	22q13.2q22	42562→47789	5227	50		
CGM2040 ¹	Dup	Xq28	153393→153531	138	19	dn	MLPA microdele ciones
	Trip	Xq28	152930→153230	300	15		

*Primeros 4 pacientes con reordenamientos subteloméricos desequilibrados detectados mediante la técnica de FISH (Orellana *et al.*, 2007).

¹ Mayo *et al.*, 2011.

Del: delección. Dup: duplicación. Trip: triplicación.

Herencia: madre PTE: madre portadora de translocación equilibrada; padre PTE: padre portador de translocación equilibrada; dn: *de novo*.

El sombreado gris en el número de genes indica que la región contiene algún gen cuya función se ha relacionado con la maquinaria epigenética.

El número de genes se ha obtenido de la información proporcionada por la Universidad de California, Santa Cruz, en su página web sobre datos de la secuencia del genoma (<http://genome.ucsc.edu/>). A partir de la página UCSC *Genome Bioinformatics* en el apartado *table browser* y utilizando como *track* el término *RefSeq Genes*, se ha anotado el número de genes que proporciona la opción *summary statistics*.

1.1.2.a.II Síndromes clínicos de microduplicación y microdeleción.

En los 39 pacientes que se presentan a continuación (tabla 9) se detectaron CNVs descritas en la literatura como regiones cromosómicas asociadas a síndromes de microdeleción o de microduplicación.

Tabla 9. Pacientes con CNVs responsables de síndromes clínicos de microduplicación y microdeleción.

Síndrome descrito	Alteración genómica	Localización cromosómica	Paciente	Tamaño aproximado (pb)	Nº de genes	Herencia
Deleción 1p36	Del	^s 1p36	CGM2067	3873000	193	<i>dn</i>
			CGM506	2100000	126	<i>dn</i>
*Deleción 2p22.2	Dup	2p22.2	CGM2350	13371505	244	<i>dn</i>
Deleción 2q23.1	Del	2q23.1	CGM2402	3822748	22	<i>dn</i>
Deleción 3q13.31	Del	3q13.2q31	XF1701	3241702	43	<i>dn</i>
Deleción 3q29	Del	^s 3q29	CGM784 ⁽¹⁾	1174000	26	M (madre con DI leve y estenosis pulmonar)
Deleción 6q16	Del	6q16.1q16.3	CGM1414	9200000	31	<i>dn</i>
			XF1774 ^(b)	10314000	31	<i>dn</i>

Resultados

Síndrome descrito	Alteración genómica	Localización cromosómica	Paciente	Tamaño aproximado (pb)	Nº de genes	Herencia
Deleción 6q25	Del	6q25.3	CGM2428	67987	3	dn
Saethre-Chotzen	Del	7p21.2	CGM1199	580000	2	dn
Región Crítica del síndrome de Williams	Del	7q11.23	CGM2412	2284158	73	dn
			CGM2488	2284158	73	dn
CHARGE	Dup	8q21	XF2019 ⁽¹⁾	2990000	13	padre PTE
Kleefstra	Del	^s 9q34.2	CGM1388 ⁽³⁾	1215000	68	dn
			CGM1397 ⁽³⁾	1009000	50	dn
*Deleción 14q11	Dup	14q11	CGM991 ⁽⁴⁾	4828000	187	dn
Duplicación y deleción 16p (penetrancia incompleta y expresividad variable)	Del	16p11	CGM2952	523387	45	P
		16p12.2	CGM1696	486713	14	P
		16p12.2	CGM912 ^(a)	1710466	103	dn
	Dup	16p11.2	XF1774 ^(b)	360000	35	dn
		16p11	XF2184	525000	43	M
		16p12.1	CGM1208	607836	38	P
		16p13.1	CGM2182	1257000	24	P
		16p13.11	XF1338	1305000	26	P
16p13.11p12.3	CGM2822	2520144	31	M		
Rubinstein-Taybi	Del	^s 16p13.3	CGM2292	79782	2	dn
Smith-Magenis	Del	17p11	XF2863	3835315	112	dn
Deleción 17q21	Del	17q21	XF2789	600636	24	dn
Región crítica del síndrome de DiGeorge (variabilidad fenotípica)	Del	22q11.23	CGM2419	2515069	107	dn
	Dup	22q11.23	CGM2103	1954000	67	P
Región crítica del síndrome de Phelan-Mc-Dermid	Del	^s 22q13	CGM165	948	1	dn
			CGM2537	270884	30	dn
			XF1054	1343000	65	dn
	Dup	^s 22q13	X2686	529000	45	dn
Duplicación HUWE1	Dup	Xp11.22	XF2761	1001000	21	M
^RM ligado a X	Dup	Xp11.3p11.2	CGM548	3859000	130	dn
^RM, facies hipotónica, ligado a X	Dup	Xq13.2q21.31	XF1702	18662204	82	M

Rett	Dup	^s Xq28	CGM1330	212000	10	M
			X841	1060000	88	M

* Descritos en la bibliografía como síndromes de delección, sin embargo en los pacientes se observa una duplicación de la misma región cromosómica.

^ Solapa parcialmente con la región cromosómica característica del síndrome asociado.

Dup: duplicación. Del: delección.

^s alteración subtelomérica.

^(a) Paciente (CGM912) con dos delecciones relacionadas con la patología (delección 16p12.2 y delección 7q11.22).

^(b) Paciente (XF1774) con una delección (6q16.1q16.3) y una duplicación (16p11.2), ambas relacionadas con la patología.

⁽¹⁾ Monfort *et al.*, 2008.

⁽²⁾ Orellana *et al.*, 2007.

⁽³⁾ Roselló *et al.*, 2007.

⁽⁴⁾ Monfort *et al.*, 2007.

Herencia M: materna; P: paterna; *dn*: *de novo*.

El sombreado gris en el número de genes indica que la región contiene algún gen cuya función se ha relacionado con la maquinaria epigenética.

1.1.2.a.III CNVs causales halladas en los pacientes restantes.

En el resto de casos (19 pacientes) se detectaron CNVs que tras su exhaustiva revisión, se consideraron responsables de la patología en función de criterios de patogenicidad como el tamaño de la alteración, la herencia o la publicación de otros casos descritos con la misma CNV.

Resultados

Tabla 10. Pacientes con otras CNVs consideras patológicas.

	Paciente	Localización cromosómica	Nº de genes	Criterios de patogenicidad		
				Tamaño (pb)	Herencia	Otros casos descritos
Delección	CGM1353	1q24.25	77	5126523	dn	No
	CGM1527	^s 1q44 ⁽²⁾	14	1153000	dn	Si
	CGM2433	2q12.3	2	80170	dn	No ⁺
	CGM2756	2q31.1q32.1	137	17713780	dn	Si
	CGM1349	2q31.2 ⁽¹⁾	35	3270000	dn	No
	CGM1526	5q14.3	16	3970363	dn	No
	XF2296	6q22.2q22.3	32	7460051	dn	Si
	CGM2179	11q13.5	46	7909000	dn	No
	XF2623	12q24.31	40	1224586	dn	No ⁺
	X1186	13q32	40	5544000	dn	Si
	X2629	15q23	12	1290224	M*	No ⁺
	CGM2451	^s 18q22.1q23	56	11178506	dn	Si
	XF1526	20q12q13.1	16	2545205	P*	No ⁺
	CGM2494	21q21.2	16	3353260	M**	No
	Duplicación	CGM912	7q11.22 ^(a)	9	2791000	dn
CGM1606 ⁽³⁾		^s Xq28	10	427000	dn	Si
		Xp22.2	2	408000	M	No
CGM2161		2q22.2q23.2	18	6017686	dn	Si
CGM2733		^s 17p13.2pter	140	4276978	dn	Si
XF977	19p13.3	164	4956139	M***	Si	
	CGM1513	19q13.42	5	269000	dn	No ⁺

^(a) En este paciente (CGM912) se han detectado dos deleciones relacionadas con la patología (delección 16p12.2 y delección 7q11.22).

^s alteración subtelomérica

Herencia: M: materna; P: paterna; dn: *de novo*; *progenitor con DI leve; **madre con posible alteración cromosómica en mosaico; ***madre portadora de una translocación insercional intracromosómica equilibrada (López-Carrasco *et al.*, 2013).

⁺ No se han descrito otros casos similares pero el reordenamiento incluye genes cuya función se puede relacionar con la patología que presenta el paciente.

⁽¹⁾ Monfort *et al.*, 2008 y López Carrasco *et al.*, 2013.

⁽²⁾ Orellana *et al.*, 2009.

⁽³⁾ Paciente (CGM1606) con 2 pCNVs, una intersticial y otra subtelomérica. Para los cálculos estadísticos globales en pacientes con pCNVs se ha considerado como intersticial.

El sombreado gris en el número de genes indica que la región contiene algún gen cuya función se ha relacionado con la maquinaria epigenética.

1.1.2.b Casos con CNVs benignas.

En 55 de los casos se detectaron CNVs consideradas benignas (bCNVs) por estar publicadas en bases de datos de variantes de la población general y que no tienen repercusión fenotípica. Algunas de estas CNVs además, son variantes de pequeño tamaño heredadas de alguno de los progenitores sanos. Se observaron 82 bCNVs en 55 pacientes. Estas variantes tenían un tamaño variable que abarcaba desde las 149pb hasta 1325000pb, con un tamaño medio de 211862pb. En 29 de estas bCNVs se estudió la herencia y el origen. Sólo 3 de ellas eran *de novo*, mientras que de las 26 heredadas, 9 eran de origen paterno y 17 de origen materno. La mayoría de los pacientes (37) presentaban una sólo bCNV, en 12 se detectaron 2 bCNV, en 5 se observaron 3 bCNV y uno de los pacientes presentó 6 bCNVs diferentes.

Se realizó un análisis estadístico para determinar si alguna de las variables clínicas era un indicador de la presencia de bCNVs, mediante un test de Chi cuadrado. Se establecieron tablas de contingencia de 2x2 y análisis mediante la prueba de Fisher en los casos que se requirió. Se compararon los rasgos clínicos de estos 55 pacientes frente a los 118 pacientes en los que no se detectó ninguna CNV. Se consideró un nivel de significación estadística $p < 0,05$. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa, por lo que se asume, desde el punto de vista de los resultados genéticos, que estos dos grupos de pacientes son considerados uno solo (resultado normal). A partir de este momento los estudios comparativos se realizan entre el grupo de 73 pacientes con pCNVs frente a este grupo unificado de 173 pacientes.

Resultados

1.2 Estudio de las variables genéticas.

1.2.1 Distribución en el genoma.

Respecto al cromosoma implicado, *a priori*, la localización parece muy heterogénea. Pero, cabe destacar que 35 de los 91 cambios genómicos patogénicos detectados en los 73 pacientes, se concentran en determinadas regiones cromosómicas recurrentes (figura 20), como son:

- la región terminal del brazo corto del cromosoma 4 (4 pCNVs),
- el brazo largo del cromosoma 7, en 7q11.23 (3 pCNVs) flanqueadas por duplicaciones segmentarias,
- el brazo corto del cromosoma 16 (10 pCNVs),
- el brazo largo del cromosoma 22 (8 pCNVs de las cuales la mitad se localizan en 22q11 flanqueadas por duplicaciones segmentarias),
- y el cromosoma X (10 pCNVs), especialmente en la región terminal Xq28.

Resultados



Figura 20. Idiograma donde se muestra la localización cromosómica de las 91 pCNVs detectadas en los 73 pacientes.

Las barras azules indican que se trata de una duplicación, y las barras rojas muestran las deleciones.

Resultados

1.2.2 Herencia y origen.

En todos los pacientes en los que se detectó alguna CNV, al mismo tiempo que se confirmaba la alteración genética por otra técnica de biología molecular, se intentó averiguar la herencia y el origen de la misma (tablas 11, 12 y 13). Aunque la variable herencia/origen se tuvo en cuenta en los casos con bCNVs y pCNVs, precisamente para facilitar la interpretación del resultado, sólo se consideran en este apartado los 73 casos con pCNVs, ya que está claro el papel no patogénico de las bCNVs.

Se analizó la herencia y el origen de las alteraciones teniendo en cuenta el tipo de pCNV según las tres clasificaciones descritas en el apartado 1.1.2. de los resultados.

Clasificación I: según el tipo de desequilibrio genómico.

Tabla 11. Herencia y origen de las CNVs de delección y de duplicación.

Herencia	Origen	Delección	Duplicación	Delección+ duplicación	Subtotal pacientes	Total pacientes
Heredada	materno	3	7	6	16	28
	paterno	3	5	4	12	
<i>De novo</i>	materno	3	2	1	6	45
	paterno	11	3	2	16	
	desconocido	17	4	2	23	
		37	21	15	73	

Clasificación II: según la localización cromosómica de la región implicada.**Tabla 12.** Herencia y origen de las CNVs de localización intersticial y subtelomérica.

Herencia	Origen	Intersticial	Subtelomérica	Subtotal pacientes	Total pacientes
Heredada	materno	8	8	16	28
	paterno	8	4	12	
<i>De novo</i>	materno	5	1	6	45
	paterno	11	5	16	
	desconocido	11	12	23	
		43	30	73	

Clasificación III: según el número de regiones implicadas.**Tabla 13.** Herencia y origen de las CNVs simples y complejas.

Herencia	Origen	Simple	Compleja	Subtotal pacientes	Total pacientes
Heredada	materno	10	6	16	28
	paterno	8	4	12	
<i>De novo</i>	materno	5	1	6	45
	paterno	14	2	16	
	desconocido	18	5	23	
		55	18	73	

De los 73 pacientes con pCNVs, en 28 casos las alteraciones son heredadas, de las cuales 16 son maternas y 12 son paternas (tabla 14). En el caso de las maternas, 5 corresponden a alteraciones en el

Resultados

cromosoma X. Por tanto, sin tener en cuenta estos 5 casos, no se observan grandes diferencias en cuanto al número y herencia/origen de las alteraciones heredadas (11 maternas y 12 paternas). Respecto al cromosoma implicado, el resultado es muy heterogéneo en ambos grupos, pero de estos 23 casos con alteraciones heredadas (11 maternas y 12 paternas) cabe destacar los 7 cambios genómicos, tanto deleciones como duplicaciones, que se concentran en el brazo corto del cromosoma 16 (2 maternas y 5 paternas).

Tabla 14. Cambios genómicos heredados o de origen tanto materno como paterno.

	Cambio genómico heredado de la madre o de origen materno	Cambio genómico heredado del padre o de origen paterno
Heredado	16	12
<i>De novo</i>	6	16

Los cambios genómicos detectados en el resto de pacientes fueron *de novo*. Estudiados estos 45 pacientes, sólo en 22 de ellos se pudo conocer el origen de la alteración, siendo 16 casos de origen paterno y 6 de origen materno, con una ratio 2,6:1. Dada esta mayor frecuencia de alteraciones *de novo* de origen paterno, se estudió si existe alguna diferencia de edad en los progenitores de estos pacientes respecto al grupo de pacientes con resultado normal (comparación de medias). No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa. Para el grupo de 16 pacientes con alteración genética *de novo* de origen paterno, la edad media del padre a la paternidad fue de 34,15 años, frente a 33,99 años para el grupo de padres cuyos hijos no tienen cambios genómicos ($p=0,918$). Este mismo cálculo se realizó para el grupo de 6 pacientes con alteración genética *de novo* de origen materno, no encontrándose tampoco ninguna diferencia siendo la edad

Resultados

media a la maternidad de los casos con pCNVs *de novo* de origen materno de 31,2 años y la de las madres cuyos hijos no tienen cambios genómicos de 31.5 ($p=0,858$).

Se observó diferencia en cuanto a la herencia (heredada o *de novo*) del cambio genómico frente al origen del mismo (materno o paterno) con un valor de $p=0,03$ (figura 21), siendo más frecuente el origen materno en las alteraciones heredadas, debido fundamentalmente a las alteraciones en el cromosoma X, mientras que las alteraciones *de novo* son mayoritariamente de origen paterno.

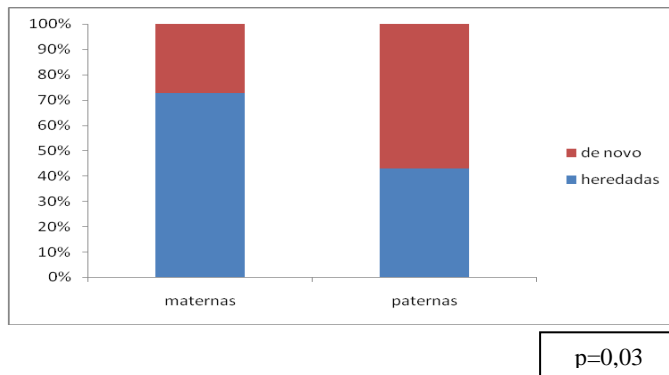


Figura 21. CNVs en función de la herencia y el origen de las mismas.

A continuación se presentan algunos detalles de los casos con alteraciones heredadas (tabla 15). Se muestran por un lado, los casos en los que el progenitor es portador del mismo desequilibrio genómico que el paciente (parte superior de la tabla 15) y por otro lado, los casos en los que el progenitor presenta un reordenamiento cromosómico equilibrado que ha transmitido de manera desequilibrada al paciente (parte inferior de la tabla 15).

Resultados

Tabla 15. Reordenamientos genómicos presentes en 28 pacientes heredados de un progenitor y su interpretación.

Herencia	Nº pacientes	pCNV	Progenitor	Interpretación
Materna (10 casos)	1	dupXp22.2	Sano	Sesgo inactivación cromosoma X
	1	dupXp11.22		
	1	dupXq13.2q21.31		
	2	dupXq28		
	1	del3q29	DI leve y estenosis pulmonar	Patológico en paciente y madre
	1	del15q23	DI leve	
	1	del21q21.2	Sano	¿pCNV en mosaico?*
	1	dup16p11.2		
1	dup16p13.11p12.3			
1	dup16.13.1			
Paterna (7 casos)	1	del 16p11	Sano	Penetrancia incompleta/expression variable
	1	dup 16p12.1		
	1	del16p12.2		
	1	dup22q11.23		
	1	del20q12q13.1		
	1			
PTE	Nº pacientes	Pérdida	Ganancia	Translocación equilibrada en progenitor sano
Madre (6 casos)	1	12pter	13qter	
	1	13q34qter	15q25qter	
	1	21q22.2qter	17p13.2pter	
	1	5pter	10qter	
	1	6pter	3qter	
	1	-	19p13.3**	
Padre (5 casos)	1	-	8q12***	
	1	14q32.33	8q24.24	
	1	4p16.2pter	11p15.5pter	
	1	4pter	21qter	
	1	5pter	9pter	

DI: discapacidad intelectual.

PTE: progenitor portador de translocación equilibrada.

* Estudios no realizados por falta de colaboración de los padres.

**Madre con translocación insercional intracromosómica.

***Padre con translocación recíproca aparentemente equilibrada entre los cromosomas 4 y 8.

Se realizó un análisis estadístico para determinar si la presencia de antecedentes familiares (de anomalías congénitas, de abortos o de discapacidad intelectual) era un indicador de reordenamientos genómicos en pacientes con algún progenitor portador de una translocación aparentemente equilibrada. Este análisis se realizó mediante un test de Chi cuadrado (173 pacientes frente 11 pacientes). Se consideró un nivel de significación estadística $p < 0,05$. No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa.

1.2.3 Tipo de alteración (ganancia/pérdida).

En los 73 pacientes con pCNVs se han contabilizado un total de 91 alteraciones genómicas (55 simples y 18 complejas con 2 pCNVs cada uno). Se trata de 54 deleciones y 37 duplicaciones.

Se analizó en ambos tipos de alteraciones tanto el tamaño de la región alterada como el contenido en genes y en elementos ultraconservados (tabla 16) y se realizó un test de comparación de medias. Aunque el tamaño y el número de genes son mayores en las duplicaciones, y las deleciones en cambio, tienen más elementos ultraconservados, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

Tabla 16. Tamaño, número de genes y de elementos ultraconservados para las CNVs de delección y de duplicación.

		Delecciones	Duplicaciones
Tamaño (pb)	mínimo	948	138.000
	máximo	17.713.780	23.012.000
	promedio	3.786.410	4.610.364
Genes	mínimo	1	1
	máximo	204	269
	promedio	54	82
UCEs	mínimo	0	0
	máximo	15	14
	promedio	1	0,75

Por otro lado, se realizó un análisis estadístico mediante regresión lineal para detectar correlaciones entre las variables clínicas y el tamaño de la región alterada, el contenido en genes o en elementos ultraconservados tanto de las pCNVs de delección como de duplicación. No se observó ninguna correlación entre las variables clínicas y el tamaño o el contenido en genes de la región alterada. Sin embargo, se detectó que las ganancias de UCEs correlacionan con los trastornos del crecimiento. Esto es, la ganancia de elementos ultraconservados se correlaciona con rasgos como el peso bajo, la frente prominente o la microcefalia adquirida. Para llegar a estos resultados se realizó un análisis de regresión lineal univariante entre las variables clínicas y la variable que recoge el número de elementos ultraconservados en pCNVs de delección y de duplicación por separado. En las tablas 17 y 18 que se presentan a continuación se

muestran los resultados del análisis estadístico de correlación entre las variables clínicas y los elementos ultraconservados.

Tabla 17. Resultados del análisis de la regresión lineal univariante para las pCNVs de delección.

Las variables clínicas se han considerado como variable independiente y el número de UCEs contenidos en las pCNVs de delección como la variable dependiente.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		t	Sig.	Intervalo de confianza de 95,0% para B	
	B	Error típ.			Límite inferior	Límite superior
Hipotelorismo	6,620	1,777	3,724	,000	3,050	10,190

a. Variable dependiente: número de UCEs en pCNVs de delección.

Hay que tener en cuenta para el caso de las delecciones, que aunque el resultado de la regresión lineal univariante para el rasgo clínico hipotelorismo es muy significativo, hace referencia a un número escaso de pacientes, de los cuales sólo dos presentan hipotelorismo y CNVs patológicas.

Resultados

Tabla 18. Resultados del análisis de la regresión lineal univariante para las pCNVs de duplicación.

Las variables clínicas se han considerado como variable independiente y el número de UCEs contenidos en las pCNVs de duplicación como la variable dependiente.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		t	Sig.	Intervalo de confianza de 95,0% para B	
	B	Error típ			Límite inferior	Límite superior
Peso bajo recién nacido	2,37	,89	2,65	,012	,56	4,19
Microcefalia adquirida	3,41	1,67	2,03	,06	-2,10	7,03
Fronte prominente	4,188	1,08	3,86	,000	1,99	6,39

a. Variable dependiente: número de UCEs en pCNVs de duplicación.

Las variables clínicas de retraso de crecimiento intrauterino (RCIU), anomalías ecográficas incluido el RCIU y el peso bajo en el recién nacido mostraron el mismo resultado en la regresión lineal univariante, con valores estadísticamente significativos. Dado que las tres variables hacen referencia básicamente al mismo rasgo clínico, sólo se muestra una de ellas. Se utilizó la variable peso bajo en el recién nacido por ser la más objetiva (y medible) de las tres y además porque es un dato que se recoge, de forma rutinaria en prácticamente todos los recién nacidos.

En el caso de las duplicaciones, los resultados de este análisis mostraron una correlación positiva entre las variables clínicas relacionadas con el retraso del crecimiento, tanto prenatal como postnatal, y el número de elementos ultraconservados en el reordenamiento genómico. Se trata de seis pacientes, con retraso del crecimiento, del total de 10 con duplicaciones que presentan elementos ultraconservados. Es importante destacar que en este tipo de análisis, el coeficiente B hace referencia a la diferencia del promedio de estos elementos ultraconservados contenidos en pCNVs

de pacientes con el rasgo clínico y en pCNVs de pacientes que no presentan dicho rasgo.

1.2.4 Localización dentro del cromosoma (intersticial o subtelomérica).

Las 91 pCNVs detectadas en los 73 pacientes, se localizan por igual tanto a nivel intersticial como en regiones subteloméricas. Se trata de 46 subteloméricas y 45 intersticiales. El tamaño y el número de genes es mayor en las subteloméricas, y en cambio, las intersticiales tienen más elementos ultraconservados (tabla 19), siendo las regiones intersticiales de los brazos largos de los cromosomas 2 y 6 las que contienen clústeres de elementos ultraconservados más numerosos (2q31.1q32.1 con 15 UCEs, 2q22.2q23.2 con 14 UCEs y 6q16.1q16.3 con 9 UCEs)

Tabla 19. Tamaño, número de genes y de elementos ultraconservados para las pCNVs de localización subtelomérica e intersticial.

		Subteloméricas	Intersticiales
Tamaño (pb)	mínimo	948	67.987
	máximo	23.012.000	18.662.204
	promedio	4.454.578	3.780.867
Genes	mínimo	1	1
	máximo	269	187
	promedio	80	50
UCEs	mínimo	0	0
	máximo	4	15
	promedio	0,37	1,55

Resultados

1.2.5 Relación entre el tipo de alteración (ganancia/pérdida) y localización dentro del cromosoma (intersticial/subtelomérica).

Se analizó en las deleciones y en las duplicaciones tanto el tamaño de la región alterada como el contenido en genes y elementos ultraconservados en función de su localización (tabla 20) y se realizó un test de comparación de medias.

Al comparar el tamaño medio de las pCNVs se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre el tamaño de las duplicaciones subteloméricas, mucho mayor que el de las intersticiales.

El mayor tamaño de las pCNVs de localización subtelomérica se debe principalmente a las duplicaciones ya que el tamaño medio de las deleciones es muy similar en ambas localizaciones.

Tabla 20. Tamaño, número de genes y de elementos ultraconservados para las pCNVs de deleción y de duplicación en función de su localización subtelomérica o intersticial.

			Subteloméricas	Intersticiales
Deleciones	Tamaño (pb)	mínimo	948	67.987
		máximo	13.500.000	17.713.780
		promedio	3.730.432	3.780.867
	Genes	mínimo	1	2
		máximo	204	137
		promedio	80	43
	UCEs	mínimo	0	0
		máximo	2	15
		promedio	0,26	2

			Subteloméricas	Intersticiales
Duplicaciones	Tamaño (pb)	mínimo	138.000	269.000
		máximo	23.012.000	18.662.204
		promedio	5.484.628	3.688.584
	Genes	mínimo	10	1
		máximo	269	187
		promedio	101	61
	UCEs	mínimo	0	0
		máximo	4	14
		promedio	0,52	1

1.2.6 Número de pCNVs por caso.

Analizando las 91 pCNVs causales detectadas en los 73 pacientes se observó que lo más frecuente es la detección de una única pCNV por paciente:

- 55 casos con 1 pCNV
- 18 casos con 2 pCNVs

En los 18 pacientes en que se encontraron 2 CNVs patológicas se trata en la mayoría de ellos de una pCNV de delección y otra de duplicación:

Resultados

- 14 con delección/duplicación:
 - Nueve de los cuales son consecuencia de la segregación desequilibrada de una translocación parental heredada,
 - otros dos también consecuencia de una translocación desequilibrada pero *de novo*,
 - dos casos son delección/duplicación de regiones contiguas una del cromosoma 4 y otra del 8 con un segmento intermedio conservado. Se trata de regiones con reordenamientos que se han descrito como ocasionados por la presencia de una inversión en uno de los cromosomas parentales,
 - y un paciente que presenta una delección en el brazo largo del cromosoma 6 y una duplicación en el corto del 16.
- dos casos con 2 delecciones, uno de ellos con 2 pCNVs de delección contiguas en el cromosoma 22.
- dos casos con 2 duplicaciones, todas ellas en el cromosoma X.

Respecto a la localización en el cromosoma en estos casos con 2 pCNVs, 15 son subteloméricos, 2 son intersticiales y una paciente presenta en el cromosoma X una duplicación intersticial heredada (Xp22.2) y una delección subtelomérica *de novo* (Xq28) en el otro homólogo.

En uno de los casos con dos delecciones (en el cromosoma 22) y en el caso con dos duplicaciones en Xq28, se da la circunstancia de que las alteraciones se localizan muy próximas, prácticamente contiguas con una pequeña región intermedia conservada, por lo que es probable que estas alteraciones contiguas se hayan producido en un único evento. De los otros 16 casos con 2 pCNVs, al menos 13 se han originado también en un único evento mientras que los tres restantes parecen tener un origen de manera independiente.

1.3 Estudio de las variables clínicas.

1.3.1 Variables demográficas.

1.3.1.a Edad de los pacientes.

La edad de los pacientes en el momento de la aparición de los primeros signos es muy variable, pero en general, excepto para los recién nacidos polimalformados, el tiempo de demora desde la aparición de los primeros signos de discapacidad hasta el momento del diagnóstico genético es de varios años. Desde el punto de vista estadístico, no hay diferencias significativas entre la edad de los pacientes por género tanto para el global de la serie ($p=0,2$) como por grupos de pacientes con resultado normal ($p=0,1$) o alterado ($p=0,7$).

1.3.1.b Género de los pacientes.

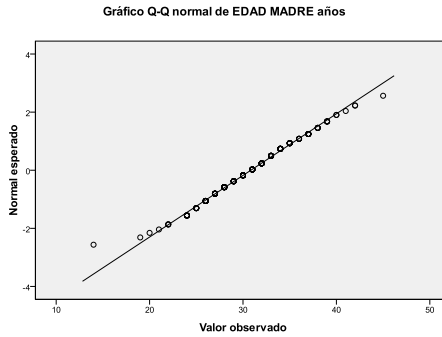
En la muestra estudiada, la proporción de sexos es aproximadamente 1,2 varones: 1 mujer. Esta proporción se mantiene en el grupo con resultado normal. Sin embargo la proporción de CNVs causales es ligeramente superior en los varones (1,3:1). Desde el punto de vista estadístico no hay diferencias significativas entre el género y la detección de alguna pCNV (Chi cuadrado=0,6).

1.3.1.c Edad de los progenitores.

Se realizó el cálculo de las edades de los progenitores a la maternidad y a la paternidad a partir de la fecha de nacimiento de los mismos, excepto para 44 madres y 49 padres de los que no disponíamos de dicho dato. Tras la realización de las pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) se comprobó, tal como se muestra en la figura 22, que tanto las edades de las madres como las de los padres seguían una distribución normal (edad madres $p=0,2$ y edad padres $p=0,2$).

Resultados

A.



B.

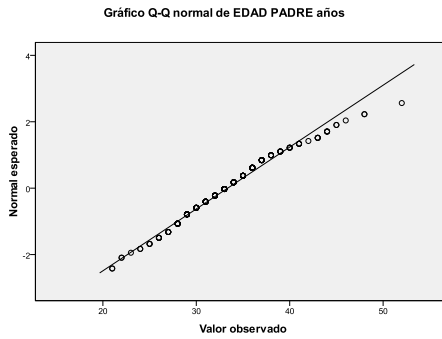


Figura 22. Distribución normal de la edad de los progenitores a la maternidad (A) y a la paternidad (B).

La edad a la maternidad en nuestra serie empezaba a los 14,8 años hasta los 45,4 años. La edad a la paternidad abarcaba desde los 21,4 hasta los 52,2 años. Estas edades de los progenitores corresponden al período de 1987-2009, que son los años en que se sitúan los nacimientos de los 246 pacientes (figuras 23 y 24).

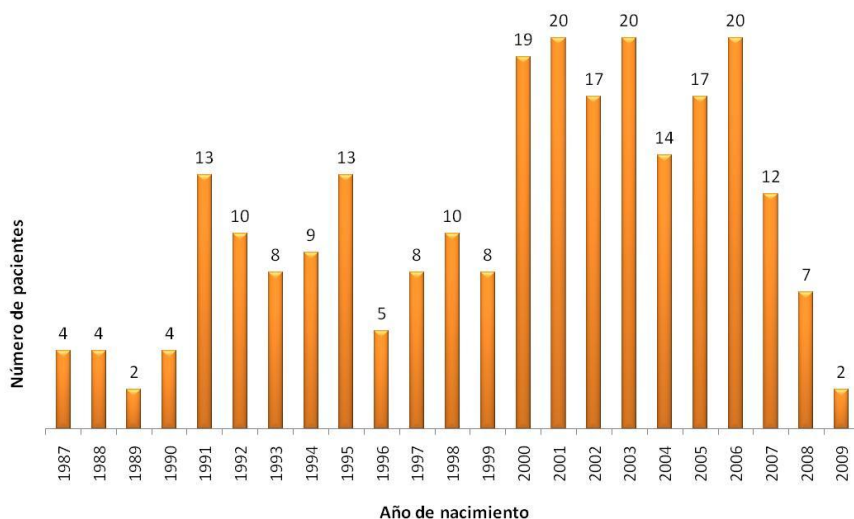


Figura 23. Período de años en el que nacieron los 246 pacientes. Se muestra el año junto al número de pacientes que nacieron ese mismo año.

Edad media de maternidad y paternidad por año de nacimiento del paciente

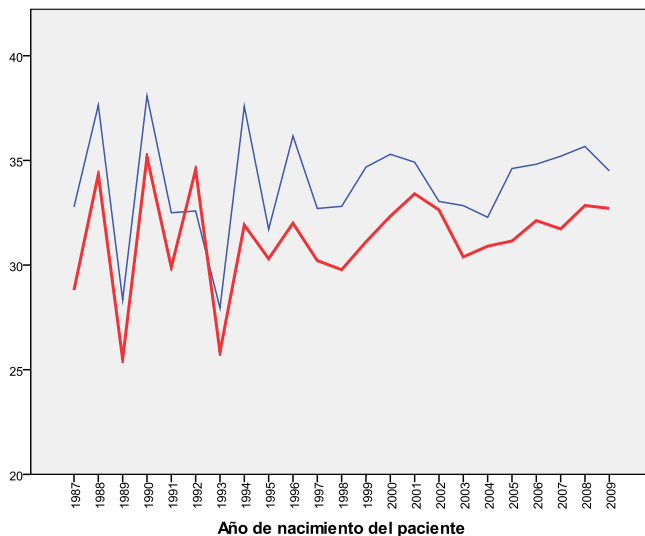


Figura 24. Edad media a la maternidad (en rojo) y a la paternidad (en azul) por año de nacimiento de los pacientes.

Resultados

Para el cálculo de la edad a la maternidad y a la paternidad de la población general, se consultaron los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) (<http://www.ine.es>):

- Edad media a la maternidad en la población general (tabla 21 y figura 25A).

Se consultó la página web mencionada buscando la información desde el año 1987 al año 2009 (período de años en que nacieron los 246 pacientes de la serie). A partir de los nacimientos ocurridos en España para los años 1987 al 2009, se calculó la edad media ponderada a la maternidad en la población general siendo de 30,4 años. Esta edad a la maternidad en España es equiparable a la edad media a la maternidad en la Comunidad Valenciana calculada a partir de los datos sociodemográficos de natalidad del Observatorio de Salud Infantil y Perinatal (OSIP) de la Conselleria de Sanitat Valenciana (www.sp.san.gva.es).

- Edad media a la paternidad en la población general (tabla 21 y figura 25B).

El cálculo de esta edad no fue tan sencillo como en el caso de la maternidad. El INE sólo dispone de la edad media a la paternidad desde el año 1987 a 1994. Por tanto, aunque se realizaron dos peticiones de información al área de atención a usuarios del INE solicitando esta información como petición a medida no se obtuvo respuesta por parte del área de difusión por internet. Por ello, optamos en su momento por calcular desde el año 1995 al año 2009 la edad media a la paternidad winsorizada y recortada. Este cálculo se realizó a partir de los datos obtenidos del INE: apartado demografía y población, movimiento natural de la población, nacimientos ocurridos en España por estado civil de la madre, edad de la madre y grupo de edad del padre. Para el cálculo de la media en cada año no se tuvo en cuenta el grupo de nacimientos en que no constaba

la edad del padre. Para el cálculo de la edad media del padre winsorizada se sustituyó el 1% de los valores extremos (<20 años y >50 años) por los valores contiguos (20 y 50 años) que acotaban dichos extremos. Para el cálculo de la edad media del padre recortada se calculó la media de los datos una vez eliminadas de ambas colas una determinada proporción de valores extremos (1%). Tras el cálculo de ambos tipos de media, optamos por el valor de la edad media winsorizada del padre a la paternidad porque consideramos que era la más representativa. Esta media además mantenía una diferencia constante de tres años respecto a la edad media de la madre a la maternidad para el rango de los años desde 1987 a 2009.

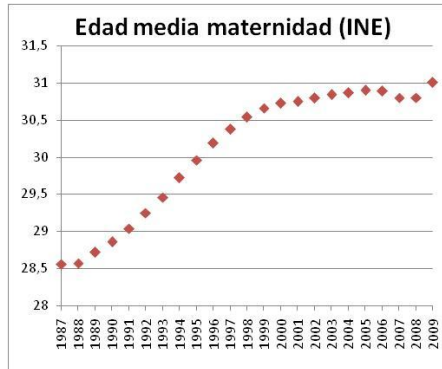
Resultados

Tabla 21. Edad media en años para la maternidad y para la paternidad en la población general para el período comprendido entre 1987 y 2009.

Año	Edad media a la maternidad	Edad media a la paternidad	Diferencia de edades
1987	28,6	31,6	3
1988	28,6	31,7	3,1
1989	28,7	31,8	3,1
1990	28,9	31,9	3
1991	29	32,1	3,1
1992	29,2	32,2	3
1993	29,5	32,5	3
1994	29,7	32,7	3
1995	30	32,7	2,7
1996	30,2	32,6	2,4
1997	30,4	32,8	2,4
1998	30,5	33,1	2,6
1999	30,1	33,2	2,5
2000	30,7	33,4	2,6
2001	30,7	33,4	2,7
2002	30,8	33,5	2,7
2003	30,8	33,6	2,8
2004	30,8	33,7	2,8
2005	30,9	33,8	2,9
2006	30,9	33,9	3
2007	30,8	34	3,2
2008	30,8	34,2	3,4
2009	31	34,4	3,4
Valores medios:	30,1	32,9	2,9

En color gris se muestran los valores obtenidos del cálculo de la media winsorizada para la edad a la paternidad, obtenida a partir de los datos del INE.

A.



B.

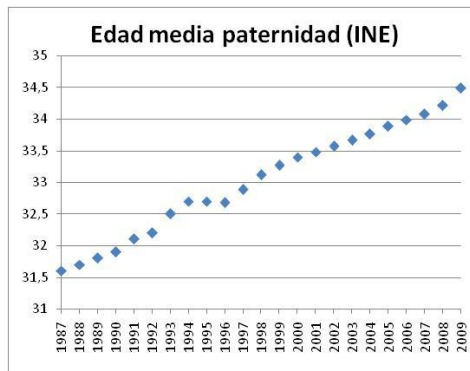


Figura 25. Edad media a la maternidad (A) y a la paternidad (B) en la población general para el período de 1987 al 2009, obtenida a partir de los datos demográficos del INE, directos para la maternidad y calculados para la paternidad.

A continuación se presenta, en la tabla 22, la media de edad a la maternidad y a la paternidad en nuestra serie, tanto para la serie completa como para los grupos con pCNVs, así como la edad media de maternidad y de paternidad ponderada de la población general para los años de nacimiento de los 246 pacientes.

Resultados

Tabla 22. Edad a la maternidad y a la paternidad para la población general, para la serie global de pacientes y por grupos en función de la detección de alguna pCNV.

Edad media en años	Serie global (246 pacientes)	Grupo de pacientes con resultado genético normal (n=173)	Grupo de pacientes con pCNVs (n=73)	Población general (media ponderada)
Maternidad	31,3	31,6	30,8	30,4
Paternidad	33,9	33,9	33,4	33,2

Una vez obtenidas las edades, se realizó una comparación de medias tanto para la edad de la madre como la del padre en los diferentes grupos de casos normales y alterados, grupos en función de la clasificación de las pCNVs (deleciones, duplicaciones, deleciones/duplicaciones, subteloméricas, intersticiales, simples y complejas), así como en las pCNVs agrupadas en función de la herencia (*de novo* o heredadas) y el origen (materno o paterno). No se obtuvo ningún resultado estadísticamente significativo. También se compararon estas medias de nuestra serie con las edades teóricas a la maternidad (edad media ponderada a la maternidad calculada para el período 1987 al 2009) y a la paternidad (edad media ponderada winsorizada a la paternidad calculada para el período de 1987 al 2009). No existen diferencias estadísticamente significativas para la edad a la paternidad en el grupo de pacientes con resultado normal ni alterado. Para la edad a la maternidad tampoco existen diferencias en el grupo de pacientes con resultado alterado respecto a la población general, pero la diferencia de la edad materna a la maternidad en la población general (30,4 años) respecto a la de las madres de los pacientes con resultado genético normal (31,6 años) es estadísticamente significativa ($p=0,004$).

Por otra parte, se calculó la media de la edad de los progenitores en los pacientes con pCNVs *de novo* en dos subgrupos, en función de que la pCNV se encontrara flanqueada o no por duplicaciones segmentarias (tabla 23). No se obtuvo ninguna diferencia estadísticamente significativa al comparar la edad de estos progenitores frente a la edad de los progenitores del resto de grupos de pacientes. Sin embargo, se observó que los padres de los pacientes con pCNVs *de novo* no recurrentes, es decir, no flanqueadas por duplicaciones segmentarias, tienen una edad media a la paternidad superior al resto de grupos.

Tabla 23. Edad media a la maternidad y a la paternidad para las madres y padres de pacientes con pCNVs *de novo*.

Edad media en años	Pacientes con pCNVs <i>de novo</i>	
	pCNVs flanqueadas por DS	pCNVs no flanqueadas por DS
Maternidad	32,7	31,2
Paternidad	32,1	34,1

DS: duplicaciones segmentarias

1.3.2 Variables clínicas en la serie global.

1.3.2.a Características clínicas principales.

Se realizó un estudio descriptivo mediante análisis de frecuencias para determinar los rasgos clínicos más frecuentes en nuestra serie. Dado que se establecieron criterios clínicos de inclusión bien definidos para el estudio, la mayoría de pacientes presentaban “fenotipo cromosómico” con gran cantidad de manifestaciones clínicas (tabla 24).

Resultados

Tabla 24. Criterios clínicos establecidos para la inclusión de los pacientes en el estudio de investigación de trastornos del neurodesarrollo.

Criterios clínicos	Número de pacientes	Porcentaje
Rasgos dismórficos	242	98,4%
Defectos congénitos	230	93,5%
Retraso del desarrollo psicomotor	227	92,3%
Antecedentes familiares:	145	58,9%
• DI	91	37%
• Abortos de repetición	61	24,8%
• Defectos congénitos	51	20,7%

La alteración del desarrollo somático, presente en 177 pacientes (72%), es con diferencia la manifestación clínica más frecuente en el global de la serie (tabla 29). Le siguen por orden de frecuencia: anomalías de la línea media (136 pacientes; 55,3%), anomalías de manos y/o pies (135 pacientes; 54,9%), alteración del tono muscular (125 pacientes; 50,8%), orejas de implantación baja (116 pacientes; 47,2%) y alteración de las fisuras palpebrales (112 pacientes; 45,5%). Cabe destacar que el 47,2% (116 pacientes) presentaron algún tipo de incidencia al nacimiento (pérdida de bienestar fetal, sufrimiento fetal agudo, aguas meconiales).

1.3.2.b Somatometría: percentiles de talla, peso y perímetro cefálico.

Entre las variables clínicas estudiadas referentes a la somatometría de los pacientes, se tuvieron en cuenta la talla, el peso y el perímetro cefálico (PC) tanto al nacimiento, como en el momento de inclusión del paciente en el estudio. Estos datos permitieron además el cálculo de otras variables clínicas como la microcefalia congénita (percentil PC al nacimiento <10) y la microcefalia adquirida (microcefalia actual - microcefalia congénita). A partir de estas variables se calcularon las correspondientes en percentiles. Para el cálculo de estos percentiles en

el RN se tomaron como referencia las tablas de talla, peso y perímetro cefálico utilizadas en el Servicio de Pediatría, Sección de Neonatología del Hospital Universitario y Politécnico “La Fe” (Lubchenco *et al.*, 1963 y Lubchenco *et al.*, 1966). Para el cálculo del percentil de las variables de crecimiento en el momento de la primera consulta del paciente en nuestra Unidad, se tomaron como referencia las tablas del estudio longitudinal del crecimiento, curvas de 0 a 18 años para niñas y niños de M. Hernández y colaboradores publicadas en la Cartilla de Salud Infantil por la Direcció General de Salut Pública de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana (Decreto 147/1986, orden de 22 de marzo de 1988 de la Consellería de Sanitat).

Se realizó un análisis estadístico mediante Chi cuadrado para determinar si alguna de estas variables era un indicador de la presencia de reordenamientos genómicos. Se consideró un nivel de significación estadística $p < 0,01$. Se muestran sólo los resultados con este valor de significación estadística o con un valor de *odds ratio* (OR) elevado (superior a 2).

A continuación, en las tablas 25, 26, 27 y 28 se presentan los resultados del cálculo del valor p y OR tanto para el grupo de 73 pacientes con pCNVs como para los subgrupos obtenidos en las tres clasificaciones, comparados cada uno de ellos frente al grupo de pacientes con resultado normal. Para unificar los valores tanto en el recién nacido como en el momento de inclusión en el estudio del paciente, se ha considerado como alto aquel valor cuyo percentil es superior a 90 y como bajo el valor cuyo percentil es inferior a 10.

Tabla 25. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una *odds ratio* superior a 2 para los pacientes con pCNVs.

Pacientes con pCNVs		
Somatometría	p valor	OR
Talla baja RN	0,014	3,37
Talla alta RN	0,002	4

RN: recién nacido

Resultados

Tabla 26. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una *odds ratio* superior a 2 para los casos con pCNVs de delección pura o de delección y duplicación en el mismo paciente.

Somatometría		Delecciones		Delecciones/ Duplicaciones	
		p valor	OR	p valor	OR
Inclusión	Talla alta	0,002	7.9	0,016	15,8
	Peso alto	0,006	5.75	-	-
RN	Talla alta	-	-	<0,001	14,2
	Peso alto	-	-	0,001	7,6

RN: recién nacido

No se ha observado ningún valor estadísticamente significativo para el grupo de pacientes con duplicaciones puras, por lo que no se reflejan los datos en la tabla.

Tabla 27. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una *odds ratio* superior a 2 para los pacientes con pCNVs de localización subtelomérica o intersticial.

Somatometría		Subteloméricas		Intersticiales	
		p valor	OR	p valor	OR
Inclusión	Talla alta	-	-	<0,001	9,8
	Peso alto	-	-	0,002	7
RN	Talla baja	0,007	5,37	-	-
	Talla alta	<0,001	8,29	-	-

RN: recién nacido

Tabla 28. Variables clínicas referidas a la somatometría con resultado del cálculo del valor p estadísticamente significativo o con una *odds ratio* superior a 2 para los pacientes pCNVs simples o complejas.

Somatometría		Complejas		Simples	
		p valor	OR	p valor	OR
Inclusión	Talla alta	-	-	0,001	7,9
	Peso alto	-	-	0,003	5,5
RN	PC bajo	-	-	0,004	4,2
	Talla alta	<0,001	11,4	-	-
	Peso alto	0,003	5,45	-	-

RN: recién nacido

Llama la atención que es principalmente la talla alta, tanto al nacimiento como en el momento de inclusión, la variable que aparenta asociarse de forma específica más claramente con las alteraciones genómicas.

Resultados

1.4 Estudio de las características genéticas y genómicas de las CNVs identificadas y su relación con variables clínicas.

Se analizaron las características clínicas de los pacientes con pCNVs para identificar las que están más asociadas a la presencia de variantes patológicas de dosis.

Se realizó un análisis estadístico para determinar si alguna de estas variables era un indicador de la presencia de reordenamientos genómicos, mediante un test de Chi cuadrado. Se establecieron tablas de contingencia de 2x2 y análisis mediante la prueba de Fisher en los casos que se requirió. Se consideró un nivel de significación estadística $p < 0,001$.

1.4.1 Asociación de variables clínicas.

Se realizó un primer estudio aproximativo y muy general para observar el grado de asociación o la variación conjunta existente entre las variables clínicas mediante análisis de correlación con SPSS.

Se marcaron las correlaciones significativas, en este caso para coeficientes de correlación significativos al nivel 0,01. Se tuvieron en cuenta tanto relaciones positivas (los valores de las 2 variables varían en el mismo sentido) como negativas (los valores de ambas variables varían en sentidos opuestos).

A través de este estudio de la relación entre variables, observamos que:

Resultados

- Para las variables clínicas incluidas en el apartado de gestación-neonato (figura 26): las semanas de gestación tienen una relación negativa con las anomalías ecográficas y positiva con la puntuación para el APGAR; el RCIU tiene una relación positiva con la variación en la cantidad de líquido amniótico. Para las variables recogidas en el recién nacido se observa que los percentiles del peso, la talla y el perímetro cefálico se correlacionan entre ellos, y éste último con el tono muscular que a su vez mantiene una relación positiva con el déficit de succión y con los trastornos de alimentación.

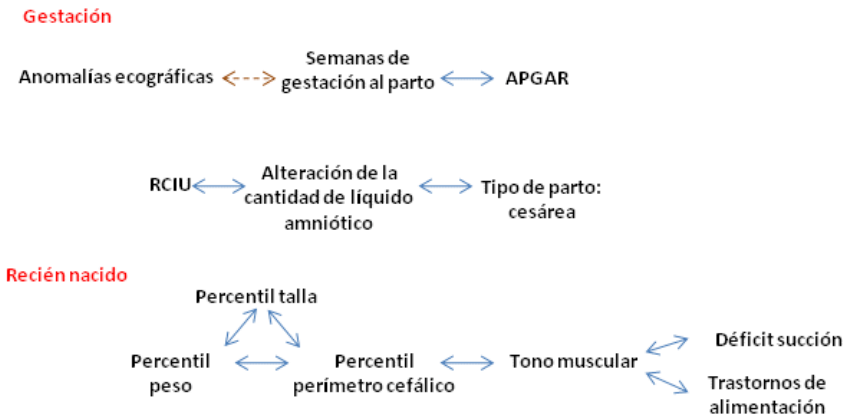


Figura 26. Correlaciones entre las variables clínicas recogidas durante la gestación y la etapa de neonato. Las flechas discontinuas indican que la correlación entre las variables tiene sentido negativo, mientras que si el sentido de la correlación es positivo la flecha es continua.

Resultados

- Para la dismorfia facial (figura 27) existen correlaciones positivas entre otras para: el hipertelorismo y la raíz nasal hundida, la orientación de las fisuras palpebrales, el epicantus y la implantación baja de las orejas; el labio leporino y la fisura palatina tienen una relación positiva, así como el paladar ojival y las alteraciones de la mandíbula con las anomalías en los dientes. También el hipotelorismo y el estrabismo tienen una relación positiva. Sin embargo, existen variables clínicas que no mantienen ninguna relación con otras como son por ejemplo la ptosis palpebral, el coloboma, la sinofridia, la variación en el tamaño de la nariz o la posición rotada de las orejas.

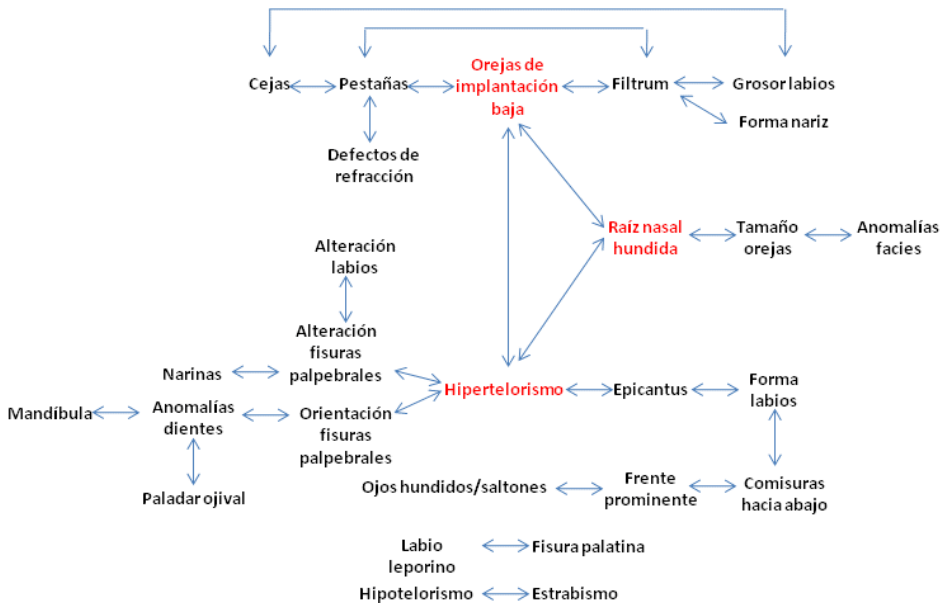


Figura 27. Correlaciones entre las variables clínicas referidas a los rasgos dismórficos faciales.

- Para los defectos congénitos (figura 28) existe una relación positiva entre el percentil para el peso y para la talla. También existe una correlación positiva entre diferentes defectos congénitos cardíacos (CIA, CIV y PDA), y entre éstos y las anomalías de los dedos 2-5. A su vez, las anomalías de los dedos tienen una relación positiva con las anomalías cerebrales.

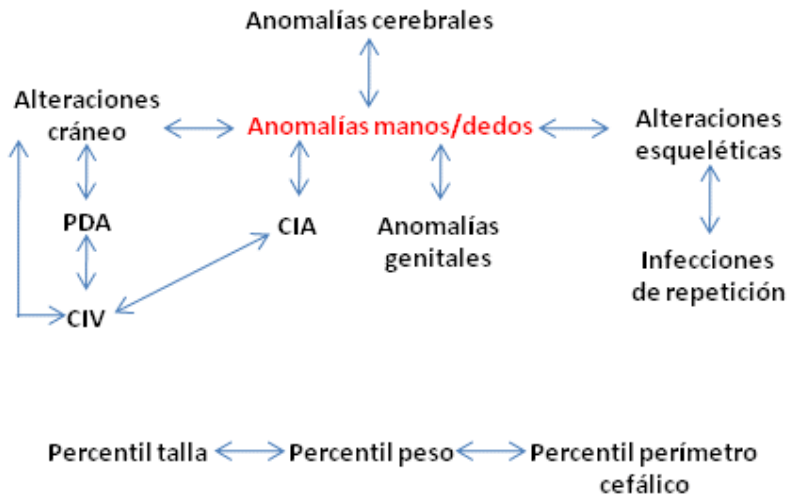
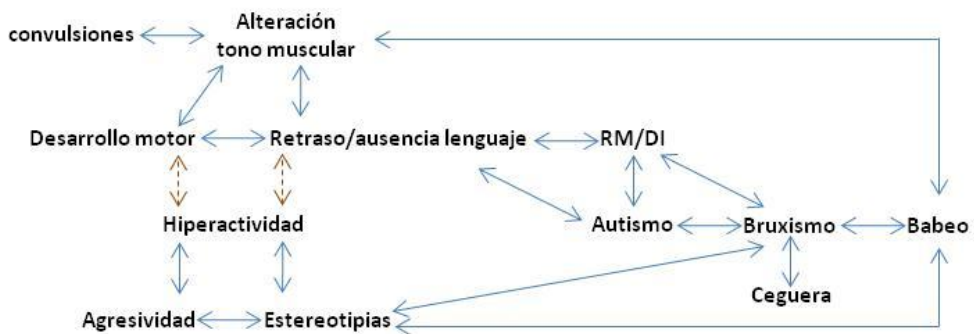


Figura 28. Correlaciones entre las variables clínicas que hacen referencia a los defectos congénitos.

Resultados

- Para las variables clínicas que evalúan los rasgos neurológicos (figura 29), existen relaciones claramente positivas entre el retraso del desarrollo psicomotor/DI con la alteración del tono muscular, convulsiones, autismo, bruxismo. Las anomalías del tono muscular se relacionan de forma positiva con las convulsiones, el babeo, y el retraso del desarrollo motor incluido el del lenguaje. La hiperactividad con la agresividad y las estereotipias. Llama la atención, por otra parte, la asociación negativa entre la hiperactividad con una mayor afectación del lenguaje o del desarrollo motor.



RM/DI: retraso mental/discapacidad intelectual

Figura 29. Correlaciones entre las variables clínicas referidas a los rasgos neurológicos.

Las flechas discontinuas indican que la correlación entre las variables tiene sentido negativo, mientras que si el sentido de la correlación es positivo la flecha es continua.

1.4.2 Comparación de frecuencias.

Se realizó un estudio descriptivo con análisis de frecuencias, que se muestran en la tabla 29, para observar los rasgos clínicos más frecuentes en el total de la serie y en los 73 pacientes con pCNVs. En la figura 30 se muestran las variables clínicas con resultado estadísticamente significativo al comparar el rasgo clínico entre la serie global y el grupo de 73 pacientes con pCNVs.

Tabla 29. Análisis de frecuencias de los rasgos clínicos para la serie global y para los pacientes con pCNVs.

Sólo se presentan los datos correspondientes a aquellas manifestaciones clínicas presentes en más del 10% de pacientes y las inferiores a dicho porcentaje pero clínicamente importantes por su diferencia en ambos grupos. Tanto las manifestaciones clínicas, como los valores p y las *odds ratio* más relevantes (<0,5 ó >2 respectivamente) se muestran en negrita.

Rasgo clínico		246 pacientes		73 pacientes (pCNVs)			
		Nº	%	Nº	%	valor p	OR
Gestación-recién nacido	Oligo/polihidramnios	24	9,8	9	12,3	0,38	1,48
	RCIU	64	26	21	28,8	0,52	1,22
	Hallazgos ecográficos	25	10,2	8	11	0,79	1,29
	Amenaza aborto	25	10,2	11	15,1	0,09	2,01
	Tono muscular	73	29,7	18	24,7	0,26	0,7
	Déficit de succión	77	31,3	18	24,7	0,14	0,63
	Trastornos de alimentación	53	21,5	15	20,5	0,80	0,91
	APGAR (al menos 1 valor<8)	28	11,4	9	12,3	0,37	0,97
Dismorfia facial	Asimetría	28	11,4	10	13,7	0,46	1,3
	Frente prominente	32	13	7	9,6	0,30	0,62
	Cejas	45	18,3	13	17,8	0,89	0,95
	Ojos hundidos/saltones	12	4,9	6	8,2	0,11	2,49
	Hipertelorismo	88	35,8	34	46,6	0,02	1,92
	Fisuras palpebrales	112	45,5	35	47,9	0,62	1,14
	Orientación*	73	29,7	22	30,1	0,91	1,03
	Epicanthus	31	12,6	11	15,1	0,45	1,35
	Raiz nasal	69	28	25	34,2	0,16	1,52
	Hundida	60	24,4	23	31,5	0,09	1,69

Resultados

Orejas de implantación baja	116	47,2	42	57,5	0,03	1,81
Orejas dismórficas	83	33,7	24	32,9	0,85	0,94
Orejas rotadas	26	10,6	9	12,3	0,56	1,29
Alteración tamaño de orejas	49	19,9	19	26	0,12	1,67
Nariz	42	17,1	11	15,1	0,59	0,81
Narinas	37	15	9	12,3	0,44	0,72
Philtrum	70	28,5	18	24,7	0,39	0,76
Labios	98	39,8	30	41,1	0,79	1,07
V invertida	54	22	14	19,2	0,49	0,78
Grosor labios	48	19,5	19	26	0,09	1,74
Mandíbula	108	43,9	34	46,6	0,58	1,16
Paladar ojival	52	21,1	11	15,1	0,13	0,57
Implantación dentaria	43	17,5	18	24,7	0,05	1,93
Facies anómala	47	19,1	17	23,3	0,27	1,44

Rasgo clínico	246 pacientes		73 pacientes (pCNVs)			
	Nº	%	Nº	%	valor p	OR
Trastornos crecimiento	177	72	57	78,1	0,16	1,57
^^Talla baja	65	26,4	17	23,3	0,2	0,6
^^Talla alta	10	4,1	6	8,2	0,04	3,75
^^Peso bajo	58	23,6	14	19,2	0,04	0,4
^^Peso alto	13	5,3	8	11	0,02	3,73
Línea media	136	55,3	37	50,7	0,35	0,76
Perímetro cefálico alterado	91	37	27	37	0,99	0,99
Microcefalia	71	28,9	21	28,8	0,98	0,99
Forma cráneo	41	16,7	13	17,8	0,75	1,12
Cerebrales (RMN)	87	35,4	29	39,7	0,35	1,30
Pelo	52	21,1	13	17,8	0,41	0,74
Implantación baja	22	8,9	9	12,3	0,23	1,73
Manos/pies	135	54,9	46	63	0,09	1,60
Manos	125	50,8	44	60,3	0,05	1,72
Dedos	73	29,7	29	39,7	0,02	1,93
Pulgares	22	8,9	8	11	0,47	1,39
Dedos 2-5	59	24	24	32,9	0,03	1,93
Cardíacos	58	23,6	17	23,3	0,94	0,97
CIA	27	11	9	12,3	0,66	1,21
CIV	11	4,5	6	8,2	0,06	3,01
Renales	33	13,4	9	12,3	0,74	0,87

Resultados

	Genitales ⁺	37	15	20	27,4	<0,001	3,46
	Varón	29	21,3	15	35,7	0,006	3,17
	Mujer	8	7,3	5	16,1	0,025	4,87
	Esqueléticos	77	31,3	21	28,8	0,58	0,84
	Columna vertebral	31	12,6	10	13,7	0,74	1,14
	Miembros	32	13	10	13,7	0,83	1,08
	Piel	45	18,3	14	19,2	0,81	1,08
Rasgos neurológicos	Tono muscular	125	50,8	33	45,2	0,25	0,72
	Epilepsia	56	22,8	18	24,7	0,64	1,16
	Rasgos autistas	75	30,5	20	27,4	0,28	0,71
	Hiperactividad	64	26	20	27,4	0,75	1,1
	Agresividad	28	11,4	14	19,2	0,01	2,69
	Estereotipias	69	28	20	27,4	0,88	0,95
	Trastorno conducta/comportamiento	63	25,6	17	23,3	0,59	0,83
	Hipoacusia	37	15	14	19,2	0,24	1,54

*Fisuras palpebrales hacia arriba p=0,051.

*Fisuras palpebrales hacia abajo p=0,267.

^^Parámetros valorados en el momento de inclusión del paciente en el estudio. Se consideran en percentiles bajos los valores inferiores al 10% y altos los que superan el 90%.

+Hay que tener en consideración que para la variable anomalías genitales se ha realizado el análisis de frecuencias sobre el número de varones y de mujeres, tanto para el global de la serie (varones: 136 y mujeres: 110) como para los pacientes con pCNVs (varones: 42 y mujeres: 31)

Resultados

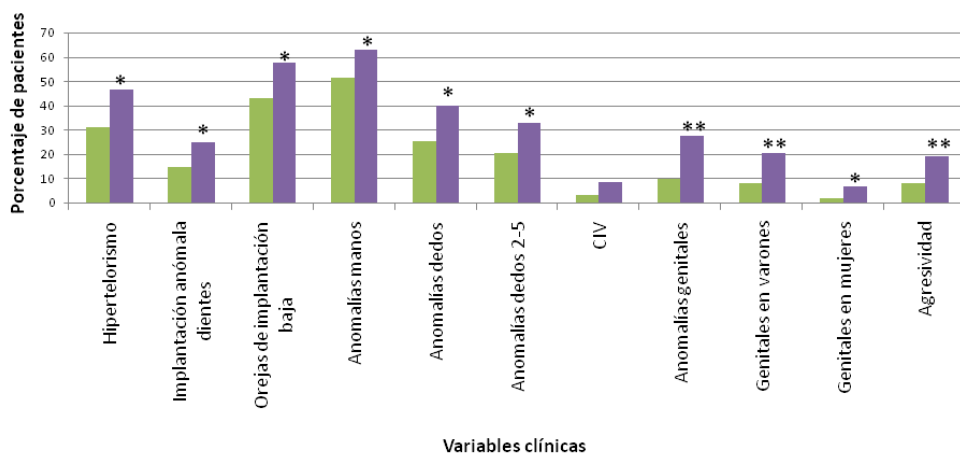


Figura 30. Gráfico de barras agrupadas que muestra las variables clínicas con significación estadística.

En color verde se muestran los casos con resultado normal y en color morado los casos con resultado alterado. Sólo se representan las variables clínicas con mayor significación estadística (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) y la CIV que roza la significatividad.

Este mismo estudio descriptivo con análisis de frecuencias se realizó para observar cuales eran los rasgos clínicos más frecuentes en los diferentes grupos de pCNVs de las tres clasificaciones (tablas 30, 31 y 32). En las tablas siguientes sólo se muestran las anomalías más frecuentes agrupadas o algún detalle significativo que merezca la pena resaltar por su valor p o por el valor de la *odds ratio*. Es llamativo que las anomalías o características clínicas que se encuentran con mayor frecuencia en los casos con pCNVs son distintas para cada tipo de alteración, siendo los únicos rasgos comunes presentes en las tres clasificaciones la implantación baja de las orejas y las anomalías genitales.

Clasificación I: tipo de desequilibrio genómico.

Tabla 30. Rasgos clínicos más significativos por su valor p o por la *odds ratio* para el grupo de las deleciones puras, duplicaciones puras y deleciones con duplicación.

	Deleciones (n=37)				Duplicaciones (n=21)				Deleciones/Duplicaciones (n=15)			
	Nº	%	p	OR	Nº	%	p	OR	Nº	%	p	OR
A aborto	9	24,3	0,004	3,65	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	10	66,6	0,005	4,4
Ojos hun/salt	-	-	-	-	-	-	-	-	3	20	0,004	6,95
Ojos saltones	-	-	-	-	-	-	-	-	2	13,3	0,007	8,71
Orejas imp baja	25	67,6	0,006	2,78	-	-	-	-	-	-	-	-
Alt imp dientes	12	32,4	0,009	2,84	-	-	-	-	-	-	-	-
An dedos 2-5	-	-	-	-	10	47,6	0,005	3,58	-	-	-	-
An genitales	-	-	-	-	-	-	-	-	5	33,3	0,007	4,58
An endocrinas	-	-	-	-	4	19	0,005	5,58	-	-	-	-

A aborto: amenaza de aborto; ojos hun/salt: ojos hundidos o saltones; orejas imp baja: orejas de implantación baja; alt imp dientes: alteración en la implantación de los dientes; an: anomalías.

Cabe destacar además otros detalles clínicos, poco frecuentes y que por tanto no están reflejados en las tablas, como que:

- En el grupo de pacientes con pCNVs de deleción cuatro de ellos presentaron polihidramnios (10,8% p=0,007) y nueve facies tosca (24,3% p=0,007).
- En el grupo de pacientes con pCNVs de duplicación se detectaron otros rasgos clínicos con un valor estadísticamente significativo respecto al grupo de pacientes con resultado normal: aracnodactilia (seis pacientes, 28,57%, p<0,001) y labio superior fino (cinco pacientes, 23,8%, p=0,002). Merece la pena resaltar que seis pacientes presentaron anomalías de los ventrículos cerebrales (p=0,017) y de los cuatro pacientes con

Resultados

alteraciones endocrinas, tres de ellos tenían hipotiroidismo ($p=0,004$).

- En el grupo de pacientes con pCNVs de delección y de duplicación ocho de ellos presentaron anomalías cerebrales (RMN), siendo la más frecuente la anomalía de los ventrículos cerebrales, presente en cinco pacientes ($p=0,003$).

Clasificación II: localización cromosómica de la región implicada.

Tabla 31. Rasgos clínicos más significativos por su valor p o por la *odds ratio* para el grupo de pCNVs de localización intersticial o subtelomérica.

	Intersticiales (n=43)				Subteloméricas (n=30)			
	Nº	%	p	OR	Nº	%	p	OR
Orejas implantación baja	28	65,1	0,009	2,49	-	-	-	-
Implantación anómala dientes	14	32,6	0,006	2,85	-	-	-	-
Genitales	11	25,6	0,006	3,15	9	30	0,002	3,93
Agresividad	-	-	-	-	9	30	<0,001	4,87

En esta segunda clasificación, además de los rasgos clínicos representados en la tabla, es importante remarcar que de los nueve pacientes con pCNVs subteloméricas que presentaban agresividad, en seis de ellos se manifestaba como agresividad hacia los demás ($p=0,002$).

Clasificación III: según el número de regiones implicadas.**Tabla 32.** Rasgos clínicos más significativos por su valor p o por la *odds ratio* para el grupo de pCNVs simples o complejas.

	Simples (n=55)				Complejas (n=18)			
	Nº	%	p	OR	Nº	%	p	OR
Orejas implantación baja	36	65,5	0,003	2,53	-	-	-	-
Dedos	-	-	-	-	10	55,6	0,007	3,66
Pulgares	-	-	-	-	5	27,8	0,008	4,36
Genitales	15	27,3	0,001	3,44	-	-	-	-

Además, en esta tercera clasificación dentro de las alteraciones complejas, es importante destacar que de los 18 pacientes con alteración genética, diez presentaban algún tipo de anomalía cerebral, siendo la más frecuente la alteración de los ventrículos cerebrales presente en cinco pacientes ($p=0,006$).

1.4.3 Análisis de variables cuantitativas. Regresión lineal.

Se realizó un estudio de regresión lineal con el programa SPSS para evaluar la existencia de algún tipo de relación entre diversas variables cuantitativas: número de rasgos dismórficos y número de sistemas afectados frente a variables genéticas que incluían el tamaño, el número de genes y el número de elementos ultraconservados en las pCNVs.

Resultados

Rasgos dismórficos.

Para el cálculo del número de rasgos dismórficos se sumaron para cada paciente las variables clínicas de los 13 apartados de rasgos dismórficos descritos en material y métodos, que hacen referencia a 41 rasgos faciales diferentes. Se obtuvieron los siguientes estadísticos:

- Pacientes con resultado normal: media 5,7; mediana 5; mínimo 0 y máximo 14.
- Pacientes con pCNVs: media y mediana 6; mínimo 1 y máximo 12.

Sistemas afectados.

Para el cálculo del número de sistemas afectados se sumaron para cada paciente las variables clínicas referentes a los 10 apartados de defectos congénitos descritos en material y métodos. Se obtuvieron los siguientes estadísticos:

- Pacientes con resultado normal: media 3,5; mediana 4; mínimo 0 y máximo 9.
- Pacientes con pCNVs: media 3,9; mediana 4; mínimo 1 y máximo 8.

Tamaño, genes y elementos ultraconservados.

Se calculó para las 91 pCNVs el tamaño promedio: 4.121.424pb (948pb a 23.012.000pb), el número medio de genes: 65 (1 a 269) y el promedio de UCEs: 0,95 (0 a 15).

El análisis de la regresión lineal entre estas variables puso de manifiesto que el número de rasgos dismórficos correlaciona significativamente con en el número de genes para las alteraciones de localización subtelomérica ($p=0,04$). Dentro de este grupo de pCNVs subteloméricas, para las duplicaciones puras, el número de sistemas afectados correlaciona significativamente con el tamaño y el número de UCEs con unos valores p de 0,025 y 0,01 respectivamente. Para el resto de variables no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa.

1.4.4 Cálculo de la puntuación clínica según de Vries.

Se calculó la puntuación propuesta por de Vries en 2001 para los pacientes con reordenamientos subteloméricos submicroscópicos, en los 246 casos que forman la serie. Este cálculo se realizó para la serie completa y posteriormente se comparó la puntuación obtenida en los distintos grupos de pacientes en función del resultado (normal o pCNVs claramente patológicas o consideradas de penetrancia incompleta). *A priori*, no se observaron grandes diferencias de puntuación entre los grupos de pacientes (tabla 33).

Tabla 33. Puntuación media, mediana, moda, mínimo y máximo según la publicación propuesta por de Vries en 2001 para los pacientes de la serie en función del resultado genético obtenido.

	Serie completa (n=246)	Pacientes con resultado normal (n=173)	Pacientes con pCNVs (n=73)	Pacientes con pCNVs sin los casos pipCNVs (n=65)
Media	3,57	3,38	4,01	4
Mediana	3	3	4	4
Moda	3	3	3	3
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	8	8	8	8

En las figuras 31 y 32 que se muestran a continuación, se presenta la distribución de los pacientes y el cálculo de la puntuación según proponen de Vries y colaboradores.

Resultados

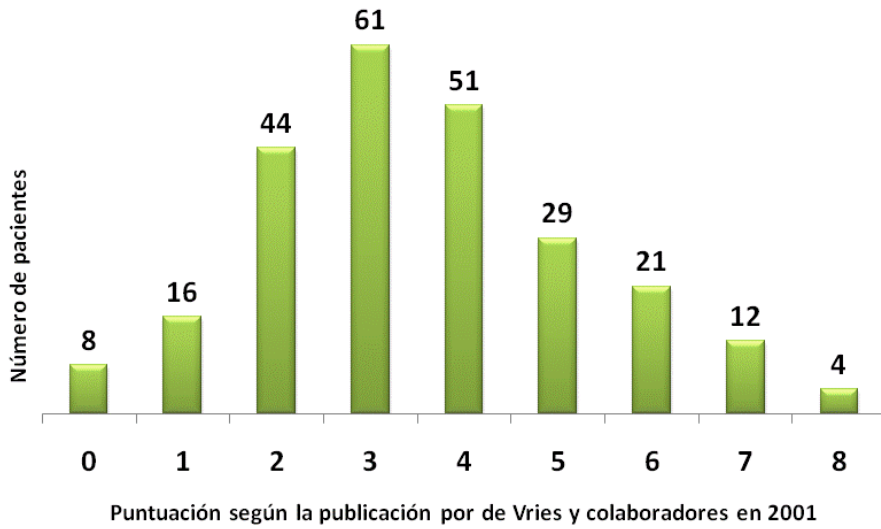


Figura 31. Distribución de los 246 pacientes según la puntuación propuesta por de Vries en 2001.

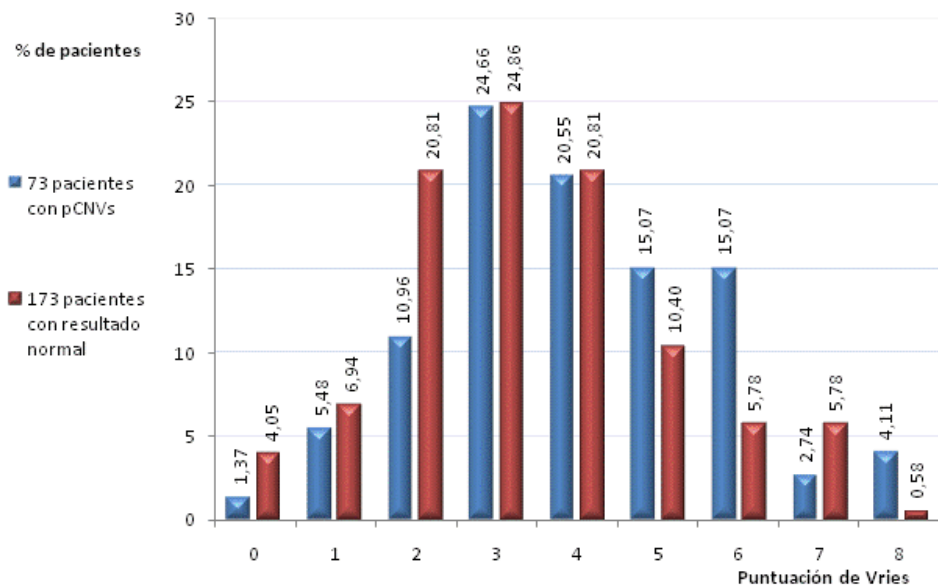


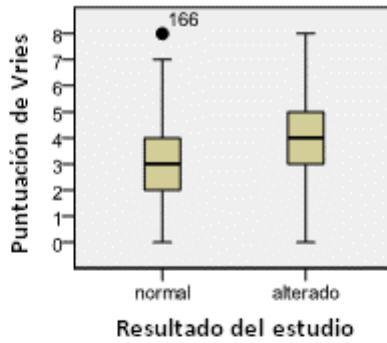
Figura 32. Cálculo de la puntuación de Vries para los pacientes con pCNVs y para el grupo con resultado normal.

Se realizó el análisis de la puntuación en los diferentes grupos de las 3 clasificaciones de las pCNVs. Se calculó la sensibilidad, especificidad y Chi-cuadrado para los diferentes puntos de corte (≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 , ≥ 7 y ≥ 8). Se confirmó que la diferencia fue mayor en las pCNVs intersticiales a partir de un punto de corte ≥ 3 ($p=0,044$), y conforme el punto de corte es mayor, la sensibilidad disminuye y aumenta la especificidad. Sólo se obtuvo un resultado estadísticamente significativo para las pCNVs intersticiales (de Vries ≥ 3 $p=0,04$).

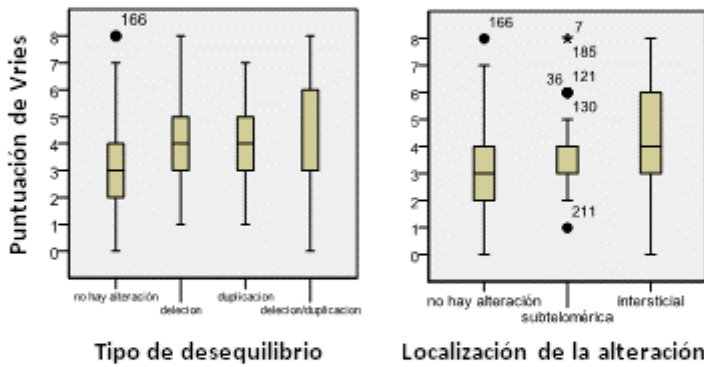
Así mismo, al tratarse de una variable ordinal, se analizó la puntuación de Vries comparando pacientes con resultado normal frente a pacientes con pCNVs mediante análisis de regresión logística. El análisis estadístico mostró que este último grupo presenta una puntuación significativamente más elevada (regresión logística binaria $p=0,01$). Este mismo cálculo se realizó comparando resultado normal frente a alteraciones subteloméricas y frente a alteraciones intersticiales. La regresión logística binaria sólo mostró un resultado estadísticamente significativo para las alteraciones de localización intersticial (subteloméricas $p=0,217$; intersticiales $p=0,01$). No obstante, existe un gran solapamiento entre ambos grupos de pacientes, de forma que la posible utilidad clínica de esta puntuación para diferenciar pacientes con y sin reordenamientos genómicos es mínima en nuestra serie (figura 32). La figura 33 muestra la representación de la puntuación en función del resultado obtenido.

Resultados

A



B



C

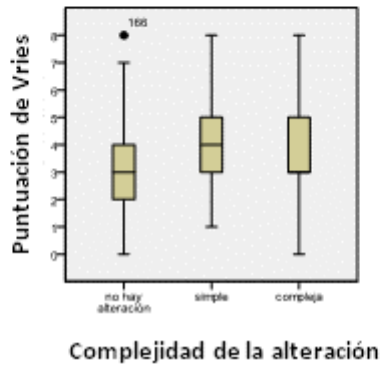


Figura 33. Box-plot con la representación de la puntuación de Vries en los pacientes en función del resultado.

A representa el resultado normal o presencia de pCNVs. **B** y **C** muestran los resultados según las tres clasificaciones utilizadas.

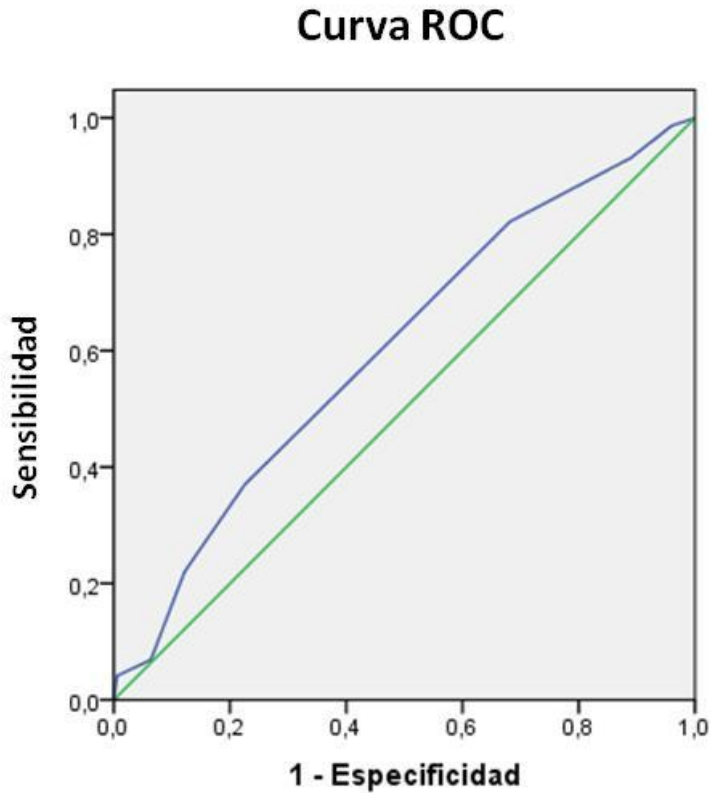


Figura 34. Curva ROC que muestra la sensibilidad y la especificidad para nuestra serie según la puntuación propuesta por de Vries. Área bajo la curva 0,603.

Se cálculo en nuestra serie la sensibilidad y especificidad según el modelo de puntuación propuesto por de Vries en 2001 que situaba el punto de corte en ≥ 3 . El resultado evidenció una sensibilidad del 57% y una especificidad del 56%. La representación con la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se muestra en la figura 34.

Resultados

1.4.5 Desarrollo de un nuevo modelo predictivo de reordenamientos genómicos mediante regresión logística.

Se realizó un estudio de regresión logística binaria con el programa SPSS para evaluar las variables clínicas que se asocian con mayor frecuencia a las pCNVs y escoger aquellas que pudieran orientar cuándo se puede esperar con mayor probabilidad obtener un resultado genético normal o alterado, y así poder asignar una puntuación clínica a cada nuevo paciente en función de estas variables.

En el modelo de partida para realizar la regresión logística, se incluyeron los rasgos clínicos en función de dos criterios de selección según los resultados ya presentados (ver comparación de frecuencias tablas de la 29 a la 32). Los rasgos se escogieron bien por tener un valor $p < 0,01$, o bien, por presentar una *odds ratio* > 2 tanto en el global de los casos patológicos como en los diferentes subgrupos en función de las 3 clasificaciones establecidas (ver apartado 1.1.2 de los resultados).

Se utilizó la regresión logística binaria con método atrás condicional y con punto de corte de 0.3.

Los resultados de la regresión logística se muestran en la tabla 34.

Al mismo tiempo, se valoraron posibles interacciones como el género y la edad de los pacientes (segmentación del archivo respecto a la mediana de la edad: 62 meses). No se observaron diferencias al realizar los cálculos de la regresión logística en función de estos parámetros, aunque el porcentaje de casos pronosticados normales y alterados era ligeramente mayor en el grupo de varones respecto al de mujeres y también en el grupo de pacientes con edad inferior a 62 meses respecto a los pacientes de mayor edad.

Tabla 34. Resultados de la regresión logística en el programa SPSS con las variables clínicas con resultado significativo.

Variables en la ecuación

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
								Inferior	Superior
Paso 1 ^a	Hipertonía RN	1,93	,91	4,48	1	,034	6,89	1,15	41,12
	Hipertelorismo	,87	,33	6,91	1	,009	2,39	1,25	4,6
	Alteración implantación dientes	,93	,40	5,43	1	,020	2,54	1,16	5,57
	Dedos afilados	2,22	1,14	3,79	1	,051	9,26	,99	86,95
	Anomalías genitales	1,37	,41	11,09	1	,001	3,93	1,76	8,79
	CIV	1,71	,66	6,62	1	,010	5,55	1,50	20,49
	Agresividad	1,15	,46	6,19	1	,013	3,17	1,28	7,87
	Constante	- 2,12	,28	56,19	1	,000	,12		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: hipertonía en el recién nacido (RN), hipertelorismo, alteración en la implantación de los dientes, dedos afilados, anomalías genitales, CIV (comunicación interventricular), agresividad.

El análisis de la regresión logística entre las variables clínicas permitió realizar una selección de variables clínicas predictoras que incluían rasgos clínicos como:

- Período neonatal: **hipertonía** en el recién nacido.
- Rasgos dismórficos faciales: **hipertelorismo** e **implantación anómala de los dientes**.
- Defectos congénitos: **comunicación cardíaca interventricular, dedos afilados y anomalías genitales**.
- Rasgos neurológicos: **agresividad**.

Resultados

Posteriormente, a esta preselección de siete variables, se añadieron otros cuatro rasgos clínicos en función de diversos criterios:

- **Implantación baja de las orejas.** Este rasgo clínico está presente en la mitad de los pacientes de la serie y casi en un 60% de los casos en que se ha detectado alguna CNV patológica. Se trata por tanto, de un rasgo dismórfico muy frecuente y asociado a numerosos síndromes y patologías incluidas en el llamado “fenotipo cromosómico”. Aproximadamente el 18% de los síndromes dismórficos presentes en las bases de datos *London Medical Databases* que cursan con retraso del desarrollo tienen implantación baja de las orejas, siendo un grupo muy numeroso el que corresponde a las deleciones y duplicaciones cromosómicas. Por todo ello, consideramos que aunque no tenga un valor estadísticamente significativo en el análisis de la regresión logística, debe incluirse como una variable más en el modelo predictivo propuesto.
- **Cardiopatía congénita y anomalías de los dedos.** Se trata de manifestaciones clínicas más amplias y que abarcan a la comunicación interventricular y a los dedos afilados, respectivamente, ambas con resultados estadísticamente significativos en la regresión logística. Se decidió mantener y otorgar mayor valor a la comunicación interventricular y a los dedos afilados por los resultados obtenidos tras el análisis estadístico (coeficientes B elevados). Pero, dado que en nuestra serie de pacientes se ha realizado una historia clínica exhaustiva que ha permitido anotar muy al detalle algunas variables clínicas, que quizá no es posible recoger en una consulta más rutinaria, se decidió incluir también estas dos variables más generales.
- **Retraso del desarrollo.** Se decidió valorar la incorporación al modelo predictivo de la discapacidad intelectual ya que es una de las principales indicaciones para la realización de *array-CGH*. Sin embargo, la DI no se puede valorar en nuestra serie como variable predictora, ya que al tratarse de un criterio de inclusión, está presente en la mayoría de los pacientes.

Además, hay que tener en cuenta que en muchas ocasiones, la discapacidad es difícil de valorar, sobre todo, en niños menores de 5 años. Por este motivo se decidió incluir en el modelo predictivo el retraso del desarrollo, ya que se puede objetivar mejor y de forma más precoz en los niños, sobre todo los hitos del desarrollo que afectan al área motora y del lenguaje. Hay que tener en cuenta, a favor de esta variable, que valora al niño en 5 áreas: a nivel motor grueso, la psicomotricidad fina, el área del lenguaje, a nivel cognitivo y el área social. Por tanto, el retraso del desarrollo puede utilizarse para evaluar precozmente tanto la discapacidad como el trastorno del espectro autista. El único inconveniente es que no puede utilizarse en recién nacidos.

Con todo lo anteriormente expuesto, el modelo predictivo que proponemos estaría formado por un conjunto de manifestaciones clínicas que engloban 11 variables, a cada una de las cuales se le asigna un punto, por tanto, la puntuación máxima es de 11 puntos.

Resultados

Tabla 35. Variables clínicas que forman el modelo predictivo propuesto para orientar cuándo se espera obtener un resultado normal o alterado mediante el estudio con *arrays*.

Variables clínicas		Puntuación	Puntuación por apartado
Rasgos dismórficos	Hipertelorismo	1	3
	Orejas de implantación baja	1	
	Implantación anómala de los dientes	1	
Defectos congénitos	Cardiopatía	1	5
	Si la cardiopatía es una CIV o presenta además una CIV, sumar 1 punto	1	
	Anomalías dedos	1	
	Si la anomalía son los dedos afilados o además los presenta, sumar 1 punto	1	
	Anomalías genitales	1	
Rasgos neurológicos	Hipertensión en el recién nacido	1	3
	Retraso del desarrollo	1	
	Agresividad	1	

1.4.5.a Aplicación del modelo a la serie global de pacientes.

Se aplicó el modelo clínico propuesto a la serie del presente trabajo formada por 246 pacientes. A continuación se presentan los valores de la puntuación obtenida según las manifestaciones clínicas que presenten los pacientes (tabla 36). Se muestra la puntuación media, la mediana, la moda, el mínimo y el máximo de la serie completa y en función del resultado genético: pacientes con resultado normal, con CNVs patológicas, y en la última columna el grupo de casos con pCNVs pero excluyendo los ocho pacientes que presentan CNVs consideradas de penetrancia incompleta.

Tabla 36. Puntuación media, mediana, moda, mínimo y máximo según el modelo con la puntuación clínica propuesta para los pacientes de la serie en función del resultado genético obtenido.

	Serie completa (n=246)	Pacientes con resultado normal (n=173)	Pacientes con pCNVs (n=73)	Pacientes con pCNVs sin los casos pipCNVs (n=65)
Media	2,8	2,5	3,5	3,6
Mediana	3	2	3	4
Moda	3	2	3	3
Mínimo	0	0	1	1
Máximo	7	6	7	7

Al comparar estos resultados con los obtenidos al aplicar el modelo propuesto por de Vries en 2001, que se muestra en la tabla 33, se observa que aunque los valores en el grupo de pacientes con pCNVs son similares con ambos modelos, la diferencia entre este grupo de pacientes y el grupo con resultado normal es mayor con el modelo que proponemos.

Se estableció, en función del diagrama de cajas que se muestra a continuación (figura 35), que el punto de corte de la puntuación para alcanzar una sensibilidad superior al 75% fuera de 3 puntos; con lo cual sería recomendable realizar el estudio de *array*-CGH a los pacientes que al aplicar el modelo predictivo con las variables clínicas descritas en la tabla 35 tuvieran una puntuación igual o superior a 3 puntos. Establecido por tanto este punto, se realizó el cálculo de la sensibilidad y la especificidad para dicho modelo en la serie de pacientes. La sensibilidad de este modelo, teniendo en cuenta los 73 pacientes en los que se detectó alguna alteración genética, era del 75,3% mientras que la especificidad se situaba en torno al 51%.

Resultados

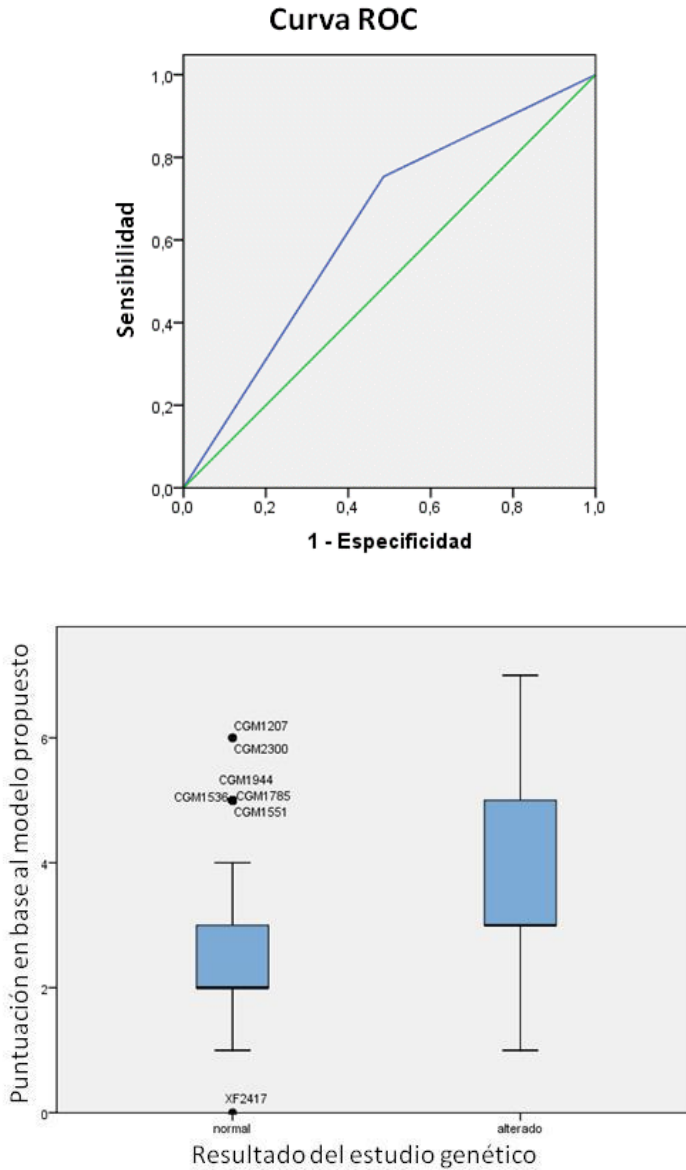


Figura 35. Curva ROC y diagrama de cajas que representa la puntuación en los pacientes de la serie según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo en función del resultado obtenido tras el estudio genético.

Área bajo la curva 0,634; $p=0,001$; IC 95%: 0,560-0,708.

Dado que las CNVs de penetrancia incompleta se consideran patológicas y asociadas a expresividad variable, el abanico de las manifestaciones clínicas, en caso de estar presentes, puede ser muy amplio (tipo y severidad). Teniendo en cuenta esta peculiaridad de las deleciones y duplicaciones en determinadas regiones cromosómicas, se realizó el mismo cálculo, pero en este caso excluyendo los ocho pacientes con pipCNVs del análisis (figura 36). Se trata de ocho pacientes, de los cuales siete presentan deleciones o duplicaciones en 16p heredadas de un progenitor sano (CGM2182, CGM208, CGM2822, XF1338, XF2184, CGM1696, CGM2952) y un paciente (XF1526) con una deleción en 20q12q13.1 heredada del padre, el cual presenta una discapacidad intelectual leve. La sensibilidad de este modelo al excluir los ocho pacientes con las CNVs consideradas patológicas de penetrancia incompleta, aumentaba hasta el 77% mientras que la especificidad se mantenía en torno al mismo valor.

Resultados

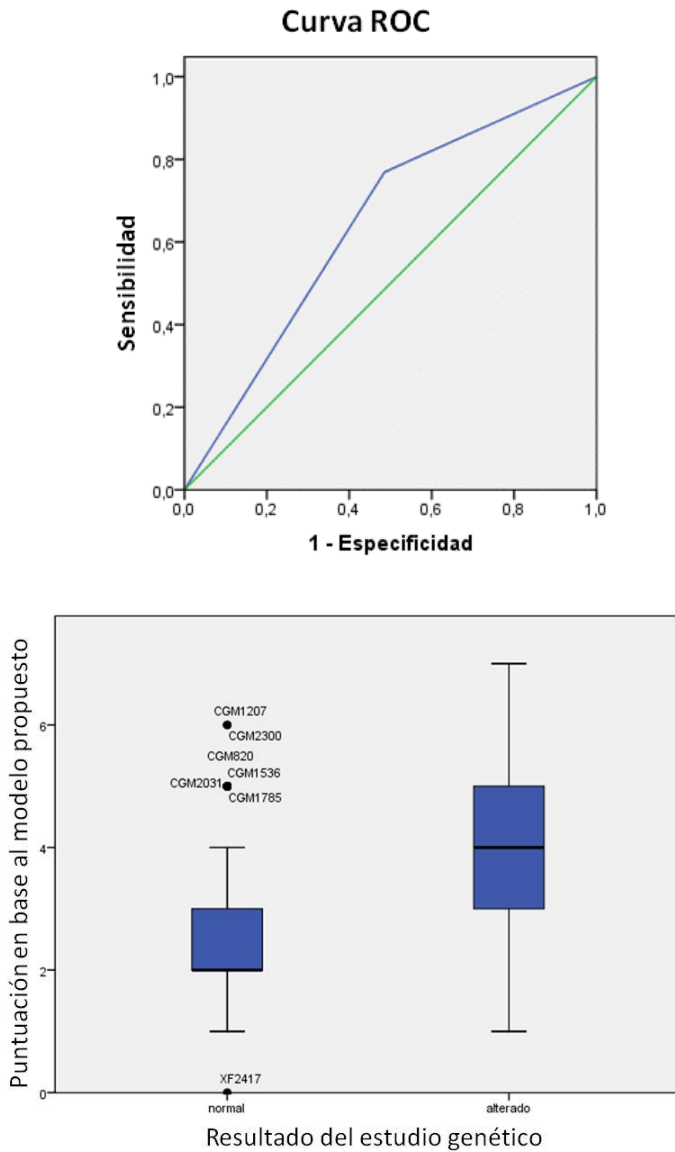


Figura 36. Curva ROC y diagrama de cajas que representa la puntuación en los pacientes de la serie, sin los ocho casos considerados patológicos de penetrancia incompleta, según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo en función del resultado obtenido tras el estudio genético. Área bajo la curva 0,642; $p=0,001$; IC 95%: 0,566-0,718.

1.4.5.b Serie de seguimiento.

Se evaluó este modelo predictivo con las variables clínicas propuestas en una serie de seguimiento independiente.

La serie de seguimiento estaba formada por 101 pacientes la mayoría en edad pediátrica. Estos pacientes fueron remitidos a la Unidad de Genética del Hospital Universitari i Politènic “La Fe” para su valoración e inclusión en el proyecto de investigación (PI 2009/0093) que lleva por título “**Búsqueda e identificación de nuevas causas genéticas y epigenéticas de trastornos del espectro autista: diseño y aplicación de un array dirigido de alta resolución, con elementos clave de la maquinaria epigenética**” concedido por la Fundación Ramón Areces en su XV Concurso Nacional para la adjudicación de ayudas a la investigación científica y técnica, y cuya investigadora principal es la Dra. Carmen Orellana.

A los 101 pacientes se les realizó un estudio *array*-CGH comercial o de diseño propio. Los resultados del estudio genético mostraron pCNVs causales en 16 pacientes, aunque 4 de ellas se consideraron pipCNVs (todas ellas en la misma región cromosómica 16p). En 81 pacientes no se encontró ninguna variante de dosis patogénica, y en los 4 restantes se detectó una CNV considerada como una variante de significado incierto.

Se calculó la puntuación para cada paciente de la serie de seguimiento según las variables clínicas definidas anteriormente en el modelo predictivo (tabla 35). Se dibujó la curva ROC obteniendo un área bajo la curva (ABC) de 0,720 ($p=0,006$; intervalo de confianza 95%: 0,583-0,856) que se muestra a continuación en la figura 37.

Resultados

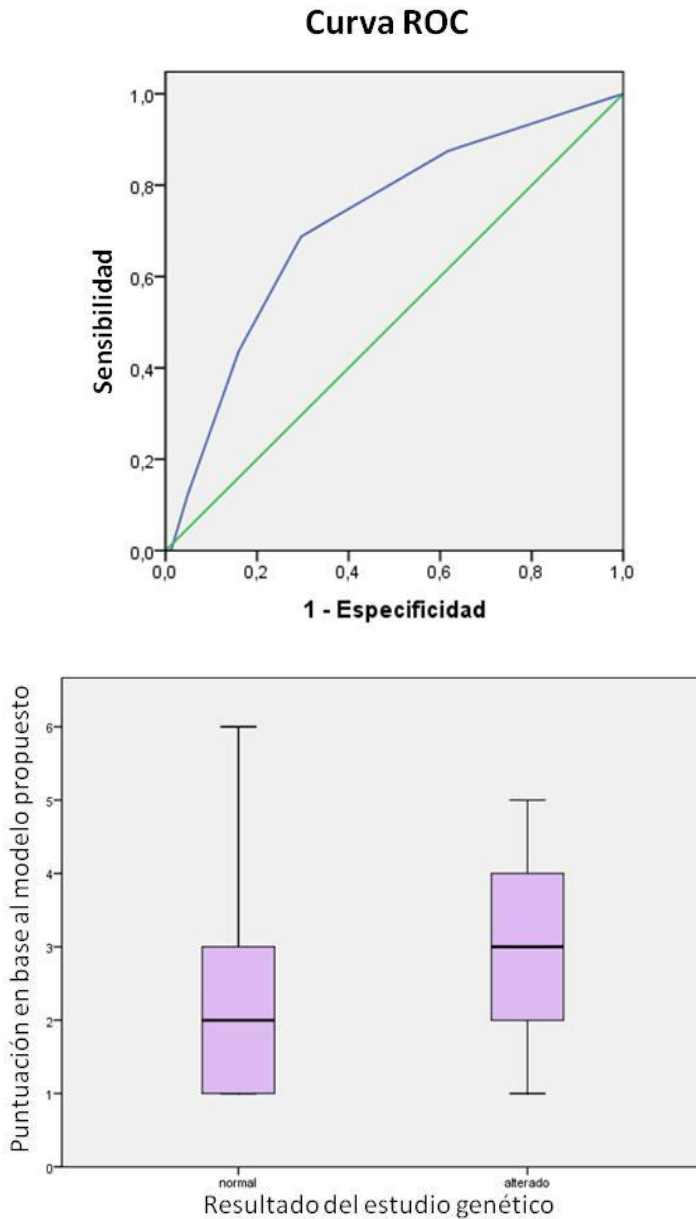


Figura 37. Curva ROC y diagrama de cajas de los pacientes de la serie de seguimiento según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo.

Área bajo la curva 0,720; $p=0,006$; IC 95%: 0,583-0,856.

Se revisaron los resultados de los casos con pCNVs y baja puntuación (con 1 ó 2 puntos). Se trataba de cinco casos, cuatro de los cuales correspondían a las CNVs de penetrancia incompleta, dos de ellos con un único punto (CGM3388 y CGM3826) y los otros dos casos con dos puntos (XF2690 y 000506), según el modelo predictivo propuesto. El quinto caso correspondía a una paciente (003298) con una puntuación de dos por la hipertensión y el retraso del desarrollo. Esta paciente, se incluyó en el estudio a los tres meses de edad, por un cuadro polimalformativo (microcefalia, espina bífida, anomalías renales) con numerosos rasgos dismórficos (hipotelorismo con ptosis palpebral, pestañas abundantes, nariz bulbosa, grande con narinas hipoplásicas y orejas grandes), pero no presentaba ninguno de los rasgos principales que forman el modelo clínico predictivo (sin cardiopatía, ni anomalías de los dedos o de los genitales, ni hipertelorismo ni implantación baja de las orejas).

Dado que las deleciones y duplicaciones en 16p13.11, presentes en los cuatro pacientes mencionados anteriormente, se consideran patológicas de penetrancia incompleta y asociadas a expresividad variable las manifestaciones clínicas que presenten pueden ser muy diversas. Teniendo en cuenta esta particularidad de las deleciones y duplicaciones en determinadas regiones del cromosoma 16p, se realizó el mismo cálculo, pero en este caso excluyendo estos cuatro pacientes del análisis (figura 38). En este caso, los resultados de la curva ROC mostraron un aumento notable de la sensibilidad del modelo propuesto.

Resultados

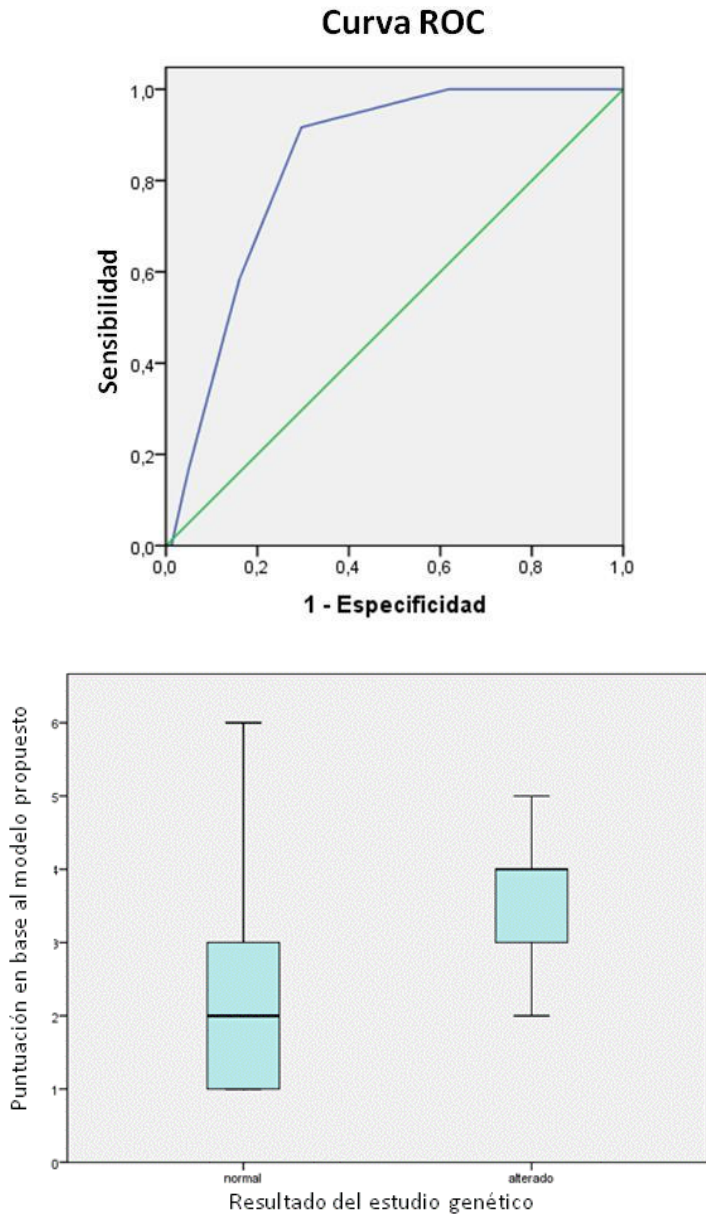


Figura 38. Curva ROC y diagrama de cajas que representa la puntuación en los pacientes de la serie de seguimiento según las variables clínicas definidas en el modelo predictivo excluyendo los cuatro casos patológicos de penetrancia incompleta. Área bajo la curva 0,837; $p < 0,001$; IC 95%: 0,746-0,928.

Se calculó la sensibilidad y la especificidad en la serie de seguimiento con los 101 pacientes y posteriormente excluyendo los cuatro casos con pCNVs de penetrancia incompleta en el cromosoma 16. Los resultados confirmaron que, para un punto de corte de tres puntos, al igual que ocurría con la curva ROC, al excluir los casos con pipCNVs, la sensibilidad aumentaba considerablemente (de 68,7% a 91,6%), manteniéndose la especificidad (70,3%).

Resultados

1.5 Análisis de enriquecimiento funcional de los genes implicados en las pCNVs.

Previo al análisis de enriquecimiento funcional se tuvieron en cuenta varias condiciones. Por un lado, dado que la recurrencia del mismo reordenamiento genómico es muy baja en la serie, los genes incluidos en estas regiones cromosómicas no suelen repetirse en los distintos pacientes. Por otro lado, las pCNVs contienen genes no vinculados necesariamente a la discapacidad intelectual o las anomalías físicas. Por lo tanto, *a priori*, será difícil encontrar un grupo pequeño de genes que estén asociados al trastorno del neurodesarrollo u otras anomalías en los distintos pacientes. Partiendo de esta base, y teniendo en cuenta que las 91 pCNVs en los 73 pacientes contienen 6779 genes, se realizó una selección de genes de interés en las regiones alteradas.

Para ello, se determinó el nivel de conservación para cada uno de los genes de las pCNVs y se seleccionaron los de mayor grado de conservación. Se utilizó el valor omega, que es una medida de presión selectiva que se obtiene como una razón de probabilidades dN/dS (razón entre la probabilidad que el gen tenga una mutación en sitios no sinónimos frente a sitios sinónimos). De esta forma, un valor igual a uno indica que el gen muta con igual probabilidad en sitios no sinónimos que en sitios sinónimos, y por el contrario, valores de este indicador que estén próximos a cero, indicarán que se trata de genes muy conservados. El valor de omega se obtuvo para la comparación humano-ratón. Hay que tener en cuenta que no se conoce este valor omega para todos los genes. Por otra parte, los genes no codificantes (como lncRNAs o microRNAs) por definición no se les puede asignar un valor omega. De los 6779 genes contenidos en las pCNVs de nuestra serie, tan sólo se pudo establecer el nivel de conservación para 2633 genes. Utilizando este cálculo, se seleccionaron aquellos genes que presentaban un valor menor del percentil 25 en el indicador de conservación omega. Con ello, se redujo el número de genes de 6779 a 620 genes conservados en las regiones cromosómicas alteradas. Teniendo en cuenta estas consideraciones previas, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para conocer las funciones en las que participan estos 620 genes.

Para cada subgrupo de pacientes definido a partir de las categorías de una variable clínica se realizó un análisis de enriquecimiento funcional. Las funciones biológicas significativas que hacen referencia a los procesos biológicos, los componentes celulares y las funciones moleculares recogidas en la base de datos Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), fueron representadas mediante grafos que permiten valorar la relación entre los resultados obtenidos.

El análisis de enriquecimiento mostró siete funciones moleculares (GOs) comunes sobrerrepresentadas en el grupo de 38 pacientes con trastornos de conducta y de comportamiento (figura 39). El nivel de significación para estas funciones, tras aplicar un test exacto de Fisher para cada función biológica y ajustar mediante la aplicación del procedimiento *False Discovery Rate*, se sitúa entre 0.028 y 0.045. De la misma forma, en los 35 pacientes sin problemas de comportamiento, no se obtuvo ninguna función molecular enriquecida. Estos siete GOs hacen referencia a 96 genes que, en términos generales, codifican proteínas del grupo de las proteinquinasas (fundamentalmente del tipo serina/treonina) y de la superfamilia de la guanosinatrifosfatasa (GTPasa). Por tanto, participan en funciones de regulación de la actividad protéica. En la tabla 37 se presenta una relación de los genes que codifican para proteinquinasas de serina/treonina o proteínas de unión a GTP cuya dosis se encuentra alterada en nuestra serie de pacientes. Para esta última función, se ha centrado la revisión en los genes que participan en la función molecular que se sitúa al final del grafo y, por tanto, recoge las funciones anteriores.

Resultados

Tabla 37. Función molecular que hace referencia a las proteinquinasas de tipo serina/treonina (GO: 0004674) y función molecular de proteínas de unión a GTP (GO: 0005525). Se muestran los 16 genes que hacen referencia a cada GO junto con los 21 pacientes con trastorno de conducta y de comportamiento cuyas pCNVs contienen dichos genes.

En sombreado se muestran los genes sobre los que se ha publicado alguna evidencia de su relación con problemas de comportamiento o trastornos neuropsiquiátricos (extraído de OMIM).

Localización cromosómica	Pacientes	Genes que hacen referencia a las proteinquinasas (función molecular GO0004674)	Genes que hacen referencia a las proteínas de unión a GTP (función molecular GO0005525)
1q43q44	XF2337	<i>AKT3</i> V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3	<i>ADSS</i> Adenylosuccinatesynthetase
2p21p23.3	CGM2350	<i>PRKD3</i> Protein kinase c, nu	<i>EHD3</i> Pleckstrin homology domain-containing protein, family h, member 2
			<i>RAB10</i> Ras-associated protein rab10
2q22.3q23.1	CGM2402	<i>ACVR2A</i> Activin a receptor, type iia	<i>RND3</i> Rho familygtpase 3
2q37.1	XF2337	<i>CAB39</i> Calcium-binding protein 39	<i>ARL4C</i> Adp-ribosylation factor-like 4c
2q37.3		<i>STK25</i> Serine/threonine protein kinase 25	<i>SEPT2</i> Septin 2
3q29	CGM784	<i>PAK2</i> P21 protein-activated kinase 2	-
7q11.23	CGM2488 CGM2412	<i>LIMK1</i> Lim domain kinase 1	-
8q12.1	XF2019	-	<i>RAB2A</i> Ras-associated protein rab2
9q34.3	CGM1388 CGM1397	-	<i>TUBB4B</i> Tubulin, beta-4b

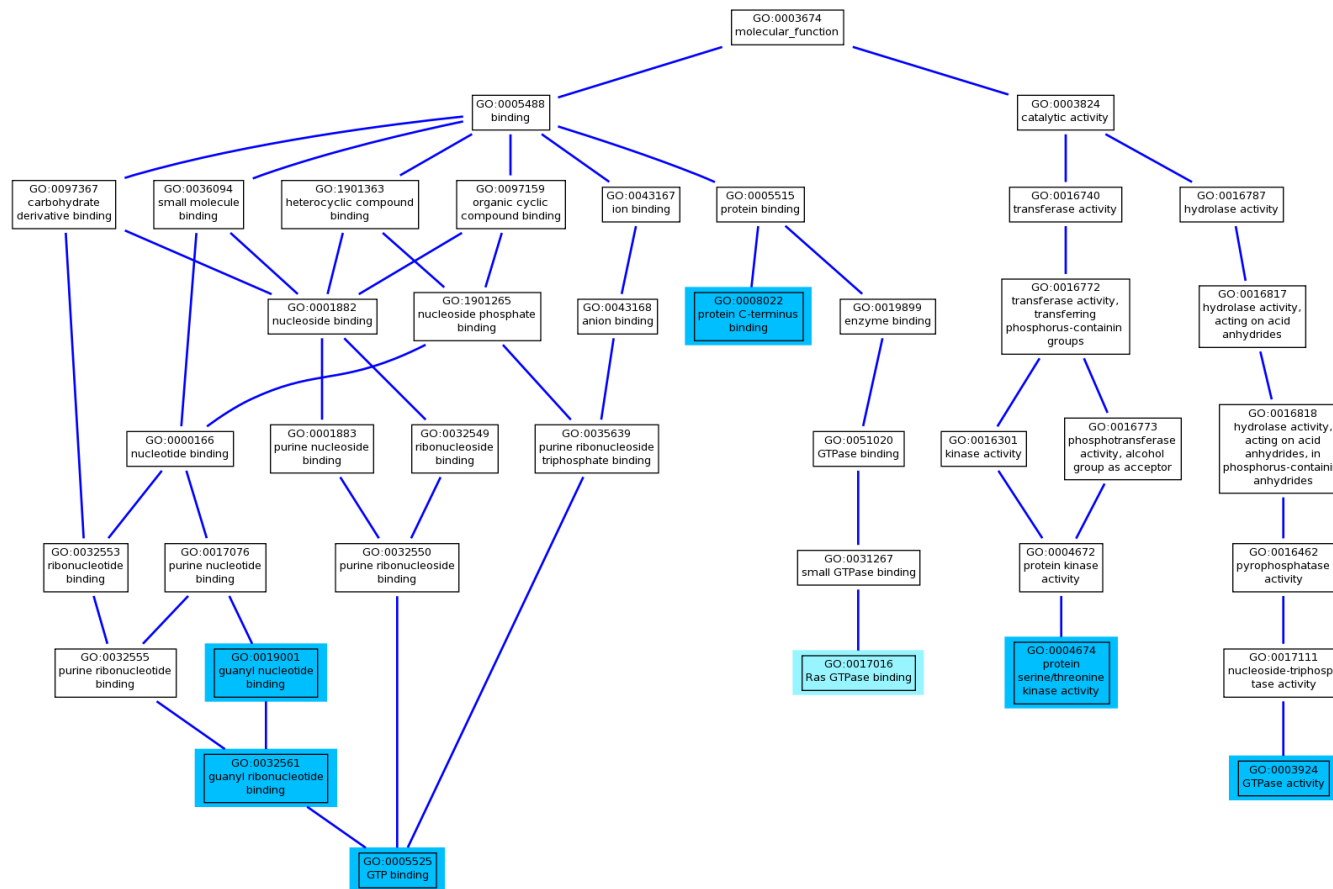
Resultados

Localización cromosómica	Pacientes	Genes que hacen referencia a las proteinquinasas (función molecular GO0004674)	Genes que hacen referencia a las proteínas de unión a GTP (función molecular GO0005525)
12q24.31	XF2623	-	<i>RHOF</i> Ras Homolog Family Member F
13q32.2	X1186	<i>STK24</i> Serine/threonine protein kinase 24	<i>RAP2A</i> Ras-related protein 2a
16p11.2	CGM912 XF2184	<i>PPP4C</i> Serine/threonine protein phosphatase 4	-
		<i>MAPK3</i> Protein kinase, mitogen-activated, 3	
17p11.2	XF2863	-	<i>RASD1</i> Ras protein, dexamethasone-induced, 1
			<i>DRG2</i> Developmentally regulated gtp-binding protein 2
22q11.21	CGM2419 CGM2103	-	<i>SEPT5</i> Septin 5
22q13	XF1054	<i>PIM3</i> Serine/threonine protein kinase	-
22q13.1	CGM305	<i>CSNK1E</i> Casein kinase i, epsilon	<i>GTPBP1</i> Gtp-bindingprotein 1
			<i>SEPT3</i> Septin 3
22q13.33	XF1054 X2686	<i>MAPK11</i> Protein kinase, mitogen-activated, 11	-
		<i>MAPK12</i> Mitogen-activated protein kinase 12	
Xq28	CGM1606	-	<i>RAB39B</i> Ras-associated protein rab39b
	X841	<i>SRPK3</i> SRSF protein kinase 3	-
<i>PNCK</i> Pregnancy-upregulated, nonubiquitous, cam kinase			

Resultados

En conjunto, este enriquecimiento funcional se debe a 96 genes contenidos en las pCNVs de 24 de estos 38 pacientes con trastornos de conducta. Sin embargo, para muchos de los genes contenidos en las pCNVs no se conoce el valor omega, por lo que quedaron fuera del análisis mencionado anteriormente. Por tanto, para tener una visión más general, no sólo enfocada a genes con alto grado de conservación, se decidió ampliar el estudio de estas funciones moleculares al conjunto de los 6779 genes contenidos en las pCNVs en nuestra serie de pacientes. Se realizó un análisis bioinformático para averiguar cuáles de estos genes hacen referencia a las siete funciones moleculares obtenidas con el análisis de enriquecimiento independientemente de su grado de conservación. En este caso, el resultado fue de 334 genes localizados en las pCNVs de 33 pacientes del grupo inicial de 38 con trastornos de conducta. En concreto, para la función molecular que hace referencia a las proteinquinasas de tipo serina/treonina (GO: 0004674) había ocho pacientes más con trastornos de conducta, siendo las cifras de 69 genes en 21 pacientes, y para la función molecular de proteínas de unión a GTP (GO: 0005525) se encontraron dos pacientes más, lo que supone 55 genes en 15 pacientes.

Resultados



Resultados

Figura 39. Representación gráfica de las funciones moleculares significativas de los genes conservados contenidos en las pCNVs de los pacientes con alteraciones de conducta y de comportamiento. El color azul oscuro indica que esas funciones están presentes en al menos el 25-50% de los 38 pacientes con problemas de comportamiento. El color azul claro indica que esa función está presente en el 0-25% de los pacientes de ese grupo.

DISCUSIÓN

Discusión

1.1 Rendimiento diagnóstico.

Los avances tecnológicos y bioinformáticos de análisis genómico han provocado el rápido desarrollo de la genética. La tecnología de los *arrays* de CGH aplicada a la discapacidad intelectual cuenta ya con varios años de experiencia. Lo que en un principio era una técnica incipiente que parecía muy prometedora para el diagnóstico de deleciones y duplicaciones genómicas causales de patología, se ha convertido en muy poco tiempo en una técnica diagnóstica afianzada.

El interés científico por los *arrays* es más que evidente, y se pone de manifiesto en el incremento en el número de publicaciones que aparecen por ejemplo en la base de datos Pubmed. Haciendo una búsqueda a mediados de marzo de 2014, el número de entradas para “array CGH” fue de 2880, que van desde 2 artículos en el año 1997 hasta aproximadamente 300 por año a partir del 2007.

El diagnóstico en ciencias de la salud es el procedimiento por el cual se identifica una enfermedad, entidad nosológica, síndrome o cualquier condición de salud-enfermedad. El rendimiento diagnóstico se calcula como el número de pruebas con resultado informativo de la patología. En el presente estudio hemos utilizado las nuevas tecnologías de análisis genómico que han surgido a lo largo de los últimos años, para el estudio y diagnóstico de 246 pacientes con DI. Hemos identificado cambios patológicos de número de copias por deleción y/o duplicación en 73 pacientes. Esta cifra supone un **rendimiento diagnóstico del 29.7%**.

El rendimiento en general para las tecnologías que detectan desequilibrios genómicos (ganancias o pérdidas de una región cromosómica) es muy variable y dependerá fundamentalmente de tres factores:

1. La plataforma utilizada y los parámetros de análisis.
2. La selección de los pacientes estudiados.
3. La interpretación de los cambios en el número de copias detectadas (CNV).

Discusión

Si bien los primeros artículos ofrecen porcentajes muy variables en cuanto al rendimiento diagnóstico, los últimos trabajos publicados aportan las cifras más acertadas en cuanto al rendimiento de los *arrays*, situándose en torno al 12-20% (Xiang *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). El porcentaje de casos alterados en el presente trabajo es muy superior al detectado en la mayoría de las series de pacientes publicadas hasta el momento.

1. La plataforma utilizada y los parámetros de análisis.

Diversos estudios sugieren que el análisis del cariotipo sólo identifica anomalías cromosómicas subyacentes en el 3% -5% de los niños con discapacidad intelectual moderada a grave excluyendo el síndrome de Down (Stankiewicz y Beudet 2007). En nuestro laboratorio, el rendimiento diagnóstico del cariotipo en pacientes con trastornos del neurodesarrollo durante el año 2012 ha sido de 4.3%. La combinación, en pacientes seleccionados, de cariotipo y estudio de reordenamientos subteloméricos (con técnicas como FISH o MLPA) permite un nivel de detección de aproximadamente 8-10% (Flint y Knight 2003; Koolen *et al.*, 2004). En los años 2007 al 2010 los estudios con *arrays* llegan a su máximo esplendor, empezando con series estudiadas con *arrays* de BACs (Fan *et al.*, 2007; Engels *et al.*, 2007) y pasando rápidamente a *arrays* de oligonucleótidos (Jaillard *et al.*, 2010; Xiang *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). Finalmente, en los últimos 4 años, el desarrollo de *arrays* de alta resolución y gran cobertura permite detectar trastornos genómicos en el 15-20% de niños estudiados por presentar DI de grado medio-alto sobre todo si se asocia con defectos congénitos o epilepsia (Miller *et al.*, 2010; Rodríguez-Revenga *et al.*, 2013).

2. La selección de los pacientes estudiados.

La mayoría de los trabajos publicados que utilizan la tecnología de los *arrays* para identificar trastornos genómicos se centran en pacientes con DI de moderada a grave, a menudo asociada a defectos congénitos y rasgos dismórficos. Los primeros artículos se publican en los años 2002 al 2004 (Veltman *et al.*, 2002; Vissers *et al.*, 2003; Shaw-Smith *et al.*, 2004) y pronto aparecieron en cascada numerosas publicaciones

que analizaban de forma rutinaria grandes series de pacientes. En todos estos trabajos, a diferencia del presente estudio, no se establecen criterios clínicos estrictos de selección de los pacientes. En general, los investigadores estudian pacientes que cumplen criterios basados en la puntuación publicada por de Vries en 2001 (algunos utilizan como puntuación mínima necesaria el punto de corte ≥ 3 y otros simplemente lo usan como orientación). O bien estudian pacientes en base a unos criterios de selección propios y amplios, generalmente retraso del desarrollo o discapacidad intelectual. En el presente trabajo hemos utilizado unos criterios de selección de los pacientes muy concretos, restrictivos y específicos: DI o trastornos del desarrollo de etiología no aclarada asociados a defectos congénitos y rasgos dismórficos o antecedentes familiares de DI, anomalías congénitas o abortos de repetición. Esta selección tan dirigida y enfocada a pacientes con “fenotipo cromosómico” ha permitido obtener un rendimiento diagnóstico de los más altos publicados hasta el momento.

3. La interpretación de los cambios en el número de copias detectadas.

La variabilidad del rendimiento diagnóstico se debe, en parte, a que en la literatura se publican cifras de CNVs causales que incluyen las variantes de significado incierto (VOUS) sobre todo antes de la publicación de Miller y colaboradores en 2010. Este es el caso por ejemplo de Ahn y colaboradores (2010) que alcanzan un rendimiento diagnóstico de 24% porque incluyen no sólo las pCNV sino también las VOUS. La inclusión de estas CNVs de significado incierto como “positivos” hace que aumente la tasa de detección de algunas series. En el presente trabajo se detectaron ocho VOUS a las que se asignó, antes de empezar con los análisis, un significado benigno o patológico, precisamente para evitar este tipo de conflictos y dar una verdadera utilidad clínica a los resultados. Aunque no existe una “regla de oro” para dar un significado a las CNV, en 2010 el consorcio ISCA publicó un consenso (Miller *et al.*, 2010) que ofrece unos criterios orientativos para asignar patogenicidad a las CNVs (tabla 38). De forma paralela nuestro grupo, en base a la experiencia propia, había llegado a unas conclusiones muy similares. Por tanto, los

Discusión

critérios utilizados en el presente trabajo coinciden en buena medida con los propuestos en dicha publicación.

Tabla 38. Criterios para la asignación de la patogenicidad o benignidad, adaptado de Miller *et al.*, 2010.

Valoración de la patogenicidad de una CNV^a			
Criterios primarios: CNV probablemente patogénica (P) o benigna (B)		P	B
1	a. CNV idéntica heredada de un progenitor sano ^b		✓
	b. CNV alterada o expandida heredada de un progenitor	✓	
	c. CNV idéntica heredada de un progenitor afecto	✓	
2	a. CNV similar en pariente sano		✓
	b. CNV similar en pariente afecto	✓	
3	CNV descrita en individuos sanos (publicada en bases de datos y detectada mediante tecnología de alta resolución)		✓
4	CNV que solapa con desequilibrio genómico definido por una tecnología de alta resolución en una base de datos de CNVs en pacientes con RD/DI, TEA o ACM	✓	
5	CNV que se superpone con un síndrome de desequilibrio genómico conocido (síndrome de delección o duplicación publicado)	✓	
6	CNV que contiene genes OMIM ^c	✓	
7	a. CNV rica en genes	✓	
	b. CNV pobre en genes		✓
Hallazgos generales^d			
1	a. CNV es una delección	✓	
	b. CNV es una delección en homocigosis	✓	
2	a. CNV es una duplicación (sin genes conocidos sensibles a dosis)		✓
	b. CNV es una amplificación (ganancia de más de 1 copia)	✓	
3	CNV no contiene elementos reguladores		✓

^aCambio de número de copias.

^bUna delección heredada de un padre sano podría contener un gen OMIM de herencia autosómica recesiva y ser patógena en conjunción con una mutación puntual heredada del otro progenitor.

^cCNV produce el mismo fenotipo que se sabe que causa la mutación responsable de la enfermedad.

^dExcepciones descritas.

RD/DI: retraso del desarrollo/discapacidad intelectual; TEA: trastorno del espectro autista; ACM: anomalías congénitas múltiples.

Quizá uno de los criterios más discutibles de Miller y colaboradores es el primer punto de los criterios primarios, esto es, cuando se detecta en un paciente una CNV heredada de un progenitor sano, se interpreta *a priori* como una CNV benigna. Si bien es cierto, que los estudios con arrays permiten la detección de “variantes propias de cada familia”, no descritas en las bases de datos en individuos sanos ni en pacientes, es necesario matizar y tener en cuenta varios factores antes de considerarlas directamente como benignas:

- Existen numerosas y recientes publicaciones que describen CNVs tanto de delección como de duplicación que se consideran de penetrancia incompleta y/o de expresividad variable (Cooper *et al.*, 2011, Kaminsky *et al.*, 2011). Esta variabilidad en el fenotipo se ha observado sobre todo en la región cromosómica 16p11.2 (Fernandez *et al.*, 2009), tanto para las delecciones como para las duplicaciones, y en las CNVs de duplicación en 22q11.2 (Ou *et al.*, 2008). En la serie de pacientes estudiada, se han detectado ocho familias con este tipo de CNVs (ver tabla 15 de resultados con las CNVs heredadas y su interpretación).
- Relacionado justo con el punto anterior, en los casos de CNVs heredadas, debería estar recomendada la evaluación clínica de los progenitores, que podría facilitar la interpretación y permitiría otorgar valor a dicha CNV. Esta evaluación muchas veces ya se realiza en la valoración del paciente para estudio con *array*-CGH. Sin embargo, hay ocasiones en las que los progenitores no presentan un fenotipo aparentemente anómalo,

Discusión

y es precisamente en consultas sucesivas, una vez detectada la CNV, cuando indagando se detecta, en los progenitores portadores de la CNV, algún rasgo clínico que podría estar relacionado. Este hecho se ha observado por ejemplo en los casos CGM2952 y XF2184 de nuestra serie. La paciente CGM2952 es portadora de una CNV de delección en 16p11. Su hermana, con un trastorno generalizado del desarrollo, también es portadora. El estudio familiar mostró que se trata de una CNV heredada del padre aparentemente sano. Pero la entrevista clínica realizada *a posteriori* con los padres, evidenció un problema de alcoholismo presente en el padre. Este trastorno mental y del comportamiento encaja perfectamente con la variabilidad fenotípica de esta región cromosómica. El otro ejemplo, es el caso XF2184, tanto el paciente como su hermano, ambos con un trastorno del neurodesarrollo, son portadores de un CNV de duplicación en 16p11. La historia clínica de la madre, portadora de la misma CNV que sus hijos, reveló que durante la infancia presentó la misma dislalia que mostraban ahora sus hijos.

- En determinados casos heredados o *de novo*, serían necesarios otros estudios específicos para valorar la posibilidad de mosaicismo en un progenitor sano (Kearney *et al.*, 2011b). No se ha evidenciado en ningún caso de la serie pero no se puede descartar la presencia de mosaicismo germinal. Respecto al mosaicismo somático, se puede sospechar en portadores sanos de alteraciones patológicas. Así se sospechó por ejemplo en el caso CGM2494, donde tanto la paciente como la madre son portadoras de una delección de poco más de 3 Mb en 21q21.2 probablemente patológica. La falta de colaboración de la familia, no permitió confirmar o descartar la presencia de una alteración en mosaico en la madre.
- Otro punto a tener en cuenta en la interpretación tanto de las CNVs heredadas de un progenitor sano, como en las que se producen *de novo*, es la posibilidad de que en el paciente pueda existir un trastorno recesivo, bien por una mutación puntual no detectable por *array* (Vermeesch *et al.*, 2012), o bien por un segundo evento tipo CNV que pueda contribuir al fenotipo del paciente. De hecho, por ejemplo, en los casos

CGM912 y XF1774, ambos con CNVs en 16p, hemos detectado una segunda variante también *de novo*, que podría contribuir a la expresión fenotípica en estos pacientes.

Existen otros criterios, sobre los que apenas hay publicaciones científicas, que nuestro grupo también ha tenido en cuenta para la interpretación de las CNVs. Cabe destacar entre ellos la presencia o ausencia, así como su posible repercusión en las CNVs, de elementos ultraconservados (Martínez *et al.*, 2010), microRNAs, la formación de nuevos genes quimera y la posible presencia de genes sometidos a impronta (Kearney *et al.*, 2011b).

En general, la interpretación en los cambios de número de copias, es un proceso dinámico y en continuo progreso, debido a los rápidos avances en el conocimiento y la información clínica y genómica. Diversos grupos de investigación hemos llegado a esta misma conclusión, que también apunta por ejemplo la Dra. Aránzazu Díaz en su trabajo de tesis (2013), remarcando la importancia de dejar la puerta abierta a la reevaluación continua de estos pacientes.

1.2 Características clínicas de los pacientes: obtención de un modelo predictivo.

A pesar de la gran cantidad de trabajos publicados sobre la utilidad de los *arrays* en el diagnóstico etiológico de pacientes con fenotipo cromosómico y/o DI, en la mayoría de los casos los datos clínicos son muy escasos, sobre todo cuando se publican series grandes de pacientes, en los cuales la clínica se plantea de manera muy general. Son muy pocos los trabajos en los que se hace una revisión exhaustiva de la clínica asociada a los distintos desequilibrios genómicos (Soukier *et al.*, 2012).

Este trabajo se ha realizado gracias a la inclusión, de forma minuciosa, sistemática y detallada, de datos clínicos y genéticos recogidos en una base de datos, con más de 260 variables diferentes, diseñada para este fin. Tan sólo existe un trabajo publicado en la literatura que haga referencia a una recogida sistemática y electrónica de variables

Discusión

clínicas y genéticas en pacientes con DI. En 2007 el grupo de Pescucci y colaboradores, de la Universidad de Siena, publica un artículo que detalla el funcionamiento de un banco de datos y muestras de pacientes con DI ligada al cromosoma X. Aunque se trata de un trabajo de gran interés y con repercusión para clínicos y científicos que trabajen en este tema, no plantean criterios de recogida, ni búsqueda por ejemplo de factores de predisposición.

1.2.1 Características clínicas generales de los pacientes.

En nuestra serie global de pacientes (n=246) las características clínicas más importantes son, por orden de frecuencia, los trastornos de crecimiento (72%), las anomalías de las manos y/o pies (60%), los defectos congénitos de la línea media (55%), la alteración del tono muscular (51%), la implantación baja de las orejas (47%), y las anomalías de las fisuras palpebrales (45%).

En los pacientes con pCNVs (n=73) las características clínicas más frecuentes tras el trastorno de crecimiento (78%), son las anomalías de las manos (60%), la implantación baja de las orejas (57%), el hipertelorismo (46%) y las anomalías de mandíbula (46%). Además, es importante destacar que algunas manifestaciones clínicas poco frecuentes en la serie global, como son los defectos congénitos en los genitales y rasgos conductuales como la agresividad, son mucho más frecuentes en el grupo de pacientes con pCNVs, por lo que alcanzan valores de significación estadística más alta que el resto de rasgos clínicos (valor $p < 0,001$ y $\leq 0,01$ respectivamente). Son por tanto rasgos que se asocian de forma más específica a reordenamientos genómicos en nuestra serie de pacientes.

Dado que los reordenamientos genómicos detectados en el grupo de pacientes con pCNVs son muy heterogéneos (deleciones, duplicaciones, simples, complejas, intersticiales, terminales), se establecieron tres clasificaciones diferentes según el tipo de desequilibrio genómico, la localización cromosómica y el número de regiones implicadas, que nos permitieran comparar los rasgos clínicos de cada uno de los subgrupos de pacientes de estas categorías frente al grupo en el que no se detectó ninguna pCNV. Excepto los defectos congénitos de los genitales, que constituyen un rasgo común en las

tres categorías establecidas, es llamativo que las características clínicas que se encuentran con mayor frecuencia son distintas para cada tipo de alteración. Suponemos que esta heterogenidad se debe, al menos en parte, al escaso número de casos patológicos en cada subgrupo. Esta comparación genotipo-fenotipo puede ser el principio para establecer en un futuro las principales manifestaciones clínicas asociadas a deleciones, duplicaciones y translocaciones desequilibradas, tanto intersticiales como subteloméricas. Estos análisis permitirán establecer claramente las indicaciones clínicas y protocolos de estudio por *arrays* de pacientes con trastornos del neurodesarrollo.

1.2.2 Cardiopatía congénita.

A pesar de los avances médicos y quirúrgicos, los defectos congénitos cardíacos, que afectan aproximadamente al 1% de todos los recién nacidos, continúan siendo la causa principal de muerte en nacidos con defectos congénitos. Hasta la introducción de la técnica de *arrays*, la etiología de estas cardiopatías era atribuible en un 20% de los casos a aneuploidías cromosómicas y enfermedades monogénicas. En el 80% restante se especulaba sobre enfermedades genéticas poligénicas y factores ambientales entre los que se incluían infecciones víricas, exposición a tóxicos y enfermedades maternas (Bentham y Bhattacharya 2008). Aunque los estudios publicados que establecen correlación entre las CNVs detectadas con *arrays* y la etiología de las cardiopatías congénitas son limitados, la prevalencia de defectos congénitos cardíacos en pacientes con pCNVs es alta, sobre todo si presentan otros defectos congénitos o asocian rasgos neurológicos. Hasta el 30% de pacientes con cardiopatía junto con otros defectos congénitos, presentan alguna pCNV causal (Thienpont *et al.*, 2007).

Los defectos cardíacos congénitos, descritos por tanto hasta el momento como los defectos más frecuentes en pacientes con desequilibrios genómicos, están presentes en el 23% de pacientes tanto en nuestra serie global como en los pacientes con pCNVs. No obstante, es llamativo que este porcentaje de pacientes con pCNVs y cardiopatía es muy similar al publicado en otras series: Lu y colaboradores en 2008 detectan cardiopatía con o sin otros defectos

Discusión

congénitos en el 20,2% de pacientes con pCNVs; Soukier y su grupo de investigación en 2012 detectan algún tipo de cardiopatía en el 22% de pacientes con pCNVs con un valor $p=0,008$. Estos defectos cardíacos, no analizados en detalle en los artículos publicados hasta el momento, corresponden en nuestra serie global y para el grupo de pacientes con pCNVs a CIA, PDA y CIV. Estas cardiopatías mantienen las mismas frecuencias en la serie global y en los pacientes con pCNVs, excepto la CIV, cuya frecuencia es el doble en pacientes con pCNVs, teniendo además una OR de 3 y un valor p que roza la significatividad ($p=0,06$).

Al estudiar series de pacientes con cardiopatía, hay que tener en cuenta, que quizá se está introduciendo un doble sesgo. Por un lado, la supervivencia de estos pacientes, puede estar comprometida por la propia cardiopatía, lo cual hace que puedan fallecer antes de obtener un diagnóstico genético. Por otro lado, a diferencia de EEUU en que se estudian grandes series de pacientes directamente por *array*-CGH, en nuestro laboratorio, a la mayoría de neonatos con cardiopatía se les realizaba hasta ahora, un screening utilizando la técnica de MLPA para descartar síndromes de microdelección como los descritos en las regiones 22q11 y 7q21. Según amplias series publicadas, la delección 22q11 es la anomalía cromosómica más frecuente (1/169 casos) y suele asociar cardiopatía (Kaminsky *et al.*, 2011). El estudio mediante MLPA en el recién nacido permite diagnosticar en edades tempranas muchos casos a los que luego no hace falta realizarles ningún otro tipo de estudio genético (*array*). Además la técnica de estudio empleada permite detectar un aumento o disminución de dosis de varias regiones a la vez. Al utilizar la técnica de MLPA con kits (por ejemplo la SALSA P245) que agrupan varias regiones, permite al mismo tiempo rastrear otras regiones cromosómicas asociadas a otros síndromes. En nuestro laboratorio se han diagnosticado de esta forma en los últimos 6 años: dos casos con delección 1p36, 14 casos con delección 7q11.23 y 31 casos con delección 22q11.21, todos ellos con cardiopatía. El diagnóstico temprano mediante esta técnica podría explicar la baja frecuencia de casos con CNVs flanqueadas por duplicaciones segmentarias detectadas en nuestra serie (siete pacientes), ya que estos casos con un diagnóstico ya establecido no fueron incluidos en la serie investigada. Esto supone un sesgo importante, ya que los

reordenamientos genómicos más frecuentes se encuentran infrarrepresentados en nuestra serie.

1.2.3 Trastornos del crecimiento.

Las alteraciones del desarrollo somático son ligeramente más frecuentes en pacientes con pCNVs (78% frente a 74% en la serie global). En este grupo de pacientes, tal como describieron Soukier y colaboradores en 2012, predominan la talla y el peso bajos. Esto es debido quizá a un sesgo de selección, ya que seguramente se solicitan más estudios genéticos a pacientes con talla baja que con talla alta. Este hecho queda demostrado en el presente trabajo, de forma que, en el global de 246 pacientes el 26% tienen talla baja y el 47% peso bajo. Estos porcentajes tan elevados (superiores a lo esperado) se mantienen en el grupo de pacientes con pCNVs. Sin embargo, no ocurre esto para la talla y el peso altos. Aproximadamente el 5% de pacientes presentan la talla y/o el peso alto en la serie global, pero en el grupo de pacientes con pCNVs este porcentaje aumenta hasta el 10% con una diferencia estadísticamente significativa (para la talla alta $p=0,04$ y para el peso alto $p=0,02$). Por tanto, lo que no se ha publicado hasta el momento es que los percentiles altos, por encima de 90 tanto para la talla como para el peso, presentan una mayor asociación específica con las pCNVs.

Una variable a tener en cuenta en los trastornos del crecimiento, no descrita previamente, es la presencia de elementos ultraconservados en las regiones de ganancias y pérdidas cromosómicas. Los elementos ultraconservados se definen como segmentos de DNA de al menos 200 pares de bases con identidad de secuencia en los genomas humano, de ratón y de rata (Bejerano *et al.*, 2004). Aunque se han descrito cerca de 481 elementos ultraconservados, su significado real, continúa siendo una gran incógnita. Desde la publicación de Bejerano y colaboradores en 2004, los elementos conservados se han relacionado de una u otra forma con genes implicados en el desarrollo. Se ha otorgado a los UCEs funciones importantes como potenciadores o represores de la transcripción, como reguladores o como elementos implicados en la modificación epigenética en los genomas de vertebrados (Baira *et al.*, 2008).

Discusión

En nuestra serie, la diferencia entre el número de elementos observados y esperados, representa un elevado enriquecimiento de estos elementos en variantes de dosis génicas con repercusión patológica, dato publicado previamente por nuestro grupo (Martínez *et al.*, 2010). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que ninguno de estos elementos se ha encontrado en las variantes de dosis consideradas en este trabajo como polimórficas.

El hecho de que rasgos, como el peso bajo en el recién nacido, se correlacionen de forma muy significativa en nuestra serie con la ganancia neta de elementos ultraconservados ($p < 0,012$) y que otros rasgos, como la microcefalia adquirida, rocen la significatividad ($p = 0,06$), sugiere que en general los elementos ultraconservados actuarían como represores del crecimiento ejerciendo un control negativo sobre el mismo. Estos resultados parecen seguir la misma línea que los publicados en los últimos años, que permiten relacionar los elementos ultraconservados con diversas patologías como las leucemias y los carcinomas humanos (Calin *et al.*, 2007). En concreto, este grupo de investigadores demostró una función oncogénica específica en el cáncer de colon para el elemento ultraconservado UC73, al comprobar su efecto antiproliferativo a través de la inducción de la apoptosis. También recientemente se ha publicado otro artículo que relaciona los elementos ultraconservados con el crecimiento, concretamente con los planos de desarrollo de los tunicados (Sanges *et al.*, 2013). Estos investigadores identifican un grupo de secuencias altamente conservadas en genomas de tunicados y de vertebrados, asociadas de forma significativa con genes *homeobox* implicados en el desarrollo del organismo.

Respecto a la presencia de elementos ultraconservados en las deleciones, si bien es cierto que el análisis de regresión lineal univariante mostró que los casos con hipotelorismo tienen más elementos ultraconservados que los casos sin hipotelorismo, hay que tener muy presente, que este resultado hace referencia a un único paciente. En nuestra serie, el hipotelorismo es un rasgo clínico poco frecuente, presente en 12 de los 246 pacientes. De estos 12 pacientes con hipotelorismo, sólo en dos se detectaron reordenamientos genómicos responsables de la patología, y tan sólo en un caso se ha descrito la presencia de elementos ultraconservados en la pCNV (CGM2756). A pesar de esto, merece la pena resaltar que, un estudio

publicado recientemente relaciona alteraciones de elementos ultraconservados con la holoprosencefalia (Roessler *et al.*, 2012). Los resultados de los estudios realizados por el grupo de Roessler y colaboradores, mostraron que las secuencias ultraconservadas están presentes de forma preferente en la vecindad de genes del desarrollo como *ZIC2* (holoprosencefalia MIM 603073), pudiendo directa o indirectamente influir en las manifestaciones fenotípicas de la holoprosencefalia. La holoprosencefalia hace referencia a una serie de anomalías congénitas cerebrales y del macizo facial, que se generan en estadios muy tempranos del desarrollo, cuando la placa neural se pliega sobre sí misma y forma el tubo neural. Las alteraciones cerebrales son el resultado de un fallo en la diferenciación y separación o hendidura del prosencéfalo o cerebro anterior, que dará lugar a los hemisferios cerebrales y a los ventrículos laterales. El desarrollo deficiente de la placa neural puede ser causa, asimismo, de fallo en la formación del cuerpo caloso y contribuir a un defecto de la migración neuronal con la producción de malformaciones cerebrales. La holoprosencefalia va asociada, por un lado, a una morfología facial característica que afecta el desarrollo de la línea media del plano facial, en la que cabe destacar el hipotelorismo, y por otro lado, a una encefalopatía, con diversas anomalías cardíacas, musculoesqueléticas, genitourinarias y gastrointestinales (Izquierdo y Avellaneda 2003). En este sentido, el paciente con la pCNV de delección y elementos ultraconservados (CGM2756), además del hipotelorismo, presenta otros rasgos descritos en la holoprosencefalia como alteraciones de la línea media facial (frente en quilla, alteración de la raíz nasal y del filtrum), alteraciones cerebrales como la ventriculomegalia, además de persistencia del *ductus arterioso* y transposición penoescrotal (pene hipoplásico con inclusión interescrotal y criptorquidia bilateral). Merece la pena destacar que los 10 pacientes con hipotelorismo, sin pCNVs, presentan algún tipo de malformación cráneocerebral, asociada en la mayoría de casos con alteraciones de la línea media, lo cual podría orientar la búsqueda de la causa del trastorno del neurodesarrollo en estos pacientes hacia la alteración de elementos conservados en el genoma, no detectados hasta el momento.

En cualquier caso, sería necesario realizar estos estudios en una serie más grande de pacientes para evaluar la importancia de los elementos

Discusión

ultraconservados como un nuevo elemento regulador genómico/genético de los trastornos del crecimiento.

1.2.4 Anomalías genitales.

Las anomalías genitales no se encuentran entre las características clínicas más frecuentes ni en la serie global ni en los casos con pCNVs. Sin embargo, la frecuencia de estas anomalías es significativamente mayor en el grupo de casos con pCNVs: las anomalías genitales constituyen el defecto congénito con un valor p estadísticamente más significativo ($p < 0,001$, por género: varones $p = 0,006$ y mujeres $p = 0,025$). Es muy importante en la exploración física de los pacientes tener en cuenta este tipo de anomalías congénitas, sobre todo anomalías de testículos y micropene en niños y la hipertrofia/hipoplasia de labios mayores y menores en niñas.

1.2.5 Anomalías de los dedos.

En nuestra serie global de pacientes, tras los trastornos del crecimiento, la anomalía congénita más frecuente es la de las manos (50,8%), siendo incluso mayor en los pacientes con pCNVs (60,3%). Este porcentaje se debe sobre todo a las anomalías de los dedos 2-5 de las manos, presente en el 33% de casos con pCNVs ($p = 0,03$) siendo la clinodactilia del 5º dedo junto con los dedos largos y afilados los defectos de los dedos más frecuentes en el global de la serie. Las anomalías de los dedos, asociadas muchas veces a formas sindrómicas de discapacidad intelectual, se presentan en ocasiones junto con otro tipo de defectos congénitos como por ejemplo las anomalías genitales, craneales, cerebrales, esqueléticas o incluso con cardiopatías como la comunicación interauricular (ver figura 28 de los resultados).

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica y no se ha encontrado hasta el momento ninguna publicación que analice la relación de muchos de estos rasgos clínicos como son las anomalías genitales y de los dedos con la presencia o ausencia de pCNVs en pacientes con trastornos del neurodesarrollo.

En nuestra serie, rasgos como los trastornos del crecimiento, la implantación baja de las orejas, el hipertelorismo, los defectos mandibulares, las anomalías de los dedos 2-5, los defectos congénitos cerebrales y genitales, forman el “fenotipo cromosómico” asociado a pCNVs.

1.2.6 Asociación de rasgos clínicos frecuentes. Propuesta de una nueva secuencia clínica indicativa de Neurocristopatía.

El análisis estadístico de las variables ha permitido detectar la existencia de una tríada de rasgos dismórficos faciales muy asociados entre ellos, formada por la raíz nasal hundida, el hipertelorismo y implantación baja de las orejas (en adelante RHO). Estos tres rasgos están presentes en diversos síndromes que aparentemente no guardan relación entre ellos. En concreto, una búsqueda realizada en las bases de datos *London Medical Database*, con estos tres criterios como obligatorios, muestra una salida con 79 síndromes diferentes. Algunos ejemplos como el mosaicismo para la trisomía 10 o para la trisomía 14, el síndrome de Schinzel-Giedion, el síndrome de Job, el síndrome de Marshall-Smith, la anemia de Diamond-Blackfan, la malformación de Dandy-Walker, los síndromes de microdelección 1p36, 1q41q42, 1q44, 7p22, 8p23, 9q34 (síndrome de Kleefstra), 14q32, 11q25 (síndrome de Jacobsen), 17p13 (lisencefalia de Miller-Dieker), 19p13, y de microduplicación 16p13.3 y 22q13, ponen de manifiesto la heterogeneidad de las patologías. Algunas muy conocidas y estudiadas, y otras en las que no se conoce el patrón de herencia ni el gen responsable.

Esta variabilidad en cuanto a síndromes clínicos diferentes producidos por alteraciones genéticas muy diversas, entre las que *a priori* no existe ningún tipo de relación, también se manifiesta en la serie estudiada en el presente trabajo. Esta asociación RHO se observa en ocho pacientes con pCNVs diferentes en cuanto al tipo de variante y a la localización cromosómica. Se trata de los pacientes CGM1353, CGM1525, CGM2067, CGM2412, CGM2494, CGM2733, XF2296, XF2789 (ver anexo III).

Discusión

Por otro lado, esta tríada clínica RHO se ha descrito en pacientes con trastornos del neurodesarrollo producidos por factores ambientales, en distintos momentos del desarrollo embrionario, tanto por el efecto teratógeno de fármacos como el ácido retinoico o de otro tipo de tóxicos como el alcohol (síndrome alcohólico fetal). La exposición del embrión a estos tóxicos durante las primeras semanas del desarrollo embrionario puede ocasionar graves malformaciones, siendo frecuentes las craneofaciales. En este sentido, resulta de gran interés que Sulik y Johnston (1982) demostraran, en un modelo de ratón, que las células de la cresta neural son particularmente sensibles a los efectos de la exposición embrionaria al alcohol, y que la muerte de estas células, o un defecto en su migración, puede ser la causa de los defectos craneofaciales propios del síndrome alcohólico fetal, entre los que se encuentra la tríada RHO.

De cualquier forma, bien sea por la presencia de trastornos de causa genética, como es el caso de numerosas microdeleciones o microduplicaciones en diversas regiones del genoma, bien por los efectos teratógenos del alcohol durante el periodo embrionario o bien por otros factores, parece que nos encontramos ante un nuevo tipo de secuencia para defectos craneofaciales, no descrita como tal, pero que se observa en numerosos síndromes. Partiendo de los estudios sobre el síndrome alcohólico fetal en el modelo de ratón, mediante una revisión bibliográfica hemos podido constatar que varios de los genes alterados en síndromes genéticos que presentan la secuencia RHO se encuentran igualmente implicados en los procesos de diferenciación y migración de células derivadas de la cresta neural. Tal es el caso de patologías tan dispares como el síndrome de Mowat-Wilson (gen *ZEB2*), el síndrome de delección 5q14 (gen *MEF2C*), la displasia campomélica (gen *SOX9*) o el síndrome de Saethre-Chotzen (gen *TWIST1*), entre otros (extraído de OMIM). Del mismo modo, se han identificado microRNAs, como MIRN200B y MIRN429 (incluidos en la región cromosómica delecionada en el paciente CGM2067), que actúan entre otros sobre el gen *ZEB2* (responsable del síndrome de Mowat-Wilson) como un paso más en los procesos de transición

epitelio-mesenquimal (Renthal *et al.*, 2010). Además, resulta muy significativo que en muchos de estos pacientes es frecuente encontrar asociadas otras manifestaciones clínicas como la hipoacusia o los defectos cardíacos congénitos, los cuales se podrían relacionar con el mismo tipo de procesos.

Bajo el término de neurocristopatía, acuñado por primera vez en 1974 por Bolande, se describen las lesiones secundarias a la alteración de las células de la cresta neural. Se trata de un grupo de patologías que derivan de un desarrollo embriológico anómalo. Debido a la multitud de estructuras que derivan de estas células, las posibles manifestaciones resultantes pueden ser muy variadas y presentarse de forma aislada o asociadas formando síndromes. En este sentido, la enfermedad de Hirschsprung (aganglioneosis intestinal) es consecuencia de un defecto en la migración de las células de la cresta neural hacia el intestino distal, y por tanto se considera que forma parte del concepto de neurocristopatía (Espinosa y Alonso Calderón 2009). Puede presentarse de forma aislada (neurocristopatía entérica), o formado parte de otros trastornos derivados de anomalías de la cresta neural como el síndrome de hipoventilación central congénito (Ondine) (Masumoto *et al.*, 2002) o el síndrome de Waardenburg (Toki *et al.*, 2003).

La porción cefálica de la cresta neural tiene la capacidad adicional de diferenciarse en células mesenquimatosas y dar lugar a otros tejidos. Esta porción cefálica contribuye a la formación de parte del cráneo, huesos de la cara y dientes, además de tejido conjuntivo que forma parte de diversas estructuras de cabeza y cuello (Noden 1988).

Las neurocristopatías son, por tanto, patologías producidas por alteraciones en el crecimiento, en la proliferación, en la diferenciación y/o en la migración de las células derivadas de la cresta neural. Estas células se originan en la zona dorsal del tubo neural durante la embriogénesis y migran con el proceso frontonasal y los arcos faríngeos. Es necesario un estrecho control espacio-temporal de las redes de señalización, donde los factores de transcripción juegan un

Discusión

papel fundamental, para la inducción, migración, proliferación y diferenciación de las células de la cresta neural que dan lugar, entre otros, a las estructuras craneofaciales. Por tanto, la disrupción en algún punto de este complejo proceso resulta en malformaciones craneofaciales (Cordero *et al.*, 2011). Del mismo modo, estas células contribuyen a la fusión de los cojines endocárdicos conotruncales, lo que explica que muchos niños con defectos craneofaciales presentan también anomalías cardíacas congénitas. Esto ocurre por ejemplo en el síndrome de Collins, en el síndrome de DiGeorge o en el síndrome de Goldenhar. Esta neurocristopatía, que se describe en el presente trabajo, está formada fundamentalmente por rasgos a nivel cefálico (asociación RHO) y cardíaco, pero además es frecuente encontrar otros síntomas relacionados con las células de la cresta neural como la hipoacusia neurosensorial y los trastornos de conducta tipo agresividad. Estudios en animales sugieren que el comportamiento agresivo estaría mediado por una compleja interacción entre diversos sistemas hormonales: gonadales, suprarrenales e hipotalámico-hipofisarios (Ramírez y Delius 1980). La agresión sería el resultado de la interacción de sustancias bioquímicas neuroreguladoras como son las hormonas y los neurotransmisores. En concreto, parece ampliamente aceptado que el descenso del nivel de serotonina y el aumento de los niveles de noradrenalina y dopamina está implicado en la etiología de la agresión y la violencia (Martín 2006). La noradrenalina es una catecolamina producida en la región medular de la cápsula suprarrenal, que se origina de células de la cresta neural relacionándose por consiguiente con las neurocristopatías.

Asumiendo como hipótesis de partida que la presentación de la triada RHO es sintomática de neurocristopatía, se decidió contrastar esta hipótesis mediante la búsqueda de relaciones funcionales entre los genes contenidos en las ocho pCNVs detectadas en los pacientes con esta secuencia. Esta búsqueda se realizó a través de la página web de bases de datos como STRING, NCBI y PubMed:

- la base de datos STRING (<http://string-db.org/>), que muestra interacciones directas (físicas) y asociaciones indirectas (funcionales de proteínas), puso de manifiesto un posible nexo

común en cinco pacientes. Los resultados de esta búsqueda mostraron que nueve genes (*RPA1*, *YWHAE*, *EIF4H*, *CCT8*, *PRPF8*, *PRDX6*, *ATAD3A*, *MYBBP1A*, *KIAA0664*) localizados en cinco de las ocho regiones se relacionaban entre sí mediante la formación de complejos de migración y de señalización de adhesión a la integrina $\alpha\beta 1$ (tabla 39, genes en color naranja). Las integrinas forman parte de una familia de receptores de adhesión celular que participan y median en las interacciones entre las células y entre éstas y la matriz extracelular, participando en procesos de migración y de señalización celular (Byron *et al.*, 2012).

- a través de la página web de la base de datos NCBI, se revisaron los 101 genes reguladores incluidos en la red propuesta como modelo para el desarrollo craneal a partir de las células de la cresta neural (WP2064) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/672460>). Muchas de las interacciones propuestas en este modelo están reguladas por factores de transcripción. De esta forma se seleccionaron otros cuatro genes contenidos en tres regiones diferentes de estos ocho pacientes (tabla 39, genes en color verde).

El gen *FGFR3* (incluido en la región duplicada del paciente CGM1525) pertenece a una familia de genes que codifican para receptores de factores de crecimiento polipeptídicos implicados en gran variedad de actividades como la mitogénesis, la angiogénesis y la cicatrización de heridas. Mutaciones en este gen se han asociado a trastornos del crecimiento de huesos largos dando lugar a formas leves de hipocondroplasia, a formas más comunes de acondroplasia o a displasia tanatofórica letal en la época perinatal. También se han descrito mutaciones en *FGFR3* en pacientes con formas sindrómicas de craneosinostosis (síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon con *acantosis nigricans*). En estos pacientes, al igual que en otros casos de craneosinostosis sindrómicas, bien producidas por mutaciones en genes de la misma familia de factores de crecimiento fibroblástico como *FGFR2* (síndrome de Crouzon, síndrome de Pfeiffer, síndrome

Discusión

de Apert) o por alteraciones de genes como *TWIST1* (síndrome de Saethre-Chotzen) o *EFNB1* (síndrome craneofrontonasal), se han descrito rasgos dismórficos comunes en todos como son el hipertelorismo y la orientación de las fisuras palpebrales hacia abajo. (GeneReviewsTM: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/)). Además, tanto los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) como el AR regulan la expresión de los genes *Hox* directamente o a través de factores de transcripción. Dentro de esta familia génica, el gen *HOXB1* (incluido en la región cromosómica delecionada en el paciente XF2789) es el que posee mayor potencial de inducción de diferenciación celular a través de vías de señalización como Bmp y Notch, participando en aspectos clave de la cascada genética implicada en la regulación de las células de la cresta neural craneal. En este sentido, cabe mencionar que una disminución de la actividad represora del gen *HES5* (incluido en la región cromosómica delecionada en el paciente CGM2067) puede interrumpir la oscilación de la actividad de la vía de señalización Notch, que es necesaria para una adecuada proliferación y diferenciación celulares espacio-temporales (Kageyama *et al.*, 2008; Gouti *et al.*, 2011).

- Dado que sólo quedaba un paciente (XF2296) en el cual no se había encontrado ninguna relación a través de las búsquedas realizadas con las bases de datos STRING o NCBI, se decidió revisar uno a uno los 26 genes contenidos en esta región cromosómica. Para ello se realizó una búsqueda en PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) para cada uno de estos genes y se revisaron las publicaciones relacionadas con la cresta neural. Se detectaron dos genes implicados en alguno de los procesos de diferenciación, de crecimiento o de migración de las células de la cresta neural (tabla 39). Por un lado, el gen *VgII2a* pertenece a una familia de cofactores transcripcionales implicados en gran variedad de procesos del desarrollo. *VgII2a* es necesario para la supervivencia de las células de la cresta neural dentro del arco faríngeo. Una alteración en la expresión de este gen se asocia a un aumento de la muerte celular en el arco faríngeo y a anomalías en el desarrollo craneofacial en el

pez cebra (Johnson *et al.*, 2011). En humanos, se han descrito mutaciones en *VgII2* en pacientes con displasia craneometafisaria, trastorno que causa, entre otros defectos, hiperostosis de los huesos de la cara (Iughetti *et al.*, 2000). Por otro lado, el gen *GJAI* codifica para una proteína de unión conocida como conexina 43. Esta proteína se expresa de forma abundante en las células de la cresta neural y en el miocardio ventricular, por lo que se le ha otorgado un papel importante en las cardiopatías congénitas, sobre todo en las anomalías del tracto de salida. Se han descrito mutaciones en homocigosis en el gen *GJAI* en pacientes con displasia oculodentodigital, un trastorno que cursa con dismorfias craneofaciales y de miembros, neurodegeneración e hipoacusia (Paznekas *et al.*, 2003). Aunque los defectos cardíacos en este trastorno son raros, se han descrito en estos pacientes anomalías de la conducción cardíaca, como la taquicardia ventricular y el bloqueo atrioventricular (Huang *et al.*, 2011). En este sentido, merece la pena resaltar que aunque la paciente XF2296 no presenta ninguna cardiopatía congénita, a raíz del tratamiento con concerta®, instaurado para tratar el déficit de atención, empezó con crisis de taquicardias. Si bien es cierto que uno de los efectos adversos poco frecuentes del concerta® pueden ser las palpitaciones, en esta paciente esta reacción adversa medicamentosa podría haberse visto favorecida o potenciada por la afectación de genes como el *GJAI* o el gen *PLN*, éste último regulador de la función cardíaca, y asociado a una forma de miocardiopatía dilatada.

Discusión

Tabla 39. Pacientes con la secuencia RHO y con variantes de dosis consideradas patológicas.

Se muestran los genes contenidos en esas regiones, en los que se ha publicado su participación en algún proceso implicado en el crecimiento, la diferenciación o la migración de células de la cresta neural (el código de colores en los genes indica la base de datos de la que se han obtenido: naranja para STRING, verde para NCBI y negro para PubMed).

Paciente	Tipo de pCNV	Inicio y fin de la CNV en pb (Hg18)	Gen	Fuente bibliográfica
CGM2067	del	(chr1: 0-3873000)	MIRN200B, MIRN429	Renthal <i>et al.</i> , 2010
			<i>ATAD3A</i>	Byron <i>et al.</i> , 2012
CGM1353	del	(chr1: 167024416- 172150939)	<i>DVLI*</i> , <i>HES5</i>	NCBI: pathway WP2064
			<i>PRDX6</i>	Byron <i>et al.</i> , 2012
CGM1525	del/ dup	(chr4: 0-1323000/ 1379000- 2472000)	<i>FGFR3</i> (duplicado)	NCBI: pathway WP2064
XF2296	del	(chr6: 117561349- 125021400)	<i>VgII2a</i> <i>GJA1*</i>	Jonhson <i>et al.</i> , 2011 Huang <i>et al.</i> , 2011
CGM2412	del	(chr7: 72332743- 74616901)	<i>EIF4H</i>	Byron <i>et al.</i> , 2012

CGM2733	dup	(chr17: 116343-4393321)	<i>RPAI, YWHAE, PRPF8, MYBB1A, KIAA0664</i>	Byron <i>et al.</i> , 2012
XF2789	del	(chr 17: 43612631-44213267)	<i>HOXB1</i>	NCBI: pathway WP2064
CGM2494	del	(chr21: 26099513-29452773)	<i>CCT8</i>	Byron <i>et al.</i> , 2012

del: delección

dup: duplicación

NCBI: pathway WP2064:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/672460>

* Relacionado con la regulación de las células de la cresta neural implicadas en el desarrollo embriológico cardíaco (Hamblet *et al.*, 2002).

* Codifica para la proteína conexina 43 que se localiza de forma abundante en el miocardio ventricular.

En conclusión, hay suficientes evidencias publicadas en la literatura que justifican y apoyan la relación entre los genes contenidos en las ocho pCNVs asociadas a la tríada RHO y la neurocristopatía.

1.2.7 Obtención de un modelo predictivo.

En 2001, de Vries y colaboradores publican un listado de variables clínicas a las que asignan una puntuación que facilita la preselección de casos con mayor probabilidad de ser portadores de reordenamientos subteloméricos crípticos (tabla 40). Estas variables, que suman un máximo de diez puntos, incluyen historia familiar de DI, retraso de crecimiento pre y postnatal, micro/macrocefalia, la presencia de tres rasgos dismórficos faciales y defectos congénitos como anomalías de las manos, cardiopatía e hipospadias con o sin testes no descendidos.

Discusión

Tabla 40. Puntuación propuesta por de Vries y colaboradores para la selección de pacientes con sospecha de reordenamientos subteloméricos. Adaptado de Vries *et al.*, 2001.

Variables clínicas	Puntuación
Historia familiar de discapacidad intelectual: <ul style="list-style-type: none">• compatible con herencia mendeliana• no compatible con herencia mendeliana	1 2
Retraso crecimiento prenatal	2
Anomalías de crecimiento postnatal, para cada una de los siguientes 1 punto (máximo 2): microcefalia (1), talla baja (1), macrocefalia (1), talla alta (1)	2
≥ 2 rasgos dismórficos: hipertelorismo, anomalías nasales, anomalías de las orejas	2
Anomalías congénitas, para cada una de las siguientes 1 punto (máximo 2): anomalías de manos (1), cardiopatía (1), hipospadias ± testes no descendidos (1)	2

Este grupo establece en tres el punto de corte a partir del cual estaría indicado el estudio de reordenamientos subteloméricos. Para tres puntos obtienen una sensibilidad del 100% y una especificidad del 27%. Conforme aumenta el punto de corte, disminuye la sensibilidad y aumenta la especificidad, llegando a cifras de 11% y 99%, respectivamente, cuando los criterios clínicos alcanzan una puntuación igual o superior a nueve. Este modelo con dichas variables clínicas se ha utilizado, por algunos grupos de investigación, a lo largo de la última década para seleccionar pacientes susceptibles de ser estudiados por FISH, MLPA y *arrays* sin obtener rendimientos diagnósticos superiores al obtenido en nuestra serie. Sin embargo, este porcentaje parece superior al detectado por otros grupos que utilizan

como único criterio de selección de pacientes la discapacidad intelectual. Así por ejemplo, de Vries y colaboradores publican en 2005 una serie formada por 100 pacientes seleccionados según su puntuación (≥ 3 puntos) y obtienen un 10% de casos con trastornos genómicos asociados a patología. En otros grupos que hacen la selección clínica en base a esta puntuación, el rendimiento diagnóstico que obtienen es muy similar, en torno al 10-15% (Schoumans *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2007; Jaillard *et al.*, 2010). Sin embargo existen publicaciones de grupos que estudian “pacientes con discapacidad intelectual” sin ningún tipo de selección y obtienen porcentajes variables de casos con alteraciones, pero en general menores, entre un 3 a un 10% (Manolakos *et al.*, 2010; Engels *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, se ha realizado un análisis estadístico de las variables clínicas y genéticas para evaluar, por un lado, el modelo propuesto por de Vries en 2001, y por otro lado, proponer un nuevo modelo predictivo que permita seleccionar y estudiar pacientes susceptibles de presentar un trastorno genómico (delección y/o duplicación).

El análisis multivariante mediante regresión logística de las variables clínicas y genómicas asociadas a pCNVs en esta serie ha permitido establecer una selección de determinados rasgos clínicos en los pacientes que serviría para predecir aquellos casos con mayor riesgo de tener una pCNV. Cabe destacar que la mayoría de aspectos clínicos asociados en nuestra serie son diferentes a los publicados por de Vries en 2001.

La puntuación establecida con los resultados de la serie de 246 pacientes ha sido evaluada en una serie de seguimiento independiente, seleccionada con unos criterios clínicos diferentes y un rendimiento diagnóstico del 15,8%. Aplicando el modelo propuesto a dicha serie de seguimiento hemos obtenido una sensibilidad del 91% y una especificidad del 70%, para un punto de corte de tres puntos, lo que confirma la utilidad clínica-práctica de la puntuación propuesta.

Discusión

1.2.7.a Evaluación de la puntuación propuesta por de Vries en 2001.

Aunque la puntuación obtenida por de Vries se centra en la búsqueda de reordenamientos crípticos subteloméricos, dado que no existe ningún otro modelo publicado, se ha utilizado también para la búsqueda y detección de CNVs de localización intersticial. Se calculó la puntuación según de Vries en nuestra serie de pacientes. *A priori*, no se observaron diferencias entre los subgrupos de pacientes (existe un gran solapamiento entre pacientes con y sin pCNVs), por lo que la utilidad de esta puntuación para diferenciar pacientes con reordenamientos genómicos es mínima en nuestra serie. Aunque en promedio el grupo de pacientes con pCNVs presentan puntuaciones ligeramente más altas frente al grupo de pacientes con resultado normal, es precisamente en el subgrupo de pacientes con pCNVs de localización intersticial donde esta diferencia es estadísticamente significativa y no ocurre así en los pacientes con pCNVs subteloméricas tal como proponen de Vries y colaboradores. Lo que sí es cierto, es que los pacientes con alteraciones subteloméricas tienen en general más manifestaciones clínicas que los pacientes con alteraciones intersticiales. En nuestra serie esto es debido a que tanto el tamaño de la alteración como el número de genes es mayor en las alteraciones subteloméricas (tamaño medio de las pCNVs subteloméricas: 4.454.578pb; intersticiales: 3.780.867pb y número medio de genes en las pCNVs subteloméricas: 80; intersticiales: 50). La mayoría de alteraciones subteloméricas son reordenamientos complejos que implican pérdida y ganancia de dos regiones genómicas, mientras que la mayoría de las alteraciones intersticiales son simples. También hay que tener en cuenta otro factor que puede influir en una expresión clínica más grave en las translocaciones subteloméricas, y que puede explicarse por un mayor efecto posicional.

1.2.7.b Propuesta de un nuevo modelo predictivo.

El análisis estadístico realizado en el presente trabajo ha permitido obtener y puntuar un grupo de variables clínicas que componen un modelo aplicable a la priorización de los pacientes susceptibles de ser estudiados por *array* para la detección de trastornos genómicos. Este grupo está formado por 11 rasgos clínicos que permiten alcanzar un máximo de 11 puntos (tabla 41).

Tabla 41. Variables clínicas que forman el modelo predictivo propuesto para orientar cuándo se espera obtener un resultado normal o alterado mediante el estudio con *arrays*.

Variables clínicas		Puntuación	Puntuación por apartado
Rasgos dismórficos	Hipertelorismo	1	3
	Orejas de implantación baja	1	
	Implantación anómala de los dientes	1	
Defectos congénitos	Cardiopatía	1	5
	Si la cardiopatía es una CIV o presenta además una CIV, sumar 1 punto	1	
	Anomalías dedos	1	
	Si la anomalía son los dedos afilados o además los presenta, sumar 1 punto	1	
	Anomalías genitales	1	
Rasgos neurológicos	Hipertonía en el recién nacido	1	3
	Retraso del desarrollo	1	
	Agresividad	1	

Esta tabla es la misma que la tabla 35 que se vuelve a situar aquí para facilitar la lectura y la discusión.

Discusión

Estas variables hacen referencia a características clínicas de los pacientes que podemos dividir en varios apartados. Dos de estas manifestaciones clínicas son solapantes a las propuestas con anterioridad por de Vries, como el hipertelorismo o la cardiopatía congénita. En comparación con el modelo propuesto por de Vries en 2001, algunos de los que proponemos son rasgos más generales, como las anomalías genitales; y otros, sin embargo, son rasgos más específicos, como la comunicación interventricular o los dedos afilados. También cabe destacar otras variables hasta ahora no propuestas, como la hipertonía en el recién nacido y la valoración de trastornos de conducta como la agresividad.

El modelo propuesto se ha evaluado en una serie de seguimiento formada fundamentalmente por pacientes con otro perfil clínico. Se trata de 101 pacientes, la mayoría con trastorno del espectro autista asociado a otros rasgos clínicos (dismorfias faciales o defectos congénitos) o con antecedentes familiares de trastornos del neurodesarrollo. El rendimiento diagnóstico del *array* en estos pacientes fue de 15,8%, superior al publicado en otras series (Schaefer y Mendelsohn 2013). En esta serie de seguimiento se calculó la puntuación propuesta, teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en el apartado 1.4.5 de los resultados, y con un punto de corte superior o igual a tres puntos. Se obtuvo una sensibilidad del 91% y una especificidad del 70%, lo que otorga una gran robustez al modelo propuesto. Tan sólo hubo un caso con resultado genético alterado y puntuación inferior a tres. Se trata de una paciente (003298), de tres meses de edad, con un cuadro polimalformativo que recuerda en parte al síndrome de Cornelia de Lange. Uno de los límites del modelo propuesto, es su aplicación en pacientes de corta edad. En los recién nacidos o en los pacientes con escasos meses de vida, hay que tener presente que no se podrán valorar tres de las variables clínicas propuestas en el modelo predictivo: la implantación anómala de los dientes, el retraso del desarrollo, y las alteraciones de la conducta como la agresividad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el ingreso en una sala de Pediatría de un neonato con un cuadro patológico (muchas veces con

una cardiopatía congénita) obliga a solicitar estudios genéticos que hasta hace relativamente poco, incluían el cariotipo y, en numerosas ocasiones, el estudio de síndromes de microdelección (incluido el síndrome de DiGeorge). La sustitución de estas dos técnicas por el estudio con *array*-CGH en los neonatos polimalformados sin un diagnóstico clínico establecido, permite aumentar el porcentaje de diagnóstico genético en estos casos, que se sitúa, según el grupo de Lu y colaboradores, alrededor del 20% (Lu *et al.*, 2008). En nuestra serie, de los 246 pacientes, tan sólo cinco tenían menos de cuatro meses, la mayoría de ellos con una puntuación baja (dos puntos) según el modelo que proponemos. El estudio con *array*-CGH permitió el diagnóstico genético en dos de ellos (CGM1387 y CGM2292). Sería necesario, por tanto, plantear estudios como el que se ha realizado en el presente trabajo en series de neonatos o pacientes de pocos meses, con el fin de poder obtener unos criterios clínicos que orienten hacia el tipo de estudios genéticos a realizar en estos casos.

Cuatro de las variables clínicas propuestas en el modelo predictivo se pueden relacionar a través de la nueva secuencia clínica indicativa de neurocristopatía, propuesta en el apartado 1.2.6 de la discusión. Se trata del hipertelorismo, las orejas de implantación baja, las cardiopatías congénitas y la agresividad. Esto podría estar relacionado con el hecho de que los procesos de diferenciación y migración de células derivadas de la cresta neural son especialmente susceptibles a sufrir alteraciones dado el número elevado de genes y elementos reguladores, muchas veces sensibles a dosis, que participan en los mismos (NCBI:pathwayWP2064:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/672460>). Respecto al resto de variables que conforman el modelo, hay que tener en consideración varios aspectos. Por un lado, en referencia a las anomalías de los dedos, sobre todo de los dedos 2-5 de las manos, la mayoría de las veces fáciles de detectar a simple vista, son después de los trastornos de crecimiento, el defecto congénito más frecuente en nuestra serie. Por otro lado, es importante resaltar que aunque son pocos los casos con anomalías genitales, en poco más de la mitad de ellos se ha detectado un reordenamiento genómico,

Discusión

esto es, en 20 de los 37 pacientes con alguna anomalía genital. No se ha publicado hasta el momento ningún artículo que analice la relación en conjunto de muchos de estos rasgos clínicos con la presencia o ausencia de pCNVs en este tipo de pacientes. Nos encontramos por tanto, ante un patrón clínico novedoso, consistente y que puede resultar útil en la evaluación clínico-genética de un paciente con trastorno del neurodesarrollo.

La aplicación del modelo clínico predictivo propuesto a la serie del presente trabajo pone de manifiesto una especificidad del 51% y una sensibilidad del 77% para una puntuación ≥ 3 a tres, mayor a la obtenida con la puntuación propuesta por de Vries (57%), que hasta el momento es la única que se conoce. Sería útil plantear, a corto plazo, estudios enfocados hacia el conocimiento de las repercusiones clínicas de los reordenamientos genómicos detectados mediante *arrays*, sobre todo, teniendo en cuenta el rumbo que están tomando los estudios genéticos en los últimos tiempos, enfocados hacia la secuenciación masiva.

1.3 Factores de predisposición.

1.3.1 Duplicaciones segmentarias.

En general, los estudios de series de pacientes mediante *arrays*, muestran que son más frecuentes los casos con pCNVs no flanqueadas por duplicaciones segmentarias. En nuestra serie, se han detectado siete casos donde las pCNVs se localizaban en regiones ricas en duplicaciones segmentarias en ambos lados, siendo posiblemente el mecanismo de producción de dichas pCNVs la recombinación homóloga no alélica. Por este mecanismo se han descrito más deleciones que duplicaciones (en nuestro caso son cuatro deleciones y dos duplicaciones). En el resto de casos de nuestra serie, no se han observado duplicaciones segmentarias flanqueantes a las pCNVs, por lo que su mecanismo de producción podría ser otro como la

fragmentación y la reparación anómala del ADN durante la espermatogénesis.

1.3.2 Género de los pacientes.

La discapacidad intelectual afecta entre un 30-50% más a varones que a mujeres (Stevenson *et al.*, 2000). Además de presentar distinta prevalencia, también se han descrito diferencias significativas en la evolución y la gravedad, en función del género. Aunque los factores biológicos y/o ambientales que subyacen a estas funciones género-específicas siguen sin estar claros, se centran básicamente en cuatro puntos clave que abarcan factores anatómicos, hormonales, genéticos y epigenéticos.

El desarrollo fetal masculino es más susceptible del daño cerebral precoz. En mujeres, el volumen del cerebro es menor pero con mayor tamaño del cuerpo calloso y mayor número de conexiones interhemisféricas, que ofrecen más robustez al cerebro femenino. Además, estudios morfométricos cerebrales muestran diferencias en el volumen cortical de varones y mujeres en localizaciones concretas de la sustancia gris. Estas sutiles aunque consistentes diferencias resultan ventajosas para la mujer en áreas como la comunicación y la emoción (Knickmeyer *et al.*, 2013).

Entre los factores biológicos posibles, se cree que los niveles de hormonas sexuales pueden desempeñar un importante papel, ya que difieren entre hombres y mujeres (andrógenos frente a estrógenos). Estas diferencias son particularmente relevantes durante el desarrollo fetal y neonatal, afectando al neurodesarrollo para producir las diferencias sexuales en el comportamiento, la cognición, la estructura y la función del cerebro (Baron-Cohen *et al.*, 2011). Variaciones en la concentración de testosterona fetal detectadas en el líquido amniótico, podrían explicar diferencias de género en áreas clave como el comportamiento y la cognición en la población general, así como las diferencias observadas en las relaciones sociales y los intereses restringidos que muestran los pacientes con trastornos del espectro autista (Auyeung *et al.*, 2010). Las niñas con hiperplasia suprarrenal congénita, que tienen niveles altos de testosterona fetal, tienen niveles de CI menores que sus hermanas no afectas. Además, se ha

Discusión

demostrado que el tratamiento prenatal con dexametasona en estas niñas mejora las funciones cognitivas, sociales y emocionales.

Clásicamente, los factores genéticos que explican las diferencias en la discapacidad intelectual en varones y mujeres se han centrado en el cromosoma X. La discapacidad intelectual ligada al X (DILX), incluido el síndrome de X frágil, generalmente leve en mujeres, puede explicar parcialmente el mayor porcentaje de DI descrito en varones. Sin embargo, hoy en día se sospecha que estos genes conocidos de DILX no justificarían totalmente este exceso de varones, al menos como causas monogénicas. Se ha postulado que pueden existir polimorfismos genéticos en el X que afecten sutilmente a las capacidades cognitivas, pero sin causar directamente DI en la mayoría de los casos, y causando poca o ninguna disminución de la capacidad reproductiva. Estos alelos se traducirían en un abanico heterogéneo de DI sólo cuando se asocian con combinaciones genéticas claramente patológicas o de susceptibilidad o con determinadas condiciones ambientales (Mandel y Chelly 2004).

Recientemente se han publicado datos que indican que los procesos epigenéticos, como la metilación del ADN y las modificaciones de la cromatina, juegan un papel importante en la diferenciación cerebral en función del género del individuo. Se han descrito pequeñas variaciones específicas de género en la regulación génica. Por ejemplo, se ha observado una disminución de la expresión de *DNMT3b* implicado en la metilación del ADN en la amígdala (cerebro social) en recién nacidos varones (Jessen y Auger 2011). Otro ejemplo más clásico hace referencia a la impronta del cromosoma X; se ha sugerido que influye en el grosor y el volumen del córtex durante el desarrollo cerebral precoz (Lepage *et al.*, 2013). Variaciones epigenéticas podrían explicar por qué las niñas Turner que sólo tienen el X paterno tienen mejores habilidades verbales y un funcionamiento ejecutivo más alto que las niñas Turner que tienen el cromosoma X de origen materno (Perrin *et al.*, 2007). Según la teoría del cromosoma X, en las mujeres, el cromosoma X de origen paterno ofrecería protección frente a trastornos del neurodesarrollo, por tanto, los varones, que sólo disponen del cromosoma X de origen materno, estarían más expuestos (Baron-Cohen *et al.*, 2011).

En definitiva, las diferencias de género en la estructura cerebral, sobre todo cortical, varían de un modo complejo y altamente dinámico a través de factores biológicos, fundamentalmente hormonales, y ambientales como pueden ser las expectativas parentales o influencias culturales en el estilo de vida.

1.3.3 Origen parental de las pCNVs.

Las células germinales masculinas y femeninas pueden transmitir defectos genéticos que pueden condicionar o predisponer a enfermedades genéticas en la descendencia. Sin embargo, el origen parental de estos defectos parece que no ocurre al azar. Desde hace años, se conoce que las aneuploidías de los autosomas tienen preferentemente un origen materno (Hassold y Hunt 2001), mientras que las mutaciones y reordenamientos cromosómicos estructurales *de novo* se originan con mayor frecuencia en la espermatogénesis (Crow 2001; Sibbons *et al.*, 2012).

En general, ante la detección de una CNV en un paciente lo más habitual es estudiar la herencia de la misma, sin embargo, existen pocas publicaciones respecto al estudio del origen parental en el caso de que dicha CNV sea *de novo*. Si clasificamos las pCNVs en dos grupos, un grupo formado por las pCNVs que se sabe que están flanqueadas por duplicaciones segmentarias (DS) y otro grupo con las que no lo están, se ha sugerido que para las pCNVs con DS no hay diferencias en cuanto al origen parental (Thomas *et al.*, 2006). En cambio, en las pCNVs sin DS se ha observado que mayoritariamente son de origen paterno (en una relación 2:1). En nuestra serie, en los casos con pCNVs no recurrentes (sin DS) en los que se pudo estudiar el origen parental se observó que 16 pCNVs *de novo* eran de origen paterno frente a 6 de origen materno. Además, esta diferencia todavía es mayor en el caso de las pCNVs que se localizan en las regiones subteloméricas. El origen preferentemente paterno de las pCNVs *de novo* no recurrentes, tan sólo se ha demostrado anteriormente por dos grupos: el grupo de la Dra. Heir-Kwa en 2011, que también concluyen que, independientemente del tamaño y tipo de CNV (delección o duplicación), mayoritariamente (en una relación 2:1) las pCNVs no flanqueadas por DS son de origen paterno; un estudio muy similar

Discusión

publicado en 2012 (Sibbons *et al.*, 2012) llega a la misma conclusión respecto al origen de las CNVs, aunque en esta publicación, la mitad de los casos estudiados son reordenamientos visibles citogenéticamente. Por tanto, deben existir mecanismos específicos de la línea germinal masculina que expliquen la aparición preferencial de microdeleciones y microduplicaciones no recurrentes a través de la línea paterna. Hay que tener en cuenta que las alteraciones por recombinación sólo se producen en meiosis, aunque puede ser distinta en diferentes regiones, se produce por igual en mujeres y varones. Sin embargo, las alteraciones por rotura del ADN se producen más en mitosis, aumentando la tasa de mutación por tanto con la edad paterna, como se discute más adelante.

El acúmulo de lesiones en el ADN durante la espermatogénesis puede deberse a varios factores. La capacidad de reparación del ADN disminuye durante la última parte de la espermatogénesis, al contrario de lo que ocurre en el ovocito, cuya capacidad de reparación del daño producido en el ADN no sólo permanece a lo largo de todo el proceso de la ovogénesis, sino que además ha de proveer los mecanismos de reparación de ambos genomas parentales tras la fertilización (Marchetti *et al.*, 2007). El espermatozoide no tiene mecanismos de reparación del ADN durante el almacenamiento y tránsito a través del epidídimo y en el post eyaculado, sino que la reparación dependerá del ovocito y del preembrión. Por tanto, el efecto de la fragmentación que sufre el ADN espermático, durante el remodelado y empaquetado de la cromatina, dependerá básicamente de dos efectos combinados. Por un lado, del daño de la cromatina de los espermatozoides y por otro lado, de la capacidad de los ovocitos para repararlo (González-Marín *et al.*, 2012). La fragmentación del ADN espermático, tanto de cadena simple como doble, puede producirse en cualquier fase de la espermatogénesis durante el empaquetamiento de la cromatina: acetilación de histonas a través del “espermatoproteosoma” PA200 (Khor *et al.*, 2006, Quian *et al.*, 2013), protaminación, compactación y elongación de espermátides. Se han descrito causas intrínsecas y extrínsecas que producen fragmentación del ADN (González-Marín *et al.*, 2012, Wyrobek *et al.*, 2006). Entre las causas intrínsecas destacan la maduración anómala de las espermátides, la apoptosis aberrante, la ratio protamina 1 y 2 alterada, el estrés oxidativo; y entre las causas extrínsecas hay que tener en cuenta las técnicas de reproducción

asistida, las infecciones genitourinarias, los periodos cortos de abstinencia, la temperatura aumentada de los testículos, tratamientos como la quimio y la radioterapia, la exposición a tóxicos medioambientales y la edad avanzada a la paternidad, que además se asocia directamente con un aumento significativo de la expresión de biomarcadores de apoptosis precoz (Colin *et al.*, 2010) y con alteraciones epigenéticas como la metilación del ADN y la modificación de histonas (Houshdaran *et al.*, 2007). En definitiva, la recombinación homóloga no alélica puede ser el mecanismo mayoritario de producción de reordenamientos recurrentes de origen paterno y materno. En cambio, tanto las causas intrínsecas como extrínsecas que favorecen la fragmentación del ADN espermático constituyen mecanismos masculino-específicos que podrían explicar el origen parental preferencial paterno de las pCNVs *de novo* no recurrentes.

1.3.4 Edad de los progenitores.

No se han observado grandes diferencias en la edad de los progenitores en la serie global de 246 pacientes respecto a la edad de la población general a la maternidad y a la paternidad. Sin embargo, si nos centramos en el grupo de progenitores de pacientes con pCNVs *de novo*, se pueden remarcar varios aspectos. Al agrupar las pCNVs según estén o no flanqueadas por DS, tal como se menciona en el apartado anterior, no se observan diferencias en la edad de los progenitores de los pacientes con pCNVs con DS. Sin embargo, los padres de pacientes con pCNVs *de novo* no recurrentes y de origen paterno tienen una edad a la paternidad levemente superior comparada tanto con el resto de grupos de pacientes, como con la población general. Además la edad media de los padres en estos dos grupos de pacientes (32,14 años para los padres de pacientes con pCNVs con DS y 34,15 años para los que no tienen DS) es muy similar a la publicada por Hehir-Kwa y colaboradores en 2011 (32,68 años frente 34,16 años), que son el único grupo que ha estudiado este factor de predisposición en pacientes con pCNVs.

Varios estudios han demostrado una alteración de los parámetros que miden la calidad del espermatozoides y la fertilidad (concentración, movilidad

Discusión

y morfología) con la edad paterna avanzada (Kidd *et al.*, 2001; Eskenazi *et al.*, 2003), sin embargo, muchos de los mecanismos biológicos que subyacen a este proceso siguen siendo poco conocidos. Además, estos parámetros proporcionan una visión general del esperma pero no informan acerca de la integridad del ADN, fundamental para la reproducción y considerado, desde hace décadas, como un marcador independiente de fertilidad (Evenson *et al.*, 1980). No está claro si el problema surge de las células madre progenitoras de espermatogonias (por ejemplo mutaciones), o del nicho somático presente en el testículo (que consiste en células de Sertoli, de Leydig y miodides peritubulares), o de una combinación de los dos (Paul y Robaire 2013). Los datos actuales sugieren que ambos factores tienen un papel en la pérdida de células germinales asociada a la edad. Lo que está claro, en cambio, es la evidencia de edad avanzada y determinados problemas genéticos en la descendencia, como por ejemplo mutaciones puntuales o alteraciones epigenéticas. La edad avanzada, sobre todo la paterna, se ha asociado con un aumento de trastornos genéticos como mutaciones *de novo*, que se transmiten con una herencia autosómica dominante, que incluyen numerosos síndromes como por ejemplo el de Pfeiffer, Crouzon, Apert, Muenke, Noonan, Costello, acondroplasia, MEN2A y MEN2B (Goriely *et al.*, 2009, Yoon *et al.*, 2005, Goriely *et al.*, 2010, Tiemann-Boege *et al.*, 2012). Pero también se relaciona con trastornos neuropsiquiátricos de etiología compleja como el autismo, y otros, asociados a alteraciones epigenéticas como la esquizofrenia (Perrin *et al.*, 2007, Toriello y Meck 2008, Kong *et al.*, 2012). En 2001, Malaspina y colaboradores demostraron que la incidencia de la esquizofrenia aumenta progresivamente conforme aumenta la edad del padre en el momento de la paternidad, siendo el riesgo 2-3 veces superior en padres de 45-49 años de edad. También la incidencia de autismo es seis veces superior en la descendencia de padres entre 40-50 años comparada con padres de hasta 30 años (Reichenberg *et al.*, 2006). El coeficiente intelectual es menor en la descendencia de padres de edad avanzada, independientemente del efecto de la edad materna (Malaspina *et al.*, 2005). Se ha sugerido que cuando la edad del padre a la paternidad es mayor de 40 años, se asocia con una mayor probabilidad de que la descendencia necesite algún tipo de apoyo o de educación especial en el colegio (Mannerkoski *et al.*, 2007).

En nuestra serie de pacientes hemos observado que los progenitores, tanto madres como padres, de los pacientes sin CNVs tienen edades superiores a la maternidad y a la paternidad que la población general. Este hecho podría muy bien estar relacionado con la presencia de alteraciones genéticas diferentes a los reordenamientos tipo pCNVs, pero relacionados con edades avanzadas tanto a la maternidad como a la paternidad (este resultado es estadísticamente significativo en madres $p = 0,004$), podría ir encaminado a la búsqueda de mutaciones puntuales *de novo* o cambios epigenéticos. Estas anomalías podrían explicar un porcentaje de casos en el grupo de pacientes en los que no se ha detectado ninguna CNV y cuyos progenitores tienen una edad a la paternidad ligeramente superior a la población general. Por otra parte, no se puede excluir que determinados “factores ambientales” relacionados con edad avanzada, como por ejemplo obstétricos, puedan suponer un factor de riesgo añadido a la discapacidad intelectual y otras anomalías congénitas.

1.3.5 Riesgo de alteraciones recurrentes.

La mayoría de las CNVs detectadas con *array*-CGH surgen *de novo* en los pacientes. No obstante, los resultados muestran un 38% de pacientes (28 casos) con CNVs heredadas. Este porcentaje, nada despreciable, justifica la necesidad de caracterizar e identificar en las familias a los portadores de CNVs, generalmente equilibradas, dado el elevado riesgo de tener descendencia con TND, y poder ofrecer de este modo un correcto asesoramiento genético. En la mayoría de los casos heredados, los progenitores son sanos, sólo tres de ellos presentaban una discapacidad intelectual leve. En estos tres casos se detectó la misma CNV patológica en el paciente y en el progenitor. Básicamente, existen cuatro mecanismos diferentes que explican la transmisión familiar de las CNVs de progenitores sanos a niños con TND:

- pCNVs localizadas en el cromosoma X en cuatro varones y una mujer. En los cuatro pacientes varones se observó que las madres portadoras tienen una inactivación sesgada del cromosoma X. En el caso de la mujer (CGM1606) es portadora de una duplicación en Xp22.2 heredada de su madre

Discusión

considerada como una *pipCNV* y una deleción patológica en Xq28 *de novo* de origen paterno, que igualmente asocia inactivación preferencial del cromosoma X con la deleción.

- Translocaciones subteloméricas con ganancia y pérdida de dos regiones cromosómicas diferentes. En nueve pacientes con este tipo de reordenamiento, uno de los progenitores era portador equilibrado de la translocación que transmitieron de forma desequilibrada a su descendencia.
- Translocaciones insercionales (TI). Se detectaron dos duplicaciones (XF977 y XF2019) que se habían considerado a priori originadas *de novo*, en realidad eran heredadas de forma desequilibrada de un progenitor, siendo éste portador equilibrado de una TI (López-Carrasco *et al.*, 2013). En el caso del paciente XF977 se detectó una duplicación de 4,95Mb en 19p13.3, considerada *de novo* porque en el estudio de los progenitores mediante marcadores microsatélite se obtuvo una dosis normal. Un estudio de *array*-CGH realizado, en otro centro, a un primo del paciente también por presentar TND, mostró la misma duplicación, por lo que se investigó el origen y el mecanismo de transmisión de esta alteración. El estudio genético mostró que las madres de ambos eran portadoras de una TI intracromosómica. Se realizó un extenso estudio genético familiar y se pudo comprobar que en la familia había otros 11 portadores de la TI equilibrada y un tercer caso con TND que presentaba el cromosoma 19 derivado de la TI con la duplicación (TI desequilibrada). En el caso del paciente XF2019, se detectó una duplicación de 3Mb en 8q12, que se había considerado *de novo* a partir del resultado obtenido con el estudio de los progenitores mediante marcadores microsatélites. Tanto el paciente como su padre eran portadores de una translocación aparentemente equilibrada [t(4;7)(q11;q21)]. Inicialmente se pensó que la duplicación no guardaba relación con la translocación familiar. Pero los estudios mediante FISH mostraron en realidad una translocación en el padre que implicaba a tres cromosomas: en el punto de corte del cromosoma 4 derivado se había insertado el fragmento del cromosoma 8, mientras que su hijo había

heredado de forma desequilibrada, por un lado, los dos cromosomas 8 normales, y por otro lado, los cromosomas 4 y 7 translocados con un fragmento del 8 insertado en el derivado 4.

Estos resultados muestran que la frecuencia de translocaciones insercionales es mayor a lo estimado previamente (1:80.000 según Van Hemel y Eussen 2000). Dos estudios recientes e independientes, centrados en la búsqueda de TI, muestran una frecuencia aproximada para dicho evento de 1:500 (Kang *et al.*, 2010; Neill *et al.*, 2011). Para Nowakowska y colaboradores (Nowakowska *et al.*, 2012), la frecuencia de las TI se sitúa en torno al 2% de todas las CNVs aparentemente *de novo*. Está más que justificada la necesidad de caracterizar mediante FISH los reordenamientos que son detectados mediante *array*-CGH e identificar portadores equilibrados de TI (Miller *et al.*, 2010), para, por un lado ofrecer un correcto asesoramiento genético, así como diagnóstico prenatal o preimplantacional a la familia dado el elevado riesgo de recurrencia que presentan; y por otro lado, establecer la frecuencia real de este tipo de eventos insercionales.

Dado el riesgo de recurrencia del 50% tanto para las translocaciones subteloméricas como para las insercionales, es frecuente encontrar en estas familias, además de portadores equilibrados sanos, varios miembros con el desequilibrio genómico. Como ejemplo, para las TI, se ha comentado anteriormente la familia del paciente XF977 con 3 casos con TND. El estudio de las translocaciones crípticas subteloméricas permitió la detección en la familia del paciente CGM1160 de una prima, también con DI, portadora del desequilibrio genómico complementario al caso índice.

- CNVs de penetrancia incompleta o expresión variable. La mayoría de estas CNVs (siete de los nueve casos) se localizan en el brazo corto del cromosoma 16. En estos nueve pacientes, el hecho de que los progenitores sanos sean portadores de la misma pCNV que sus hijos, descrita también en población sana, hace pensar que se trate realmente de un factor de

Discusión

predisposición a trastornos del neurodesarrollo y que tal vez sea necesario un segundo factor, todavía desconocido, que cause la patología. En nuestra serie de pacientes se han detectado tres casos que además de la CNV en 16p presentan otra CNV en una localización cromosómica diferente. En dos de estos casos la CNV es claramente patogénica mientras que en el tercero no está clara su interpretación. En cualquier caso, la presencia de varias CNVs en un mismo paciente seguramente repercute en la expresión del fenotipo.

Se han descrito diversos “puntos calientes” de inestabilidad cromosómica que producen alteraciones genómicas recurrentes en pacientes con trastornos del neurodesarrollo. Se trata de microdeleciones y microduplicaciones en 16p11.2 y 16p13, asociadas a un amplio rango de trastornos del neurodesarrollo incluyendo autismo, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, discapacidad intelectual, esquizofrenia y epilepsia, todas ellas con una base genética común y manifestaciones clínicas solapantes (Weis *et al.*, 2008; Ullmann *et al.*, 2007). Además, hay que tener en cuenta que el brazo corto del cromosoma 16 es excepcional desde la perspectiva evolutiva, dado que hay un exceso de segmentos duplicados, que han surgido recientemente en la evolución, siendo específicos de simios y humanos (Eichler y Zimmerman 2008). En el último año, se ha descrito en esta región cromosómica un “efecto autosómico de sesgo ligado al género” (Tropeano *et al.*, 2013). Este grupo observa que los trastornos del neurodesarrollo asociados a CNVs en 16p13.11 se detectan en exceso en pacientes varones frente a mujeres. Se trata, en la mayoría de casos, de duplicaciones cromosómicas heredadas de las madres con un amplio espectro fenotípico que incluye también la normalidad. En nuestra serie tan sólo se han encontrado tres CNVs en 16p13 siendo los tres casos duplicaciones heredadas, aunque no cumplen el resto de premisas, ya que se trata de dos mujeres y prevalece la herencia paterna.

1.4 Proteínas que actúan como “interruptores moleculares” en la transmisión de señales celulares y su importancia en la modulación de la conducta y el comportamiento humano.

El análisis de enriquecimiento funcional para cada subgrupo de pacientes en función de las nueve variables clínicas inicialmente seleccionadas, ha permitido la detección de siete funciones moleculares significativas, que están caracterizando a un grupo de genes conservados contenidos en pCNVs de 38 pacientes con trastornos de conducta y de comportamiento, frente al resto de genes del genoma. Estos siete GOs hacen referencia a 96 genes con alto grado de conservación que participan en funciones en las que intervienen proteínas del grupo de las proteinquinasas (fundamentalmente serina/treonina quinasa) y de la superfamilia de la guanosinatrifosfatasa (GTPasa). Ambos grupos de proteínas sirven como “interruptores moleculares” para una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares.

Las proteinquinasas son enzimas que modifican, mediante fosforilación, otras proteínas que actúan como sustratos, y por consiguiente activándolas o desactivándolas. Ocupan, por tanto, un lugar central en la cascada de respuesta ante una señal química que llegue a la célula, esto es, sirven de puente entre un segundo mensajero, y las respuestas celulares al estímulo (por ejemplo activación o desactivación de factores de transcripción). Se conocen un buen número de genes que codifican para proteinquinasas de serina/treonina, que se han relacionado con trastornos del neurodesarrollo (tabla 42). Como ejemplo tenemos el gen *RPS6KA3*, responsable del síndrome de Coffin-Lowry, en el que son habituales los trastornos de conducta, incluso entre las mujeres portadoras (Marques Pereira *et al.*, 2010).

Discusión

Tabla 42. Listado de genes obtenido tras realizar una búsqueda en la base de datos OMIM con los criterios de búsqueda trastorno del neurodesarrollo y quinasas de serina/treonina.

Gen	Localización cromosómica	OMIM
<i>HDAC4</i>	2q37.3	605314
<i>CTNNB1</i>	3p21	116806
<i>CASR</i>	3q13	601199
<i>NFKB1</i>	4q24	164011
<i>CAMK4</i>	5q21.3	114080
<i>CDKL3</i>	5q31	608459
<i>IL6</i>	7p21	147620
<i>RAC1</i>	7p22	602048
<i>BRAF</i>	7q34	164757
<i>KCNK9</i>	8q24.3	605874
<i>GRIN1</i>	9q34.3	138249
<i>FGFR2</i>	10q26	176943
<i>DIO2</i>	14q24.2q24.3	601413
<i>CDK5R1</i>	17q11.2	603460
<i>MAP2K2</i>	19p13.3	601263
<i>DMPK</i>	19q13.3	605377
<i>DYRK1A</i>	21q22.13	600855
<i>WNK3</i>	Xp11.22	300358
<i>CASK</i>	Xp11.4	300172
<i>CDKL5</i>	Xp22	300203
<i>RPS6KA3</i>	Xp22.2p22.1	300075
<i>PAK3</i>	Xq23	300142
<i>FLNA</i>	Xq28	300017
<i>IKBK</i>		300248

Las GTPasas son una numerosa superfamilia de enzimas con algo más de 300 proteínas estructuralmente relacionadas y que regulan diversas funciones biológicas como la transducción de señales, la motilidad celular y el transporte intracelular. Son enzimas de tipo hidrolasa que pueden unirse e hidrolizar la molécula guanosíntrifosfato (GTP). La unión de la GTPasa con su sustrato, el GTP, ocurre en una región de la enzima altamente conservada denominada dominio G y es una región común a todas las GTPasas. La GTPasa está activa cuando está unida al GTP e inactiva cuando está unida al GDP. Se conocen mutaciones en distintos miembros de esta familia de enzimas que pueden ocasionar trastornos del neurodesarrollo (tabla 43). Un miembro prototípico de esta familia es la GTPasa monomérica llamada RAS. Las rasopatías son un ejemplo concreto y conocido de desregulación en rutas de señalización, en concreto en la vía de transducción de señal de RAS. Son un grupo de patologías causadas por mutaciones *de novo* en la familia de oncogenes *RAS*, que con frecuencia asocian trastornos de conducta englobados dentro del trastorno del espectro autista. La ruta de señalización *RAS/MAPK* está implicada en procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Las alteraciones genéticas que provocan la desregulación de esta vía, dependiendo de dónde se produzcan, pueden dar lugar a síndromes como neurofibromatosis tipo 1 (*NF1*), Noonan (*PTPN1*), Costello (*HRAS*), Leopard (*PTPN11*) y cardio-facio-cutáneo (*RAS*, *BRAF*, *MAP2K1/2*) entre otros. El producto del gen *RAS* activa las serina-treonina quinasas, que a su vez activan a proteinquinasas tipo mitógeno (*MAPK* o *MEK*). Los productos de *MEK* fosforilan entonces a sus dos sustratos, ERK1 y ERK2, que son a su vez, los productos de los genes *MAPK3* y *MAPK1* respectivamente (Adviento *et al.*, 2014). Entre un 25-35% de los pacientes con rasopatías presentan problemas sociales de atención y de conducta. Del mismo modo, la hiperactividad está presente hasta en el 60% de los pacientes con neurofibromatosis tipo 1.

Discusión

Tabla 43. Listado de genes obtenido tras realizar una búsqueda en la base de datos OMIM con los parámetros trastorno del neurodesarrollo y proteína de unión a GTP.

Gen	Localización cromosómica	OMIM
<i>SRGAP3</i>	3p25.3	606525
<i>SYNGAP1</i>	6p21.3	603384
<i>RAC1</i>	7p22	602048
<i>BRAF</i>	7q34	164757
<i>DOCK8</i>	9p24.3	611432
<i>TSC1</i>	9q34	605284
<i>HRAS</i>	11p15.5	190020
<i>EFTUD2</i>	17q21.31	603892
<i>RAB3A</i>	19p13.2	179490
<i>FGD1</i>	Xp11.21	300546
<i>ARHGEF9</i>	Xq11.1	300429
<i>OPHN1</i>	Xq12	300127
<i>RAB40AL</i>	Xq22.2	300405
<i>PAK3</i>	Xq23	300142
<i>ARHGEF6</i>	Xq26.3	300267
<i>GDII</i>	Xq28	300104
<i>RAB39B</i>		300774
<i>FLNA</i>		300017

En nuestra serie, los trastornos de comportamiento que presentan los pacientes son fundamentalmente hiperactividad, agresividad y alteraciones de conducta propias de los trastornos del espectro autista.

La relación entre genes y comportamiento es un tópico que siempre ha despertado gran interés. Los estudios de asociación han permitido la identificación de numerosas regiones genómicas relacionadas con determinados rasgos de conducta y de comportamiento. Pero los genes que subyacen a los mecanismos responsables de estas asociaciones permanecen en gran parte desconocidos. El estudio de las enfermedades humanas causadas por anomalías genómicas estructurales recurrentes, generalmente microdeleciones, ha permitido

establecer relaciones directas entre genes y comportamiento. Así por ejemplo, se han descrito determinados genes como *LIMK1* y *CSNK1E* asociados a las regiones cromosómicas que causan los síndromes de microdelección 7q11.23 y 22q13.1 respectivamente, y su implicación en el autismo y en trastornos psiquiátricos tipo ansiedad, agresividad, esquizofrenia y trastorno bipolar (Li *et al.*, 2009; Jabbia *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2008; Matsunaga *et al.*, 2012; Bryant *et al.*, 2012). Ambos genes codifican quinasas de tipo serina/treonina, el gen *LIMK1* regula la polimerización de la actina y, por tanto, la estructura del citoesqueleto y el gen *CSNK1E* fosforila numerosas proteínas, entre ellas algunas que participan en el ritmo circadiano. Desde hace años, también se conoce el riesgo incrementado (hasta 20 veces) para la esquizofrenia en el síndrome de delección 22q11.2 (Basset *et al.*, 2008). También las microdelecciones y microduplicaciones recurrentes en 16p11.2 se asocian con formas de autismo no sindrómico de desarrollo temprano con tendencia a problemas de comportamiento como la hiperactividad y la agresividad (Kumar *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2008). Uno de los genes candidatos en esta región (*MAPK3*) se ha asociado recientemente con un riesgo aumentado para trastornos tipo psicosis (Steinberg *et al.*, 2014). Además en los últimos tiempos están adquiriendo fuerza otros síndromes genéticos como la microdelección 3q29. Se trata de un trastorno con una gran heterogeneidad a nivel cognitivo y fenotipo psiquiátrico que incluye no sólo la esquizofrenia, sino también trastornos del humor, trastorno bipolar o rasgos autistas, además de ansiedad, agitación, hiperactividad y comportamiento agresivo (Carroll *et al.*, 2011). El gen *PAK2* se ha descrito como candidato relacionado con este fenotipo. Este gen es un miembro de la familia de las proteinquinasas que regula la morfología de la sinapsis y el complejo receptor del glutamato en la sinapsis mediante su acción sobre la remodelación del citoesqueleto de actina en la neurona. Alteraciones específicas en los receptores del glutamato se han asociado con el desarrollo de síntomas psicóticos (Quintero-Rivera *et al.*, 2010). La haploinsuficiencia de genes como *PAK2* en el paciente CGM784 podría ser la responsable de la hiperactividad y la agresividad que presenta. Existen por tanto hasta ahora escasas regiones cromosómicas concretas (3q29, 7q11.23, 16p11.2, 22q11.2 y 22q13.1) sobre las que existen publicaciones científicas acerca de su relación con los trastornos del neurodesarrollo que incluyen específicamente problemas de comportamiento o trastornos

Discusión

neuropsiquiátricos. Estas regiones descritas, están contenidas en las pCNVs de varios pacientes en nuestra serie, y por tanto se han puesto de manifiesto en el análisis de enriquecimiento funcional de genes realizado en función de la variable clínica trastornos de conducta (tabla 37 en resultados). Pero, excepto para estos genes, poco más se sabe sobre pCNVs y genes contenidos que puedan asociarse a trastornos de conducta en pacientes con discapacidad intelectual.

Los genes con funciones enriquecidas obtenidos tras el análisis funcional, que se encuentran alterados en nuestra serie de pacientes con pCNVs y trastornos de conducta, participan en gran variedad de procesos celulares como proliferación, crecimiento, migración/maduración neuronal (*LIMK1*), supervivencia celular, apoptosis, citoesqueleto (*PAK2*, *SEPT*), enzimas antioxidantes, ritmos circadianos (*CSNK1E*, *RASD1*), factores de transcripción, metabolismo energético (*STK25*), respuesta al estrés, homeostasis de la glucosa (*PIM3*), transporte vesicular (*RAB*) etc. (extraído de OMIM). En general, son enzimas modificadoras de otras proteínas (activación o desactivación) que sirven como “interruptores moleculares” en gran variedad de rutas de transmisión de señales pero con mecanismos de acción comunes. Cualquier alteración genética que provoque la desregulación de estas vías de señalización podría predisponer a trastornos de comportamiento. En modelos animales se ha demostrado que las anomalías de estas rutas de señalización son responsables de trastornos como la depresión (en caso de hiperfosforilación) y la ansiedad (en caso de hipofosforilación) (Kerner *et al.*, 2013). La hipótesis de un “contexto molecular alterado” en el seno de la sinapsis tripartita glutamatérgica (neurona presináptica, neurona postsináptica y astrocito) cobra cada vez más fuerza, teniendo en cuenta que los tratamientos dirigidos hacia estas dianas producen mejorías en los pacientes. En este sentido, el tratamiento con insulina intranasal supuso, aparentemente, una mejora en la hiperactividad y estado de atención de pacientes con síndrome de delección 22q13 (Schmidt *et al.*, 2009). Esta mejora en el control del comportamiento en la vida diaria podría estar relacionada con la recaptación de glutamato por los astrocitos mediante la regulación del metabolismo de la glucosa.

El cerebro está formado por neuronas y células gliales cuya relación es fundamental para mantener la homeostasis cerebral. La excitabilidad de las células nerviosas depende en gran medida del ácido glutámico, principal neurotransmisor excitador en el cerebro de mamíferos. Una alteración entre los sistemas neuro-gliales glutamatérgicos puede producir la muerte de las células nerviosas a través de un mecanismo excitotóxico. Este mecanismo se observa por ejemplo en algunas enfermedades neurodegenerativas como Huntington, Alzheimer y Parkinson (García y Massien 2004). La estimulación de las neuronas a través de la sinapsis glutamatérgica consiste básicamente en la despolarización de las terminales sinápticas y la liberación vesicular del glutamato de la terminal presináptica al espacio sináptico. Seguidamente, a través de los receptores de glutamato (ionotrópicos y metabotrópicos) de la membrana postsináptica, mediante canales de iones específicos y de proteínas G (mensajeros intracelulares) se produce la sinapsis excitatoria. Inmediatamente se lleva a cabo la captura de glutamato, principalmente por parte de los astrocitos, lo cual requiere energía, una molécula de ATP por molécula de glutamato transportada. Por tanto, la regulación de las vías de señalización intra y extracelular son centrales en la plasticidad neuronal. Son numerosos los genes que participan en este “contexto molecular”.

En este escenario, no sólo los genes más conservados durante la evolución tendrán repercusión sobre el comportamiento humano. Existen evidencias que sugieren que en el cerebro humano en desarrollo hay una proporción significativamente mayor de genes de reciente aparición. Muchos de estos genes se expresan en la corteza prefrontal, y otras partes recientes del cerebro humano, que están implicadas en el comportamiento cognitivo complejo (Zhang *et al.*, 2011). En este sentido, al eliminar en el análisis funcional el criterio de conservación génica, se observó un incremento superior a cuatro veces el número de genes relacionados con los trastornos de conducta para la función molecular que hace referencia a las proteinquinasas de tipo serina/treonina. Para la función molecular de proteínas de unión a GTP, este incremento es algo superior a tres veces. Entre este último grupo de genes, no tan conservados, se encuentra por ejemplo el *MECP2*. En un principio, este gen quedó fuera del análisis funcional inicial al no cumplir el criterio de conservación génica establecido

Discusión

mediante el valor omega. Sin embargo, es muy conocido el papel que juega este gen en el neurodesarrollo, especialmente en la etiología de muchos trastornos englobados en el espectro autista.

En conclusión, los resultados obtenidos con el análisis funcional en el grupo de pacientes con trastornos de conducta, con un enriquecimiento significativo de funciones celulares en las que participan proteínas implicadas en la regulación de las respuestas sinápticas a través de la fosforilación y la transducción de señales, apoya la idea de que este tipo de proteínas tienen un papel importante en el comportamiento humano. Esto parece claramente establecido para genes como por ejemplo *LIMK1*, *CSNK1E*, *MAPK12*, *PAK2* y *RAB39B*. Pero existen otros muchos genes localizados en las pCNVs de este grupo de pacientes con estas mismas funciones moleculares, que por tanto, podrían ser buenos genes candidatos en la modulación de la conducta y el comportamiento humano.

1.5 Otros estudios genéticos realizados en pacientes con array normal.

A lo largo de estos años, la valoración continua de los pacientes por parte de todos los profesionales implicados en el diagnóstico, ha permitido la identificación de otras alteraciones genéticas y epigenéticas causantes de trastornos del neurodesarrollo. Este diagnóstico genético, realizado tanto en otros centros como en nuestra propia Unidad, ha permitido conocer la causa de la discapacidad intelectual en siete pacientes en los que no se detectó ninguna CNV causal mediante el estudio con *arrays*. A continuación se muestra un listado de los casos junto con el diagnóstico:

- CGM1236: síndrome de Pallister-Killian (isocromosoma 12p en mosaico).
- CGM1254: síndrome de Nijmegen (test de fragilidad cromosómica) (Tomás *et al.*, 2011).
- CGM1484: síndrome de Sotos (alteración impronta gen *KCNQ10T1* desmetilado 75%, pérdida de patrón de impronta materna) (Mayo *et al.*, 2012).

- CGM478: síndrome de CHARGE (detectada mutación puntual gen CHD7).
- CGM858: síndrome de Coffin-Lowry (detectada mutación puntual gen RSK2).
- CGM2403: síndrome de Marshall-Smith (detectada mutación puntual gen NFIX).
- CGM2783: mutación puntual gen MED12 (asociado a formas de discapacidad intelectual ligado al cromosoma X).

Es de gran importancia la valoración clínica de otros síndromes de causa genética y epigenética en los casos en los que el estudio con *array* sea normal. Incluso, ante el hallazgo de una pCNV es necesaria la evaluación completa del paciente estableciendo una correlación adecuada entre el fenotipo y el genotipo. En ocasiones, una única alteración genética puede no ser la responsable del fenotipo completo del paciente. Este es el caso por ejemplo del paciente CGM991, en el que el estudio con *array* genómico detectó una duplicación patogénica en el cromosoma 14 (18832000-23660000, Hg18) (Monfort *et al.*, 2007). El estudio genético posterior puso de manifiesto la presencia de una disomía uniparental materna para dicho cromosoma. Dado que cada alteración de forma aislada no puede explicar por completo todos los rasgos clínicos, seguramente ambas anomalías genéticas contribuyen y modifican el fenotipo que presenta el paciente.

Por otra parte, podemos encontrarnos ante síndromes clínicos cuya patología no sólo se deba a la presencia de microdeleciones sino que también estén causados por mutaciones puntuales u otros mecanismos como alteraciones de la impronta, no detectables con el estudio con *arrays*. Este podría ser el caso de la paciente CGM1785 cuyo fenotipo recuerda al síndrome de Smith-Magenis. En este caso, con una puntuación de cinco según el modelo propuesto en el presente trabajo, y por tanto candidato al estudio con *arrays*, no se ha detectado ninguna pCNV causal, pero la patología que presenta la paciente podría deberse a la presencia de mutaciones puntuales no detectadas hasta el momento. Otro de los casos con estudio de *array* normal es el de la paciente CGM2031, con un cuadro clínico similar al síndrome de Cornelia de Lange y que también presenta una puntuación de cinco

Discusión

con el modelo clínico predictivo. Según los conocimientos actuales, la etiología de este síndrome se debe mayoritariamente a mutaciones en los genes *NIPBL*, *SMC3* y *SMC1A* aunque también se han descrito duplicaciones, que contienen los genes *NIPBL* y *SMC1A*, responsables de un cuadro clínico congénito multisistémico que recuerda al síndrome de Cornelia de Lange (Yan *et al.*, 2009).

Por otra parte, en aquellos casos en los que el array no detecta ninguna pCNV, hay que tener en cuenta otras variables como la existencia de antecedentes familiares. La presencia de varios casos de trastornos del neurodesarrollo en una misma familia puede servir como punto de partida, para orientar el estudio de la discapacidad intelectual hacia un trastorno de herencia ligada al cromosoma X o de herencia recesiva. En este sentido, la revisión y el análisis de los antecedentes familiares de discapacidad intelectual en la serie, permite observar una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,005$) en los pacientes con array normal frente a los pacientes con pCNVs *de novo*. El 53% de pacientes con array normal tienen antecedentes familiares de trastornos del neurodesarrollo, mientras que sólo el 18% de casos con pCNVs *de novo* tienen este tipo de antecedentes, que posiblemente no estén relacionados con la pCNV causante de discapacidad intelectual identificada en el paciente.

Analizando, por tanto, los antecedentes familiares de discapacidad intelectual en este 53% de pacientes con array normal (91 de 173 pacientes), podemos orientar el estudio de la discapacidad intelectual hacia dos vertientes:

- Trastorno del neurodesarrollo de herencia ligada al cromosoma X. El 13% de pacientes con array normal presenta antecedentes familiares de discapacidad intelectual compatibles con este patrón de herencia, en consecuencia podría ser recomendable, en este grupo de pacientes, el enfoque diagnóstico dirigido hacia estudios genéticos de búsqueda de mutaciones puntuales en genes del cromosoma X.
- Trastorno del neurodesarrollo de herencia autosómico recesiva. Existen cuatro pacientes incluidos en la serie que tienen un hermano que presenta un retraso del desarrollo muy similar al del caso índice, que se ha estudiado por array. Se trata de:

- Dos hermanos varones (X2403) con resultado normal.
- Dos hermanas mujeres (XF2012) con resultado normal.
- Dos hermanas mujeres (CGM2952) portadoras de una delección en 16p11 (Chr16:29581455-30104842, Hg18) heredada del padre y considerada como patológica de penetrancia incompleta.
- Un varón y una mujer (XF2711) portadores de una duplicación en 20q11 (Chr20:29352000-29657000, Hg18) heredada del padre que se consideró una variante polimórfica.

La presencia de dos hermanos con la misma patología sugiere que podría tratarse de un trastorno genético de herencia autosómico recesiva no identificado hasta el momento. De estas cuatro familias, sólo existe constancia de consanguinidad en una de ellas (XF2711).

Aunque en dos de las 4 familias se detectó una variante, la CNV, por sí misma, no justificaría completamente la clínica que presentan los pacientes:

- La paciente CGM2952 y su hermana presentan una disóstosis acrofacial tipo Catania. Aunque la delección 16p11 podría de alguna forma contribuir a la etiología de este trastorno, sobre todo considerando que existe una familia descrita con esta alteración genética y un fenotipo similar (Barge-Schaapveld *et al.*, 2011), seguramente existe otro u otros factores que influyen en el fenotipo de estas hermanas.
- El paciente XF2711 y su hermana son portadores de la misma duplicación que su padre, que se consideró como una variante polimórfica en el momento en que se realizó el estudio con el *array* genómico. La aportación continua de conocimientos y de publicaciones en el campo de las CVNs ha hecho que la interpretación de las mismas pueda variar a lo largo de los años. En concreto, en esta

Discusión

familia la reevaluación del caso ha hecho que la duplicación detectada en 20q11, que afecta a un gen (*IDI*) que podría estar implicado en la diferenciación neural (Lyden *et al.*, 1999). Todo esto, hace que esta duplicación sea considerada una variante de predisposición familiar a trastornos del neurodesarrollo que, seguramente, junto a otros factores, sea la causa de la discapacidad intelectual en estos hermanos.

1.6 Revisión y perspectiva del estudio de las variantes genómicas en la discapacidad intelectual.

La incorporación de la tecnología de los *arrays* como recurso diagnóstico en la rutina clínica ha supuesto una revolución técnica en el campo de la medicina. La implantación de los *arrays* está permitiendo un cambio de gran magnitud en el diagnóstico e investigación de distintas patologías, especialmente en el ámbito de los trastornos del neurodesarrollo como la discapacidad intelectual.

El número de avances y publicaciones sobre estudios con esta tecnología ha ido en aumento en los últimos años. La mayoría de los artículos publicados hasta el momento, en revistas científicas relevantes, difunden gran cantidad de datos genómicos, pero apenas se puede leer la clínica de los pacientes asociada a estas variantes genómicas, salvo en aquellas publicaciones que se centren en una región concreta. Esta información clínica es, además, necesaria en muchos casos para una correcta interpretación de las CNVs. Aun así, estos resultados se publican y se incorporan a bases de datos científicas, como por ejemplo DECIPHER, donde en muchos de los casos registrados no están disponibles las características clínicas asociadas a las CNVs. Se ha realizado, por tanto, una gran inversión con pocos estudios de validación y rendimiento clínicos.

En cuanto al rendimiento diagnóstico, se obtiene de un 5.1% (Ballif *et al.*, 2006) a un 35% (Aradhya *et al.*, 2007) de pacientes analizados con esta tecnología. Además de la dificultad añadida, por la variabilidad en cuanto a diseños de arrays utilizados (arrays comerciales, “customizados”, de BAC, de oligonucleótidos, de SNP), resulta difícil, si no imposible, poder comparar diferentes series publicadas debido, a la falta de datos clínicos en muchas de ellas.

Proporcionar información detallada del fenotipo es esencial no sólo para la interpretación de resultados, sino que también es fundamental para la utilidad clínica de las bases de datos para futuros pacientes. Además, el estudio de las variables clínicas es imprescindible para establecer recomendaciones útiles sobre la utilización, aplicación e implementación de esta tecnología en medicina, que sirva para orientar a los profesionales en el buen uso de la misma, en las indicaciones correctas. Esto contribuirá a un mejor diagnóstico y tratamiento y a mejorar la situación del paciente y de las familias.

Existen pocas evidencias científicas en lo que respecta a la indicación y utilidad clínica de las tecnologías de microarrays a nivel internacional y también en España. Si bien es cierto que se han creado grupos de expertos para establecer recomendaciones sobre la aplicación de los *arrays*, éstas hasta ahora han sido muy generales puesto que se basan en estudios científicos realizados generalmente en series de pacientes seleccionados por presentar discapacidad intelectual y/o anomalías congénitas. Además la mayoría de recomendaciones publicadas se centran sobre todo en aspectos técnicos de los *arrays* y en su interpretación.

A nivel internacional, el American College of Medical Genetics (ACMG) celebró en octubre de 1995 una conferencia para evaluar y discutir el enfoque diagnóstico más adecuado en los pacientes con DI. Los resultados de este consenso son publicados posteriormente por Curry y colaboradores en 1997, estableciendo que las pruebas de laboratorio recomendadas para el estudio de estos pacientes deben incluir el cariotipo, el estudio del síndrome de X frágil, especialmente en casos con historia familiar positiva, y estudios metabólicos para la detección de errores congénitos del metabolismo. Posteriormente, en

Discusión

2003 la American Academy of Neurology and Child Neurology Society publica un algoritmo diagnóstico donde se especifica el proceso de evaluación y estudio del paciente con discapacidad intelectual enfatizando en la importancia de la historia clínica y familiar (Shevell *et al.*, 2003). Poco después de la publicación de la puntuación de de Vries en 2001, diseñada para aumentar el rendimiento de los estudios subteloómicos, la American Academy of Pediatrics (AAP) y el ACMG publican la evaluación clínico-genética de pacientes con retraso mental o del desarrollo, donde a las recomendaciones ya establecidas anteriormente, incluyen el estudio de reordenamientos subteloómicos críticos mediante la técnica de FISH (Moeschler y Shevell 2006; Manning y Hudgins 2007). Posteriormente, en 2008, el consorcio internacional ISCA (International Standard Cytogenomic Array; URL <https://www.iscaconsortium.org/>), formado por un grupo de científicos de más de 160 laboratorios, intentó afrontar los intereses y preocupaciones sobre la normalización y aplicación clínica de los *arrays*. Este grupo de expertos, en dos reuniones de trabajo patrocinadas por la fundación del ACMG y Luminex, promovieron el desarrollo de cuatro líneas de trabajo con recomendaciones en torno a los estudios con *arrays*:

- Indicaciones clínicas adecuadas.
- Diseño, resolución y contenido.
- Base de datos pública para la clínica e investigación. (Database of Human Variation <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/studies/nstd37/>).
- Estándares para la interpretación de resultados y para el informe de CNV patológicas, benignas y de significado incierto.

Una limitación reconocida a la utilidad clínica de esta base de datos (ISCA) sin embargo, es la calidad de la información clínica disponible para cada paciente (Wain *et al.*, 2012). Este consorcio, con más de 32.300 casos publicados, recomienda el *array* como primera herramienta de diagnóstico genético, en lugar del cariotipo con bandas G, para pacientes con retraso del desarrollo, discapacidad intelectual idiopática, trastorno del espectro autista o anomalías congénitas

múltiples. Estas recomendaciones del consorcio ISCA junto con el algoritmo clínico propuesto, son publicados por Miller y colaboradores en 2010 (figura 40), corroborando el esquema de trabajo que muchos grupos de investigación ya realizábamos con los arrays. Meses más tarde, el ACMG publica las recomendaciones para el diseño y expectativas de rendimiento de microarrays, y normas y directrices para la presentación de informes (Kearney *et al.*, 2011a; Kearney *et al.*, 2011b).

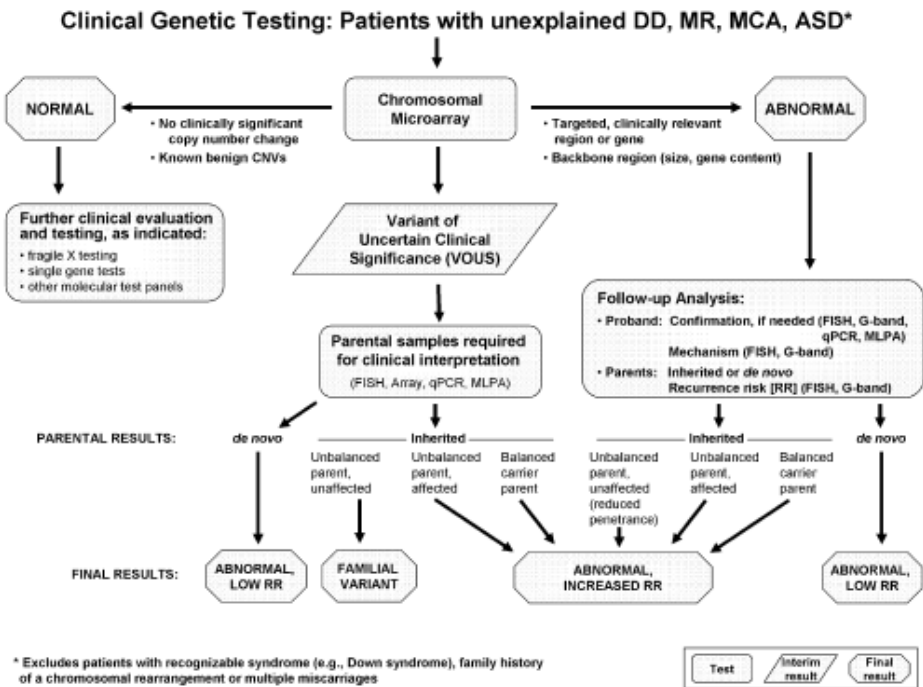


Figura 40. Algoritmo para el diagnóstico genético en pacientes con discapacidad intelectual, anomalías congénitas múltiples y trastorno del espectro autista (de Miller y colaboradores 2010).

Discusión

En 2012 Hastings y colaboradores publican en la revista de la European Cytogeneticists Association una actualización de las directrices generales y garantía de calidad para la citogenética, donde incluyen el estudio con microarray dentro de los procedimientos de laboratorio como diagnóstico genético postnatal en pacientes con:

- trastornos del crecimiento clínicamente significativos, microcefalia, macrocefalia,
- fenotipo anómalo o dismorfias,
- anomalías congénitas múltiples,
- retraso mental o del desarrollo,
- sospecha de síndrome de microdelección/microduplicación,
- trastorno recesivo ligado al X en una mujer.

En 2013 el ACMG ha publicado la evaluación genética-clínica en la identificación de la etiología de los trastornos del espectro autista. En este documento, se propone, tal como se había sugerido anteriormente, utilizar el estudio mediante *array* como primera herramienta para el diagnóstico genético en pacientes con trastorno del espectro autista. El rendimiento diagnóstico con esta tecnología se sitúa en torno al 10%. Pero, ya se apunta en esta guía que este rendimiento aumenta hasta el 30% en pacientes que además de autismo, presentan microcefalia, epilepsia, defectos congénitos, rasgos dismórficos o antecedentes familiares de trastorno del desarrollo o problemas psiquiátricos.

En España, el Grupo para el Consenso para la Implementación de los *Arrays* (CGH y SNP-arrays) en la Genética Clínica, promovido por el Instituto Roche, se reúne en Madrid en junio de 2011 y publican un año más tarde las recomendaciones sobre la utilización de los CGH-*arrays* y SNP-*arrays* en el diagnóstico prenatal y en el diagnóstico e investigación clínica en síndromes posnatales. Este grupo de expertos recomienda la aplicación de esta tecnología en la investigación de factores etiológicos en el retraso mental, en la discapacidad intelectual y/o en el trastorno del aprendizaje. Además, considera que son una herramienta de gran utilidad en el estudio de trastornos del espectro autista y/o anomalías congénitas múltiples.

Actualmente, está más que aceptado de manera general que la utilización de los arrays tiene claras ventajas sobre las técnicas de citogenética convencional, que han sido durante más de 40 años las técnicas de elección para la detección de anomalías cromosómicas, en el diagnóstico de los pacientes con discapacidad intelectual y/o anomalías congénitas. Pero, debería ser prioritaria una selección muy cuidadosa de la población a analizar y establecer protocolos estrictos de actuación, clínica y de laboratorio, que reduzcan al mínimo las pruebas innecesarias. Por tanto, es necesario impulsar la investigación orientada a la caracterización clínica detallada de pacientes susceptibles de ser estudiados mediante arrays, para aplicar los resultados a la práctica asistencial y acelerar la incorporación de estas tecnologías, con menos incertidumbre y menor coste con mayor efectividad, a los sistemas sanitarios.

Hoy en día, y ante la falta de técnicas alternativas “de amplio espectro” y elevado rendimiento, existe la tendencia del clínico a solicitar estudios de *arrays* ante sospecha de DI o TEA. No obstante, conforme se desarrollen los sistemas de secuenciación masiva, será conveniente disponer de unos criterios clínicos que orienten sobre la priorización racional del tipo de estudios a realizar. Esta tesis pretende dar una respuesta en este sentido.

Todo lo anteriormente expuesto en el presente trabajo pone de manifiesto la gran complejidad clínica y genética de los trastornos del neurodesarrollo, así como la gran importancia y utilidad de recoger las variables clínicas de la manera más detallada posible, para poder relacionarlas entre sí y con los genes contenidos en las CNVs. Aunque la introducción de las nuevas tecnologías de análisis genético en la última década ha permitido un gran avance en el conocimiento de su etiología, todavía queda mucho por conocer, sobre todo en términos de regulación espacio-temporal e interacciones funcionales. La adquisición de este conocimiento será fundamental para sentar las bases de la medicina del futuro: la medicina personalizada.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La técnica de *array*-CGH es una herramienta de diagnóstico genético muy eficaz para la identificación de CNVs causales en los trastornos del neurodesarrollo comparada con el resto de técnicas hoy en día disponibles.
2. La utilización de criterios de selección de pacientes en el presente trabajo ha permitido obtener un rendimiento diagnóstico cercano al 30%, muy superior al detectado en la mayoría de las series publicadas hasta el momento.
3. La asociación clínica de trastorno del crecimiento, implantación baja de las orejas, hipertelorismo, defectos dentarios, anomalías de los dedos 2-5, defectos congénitos cardíacos y genitales, forman el “fenotipo cromosómico” asociado a pCNVs. Esto nos ha permitido elaborar un modelo predictivo eficaz (confirmado con una serie de seguimiento) para la selección clínica de pacientes susceptibles de ser estudiados mediante *array* genómico, cuya aplicación será muy útil para mejorar el rendimiento diagnóstico.
4. Las CNVs causales flanqueadas por duplicaciones segmentarias no presentan diferencias respecto al origen parental. En cambio, las pCNVs no recurrentes son mayoritariamente de origen paterno, en una proporción superior a 2:1.
5. La edad de los progenitores a la maternidad y a la paternidad para el global de pacientes con pCNVs es prácticamente la misma que la de la población general. Excepto los progenitores de los pacientes con pCNVs *de novo*, no flanqueadas por duplicaciones segmentarias, que tienen una edad a la paternidad ligeramente superior.
6. Es recomendable realizar estudios complementarios, como cariotipo de alta resolución o FISH en los pacientes con pCNVs y/o sus progenitores, aunque aparentemente se clasifiquen como *de novo*, para descartar la presencia de translocaciones equilibradas en los progenitores.

Conclusiones

7. La evaluación clínica de los progenitores en los que se detecta una CNV heredada es importante para facilitar la interpretación y otorgar un valor causal a dicha alteración.
8. La interpretación de los cambios de número de copias es un proceso dinámico y en continuo progreso, debido a los rápidos avances en el conocimiento y la información clínica y genómica, por lo que coincidimos con otros autores en que debe plantearse la reevaluación continua de estos pacientes.
9. Proponemos que la asociación de rasgos dismórficos faciales (raíz nasal hundida, hipertelorismo e implantación baja de las orejas) forma parte de una secuencia indicativa de neurocristopatía. Un elevado número de factores de transcripción y otros elementos reguladores, como los microRNAs, forman parte de una red funcional altamente regulada que rige los procesos de desarrollo de las estructuras craneofaciales (entre otras) a partir de células derivadas de la cresta neural.
10. El análisis funcional en el grupo de pacientes con trastornos de conducta ha mostrado un enriquecimiento significativo de funciones celulares en las que participan proteínas implicadas en la regulación de las respuestas sinápticas a través de la fosforilación y la transducción de señales, actuando como “interruptores moleculares” que pueden modular el comportamiento humano
11. Es altamente recomendable impulsar la investigación orientada a la caracterización clínica detallada de pacientes susceptibles de ser estudiados mediante *arrays*. Al mismo tiempo, son necesarios mecanismos eficaces para compartir la información, no sólo genómica sino también clínica. Ambos hechos permitirán la aplicación de los resultados a la práctica asistencial y la incorporación de estas tecnologías a los sistemas sanitarios, con menos incertidumbre y mayor efectividad a menor coste.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

Aase J. 1990. Diagnostic dysmorphology. New York: Plenum Medical Book Co.

Ahn JW, Mann K, Walsh S, Shehab M, Hoanf S, Docherty Z, Mohammed S, Ogilvie CM. 2010. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Molecular Cytogenetics* 3:9.

Adviento B, Corbin IL, Widjaja F, Desachy G, Enrique N, Rosser T, Risi S, Marco EJ, Hendren RL, Bearden CE, Rauen KA, Weiss LA. 2014. Autism traits in the RASopathies. *J Med Genet* 51(1):10-20.

Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont HW. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51(6):1229-1239.

Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. 2007. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A* 143A:1432-1441.

Auyeung B, Taylor K, Hackett G, Baron-Cohen S. 2010. Foetal testosterone and autistic traits in 18 to 24-month-old-children. *Mol Autism* 1:11.

Baira E, Greshock J, Coukos G, Zhang L. 2008. Ultraconserved elements. *RNA Biology* 5:3:132-134.

Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, Kashork CD, Shaffer LG, Bejjani BA. 2006.

Bibliografía

Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A* 140: 2757-2767.

Barge-Schaapveld DQCM, Maas SM, Polstra A, Knecht LC, Hennekam RCM. 2011. The atypical 16p11.2 deletion: A not so atypical microdeletion syndrome?. *Am J Med Genet Part A* 155:1066-1072.

Baron-Cohen S, Lombardo MV, Auyeung B, Ashwin E, Chakrabarti B, Knickmeyer R. 2011. Why are autism spectrum conditions more prevalent in males?. *PLoS Biology* 9;6:1-10.

Bassett AS, Marshall CR, Lionel AC, Chow EW, Scherer SW. 2008. Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mol Genet* 17(24):4045-53.

Battaglia A, Bianchini E, Carey JC. 1999. Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet* 82(1):60-6.

Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. 2004. Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 28;304(5675):1321-5.

Bentham J, Bhattacharya S. 2008. Genetic mechanisms controlling cardiovascular development. *Ann N Y Acad Sci* 1123:10-19.

Bergmann C, Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schoneborn S, Eggermann T, Häusler M, Mull M, Ramaekers VT. 2003. Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain*. 126:1537-44.

Bibliografía

Bermejo E, Cuevas L, Grupo Periférico del ECEMC, Martínez-Frías ML. 2010. Informe de vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en España: datos registrados por el ECEMC en el período 1980-2009. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología* serie V, nº 9:68-100.

Bocian E, Hélias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska-Każmierczak A, Stankiewicz P, Kostyk E, Mazurczak T. 2004. Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. *Med Sci Monit* 10(4):CR143-51.

Bolande RP. 1974. The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human Pathology* 5(4):409-29.

Bolande RP. 1997. Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med* 17(1):1-25.

Bryant CD, Parker CC, Zhou L, Olker C, Chandrasekaran RY, Wager TT, Bolivar VJ, Loudon AS, Vitaterna MH, Turek FW, Palmer AA. 2012. Csnk1e is a genetic regulator of sensitivity to psychostimulants and opioids. *Neuropsychopharmacology* 37:1026-1035.

Byron A, Humphries JD, Craig SE, Knight D, Humphries MJ. 2012. Proteomic analysis of $\alpha 4\beta 1$ integrin adhesion complexes reveals α -subunit-dependent protein recruitment. *Proteomics* 12(13):2107-14.

Calin GA, Liu CG, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, Fabbri M, Cimmino A, Lee EJ, Wojcik SE, Shimizu M, Tili E, Rossi S, Taccioli C, Pichiorri F, Liu X, Zupo S, Herlea V, Gramantieri L, Lanza G, Alder H, Rassenti L, Volinia S, Schmittgen TD, Kipps TJ, Negrini M,

Bibliografía

Croce CM. 2007. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell* 12:215-29.

Carroll LS, Williams HJ, Walters J, Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ. 2011. Mutation screening of the 3q29 microdeletion syndrome candidate genes DLG1 and PAK2 in schizophrenia. *Am J Med Genet Part B* 156:844-849.

Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. 2008. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet* 16:422-434.

Ciuladaitė Z, Kasnauskienė J, Cimbalištienė L, Preikšaitienė E, Patsalis PC, Kučinskas V. 2011. Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. *J Appl Genet* 52(4):443-9.

Colin A, Barroso G, Gómez-López Nardhy, Duran H, Oechninger S. 2010. The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril* 94(7):2609-2614.

Consenso para la implementación de los arrays (CGH y SNP-arrays) en la genética clínica. 2012.

Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu YH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannong V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 43:838-846.

Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. 2011. Cranial neural crest cells on the move: Their roles

in craniofacial development. *Am J Med Genet Part A* 155:270–279.

Crews D. 2008. Epigenetics and its implications for behavioral neuroendocrinology. *Front Neuroendocrinol* 29:244-57.

Croen LA, Grether JK, Selvin S. 2001. The epidemiology of mental retardation of unknown cause. *Pediatrics* 107(6):E86.

Crow JF. 2000. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* 1(1):40-7.

Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J. 1997. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72(4):468-77.

Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J. 1997. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72(4):468-77.

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos adoptada por la Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada en Tokio, Japón, octubre 1975; Venecia, Italia, octubre 1983; Hong Kong, septiembre 1989; Sudáfrica, octubre 1996; Edimburgo, Escocia, octubre 2000; Nota de Clarificación, Washintong 2002 y Tokio 2004; Seúl, Corea, octubre 2008 y Fortaleza, Brasil, octubre 2013.

Bibliografía

De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. 2001. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38(3):145-50.

De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 40(6):385-98.

De Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal Sv, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw Nd, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA. 2005. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 77(4):606-16.

Decouflé P, Boyle CA, Paulozzi LJ, Lary JM. 2001. Increased risk for developmental disabilities in children who have major birth defects: a population-based study. *Pediatrics* 108(3):728-34.

Díaz-Anzaldúa A y Díaz-Martínez A. 2013. Contribución genética, ambiental y epigenética en la susceptibilidad a los trastornos del espectro autista. *Rev Neurol* 57(12):556-568.

Díaz de Bustamente A. 2013. Eficacia de los arrays de CGH en el diagnóstico de la discapacidad intelectual y de los trastornos del espectro autista. Memoria para optar al grado de doctor.

Eichler EE, Zimmerman AW. 2008. A hot spot of genetic instability in autism. *N Engl J Med* 358(7):737-9.

Bibliografía

Engels H, Brockschmidt A, Hoischen A, Landwehr C, Bosse K, Walldorf C, Toedt G, Radlwimmer B, Propping P, Lichter P, Weber RG. 2007. DNA microarray analysis identifies candidate regions and genes in unexplained mental retardation. *Neurology* 68:743-750.

Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, Moore D. 2003. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 18:447-54.

Espinosa R, Alonso Calderón JL. 2009. Neurocristopatías y enfermedad de Hirschsprung. *Cir Pediatr* 22(1):25-28.

Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas. *Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Serie V, nº 9 2010.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131-1133.

Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, Carver V, Benke P, Mundy P, Elsas LJ. 2007. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genome wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat* 28: 1124-1132.

Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, Joseph-George AM, Mackay S, Whitten K, Noble B, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Tucker E, Turner L, Marshall CR, Scherer SW. 2009. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet* 47:195-203.

Bibliografía

Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, Mc Dermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9(2):132-40.

Flint J, Knight S. 2003. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 13(3):310-6.

Frints SG, Borghgraef M, Froyen G, Marynen P, Fryns JP. 2002. Clinical study and haplotype analysis in two brothers with Partington syndrome. *Am J Med Genet* 112(4):361-8.

Froyen G, Belet S, Martinez F, Barros Santos-Reboucas C, Declercq M, Verbeeck J, Donckers L, Berland S, Mayo S, Rosello M, Mattos Gonçalves Pimentel M, Fintelman Rodrigues N, Hovland R, Rodrigues dos Santos S, Raymond L, Bose T, Corbett MA, Sheffield L, van Ravenswaaij-Arts CMA, Dijkhuizen T, Coutton C, Satre V, Siu V, Marynen P. 2012. Copy-Number Gains of HUWE1 Due to Replication- and Recombination-Based Rearrangements. *Am J Hum Genetics* 91(2):252-264.

García O, Massien L. 2004. Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Arch Neurocién* 9(1):39-46.

García-Cazorla A, Wolf NI, Serrano M, Moog U, Pérez-Dueñas B, Póo P, Pineda M, Campistol J, Hoffmann GF. 2009. Mental retardation and inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 32(5):597-608.

Gintis H. 2011. Gene-culture coevolution and the nature of human sociality. *Phil Trans R Soc B* 366: 878-888.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, Filipink RA, McConnell JS, Angle B, Meschino WS, Nezarati MM, Asamoah A, Jackson KE, Gowans GC, Martin JA, Carmany EP, Stockton DW, Schnur RE, Penney LS, Martin DM, Raskin S, Leppig K, Thiese H, Smith R, Aberg E, Niyazov DM, Escobar LF, El-Khechen D, Johnson KD, Lebel RR, Siefkas K, Ball S, Shur N, McGuire M, Brasington CK, Spence JE, Martin LS, Clericuzio C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. 2012. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 4;367(14):1321-31.

González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. 2012. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* 13:14026-14052.

Goriely A, McVean GAT, Røjmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AOM. 2003. Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. *Science* 301:643-646.

Goriely A, Hansen RM, Taylor IB, Olesen IA, Jacobsen GK, McGowan SI, Pfeifer SP, McVean GAT, Rajpert-DeMeyers E, Wilkie AOM. 2009. Activating mutations in FGFR3 and HRAS reveal a shared genetic origin for congenital disorders and testicular tumors. *Nat Genet* 41:1247-1252.

Goriely A, Lord H, Jasmine Lim, Johnson D, Lester T, Firth HV, Wilkie AOM. 2010. Germline and somatic mosaicism for FGFR2 mutation in the mother of a child with Crouzon syndrome: implications for genetic testing in “paternal age-effect” syndromes. *Am J Med Genet Part A* 152A:2067-2073.

Gouti M, Briscoe J, Gavalas A. 2011 Anterior Hox genes with components of the neural crest specification network to induce neural crest fates. *Stem Cells* 29:858-870.

Bibliografía

Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP. 2005. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet* 42(1):8-16.

Guitart-Feliubadaló M, Brunet-Vega A, Villatoro-Gómez S, Baena-Díez N, Gabau-Vila E. 2006. Causas cromosómicas que originan el retraso mental: alteraciones cromosómicas diagnosticables en el paciente. *Rev Neurol* 42(supl1):S21-S26.

Hamblet NS, Lijam N, Ruiz-Lozano P, Wang J, Yang Y, Zhen L, Mei L, Chien KR, Sussman DJ, Wynshaw-Boris A. 2002. Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. *Developmental* 129:5827-5838.

Hamdan FF, Daoud H, Piton A, Gauthier J, Dobrzyniecka S, Krebs MO, Joobar R, Lacaille JC, Nadeau A, Milunsky JM, Wang Z, Carmant L, Mottron L, Beauchamp MH, Rouleau GA, Michaud JL. 2011. De novo SYNGAP1 mutations in nonsyndromic intellectual disability and autism. *Biol Psychiatry* 69(9):898-901.

Hassold T, Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2(4):280-91.

Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U, Cavani S. 2012. General guidelines and quality assurance for cytogenetics. European Cytogeneticists Association newsletter n°29 january 2012.

Heir-Kwa J, Rodríguez-Santiago B, Vissers LE, de Leeuw N, Pfundt R, Buitelaar JK, Pérez-Jurado LA, Veltman JA.

Bibliografía

2011. De novo copy number variants associated with intellectual disability have a paternal origin and age bias. *J Med Genet* 48:776-778.

Herbst DS, Miller JR. 1980. Nonspecific X-linked mental retardation II: the frequency in British Columbia. *Am J Med Genet* 7(4):461-9.

Herbst DS. 1980. Nonspecific X-linked mental retardation I: a review with information from 24 new families. *Am J Med Genet* 7(4):443-60.

Hoffmann K, Heller R. 2011. Uniparental disomies 7 and 14. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(1):77-100.

Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. 2007. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* 2:e1289.

Huang G, Xie L, Linask KL, Zhang C, Zhao X, Yang Y, Zhou GM, Wu YJ, Marquez-Rosado L, McElhinney DB, Goldmuntz E, Liu C, Lampe PD, Chatterjee B, Lo CW. 2011. Evaluating the role of connexin 43 in congenital heart disease: screening for mutations in patients with outflow tract anomalies and the analysis of knock-in mouse models. *J Cardiovasc Dis Res* 2:206-12.

INSTRUMENTO de Ratificación del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina) hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997.

Iughetti P, Alonso LG, Wilcox W, Alonso N, Passos-Bueno MR. 2000. Mapping of the autosomal recessive (AR)

Bibliografía

craniometaphyseal dysplasia locus to chromosome region 6q21-22 and confirmation of genetic heterogeneity for mild AR spondylocostal dysplasia. *Am J Med Genet* 95:482-491.

Izquierdo M, Avellaneda A. Diciembre de 2003. Holoprosencefalia. Instituto de Investigación de Enfermedades Raras. ISBN: 978-84-96958-54-8.

Jabbia M, Kippenhana JS, Kohna P, Marencob S, Mervisc CB, Morrisd CA, Meyer-Lindenberga A, Bermana KF. 2012. The Williams syndrome chromosome 7q11.23 hemideletion confers hypersocial, anxious personality coupled with altered insula structure and function. *PNAS* E860-E866.

Jaillard S, Drunat S, Bendavid C, Aboura A, Etcheverry A, Journal H, Delahaye A, Pasquier L, Bonneau D, Toutain A, Burglen L, Guichet A, Pipiras E, Gilbert-Dussardier B, Benzacken B, Martin-Coignard D, Henry C, David A, Lucas J, Mosser J, David V, Odent S, Verloes A, Dubourg C. 2010. Identification of gene copy number variations in patients with mental retardation using array-CGH: novel syndromes in a large French series. *Eur J Med Genet* 58:66-75.

James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neubrandner JA. 2004. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr* 80(6):1611-7.

Jessen HM, Auger AP. 2011. Sex differences in epigenetic mechanisms may underlie risk and resilience for mental health disorders. *Epigenetics* 6;7:857-861.

Johnson CW, Hernández-Lagunas L, Feng W, Melvin VS, Williams T, Artinger KB. 2011. VgII2a is required for neural crest cell survival during zebrafish craniofacial development. *Dev Biol* 357(1):269-281.

Bibliografía

Kageyamana R, Ohtsuka T, Kobayashi T. 2008. Roles of Hes genes in neural development. *Develop Growth Differ* 50:97-103.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083):818-21.

Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren ST, Richard G, Compton JG, Fuller AE, Gliem TJ, Huang S, Collinson MN, Beal SJ, Ackley T, Pickering DL, Golden DM, Aston E, Whitby H, Shetty S, Rossi MR, Rudd MK, South ST, Brothman AR, Sanger WG, Iyer RK, Crolla JA, Thorland EC, Aradhya S, Ledbetter DH, Martin CL. 2011. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med* 13:777-784.

Kang SH, Shaw C, Ou Z, Eng PA, Cooper ML, Pursley AN, Sahoo T, Bacino CA, Chinault AC, Stankiewicz P, Patel A, Lupski JR, Cheung SW. 2010. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am J Med Genet A* 152A:1111-1126.

Kearney HM, South ST, Wolff DJ, Lamb A, Hamosh A, Rao KW. 2011a. American college of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. *Genet Med* 13;7:676-679.

Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. 2011b. American college of Medical Genetics

Bibliografía

standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 13;7:680-685.

Kerner B, Rao AR, Christensen B, Dandekar S, Yourshaw M, Nelson SF. 2013. Rare genomic variants link bipolar disorder with anxiety disorders to CREB-regulated intracellular signaling pathways. *Front Psychiatry* 4:154.

Khor B, Bredemeyer AL, Huang CH, Turnbull IR, Evans R, Maggi LB, White JM, Walker LM, Carnes K, Hess RA, Sleckman BP. 2006. Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol Cell Biol* 26(8): 2999-3007.

Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobeck AJ. 2001. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 75:237-42.

Kirby RS, Brewster MA, Canino CU, Pavin M. 1995. Early childhood surveillance of developmental disorders by a birth defects surveillance system: methods, prevalence comparisons, and mortality patterns. *J Dev Behav Pediatr* 16(5):318-26.

Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. 1998. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 31(3):163-73.

Knickmeyer RC, Wang J, Zhu H, Geng X, Woolson S, Hamer RM, Konneker T, Styner M, Gilmore JH. 2013. Impact of sex and gonadal steroids on neonatal brain structure. *Cereb cortex* doi:10.1093

Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354(9191):1676-81.

Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA. 2004. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 41(12):892-9.

Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WS, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. 2012. Rate de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488:471-5.

Koolen DA, Sharp AJ, Hurst JA, Firth HV, Knight SJ, Goldenberg A, Saugier-Verber P, Pfundt R, Vissers LE, Destrée A, Grisart B, Rooms L, Van der Aa N, Field M, Hackett A, Bell K, Nowaczyk MJ, Mancini GM, Poddighe PJ, Schwartz CE, Rossi E, De Gregori M, Antonacci-Fulton LL, McLellan MD 2nd, Garrett JM, Wiechert MA, Miner TL, Crosby S, Ciccone R, Willatt L, Rauch A, Zenker M, Aradhya S, Manning MA, Strom TM, Wagenstaller J, Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Price SM, Stewart H, Shaw-Smith C, Brunner HG, Wilkie AO, Veltman JA, Zuffardi O, Eichler EE, de Vries BB. 2008. Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet* 45(11):710-20.

Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH Jr, Dobyns

Bibliografía

WB, Christian SL. 2008. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* 17(4):628-38.

Kuss AW, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Behjati F, Darvish H, Abbasi-Moheb L, Puettmann L, Zecha A, Weissmann R, Hu H, Mohseni M, Abedini SS, Rajab A, Hertzberg C, Wieczorek D, Ullmann R, Ghasemi-Firouzabadi S, Banihashemi S, Arzhanghi S, Hadavi V, Bahrami-Monajemi G, Kasiri M, Falah M, Nikuei P, Dehghan A, Sobhani M, Jamali P, Ropers HH, Najmabadi H. 2011. Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. *Hum Genet* 129(2):141-8.

Lepage JF, Hong DS, Mazaika PK, Raman M, Sheau K, Marzelli MJ, Hallmayer J, Reiss AL. 2013. Genomic imprinting effects of the X chromosome on brain morphology. *J Neurosci* 33(19):8567-74.

LEY 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

Li HH, Roy M, Kuscuoglu U, Spencer CM, Halm B, Harrison KC, Bayle JH, Splendore A, Ding F, Meltzer LA, Wright E, Paylor R, Deisseroth K, Francke U. 2009. Induced chromosome deletions cause hypersociability and other features of Williams–Beuren syndrome in mice. *EMBO Mol Med* 1, 50-65.

López-Carrasco A, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Mayo S, Martínez F, Orellana C. 2013. Localización cromosómica de duplicaciones submicroscópicas en pacientes con trastornos del neurodesarrollo para identificar casos con alto riesgo de

recurrencia familiar. *Med Clin (Barc)* Jun 19. doi:pii: S0025-7753(13)00319-9. 10.1016/j.medcli.2013.04.034.

Lu XY, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Stankiewicz P, Kang SH et al. 2008. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 122:1310-1318.

Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. 1963. Intrauterine growth as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics* 32:793-800.

Lubchenco LO, Hansman C, Boyd E. 1966. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics* 37:403-8.

Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. 1999. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401(6754):670-7.

Malaspina D, Harlap S, Fenning S, Heiman D, Nahon D, Feldman D, Susser ES. 2001. Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 58(4):361-7.

Malaspina D, Reichenberg A, Weiser M, Fennig S, Davidson M, Harlap S, Wolitzky R, Rabinowitz J, Susser E, Knobler HY. 2005. Paternal age and intelligence: implications for age-related genomic changes in male germ cells. *Psychiatr Genet* 15(2):117-25.

Mandel JL, Chelly J. 2004. Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The

Bibliografía

paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 12:689-693.

Mannerkoski MK, Aberg LE, Autti TH, Hoikkala M, Sarna S, Heiskala HJ. 2007. Newborns at risk for special education placement: a population-based study. *Eur J Paediatr Neurol* 11(4):223-231.

Manning M, Hudgins L. 2007. Use of array-based technology in the practice of medical genetics. *Genet Med* 9:650-653.

Manolakos E, Vetro A, Kefals K, Rapti SM, Louizou E, Garas A, Kitsos G, Vasileiadis L, Tsoplou P, Eleftheriades M, Peitsidis P, Orru S, Liehr T, Petersen MB, Thomaidis L. 2010. The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay. *Molecular Genetics* 3:22.

Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. 2007. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *PNAS* 104(45):17725-17729.

Marques Pereira P, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A. 2010. Coffin–Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet* 18(6): 627-633.

Martín J. 2006. Bioquímica de la agresión. *Psicopatología Clínica, Legal y Forense* 5:43-66.

Martínez F, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Blesa D, Quiroga R, Mayo S, Orellana C. 2010. Enrichment of ultraconserved elements among genomic imbalances causing mental delay and congenital anomalies. *BMC Med Genomics* 3(1):54.

Bibliografía

Martínez-Frías ML, Frías JL, Opitz JM. 1998. Errors of morphogenesis and developmental field theory. *Am J Med* 76:291-96.

Martínez-Frías ML, Bermejo E, Frías JL. 2000. Pathogenic classification of a series of 27,145 consecutive infants with congenital defects. *Am J Med Genet* 90(3):246-9.

Masumoto K, Arima T, Izaki T, Takahashi Y, Honda N, Toyoshima S, Shimotake T. 2002. Ondine's curse associated with Hirschsprung disease and ganglioneuroblastoma. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34(1):83-6.

Matsunaga S, Ikeda M, Kishi T, Fukuo Y, Aleksic B, Yoshimura R, Okochi T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Umene-Nakano W, Inada T, Kunugi H, Kato T, Yoshikawa T, Ujike H, Nakamura J, Ozaki N, Kitajima T, Iwata N. 2012. An evaluation of polymorphisms in casein kinase 1 delta and epsilon genes in major psychiatric disorders. *Neurosci Lett* 529(1):66-9.

Mayo S, Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Armstrong J, Català V, Martínez F. 2011. De novo interstitial triplication of MECP2 in a girl with neurodevelopmental disorder and random X chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res* 135(2):93-101.

Mayo S, Garin I, Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Zarzo C, de Naclares GP, Martínez F. 2012. Hypomethylation of the KCNQ1OT1 imprinting center of chromosome 11 associated to Sotos-like features. *J Hum Genet* 57:153-156.

Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A, Tárraga J, Pascual-Montano A, Nogales-Cadenas R, Santoyo J, García F, Marbà M, Montaner D, Dopazo J. 2010. Babelomics: an integrative platform for the analysis of

Bibliografía

transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W210-3. doi: 10.1093/nar/gkq388. Epub 2010 May 16.

Mehler MF. 2008. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Progress in Neurobiology* 86:305-341.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF 1988. A simple out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kosk K, Kranyz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Sherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. 2010. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnosis test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86.5:749-764.

Moeschler JB and Shevell M. 2006. Clinical Genetic Evaluation of the Child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 117;6:2304-2316.

Molin AM, Andrieux J, Koolen DA, Malan V, Carella M, Colleaux L, Cormier-Daire V, David A, de Leeuw N, Delobel B, Duban-Bedu B, Fischetto R, Flinter F, Kjaergaard S, Kok F, Krepischi AC, Le Caignec C, Ogilvie CM, Maia S, Mathieu-Dramard M, Munnich A, Palumbo O, Papadia F, Pfundt R, Reardon W, Receveur A, Rio M, Ronsbro Darling L, Rosenberg C, Sá J, Vallee L, Vincent-Delorme C, Zelante L, Bondeson ML, Annerén G. 2012. A

novel microdeletion syndrome at 3q13.31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features. *J Med Genet* 49(2):104-9.

Monfort S, Martínez F, Roselló M, Badía L, Prieto F, Orellana C. 2006a. A subtelomeric translocation apparently implied in multiple abortions *J Assist Reprod Genet* 23(2):97-101.

Monfort S, Orellana C, Oltra S, Roselló M, Guitart M, Martínez F. 2006b. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med* 147(6):295-300.

Monfort S, Blesa D, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Cigudosa JC, Martínez F. 2007. Duplication of 14q11.2 associates with short stature and mild mental retardation: A putative relation with quantitative trait loci. *Am J Med Genet A* 15; 143(4):382-4.

Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Blesa D, Kok K, Ferrer I, Cigudosa JC, Martínez F. 2008. Detection of known and novel genomic rearrangements by array based comparative genomic hybridisation: deletion of ZNF533 and duplication of CHARGE syndrome genes. *J Med Genet* 45(7):432-7.

Najmabadi H, Motazacker MM, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Chen W, Behjati F, Hadavi V, Nieh SE, Abedini SS, Vazifehmand R, Firouzabadi SG, Jamali P, Falah M, Seifati SM, Grütters A, Lenzner S, Jensen LR, Rüschenhoff F, Kuss AW, Ropers HH. 2007. Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet* 121(1):43-8.

Bibliografía

Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Püttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wiczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH. 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 21;478(7367):57-63.

Neill NJ, Ballif BC, Lamb AN, Parikh S, Ravnán JB, Schultz RA, Torchia BS, Rosenfeld JA, Shaffer LG. 2011. Recurrence, submicroscopic complexity, and potential clinical relevance of copy gains detected by array CGH that are shown to be unbalanced insertions by FISH. *Genome Res* 21:535-544.

Noden DM. 1988. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development* 103 Suppl:121-40.

Nowakowska B de Leeuw N, Ruivenkamp CAL, Sikkema-Raddatz, Crolla JA, Thoelen R, Koopmans M, den Hollander N, van Haeringen A, van der Kevie-Kersemaekers AM, Pfundt R, Mieloo H, van Essen T, de Vries BBA, Green A, Reardon W, Fryns JP, Vermeesch JR. 2012. *Eur J Hum Genet* 20:166-170.

Opitz JM. Blastogenesis and the “primary field” in human development. New York: Alan R Liss, Inc., for the National Foundation-March of Dimes. 1993. BD: OAS XXIX(1):3-37.

Bibliografía

Orellana C, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Martínez F. 2007. Clinical findings and molecular characterization of six new subtelomeric imbalances. *Clin Genet* 71:474-479.

Orellana C, Bernabeu J, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Ferrer I, Quiroga R, Martínez-Garay I, Martínez F. 2008. Duplication of the Williams-Beuren critical region: case report and further delineation of the phenotypic spectrum. *J Med Genet* 45:187-189.

Orellana C, Roselló M, Monfort S, Oltra S, Quiroga R, Ferrer I, Martínez F. 2009. Corpus callosum abnormalities and the controversy about the candidate genes located in 1q44. *Cytogenet Genome Res* 127:5-8.

Ou Z, Berg JS, Yonath H, Enciso VB, Miller DT, Picker J, Lenzi T, Keegan CE, Sutton VR, Belmont J, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Roeder E, Patel A. 2008. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet Med* 10:267-277.

Paul C, Robaire B. 2013. Ageing of the male germ line. *Nat Rev Urol* 10(4):227-35.

Paznekas W, Boyadjiev S, Shapiro R, Daniels O, Wollnik B, Keegan C, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW. 2003. Connexin 43 (gja1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72:408-18.

Perrin MC, Brown AS, Malaspina D. 2007. Aberrant epigenetic regulation could explain the relationship of paternal age to schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* vol 33 (6):1270-1273

Bibliografía

Pescucci C, Caselli R, Mari F, Speciale C, Ariani F, Bruttini M, Sampieri K, Mencarelli MA, Scala E, Longo I, Artuso R, Renieri A, Meloni I; XLMR Italian Network. 2007. The Italian XLMR bank: a clinical and molecular database. *Hum Mutat* 28(1):13-8.

Portnoi MF. 2009. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet* 52(2-3):88-93.

Quian MX, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du BY, Ji DY, Wang GF, Zhu QQ, Song W, Yu Y, Zhang XX, Huang HT, Miao S, Chen LB, Zhang ZH, Liang YN, Liu S, Cha H, Yang D, Zhai Y, Komatsu T, Tsuruta F, Li Haitao, Cao C, Li W, Li GH, Cheng Y, Chiba T, Wang L, Goldberg AL, Shen Y. 2013. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* 153:1012-1024.

Quintero-Rivera F, Sharifi-Hannauer P, Martinez-Agosto JA. 2010. Autistic and psychiatric findings associated with the 3q29 microdeletion syndrome: case report and review. *Am J Med Genet A* 152A(10):2459-67.

Ramírez JM, Delius JD. 1980. Behavioral effects of intracerebroventricular infusion of LH-RH in pigeons. *Bulletin of the Psychonomic Society* 16: 128-130.

R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. 2006. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in

individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478–489.

Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, Rabinowitz J, Shulman C, Malaspina D, Lubin G, Knobler HY, Davidson M, Susser E. 2006. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry* 63(9):1026-32.

Renthal NE, Chen CC, Williams KC, Gerard RD, Prange-Kiel J, Mendelson CR. 2010. MiR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proc Natl Acad Sci* 107(48):20828-33.

Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A. 2001. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109(3):286-94.

Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sánchez A, Mallolas J, Carrió A, Pedrinaci S, Barrionuevo JL, Milà M. 2004. Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 65(1):17-23.

Rodríguez-Revenga L, Vallespín E, Madrigal I, Palomares M, Mur A, García-Miñaur S, Santos F, Mori MÁ, Lapunzina P, Mila M, Nevado J. 2013. A parallel study of different array-CGH platforms in a set of Spanish patients with developmental delay and intellectual disability. *Gene* 25;521(1):82-6.

Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreëls F. 1997. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol* 39(2):125-32.

Bibliografía

Roessler E, Hu P, Hong SK, Srivastava K, Carrington B, Sood R, Petrykowska H, Elnitski L, Ribeiro LA, Antonio Richieri-Costa A, Feldman B, Odenwald WF, Muenke M. 2012. Unique alterations of an ultraconserved non-coding element in the 3'UTR of ZIC2 in holoprosencephaly. *PLoS ONE* 7(7):e39026.

Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. 2005. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat* 25(6):513-24.

Ropers HH, Hamel BC. 2005. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 6(1):46-57.

Ropers HH. 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genom Human Genet* 11:161-187.

Roselló M, Monfort S, Orellana C, Oltra S, Martínez I, Martínez F. 2007. Deleción subtelo mérica 9qter: definición del síndrome y origen parental. *Med Clin (Barc)* 128(11):419-21.

Roselló M, Monfort S, Orellana C, Ferrer-Bolufer I, Quiroga R, Oltra S, Martínez F. 2009. Submicroscopic duplication of the Wolf-Hirschhorn critical region with a 4p terminal deletion. *Cytogenet Genome Res* 125(2): 103-8.

Sánchez-Díaz A, Morales-Peydró C, Madrigal-Bajo I. 2006. Autosomal dominant mental retardation. *Rev Neurol* 42 Suppl 1:S33-7.

Sanges R, Hadzhiev Y, Gueroult-Bellone M, Rour A, Ferg M, Meola N, Amore G, Basu S, Brown ER, De Simone M, Petrera F, Licastro D, Strähle U, Banfi S, Lemaire P, Birney E, Müller F, Stupka E. 2013. Highly conserved elements discovered in vertebrates are present in non-syntenic loci of

tunicates, act as enhancers and can be transcribed during development. *Nucleic Acids Research* 41(6):3600–3618.

Schinzel. 2nd ed. Human chromosome abnormalities-Catalogs and collections. 2001. ISBN: 3-11-011607-3.

Schmidt H, Kern W, Giese R, Hallschmid M, Enders A. 2009. Intranasal insulin to improve developmental delay in children with 22q13 deletion syndrome: an exploratory clinical trial. *J Med Genet* 46(4):217-22.

Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. 2005. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 42(9):699-705.

Schaefer GB, Mendelsohn NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. 2013. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med* 15(5):399-407.

Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds.). ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger, Basel 2013.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. 2004. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 41(4):241-8.

Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD. 2003. Quality

Bibliografía

Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology; Practice Committee of the Child Neurology Society. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 60(3):367-80.

Shi J, Wittke-Thompson JK, Badner JA, Hattori E, Potash JB, Willour VL, McMahon FJ, Gershon ES, Liu C. 2008. Clock genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 5;147B(7): 1047-1055.

Shouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.

Sibbons C, Morris JK, Crolla JA, Jacobs PA, Thomas NS. 2012. *De novo* deletions and duplications detected by array CGH: a study of parental origin in relation to mechanisms of formation and size of imbalance. *Eur J Hum Genet* 20:155-160.

Soukier M, Klein N, Auber B, Wickert J, Schröder J, Zoll B, Burfeind P, Bartels I, Alsat EA, Lingen M, Grzmil P, Schulze S, Keyser J, Weise D, Borchers M, Hobbiebrunken E, Röbl M, Gärtner J, Brockmann K, Zirn B. 2012. ArrayCGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants?. *Clin Genet* 83(1):53-65. doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01850.

Stankiewicz P, Beaudet AL. 2007. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations,

developmental delay and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet* 17:182-192.

Steinberg S, de Jong S, Mattheisen M, Costas J, Demontis D, Jamain S, Pietiläinen OP, Lin K, Papiol S, Huttenlocher J, Sigurdsson E, Vassos E, Giegling I, Breuer R, Fraser G, Walker N, Melle I, Djurovic S, Agartz I, Tuulio-Henriksson A, Suvisaari J, Lönngqvist J, Paunio T, Olsen L, Hansen T, Ingason A, Pirinen M, Strengman E; GROUP, Hougaard DM, Orntoft T, Didriksen M, Hollegaard MV, Nordentoft M, Abramova L, Kaleda V, Arrojo M, Sanjuán J, Arango C, Etain B, Bellivier F, Méary A, Schürhoff F, Szoke A, Ribolsi M, Magni V, Siracusano A, Sperling S, Rossner M, Christiansen C, Kiemenev LA, Franke B, van den Berg LH, Veldink J, Curran S, Bolton P, Poot M, Staal W, Rehnstrom K, Kilpinen H, Freitag CM, Meyer J, Magnusson P, Saemundsen E, Martsenkovsky I, Bikshaieva I, Martsenkovska I, Vashchenko O, Raleva M, Paketchieva K, Stefanovski B, Durmishi N, Pejovic Milovancevic M, Lecic Tosevski D, Silagadze T, Naneishvili N, Mikeladze N, Surguladze S, Vincent JB, Farmer A, Mitchell PB, Wright A, Schofield PR, Fullerton JM, Montgomery GW, Martin NG, Rubino IA, van Winkel R, Kenis G, De Hert M, Réthelyi JM, Bitter I, Terenius L, Jönsson EG, Bakker S, van Os J, Jablensky A, Leboyer M, Bramon E, Powell J, Murray R, Corvin A, Gill M, Morris D, O'Neill FA, Kendler K, Riley B; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC, Thorsteinsdottir U, Kong A, Ehrenreich H, Carracedo A, Golimbet V, Andreassen OA, Børghlum AD, Mors O, Mortensen PB, Werge T, Ophoff RA, Nöthen MM, Rietschel M, Cichon S, Ruggeri M, Tosato S, Palotie A, St Clair D, Rujescu D, Collier DA, Stefansson H, Stefansson K. 2014. Common variant at 16p11.2 conferring risk of psychosis. *Mol Psychiatry* 19(1):108-14.

Stevenson RE, Schwartz CE, Schroer RJ. 2000. X-linked mental retardation. Oxford: Oxford University Press, 2000.

Bibliografía

Stewart DR, Kleefstra T. 2007. The chromosome 9q subtelomere deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* Nov 15;145C(4):383-92.

Sulik KK, Johnston MC. 1982. Embryonic origin of holoprosencephaly: Interrelationship of the developing brain and face. *Scanning Electron Microscopy* 1:309-322.

Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubbridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR. 2009. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* 41(5):535-43.

Tiemann-Boege I, Navidi W, Grewal R, Cohn D, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Arnheim N. 2012. The observed human sperm mutation frequency cannot explain the achondroplasia paternal age effect. *PNAS* 99(23):14952-14957.

Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, Fryns JP, Gewillig M, Vermeesch JR, Devriendt K. 2007. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by aCGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* 28:2778-2784.

Thomas NS, Durkie M, Potts G. 2006. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet* 14:831-837.

Toki F, Suzuki N, Inoue K, Suzuki M, Hirakata K, Nagai K, Kuroiwa M, Lupski JR, Tsuchida Y. 2003. Intestinal aganglionosis associated with the Waardenburg syndrome: report of two cases and review of the literature. *Pediatr Surg Int* 19(11):725-8.

Tomás M, Pérez J, Roselló M, Orellana C. 2011. El fenotipo síndrome de Nijmegen: una entidad a tener en cuenta en el diagnóstico de la microcefalia. *An Pediatr (Barc)* 74(1):58-60.

Toriello HV, Meck JM. 2008. Statement on guidance for genetic counselling in advanced paternal age. *Genet Med* 10:457-60.

Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, Breen G, Rucker J, Dixit A, Pal DK, McGuffin P, Farmer A, White PS, Andrieux J, Vassos E, Ogilvie CM, Curran S, Collier DA. 2013. Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One* 18;8(4):e61365.

Turner G, Turner B. 1974. X-linked mental retardation. *J Med Genet* 11(2):109-13.

Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M, Chen W, Tonge B, Rosenberg C, Field M, Vianna-Morgante AM, Christie L, Krepischi-Santos AC, Banna L, Brereton AV, Hill A, Bisgaard AM, Müller I, Hultschig C, Erdogan F, Wiczorek G, Ropers HH. 2007. Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* 28(7):674-82.

Bibliografía

Van Hemel JO, Eussen HJ. 2000. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet* 107:415-432.

Van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. 2005. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet* 13(1):6-25.

Van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM. 2002. Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 39(8):546-53.

Van Vliet J, Oates NA, Whitelaw E. 2007. Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cell Mol Life Sci* 64(12):1531-8.

Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. 2002. High-throughput analysis of subtelomeric chromosomes rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 70:1269-1276.

Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. 2012. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat* 33;6:906-915.

Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. 2003. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide

detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73(6):1261-70.

Wain KE, Riggs E, Hanson K, Savage M, Riethmaier D, Muirhead A, Mitchell E, Packard BS, Faucett WA. 2012. The laboratory-clinician team: a professional call to action to improve communication and collaboration for optimal patient care in chromosomal microarray testing. *J Genet Couns* 21(5):631-7.

Weiss LA, Pan L, Abney M, Ober C. 2006. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in human. *Nature Genetics* 38(2):218-22.

Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ; Autism Consortium. 2008. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 358(7):667-75.

Weston JA. 1970. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphog* 8:41-114.

Winter R, Baraitser M. London dysmorphology database. London: Oxford University Press; 2001.

Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D. 2006. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci* 103:9601-6.

Bibliografía

Xiang B, Li A, Valentin D, Nowak NJ, Zhao H, Li P. 2008. Analytical and clinical validity of whole-genome oligonucleotide array comparative genomic hybridization for pediatric patients with mental retardation and developmental delay. *Am J Med Genet A* 146A:1942-1954.

Xiang B, Zhu H, Shen Y, Miller DT, Lu K, Hu X, Andersson HC, Narumanchi TM, Wang Y, Martinez JE, Wu BL, Li P, Li MM, Chen TJ, Fan YS. 2010. Genomic-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation. A multicenter experience of 1499 clinical cases. *J Mol Diagn* 12:204-212.

Yan J, Zhang F, Brundage E, Scheuerle A, Lanpher B, Erickson RP, Powis Z, Robinson HB, Trapane PL, Stachiw-Hietpas D, Keppler-Noreuil KM, Lalani SR, Sahoo T, Chinault AC, Patel A, Cheung SW, Lupski JR. 2009. Genomic duplication resulting in increased copy number of genes encoding the sister chromatid cohesion complex conveys clinical consequences distinct from Cornelia de Lange. *J Med Genet* 46(9):626-34.

Yoon SR, Qin J, Glaser RL, Jabs EW, Wexler NS, Sokol R, Arnheim N, Calabrese P. 2005. The ups and downs of mutation frequencies during aging can account for the Apert syndrome paternal age effect. *PLoS Genetics* 5(7):e1000558.

Zhang L, Xi J, Xu G, Shu H, Wang X, Li P. 2011. Cortical dynamics of acoustic and phonological processing in speech perception. *PLoS One* 6(6):e20963.

ANEXOS

ANEXO I



Hoja de recogida de datos clínicos. Proyecto de investigación en trastornos del desarrollo/ retraso psicomotor.

Nombre.....Sexo varón mujer
 Fecha de nacimiento.....Edad.....Talla.....Peso.....
 Dirección.....
 Teléfono.....
 Hospital de procedencia.....
 Médico solicitante.....Fecha.....

1 Gestación

Fecundación Natural Reproducción asistida: ICSI otros.....
 Oligoamnios Hidramnios
 Amniocentesis /Biopsia corial no si Resultado.....
 Retraso de crecimiento intrauterino no si
 Semanas de gestación.....Parto: Natural Cesárea
 Incidencias.....

2 Datos pre/ neonatales

Talla.....Peso.....Perímetro craneal.....
 Hipotonía no si Hipertonía no si Trastornos alimentación no si
 Otros (Apgar).....

3 Dismorfia facial

Asimetría si no Hipertelorismo si no Hipotelorismo si no
 Fisuras palpebrales arriba abajo normal estrechas
 Orejas implantación baja dismórficas otros.....
 Ojos coloboma estrabismo otros.....
 Mandíbula micrognatia prognatismo otros.....
 Nariz.....
 Boca labio leporino fisura palatina macroglosia otros.....
 Dientes ausencia implantación anómala otros.....
 Otros.....

4 Cráneo/ SNC

Microcefalia no si Macrocefalia no si Hidrocefalia no si
Pelo hipertrichosis implantación baja pelo ralo otros.....
Otros.....

5 Anomalías congénitas

Desarrollo somático normal anómalo Especificar.....
Manos.....
Corazón.....
Riñón.....
Genitales externos ambiguos criptorquidia hipospadias
Alteraciones esqueléticas.....
Alteraciones cutáneas nevus hemangiomas pigmentación
anómala
Otros.....

6 Rasgos neurológicos.

Retraso mental leve moderado grave
Hipotonía no si Hipertonía no si
Desarrollo psicomotor normal alterado Especificar.....
Retraso del lenguaje no si Especificar.....
Sordera no si Ceguera no si
Convulsiones no si Especificar.....
Exploraciones complementarias
TAC/ RMN.....
EEG.....
Comportamiento anómalo hiperactividad autismo agresividad
Otros comportamientos.....
Otros.....

7 Historia familiar Consanguinidad no si Tipo.....

Antecedentes de anomalías congénitas no si especificar.....
Antecedentes de retraso mental no si especificar.....
Antecedentes de abortos no si especificar.....

ANEXO II



Nota informativa del proyecto de investigación sobre el origen genético de los trastornos del desarrollo.

Los trastornos del desarrollo asociados a anomalías congénitas o a retraso mental, pueden estar originados por múltiples causas: infecciosas, traumáticas, ambientales o genéticas. Sabemos que existen numerosos genes cuyas alteraciones conllevan trastornos del desarrollo, algunos conocidos, otros todavía por identificar. La localización y el estudio de estos genes es fundamental para el diagnóstico y la prevención de los mismos.

Dado que los estudios que se realizan habitualmente en la práctica asistencial (cariotipo, estudio de síndromes conocidos como el del cromosoma X frágil, etc.) no permiten identificar determinadas alteraciones, la aplicación de nuevas técnicas de biología molecular puede constituir una herramienta muy válida para conocer la causa genética de estos trastornos.

En el presente proyecto de investigación se pretende utilizar, para el estudio y la identificación de los genes responsables de estas patologías, las nuevas tecnologías desarrolladas en el campo de la genética molecular entre las que se incluyen CGH-array, FISH, secuenciación, etc.

Es posible que estos estudios se prolonguen en el tiempo o incluso que no se obtenga ningún resultado concluyente.

Este estudio no supone un riesgo adicional para el paciente, y como beneficio puede ayudar a conocer la causa de la anomalía que presenta.

Para la participación en el proyecto será necesario realizar una extracción de sangre periférica, a partir de la cual se obtendrá el material necesario, que puede ser DNA, RNA o cultivos celulares, para llevar a cabo los estudios de investigación.

En caso de detectar cualquier alteración genética relevante, se comunicará el resultado a los padres y se ofrecerá a los familiares la posibilidad de realizar estudios complementarios con el fin de determinar si la alteración genética ha sido heredada o no, para así poder ofrecer un consejo genético adecuado. Por este motivo se ruega que comuniquen cualquier cambio de domicilio o teléfono de contacto.

Estudio financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias.

**Para cualquier aclaración sobre el tema contactar con:
Mónica Roselló, Carmen Orellana o Francisco Martínez
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal
Teléfono directo: 96 197 3153**



Consentimiento informado para estudio genético.

....., en calidad de padre o representante legal
....., en calidad de madre o representante legal
.....(Nombre del paciente)

Según el artículo 10 de la Ley General de Sanidad 14/86, se me ha informado que las muestras que se han extraído se utilizarán en un proyecto de investigación y, que los procedimientos diagnósticos que se le apliquen en ningún caso comportarán peligro adicional para su salud.

El objetivo del presente estudio es intentar identificar las posibles alteraciones genéticas causantes de la enfermedad que padece (ver la nota informativa adjunta). La finalidad del presente estudio es ampliar conocimientos de interés general y del mismo no se podrá derivar beneficio económico directa o indirectamente.

Se informará sobre los resultados obtenidos del estudio que puedan ser relevantes para el paciente o sus familiares. No obstante, es posible que de dicho estudio no se derive ningún resultado concluyente, en cuyo caso no se emitirá ningún informe.

He podido hacer preguntas sobre dicho estudio y he recibido suficiente información al respecto.

Se me ha informado de que tanto sus datos personales como los resultados derivados de este estudio estarán protegidos por la Ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal y según la normativa establecida por el Hospital. Sólo tendrá acceso a los mismos el personal de plantilla con causa justificada. Comprendo que puedo revocar la presente participación en el estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Doy mi conformidad para la inclusión de los datos clínicos y genéticos que el equipo investigador considere oportunos, con plenas garantías de confidencialidad, en la base de datos de la Red Temática de Investigación Cooperativa (GIRMOGEN) financiada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo). SI NO

Presto mi conformidad para la participación en el estudio. Fecha

Firma padre DNI.....Firma madre DNI.....El investigador.....

REVOCACIÓN

Revoco la autorización arriba señalada. Fecha

Firma del representante DNI El investigador:.....

ANEXO III

Resumen de las principales características clínicas y variantes de dosis en los 73 pacientes en los que se detectó alguna CNV causal (91 CNVs).

Número caso	Gestación/recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
CGM1160	RCIU	hipertelorismo, epicantus, micrognatia	microcefalia, criptorquidia, talla baja	-	AB RM	DEL*	Chr12:0-5000000	H	M
						DUP*	Chr13:109140000 -114100000		
CGM1199	RCIU, hipotonía	frente prominente, hipertelorismo, epicantus, nariz ancha y plana, micrognatia, orejas imp baja	sindactilia, criptorquidia, talla baja	hipotonía, hipoacusia	-	DEL	Chr7:19120000 -19700000	dn	D
CGM1208	A aborto	asimetría, hipertelorismo, micrognatia, facies triangular	PDA, hipotiroidismo	-	-	DUP	Chr16:28481861 -29089697	H	P
CGM1313	-	hipertelorismo, prognatismo, nariz bulbosa, labio sup fino, filtrum largo, dientes supernumerarios	braquidactilia, micropene, criptorquidia, escoliosis	hipotonía, megacisterna maga, hipoplasia CC	-	DEL	Chr8:0-6720000	dn	M
						DUP	Chr8:12772000 -35784000		
CGM1330	A aborto	orejas imp baja, grandes y dismórficas	aracnodactilia, lordosis, hipotiroidismo	hipertonía, epilepsia, autismo	-	DUP	ChrX:152850000 -153062000	H	M
CGM1349	hipertonía	orejas imp baja	braquicefalia, clino-sindactilia, escoliosis	atrofia córtico-subcortical	AB RM	DEL	Chr2:177246000 -180516000	dn	P
CGM1353	RCIU	hipertelorismo, orejas imp baja, raiz nasal hundida, ausencia dientes	microcefalia	-	-	DEL	Chr1:167024416 -172150939	dn	M
CGM1385	-	hipertelorismo, labio leporino, fisura palatina	macro-hidrocefalia, aracnodactilia, dilatación aórtica, criptorquidia	hipoacusia, ventriculomegalia, áreas desmielinización	AC AB	DUP	Chr7:73481000 -74984000	dn	D
CGM1387	RCIU	hipertelorismo, epicantus	pulgares imp baja, lux cong cadera	hipertonía	AB RM	DEL	Chr5:0-11500000	H	M
						DUP	Chr10:129774730 -135374737		
CGM1388	RCIU	hipertelorismo, fisuras palp abajo, orejas imp baja	-	hipotonía, estereotipias	AB	DEL	Chr9:138913000 -140128000	dn	P

Número caso	Gestación/recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
CGM1397	-	fisuras palp abajo, orejas imp baja, raiz nasal hundida, narinas antevertidas, diástasis dental	microcefalia, asimetría miembros inferiores	hipoacusia, epilepsia, autismo	AC AB RM	DEL	Chr9:139119000 -140128000	dn	P
CGM1414	-	orejas imp baja, raiz nasal hundida, labios gruesos	-	-	RM	DEL	Chr6:93800000 -103000000	dn	P
CGM1513	RCIU	hipertelorismo, fisuras palp arriba, orejas dismórficas, labio sup fino	-	hipertonía, convulsiones t-c, autismo, Arnold Chiari I	AC RM	DUP	Chr19:61012000 -61281000	dn	D
CGM1525	-	hipertelorismo, fisuras palp abajo, orejas imp baja, raiz nasal hundida	-	epilepsia, agresividad	-	DEL DUP	Chr4:0-1323000 Chr4:1379000 -2472000	dn	D
CGM1526	hipertonía	orejas imp baja, filtrum corto	macrocefalia, testes pequeños	hipotonía, epilepsia, autismo	-	DEL	Chr5:86142512 -90112875	dn	P
CGM1527	Disminución movimientos fetales, hipotonía	orejas grandes y dismórficas, prognatismo, labios V inv, filtrum largo, facies tosca	manos pequeñas, testes pequeños en ascensor, lordosis	epilepsia	AB	DEL	Chr1:242638000 -243791000	dn	P
CGM1606	-	sinofridia, prognatismo, facies hundida	pulgares imp baja	hiperactividad, agresividad	-	DEL DUP	ChrX:153786000 -154213000 ChrX:15916000 -16324000	dn H	P M
CGM165	RCIU	hipertelorismo, orejas pequeñas, cejas pobladas	hipertricosis, manos toscas	hipotonía, trastorno sueño, hiperactividad, agresividad	-	DEL	Chr22:49524182 -49525130	dn	D
CGM1696	-	nariz bulbosa, filtrum largo-plano	hipertrofia ventricular	hiperactividad	AC	DEL	Chr16:21857310 -22344023	H	P
CGM1819	RCIU	asimetría, epicantus, sinofridia, nariz pequeña punta hundida y narinas antevertidas, labios V inv	dedos afilados, ectasia renal bilateral, micropene	-	-	DEL DUP	Chr14:102993000 -106329000 Chr8:140699000 -146250000	H	P
CGM2040	-	orejas grandes, prognatismo, raiz nasal hundida, labios gruesos	-	autismo	RM	DUP DUP	ChrX:152930000 -153230000 ChrX:153393000 -153531000	dn	P

Número caso	Gestación/recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
CGM2067	eco: cardioPía	hipertelorismo, orejas pequeñas imp baja, raiz nasal hundida, labios V inv, fisura palatina	clino-aracnodactilia, CIA+CIV+PDA	hipotonía	-	DEL	Chr1:0-3873000	dn	D
CGM2103	RCIU	hipertelorismo, orejas imp baja y rotadas, sinofridia, labios V inv y sup fino	microcefalia, manos pequeñas, duplicidad sistema renal derecho	hipoacusia, epilepsia, autismo, disgenesia CC	RM	DUP	Chr22:17276000-19230000	H	P
CGM2161	RCIU	asimetría, hipertelorismo, orejas pequeñas imp baja, micrognatia, labio sup fino inf grueso, filtrum largo-plano, frente prominente, facies plana	microcefalia, clino-sindactilia, escoliosis	trastorno sueño	RM	DUP	Chr2:143702631-149720317	dn	M
CGM2179	RCIU, A aborto	asimetría, orejas grandes, facies plana	microcefalia	hipotonía, trastorno sueño	-	DEL	Chr11:75730000-83639000	dn	P
CGM2182	hipotonía	hipertelorismo, fisuras palp abajo, orejas imp baja, ojos saltones, nariz grande, labios V inv, frente prominente	aracnodactilia, CIA	hipotonía	RM	DUP	Chr16:14956000-16213000	H	P
CGM2292	polihidramnios, RCIU, eco: cardioPía, hipotonía	asimetría, microftalmia-coloboma, Pierre Robin, raiz nasal hundida	microcefalia, CIA+PDA, hemangiomas	hipertonía, disgenesia CC	-	DEL	Chr16:3721465-3801247	dn	D
CGM2350	RCIU	micrognatia, labios V inv, facies triangular	microcefalia, ano anterior	hiperactividad	-	DUP	Chr2:24374370-37745875	dn	P
CGM2402	eco: hidronefrosis	hipertelorismo, epicantus, orejas imp baja, Pierre Robin, labios V inv	microcefalia, occipucio plano, clinodactilia-hipoplasia uñas, pterigium colli	hipertonía, hipoacusia, trastorno sueño, hiperactividad, afectación sus blanca	-	DEL	Chr2:148318877-152141625	dn	P
CGM2405	-	asimetría, orejas dismórficas, ojos hundidos, cejas escasas en arco, Pierre Robin, raiz nasal hundida	microcefalia, braquidactilia, PDA+displasia aórtica, hernia inguinal bilateral	-	-	DEL	Chr4:0-1905000	H	P
					-	DUP	Chr21:42050323-46944323		

Número caso	Gestación/ recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
CGM2412	polihidramnios, RCIU	hipertelorismo, epicantus, orejas grandes imp baja, raiz nasal hundida, labios gruesos	manos toscas, hernia inguinal	autismo	AC	DEL	Chr7:72332743-74616901	dn	D
CGM2419	A aborto	fisuras palp arriba, orejas dismórficas imp baja, raiz nasal hundida, labios V inv	braquidactilia, criptorquidia	hipotonía, hipoacusia, hiperactividad, autismo, asimetría ventriculos	-	DEL	Chr22:17277485-19792554	dn	D
CGM2428	RCIU	orejas pequeñas imp baja, sinofridia, micrognatia, raiz nasal hundida, labios gruesos	microcefalia, braqui-sindactilia, uñas distróficas, manchas acrómicas	-	-	DEL	Chr6:157427902-157495889	dn	D
CGM2433	A aborto	fisuras palp abajo, orejas dismórficas pequeñas rotadas imp baja, micrognatia	microcefalia, CIV, ectasia piélica bilateral (II)	hipotonía axial e hipertonia miembros, autismo	AB	DEL	Chr2:108666964-108747134	dn	D
CGM245	-	hipertelorismo, fisuras palp abajo, orejas grandes, prognatismo, punta nasal bulbosa	braquidactilia, CIA+estenosis aórtica, riñón en herradura	hipotonía, leucomalacia periventricular	-	DEL	Chr13:112809000-114077000	H	M
						DUP	Chr15:82964000-100168000		
CGM2451	-	hipertelorismo, fisuras palp arriba, orejas imp baja, filtrum largo-plano	-	hipoacusia, hiperactividad, autismo	AC	DEL	Chr18:64904611-76083117	dn	D
CGM2488	-	hipertelorismo, fisuras palp estrechas arriba, orejas dismórficas, micrognatia, labios gruesos, filtrum plano	microcefalia, vitfligo	hiperactividad	-	DEL	Chr7:72332743-74616901	dn	D
CGM2494	A aborto, RCIU, AUU	hipertelorismo, fisuras palp estrechas, orejas grandes raiz nasal hundida, labios V inv	polidactilia, CIA+CIV+PDA, hipertrofia clítoris, vértebras mariposa	-	-	DEL	Chr21:26099513-29452773	H	M
CGM2537	polihidramnios, hipotonía	hipertelorismo, orejas imp baja, micrognatia, frente prominente	hernia inguinal bilateral, hernia umbilical	hipotonía, hipoacusia, trastorno sueño, epilepsia, hiperactividad, autismo, agresividad	-	DEL	Chr22:49319728-49590612	dn	D

Número caso	Gestación/recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
CGM2733	-	hipertelorismo, fisuras palp arriba, epicanthus, orejas grandes imp baja, raiz nasal hundida	hernia inguinal	hipotonía, hipoacusia, autismo, hipoplasia vermis cerebeloso	-	DUP	Chr17:116343-4393321	dn	P
CGM2756	oligoamnios, eco: quistes plexos coroideos	hipotelorismo, fisuras palp arriba, orejas dismórficas, raiz nasal hundida, filtrum plano	microcefalia, sindactilia, PDA, "scrotal shacelar"	hipoacusia	AC	DEL	Chr2:171729760-189443541	dn	P
CGM2822	-	orejas imp baja, sinofridia, max superior protuyente, labio sup fino	clinodactilia, hipoplasia labios mayores	-	AC RM	DUP	Chr16:15399818-17919962	H	M
CGM2952	-	fisuras palp estrechas, orejas imp baja, Pierre Robin, labios V inv sup fino, fisura palatina, filtrum corto	microcefalia, clinodactilia, cifo-lordosis	convulsiones t-c	AC RM	DEL	Chr16:29581455-30104842	H	P
CGM305	A aborto, hipotonía	asimetría, orejas dismórficas imp baja, retrognatia, nariz bulbosa	pulgares adducción, CIA	hipotonía, convulsiones t-c, autismo, disgenesia CC	AC	DEL	Chr22:36271000-37282000	dn	D
						DEL	Chr22:42562000-47789000		
CGM506	RCIU, hipotonía	hipertelorismo, fisuras palp abajo, orejas dismórficas imp baja, ojos hundidos, nariz en gancho	microcefalia, manos toscas y cortas	trastorno sueño, hipoplasia CC	-	DEL	Chr1:0-2100000	dn	D
CGM548	-	orejas dismórficas imp baja, raiz nasal hundida, labios gruesos	macro-hidrocefalia, manos toscas, hipotiroidismo	hipotonía, epilepsia, ventriculomegalia	-	DUP	ChrX:45063000-48922000	dn	P
CGM784	A aborto	orejas imp baja, micrognatia, raiz nasal hundida	-	hiperactividad, agresividad	AC AB RM	DEL	Chr3:197292000-198462000	H	M
CGM897	-	asimetría, hipertelorismo, fisuras palp arriba, orejas dismórficas, labios V inv, frente prominente	microcefalia, dedos afilados, hernia umbilical	hipotonía, epilepsia	AB	DEL	Chr4:62447-3740069	H	P
						DUP	Chr11:186966-3338575		

Número caso	Gestación/recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
CGM912	Polihidramnios, hipertoniá	fisuras palp arriba, orejas imp baja, Pierre-Robin, labios gruesos, diástasis dentaria	aracno-campodactilia, luxación congénita de cadera, laringomalacia	hipotonía axial e hipertornía miembros, autismo, atrofia córtico-subcortical	-	DEL	Chr7:65733000-68524000	dn	D
						DEL	Chr16:28395588-30106054		
CGM935	polihidramnios, RCIU, eco: AUU, labio leporino	hipertelorismo, raiz nasal hundida, labio leporino-fisura palatina	clinodactilia, CIA+CIV+HTP, agenesia renal	ventriculomegalia, hipoplasia CC	RM	DEL*	Chr5:0-13500000	H	P
						DUP*	Chr9:0-6200000		
CGM967	-	hipertelorismo, fisuras palp arriba, orejas grandes imp baja, ojos saltones, labios V inv	clinodactilia, CIA+PDA, micropene, asimetría miembros, escoliosis	hipotonía, hipoacusia, epilepsia, lesión sus blanca	AB	DEL*	Chr6:0-6900000	H	M
						DUP*	Chr3:195100000-199000000		
CGM991	-	orejas imp baja, coloboma, micrognatia, nariz bulbosa, labios V inv sup fino, filtrum liso	sindactilia-dedos afilados, micropene, testes pequeños	asimetría ventricular	AB	DUP	Chr14:18832000-23660000	dn	M
X1186	hipotonía	hipertelorismo, disposición anómala cejas	hipertricosis	hipotonía, autismo, agresividad	AC	DEL	Chr13:93423000-98967000	dn	P
X2629	-	hipertelorismo, fisuras palp abajo, telecantus, micrognatia, labio sup fino, filtrum largo	-	-	AB RM	DEL	Chr15:67908680-69198904	H	M
X2686	-	orejas grandes imp baja, prognatismo, orejas grandes, labios gruesos, filtrum corto	aracnodactilia, escoliosis, diabetes mellitus	hiperactividad, agresividad	RM	DUP	Chr22:48996000-49525000	dn	D
X3361	oligoamnios	asimetría, hipertelorismo, epicantus, orejas grandes, raiz nasal hundida, facies plana	-	hipotonía, agresividad	-	DEL	Chr21:45115438-46892352	H	M
						DUP	Chr17:48539-4167891		
X841	-	orejas dismórficas grandes, prognatismo, raiz nasal hundida	aracnodactilia, luxación congénita de cadera	autismo, agresividad	AB RM	DUP	ChrX:152373000-153433000	H	M
XF1054	A aborto	hipotelorismo, sinofridia	microcefalia	hiperactividad, autismo	AC	DEL	Chr22:48182000-49525000	dn	D

Número caso	Gestación/recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
XF1338	-	hipertelorismo, fisuras palp arriba, orejas pequeñas dismórficas imp baja, sinofridia, prognatismo	hipertricosis, manos toscas y cortas, manchas café con leche	hiperactividad, autismo	AC AB RM	DUP	Chr16:14852000 -16157000	H	P
XF1526	-	orejas dismórficas rotadas, prognatismo	escoliosis, acantosis nigrans	hipotonía, hipoacusia, epilepsia	RM	DEL	Chr20:39462651 -42007856	H	P
XF1701	A aborto, hipotonía	fisuras palp arriba, orejas imp baja, prognatismo, labios V inv, frente prominete	macrocefalia, hiperlaxitud ligamentosa	hipotonía, hiperactividad, autismo, hipoplasia CC	-	DEL	Chr3:113681019 -116922721	dn	M
XF1702	-	fisuras palp abajo, orejas imp baja, micrognatia, labios gruesos	microcefalia, manos y pies grandes, dedos afilados, criptorquidia	hipotonía, hiperactividad, agresividad, aumento surcos corticales	-	DUP	ChrX:72349923 -91012127	H	M
XF1774	-	hipertelorismo, orejas imp baja	déficit GH	hipertonía	AC AB RM	DEL	Chr6:93930000 -104244000	dn	P
						DUP	Chr16:29746000 -30106000	dn	D
XF2019	hipotonía	síndrome Duane, cejas muy pobladas, labios gruesos	CIV	hipoacusia, hiperactividad	-	DUP	Chr8:59536000 -62526000	H	P
XF2184	-	asimetría, filtrum largo	-	hiperactividad, agresividad	RM	DUP	Chr16:29581000 -30106000	H	M
XF2296	oligoamnios, A aborto, hipotonía	hipertelorismo, fisuras palp arriba, epicanthus, prognatismo, raiz nasal hundida, diástasis dentaria	alteraciones ritmo cardíaco	hipotonía, epilepsia, hiperactividad	-	DEL	Chr6:117561349 -125021400	dn	M
XF2337	hipotonía axial e hipertonía miembros	fisuras palp estrechas, ojos saltones, retrognatia, raiz nasal hundida, labios V inv sup fino, filtrum plano, frente prominente	pulgares imp baja	epilepsia, hiperactividad, autismo, agresividad	-	DEL*	Chr2:231100000 -242100000	dn	D
						DUP*	Chr1:239100000 -245100000		
XF2463	-	filtrum plano	microcefalia, criptorquidia, pies zambos	-	AB	DEL	Chr2:0-2757000	dn	P
						DUP	Chr2:230702000 -242690000		
XF2623	-	prognatismo, facies alargada	-	hipotonía, epilepsia, hiperactividad	-	DEL	Chr12:120712057 -121936643	dn	P

Número caso	Gestación/ recién nacido	Rasgos dismórficos	Defectos congénitos	Rasgos neurológicos	AF	Alt	Localización genómica (Hg18)	He	O
XF2761	-	orejas dismórficas imp baja	hernia inguinal, criptorquidia	epilepsia	RM	DUP	ChrX:53238000-54239000	H	M
XF2789	oligoamnios, RCIU, eco: fémur corto, hipotonía	hipertelorismo, orejas imp baja, ojos hundidos, cejas muy pobladas, raiz nasal hundida, filtrum largo-plano, facies alargada	macrocefalia, hipertricosis, criptorquidia	hipotonía, epilepsia, autismo	-	DEL	Chr17:43612631-44213267	dn	D
XF2863	-	epicantus, orejas imp baja, cejas muy pobladas, raiz nasal hundida	macrocefalia, CIA+CIIV	hipotonía, trastorno sueño, agresividad	-	DEL	Chr17:16646746-20482061	dn	D
XF977	RCIU	orejas dismórficas, micrognatia	microcefalia, clino-aracnodactilia	-	AB	DUP	Chr19:1903590-6859729	H	M

*Tamaño estimado de la deleción y duplicación en función del resultado del estudio con marcadores polimórficos tipo microsatélite.

Abreviaturas (por orden alfabético):

A aborto: amenaza de aborto **AB:** antecedentes familiares de abortos **AC:** antecedentes familiares de anomalías congénitas
AF: antecedentes familiares **Alt:** alteración genética **AUU:** arteria umbilical única
cardioPía: cardiopatía **CC:** cuerpo calloso **CIA:** comunicación interauricular **CIV:** comunicación interventricular
D: desconocido **dn:** *de novo* **DEL:** delección **DUP:** duplicación **eco:** ecografía
H: heredada **He:** herencia **HTP:** hipertensión pulmonar
imp: implantación **inf:** inferior
lux cong: luxación congénita
M: materno **max:** maxilar
O: origen
P: paterno **palp:** palpebrales **PDA:** persistencia del *ductus arterioso*
RCIU: retraso de crecimiento intrauterino **RM:** antecedentes familiares de discapacidad intelectual
sus: sustancia **sup:** superior
t-c: tónico clónicas
V inv: invertida

ANEXO IV

Financiación.

“Aplicación de la CGH-array para la detección de reordenamientos genómicos responsables de retraso mental de causa desconocida” (PI040421). Investigador principal: Dr. Francisco Martínez.

“Rastreo genómico de alta resolución en genes candidatos de trastornos del neurodesarrollo” (PI080648). Investigador principal: Dr. Francisco Martínez.

“Rastreo de regiones genómicas propensas a sufrir reordenamientos en niños con retraso mental asociado a anomalías congénitas” (PIAP-096/06). Investigador principal: Dra. Carmen Orellana

“Determinación de la localización genómica de segmentos duplicados en pacientes con trastornos del neurodesarrollo para identificar casos con alto riesgo de recurrencia familiar” (PI AP-138/11). Investigador principal: Dra. Carmen Orellana.

“Búsqueda e identificación de nuevas causas genéticas y epigenéticas de trastornos del espectro autista: diseño y aplicación de un array dirigido de alta resolución, con elementos clave de la maquinaria epigenética” (PI 2009/0093). Investigador principal: Dra. Carmen Orellana.

