



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado de Biología Molecular y Genética

Grupo acreditado de Investigación Traslacional en Genética

BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS CAUSAS GENÉTICAS O EPIGENÉTICAS DE TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Sonia Mayo de Andrés

Dirigida por:
Dr. Francisco Martínez Castellano
Dra. Carmen Orellana Alonso

Valencia, 2015

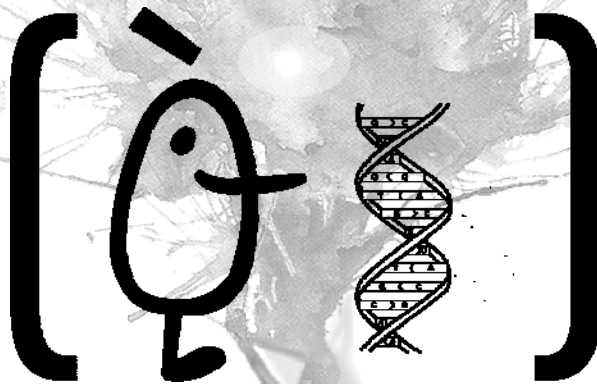


VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

LaFe
Hospital
Universitari
i Politècnic

**BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS CAUSAS
GENÉTICAS O EPIGENÉTICAS DE TRASTORNOS DEL
NEURODESARROLLO**

TESIS DOCTORAL



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado de Biología Molecular y Genética

Grupo acreditado de Investigación Traslacional en Genética

Sonia Mayo de Andrés

Directores: Dr. Francisco Martínez Castellano
Dra. Carmen Orellana Alonso



LaFe
Hospital
Universitari
i Politècnic

Título de la Tesis Doctoral

Búsqueda e Identificación de Nuevas Causas Genéticas o Epigenéticas de Trastornos del Neurodesarrollo

Programa de Doctorado
Biología Molecular y Genética (030 F)

Directores de la tesis
Dr. Francisco Martínez Castellano
Dra. Carmen Orellana Alonso

Realizada por

A blue ink handwritten signature, appearing to be "Sonia Mayo de Andrés".

Sonia Mayo de Andrés



El Dr. FRANCISCO MARTÍNEZ CASTELLANO y la Dra. CARMEN ORELLANA ALONSO, investigadores del Grupo de Investigación Traslacional en Genética del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

CERTIFICAN

Que la presente memoria titulada "Búsqueda e Identificación de Nuevas Causas Genéticas o Epigenéticas de Trastornos del Neurodesarrollo" ha sido realizada, bajo su dirección en la Unidad de Genética del Hospital Universitario y Politécnico La Fe por Sonia Mayo de Andrés, licenciada en Bioquímica por la Universidad de Valencia y que, habiendo revisado el trabajo, consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

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

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia a 1 de septiembre de 2015.



Fdo. Dr. Francisco Martínez Castellano



Fdo. Dra. Carmen Orellana Alonso

*"The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not 'Eureka!' (I found it!) but
'That's funny ...' "*
(Isaac Asimov)

ÍNDICES





ABREVIATURAS.....	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. Discapacidad intelectual	3
1.1 Definición	3
1.2 Clasificación.....	3
1.3 Prevalencia	4
1.4 Etiología.....	5
1.4.1. <i>Causas ambientales</i>	6
1.4.2. <i>Causas genéticas</i>	7
1.4.3. <i>Multifactoriales</i>	8
2. Epigenética	9
2.1 Mecanismos implicados en la regulación epigenética.	11
2.1.1. <i>Metilación del DNA</i>	11
2.1.2. <i>Modificación de histonas</i>	12
2.1.3. <i>Variantes de histonas</i>	15
2.1.4. <i>RNAs no codificantes</i>	15
2.1.5. <i>Editado del RNA</i>	17
2.1.6. <i>Otros factores que participan en la remodelación de la cromatina</i>	17
2.2 Procesos regulados por mecanismos epigenéticos	17
2.2.1. <i>Inactivación del Cromosoma X</i>	17
2.2.2. <i>Impronta génica</i>	18
2.3 Genes epigenéticos	20
3. Alteraciones epigenéticas en trastornos del neurodesarrollo	21
3.1 Alteraciones conocidas en genes epigenéticos	22
3.1.1. <i>MECP2</i>	22
3.1.2. <i>EHMT1</i>	24
3.1.3. <i>HDAC4</i>	25
3.1.4. <i>ATRX</i>	25
3.2 Alteraciones conocidas de la impronta	27
3.2.1. <i>Síndrome de Angelman</i>	29
3.2.2. <i>Síndrome de Prader-Willi</i>	29
3.2.3. <i>Síndrome de Temple y Síndrome de Kagami-Ogata</i>	29
3.2.4. <i>Síndrome de Silver-Rusell</i>	30
3.2.5. <i>Síndrome de Beckwith-Wiedemann</i>	30
4. Técnicas moleculares para el estudio de los trastornos del neurodesarrollo.....	30

HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Sujetos de estudio	43
1.1 Pacientes	43
1.2 Grupos control	44
2. Obtención de ácidos nucleicos	45
2.1 Extracción de ácidos nucleicos	45
2.1.1. <i>DNA genómico</i>	45
2.1.2. <i>RNA</i>	46
2.1.3. <i>cDNA</i>	47
2.2 Cuantificación y valoración de la calidad de los ácidos nucleicos	47
2.2.1. <i>DNA genómico</i>	47
2.2.2. <i>RNA y cDNA</i>	47
3. PCR	48
3.1 Reactivos de PCR	48
3.1.1. <i>PCR convencional</i>	48
3.1.2. <i>PCR para tamaños grandes</i>	49
3.2 Programas de PCR	50
3.2.1. <i>PCR convencional</i>	50
3.2.2. <i>PCR para tamaños grandes</i>	51
4. Electroforesis	51
4.1 Electroforesis en gel de agarosa	51
4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida	52
4.3 Electroforesis capilar	52
5. Reacción de secuenciación	54
6. CGH-array de oligonucleótidos	55
6.1 CGH-array comercial	55
6.2 CGH-array de diseño propio	56
6.3 Protocolo de hibridación y escaneo	60
6.3.1. <i>Preparación de las muestras</i>	60
6.3.2. <i>Marcaje</i>	60
6.3.3. <i>Hibridación</i>	60
6.3.4. <i>Escaneo</i>	61
6.4 Análisis de los resultados	61
6.4.1. <i>Parámetros de preprocesamiento</i>	61
6.4.2. <i>Parámetros de análisis</i>	63
6.4.3. <i>Representación de los resultados</i>	64

7.	FISH	66
8.	MLPA	66
9.	MS-MLPA	67
10.	Análisis de segregación de marcadores microsatélite	69
11.	PCR cuantitativa.....	69
12.	Digestión con enzimas de restricción	71
12.1	Estudio de Inactivación del cromosoma X	72
12.2	Mapa de restricción	73
13.	Heterodúplex.....	73
14.	Metilación generalizada (HPLC).....	75
15.	Rastreo de regiones sometidas a impronta	76
16.	Bases de datos.....	77
16.1	UCSC.....	77
16.2	NCBI	78
16.3	DGV (<i>Database of Genomic Variants</i>).....	79
16.4	Búsqueda de CNVs consideradas patológicas	79
16.5	Expresión génica	79
16.6	Otras bases de datos o fuentes de información de interés.....	80
17.	Esquema de trabajo	80
RESULTADOS		83
1.	Cambio de dosis.....	85
1.1	Descripción general de los resultados obtenidos en los estudios por CGH-array	85
1.1.1.	<i>Resultados del CGH-array comercial</i>	88
1.1.2.	<i>Resultados del CGH-array de diseño propio</i>	89
1.2	Alteraciones en genes epigenéticos de interés.....	90
1.2.1.	<i>Análisis de enriquecimiento en genes epigenéticos</i>	90
1.2.2.	<i>Genes epigenéticos causantes de DI</i>	92
1.2.3.	<i>Genes epigenéticos candidatos a DI</i>	113
1.3	Otras alteraciones en regiones de interés detectadas por el array de diseño propio.....	126
1.3.1.	<i>Alteraciones patológicas</i>	126
1.3.2.	<i>Alteraciones intragénicas</i>	128
1.4	Alteraciones en elementos reguladores.....	131
1.4.1.	<i>Análisis de enriquecimiento en elementos ultraconservados</i>	131
1.4.2.	<i>Análisis de enriquecimiento en miRNAs</i>	133
1.4.3.	<i>Aplicación del array de diseño propio para la detección de alteraciones en miRNAs y UCES</i>	134

1.5	Análisis de la zona gris.....	135
1.5.1.	<i>Análisis de enriquecimiento en la zona gris de distintos elementos de interés</i>	137
1.5.2.	<i>Generación de genes quimera</i>	138
2.	Genes candidatos	155
2.1	Rastreo de mutaciones en el gen <i>MYT1L</i>	155
3.	Metilación generalizada.....	158
4.	Regiones sometidas a impronta.....	166
4.1	<i>KCNQ1OT1</i>	166
4.2	<i>H19</i>	166
4.3	<i>SNRPN</i>	168
4.4	<i>MEG3</i>	169
4.4.1.	<i>Disomía uniparental materna</i>	169
4.4.2.	<i>Disomía uniparental paterna</i>	170
4.5	Polimorfismo en <i>KCNQ1OT1</i>	171
DISCUSIÓN		173
1.	Cambio de dosis	175
1.1	Valoración de los resultados del Array de diseño propio	175
1.1.1.	<i>Comparación de los resultados obtenidos con otras series publicadas</i>	176
1.1.2.	<i>CGH-array de diseño propio vs comercial</i>	179
1.1.3.	<i>Alteraciones intragénicas</i>	181
1.2	Alteraciones en genes implicados en la maquinaria epigenética 183	
1.2.1.	<i>Análisis de enriquecimiento</i>	184
1.2.2.	<i>Genes epigenéticos patológicos</i>	184
1.2.3.	<i>Genes epigenéticos candidatos de DI</i>	189
1.2.4.	<i>Importancia de los genes epigenéticos en el neurodesarrollo</i> ... 193	
1.3	Alteraciones en elementos reguladores.....	194
1.4	Zona Gris	195
1.4.1.	<i>Análisis de enriquecimiento</i>	195
1.4.2.	<i>Genes quimera</i>	197
2.	Genes candidatos	201
2.1	<i>MYT1L</i>	201
3.	Metilación generalizada.....	205
4.	Regiones sometidas a impronta.....	207
CONCLUSIONES.....		211
BIBLIOGRAFÍA		215

ANEXOS	245
Anexo I: Hoja de recogida de datos clínicos y consentimiento informado	247
Anexo II: Casos control con alteración en algún gen implicado en la regulación epigenética.....	250
Anexo III: Diseño del array a la carta	251
Anexo IV: Sondas FISH	297
Anexo V: SALSAS de MLPA	298
Anexo VI: Marcadores microsatélites.....	301
Anexo VII: PCR cuantitativa	305
Anexo VIII: Otros cebadores	310
Anexo IX: Alteraciones detectadas por CGH-array.....	313
Anexo X: Genes epigenéticos	322
 AGRADECIMIENTOS	 325

Figura 1: Distribución de la DI en función del grado de afectación.....	5
Figura 2: Esquema de las principales causas de DI conocidas	6
Figura 3: Representación esquemática de distintos procesos en los que participan los diferentes mecanismos epigenéticos.....	10
Figura 4: Reacción de metilación de la citosina	11
Figura 5: Representación del ensamblaje de las histonas para formar el nucleosoma	12
Figura 6: Ejemplo de distintos dominios proteicos que reconocen diferentes modificaciones en residuos de histonas	12
Figura 7: Reacción de acetilación y desacetilación de lisina	13
Figura 8: Modificaciones de histonas	14
Figura 9: Variantes de Histonas.....	15
Figura 10: Ejemplos de la implicación de los ncRNAs en la regulación epigenética.....	16
Figura 11: Cromosoma X y localización de PAR1, PAR2 y XIC.....	18
Figura 12: Representación esquemática de las marcas epigenéticas observadas en nucleosomas de cromosoma X activo e inactivo	18
Figura 13: Representación del modelo aislante de impronta en el dominio H19/IGF2.....	20
Figura 14: Representación del modelo lncRNA de impronta en el grupo de genes regulado por KvDMR1	20
Figura 15: Representación del papel de MECP2 en la represión y activación transcripcional.....	23
Figura 16: Modelo hipotético de intercambio de histonas mediado por ATRX en la activación transcripcional de genes específicos.....	26
Figura 17: Representación de la participación de ATRX en la estabilización de la estructura secundaria del DNA	26
Figura 18: Distribución del número de pacientes según su fecha de inclusión	43
Figura 19: Distribución por género y edad de pacientes y controles	45
Figura 20: Esquema del proceso de extracción de DNA genómico en columna	46
Figura 21: Esquema del proceso de extracción de RNA en columna	46
Figura 22: Representación esquemática del proceso de síntesis de sondas para CGH-array con la tecnología SurePrint.....	56
Figura 23: Ejemplo de la aplicación de un método de centralización	62
Figura 24: Ejemplo de las distintas representaciones que ofrece el programa Workbench para la visualización de los resultados del CGH-array	65
Figura 25: Ejemplo que representa los valores de las sondas recogidas en una alteración detectada por CGH-array	65
Figura 26: Representación del fundamento de la técnica MLPA	67
Figura 27: Representación del fundamento de la técnica MS-MLPA.....	68
Figura 28: Ejemplo de dos curvas de fusión de qPCR	71
Figura 29: Esquema representativo de los posibles hallazgos en un análisis de heterodúplex.....	74

Figura 30: Opciones de búsqueda de la página web UCSC.....	78
Figura 31: Diagrama que representa el esquema de trabajo seguido.....	81
Figura 32: Representación del número de pacientes en función del número de CNV detectadas en cada caso por CGH-array	85
Figura 33: Ideograma en el que se representan las 55 CNV patológicas detectadas por el array comercial en 47 pacientes.....	88
Figura 34: Ideograma en el que se representan las 12 CNV patológicas detectadas por las distintas versiones del array de diseño propio	89
Figura 35: Distribución en el genoma de los genes seleccionados como epigenéticos.....	91
Figura 36: Herramientas estadísticas para la valoración del enriquecimiento de genes epigenéticos en CNVs	91
Figura 37: Duplicaciones detectadas en la región Xq28 que contienen al gen <i>MECP2</i>	94
Figura 38: Estudios complementarios realizados en muestras de la paciente CGM2040.....	96
Figura 39: Representación de los resultados obtenidos en el análisis de metilación de la región promotora de <i>MECP2</i>	97
Figura 40: Representación de las CNVs detectadas en 2q23 que contienen al gen <i>MBD5</i>	99
Figura 41: Representación de las duplicaciones detectadas mediante CGH-array que contienen al gen <i>ATRX</i>	101
Figura 42: Representación de la delección que afecta al gen <i>CTCF</i> en el paciente CGM3263.....	103
Figura 43: Representación de la delección que contiene el gen <i>RAD21</i> en la paciente 3298.....	104
Figura 44: Estudios complementarios realizados en muestras de la paciente 3298	105
Figura 45: Representación de las delecciones en 1q44	106
Figura 46: Representación de los cambios de dosis detectadas que afectan al gen <i>HDAC4</i>	108
Figura 47: Estudio de segregación familiar con marcadores microsatélite en la región 2q37 del paciente CGM2143.....	109
Figura 48: Resultado del FISH en el paciente XF2463	109
Figura 49: Duplicación parcial de <i>HDAC4</i> en el paciente XF3982.....	110
Figura 50: Representación de las delecciones que afectan al gen <i>EHMT1</i>	111
Figura 51: Representación de las dos duplicaciones en el cromosoma X detectadas en el paciente XF2761	113
Figura 52: Representación de la duplicación que contiene el gen <i>DNMT3A</i> en la paciente CGM2350	115
Figura 53: Representación de los cambios de dosis detectados que afectan al gen <i>WHSC1</i>	116
Figura 54: Representación de las delecciones que contienen al gen <i>SETD1B</i>	118

Figura 55: Representación de las deleciones detectadas en la región 6q16..... 120

Figura 56: Resultado del estudio por CGH-array en la paciente CGM708..... 122

Figura 57: Resultado del CGH-array en el paciente XF2463..... 123

Figura 58: Resultado del análisis del CGH-array de diseño propio en el gen *MYT1L* 124

Figura 59: Análisis confirmatorio del resultado obtenido por array en la paciente CGM1778..... 125

Figura 60: Resultado del estudio por CGH-array en el paciente XF3851 129

Figura 61: Resultado del estudio por CGH-array en la paciente CGM742..... 130

Figura 62: Fórmulas utilizadas para el análisis de enriquecimiento 131

Figura 63: Distribución en el genoma de los elementos ultraconservados..... 132

Figura 64: Distribución en el genoma de los miRNAs 134

Figura 65: Delección de MIR30C2 en la paciente 4023 135

Figura 66: Representación del tamaño de las 384 zonas de incertidumbre 136

Figura 67: Diagrama de cajas donde se representa la distribución de tamaños de las 344 regiones de incertidumbre seleccionadas en función del tipo de CNV 137

Figura 68: Representación de distintas posibilidades que podrían dar lugar a genes quimera en deleciones..... 139

Figura 69: Ejemplos de los resultados obtenidos en el análisis teórico de las zonas grises pertenecientes a las 68 deleciones seleccionadas 140

Figura 70: Representación de la delección detectada mediante CGH-array en muestra de DNA del paciente CGM2433 141

Figura 71: Estrategia para acotar los puntos de rotura que han generado la delección en la muestra del paciente CGM2433 143

Figura 72: Representación de los pasos seguidos para caracterizar los puntos de rotura que han dado lugar a la delección en la muestra CGM2433 144

Figura 73: Análisis de la región homóloga entre *LIMS1* y *RANBP2* donde se localizan los puntos de rotura que ha generado la delección en la muestra del paciente CGM2433 145

Figura 74: Estudios confirmatorios de la existencia de un transcrito de fusión entre *LIMS1* y *RANBP2* en muestra de cDNA del paciente CGM2433..... 146

Figura 75: Representación de la delección detectada mediante CGH-array en muestra de DNA de la paciente CGM2428..... 147

Figura 76: Estrategia basada en qPCR para acotar los puntos de rotura que han generado la delección en la muestra de la paciente CGM2428..... 148

Figura 77: Estudios confirmatorios de la existencia de un transcrito de fusión entre *ARID1B* y *ZDHHC14* en muestra de cDNA de la paciente CGM2428 149

Figura 78: Representación de la duplicación detectada mediante CGH-array en muestra de DNA de la paciente XF2605 151

Figura 79: Estrategia para confirmar la generación por duplicación de un gen quimera mediado por duplicación segmentaria en la muestra de la paciente XF2605..... 152

Figura 80: Estudios confirmatorios de la existencia del gen quimera entre <i>ZNF451</i> y <i>KIAA1586</i> en muestra de la paciente X2605.....	153
Figura 81: Esquema del gen quimera generado en la muestra de la paciente XF2605	154
Figura 82: Representación de los dominios funcionales principales de <i>MYT1L</i> ...	155
Figura 83: Ejemplo de tres patrones distintos obtenidos por heterodúplex del exón 9 de <i>MYT1L</i>	155
Figura 84: Ejemplo de cambios detectados en <i>MYT1L</i>	157
Figura 85: Predicción <i>in silico</i> de la patogenicidad del cambio c.31C>T (p.R11C) en <i>MYT1L</i>	158
Figura 86: Esquema del protocolo utilizado en el Kit de cuantificación de DNA metilado aplicando la técnica de ELISA.....	159
Figura 87: Curva de calibración estándar del ELISA para la cuantificación de DNA metilado	160
Figura 88: Representación de la falta de correlación entre los resultados obtenidos por la técnica ELISA frente al HPLC en la cuantificación de DNA metilado.....	160
Figura 89: Distribución de género y edad en los individuos analizados por HPLC	162
Figura 90: Distribución normal del porcentaje de citosinas metiladas.....	163
Figura 91: Diagrama de cajas apareadas según el género	164
Figura 92: Representación gráfica de la distribución del porcentaje de citosinas metiladas según el género y la edad en paciente y controles.....	165
Figura 93: Resultados positivos en el rastreo de alteraciones de la metilación en <i>loci</i> sometidos a imprinta	167
Figura 94: Resultado del análisis FISH en la paciente CGM897 y su padre con sondas teloméricas del cromosoma 4 y 11	168
Figura 95: Estudio de marcadores microsatélites del cromosoma 14 del paciente CGM991 y sus progenitores.....	169
Figura 96: Estudio de marcadores microsatélites del cromosoma 14 en la paciente CGM3432 y sus progenitores.....	170
Figura 97: Duplicación detectada mediante el array comercial en el paciente CGM3432.....	170
Figura 98: Esquema representativo de la región amplificada en <i>KCNO1OT1</i>	171
Figura 99: Resultado obtenido por ambos arrays en el paciente CGM1631	180
Figura 100: Ejemplos de alteraciones de pequeño tamaño detectadas en el array de diseño propio consideradas como artefactos	181
Figura 101: Representación de las distintas duplicaciones de <i>MECP2</i> intracromosómicas descritas en mujeres con manifestaciones clínicas.....	186
Figura 102: Ejemplos del efecto del desequilibrio estequiométrico en la formación de complejos proteicos funcionales	188
Figura 103: Representación de dos posibles reordenamientos que darían lugar a la duplicación del gen <i>ANKRD12</i>	192
Figura 104: Patrones de expresión de <i>LIMS1</i> y <i>RANBP2</i>	198

Figura 105: Patrones de expresión de *KIAA1586* y *ZNF451*..... 199

Figura 106: Ejemplos de los parámetros utilizados para la selección sondas en el diseño del array a la carta 293

Figura 107: Representación esquemática de los distintos criterios utilizados para la eliminación de sondas imbricadas en el diseño del array a la carta 296

Tabla 1: Criterios de clasificación de la DI según la versión del 2015 de la CIE-10..4	
Tabla 2: Selección de estudios publicados después del 2000 con estimaciones de la prevalencia para la DI en diferentes poblaciones	5
Tabla 3: Ejemplos de síndromes de delección o duplicación asociados a DI	7
Tabla 4: Ejemplos de enfermedades monogénicas que pueden cursar con DI y presentan un patrón de herencia autosómico dominante	8
Tabla 5: Efecto sobre la transcripción de distintos patrones conocidos de metilación de histonas	13
Tabla 6: Ejemplo de agrupaciones de genes sometidos a impronta	19
Tabla 7: Listado de los principales mecanismos epigenéticos y ejemplos de genes implicados	21
Tabla 8: Ejemplo de síndromes que cursan con DI causados por alteraciones en genes epigenéticos	22
Tabla 9: Resumen general de las principales características de distintos síndromes de impronta conocidos	28
Tabla 10: Mezcla de reacción utilizada para la síntesis de cDNA	47
Tabla 11: Mezcla de reacción por muestra para la reacción de qPCR	48
Tabla 12: Condiciones más habitualmente utilizadas en este trabajo para las reacciones de PCR	49
Tabla 13: Condiciones utilizadas en este trabajo para la amplificación de fragmentos con tamaño superior a 1 Kb	49
Tabla 14: Condiciones generales de los geles de agarosa utilizados	52
Tabla 15: Reactivos utilizados para la síntesis de geles de poliacrilamida	52
Tabla 16: Secuenciadores que se han utilizado para realizar este trabajo y sus características en función de la aplicación	53
Tabla 17: Características en la preparación de las muestras para su resolución por electroforesis capilar	53
Tabla 18: Mezcla para la reacción de secuenciación	54
Tabla 19: Resumen de los parámetros que definen los distintos diseños del array a la carta	58
Tabla 20: Posibles valores teóricos de RQ en función de la alteración en número de copia presente en la muestra problema	70
Tabla 21: Reactivos y cantidades utilizadas para qPCR	70
Tabla 22: Enzimas de restricción utilizadas en este trabajo	71
Tabla 23: Reactivos y cantidades utilizadas para el estudio de inactivación del cromosoma X	72
Tabla 24: Reactivos utilizados para la digestión enzimática	73
Tabla 25: Cebadores utilizados para el análisis de heterodúplex del gen <i>MYT1L</i>	75
Tabla 26: Reactivos y cantidades utilizadas para la PCR para el análisis de heterodúplex	75
Tabla 27: Cebadores utilizados para el rastreo de regiones sometidas a impronta	76
Tabla 28: Reactivos y cantidades utilizadas para la PCR semicuantitativa en el rastreo de alteraciones en regiones sometidas a impronta	77

Tabla 29: Clasificación de las 220 CNVs en función de su repercusión clínica.....	86
Tabla 30: Clasificación de los pacientes en función del tipo de variación detectada.....	87
Tabla 31: Clasificación de las alteraciones detectadas y los pacientes estudiados por el array de diseño propio	90
Tabla 32: Resultado del análisis de enriquecimiento en genes epigenéticos en función del tipo de CNV	92
Tabla 33: Listado de los 17 casos con alteraciones patológicas que contienen genes epigenéticos que causan DI	93
Tabla 34: Comparativa de los rasgos clínicos asociados al síndrome de Duplicación de MECP2 con las características que presentan los tres casos detectados en nuestra serie	98
Tabla 35: Características principales de los síndromes de delección y duplicación de la región 2q23.1 en comparación con la clínica presentada por los dos pacientes con una CNV que afecta a gen <i>MBD5</i>	100
Tabla 36: Principales rasgos clínicos de los pacientes con duplicación de <i>ATRX</i> en comparación con la clínica asociada al síndrome ATR-X.....	102
Tabla 37: Características principales del síndrome de Braquidactilia con DI en comparación con la clínica presentada por los pacientes con alteración en el gen <i>HDAC4</i>	110
Tabla 38: Características principales del síndrome de Kleefstra en comparación con la clínica presentada por los pacientes con delección del gen <i>EHMT1</i>	112
Tabla 39: Listado de los casos con alteraciones que contienen genes epigenéticos candidatos de DI	114
Tabla 40: Características principales del síndrome de Wolf-Hirschhorn en comparación con la clínica presentada por los pacientes con una CNV que afecta a gen <i>WHSC1</i>	117
Tabla 41: Principales rasgos clínicos de los dos pacientes con delección en 12q24.31 en comparación con la clínica asociada a <i>SETD1B</i>	119
Tabla 42: Principales rasgos clínicos de los tres pacientes con delección en 6q16 en comparación con los asociados a este síndrome.....	121
Tabla 43: Listado de los casos con CNVs patológicas relacionadas con algún síndrome descrito cuyo gen causal, si se conoce, no es epigenético	127
Tabla 44: Listado de alteraciones intragénicas en posibles genes candidatos de DI	127
Tabla 45: Comparativa de los principales rasgos clínicos de los dos pacientes con duplicación intragénica del gen <i>RICS</i>	130
Tabla 46: Análisis de enriquecimiento de UCEs en CNVs	132
Tabla 47: Análisis de enriquecimiento de miRNAs en CNVs.....	133
Tabla 48: Análisis de enriquecimiento en las zonas grises	138
Tabla 49: Resumen de los 17 cambios detectados en el rastreo de mutaciones del gen <i>MYT1L</i>	156
Tabla 50: Pacientes con alteración genética conocida en genes implicados en la regulación epigenética seleccionados como controles positivos para el estudio preliminar de metilación generalizada por HPLC.....	161

Tabla 51: Análisis multivariante del porcentaje de metilación en citosinas.....	165
Tabla 52: Comparativa de las características del diseño de nuestro array de diseño propio con los descritos en la bibliografía	177
Tabla 53: Listado de alteraciones patológicas cuyo gen causal es epigenético y además contienen otros genes de la maquinaria epigenética de interés	185
Tabla 54: Recopilación de los datos clínicos publicados relacionados con alteraciones en <i>MYT1L</i> y los trastornos del neurodesarrollo	203
Tabla 55: Listado de los casos con alteración en algún gen implicado en la regulación epigenética seleccionados como posibles controles positivos para los estudios de metilación.....	250
Tabla 56: Genes seleccionados para el diseño del array a la carta en las distintas versiones	251
Tabla 57: Genes clasificados como de baja prioridad en la v4 del array de diseño propio	261
Tabla 58: Posición cromosómica de los elementos ultraconservados	266
Tabla 59: Listado de miRNAs utilizados para la búsqueda de sondas en las distintas versiones del array de diseño propio.....	271
Tabla 60: Esquema de los criterios de selección y búsqueda de sondas empleados para el diseño del array	294
Tabla 61: Sondas comerciales de FISH utilizadas en este trabajo.....	297
Tabla 62: Sondas BACs de FISH utilizadas en este trabajo	297
Tabla 63: Listado de las SALSAS comerciales de MLPA utilizadas	298
Tabla 64: Listado de los marcadores microsatélites utilizados en este trabajo ...	301
Tabla 65: Listado de cebadores diseñados para qPCR en el estudio de los pacientes incluidos en este trabajo	306
Tabla 66: Listado de otros cebadores utilizados en este trabajo.....	310
Tabla 67: Listado de las alteraciones detectadas por CGH-array	313
Tabla 68: Listado de los 510 genes considerados como epigenéticos para este trabajo.....	322

ABREVIATURAS





~	Aproximadamente
∅	Control negativo
∞	Infinito (sin tiempo fijo)
aa	aminoácido
AAIDD*	<i>American Association on Intellectual and Developmental Disabilities</i> (asociación americana sobre discapacidad intelectual y del desarrollo)
ACC	Agenesia de cuerpo calloso
Alu	<i>Arthrobacter luteus</i> (secuencia repetitiva de DNA dentro del grupo de los SINE)
asRNA*	<i>antisense RNA</i> (RNA antisentido)
cDNA	complementary DeoxyriboNucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico complementario)
CG	Citosina-Guanina
CGH*	<i>Comparative Genomic Hybridization</i> (Hibridación genómica comparada)
CI	Coefficiente intelectual
CIE-10	Clasificación Internacional de Enfermedades, versión 10
CIF	Clasificación internacional del fundamento de la DI y la salud
CIPF	Centro de Investigación Príncipe Felipe
CNV*	<i>Copy Number Variation</i> (variantes en número de copias)
Cq*	<i>quantification Cycle</i> (ciclo de cuantificación), también conocido como Ct, <i>theshold cycle</i> , o Cp, <i>crossing point</i>)
Cy	Cianina (fluorocromo)
BrEt	Bromuro de Etidio
DECIPHER*	<i>DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i> (Base de datos de desequilibrios cromosómicos y fenotipo en humanos usando los recursos de <i>Ensembl</i>)
ddNTP	Dideoxinucleósido trifosfato
del	Delección
DGV*	<i>Database of Genomic Variants</i> (base de datos de variantes genómicas)
DI	Discapacidad Intelectual
DMNT	Diabetes mellitus neonatal transitoria
DMR*	<i>Differentially Methylated Regions</i> (región metilada diferencialmente)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA*	DeoxyriboNucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
DNMT*	<i>DNA MethylTransferase</i> (Metiltransferasa de DNA)
DO	Densidad óptica
DSM-V*	<i>Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders, Fifth Edition</i> (manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 5ª edición)
DTT	Ditiotreitol
DUP	Disomía uniparental
dup	Duplicación
ECARUCA*	<i>European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations</i> (registro de alteraciones cromosómicas desequilibradas de la asociación europea de citogenetistas)
EDTA*	<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)

EEG	Electroencefalograma
ELISA*	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
EST*	<i>Expressed Sequence Tag</i> (marcador de secuencias expresadas)
EUCID*	<i>EUropean Congenital Imprinting Disorders network</i> (red europea de trastornos congénitos de la impronta)
FE*	<i>Feature Extraction</i> (extracción de características o propiedades)
FISH*	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> (hibridación <i>in situ</i> fluorescente)
FoSTeS*	<i>Fork Stalling and Template Switching</i> (bloqueo de la horquilla y cambio de molde)
gDMR*	germline <i>Differentially Methylated Regions</i> (región metilada diferencialmente en línea germinal)
GO	<i>Gene Ontology</i> (ontología de genes)
H	Histona
HAT*	<i>Histone AcetylTransferase</i> (acetiltransferasa de histonas)
HDAC*	<i>Histone DeACetylase</i> (desacetilasa de histonas)
HFD*	<i>Histone Fold Domine</i> (dominio de pliegue de histonas)
HMR*	<i>HypoMethylation Region</i> (región hipometilada)
HPLC*	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRM*	<i>High Resolution meeting</i> (fusión del alta resolución)
IC	Intervalo de confianza
ICR*	<i>Imprinting Control Region</i> (región de control de impronta)
IDIBELL	Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge
ISCA*	<i>International Standards for Cytogenomic Arrays</i> (normas internacionales para arrays citogenómicos)
ISCN*	<i>International System for human Cytogenetic Nomenclature (sistema internacional para la nomenclatura citogenética en humano)</i>
K	Lisina
lincRNA*	<i>Long intergenic non-coding RNA</i> (RNA largo intergénico no codificante)
LINE*	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i> (elementos nucleares intercalados largos)
lncRNA*	<i>Long non-coding RNA</i> (RNA largo no codificante)
miRNA*	micro RNA (micro RNA)
MLPA*	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (amplificación múltiple de sondas dependiente de ligamiento)
mRNA*	<i>messenger RNA</i> (RNA mensajero)
NAHR*	<i>Non-Allelic Homologous Recombination</i> (recombinación homóloga no alélica)
NCBI*	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (centro nacional para la información biotecnológica)
ncRNA*	<i>non-coding RNA</i> (RNA no codificante)
NHEJ*	<i>Non-Homologous End Joining</i> (unión de extremos no homólogos)
OMIM*	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (herencia mendeliana en red en hombre)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR*	<i>Odds Ratio</i> (razón de odds)
p	Percentil
pip*	<i>Pathogenic Incomplete Penetrance</i> (variante de número de copias patológica de penetrancia incompleta)

piRNA*	<i>piwi-RNA</i> (RNA asociado a Piwi)
PCR*	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PHP1B	Pseudo-hipoparatiroidismo 1B
PolyPhen-2*	<i>Polymorphism Phenotyping v2</i> (fenotipado de polimorfismos versión 2)
qPCR*	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
R	Arginina
RE	Razón de enriquecimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA*	<i>RiboNucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RQ*	<i>Relative Quantification</i> (cuantificación relativa)
rRNA*	Ribosomal RNA (RNA ribosomal)
RT-PCR*	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)
S	Serina
SA	Síndrome de Angelman
SAM	S-adenosil metionina
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SINE*	<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> (elementos nucleares intercalados cortos)
siRNA*	<i>small interfering RNA</i> (RNA pequeño de interferencia)
SKO	Síndrome Kagami-Ogata
SNC	Sistema nervioso central
snoRNA*	<i>Small nucleolar RNA</i> (RNA nucleolar pequeño)
SNP*	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (polimorfismo de nucleótido único)
SPW	Síndrome de Prader-Willi
SSR	Síndrome de Silver-Russell
ST	Síndrome de Temple
SWH	Síndrome de Wolf-Hirschhorn
T	Treonina
TBE	Tampón de electroforesis (Tris, Borato y EDTA)
TDAH	Trastorno por déficit de atención con hiperactividad
TE	Tampón para resuspender el DNA (Tris y EDTA)
TEA	Trastornos del espectro autista
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TFBS*	<i>Transcription Factor Binding Sites</i> (sitios de unión de factores de transcripción)
Tm*	melting Temperature (temperatura de fusión)
TPM	Transcritos por millón
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
tRNA*	<i>transfer RNA</i> (RNA de transferencia)
TSmiRNA*	<i>TargetScan miRNA sites</i> (regiones diana de miRNAs)
TFBS*	<i>Transcription factor binding sites</i> (sitios de unión a factores de transcripción)
UNG	Uracil N-glicosilasa
UCE*	<i>Ultra-Conserved Element</i> (elemento ultraconservado)
UCSC	Universidad de California, Santa Cruz
UTR*	<i>UnTranslated Region</i> (región no traducida)
v	Versión
V	Volumen

VOUS*	<i>Variant Of Uncertain Significance</i> (variante de número de copias de significado incierto)
X²	chi-cuadrado
X²_{TLo}	chi-cuadrado de tendencia lineal
XIC*	<i>X-chromosome Inactivation Centre</i> (centro de inactivación del cromosoma X)
Y	Treonina

*Siglas en inglés. En este trabajo se ha optado por usar algunas de las siglas en inglés y no su traducción al castellano, dado que algunos términos de este trabajo son ampliamente conocidos y utilizados a nivel técnico en inglés, y en algunos casos, además, no se ha querido perder el contexto con el resto de términos (ej: DNA y DNMT).

INTRODUCCIÓN

"I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale."
(Marie Curie)



1. Discapacidad intelectual

1.1 Definición

Los trastornos del neurodesarrollo engloban desordenes cognitivos, de aprendizaje, comportamiento, comunicación y motores, que aparecen en edad temprana. Este tipo de patologías suponen una carga sanitaria, emocional y económica a nivel individual, familiar y social que justifica la importancia de su estudio. En la quinta edición del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-V) se incluyen y describen, dentro de los trastornos del desarrollo neurológico, a la discapacidad intelectual (DI), los trastornos del espectro autista (TEA), el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) y otro tipo de trastornos como de comunicación, motores o específicos del aprendizaje.

Podemos encontrar distintas formas de definir la discapacidad intelectual, antes denominada retraso mental. Según la asociación americana de discapacidad intelectual y del desarrollo (AAIDD), se trata de una discapacidad caracterizada por limitaciones significativas, tanto en la capacidad intelectual como en la conducta adaptativa, que afecta a muchas de las habilidades sociales y funcionales de la vida cotidiana, originándose antes de los 18 años. La organización mundial de la salud (OMS) la define como una reducción significativa de la capacidad para entender la información nueva o compleja y aprender y aplicar nuevas habilidades (deterioro intelectual) que tiene como resultado una disminución de la capacidad para desenvolverse de forma independiente (alteración de la función social), con un comienzo que se produce antes de la edad adulta y cuyo efecto es duradero en el desarrollo. Y por último, la clasificación internacional de enfermedades en su 10ª versión (CIE-10), actualizada en 2015, indica que se trata de un desarrollo mental incompleto o detenido, que se caracteriza sobre todo por la deficiencia en las habilidades que se manifiestan durante el periodo de desarrollo y contribuyen al nivel global de inteligencia como las cognitivas, sociales, del lenguaje y motoras.

Resumiendo, las características que definen la DI son:

<ul style="list-style-type: none"> - Limitaciones en la capacidad intelectual - Limitaciones en la conducta adaptativa - Comienzo antes de la edad adulta 	}	<p>Afectación de las habilidades cognitivas, sociales, del lenguaje y motoras</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---	-----------------------------------------------------------------------------------

1.2 Clasificación

Existen distintos grados dentro de la DI, que puede ir de leve a profunda en base a distintos criterios. Según la CIE-10 la clasificación de la DI se estima mediante pruebas estandarizadas de inteligencia que permiten obtener el coeficiente intelectual (CI) del individuo, pudiendo complementarse con la evaluación de la capacidad de adaptación social en un entorno determinado, teniendo en cuenta que estas medidas proporcionan una indicación aproximada del grado de DI, dependiendo además este diagnóstico de la evaluación general del funcionamiento intelectual por un clínico cualificado (tabla 1).

Además, hay que tener en cuenta que la capacidad intelectual y de adaptación social puede variar con el tiempo y mejorar como resultado de la estimulación, por lo que el diagnóstico debe basarse en los niveles de funcionamiento en el momento de valoración del paciente.

Tabla 1: Criterios de clasificación de la DI según la versión del 2015 de la CIE-10.
Fuente: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en#F70-F79>.

Clasificación		Definición
leve	F70	CI: 50-69 (Edad mental en adultos = 9-12 años)
		Dificultades de aprendizaje en edad escolar. En edad adulta en su mayoría son capaces de trabajar y mantener buenas relaciones sociales.
moderada	F71	CI: 35-49 (Edad mental en adultos = 6-9 años)
		Marcado retraso en el desarrollo infantil, pero la mayoría puede adquirir habilidades en la comunicación y desarrollar un cierto grado de independencia en el cuidado personal. Los adultos necesitarán distintos grados de apoyo para vivir y trabajar.
grave	F72	CI: 20-34 (Edad mental en adultos = 3-4 años)
		Necesidad continua de apoyo.
profunda	F73	CI: <20 (Edad mental en adultos <3 años)
		Limitación grave en el cuidado personal, la continencia, la comunicación y la movilidad.

Por otro lado, la DI puede dividirse en *sindrómica*, cuando se asocia también a otras alteraciones como anomalías congénitas o rasgos *dismórficos*, dando lugar a un cuadro clínico complejo; o *no sindrómica*, cuando no presenta otra característica adicional.

1.3 Prevalencia

Se han realizado un gran número de estudios en distintas poblaciones que han permitido realizar diferentes estimaciones de la prevalencia para la DI (tabla 2). En este sentido, Maulik y colaboradores (2011) realizaron un meta-análisis de más de 50 estudios distintos estimando la prevalencia de la discapacidad intelectual en un 1 %. Hay que tener en cuenta que existen muchos factores que pueden afectar a estas estimaciones, como los criterios diagnósticos utilizados, el grado de la enfermedad, la población estudiada o el género y la edad del individuo, especialmente en niños.

Teniendo en cuenta el grado de DI, King y colaboradores (2009) evaluaron la distribución de la población afectada en función de este factor, estimando que en la mayoría de casos la DI es leve (85 %), con una prevalencia de la DI grave-profunda muy inferior (figura 1).

En cuanto al género, casi todos los estudios indican una mayor prevalencia en varones estimándose un ratio de hombres vs mujeres entorno al 1.4:1 (Stevenson *et al.*, 2000). Sin embargo, en otros trastornos del neurodesarrollo, como en el autismo, esta diferencia es más acusada, afectando predominantemente a varones, con un ratio 4.3:1 (Fombonne, 2005).

Tabla 2: Selección de estudios publicados después del 2000 con estimaciones de la prevalencia para la DI en diferentes poblaciones. Adaptación de tabla de Maulik y Harbour (2010).

País	Definición	Fuente	Tamaño Población	Prevalencia X1000	Fuente
Canadá	CIE-10	Datos administrativos/ estudios de población 14-20 años	35485	7.2	Bradley <i>et al.</i> (2002)
Australia	DSM-IV	Datos administrativos 6-15 años	240358	14.3	Leonard <i>et al.</i> (2003)
Irlanda	CIE-10	Datos administrativos Población adulta	3961701	6.3	McConkey <i>et al.</i> (2006)
Etiopia	CIF	Estudios en población adulta	24453	3.9	Fitaw y Boersma (2006)
China	Criterios específicos de discapacidad	Encuesta en hogares 0-6 años	60124	9.3	Xie <i>et al.</i> (2008)

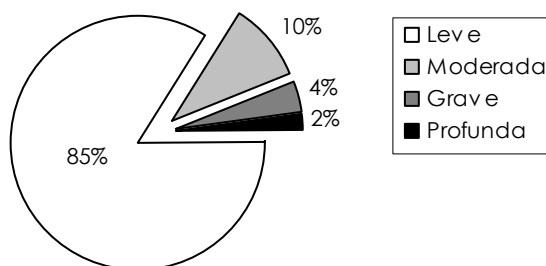


Figura 1: Distribución de la DI en función del grado de afectación (King *et al.*, 2009).

1.4 Etiología

La etiología de los trastornos del neurodesarrollo y la DI es muy diversa e incluye causas ambientales, genéticas y multifactoriales (figura 2).

Según distintos estudios, la proporción de casos en los que se averigua la causa del retraso del desarrollo/discapacidad intelectual también es muy variable (50-81 %) (McLaren y Bryson 1987; Majnemer y Shevell; 1995; Curry *et al.*, 1997; Battaglia *et al.*, 1999; Shevell *et al.*, 2000; van Karnebeek *et al.*, 2005). Esta variabilidad afecta igualmente a las diferentes causas de DI, con un rango del 19-45 % de causa ambiental y del 17-47 % de causa genética (Van Karnebeek *et al.*, 2002; Van Karnebeek *et al.*, 2005; Moeschler *et al.*, 2006); pudiendo deberse a múltiples factores como la población estudiada, la época en la que se realizó el estudio y las técnicas empleadas en el diagnóstico. Por ejemplo, en los países desarrollados, tras la introducción del diagnóstico prenatal, en los últimos años el número de casos con síndrome de Down ha disminuido significativamente. En este sentido, en España su prevalencia se ha reducido a la mitad en un periodo de 25 años, pasando de 14.8:10000 nacidos vivos entre 1980 y 1985 a 7.4:10000 en 2005 (Robles, 2007). Lo que es incuestionable es que

gracias a las nuevas tecnologías moleculares se ha aumentado el número de casos con diagnóstico genético en la última década, disminuyendo el número de pacientes con DI idiopática.

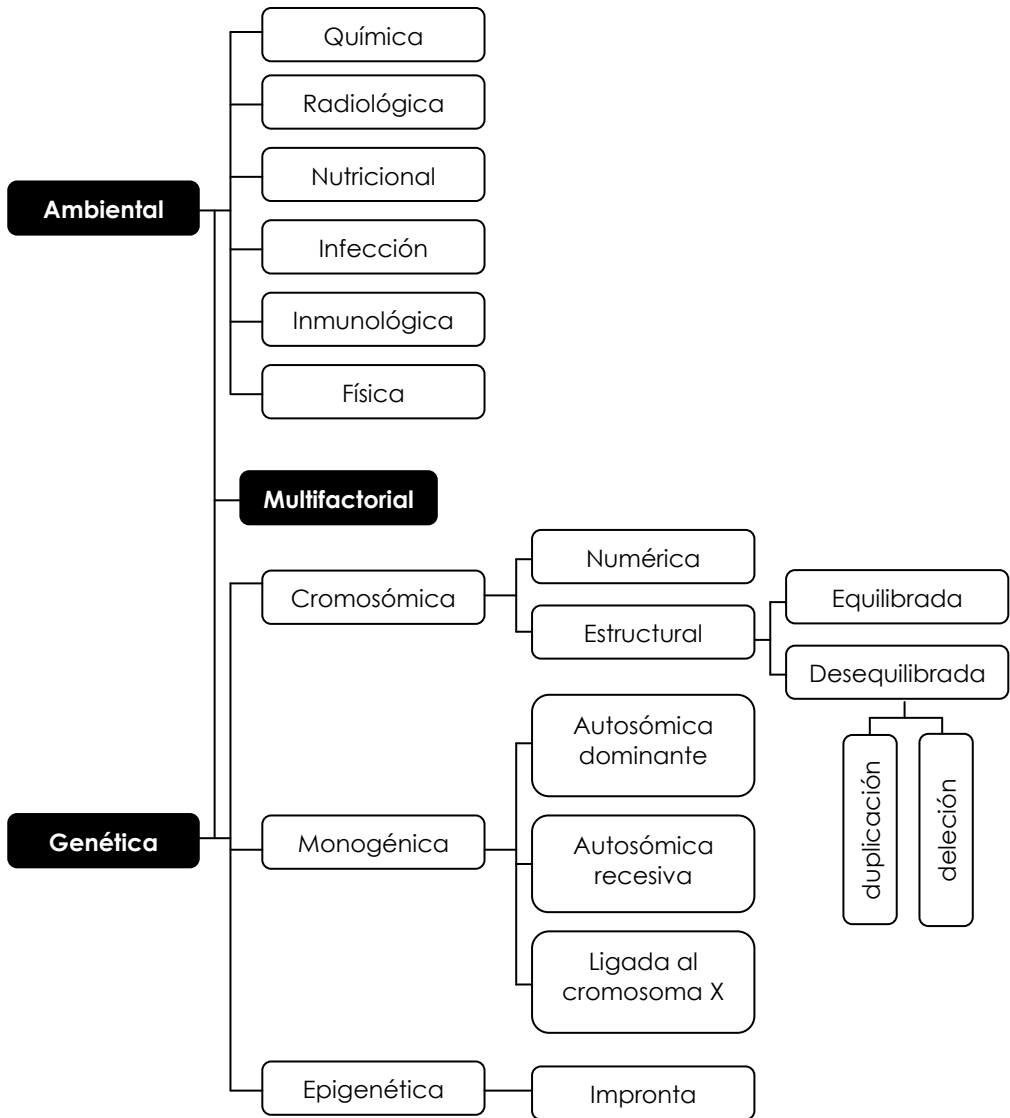


Figura 2: Esquema de las principales causas de DI conocidas.

1.4.1. *Causas ambientales*

Las causas de DI de origen ambiental incluyen a los distintos factores externos que pueden dañar el sistema nervioso central (SNC) del individuo durante la fase prenatal, perinatal o postnatal. Estos factores externos pueden ser:

- Químicos: exposición a sustancias tóxicas durante el periodo prenatal, como por ejemplo alcohol o drogas.

- Radiológicos: exposición a los rayos X durante el periodo prenatal.
- Nutricionales: malnutrición o deficiencia de algún elemento, como el yodo.
- Infecciosos: Infecciones tanto en la fase prenatal, (rubéola o citomegalovirus) como en la fase postnatal (meningitis).
- Inmunológicos: incompatibilidad materno-fetal del factor Rh.
- Físicos: como el sufrimiento fetal en la fase prenatal, la asfixia perinatal o traumatismos e isquemias cerebrales.
- Otros factores: Además la DI puede ser un efecto secundario a otros problemas como tumores cerebrales, hipoglucemia, etc.

1.4.2. Causas genéticas

Las evidencias sobre las bases genéticas de los trastornos del neurodesarrollo son incuestionables, con un gran número de síndromes descritos que cursan con DI y se asocian a diversas alteraciones genéticas, que se pueden clasificar en:

1.4.2.1. Cromosómicas

Suelen afectar a regiones cromosómicas que contienen varios genes. Dentro de este grupo podemos distinguir:

- Numéricas: cuando se produce la ganancia o pérdida de un cromosoma entero. El ejemplo más conocido es la trisomía del cromosoma 21 o síndrome de Down (OMIM 190685), la causa más comunes de DI de origen genético.
- Estructurales: como su propio nombre indica, afecta a la estructura del cromosoma e incluye alteraciones como las inversiones, translocaciones, deleciones, duplicaciones, cromosomas en anillo, etc. Estas alteraciones no tienen necesariamente que generar una pérdida o ganancia de material genético, como es el caso de las translocaciones equilibradas, pero aun así pueden tener distintas consecuencias, al truncar un gen o afectar a su expresión. No obstante, la mayoría de alteraciones estructurales asociadas a DI conllevan un cambio de dosis que afecta a varios genes, conociéndose un gran número de síndromes de deleción y duplicación que cursan con DI (tabla 3).

Tabla 3: Ejemplos de síndromes de deleción o duplicación asociados a DI.

Síndrome	OMIM	Región	Alteración
DiGeorge	188400	22q11.21	deleción
Smith-Magenis	182290	17p11.2	deleción
Potocki-Lupski	610883	17p11.2	duplicación
Williams-Beuren	194050	7q11.23	deleción

1.4.2.2. Monogénicas

La causa responsable de la patología es la alteración de un único gen. Se estima que hay más de 1400 genes asociados a DI (Raymond, 2010). Este grupo a su vez se puede dividir en función de su localización y patrón de herencia en:

- Autosómica dominante: cuando la afectación de una de las dos copias del gen es suficiente para que se produzca la enfermedad. Existen distintas patologías que pueden cursar con DI debidas a alteraciones en un gen y que presentan un patrón de herencia autosómico dominante (tabla 4).

Tabla 4: Ejemplos de enfermedades monogénicas que pueden cursar con DI y presentan un patrón de herencia autosómico dominante.

Síndrome	OMIM	Gen	% DI	Genereview
Rubinstein-Taybi	180849	<i>CREBBP</i>	100	Stevens CA, 2014
		<i>EP300</i>		
CHARGE	214800	<i>CHD7</i>	≤ 100	Lalani <i>et al.</i> , 2012
Sotos	117550	<i>NSD1</i>	variable ¹	Tatton-Brown <i>et al.</i> , 2012
Enfermedad de Steinert	160900	<i>DMPK</i>	50-60 ²	Bird TD, 2013
Esclerosis tuberosa	191100	<i>TSC1</i>	50	Northrup <i>et al.</i> , 2011
	613254	<i>TSC2</i>		
Feingold	164280	<i>MYCN</i>	Leve ³	Marcelis y de Brouwer, 2012

¹La mayoría de los casos con DI que abarca desde leve a grave.

²En los casos con Enfermedad de Steinert congénita, con una extensión del triplete CTG >1000 repeticiones.

³Déficit de aprendizaje con inteligencia por debajo de la media en más de la mitad de los casos.

- Autosómica recesiva: cuando es necesario que las dos copias del gen estén afectadas. Dentro de este grupo se incluye la mayoría de metabolopatías, como la Fenilcetonuria (OMIM 261600), la causa de DI recesiva más frecuente, provocada por mutaciones en el gen *PAH* que codifica para la fenilalanina hidroxilasa y cataliza la hidroxilación de tirosina a fenilalanina, y que con una detección precoz, en el periodo neonatal, y un tratamiento adecuado, permite evitar la DI en estos pacientes.

- Ligada al cromosoma X: cuando el gen se localiza en el cromosoma X. Se estima que existen más de 70 genes en el cromosoma X cuyas mutaciones causan DI, tanto sindrómica como no sindrómica, representando aproximadamente el 10 % de los genes localizados en este cromosoma (Raymond, 2010). Además, la mayor prevalencia de la DI en varones podría explicarse, al menos en parte, por este tipo de herencia. El ejemplo más claro en esta categoría es el síndrome de X-frágil (OMIM 300624), la causa conocida más frecuente de DI monogénica, con un patrón de herencia dominante, que afecta a 1/4000 varones y 1/6000 mujeres, y que se produce mayoritariamente por una expansión de más de 200 repeticiones del trinucleótido CGG en el gen *FMR1* (Milá *et al.*, 2014).

1.4.2.3. Epigenéticas

Debida tanto a alteraciones en genes epigenéticos como a modificaciones en la impronta génica. Este punto se desarrollará ampliamente en el apartado 3 de la introducción, comentando distintos ejemplos.

1.4.3. Multifactoriales

Implican a varios factores, tanto ambientales como genéticos, por lo que su diagnóstico etiológico es muy complejo.

En definitiva los trastornos del neurodesarrollo son procesos complejos cuyos causas y mecanismos aun hoy son desconocidos en un gran número de pacientes, se asocian con frecuencia a otras anomalías congénitas o rasgos dismórficos y en muchas ocasiones presentan agregación familiar.

En cualquier caso, el diagnóstico etiológico de los pacientes con DI es importante, ya que puede contribuir a la prevención o la detección temprana de algunas de las manifestaciones clínicas asociadas, como por ejemplo la obesidad en los casos con síndrome Prader-Willi (apartado 3.2.2. de la introducción), mejorando el tratamiento y seguimiento de estos pacientes. Además, cuando la causa es genética, el diagnóstico permite realizar un asesoramiento genético adecuado, valorar el riesgo de recurrencia y plantear distintas opciones reproductivas a los individuos afectados y sus familias, como el diagnóstico prenatal o preimplantacional.

2. Epigenética

El término "epigenética" fue introducido por primera vez por Conrad Hal Waddington en 1942 como "el estudio de los mecanismos causales a través de los cuales los genes producen efectos fenotípicos", antes incluso de que se conociera el papel del DNA como molécula portadora de la información genética (Avery *et al.*, 1944; Hershey y Chase, 1952). Desde entonces, han aparecido distintas acepciones de este término a lo largo del tiempo que reflejan la complejidad del mismo. En 1996 Arthur Riggs y colaboradores propusieron su definición como "el estudio de los cambios heredables mitótica y/o meióticamente en la función de los genes que no se pueden explicar por los cambios en las secuencias de DNA". No obstante, los mecanismos epigenéticos incluyen procesos que no son heredables, como la modificación de histonas, por lo que se han propuesto otras definiciones como "la adaptación estructural de las regiones cromosómicas con el fin de registrar, señalar o perpetuar estados de actividad alterados" (Bird A, 2007). Por otro lado, en diciembre de 2008, en un encuentro del *Cold Spring Harbor Laboratory* se propuso una definición consensado de un rasgo epigenético: "fenotipo heredable de forma estable como resultado de cambios en un cromosoma y sin alteraciones en la secuencia de DNA" (Berger *et al.*, 2009).

La regulación epigenética es un proceso complejo, en el que intervienen distintos mecanismos, interrelacionados entre sí, para modular la expresión génica sin producir cambios en la secuencia de nucleótidos, de una forma dinámica acorde con las necesidades específicas de cada tejido, en cada momento, y en respuesta a los distintos estímulos a los que nos vemos expuestos (Mehler MF, 2008) (figura 3).

La cromatina, formada por DNA, proteínas y RNA, es una estructura dinámica que contiene el material genético y puede sufrir distintos cambios que afectan a la capacidad de expresar la información contenida en los genes. Según el grado de compactación de la cromatina se distingue la heterocromatina, con una estructura más condensada (como en los telómeros y los centrómeros) y la eucromatina, que presenta una estructura más abierta y accesible. Los nucleosomas, unidad básica de la cromatina, pueden modificar su posición respecto a la hebra de DNA, a través de complejos procesos mediados por diferentes proteínas, regulando así la accesibilidad al DNA de distintos factores (Saha *et al.*, 2006).

Desde que se acuñó el término de epigenética, la investigación y el número de publicaciones en este campo han aumentado exponencialmente a lo largo del tiempo. Muchas de estas publicaciones han demostrado la importancia de los procesos epigenéticos en el desarrollo del sistema nervioso. La plasticidad neuronal (cuando la experiencia deja una huella estructural y funcional en la red neuronal), la homeostasis y las innovaciones evolutivas en forma y función (organización sináptica), son procesos dinámicos modulados por la epigenética (Kramer y van Bokhoven, 2009). Se ha propuesto que los procesos epigenéticos actúan como mediadores entre el medio ambiente al que nos vemos expuestos y la información contenida en los genes (Mehler MF, 2008).

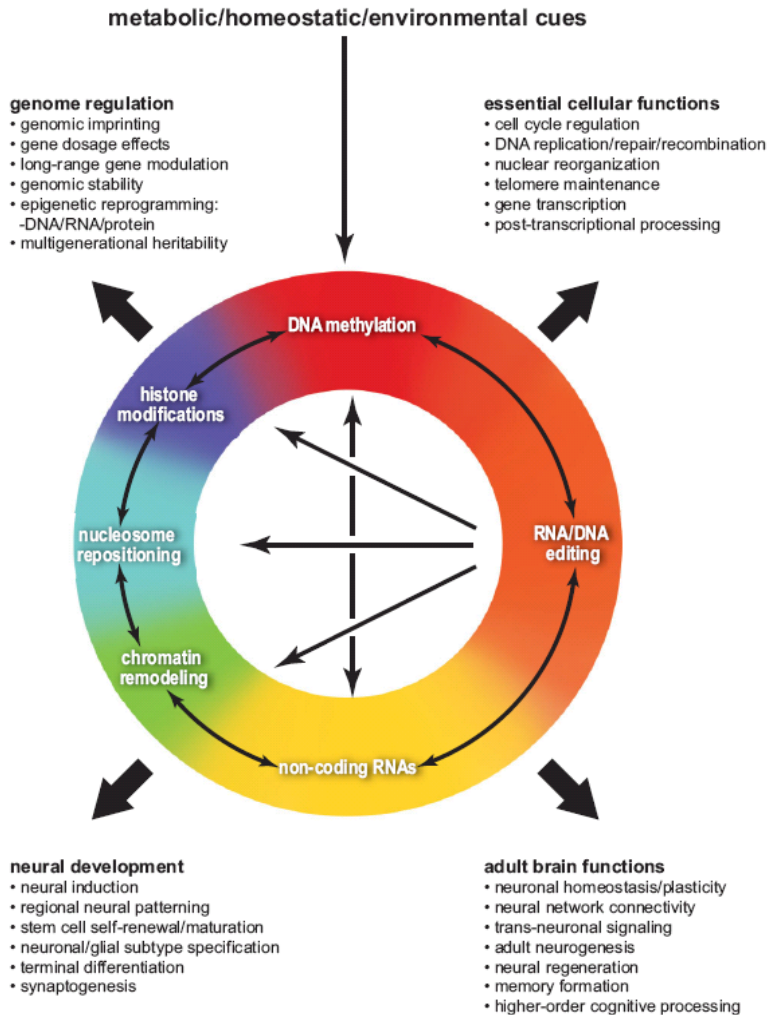


Figura 3: Representación esquemática de distintos procesos en los que participan los diferentes mecanismos epigenéticos. Imagen obtenida de Mark F. Mehler (2008).

2.1 Mecanismos implicados en la regulación epigenética.

Los principales mecanismos implicados en la regulación epigenética son:

2.1.1. Metilación del DNA

Consiste en la introducción de un grupo metilo en el carbono 5 de la base nitrogenada citosina, que pasa a ser 5-metilcitosina (figura 4). Esta reacción, que se produce principalmente en los dinucleótidos CG, está catalizada por las metiltransferasas de DNA (DNMTs).

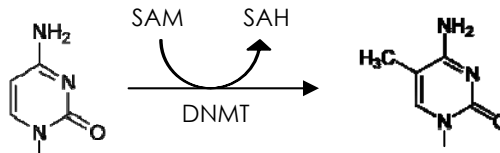


Figura 4: Reacción de metilación de la citosina. Introducción de un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) en el carbono 5 de la citosina por la enzima DNA metiltransferasa.

En vertebrados, el dinucleótido CG se encuentra en una baja proporción en el genoma, excepto en algunas regiones llamadas islas CpG, que se definen como secuencias de DNA de una longitud mayor de 200 pb, con un contenido de G/C mayor al 50 % y una relación del número observado de dinucleótidos CG respecto al número esperado superior al 0.6 (Gardiner-Garden y Frommer, 1987).

$$\text{RatioCpG} = \frac{N_{CG} / N_b}{N_C / N_b \times N_G / N_b}$$

CG: dinucleótido CG
 b: bases de la región
 C: Citosina
 G: Guanina

Aunque en humanos en torno al 80 % de los dinucleótidos CG se encuentran metilados, la mayoría de las regiones hipometiladas (HMRs: *HypoMethylation Region*) son islas CpG (Illingworth *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2009). Se estima que más del 70 % de los promotores génicos contienen islas CpG (Saxonov *et al.*, 2006). La metilación de los promotores puede impedir la unión de factores de transcripción, bloqueando directamente la transcripción génica, pero además puede reclutar distintas proteínas, lo que tiene como consecuencia la compactación del DNA, produciendo un silenciamiento génico (Attwood *et al.*, 2002). La metilación del DNA también puede producirse fuera de la región promotora, y aunque la función que desempeña este tipo de metilación no está clara, se ha asociado a la activación transcripcional (Wu *et al.*, 2010). Además, también se conocen regiones que presentan una metilación diferencial (DMRs: *Differentially Methylated Regions*), es decir, diferentes patrones de metilación en los distintos alelos, en función del tejido, el momento u otros factores (Illingworth *et al.*, 2008; Rakyan *et al.*, 2011).

Existen distintos tipos de metiltransferasas. DNMT1 se encarga de mantener el estado de metilación tras la división celular de la hebra hija, mientras que DNMT3B y DNMT3A son responsables principalmente de la metilación *de novo* en estadios tempranos del desarrollo (Bestor TH, 2000).

2.1.2. *Modificación de histonas*

Las histonas (H) son proteínas básicas sobre las que se produce el pegamiento del DNA formando el nucleosoma (figura 5). Pueden sufrir distintas modificaciones, principalmente en su extremo amino terminal, que, por un lado, influyen en la organización de la cromatina y, por otro, sirven de "señal" para la unión de distintas proteínas (Bannister y Kouzarides, 2011; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015). La modificación de histonas además de afectar a la expresión génica, participa en otros procesos como la mitosis, la meiosis o la reparación, replicación y recombinación del DNA (Bannister y Kouzarides, 2011).

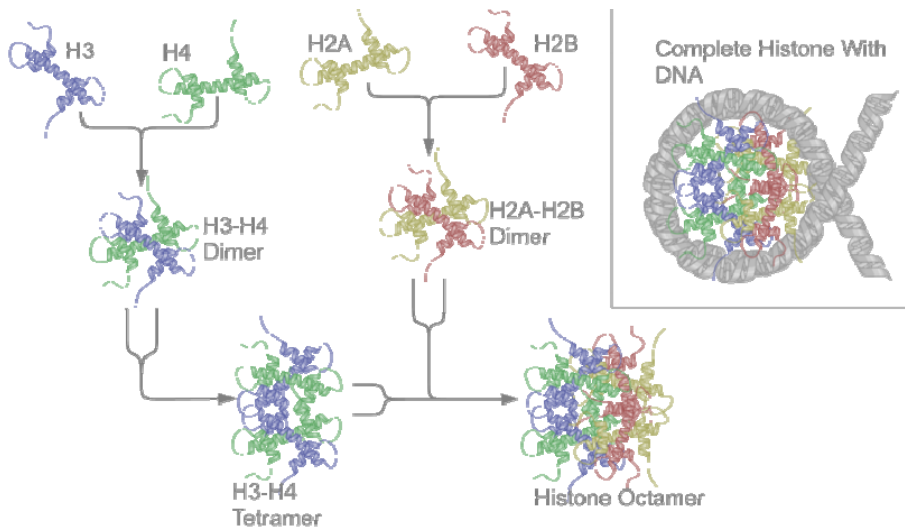


Figura 5: Representación del ensamblaje de las histonas para formar el nucleosoma. Imagen obtenida de la Wikipedia introducida por Richard Wheeler (https://es.wikipedia.org/wiki/Histona#/media/File:Nucleosome_structure.png).

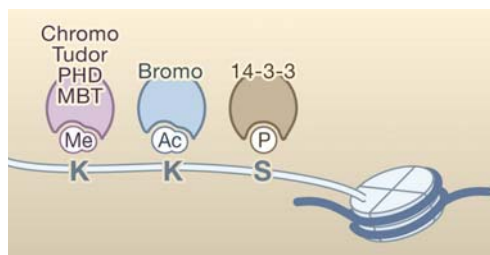


Figura 6: Ejemplo de distintos dominios proteicos que reconocen diferentes modificaciones en residuos de histonas, Imagen obtenida de Kouzarides T (2007).

2.1.2.1. *Metilación*

Es el proceso por el cual se introduce un grupo metilo en alguno de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina (K) o arginina (R) de las histonas (H3 y H4 principalmente), pudiendo sufrir distinto grado de metilación (mono o dimetiladas en ambos aminoácidos o trimetilada en el caso de la lisina). Este tipo de cambio no afecta a la carga proteica pero induce alteraciones

estructurales. Existen distintas metiltransferasas y desmetilasas que regulan este proceso y diferentes proteínas, con dominios específicos (como los Tudor, chromo o PHD), que reconocen estos cambios (figura 6). En función de la localización y el grado de metilación el efecto sobre la expresión génica será distinto ((Kouzarides T, 2007; Bannister y Kouzarides, 2011; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015) (tabla 5).

Tabla 5: Efecto sobre la transcripción de distintos patrones conocidos de metilación de histonas.

Modificación	Efecto en la transcripción
H3K4me2/3	activación
H3K36me3	activación
H3K9me2/3	represión
H3K27me2/3	represión
H4K20me3	represión

2.1.2.2. Acetilación

Consiste en la adición de un grupo acetilo al grupo ϵ -amino del residuo de lisina, lo que provoca un cambio de carga (de positiva a neutra), favoreciendo la descondensación de la estructura de la cromatina, lo que facilita la transcripción (activación transcripcional). Existen dos grupos de proteínas encargadas de regular este proceso, las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs) (figura 7). Además, distintos dominios proteicos pueden reconocer a las lisinas acetiladas (como los bromodominios) (Kouzarides T, 2007; Bannister y Kouzarides, 2011; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015) (figura 6)

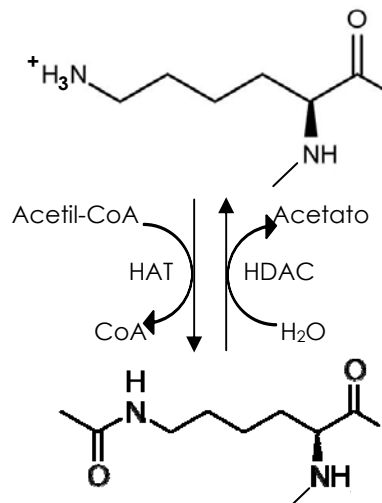


Figura 7: Reacción de acetilación y desacetilación de lisina. La acetilación está catalizada por HAT, que utiliza como coenzima al acetil-CoA, y la reacción de desacetilación tiene lugar gracias a la HDAC.

2.1.2.3. Fosforilación

Proceso por el cual se incorpora un grupo fosfato al grupo hidroxilo de residuos de serina (S), treonina (T) o tirosina (Y). Esta reacción genera una carga negativa y afecta a la estructura de la cromatina, que se hace más accesible para distintos factores. La fosforilación está regulada por las quinasas que incorporan el grupo fosfato y las fosfatasas que lo eliminan, y puede ser reconocida por proteínas de tipo 14-3-3 (Kouzarides T, 2007; Bannister y Kouzarides, 2011; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015) (figura 6).



Figura 8: Modificaciones de histonas. Representación de distintas modificaciones de histonas obtenida de Allis *et al.* (2007). Ac: acetilación; Me: metilación; P: fosforilación; Ub: ubiquitinación. Rojo: represión, verde; activación; naranja: metilación de arginina.

Las histonas pueden presentar otros tipos de modificaciones, como la sumoilación o ubiquitinación, entre muchas otras, identificándose hasta la fecha más de 13 tipos distintos de modificaciones post-traduccionales en las histonas. Además, algunas de estas modificaciones pueden verse influenciadas por el resultado de otras y trabajar de forma coordinada (Sadakierska-Chudy y Filip, 2015). En base a esto se ha postulado el término "código de histonas" que indica qué combinaciones específicas de diferentes modificaciones pueden tener distintas consecuencias en la expresión génica y la conformación de la cromatina, encontrándonos con un gran número de proteínas que participan en este complejo proceso: las que modifican a las histonas y las que interpretan este código (Strahl y Allis, 2000; Sneppen y Dodd, 2012; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015) (figura 8).

Por último, también se ha descrito el recorte de las colas de las histonas como un proceso de regulación irreversible que elimina las marcas epigenéticas de éstas (Bannister y Kouzarides, 2011; Vossaert *et al.*, 2014; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015).

2.1.3. *Variantes de histonas*

Además de las cuatro histonas que forman el núcleo del nucleosoma (H2A, H2B, H3 y H4) existen distintas variantes (figura 9). A diferencia de las primeras, la incorporación de las variantes de histonas en los nucleosomas ocurre de forma independiente a la replicación. Su sustitución ya supone en sí misma un cambio en la cromatina, pudiendo tener diferentes consecuencias epigenéticas (Henikoff y Smith 2015). Por ejemplo, H3.3, variante de H3, se encuentra enriquecida tanto en regiones de cromatina activa como en regiones silenciadas como teloméricas y pericentroméricas. Por otro lado, dos variantes de la H2 presentan distintos patrones de localización en el cromosoma X, estando la forma macroH2A enriquecida en el cromosoma X inactivo, mientras que la forma H2A.B es casi indetectable, viéndose además *in vitro* un efecto contrario sobre la transcripción, inhibida por macroH2A y facilitada por H2A.B (Henikoff y Smith 2015).

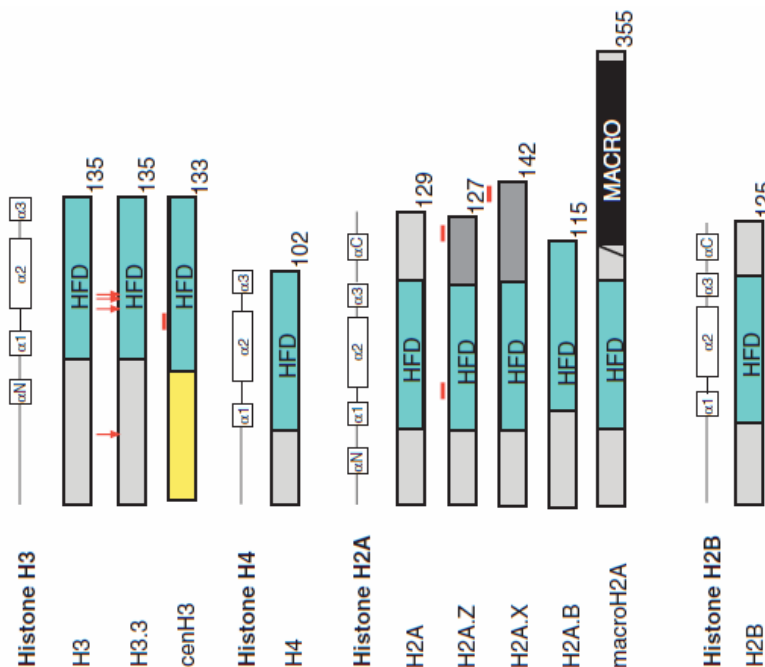


Figura 9: Variantes de Histonas. Imagen obtenida Henikoff y Smith (2015) donde se muestran distintas variantes de histonas con sus dominios estructurales. Las distintas variaciones de secuencia se encuentran marcadas en rojo. HFD: dominio de plegue de histonas (donde se produce la dimerización).

2.1.4. *RNAs no codificantes*

Los RNAs no codificante (ncRNA) se pueden dividir en dos clases, los estructurales, como el RNA de transferencia (tRNA) o el ribosomal (rRNA), y los reguladores que incluye distintos tipos como (Zhou *et al.*, 2010; Kaikkonen *et al.*, 2011; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015):

- MicroRNA (miRNA): RNA de 19-29 nt que regula la expresión génica a nivel post-transcripcional al reconocer una secuencia diana en el extremo 3'UTR del transcrito y actuar a través de distintos mecanismos que incluyen la represión de su traducción, o la degradación del mRNA. Pueden actuar sobre los mecanismos epigenéticos al regular la expresión de genes de la maquinaria epigenética (figura 10).

- RNA pequeño de interferencia (siRNA): Este RNA de doble cadena (19-29 nt) también puede participar en el silenciamiento pos-transcripcional.

- RNA asociado a Piwi (piRNA): RNA de 24-31 nt que recibe su nombre por formar complejos con las proteínas de la subfamilia de argonauta llamada Piwi. Su principal función es suprimir la actividad de transposones durante el desarrollo de la línea germinal, participando en la metilación de estos elementos (figura 10).

- RNA antisentido (asRNA): RNA de cadena sencilla complementario a mRNA que puede participar en la metilación del DNA.

- RNA largo no codificante (lncRNA): RNA de más de 200 nt que participa en la regulación de la expresión génica y en distintos procesos epigenéticos como la inactivación del cromosoma X o la impronta (apartados 2.2.1. y 2.2.2. de la introducción).

Los ncRNA reguladores se expresan en determinados momentos del desarrollo, durante la diferenciación celular o en respuesta a estímulos ambientales. Además de afectar directamente a la expresión génica, también participan en la remodelación de la cromatina, al interactuar con proteínas modificadoras de la cromatina y factores de transcripción, e intervienen en distintos procesos epigenéticos como la inactivación del cromosoma X o la impronta génica (Zhou *et al.*, 2010; Kaikkonen *et al.*, 2011; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015).

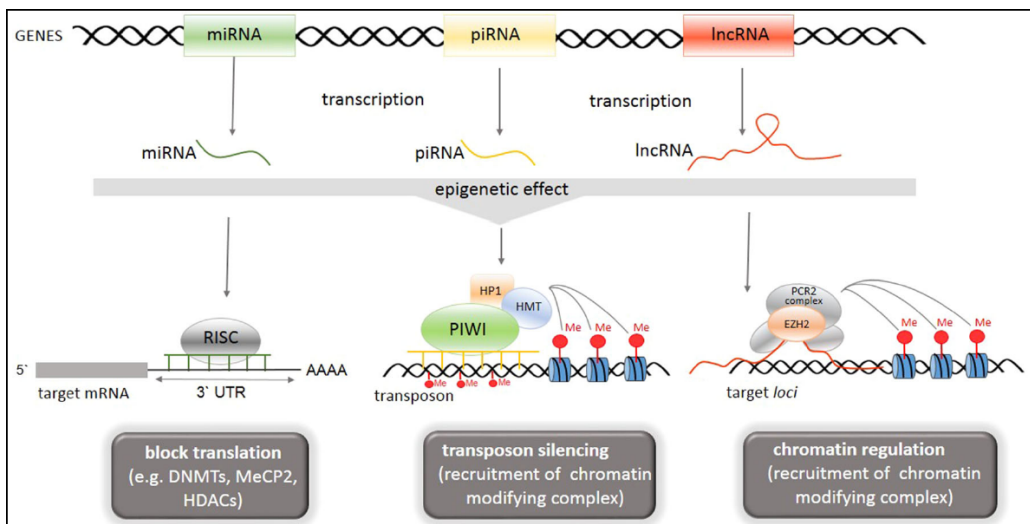


Figura 10: Ejemplos de la implicación de los ncRNAs en la regulación epigenética. Imagen obtenida Sadakierska-Chudy y Filip (2015) donde se muestra cómo intervienen algunos ncRNAs (miRNAs, piRNAs y lncRNAs) en la regulación epigenética.

2.1.5. Editado del RNA

El editado del RNA es un mecanismo post-transcripcional dinámico y versátil de recodificación de base, catalizado por enzimas específicas, que puede modular los perfiles de expresión y funciones tanto de mRNAs como de ncRNAs. Por ejemplo, el editado de adenosina a inosina (A-I) catalizado por la RNA adenosina deaminasa es un proceso particularmente activo en el cerebro (Mehler y Mattick, 2007).

2.1.6. Otros factores que participan en la remodelación de la cromatina

La modificación de histonas, incluyendo el recorte de sus colas, como ya se ha mencionado, afecta al remodelado de la cromatina, no solo por los cambios estructurales que producen, sino como consecuencia del reclutamiento de otras proteínas (Bannister y Kouzarides, 2011; Sadakierska-Chudy y Filip, 2015). Además, distintos complejos proteicos incluyen tanto a proteínas modificadoras de histonas, como a proteínas de unión a islas CpG metiladas, asociándose así dos mecanismos epigenéticos distintos (Attwood *et al.*, 2002).

Estos complejos que participan en la remodelación de la cromatina están formados por multitud de proteínas, no teniendo todas ellas una función epigenética por sí mismas, pero siendo necesarias para su correcto funcionamiento. Uno de los muchos ejemplos en este sentido lo encontramos en los complejos polycomb que participan en la represión transcripcional mediante la modificación de histonas. El complejo PRC2, con actividad metiltransferasa (H3K27), está formado por proteínas con función metiltransferasas (EZH1 y EZH2), de unión a H3K27me3 (EED) pero también de unión a nucleosoma (RBBP7 y RBBP4) o que estabilidad al complejo (SUZ12). Además, muchas de estas proteínas pueden formar parte de distintos complejos (Di Croce y Helin, 2013).

2.2 Procesos regulados por mecanismos epigenéticos

Existen un gran número de procesos regulados por mecanismos epigenéticos, aquí se comentaran un par de ejemplos relevantes para este trabajo.

2.2.1. Inactivación del Cromosoma X

En aquellos individuos que tienen más de un cromosoma X (mayoritariamente mujeres) se produce el fenómeno de inactivación de casi todo el cromosoma X, exceptuando, principalmente, las dos zonas de homología con el cromosoma Y (regiones pseudoautosómicas PAR1 y PAR2) de tal manera que en cada célula solo se encuentra activo un cromosoma X completo. La inactivación del cromosoma paterno o materno es generalmente aleatoria, pero una vez establecida, todas las células descendientes tendrán el mismo cromosoma X silenciado. Se trata de un proceso complejo, que comienza en el centro de inactivación del cromosoma X (XIC), y en el que participan distintos mecanismos epigenéticos como los lncRNA (*XIST*), la modificación de histonas (acetilación, metilación, etc.), variantes de histonas (macroH2A), metilación del DNA y remodelación de la cromatina (figuras 11 y 12).

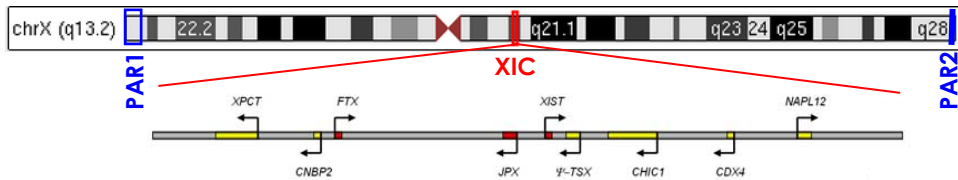


Figura 11: Cromosoma X y localización de PAR1, PAR2 y XIC. La posición de las dos regiones pseudoautosómicas se indica en azul, y en rojo el centro de inactivación del cromosoma X. En la ampliación del XIC, obtenida de Chang *et al.* (2006), se representa en rojo los ncRNAs y en amarillo los genes codificantes.

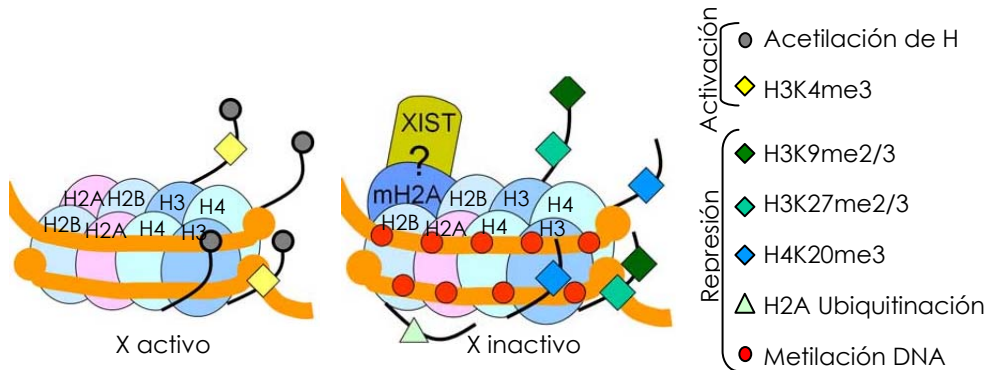


Figura 12: Representación esquemática de las marcas epigenéticas observadas en nucleosomas de cromosoma X activo e inactivo. Imagen modificada de Chang *et al.* (2006).

2.2.2. Impronta génica

Al igual que la inactivación del cromosoma X, la impronta génica es un proceso selectivo de expresión génica diferencial regulado por distintos mecanismos epigenéticos, pero en este caso, determinado por el origen parental de los alelos.

Existen más de 200 genes sometidos a impronta en humanos, 97 demostrados y 107 predichos, agrupados generalmente en distintas regiones cromosómicas (base de datos Geneimprint; <http://www.geneimprint.com>). La función de muchos de estos genes está relacionada con el crecimiento y desarrollo embrionario, placentario y neonatal. En general, los genes con expresión paterna, como *IGF2*, promueven el crecimiento, mientras que los genes con expresión materna, como *H19* o *CDKN1C*, lo reprimen, habiéndose propuesto dos hipótesis distintas para explicar este fenómeno (Moore y Haig, 1991; Varmuza y Mann, 1994). Además, muchos genes improntados se expresan en SNC y participan en procesos neurológicos o relacionados con el comportamiento del individuo, como por ejemplo *UBE3A* o *DLK1*. Por otro lado, el efecto de impronta en determinados genes puede estar restringido a linajes o períodos de desarrollo específicos de células, lo que puede dificultar su identificación y estudio.

Se conocen distintos síndromes causados por alteraciones en la impronta, cursando alguno de ellos con DI y distintos grados de retraso en el desarrollo (apartado 3.2 de la introducción). Además, en autismo se ha observado un

efecto dependiente del origen parental en algunas variantes genéticas (Fradin *et al.*, 2010; Kistner-Griffin *et al.*, 2011). Todo esto apunta hacia una posible implicación de genes improntados en este tipo de trastornos del neurodesarrollo. La mayoría de los genes improntados se encuentran agrupados en dominios, regulados de forma coordinada por una región denominada control de impronta (ICR: *imprinting control region*). Las ICRs presentan un patrón diferencial de metilación establecido durante la gametogénesis (gDMR), que se mantiene tras la fertilización, en las células somáticas, mientras que en las células germinales este patrón es borrado y restablecido para formar los nuevos gametos en función del género del individuo. La mayoría de los gDMRs identificados presentan una metilación del alelo materno, establecido durante la ovogénesis. Además, dentro de los dominios cromosómicos que contienen a los genes improntados también es habitual la presencia de otras marcas epigenéticas, como DMR somáticas o distintas modificaciones de histonas, y al menos uno de estos genes suele ser un lncRNA (Ishida y Moore, 2013; Barlow y Bartolomei, 2014) (tabla 6). Existen distintos modelos para explicar el proceso de regulación epigenética en la impronta, a continuación mencionaremos dos ejemplos.

Tabla 6: Ejemplo de agrupaciones de genes sometidos a impronta.

Región	ICR		Genes	
	gDMR	met	expresión materna	expresión paterna
11p15	H19 DMR (ICR1)	♂	<i>H19</i> ¹	<i>IGF2, IGF2-AS</i>
	KvDMR1 (ICR2)	♀	<i>KCNQ1</i> ¹ , <i>KCNQ1DN</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>SLC22A18</i> , <i>SLC22A18AS</i> , <i>PHLDA2</i> ¹ ,	<i>KCNQ1OT1</i> ²
15q11.2	PWS/AS ICR	♀	<i>UBE3A</i> ¹ , <i>ATP10A</i>	<i>MKRN3, MAGEL2, NDN, PWRN1, NPAP1</i> ¹ , <i>SNRPN, SNURF, snoRNAs (HB11-85)</i>
14q32.2	IG-DMR	♂	<i>MEG</i> ³ , <i>MEG</i> ⁸ , <i>snoRNAs</i>	<i>DLK1, RTL1</i>

¹Expresión diferencial dependiente de tejido.

²lncRNA.

met: alelo metilado; ♀: materno; ♂: paterno.

2.2.2.1. Modelo aislante: H19 DMR

Este modelo se basa en el bloqueo de la interacción entre potenciadores y promotores por la acción de la ICR situada entre ellos. Un ejemplo que se ajusta a este modelo se produce en la regulación de los genes *H19* e *IGF2* de la región 11p15.5. El alelo paterno de la DMR anexa a H19 se encuentra completamente metilado, mientras que el materno está desmetilado. Esta región contiene siete sitios de unión al factor de transcripción CTCF, de tal forma que en el alelo desmetilado la unión del factor CTCF favorece la expresión de H19 y bloquea la expresión de IGF2, mientras que en el alelo metilado no se puede producir la unión de CTCF, facilitando indirectamente la expresión de *IGF2* (figura 13).

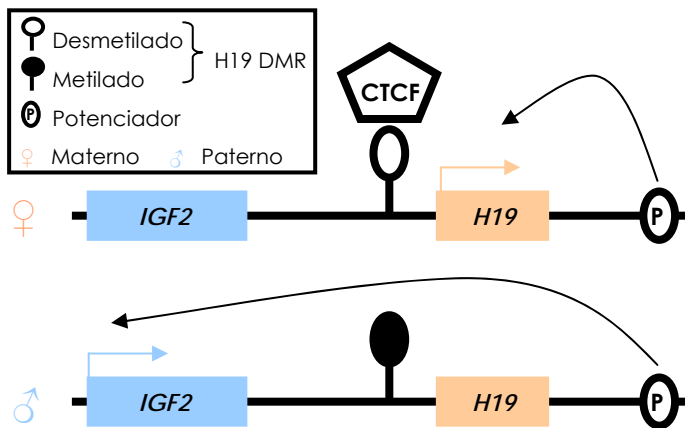


Figura 13: Representación del modelo aislante de impronta en el dominio *H19/IGF2*.

2.2.2.2. Modelo lncRNA: *KvDMR1*

Este modelo se basa en el silenciamiento de la expresión de genes improntados mediado por lncRNA. El lncRNA *KCNQ1OT1* representa un ejemplo del modelo. La expresión de este lncRNA está regulada por *KvDMR1*, que se encuentra metilado en el alelo materno y desmetilado en el alelo paterno. Cuando *KvDMR1* está metilado, *KCNQ1OT1* está silenciado y el resto de genes improntados se expresa, mientras que cuando *KvDMR1* está desmetilado, *KCNQ1OT1* se expresa y bloquea la expresión de los otros genes improntados (figura14).

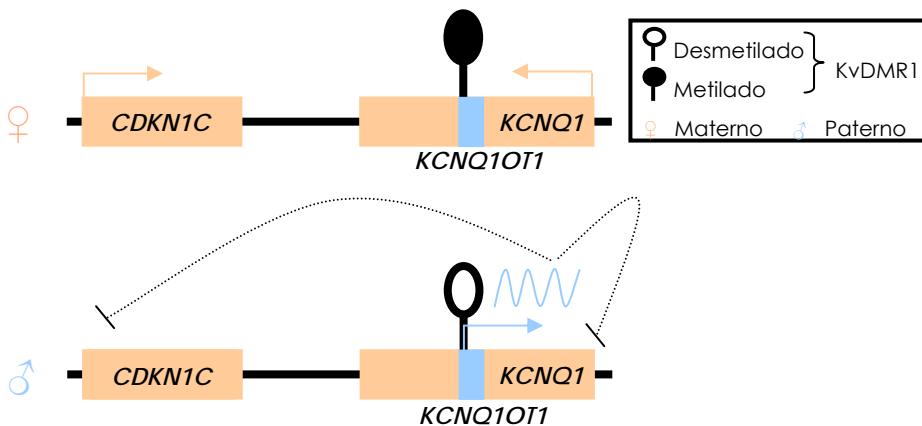


Figura 14: Representación del modelo lncRNA de impronta en el grupo de genes regulado por *KvDMR1*.

2.3 Genes epigenéticos

Si ya se ha puesto de manifiesto la complejidad de la epigenética, comenzando por la propia definición del término, establecer qué genes son "epigenéticos" y por ende participan en alguno de los distintos mecanismos implicados en la regulación epigenética, no es una tarea fácil. No existe un listado exhaustivo, ya

que en muchos de estos procesos intervienen complejos proteicos (como los del tipo SWI/SNF o los complejos Polycomb), con múltiples proteínas, que pueden asumir diferentes funciones y participar en distintos procesos, e incluso en algunos casos hasta se desconoce su función. Todavía hay mucho por descubrir en este campo, pero aun así, en esta introducción se han ido mencionando algunos de los principales genes/proteínas implicados en estos procesos (tabla 7).

Tabla 7: Listado de los principales mecanismos epigenéticos y ejemplos de genes implicados. Hay que tener en cuenta que la clasificación de algunos genes no es fácil, ya que pueden tener distintas funciones implicadas en diversos mecanismos epigenéticos.

Mecanismo	Función	Genes
Metilación del DNA	Metiltransferasas	<i>DNMT1, DNMT3A, DNMT3B</i>
	Unión a DNA metilado	<i>MBD1, MBD5, MECP2</i>
Modificación de histonas	Metiltransferasas de histonas	<i>NSD1, EHMT1, KMT2D, EZH2</i>
	Desmetilasas de histonas	<i>JARID1C, KDM8, PHF8, KDM4A</i>
	Unión a histonas metiladas	<i>PHF1, CHD1</i>
	Acetilasa de histonas (HAT)	<i>CREBBP, EP300, HAT1</i>
	Desacetilasa de histonas (HDAC)	<i>HACD4, HDAC8</i>
	Unión a histonas acetiladas	<i>ING5</i>
	Unión HAT/HDAC	<i>CTCF</i>
	Quinasa de histonas	<i>RPS6KA3, RPS6KA4</i>
	Fosfatasa de histonas	<i>EYA1</i>
Unión a Histonas fosforiladas	<i>YWHAH</i>	
Variantes de Histonas	Variantes de histonas	<i>H3F3B, H3F3A, H2AFY, H2AFB3</i>
ncRNA	miRNA	<i>MIR148A, MIR212, MIR802</i>
	Unión siRNA	<i>AGO2</i>
	piRNA	<i>piR651, piR823</i>
	Unión piRNA	<i>PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3, PIWIL4</i>
	asRNA	<i>TXIS</i>
	lncRNA	<i>XIST, H19</i>
Editado de RNA	RNA adenosina deaminasas	<i>ADAR</i>
Otros factores implicados en remodelación de la cromatina	Complejo Polycomb	<i>RBBP7, RBBP4, SUZ12</i>
	Complejo SWI/SNF	<i>ARID1A, ARID1B, ATRX</i>
	Complejo BAF	<i>SMARCC2, SMARCB1, ACTL6B</i>
	Helicasas	<i>CHD6, CHD7, CHD8</i>

3. Alteraciones epigenéticas en trastornos del neurodesarrollo

Las alteraciones de los mecanismos epigenéticos pueden ser tanto génicas, al afectar a la secuencia de genes que codifican para proteínas que participan en estos procesos; como epigenéticas, al producirse cambios en las señales epigenéticas sin alteración de la secuencia del DNA. En cualquier caso, se

produciría una modificación en las redes de expresión génica, cuyos efectos en el fenotipo son difíciles de predecir dada la complejidad del sistema.

En la regulación de la mayoría de procesos celulares y moleculares esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento del SNC están implicados mecanismos epigenéticos (Mehler MF, 2008). En base a esto, la desregulación de estos procesos puede relacionarse con un amplio espectro de trastornos neurológicos y psiquiátricos. Algunos ejemplos de síndromes que cursan con trastornos del neurodesarrollo asociados a genes implicados en procesos epigenéticos se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 8: Ejemplo de síndromes que cursan con DI causados por alteraciones en genes epigenéticos.

Síndrome	Gen	Función	Efectos en transcripción
Rett	<i>MECP2</i>	Unión a DNA metilado	Activación Represión
Duplicación <i>MECP2</i>			
CHARGE	<i>CHD7</i>	Unión a histonas	Activación
Sotos	<i>NSD1</i>	Metiltransferasa de histonas	Activación Represión
Kleefstra	<i>EHMT1</i>	Metiltransferasa de histonas	Represión
DI ligado al X	<i>JARID1C</i>	Desmetilasa de histonas	Represión
Rubinstein-Taybi	<i>CREBBP</i> <i>EP300</i>	Acetiltransferasa de histonas	Activación
DI y braquidactilia	<i>HDAC4</i>	Desacetilasa de histonas	Represión
Coffin-Lowry	<i>RPS6KA3</i>	Quinasa de histonas	Activación
α-talasemia con DI ligado al X	<i>ATRX</i>	Remodelación de la cromatina	Activación Represión

3.1 Alteraciones conocidas en genes epigenéticos

Muchos síndromes que cursan con DI se asocian a alteraciones en genes implicados en la maquinaria epigenética (tabla 8). A continuación se mencionarán aquellos ejemplos mejor conocidos.

3.1.1. *MECP2*

El gen *MECP2*, localizado en el cromosoma X (Xq28), codifica para una proteína de unión a DNA metilado que no es específica de secuencia. *MECP2* puede participar tanto en la represión como en la activación transcripcional. Por un lado es capaz de reclutar distintas proteínas, como desacetilasas (*HDAC1* y *HDAC2*) y metiltransferasas (con actividad H3K9me y H3K27me) de histonas, DNA metiltransferasas (*DNMT1*) y otras proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina como *SIN3A* y *ATRX* (apartado 3.1.4. de la introducción), formando un complejo represor de la transcripción que regula la expresión de genes implicados en el desarrollo neuronal como *BDNF* (Kramer y van Bokhoven, 2009; Gos, 2013). Por otro lado, se ha observado que también es capaz de unirse a región promotora no metilada e interactuar con *CREB1*, activador transcripcional (figura 15). Además, es una proteína que está sometida a distintas modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, que podrían

modular tanto su capacidad de unión a distintos factores como su diversidad funcional, participando también en procesos como el procesamiento del RNA, la condensación de la cromatina o el silenciamiento de elementos repetitivos (Kramer y van Bokhoven, 2009; Berdasco y Esteller, 2013).

Aunque MECP2 se expresa en todos los tejidos, su expresión en el cerebro es especialmente alta, variando además en función del momento del desarrollo (alta durante el desarrollo embrionario, baja al nacer y aumenta posteriormente). No se observa expresión en neuronas inmaduras, pareciendo más bien específica de la maduración neuronal, pero manteniéndose también en las células maduras. MECP2 es especialmente importante para el mantenimiento y la modulación de las sinapsis y la complejidad dendrítica. Los modelos de ratón que carecen de expresión *Mecp2* no muestran cambios significativos en la estructura del cerebro, pero sí un retraso en la maduración neuronal y la sinaptogénesis, encontrándose alteraciones en la morfología y la función de las neuronas (Kishi y Macklis 2005, Gos, 2013).

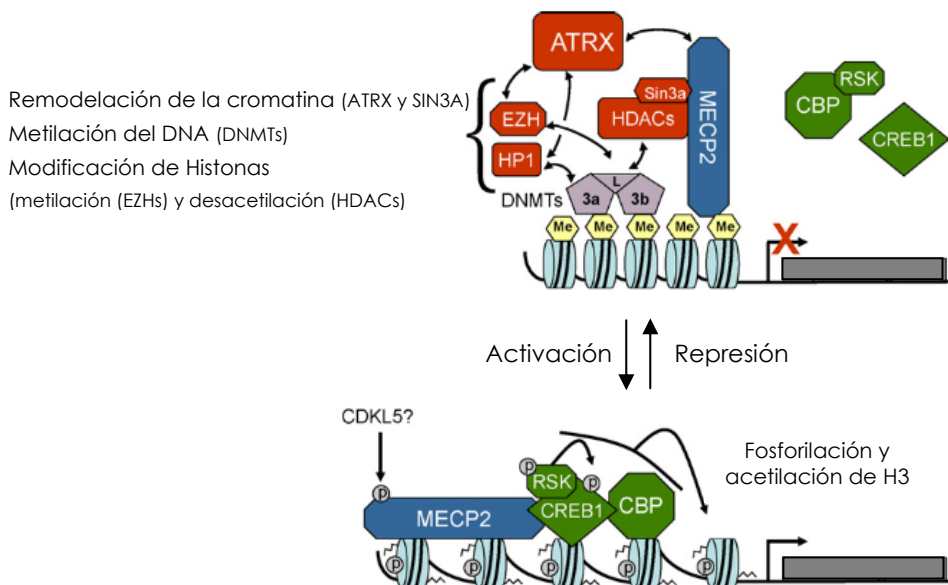


Figura 15: Representación del papel de MECP2 en la represión y activación transcripcional. Figura modificada de Kramer y van Bokhoven (2009).

Alteraciones en el gen *MECP2* se asocian a distintas patologías y trastornos del neurodesarrollo como el síndrome de Rett (OMIM 312750), la encefalopatía grave neonatal (OMIM 300673), el síndrome de Duplicación de MECP2 (OMIM 300260) o distintas formas de DI y autismo ligadas al cromosoma X (OMIM 300055, 300496). A continuación se describirán dos de estos síndromes.

3.1.1.1. Síndrome de Rett

El síndrome de Rett, que afecta mayoritariamente a mujeres (salvo casos de mosaicismo o copia extra de un cromosoma X en varones), tiene una prevalencia aproximada de 1-2:17000 niñas (Fehr *et al.*, 2011; Sarajlija *et al.*, 2015). Este síndrome se caracteriza por un desarrollo psicomotor aparentemente

normal hasta los 6-18 meses de vida, cuando se produce un retroceso de las habilidades adquiridas y un retraso global importante que incluye DI grave (con dispraxia o ausencia de la marcha y pérdida del habla), rasgos autistas y trastornos del comportamiento, con estereotipias de lavado de manos y pérdida del uso propositivo de éstas, convulsiones y microcefalia adquirida (Christodoulou y Ho, 2012).

Es una de las causas más frecuentes de DI en mujeres, debido en más de un 80 % de los casos a mutaciones, principalmente *de novo*, en el gen *MECP2*, aunque también se han descrito casos por delección. Además, la clínica puede verse modulada por el patrón de inactivación del cromosoma X. Igualmente existen variantes del síndrome llamadas Rett atípico, que implican variaciones en la clínica clásica y puede deberse a alteraciones en *MECP2* u otros genes, como *CDKL5* que se asocia principalmente a la aparición de crisis epilépticas en los primeros meses de vida (OMIM 300672, variante Hanefeld), o *FOXP1* relacionado con un fenotipo severo y de aparición temprana, durante los tres primeros meses de vida (OMIM 613454, variante Rolando o congénita) (Christodoulou y Ho, 2012).

3.1.1.2. Síndrome de duplicación de *MECP2*

El síndrome de duplicación de *MECP2* afecta mayoritariamente a varones, y aunque hoy en día se desconoce su prevalencia, se estima que puede explicar hasta un 1 % de la DI ligada al cromosoma X (Lugtenberg *et al.*, 2009; Van Esch, 2012). Se trata de un trastorno grave del desarrollo neurológico caracterizado por DI de moderada a grave, con retraso motor (retraso en la deambulación con marcha atáxica), lenguaje escaso o ausente, hipotonía infantil de aparición temprana, espasticidad progresiva y convulsiones, con infecciones recurrentes, principalmente respiratorias. Además, también se ha observado disfunción gastrointestinal, alteraciones del comportamiento como rasgos autistas y estereotipias, algunos rasgos dismórficos (como braquicefalia, hipotonía facial, orejas grandes o puente nasal hundido) y anomalías estructurales en el cerebro (Van Esch, 2012; Van Esch, 2014).

Como su propio nombre indica, se debe a duplicaciones que afectan al gen *MECP2*, de un tamaño variable que puede ir de 0.3 a más de 4 Mb, aunque también se han descrito casos con triplicación. La mayoría de estos pacientes han heredado la duplicación de sus madres, asintomáticas, que presentan un patrón sesgado de la inactivación del cromosoma X con un silenciamiento total o casi del 100 % del cromosoma portador de la duplicación.

3.1.2. *EHMT1*

El gen *EHMT1* codifica para una metiltransferasa de histonas que actúa principalmente sobre H3 (H3K9me1/2) participando en la represión transcripcional. La haploinsuficiencia de *EHMT1*, normalmente *de novo*, tanto por delección de la región 9q34.3 (en torno al 85 % de los casos) como por mutación, causa el síndrome de Kleefstra (OMIM 610253). Este síndrome se caracteriza por DI, retraso motor (deambulación sobre los 2-3 años), afectación severa del lenguaje, trastornos del comportamiento, hipotonía, anomalías congénitas (principalmente defectos cardíacos) y rasgos dismórficos característicos (braquicefalia y microcefalia, hipoplasia medio-facial, con cejas de forma inusual y sinofridia, hipertelorismo, narinas antevertidas, labio superior en arco de cupido, macroglosia y prognatismo). También pueden presentar

epilepsia, infecciones respiratorias recurrentes o sobrepeso. (Kramer y van Bokhoven, 2009; Kleefstra *et al.*, 2010; Willemsen *et al.*, 2012).

3.1.3. HDAC4

El gen *HDAC4* codifica para una desacetilasa de histonas que participa en la represión transcripcional. Distintos estudios demuestran que *HDAC4* es fundamental tanto para el desarrollo de los condrocitos en la osteogénesis, como para la supervivencia neuronal (Vega *et al.*, 2004; Chen y Cepko, 2009).

La haploinsuficiencia de *HDAC4* se considera responsable de la mayoría de manifestaciones clínicas del síndrome de deleción 2q37 o braquidactilia con DI (OMIM 600430), principalmente por deleción, con un tamaño variable que puede ir de algo más de 1 Mb a deleciones terminales mucho mayores, pero también por mutaciones en este gen (Williams *et al.*, 2010). Este síndrome puede presentarse con un amplio espectro de hallazgos clínicos, con DI leve-moderada y braquidactilia tipo E en más del 50 % de los casos, además de otras características de frecuencia variable como rasgos autistas y problemas de comportamiento, obesidad, talla baja, anomalías congénitas, defectos cardíacos o alteraciones cráneo-faciales características entre otras (Williams *et al.*, 2010; Doherty y Lacbawan, 2013).

3.1.4. ATRX

El gen *ATRX*, localizado en el cromosoma X (Xq21.1), codifica para una ATPasa/helicasa de la familia SWI2/SNF2, con actividad remodeladora de la cromatina. Está formada por siete dominios helicasa en la región C-terminal, con actividad ATPasa, y un dominio en la región N-terminal denominado ADD (*ATRX-DNMT3-DNMT3L*) que contiene un dominio PHD, con una alta especificidad por H3K9 metilado y H3K4 desmetilado. Aunque se han descrito mutaciones distribuidas a lo largo de todo el gen, más del 90 % se localizan en estos dominios, observándose que alteraciones en *ATRX* conducen a defectos en una gran variedad de procesos celulares como la cohesión de las cromátidas hermanas, el mantenimiento de la integridad telomérica o la metilación del DNA en regiones de heterocromatina. Pese a que no se conocen todos los mecanismos en los que participa *ATRX*, se está comenzando a aclarar el papel de este gen en alguno de estos procesos, como por ejemplo:

- Se conoce la participación de *ATRX* en la inserción de la variante H3.3 en regiones de heterocromatina como las secuencias repetitivas teloméricas, pericentroméricas y ribosomales, junto con la chaperona de histonas DAXX; gracias a su dominio ADD, que reconoce modificaciones de histonas de estas regiones (H3K9me3 y H3K4me0), y a su capacidad ATPasa que proporciona la energía necesaria para que se produzca este proceso (Henikoff y Smith 2015).

- También podría regular de forma positiva y negativa la incorporación de distintas variantes de histonas, actuando como activador transcripcional al permitir una conformación activa de la cromatina, con la incorporación de H3.3 y la eliminación de macroH2A en los nucleosomas localizados en determinadas zonas, como en la región subteloamérica del cromosoma 16, donde se localizan los genes de las α -globinas (Ratnakumar y Bernstein, 2013) (figura 16).

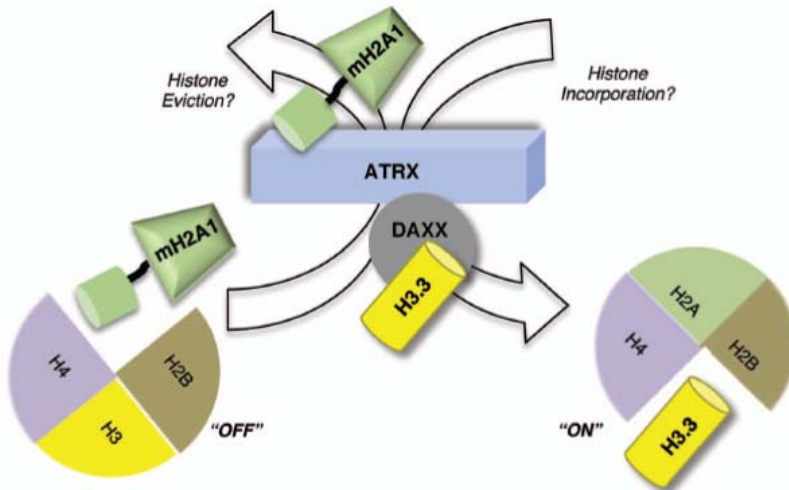


Figura 16: Modelo hipotético de intercambio de histonas mediado por ATRX en la activación transcripcional de genes específicos. Imagen obtenida de Ratnakumar y Bernstein (2013).

- Como se ha comentado ya previamente, la variante macroH2A se encuentra enriquecida en el cromosoma X inactivo. De la Fuente y colaboradores (2011) proponen que ATRX podría participar en el mantenimiento de la inactivación del X, ya que en ratón se ha observado una asociación de ATRX con este cromosoma, aunque el mecanismo se desconoce.

- Por otro lado, los dominios helicasa de ATRX le permiten interactuar con distintos factores como MECP2 (figura 15). ATRX junto con MECP2 podrían controlar la expresión de determinados genes sometidos a impronta en el cerebro, al intervenir en la modulación de las interacciones intracromosómicas y la estructura a gran escala de la cromatina (Kernohan *et al.*, 2014).

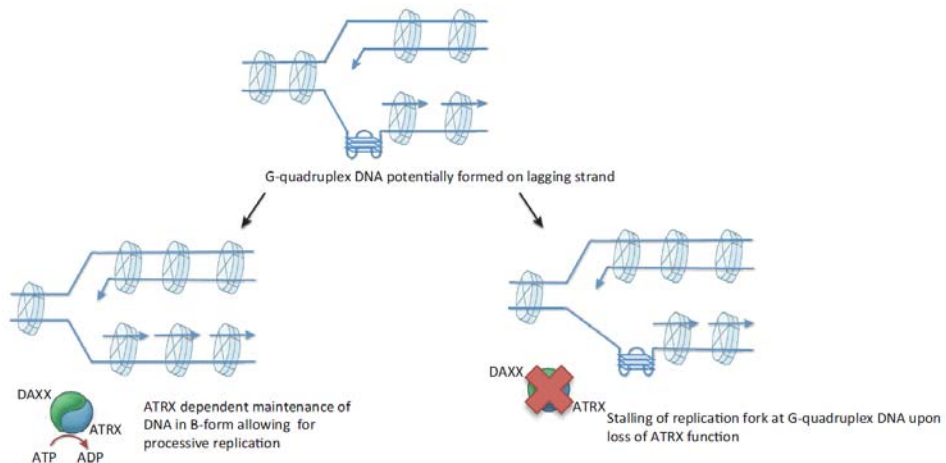


Figura 17: Representación de la participación de ATRX en la estabilización de la estructura secundaria del DNA. Imagen obtenida de (Clynes *et al.*, 2013).

- Además, podría participar en la estabilización de la estructura secundaria del DNA. Regiones ricas en guaninas, como los telómeros, pueden adquirir una estructura secundaria denominada cuádruple G, que interrumpe la replicación y transcripción. Esta estructura se ha predicho en muchas dianas de ATRX, quien podría ser capaz de unirse a ella (Clynes *et al.*, 2013; Clynes y Gibbons, 2013) (figura 17).

Las Alteraciones en este gen se asocian a distintas patologías, como la α -talasemia con síndrome mielodisplásico (OMIM 300448), causada por mutaciones somáticas, o la DI sindrómica con o sin α -talasemia (OMIM 301040 o OMIM 309580 respectivamente), con herencia recesiva ligada al cromosoma X. La α -talasemia con DI ligada al X afecta mayoritariamente a varones, mientras que las mujeres portadoras suelen ser asintomáticas con un patrón de inactivación del cromosoma X sesgado, aunque se han descrito algunos pocos casos de mujeres afectadas (Wada *et al.*, 2005; Badens *et al.*, 2006). Este síndrome, causado principalmente por mutaciones puntuales en *ATRX*, pero también por deleciones, se caracteriza por un profundo retraso en el desarrollo, siendo algunos de los pacientes afectados incapaces de andar de forma independiente o de desarrollar el lenguaje, con DI de grado variable, mayoritariamente grave-profunda, hipotonía, microcefalia, rasgos dismórficos característicos (como una facies hipotónica, hipertelorismo, nariz pequeña y labio superior en tienda de campaña), anomalías genitales (en un 80 % de los casos) y, como su nombre indica, α -talasemia en alguno de los casos. Además también pueden presentar otros rasgos como alteraciones gastrointestinales (aproximadamente en un 75 % de los casos), talla baja (65-70 %), convulsiones (30-35 %) y distintas alteraciones del comportamiento (Stevenson, 2014).

3.2 Alteraciones conocidas de la impronta

Los denominados síndromes de impronta son un grupo de enfermedades debidas a la alteración en la expresión de genes sometidos a impronta, por lo que el fenotipo resultante, es dependiente del origen parental de la alteración. Existen distintos mecanismos que pueden dar lugar a estas patologías:

- Variantes en número de copias (CNVs), tanto deleciones como duplicaciones, que contienen genes improntados.
- Disomía uniparental (DUP).
- Mutaciones de genes improntados.
- Epimutaciones, es decir, cambios en las marcas epigenéticas de estos genes, como la metilación del DNA o la modificación de histonas, sin alteración de su secuencia de DNA.

Actualmente, según la red europea de trastornos congénitos de la impronta (EUCID: *European Congenital Imprinting Disorders Network*) se conocen 8 síndromes de impronta asociados a alteraciones en distintas regiones: síndrome de Silver-Russell (SSR), síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), síndrome de Prader-Willi (SPW), síndrome de Angelman (SA), síndrome de Temple (ST), también conocido como síndrome de DUP materna del cromosoma 14 (DUP(14)mat), síndrome Kagami-Ogata (SKO), también conocido como síndrome de DUP paterna del cromosoma 14 (DUP(14)pat), Diabetes mellitus neonatal transitoria (DMNT) y Pseudo-hipoparatiroidismo 1B (PHP1B), estando algunos de ellos asociados con distintos grados de retraso en el neurodesarrollo (tabla 9). Además, recientemente se ha descrito como causa de Pubertad

Precoz central (OMIM 615346) mutaciones en el gen *MKRN3*, localizado en la región sometida a impronta 15q11.2 (tabla 6) y cuya expresión es exclusivamente del alelo paterno (Abreu *et al.*, 2013; Bulcao Macedo *et al.*, 2014; de Vries *et al.*, 2014).

Por otro lado, Mackay y colaboradores, en 2006, propusieron un nuevo síndrome de impronta denominado de hipometilación materna, al detectar en varios casos una alteración más global de distintas DMRs conocidas, que incluía una pérdida de metilación de la región 6q24 asociada a DMNT y otros *loci* de metilación materna. Igualmente se han descrito en distintas publicaciones pacientes con varios *loci* sometidos a impronta alterados (Arima *et al.*, 2005; Azzi *et al.*, 2009; Perez-Nanclares *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2014; Mackay *et al.*, 2015). Esto sugiere la existencia de genes de regulación epigenética asociados a impronta. En este sentido, el gen *NLRP2*, localizado en 19q13.42, fue propuesto por Meyer y colaboradores (2009) al observar que la madre de dos individuos con SBW debido a una pérdida de la metilación en KvDMR1 del alelo materno, era portadora de una mutación en homocigosis en *NLRP2*. Por otro lado, mutaciones en el gen *ZFP57*, localizado en 6p22.1, en pacientes con DMNT se asocian a defectos en la metilación de múltiples *loci* improntados (Mackay *et al.*, 2008), por lo que puede considerarse como otro candidato a la regulación en *trans* de la impronta.

Tabla 9: Resumen general de las principales características de distintos síndromes de impronta conocidos.

Síndrome	OMIM	Prevalencia ¹	DI	Región ²	Metilación gDMR	Mecanismo + frecuente
SSR	180860	1:70000	retraso psicomotor	11p15	H19 DMR paterna	epimutación
SBW	130650	1:13000	normal ^a		KvDMR1 materna	epimutación
SPW	176270	1:18000	variable	15q11.2	materna	del pat
SA	105830	1:16000	grave			del mat
ST	616222	desconocida	retraso psicomotor	14q32.2	paterna	DUPmat
SKO	608149	desconocida	leve			DUPpat
DMNT	601410	1:500000	normal	6q24	materna	DUPpat
						epimutación
						dup pat
PHP1B	603233	desconocida	normal	20q13	materna	epimutación

¹Prevalencia obtenida de Mackay *et al.* (2015).

²Puede haber más regiones relacionados con estas patologías.

^aSegún Shuman *et al.* (2010) puede haber una mayor frecuencia de trastornos neuroconductuales como el TEA.

del: delección; dup: duplicación; DUP: disomía uniparental; gDMR: región de metilación diferencial germinal; mat: materna; pat: paterna.

Cada síndrome de impronta se caracteriza por rasgos clínicos específicos, aunque la mayoría comparten algunas características clínicas como retraso en el crecimiento o sobrecrecimiento pre/postnatal, hipo o hiperglucemia,

trastornos de la alimentación y problemas de conducta en la infancia (Eggermann *et al.*, 2015). A continuación se describirán brevemente alguno de estos síndromes de impronta.

3.2.1. Síndrome de Angelman

El SA está causado por la pérdida de la función del gen *UBE3A*, de expresión bialélica salvo en algunas células del cerebro en las que se expresa solo el alelo materno. El 70-75 % de los casos se deben a deleciones de la región 15q11.2-q13 *de novo* de origen materno, cerca del 11 % de los pacientes presentan una mutación puntual en *UBE3A*, un 3-7 % de los casos son portadores de una DUP paterna y alrededor de un 3 % presentan un defecto de la impronta en la región 15 q11.2 de origen materno (Mackay *et al.*, 2015).

Los principales rasgos clínicos asociados a este síndrome son DI grave, marcha atáxica y/o temblores de las extremidades, retraso grave del lenguaje, con un uso mínimo o ausente de las palabras, comportamiento alterado, disposición feliz, con risas y sonrisas frecuentes e inmotivadas, excitable y con aleteo de manos, microcefalia adquirida y convulsiones. El retraso del desarrollo se observa a partir de los seis meses, pero hasta después del año no se manifiestan los rasgos del síndrome (Dagli y Williams, 2011).

3.2.2. Síndrome de Prader-Willi

La causa más frecuente del SPW es la deleción *de novo* de origen paterno de la región cromosómica 15q11-q13 (70-75 % de los pacientes), seguida por la DUP materna (20-25 %) y en raras ocasiones por un defecto de la impronta en la región 15 q11.2 de origen paterno (<1 %)(Mackay *et al.*, 2015).

Este síndrome se caracteriza por hipotonía y graves dificultades de alimentación en la primera infancia, seguido en la infancia tardía por una excesiva ingesta de alimentos y el desarrollo gradual de obesidad mórbida si no se controla la alimentación, con un retraso del desarrollo motor y del lenguaje, deterioro cognitivo, DI de grado variable y alteraciones del comportamiento (berrinches, terquedad, conducta manipuladora y comportamiento obsesivo-compulsivo). Además presentan hipogonadismo con hipoplasia genital, desarrollo incompleto de la pubertad, y, en la mayoría de casos, infertilidad y talla baja (Driscoll *et al.*, 2014).

3.2.3. Síndrome de Temple y Síndrome de Kagami-Ogata

Inicialmente estos dos síndromes se describieron en pacientes con translocaciones robertsonianas equilibradas que daban lugar a DUP del cromosoma 14, materna en el síndrome de Temple y paterna en el síndrome de Kagami-Ogata (Temple *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Aunque la DUP(14) es la causa más frecuente de estos síndromes, también se han descrito algunos casos por deleción o epimutación que afectan a la región 14q32.2 sometida a impronta (Eggermann *et al.*, 2015).

Los principales rasgos clínicos asociados al síndrome de Temple son un retraso en el crecimiento prenatal y postnatal, con talla baja (percentil <5), manos y pies pequeñas, hipotonía, retraso motor y del lenguaje, y comienzo temprano de la pubertad. Además pueden presentar otros rasgos fenotípicos como DI, problemas de alimentación en la infancia y obesidad (Ioannides *et al.*, 2014).

Por otro lado, el síndrome de Kagami-Ogata se caracteriza por polihidramnios y placentomegalia durante la gestación, con rasgos dismórficos (mejillas llenas, puente nasal hundido, *filtrum* sobresalido, micrognatia y cuello corto y alado),

tórax pequeño y en forma de campana, con costillas en forma de perchero en la infancia, defectos de la pared abdominal (como onfanocele o diástasis) y DI leve (Kagami *et al.*, 2015).

3.2.4. Síndrome de Silver-Rusell

Las principales causas del SSR son la pérdida de metilación en la región 11p15 de impronta paterna (H19 DMR), que se produce en más de un 40 % de los casos, y habitualmente aparece en mosaico, y la DUP(7)mat (10 %). Además se han descrito otras alteraciones mucho menos recurrentes que pueden causar este síndrome como la duplicación de la región 11p15 (Eggermann *et al.*, 2015).

El SSR se caracteriza principalmente por retraso en el crecimiento pre y postnatal, con talla baja y perímetro cefálico normal (macrocefalia relativa), rasgos faciales característicos con cara triangular y asimetría corporal. Además pueden presentar retraso psicomotor, clinodactilia del quinto dedo, hipoglucemia y trastornos de la alimentación (Saal, 2011).

3.2.5. Síndrome de Beckwith-Wiedemann

El SBW se produce por alteraciones que pueden afectar a las dos regiones sometidas a impronta de la región 11p15: hipometilación de KvDMR1 (50 %), DUP(11)pat (20 %), hipermetilación de H19 DMR (5 %), mutaciones puntuales en *CDKN1C* (5 %) y deleciones o duplicaciones de la región 11p15 en un menor número de casos (Mackay *et al.*, 2015).

Se trata de un trastorno que afecta al crecimiento y se caracteriza por macrosomía, macroglosia, visceromegalia y onfanocele, con un mayor riesgo de presentar tumores embrionarios como los de Wilms o hepatoblastoma. También pueden presentar orejas dismórficas, hipoglucemia neonatal, citomegalia suprarrenal y anomalías renales. Además, aunque el neurodesarrollo suele ser normal, puede haber una mayor frecuencia de trastornos neuroconductuales como el TEA en estos pacientes (Shuman *et al.*, 2010).

4. Técnicas moleculares para el estudio de los trastornos del neurodesarrollo

Históricamente, tras una evaluación clínica exhaustiva, si había una orientación diagnóstica hacia un síndrome concreto de causa genética conocida, se dirigía el estudio en esa dirección. Por ejemplo, para alteraciones cromosómicas se utilizaban técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH: *fluorescence in situ hybridization*) o posteriormente la amplificación múltiple de sondas dependiente de ligamiento (MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*), para el estudio de mutaciones monogénicas habitualmente se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*) y secuenciación de Sanger, mientras que el análisis de enfermedades debidas a expansiones de tripletes como el X-frágil se realizaba mediante el *Southern blot*. En caso de carecer de una sospecha clínica clara, se realizaba principalmente un cariotipo, en busca de grandes reordenamientos, pudiendo completarse este tipo de análisis con el estudio de regiones teloméricas tanto por FISH primero como por MLPA después.

Con el avance de las nuevas tecnologías, en la práctica asistencial el cariotipo ha sido sustituido por los arrays genómicos como primera herramienta para el rastreo de alteraciones en pacientes con DI. Esta nueva herramienta ha supuesto un gran avance en el diagnóstico etiológico de la DI, especialmente

sindrómica, describiéndose nuevos síndromes y causas de DI. Por otro lado, la interpretación de este tipo de resultados puede ser muy compleja, al aumentar el número de alteraciones detectadas cuyo significado es incierto y debido a la baja casuística de muchos de estos casos, que dificulta el poder establecer el espectro fenotípico de rasgos clínicos asociados a estas alteraciones de una forma exhaustiva y precisa.

Además, pese al aumento de la eficiencia diagnóstica con la introducción de las nuevas herramientas, todavía hay muchos pacientes con trastorno del neurodesarrollo cuya etiología permanece desconocida. Los mecanismos epigenéticos tienen especial relevancia en el desarrollo del sistema nervioso (Mehler MF, 2008; Hu *et al.*, 2014; West y Orlando, 2014), por lo que su alteración podría explicar algunos de estos casos. En este sentido, el mecanismo epigenético mejor estudiado es la metilación del DNA. Para la búsqueda de alteraciones específicas de *loci* se han utilizado dos aproximaciones distintas basadas en enzimas de restricción sensibles a metilación o en el tratamiento del DNA con bisulfito sódico. Mientras que para el estudio más global de la metilación el método de referencia es la cromatografía líquida de alta eficiencia (*high performance liquid chromatography*; HPLC), aunque se han desarrollado nuevos métodos para este tipo de estudios basados en técnicas como los arrays de metilación o la pirosecuenciación. No obstante, además de que la mayoría de laboratorios no disponen del equipamiento necesario para aplicar estas técnicas, la dificultad mayor radica en comparar los resultados obtenidos en diferentes estudios, al aplicarse distintas técnicas en distintos tejidos de muestras sometidas a distintos tratamientos. Por último, una dificultad añadida en el estudio de la DI es la inaccesibilidad al tejido diana, el sistema nervioso central, especialmente durante el neurodesarrollo.

HIPÓTESIS

*"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado."
(Albert Szent-Györgyi)*



La hipótesis fundamental de este trabajo es que las alteraciones de la regulación génica mediada por los procesos epigenéticos tienen una especial relevancia entre las causas de los trastornos del neurodesarrollo.

Esta hipótesis se concreta en los siguientes puntos:

- Las alteraciones de los mecanismos epigenéticos pueden ser tanto génicas como epigenéticas (epimutaciones).
- Estas alteraciones de la maquinaria epigenética están implicadas en los trastornos del neurodesarrollo.
- Existen variantes genéticas de predisposición a epimutaciones.
- En los casos en los que se detecten alteraciones genéticas debidas a cambios de dosis, el estudio de las zonas de incertidumbre donde se localizan los puntos de rotura en los que se han producido los reordenamientos cromosómicos, pueden ayudar a explicar el mecanismo de estas alteraciones.
- Patrones epigenéticos alterados en tejidos accesibles como la sangre periférica podrán servir de marcadores de alteraciones epigenéticas en otros tejidos menos accesibles como el sistema nervioso.
- Un estudio génico y epigenético completo permitirá identificar y catalogar mejor este grupo de patologías.

OBJETIVOS



*"Entre las dificultades se esconde la oportunidad."
(Albert Einstein)*



El objetivo general de esta tesis doctoral es contribuir al conocimiento de la etiología y al diagnóstico genético de los trastornos del neurodesarrollo.

Este objetivo general se concreta en la búsqueda de:

- Alteraciones genéticas relacionadas con este tipo de trastornos en genes candidatos, como aquellos implicados en la regulación epigenética, la diferenciación y el desarrollo del SNC, cuya expresión se encuentra activada preferentemente durante el desarrollo neuronal.
- Alteraciones en otros elementos del genoma que puedan intervenir en la regulación de la expresión génica como elementos ultraconservados y miRNAs.
- Enriquecimiento de elementos reguladores, secuencias/regiones repetitivas del genoma o marcadores de estructuración de la cromatina, en las regiones de incertidumbre que contienen los puntos de rotura de las variantes en número de copias detectadas en estos pacientes (zona gris).
- Marcadores de alteraciones epigenéticas, centrándonos en la metilación del genoma completo y de regiones candidatas de interés, tales como dominios sometidos a metilación diferencial.
- Correlación de los tipos de alteraciones detectadas con la clínica de esos pacientes.

*"Vamos a matar tres pájaros de un tiro."
(Francisco Martínez Castellano)*

MATERIAL Y MÉTODOS



Para la realización de este trabajo, se ha decidido utilizar el punto como separador decimal, siguiendo las recomendaciones de la Real Academia de la Lengua Española (2010); y la coma como separador de millares en la notación de las coordenadas genómicas, tal como se indica en la normativa internacional contenida en el ISCN (*International system for human cytogenetic nomenclature*) (Shaffer *et al.*, 2013). Además, todas las secuencias de oligonucleótidos se escriben en orientación 5'→3', siguiendo el consenso internacional. Por último, se ha utilizado el mapa genético Hg19 (NCBI37) para referir todas las coordenadas genómicas presentadas en este trabajo.

1. Sujetos de estudio

1.1 Pacientes

En este trabajo se han estudiado 395 pacientes remitidos a la Unidad de Genética del Hospital Universitario y Politécnico La Fe para su inclusión en diversos proyectos de investigación centrados en el estudio de las causas genéticas de la DI y los trastornos del neurodesarrollo del grupo de Investigación traslacional en Genética.

Los pacientes estudiados en este trabajo fueron incluidos en los proyectos a lo largo de 12 años (desde octubre de 2001 hasta julio de 2013; figura 18), pero el presente trabajo se inició en septiembre de 2009.

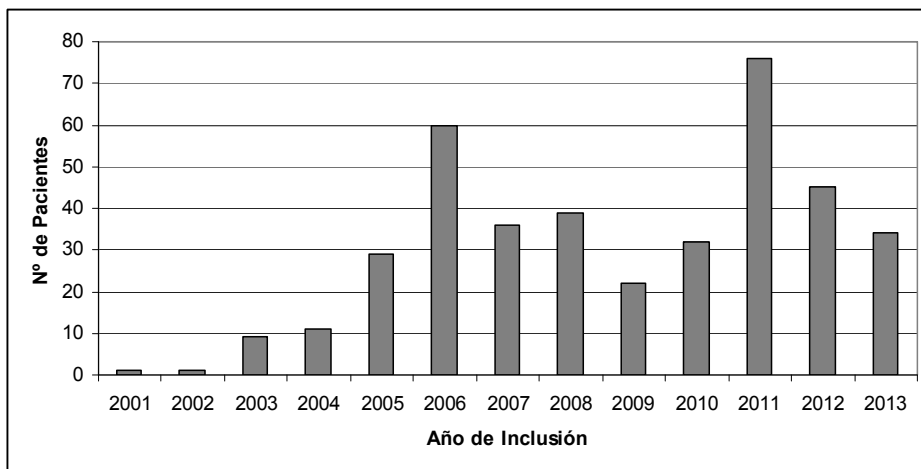


Figura 18: Distribución del número de pacientes según su fecha de inclusión.

Los criterios utilizados para la selección de los pacientes se basan en la elección de individuos con trastornos del neurodesarrollo de etiología desconocida como DI o TEA que presentan además anomalías congénitas, rasgos dismórficos y/o antecedentes familiares de trastornos del neurodesarrollo, del comportamiento, abortos de repetición o malformaciones congénitas.

En todos los casos, el estudio del cariotipo había resultado normal, excluyéndose de este trabajo aquellos pacientes en los que se había detectado alguna alteración citogenética patológica. Además, en la mayoría de los casos se

había descartado el síndrome del cromosoma X frágil, que como ya se ha comentado en la introducción, es una de las causas más frecuentes de DI de origen genético (tras el síndrome de Down), así como cualquier otro estudio asistencial que se considerara oportuno según la clínica de cada caso, como por ejemplo el síndrome de Rett, de Angelman, delección 22q11, etc.

Los pacientes fueron valorados por dos profesionales sanitarios diferentes. Dentro de nuestro grupo de investigación se elaboró una hoja de recogida de datos clínicos y, después de informar a las familias sobre el proyecto, se obtuvo el consentimiento para la realización de los estudios pertinentes presentados en este trabajo (anexo I). Todo esto se llevó a cabo con la aprobación del comité ético del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, 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 (2013).

Además, a partir de febrero de 2004 el grupo de Investigación Traslacional en Genética, diseñó y puso en marcha una base de datos ACCESS para la recogida y categorización de los principales datos clínicos y el registro de los resultados de los diferentes estudios genéticos realizados, gestionada principalmente por la Dra. Orellana y Dra. Roselló. En dicha base de datos los campos identificativos de los pacientes se encuentran disociados cumpliendo con la ley de protección de datos.

Para la obtención de material genético se extrajo una muestra de sangre periférica venosa tanto al paciente como a sus progenitores. Además, en algunos casos, a raíz de los hallazgos obtenidos, fue necesario completar el estudio familiar, por lo que también se obtuvo muestra de otros miembros de la familia.

1.2 Grupos control

Para evaluar la frecuencia de los hallazgos encontrados en población sana, se recogieron muestras de 236 individuos de nuestra población que fueron obtenidas y anonimadas de acuerdo con la normativa legal vigente. Las muestras de DNA de estos casos se obtuvieron a partir de los excedentes de la sangre venosa enviada a hematología para la realización de un hemograma. Estos individuos se remitieron desde distintos servicios, no estando la causa de su estudio relacionada con ningún trastorno del neurodesarrollo. Los únicos datos recogidos en estos casos fueron la edad y el género, buscando, en la medida de lo posible, la concordancia de estos parámetros con nuestra serie de pacientes (figura 19).

Como controles positivos para los estudios de metilación se disponía, por un lado, de muestras de 36 pacientes con trastornos del neurodesarrollo con alteraciones conocidas en genes implicados en procesos epigenéticos, como el *MECP2*, *CREBBP*, *RPS6KA3*, *ATRX*, *HDAC4* o *EMTH1* (anexo II). Por otro lado, teníamos acceso a muestras de DNA de pacientes con alteraciones en la impronta debidos a la metilación anómala de los genes *SNRPN*, *KCNQ1OT1*, *H19* o *MEG3*, que fueron diagnosticados en nuestro servicio y que, en este trabajo, nos sirvieron de controles positivos en los estudios de metilación centrados en alteraciones de estos genes.

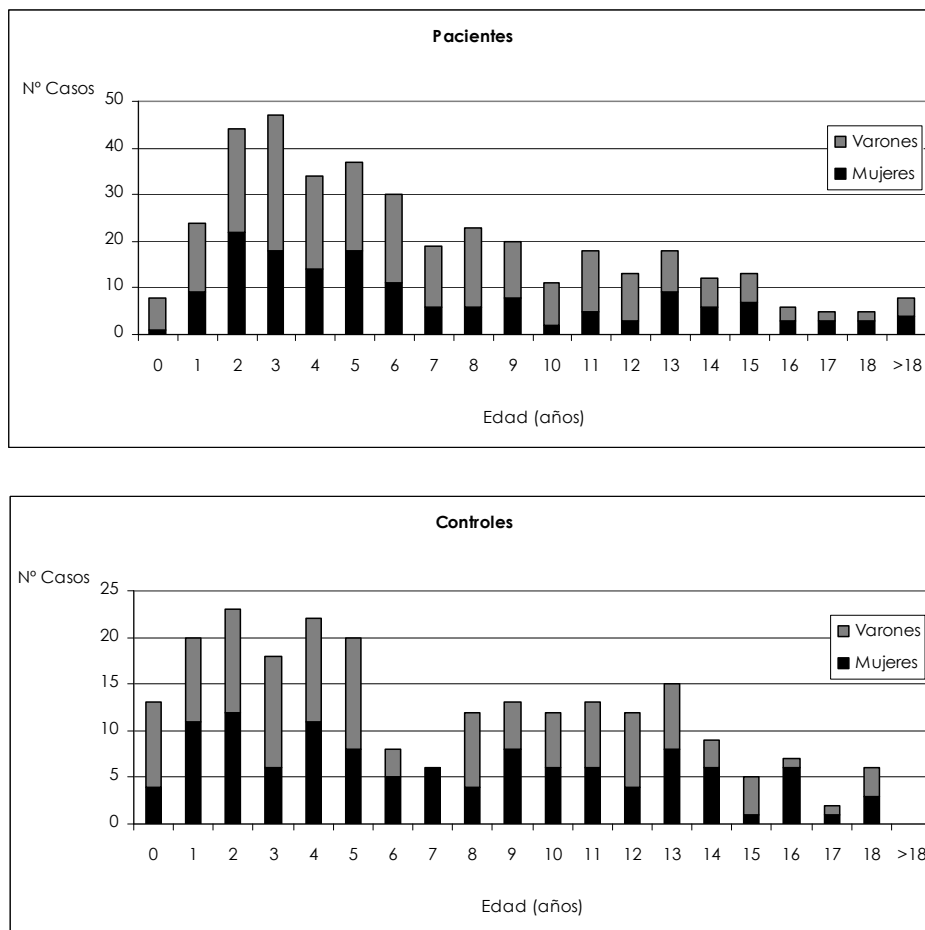


Figura 19: Distribución por género y edad de pacientes y controles. Representación por género y edad de los pacientes estudiados (arriba) y los individuos control (abajo). La serie estudiada está formada por 237 varones y 158 mujeres, siendo la media de edad de 7 años, mientras que la serie control está formada por 120 varones y 116 mujeres, con una media de edad de 7 años.

2. Obtención de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de una muestra de sangre periférica recogida en anticoagulante EDTA (1 mM) en un volumen de aproximadamente 5 ml.

2.1 Extracción de ácidos nucleicos

2.1.1. *DNA genómico*

Durante los más de 10 años en los que se ha realizado la recogida de muestras utilizadas en este trabajo, se han empleado distintos protocolos de extracción de DNA:

2.1.1.1. *Protocolo de extracción fenólica*

Protocolo de extracción de DNA basado en la separación con fenol de ácidos nucleicos con una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, seguido de una purificación por precipitación con etanol (a una concentración final de 130 mM de CINa y 66 % de etanol) (Sambrook y Russell; 2001; Monfort; 2014).

2.1.1.2. *Protocolo de extracción en columna*

Para realizar este protocolo se utiliza el kit comercial de QIAamp® DNA mini Kit (QIAGEN), con sus correspondientes reactivos incluidos en el Kit. La extracción se realizó tanto de forma manual, como automatizada, utilizando el equipo de QIACUBE (QIAGEN). El procedimiento utilizado fue el indicado por la casa comercial con pequeñas modificaciones (figura 20).

Como paso previo a la extracción, se lisan de forma selectiva los eritrocitos con una solución fría hipotónica (5 mM Cl₂Mg, Tris 20 mM, pH 7.5). Para el protocolo de extracción se parte de 400 µl de lisado eritrocitario. Por último, la elución del DNA genómico de la columna se realiza pasando 2 veces sucesivas 50 µl de tampón comercial AE (10 mM Tris-Cl y 0.5 mM EDTA; pH 9.0), obteniendo un volumen final de aproximadamente 100 µl.

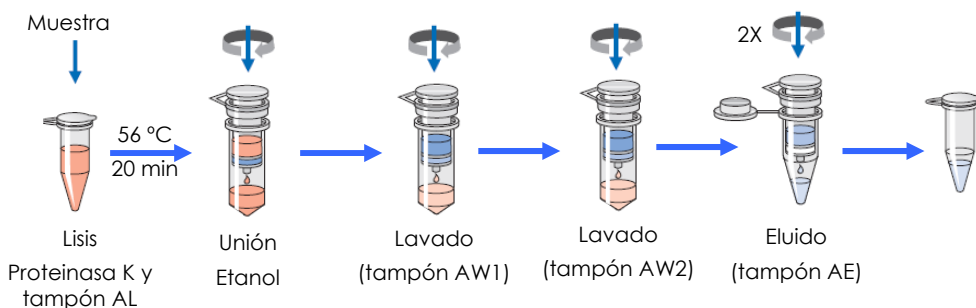


Figura 20: Esquema del proceso de extracción de DNA genómico en columna. Imagen modificada del manual del Kit de QIAamp® DNA mini Kit.

2.1.2. *RNA*

Primero se realizó una separación en gradiente de ficol de las células nucleadas, guardando las células a -80 °C en tampón de lisis RLT. Posteriormente se realizó la extracción del RNA en columna con el Kit comercial de QIAGEN RNeasy® mini Kit, eluyendo el RNA en 50 µl de agua libre de RNasas (figura 21).

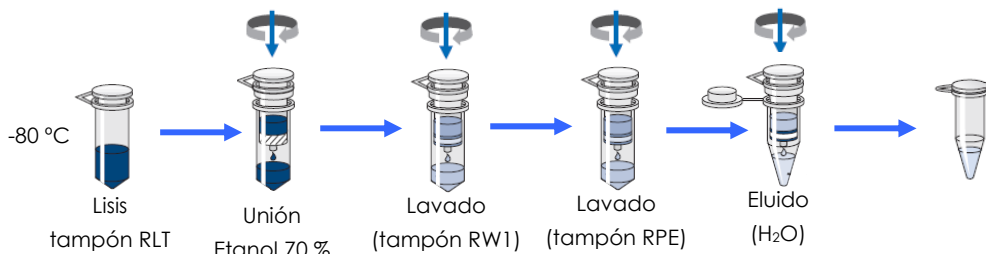


Figura 21: Esquema del proceso de extracción de RNA en columna. Imagen modificada del manual del Kit RNeasy mini Kit de QIAGEN.

2.1.3. *cDNA*

Este proceso se realiza utilizando el Kit comercial GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit de Applied Biosystems, utilizando un programa específico para la síntesis de cDNA que consiste en 15 min a 25 °C seguido de 30 min a 42 °C. Los reactivos utilizados en la mezcla de reacción se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10: Mezcla de reacción utilizada para la síntesis de cDNA.

Reactivos	[I_0]	V(μl)	[I_f]
Agua libre de RNasas	-	6.4	-
Tampón 5 X	5 X	8	1 X
MgCl ₂	25 mM	4	2.5 mM
dNTPs	10 mM	4	1 mM
DTT	100 mM	4	10 mM
Hexámeros al azar	50 μM	1	1.25 μM
Oligo dT	50 μM	1	1.25 μM
Inhibidor de RNasas	20 U/ μl	1	0.5 U/ μl
MMLV (retrotranscriptasa)	50 U/ μl	0,6	0,75 U/ μl
RNA	-	10	-

[I_0]: Concentración inicial; [I_f]: Concentración final.

2.2 Cuantificación y valoración de la calidad de los ácidos nucleicos

2.2.1. *DNA genómico*

Para determinar la concentración de DNA obtenida, se utiliza el espectrofotómetro NanoDrop 3.0.1. Además de la concentración obtenida, se valora la curva de absorbancia y los cocientes de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm. Las muestras se ajustaron a una concentración aproximada de 100 ng/ μl . Si la concentración de la muestra es superior a 120 ng/ μl , se diluía, en un principio con el tampón TE 1 X (10 mM Tris-Cl y 1 mM EDTA; pH 7.5) y posteriormente utilizando el tampón comercial AE de la casa QUIAGEN (10 mM Tris-Cl y 0.5 mM EDTA; pH 9.0). Una vez ajustada la concentración, para evaluar el grado de degradación del DNA se realizó la electroforesis de 1 μl de muestra en un gel de agarosa al 0.8-1 % (apartado 4.1 de la material y métodos).

2.2.2. *RNA y cDNA*

Para valorar la eficiencia de la extracción del RNA y la síntesis del cDNA obtenido se realiza una PCR cuantitativa (qPCR) con cebadores del gen control *GAPD*, de expresión constitutiva, con sondas Taqman. Los reactivos utilizados en la mezcla de reacción se encuentran en la tabla 11.

La reacción de qPCR se realiza en el equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial, con el siguiente programa de PCR:

50 °C	2 min	} X 50 ciclos
95 °C	10 min	
95 °C	15 s	
65 °C	1 min	

Se considera que el cDNA producido es aceptable si los ciclos de cuantificación (Cq) obtenidos se encuentran alrededor de 20.

Tabla 11: Mezcla de reacción por muestra para la reacción de qPCR.

Reactivos	V (μl)
Agua libre de RNasas	9.75
Taqman Universal Master Mix (2 X) ¹	12.5
Sonda taqman y cebadores comerciales (20 X) ²	1.25
cDNA	1.5

¹De la casa comercial Applied Biosystems. Contiene 5 mM de MgCl₂; 200 mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dUTP; 0.05 U/ml de DNA polimerasa AmpliTaq Gold; 0.01 U/ml AmpErase UNG

²De la casa comercial Applied Biosystems, Assay-on-Demand™, para el gen *GAPD* de expresión constitutiva. La sonda taqman se encuentra a una concentración de 5 nM y los cebadores a 18 nM.

3. PCR

Se han utilizado, según su aplicación, distintos reactivos y programas de PCR a lo largo de este trabajo, no obstante, en este apartado, se intentará presentar los protocolos más ampliamente utilizados.

3.1 Reactivos de PCR

3.1.1. *PCR convencional*

De forma general, para la realización de PCR en este trabajo se han utilizado los siguientes reactivos:

- *Polimerasa*: Principalmente se ha utilizado la enzima Taq polimerasa de la casa comercial Biotools, con una concentración de stock de 5 U/μl.
- *dNTPs*: La mezcla de los dNTPs a una concentración de 10 mM se ha preparado a partir de los stocks de cada nucleótido a 100 mM de la casa comercial Fermentas con agua bidestilada.
- *Tampón de PCR*: Principalmente se utilizó el tampón 10 X para PCR de la casa comercial Roche que ya contiene el MgCl₂ necesario para la reacción de PCR (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8.3).
- *Master mix*: Mezcla de reacción al 2 X de la casa comercial Thermo Scientific que contiene todos los reactivos necesarios para la PCR (0.05 U/μl de Taq DNA polimerasa, 0.4 mM por cada dNTP, tampón de PCR y 4 mM de MgCl₂).
- *Cebadores*: Para su diseño se utilizaron distintas herramientas accesibles en la web:

- **Primer 3**: Seleccionando las características deseadas de la pareja de cebadores (tamaño del amplificado; tamaño y T_m (temperatura de fusión) del cebador, riesgo de autocomplementación de cada cebador consigo mismo y entre ellos, etc.), se realiza una primera búsqueda de cebadores en la región deseada.

(http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)

- **NCBI Primer-BLAST**: Principalmente esta herramienta se utilizó para evaluar el riesgo de uniones inespecíficas en otras regiones del genoma, confirmando que los parámetros de calidad de los cebadores eran equivalentes a los obtenidos con el programa *Primer 3*.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

- Oligonucleotide Properties Calculator: Para evaluar el riesgo de autoapareamiento y formación de horquillas de un cebador. (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

- UCSC In-Silico PCR: Fundamentalmente para confirmar que la pareja de cebadores candidatos, además de no hibridar en otra región del genoma, no contenían ninguna SNP (*single nucleotide polymorphism*) en su secuencia que pudiera interferir en la reacción de PCR. (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>)

Algunas de estas herramientas pueden considerarse redundantes y en muchos foros se recomienda utilizar únicamente la herramienta de diseño de cebadores *Primer 3*, pero se prefirió seguir una estrategia más "manual" para controlar mejor la secuencia y la posición de los cebadores diseñados. Su síntesis, tanto de los cebadores marcados como sin marcar, se realizó en su mayoría en la casa comercial Eurofins mwg | operon, resuspendiendo con agua bidestilada a una concentración final de 50 μM . Las secuencias y características de los cebadores usados en este trabajo se encuentran en los anexos VI-VIII.

• *Dimetil sulfóxido (DMSO)*: En algunos casos donde la reacción de PCR fue problemática, se utilizó DMSO (SIGMA) a una concentración final de 4-8 % para estabilizar la estructura lineal del DNA, reduciendo la formación de estructuras secundarias en regiones de alto contenido en C/G.

Las características de las mezclas de reacción para las reacciones de PCR se encuentran resumidas en la tabla 12.

Tabla 12: Condiciones más habitualmente utilizadas en este trabajo para las reacciones de PCR.

Reactivo	$[\]_f$	Reactivo	$[\]_f$
H ₂ O	V _f 25-50 μl	H ₂ O	V _f 25-50 μl
Tampón PCR 10 X	1 X	Master Mix 2 X	1 X
dNTPs	240 μM	Cebador Directo	500 nM-1 μM
Taq polimerasa	0.1-0.05 U/ μl	Cebador Reverso	500 nM-1 μM
DNA	~2-4 ng/ μl	DNA	~2-4 ng/ μl

~: Valor aproximado; $[\]_f$: Concentración final; V_f: Volumen final.

3.1.2. *PCR para tamaños grandes*

Para la amplificación de fragmentos mayores a 1 Kb se utilizaron reactivos específicos para PCR de tamaños grandes de la casa comercial Roche (Kit Long Expand) que permiten amplificar fragmentos de hasta 20 Kb (tabla 13).

Tabla 13: Condiciones utilizadas en este trabajo para la amplificación de fragmentos con tamaño superior a 1 Kb.

Reactivo	$[\]_o$	V(μl)	$[\]_f$
H ₂ O	-	18.8	-
Tampón PCR 2 ^l	10 X	2.5	1 X
dNTP	10 mM	1.2	480 μM

Reactivo	[i]	V(μ l)	[f]
Cebador Directo	50 μ M	0.5	1 μ M
Cebador Reverso	50 μ M	0.5	1 μ M
Taq Expand polimerasa	5 U/ μ l	0.5	0.1 U/ μ l
DNA	~100 ng/ μ l	1	4 ng/ μ l

¹El Kit comercial Long Expand incluye 3 tampones distintos de PCR con distintas concentraciones de MgCl₂ y/o detergente. Para cada PCR es aconsejable probar los tres tampones para elegir aquel que tiene una eficiencia mayor, en nuestro caso, su uso el tampón 2 (27.5 mM MgCl₂ sin detergente).

[i]: Concentración inicial; [f]: Concentración final.

3.2 Programas de PCR

3.2.1. *PCR convencional*

Se han optimizado las condiciones y programas de PCR para cada caso, en función del tamaño y la secuencia del fragmento a amplificar, la T_m de los cebadores, el riesgo de uniones inespecíficas de los cebadores a otras regiones del genoma, la posibilidad de formación de dímeros de cebadores, etc. De forma general, los programas de PCR más ampliamente usados en este trabajo son:

3.2.1.1. *Programa estándar*

Desnaturalización inicial	4min	94 °C	} 32 ² ciclos
Desnaturalización	30 s	94 °C	
Hibridación	30 s	T _m - 5 °C ¹	
Elongación	30 s ³	72 °C	
Elongación final	7 min	72 °C	
	∞	4 °C	

¹Normalmente entre 55-60 °C.

²Puede variar en función de la eficiencia de la PCR.

³En función del tamaño a amplificar también puede variar.

3.2.1.2. *Programa Syn/Araf*

Utilizado ampliamente en este trabajo, con pequeñas modificaciones según el caso, como por ejemplo para la PCR de marcadores microsatélites (apartado 10 de material y métodos).

Desnaturalización inicial	4 min	94 °C	} 10 ciclos
Desnaturalización	30 s	94 °C	
Hibridación	30 s	60 °C - 0.5 °C/ciclo	
Elongación	30s	72 °C	
Desnaturalización	30 s	94 °C	} 26 ciclos
Hibridación	30 s	55 °C	
Elongación	30 s	72 °C	
Elongación final	7 min	72 °C	
	∞	4 °C	

3.2.1.3. Programa PWA

Utilizado principalmente en la PCR para el estudio de las regiones sometidas a metilación diferencial, con un paso previo de digestión (apartado 15 de material y métodos).

Desnaturalización inicial	3 min	94 °C	
Desnaturalización	40 s	96 °C	} 28 ciclos
Hibridación	1 min	60 °C	
Elongación	30 s	72 °C	
Elongación final	7 min	72 °C	
	∞	4 °C	

3.2.2. PCR para tamaños grandes

Las condiciones generalmente utilizadas para este tipo de PCR, con pequeñas modificaciones, son las siguientes.

Desnaturalización inicial	3 min	94 °C	
Desnaturalización	30 s	94 °C	} 10 ciclos
Hibridación	30 s	65 °C	
Expansión	8 min	68 °C	
Desnaturalización	30 s	94 °C	} 20 ciclos
Hibridación	30 s	65 °C	
Elongación	8 min	68 °C + 20 s/ciclo	
Elongación final	7 min	68 °C	
	∞	4 °C	

4. Electroforesis

Existen una gran variedad de tipos de electroforesis, aquí se mencionaran solo las que se han utilizado en este trabajo.

4.1 Electroforesis en gel de agarosa

Técnica utilizada principalmente para valorar la degradación del DNA genómico y el correcto funcionamiento de las PCR (amplificación del o los fragmentos del tamaño deseado, sin otras bandas de amplificación inespecífica o dímero de cebadores). Se utiliza agarosa de la casa comercial Pronadisa (Laboratorio Conda) con porcentajes que varían alrededor del 0.8-2 % en tampón TBE 1 X (preparado a partir de TBE 10 X de la casa comercial Gibco, Life Technologies). Para introducir las muestras se utiliza 1 µl de tampón de carga (Thermo Scientific 6 X). Los marcadores de pesos moleculares habitualmente utilizados en este trabajo son el de 1 Kb plus (Fermentas, 0.5 µg/µl) y el 1 Kb (Invitrogen, 1.0 µg/µl). Para revelar el gel, una vez transcurrida la electroforesis se utiliza solución de bromuro de etidio (SIGMA) al 0.5 mg/l en TBE 1 X, visualizando el resultado en un transiluminador (Bio-Rad) (tabla 14).

Tabla 14: Condiciones generales de los geles de agarosa utilizados.

Condiciones	
% agarosa	0.8-2 %
Patrón de bandas	0.5 µg 1 Kb plus (Fermentas)
	1.0 µg 1 Kb (Invitrogen)
Condiciones electroforesis	120-150 mV
Revelado	0.5 mg/l BrEt (SIGMA)

4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Esta técnica se ha utilizado principalmente para visualizar y analizar los fragmentos obtenidos tras la amplificación por PCR de marcadores microsatélite (apartado 10 de material y métodos). Los reactivos para la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida se encuentran en la tabla 15.

Tabla 15: Reactivos utilizados para la síntesis de geles de poliacrilamida.

Reactivo	[I_0]	V(µl)	[I_f]	Casa comercial
H ₂ O	-	24.6 X 10 ³	-	Agua bidestilada
Tampón TBE	10 X	5 X 10 ³	1 X	Life Technologies
Poliacrilamida ¹	30 % A/B	20 X 10 ³	12 %	Bio-Rad
Persulfato amónico	10 %	350	0.07 %	Bio-Rad
TEMED	-	17.5	0.035 %	Bio-Rad

¹Proporciones para preparar un gel al 12 % de poliacrilamida.

[I_0]: concentración inicial; [I_f]: concentración final; A/B: Acrilamida/bisacrilamida 29:1.

La electroforesis se realizó a 500-600 voltios durante 12-16 horas, dependiendo del fragmento de menor tamaño a ser resuelto por el gel. El tampón de electroforesis utilizado fue TBE 1 X (preparado a partir de TBE 10 X de la casa comercial Gibco, Life Technologies). La cantidad de muestra utilizada depende del testado en gel de agarosa, intentando ajustar las cantidades entre las distintas muestras, pipeteando un volumen de PCR entre 1-6 µl. Se utilizan 5µl de tampón de carga que contiene Xileno cianol y azul de bromofenol. Por último, como marcador de pesos moleculares se ha utilizado, al igual que en los geles de agarosa o el 1 Kb plus de Fermentas o el 1 Kb de Invitrogen.

La detección se realizó fijando primero con etanol al 10 % y oxidando con ácido nítrico al 1 %. A continuación se utilizó una solución de plata al 0.2 % y se reveló con una solución formada por carbonato sódico al 2.94 % y formaldehído al 0.2 %, parando la reacción con ácido acético al 10 % (Monfort, 2014).

4.3 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar permite una resolución mucho mayor, pudiendo diferenciarse fragmentos que difieren en un nucleótido de tamaño. Este proceso se encuentra automatizado en equipos comerciales de la casa Applied Biosystems, y el manejo de los secuenciadores se ha realizado principalmente por Silvestre Oltra, facultativo de la Unidad de Genética de este Hospital y miembro del grupo de investigación. Esta técnica se utiliza tanto para el análisis de fragmentos (PCR con algún cebador marcado o MLPA/MS-MLPAs), como para el análisis de secuencias. Además también se empleó esta técnica en el

análisis de heterodúplex (Velasco *et al.*, 2007). A lo largo de este trabajo se ha tenido acceso a distintos secuenciadores, y en función de la aplicación, se han utilizado unas características generales distintas, como el polímero o la temperatura del horno (tabla 16).

Tabla 16: Secuenciadores que se han utilizado para realizar este trabajo y sus características en función de la aplicación.

Nombre	ABI-3130	ABI-310	ABI-3500	ABI-3130xl
Nº Capilares	4	1	8	16
Longitud del capilar	50 cm	36 cm	50 cm	36 cm
Aplicación	Heterodúplex	Secuenciación		
		MLPA/MS-MLPA		
		Análisis de fragmentos		
Polímero	CAP modificado ¹	POP-7		
Temperatura del horno	19 °C	60 °C		

¹La composición del polímero CAP modificado consiste en 5.5 % de polímero CAP comercial (0.9 % POP CAP (Applied Biosystems) y 5 % glycerol en TBE 1 X).

La preparación de las muestras en función de la aplicación, se realizó con los volúmenes de reactivos indicados en la tabla 17. Excepto para los heterodúplex, las muestras se desnaturalizaron a 95 °C 5 min bajando a continuación la temperatura a 4 °C, para después introducir las en el secuenciador y proceder a su análisis. Para el análisis de heterodúplex el tiempo y voltaje de inyección fueron de 22 s y 1.6 kV respectivamente. Para el resto de aplicaciones se utilizaron las condiciones estándar de inyección según el aparato.

Tabla 17: Características en la preparación de las muestras para su resolución por electroforesis capilar.

Aplicación	Heterodúplex	MLPA	Análisis de fragmentos	secuenciación
V formamida ¹ (µl)	-	12		
V agua ² (µl)	22	-		
Marcador	500-ROX			-
V marcador (µl)	1	0.5	-	
V muestra (µl)	2	1	<i>pellet</i>	

¹La formamida (Applied Biosystems) se utiliza en la electroforesis como agente desnaturalizante.

²Para el análisis de los heterodúplex con electroforesis capilar se utiliza, en vez de formamida, agua, para permitir que se forme la estructura secundaria que da lugar a los heterodúplex (apartado 13 de material y métodos).

Los resultados de las secuencias se visualizan y preanalizan con el programa Sequencing Analysis, y para el resto de aplicaciones se utiliza el programa GeneMapper®, ambos de la casa Applied Biosystems, exportándose los archivos pertinentes para su posterior análisis.

5. Reacción de secuenciación

Para la identificación de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones o duplicaciones se utilizó la técnica de secuenciación basada en la reacción de secuenciación de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Para eliminar el exceso de dNTPs y cebadores de la mezcla de reacción de la PCR a secuenciar, que interferirían en la reacción de secuenciación, ha de realizarse un paso previo de purificación que consiste en tratar la mezcla con Exonucleasa I, que degrada la cadena sencilla de DNA (cebadores) y fosfatasa alcalina, que hidroliza los dNTPs. Para ello, se prepara por cada muestra a secuenciar, una mezcla de 8 μ l de producto de PCR y 2 μ l de EXOSAP (mezcla de exonucleasa I y fosfatasa alcalina de gamba de la casa comercial Amersham) Esta mezcla se incuba 15 min a 37 °C para que actúen las enzimas, seguido de 15 min a 80 °C para inactivarlas.

Para cada reacción de secuenciación se prepara la mezcla de reacción indicada en la tabla 18.

Tabla18: Mezcla para la reacción de secuenciación.

Reactivo	[I_0]	V(μ l)	[I_f]	Casa comercial
H ₂ O	-	9.5	-	-
Tampón secuenciación	5 X	4	1 X	Applied Biosystems
Kit Big Dye Terminator v1.1 cycle ¹		0.5		Applied Biosystems
Cebador	3 μ M	1		Eurofins mwg operon
Mezcla de EXOSAP y PCR	-	5		-

¹Mezcla que contiene los reactivos necesarios para la reacción de secuenciación: polimerasa, dNTPs y ddNTPs marcados con distintos fluorocromos.

[I_0]: concentración inicial; [I_f]: concentración final.

El programa de secuenciación utilizado es el indicado a continuación.

3 min	94 °C	} 30 ¹ ciclos
10 s	96 °C	
6 s	50 °C	
4 min	60 °C	
∞	4 °C	

¹El número de ciclos puede variar en función de la calidad de la PCR inicial y el tamaño del fragmento a secuenciar.

Finalmente, antes de resolver las secuencias por electroforesis capilar (apartado 4.3 de material y métodos) ha de purificarse la reacción de secuenciación por precipitación con etanol (65 % de etanol absoluto) en medio salino (10 % de acetato sódico 3 M; pH 5.2) a temperatura ambiente.

Las secuencias obtenidas se alinean y analizan con el programa Sequencher 4.8 (Genes Code Corporation).

6. CGH-array de oligonucleótidos

El CGH-array (hibridación genómica comparada sobre arrays de DNA) es una técnica de rastreo de todo el genoma en búsqueda de alteraciones en número de copias (ganancias y pérdidas). Esta técnica se basa en la hibridación competitiva de DNA del paciente (muestra problema) frente a un DNA de referencia (muestra control) sobre una matriz donde se encuentran fijados fragmentos de DNA de secuencia y localización genómica conocida. En este trabajo se ha utilizado tanto un array comercial como uno de diseño propio específico para el estudio de la DI y los TEA, realizándose el análisis de los resultados por todo el grupo de investigación.

6.1 CGH-array comercial

Se ha empleado el array comercial 4X44K, G4426B de la casa Agilent Technologies. Este array se aplicó a 241 muestras de los pacientes y algunos de los resultados obtenidos forman parte de las tesis de la Dra. Sandra Monfort (2014) y la Dra. Mónica Roselló (2014) donde se valoran aspectos técnicos y clínicos respectivamente. Las características generales de este array son las siguientes:

El formato del cristal de 4X44K implica que cada cristal contiene cuatro microarrays de 44K idénticos, con lo que se pueden analizar 4 muestras distintas a la vez.

La síntesis de los cristales se realiza mediante la tecnología SurePrint de Agilent, basada en un proceso de impresión por inyección que permite sintetizar las sondas directamente en el cristal. Es un proceso mecánico, secuencial y cíclico que activa o bloquea cada punto según el nucleótido que se desee introducir en cada sonda y posición determinada (figura 22).

Contiene más de 43000 sondas (44K) de oligonucleótidos de 60 bases.

El espacio medio entre dos sondas es de 43 Kb, con una resolución entre 50 y 150 Kb.

Cubre tanto regiones codificantes como no codificantes del genoma humano, con una mayor representación de las primeras.

Todos los genes bien caracterizados están representados por más de una sonda. Este diseño contiene 2118 sondas *grid* que sirven de referencia para asignar cada punto y señal a la sonda que le corresponde, y por tanto a su secuencia específica.

Además, incluye 301 sondas replicadas cinco veces en distintas posiciones del cristal para poder valorar la repetibilidad de los resultados.

Se puede acceder a la información detallada de las sondas utilizadas y genes en los que se encuentran, tanto en la página web de la casa comercial (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) con el número de diseño 014950, como en la base de datos GEO con el código de acceso GPL5477 que corresponde a este diseño de array.

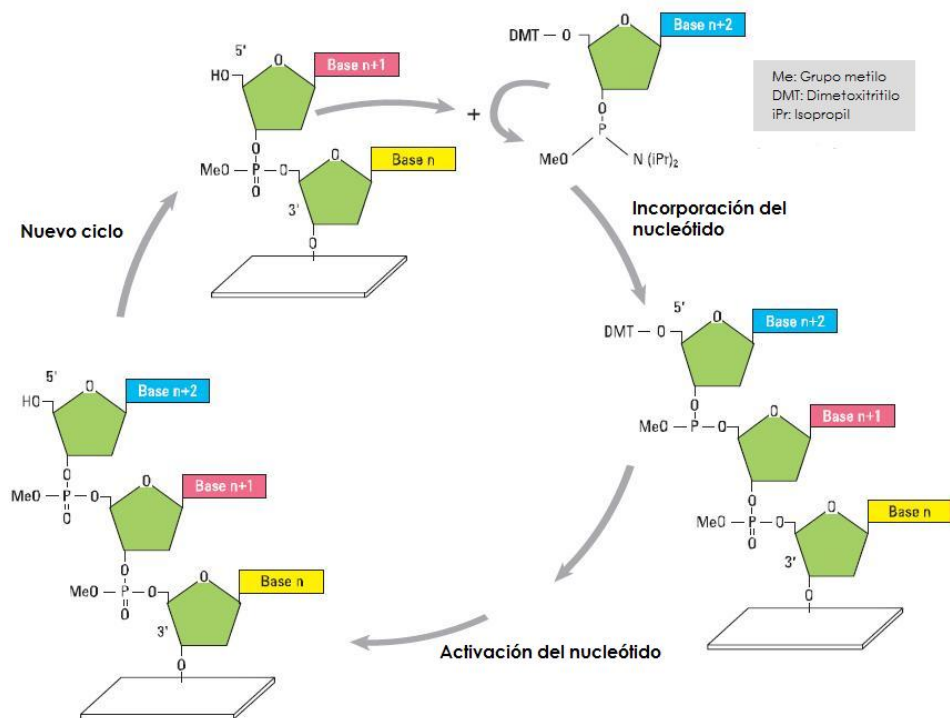


Figura 22: Representación esquemática del proceso de síntesis de sondas para CGH-array con la tecnología SurePrint. Imagen modificada del catálogo de Agilent SurePrint Technology.

Aunque la versión del mapa genético de este array es la Hg18 (NCBI36) para homogeneizar los resultados, en este trabajo, como ya se ha comentado, los datos que se presentarán estarán referidos al mapa genético Hg19 (NCBI37), convirtiendo todos los valores de posiciones cromosómicas obtenidos con este diseño a este mapa, utilizando para ello la herramienta de conversión disponible en el UCSC (<http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>).

6.2 CGH-array de diseño propio

Para el estudio específico de los trastornos del neurodesarrollo, se realizó un diseño propio de un array de alta resolución. Se eligió la plataforma de Agilent Technologies, ya que, por un lado, nuestro grupo tenía experiencia con los arrays comerciales de esta casa, y por otro, disponen de más de 8 millones de sondas prediseñadas recogidas en una base de datos que facilita el diseño “a la carta” del array deseado utilizando la herramienta online.

(<https://earray.chem.agilent.com/earray/>)

Se seleccionaron genes o *loci* que pudieran estar implicados en la etiología de los trastornos del neurodesarrollo utilizando los siguientes criterios:

Candidatos funcionales: *loci* conocidos, elementos clave de la maquinaria epigenética, con implicación y relevancia demostrada en el desarrollo y funcionamiento del SNC así como nuevos genes o *loci* candidatos de trastornos

del neurodesarrollo por cambio de dosis, alteraciones estructurales o de secuencia:

- Genes y *loci* sometidos a impronta.
- Genes implicados en la remodelación de la cromatina, que incluyen:

DNA metiltransferasas.

Genes que codifican para proteínas de unión a DNA metilado.

Genes que codifican para proteínas que participan en la modificación de histonas: acetilación, desacetilación, metilación, desmetilación, ubiquitinación, desubiquitinación, fosforilación.

RNAs no codificantes: miRNA, snoRNAs, etc.

Enzimas de editado del RNA.

- Genes candidatos de trastornos del neurodesarrollo como DI o TEA según distintas fuentes (bibliografía y/o bases de datos).

Candidatos posicionales:

- Localizados en regiones con reordenamientos detectados en diferentes series publicadas de pacientes con trastorno del neurodesarrollo.
- Localizados en reordenamientos detectados en nuestra propia serie de pacientes con estudios previos.

Candidatos patológicos: Genes causantes de síndromes conocidos que cursan con DI o TEA.

Elementos reguladores:

- UCEs (*ultra-conserved elements*): Elementos altamente conservados susceptibles de contener elementos reguladores en *cis* de la transcripción (Bejerano *et al.*, 2004).

- Regiones promotoras y flanqueantes susceptibles de contener elementos potenciadores y silenciadores de la transcripción.

La información para el diseño y selección de genes y regiones se obtuvo a partir de las diversas bases de datos como Gene, UNIGene, miRBase, Gene Ontology y Pubmed entre otras (apartado 16 de material y métodos). A lo largo de este trabajo se fueron realizando mejoras al diseño original, utilizando 4 versiones distintas del array con las que se estudiaron 190 pacientes. Las características generales de las distintas versiones del array se encuentran en la tabla 19.

Para la selección de sondas exónicas, se introdujo como criterio de búsqueda el nombre de los genes, restringiendo la búsqueda a regiones exónicas y acotando el número final de sondas. En el primer diseño, se clasificaron los genes en alta prioridad (genes patológicos y algunos candidatos funcionales y posicionales seleccionados) o baja prioridad (el resto), obteniéndose, en los genes de alta prioridad, aproximadamente el doble de sondas promedio respecto a los genes de baja prioridad (145 y 76 respectivamente). A partir de la versión 2 no se hizo esta distinción entre los genes seleccionados, y además se incluyeron 25 regiones no exónicas altamente conservadas de cuatro genes de alto interés (*MECP2; NIPBL; RPS6KA3; RAI1*) con una distribución de 2-3 sondas por región. En la última versión del array, dado el cambio de formato que permitía ampliar el número de sondas del diseño en casi 20000, se añadieron 1162 genes considerados de baja prioridad, con funciones epigenéticas o de interés pero sin asociación conocida con la DI, o de la misma familia que otros genes

candidatos, entre otros criterios. Estas regiones se definieron con un mínimo de 1 sonda y un máximo de 5. Además, en esta última versión se introdujeron sondas exónicas comprendidas en la región 16p11.2 asociada a autismo.

Tabla 19: Resumen de los parámetros que definen los distintos diseños del array a la carta.

Parámetros del diseño	Versión 1	Versión 2	Versión 3	Versión 4
Formato	4X44K			8X60K
Total de genes	364	420	430	453+1162¹
% genes epigenéticos	15.9	18.1	18.1	19.4
Genes funcionales	165	190	192	197+1162 ¹
Genes posicionales	102	122	125	137
Genes patológicos	97	108	113	119
miRNAs	492	808		
UCEs	481			
Total de sondas cristal	45220			62976
Total de sondas seleccionadas	43090	42933	42940	54450
Sondas exónicas	35174	35125	35132	35710+1248 ¹
Resolución exones	24 pb	29 pb	29 pb	31 pb
Sondas genómicas	5983	5992		15658
Resolución array	398 Kb	378 Kb	377 Kb	156 Kb
Sondas región promotora	581	127		145
Sondas miRNA	444	781		
Sondas UCE	908			
Sondas triplicadas	301^{2a}	81 (miRNAs)		1689 (UCEs+miRNAs)
Sondas control (grid)	1227^{2b}	2118^{2c}		3886^{2d}
Sondas normalización	-			1262^{2e}

¹Genes de baja prioridad, con menor densidad de sondas que el resto (1-5 sondas/gen).

²Sondas proporcionadas por Agilent, sin ser de nuestro grupo de sondas seleccionadas.

^aHuman CGH 300 Agilent Replicate Probe Group.

^bIS-45220-4-V1_4x44K_CGH_Genomic_V20061025.

^cIS-45220-4-V1_4x44K_CGH_Hs_V20060724.

^dIS-62976-8-V2_8by60K_CGH_Hs_20080925.

^eHuman_CGH_1k_Agilent Normalization Probe Group.

Para la selección de las sondas genómicas se definió un número fijo de sondas (6000 para las versiones 1 a 3 y 16000 para la última versión) a lo largo de todo el genoma, sin incluir al cromosoma Y.

Para la selección de sondas localizadas en la región promotora, se siguieron dos criterios diferentes. Para la versión 1, se seleccionaron 172 regiones promotoras de un tamaño mínimo de 100 pb con islas CpGs, utilizando como criterio de selección que la separación promedio entre sondas fuera de 150 pb, sin utilizar ningún criterio de exclusión. Se obtuvieron un promedio de 3 sondas por región, pero al analizar los datos en conjunto, se observó que muchas de estas sondas solapaban con las sondas exónicas de estos genes, por lo que en versiones posteriores se modificaron estos criterios. Para las versiones 2 a 4 se buscaron las sondas en región promotora en base al nombre del gen y no a su posición cromosómica, para evitar sobrerepresentación de regiones debido a procesamiento alternativo. Se consideró como región promotora de forma arbitraria la contenida en las 500 pb *upstream*, excluyendo regiones de mRNAs para evitar solapamientos, y utilizando como criterio de selección un máximo de 5 sondas por cada región. Pese a que con estos criterios el número de sondas, y por ende, de regiones promotoras estudiadas con este diseño era menor, con un promedio menor a una sonda por región, se prefirió utilizar estos criterios de búsqueda más restrictivos y no centrados únicamente en islas CpG.

Para la selección de sondas de los miRNAs, se utilizó el intervalo genómico de los mismos, ampliando la región de búsqueda 70 pb a cada lado de los miRNA. El listado de miRNAs se obtuvo de la base de datos miRBase (apartado 16.6 de material y métodos) que para la versión 1 del array estaba formado por 541 miRNA y para las siguientes versiones por 948. Se intentó obtener una sonda por intervalo, aun teniendo en cuenta que algunos miRNAs se encuentran formando clusters, y una misma sonda podía cubrir más de uno, el porcentaje de los miRNAs seleccionados cubierto por nuestro array es de un 91 % en la versión 1 y 85 % en las otras versiones.

Para la selección de sondas localizadas en los elementos ultraconservados, se realizó la búsqueda con el intervalo genómico de los mismos, definido en Berjerano *et al.* (2004), utilizando como criterio de selección la obtención de 2 sondas por intervalo.

Posteriormente se unificaron todas las sondas seleccionadas de un mismo diseño, para eliminar duplicidades, ya que en algunos casos una misma sonda se podía haber seleccionado con más de un criterio, y se ajustó el número final de sondas eliminando aquellas que estaban más imbricadas. En versiones posteriores, se eliminaron también aquellas sondas que habían dado resultados considerados de artefactuales, por aparecer alterados tanto por pérdida como por ganancia en la mayoría de pacientes y controles (padres).

Como sondas triplicadas, en una primera versión se utilizaron las proporcionadas por la casa comercial, pero en versiones posteriores se seleccionaron como sondas a triplicar, por un lado, 81 sondas de miRNAs (versión 2 y 3), o por otro, el total de sondas miRNAs y UCEs (versión 4) para optimizar los recursos del array y poder valorar mejor esas regiones, que se encuentran solo representadas por una o dos sondas. Además se utilizaron distintas sondas control proporcionadas por Agilent (tabla 19).

En el diseño del array no se utilizó el filtro de exclusión de sondas para regiones catalogadas de CNV ya que se comprobó que utilizando ese filtro se

eliminaban *loci* de interés. Esto se explicaría si en la selección de CNVs se han utilizado también aquellas definidas con arrays de BACs, que abarcan amplias regiones, y que en revisiones posteriores de la *Database of Genomic Variants* se han ido corrigiendo y eliminando.

Para ver información más detallada de los criterios para la selección de sondas, así como los genes o *loci* incluidos en el array, consultar el anexo III.

6.3 Protocolo de hibridación y escaneo

La hibridación y escaneo de los arrays se realizaron en laboratorios externos por no disponer en nuestro laboratorio del equipamiento necesario. Los arrays comerciales se procesaron en el Servicio de Análisis de Microarrays del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), mientras que los arrays de diseño propio comenzaron a procesarse en ese centro pero, a partir de la tercera versión del array, este proceso se realizó en Quantitative Genomic Medicine Laboratories SL (qGenomics) en Barcelona. El protocolo utilizado es el descrito por la casa comercial Agilent Technologies (G4410-90010). La hibridación de los arrays procesados en el Servicio de Análisis de Microarrays del CIPF se realizó en base a la versión 5.0 del manual (Junio de 2007); mientras que para los arrays procesados por qGenomics se utilizó la versión 7.1 (diciembre de 2011). Este protocolo consta de distintas fases, que de forma general se describen a continuación.

6.3.1. Preparación de las muestras

Antes del envío de las muestras, todas fueron analizadas mediante un gel de agarosa al 0.8-1 % para valorar la integridad del DNA, ya que si está muy fragmentado puede interferir en el resultado del array y dar muchos resultados artefactuales. De cada muestra, se prepararon entre 2 y 4 µg de DNA a una concentración aproximada de 100 ng/µl.

6.3.2. Marcaje

A grandes rasgos, en esta parte del proceso, la muestra problema y control son primero fragmentadas mediante digestión enzimática, para posteriormente ser marcadas cada una con un fluorocromos distinto, Cy5 (rojo) y Cy3 (verde). Como control, para las muestras de los pacientes, se ha usado una mezcla equimolecular de muestras de referencia de nuestra población (11 muestras del mismo género para los arrays comerciales y para los arrays de diseño propio muestra de 36 varones o 37 mujeres, según el género del paciente); mientras que para el estudio de los progenitores, el DNA procedente del padre se hibridó frente a la muestra de la madre.

6.3.3. Hibridación

De forma general, las muestras marcadas son hibridadas con el cristal, produciéndose una unión específica entre la secuencia de la sonda y la secuencia complementaria que se encuentra presente en la mezcla equimolecular de DNA problema y control, de tal manera que se produce una competencia por la unión a la sonda entre ambas. Para eliminar el exceso de DNA marcado que no ha hibridado específicamente a alguna de las secuencias de las sondas unidas al cristal se realizan varios lavados.

6.3.4. Escaneo

Finalmente, con la ayuda de un láser, se detecta la señal de cada fluorocromo en cada punto del cristal donde se encuentra una sonda distinta y se establece una correlación entre ambas señales.

Si la dosis génica en ambas muestras es la misma, se unirán de forma equivalente y tendremos una señal intermedia (amarillo). Si en esa región genómica la muestra problema presenta una disminución de dosis génica, la cantidad de fragmentos de DNA problema serán menores que la de referencia, produciéndose una disminución en la señal de ésta respecto la señal de la muestra control. Por el contrario, si en esa región genómica la muestra problema presenta un aumento de dosis génica, la cantidad de fragmentos de DNA problema será mayor que la de referencia, produciéndose un aumento en la señal de la muestra del paciente respecto a la señal de la muestra control.

Los valores de intensidad obtenidos de ambos fluorocromos, tras el escaneo, son procesados bioinformáticamente usando el programa DNA Analytics 4.0 de Agilent Technologies. Se calcula entre otras cosas, la razón logarítmica entre ambas señales en base 2 (LogRatio), ya que sigue una distribución normal. De esta forma se obtiene el archivo FE (*feature extracion*) que contiene los resultados del array de cada muestra y la información necesaria para su análisis.

6.4 **Análisis de los resultados**

En este trabajo, el programa de análisis utilizado fue el Workbench 7.0 (Agilent Technologies).

Para poder visualizar los resultados, se ha de indicar en el programa tanto el diseño del array como el archivo de los resultados FE. Además, al importar los FE, es importante tener en cuenta que ha de indicarse qué fluorocromo se ha utilizado para marcar la muestra problema, y cual para la muestra control, ya que si este dato se introduce erróneamente, el signo del LogRatio estaría invertido, y las deleciones se mostrarían como duplicaciones y viceversa. En nuestro caso, en los arrays procesados en el Servicio de Análisis de Microarrays del CIPF, la muestra problema o de los progenitores varones se marcaba con Cy3 y la muestra control o de las madres con Cy5 (indicándose en el programa como polaridad -1); mientras que en los arrays procesados por qGenomics el marcaje fue a la inversa (teniendo entonces el parámetro de polaridad un valor de 1).

El programa Workbench permite elegir distintos parámetros de preprocesamiento y análisis, mostrando los resultados de los LogRatios de cada sonda y las regiones alteradas según el filtro de alteraciones especificado por el usuario. A continuación se detallará los criterios utilizados para el análisis de resultados en nuestro caso.

6.4.1. Parámetros de preprocesamiento

6.4.1.1. *Centralización*

Consiste en normalizar los resultados, asignando el valor de LogRatio 0 a la dosis normal. En este trabajo se han utilizado dos métodos de centralización:

- Centralización clásica (*legacy*): Teniendo en cuenta que los valores de LogRatio obtenidos en un CGH-array se distribuyen en picos de frecuencias

(figura 23); el algoritmo de centralización clásica, en vez de utilizar el promedio del LogRatio para normalizar su valor a 0, busca la adición o sustracción de una misma constante a todos los valores de LogRatio, de forma que el pico de frecuencia de LogRatio mayor se normaliza para tener un valor de 0. De esta forma se evita que en aquellos casos en los que las alteraciones en número de copia son grandes o numerosas la centralización se encuentre desplazada. Esta estrategia se empleó en el análisis de los arrays comerciales.

- Centralización de pico diploide: Este algoritmo es muy similar al anterior y persigue el mismo propósito, pero en este caso no necesariamente se normaliza respecto al pico más frecuente sino respecto al que corresponde a la dosis 2. Este tipo de normalización es especialmente útil para muestras tumorales con una gran variabilidad de número de copias. Aunque el tipo de muestras con las que trabajamos en principio no cumplen estos criterios, por lo que sería equivalente utilizar el algoritmo de centralización clásica, decidimos aplicar en el estudio de los arrays de diseño propio el algoritmo de centralización de pico diploide por considerarlo más robusto.

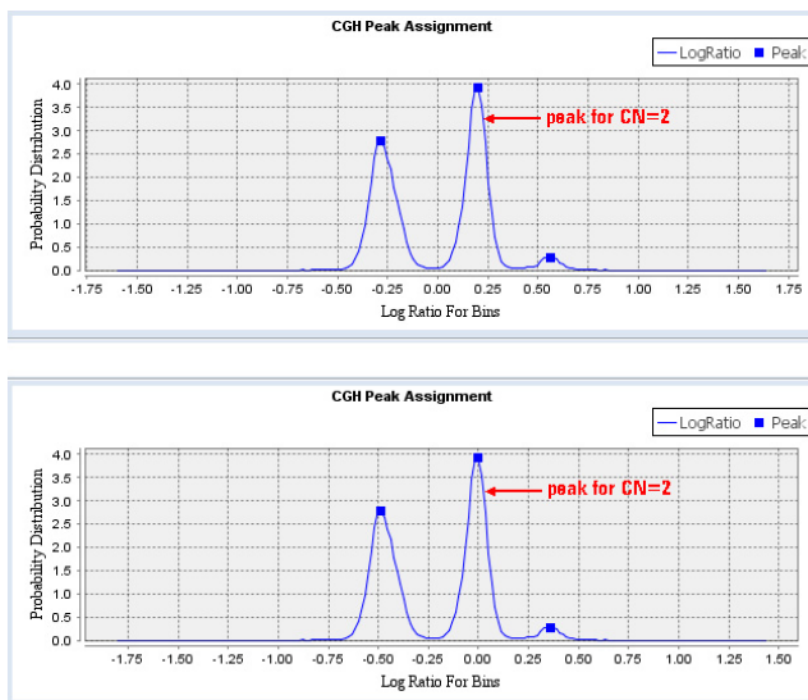


Figura 23: Ejemplo de la aplicación de un método de centralización. Representación de los valores de LogRatio de un CGH-array antes (arriba) y después de la centralización (abajo). Imagen obtenida del catálogo de Applied Biosystems G3800-90042 CGH Interactive Análisis (Agilent Genomic Workbench 7.0).

6.4.1.2. Corrección GC

En los arrays de oligos se ha observado la aparición de un artefacto técnico que consiste en la ondulación de la señal de LogRatio en función del contenido de G/C local de las regiones genómicas donde se localizan las sondas. Aunque la

causa exacta de este artefacto no se conoce, si no se corrige puede interferir con los algoritmos de detección de alteraciones, llevando a conclusiones erróneas en el análisis. La corrección GC utiliza un algoritmo para corregir las variaciones de LogRatio correlacionadas con el contenido de G/C de la región. Para aplicar este algoritmo, ha de especificarse el tamaño de la región que rodea a la sonda donde se valorará el contenido de G/C. En nuestro caso se utilizó una región de 2 Kb, que dentro de las que permite el análisis es la de menor tamaño y la establecida de forma predeterminada. Este algoritmo se aplicó a todos los arrays analizados.

6.4.1.3. Replicados intra-array

Con esta herramienta las sondas que se encuentran replicadas en el diseño del array se combinan dando un único valor. Para calcular este valor se tiene en cuenta el error de cada una de las sondas replicadas asignándole un peso inversamente proporcional a ese error, y multiplicando el valor de su LogRatio por el valor del peso. De esta forma en nuestro análisis aunque la sonda se encuentre replicada (5 veces en el array comercial y 3 en el de diseño propio), en el análisis se contará como si se tratara de una única sonda. No obstante, especialmente en el análisis de miRNAs y UCEs del array de diseño propio, una vez aplicado el filtro de análisis, en las sondas alteradas que se encuentran replicadas, se puede evaluar los valores de LogRatio de forma individualizada para valorar si es una alteración real o se trata de un artefacto producido por alguno de los replicados.

6.4.2. Parámetros de análisis

6.4.2.1. Algoritmo de detección de aberraciones

Se trata de la aplicación de logaritmos basados en tratamientos estadísticos para la detección de las aberraciones. En nuestro trabajo se han utilizado los siguientes:

- Z-Score: método rápido de detección de aberraciones, evalúa un intervalo de tamaño fijo determinado por el operador (Kb/Mb o puntos) que en nuestro caso se trataba de (3 puntos), desplazándolo a lo largo de todo el genoma, por lo que en función de la posición estará evaluando más o menos sondas. Este algoritmo se utilizó para un rastreo preliminar de alteraciones e inicialmente en el análisis de los arrays comerciales.

- ADM-1: Este algoritmo no analiza un intervalo de tamaño fijo, sino que evalúa posibles alteraciones en función de su valor promedio de LogRatio y el número de sondas que lo componen en función de un valor umbral proporcionado por el operador, que en nuestro caso era de 6 (valor por defecto del programa). Se aplicó en los arrays comerciales para reevaluar los resultados y valorar la presencia de posibles mosaicismos.

- ADM-2: Es similar al algoritmo ADM-1 pero además tiene en cuenta la calidad de las sondas, ya que hay sondas más robustas y otras cuyos valores tienen una mayor fluctuación incluso en muestras con dosis normales. Este algoritmo se utilizó para el análisis de los arrays de diseño propio.

6.4.2.2. "Fuzzy Zero"

El algoritmo ADM-2 trata los errores de las sondas como independiente, aunque a menudo estos errores se correlacionan a lo largo de amplios intervalos genómicos. Regiones amplias con LogRatios promedio bajos están, por lo tanto, en muchos casos erróneamente consideradas como significativas,

especialmente en muestras de peor calidad o donde había una mayor variabilidad de señal. El algoritmo de "Fuzzy Zero" tiene en cuenta esta fuente de error del valor del LogRatio, eliminando del registro muchas de las alteraciones que sin este filtro, tras ser revisadas, se consideraron artefactuales. Por ello, se decidió aplicar el algoritmo de "Fuzzy Zero" al análisis de todos los arrays de diseño propio, asumiendo que podríamos perder alguna alteración real, pero reduciendo el número de alteraciones artefactuales, especialmente en aquellas muestras que dieron un resultado de peor calidad, con un rango de valores LogRatio más amplio (dispersión de los puntos mayor).

6.4.2.3. Filtro de aberraciones

Para considerar posibles variantes de dosis (de ganancia o de pérdida) el operador puede establecer los criterios que considere. En nuestro caso se establecieron distintos criterios para los dos arrays:

- Array comercial: dos o más oligonucleótidos consecutivos fuera del rango considerado dentro de la normalidad ($\text{LogRatio} \pm 0.5$).
- Array de diseño propio:
 - . Para todas las sondas: dos o más oligonucleótidos consecutivos fuera del rango considerado dentro de la normalidad ($\text{LogRatio} \pm 0.399$).
 - . Para las sondas específicas de UCEs o de miRNAs: Primero se aplicó un filtro personalizado para estudiar solo las sondas diseñadas para esas regiones. Después se consideró alterada si una sonda o más tenían un valor de LogRatio igual o superior a 0.7 para las duplicaciones e igual o inferior a -0.8 para las deleciones.

Una vez aplicados estos filtros, cada una de las alteraciones se analizó de forma manual, comparando los resultados de esas sondas en todas las muestras de la misma tanda, para valorar si se trataba de una CNV frecuente o de una sonda poco fiable con valores muy fluctuantes que diera una alteración artefactual.

También se realizó una búsqueda de alteraciones mediante la visualización de los valores de la sondas en la representación cromosómica, ampliando y revisando en la representación más detallada de los genes aquellas regiones no señaladas pero susceptibles de indicar una posible alteración (apartado siguiente de la representación de los resultados).

6.4.3. Representación de los resultados

Una vez seleccionados los distintos parámetros de preprocesamiento y análisis, se pueden visualizar los resultados. Para ello, el programa Workbench, al igual que la mayoría de este tipo de programas, presenta un formato determinado de representación de los resultados, distinguiéndose en él distintas aproximaciones a los valores obtenidos (figura 24):

- **Representación genómica:** Indica en que cromosoma nos encontramos.
- **Representación cromosómica:** Muestra todas las sondas dentro de un mismo cromosoma.
- **Representación génica:** Resalta los valores de LogRatio de una región cromosómica concreta, seleccionada por el operador.
- **Tabla de resultados:** Presenta, en formato tabla, la posición cromosómica y el valor de LogRatio de cada sonda en cada una de las muestras.

Además, el programa permite visualizar no solo el valor de LogRatio, sino también el valor de fluorescencia de cada uno de los fluorocromos.

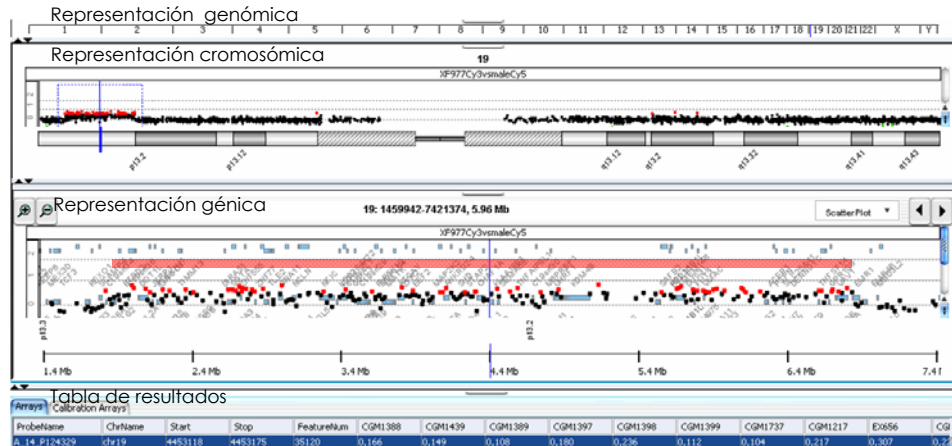


Figura 24: Ejemplo de las distintas representaciones que ofrece el programa Workbench para la visualización de los resultados del CGH-array.

El análisis de los resultados de los CGH-arrays se realizó por todo el grupo investigador, y todas las alteraciones susceptibles de ser reales se estudiaron revisando la información disponible en ese momento en las distintas bases de datos y publicaciones científicas (apartado 16 de material y métodos).

Además, la mayoría de las alteraciones detectada por CGH-array han sido confirmadas por técnicas alternativas que permitan evaluar a la vez si se trata de una alteración *de novo* o heredada. En función del tamaño de la región alterada y de las herramientas disponibles para el estudio de cada región, se han usado distintas técnicas como son los marcadores microsatelites, FISH, MLPA, qPCR y secuenciación, que se encuentran desarrolladas en los siguientes apartados.

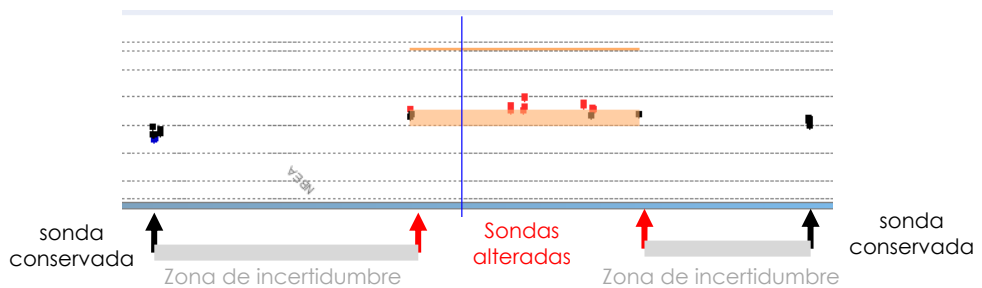


Figura 25: Ejemplo que representa los valores de las sondas recogidas en una alteración detectada por CGH-array.

En un principio, solo se recogía la posición inicial y final que delimitaba la mínima región alterada, sin tener en cuenta la zona de incertidumbre donde se encuentra el punto de rotura, que se localiza entre la última sonda conservada

y la primera alterada. Posteriormente, como parte del trabajo de esta tesis, se volvió a revisar todas las alteraciones registradas como reales en la base de datos del grupo de investigación para recoger las posiciones flanqueantes de las alteraciones que delimitan la zona de incertidumbre que contiene el punto de rotura (figura 25).

7. FISH

La técnica de FISH, basada en la utilización de una sonda de DNA marcada, específica de una región de interés, y su hibridación sobre una extensión de células en metafase, nos permite confirmar ganancias o pérdidas que contengan dicha región en el paciente, además de valorar en sus progenitores si son portadores de la alteración en si, o presentan un reordenamiento cromosómico equilibrado transmitido de forma desequilibrada al paciente, como una translocación.

Esta parte del trabajo fue realizada y supervisada principalmente por la Dra. Monfort como parte de su tesis doctoral (Monfort, 2014). Las células en metafase se obtienen a partir de una muestra de sangre periférica recogida en heparina sódica al 10 %, y tras un cultivo de 72 horas, se sacrifican y procesan siguiendo protocolos estándar de citogenética (Verma y Babu, 1989).

Las sondas utilizadas fueron principalmente comerciales tanto de la casa Abbott Molecular (Vysis) como de Cytocell Technologies, en su mayoría teloméricas, aunque también se disponía de sondas específicas de *locus* y centroméricas. Además, se obtuvieron distintas sondas específicas de *locus* partiendo de BACs obtenidos del instituto CHORI (anexo IV). El protocolo utilizado para la obtención de sondas marcadas a partir del cultivo, marcaje y purificación de BACs es el descrito en la tesis doctoral de la Dra. Monfort (2014).

Por último, el protocolo de hibridación utilizado fue el recomendado por el fabricante de las sondas con pequeñas modificaciones (Monfort, 2014).

8. MLPA

Esta técnica, representada en la figura 26, se basa en la amplificación múltiple por PCR, permite valorar cambios de dosis en varias regiones distintas simultáneamente, y ha sido aplicada por todos los miembros del grupo de investigación. Las distintas mezclas de sondas utilizadas en este trabajo son comerciales y se encuentran en el anexo V. El protocolo y los reactivos utilizados han sido los recomendados por el fabricante (MRC-Holland; <http://www.mrc-holland.com>).

Los resultados obtenidos han sido analizados principalmente en una hoja de cálculo (Microsoft Excel). La intensidad de la señal de cada sonda (área de los picos) se divide por la suma de la intensidad de señal de todas las sondas de cada muestra (intensidad relativa). Posteriormente, cada valor obtenido se normaliza dividiéndolo por el valor correspondiente obtenido en la muestra o promedio de muestras control (dosis normal de referencia). Los valores obtenidos se clasifican en los siguientes rangos:

- Valores en el rango 0.8-1.2: se consideraron indicativos de una dosis normal.
- Valores inferiores a 0.8: se consideraron indicativos de una dosis disminuida (deleción).

- Valores superiores a 1.2: se consideraron indicativos de una dosis aumentada (duplicación).

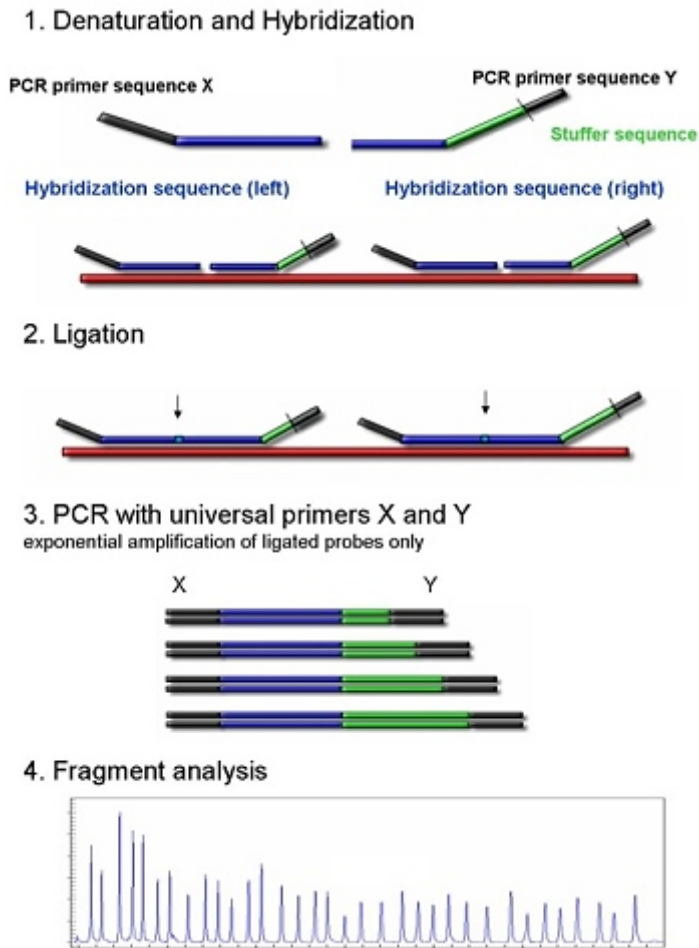


Figura 26: Representación del fundamento de la técnica MLPA. Imagen obtenida de la página web de la casa comercial MRC-Holland (<http://www.mrc-holland.com>).

9. MS-MLPA

La técnica de MS-MLPA es una variación del MLPA convencional que no solo permite analizar variaciones de dosis, sino también de metilación (figura 27). En este trabajo se utiliza principalmente como prueba confirmatoria en el estudio de metilación y dosis en los genes sometidos a impronta *H19*, *KCNQ1OT1* (SALSA ME-030) y *SNRPN* (SALSA ME-028) (apartado 15 de material y métodos). Al igual que en el MLPA convencional, el protocolo y los reactivos utilizados han sido los recomendados por el fabricante (MRC-Holland). La diferencia principal con el MLPA convencional es que, además de estudiar los cambios de dosis total, se prepara en paralelo una segunda alícuota por muestra que, en el paso de

ligación, es digerida con una enzima sensible a metilación (HhaI), de tal forma que solo se amplificará, en los fragmentos que contienen un sitio de corte reconocido por la enzima (CGCG), aquellas secuencias metiladas que no son digeridas.

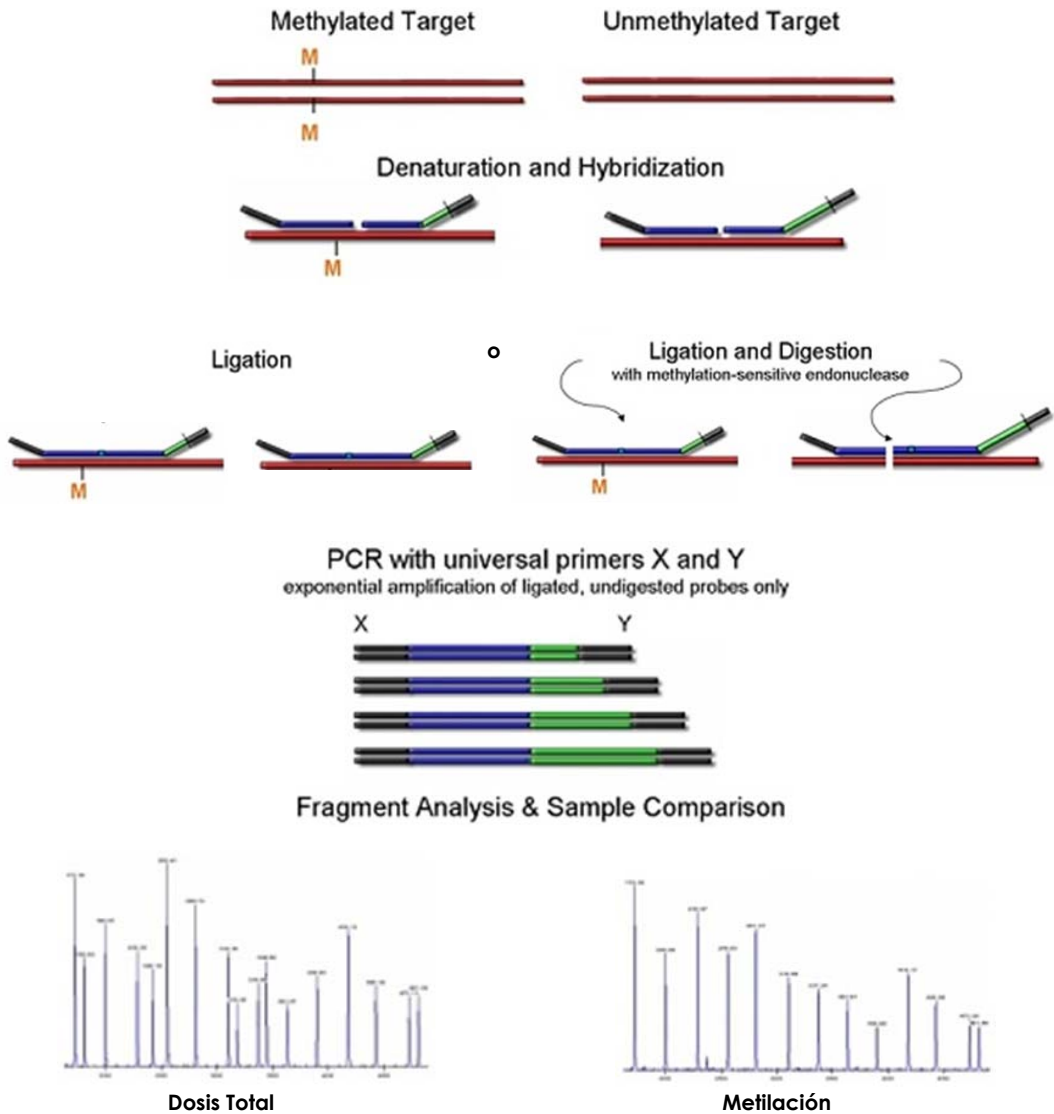


Figura 27: Representación del fundamento de la técnica MS-MLPA. Imagen modificada de la página web de la casa comercial MRC-Holland (<http://www.mrc-holland.com>)

Los resultados obtenidos también han sido analizados principalmente en una hoja de cálculo (Microsoft Excel). Los valores obtenidos de la alícuota no digerida nos darán valores de cambio de dosis total, al igual que el MLPA convencional, y se analizan, pues, de forma análoga. La alícuota digerida por

Hhal, nos dará la variación en la metilación. Hay que tener en cuenta que tanto la SALSA ME-030 como la SALSA ME-028 tienen varias sondas control de la eficiencia de la enzima de restricción que presentan un 0 % de metilación y serán totalmente digeridas, por lo que no serán amplificadas en esta PCR.

Los valores de la intensidad de la señal de cada sonda (área de los picos) se dividen por la suma de la intensidad de señal de todas las sondas de cada muestra (intensidad relativa). A continuación, por un lado, cada valor obtenido es normalizado dividiéndolo por el valor correspondiente obtenido en la muestra o muestras controles de la alícuota digerida. Con este método de normalización, tanto las sondas 100 % metiladas como las sometidas a metilación diferencial tendrán valores relativos de 1 ± 0.2 si no están alterados. Por otro lado, para confirmar que las regiones improntadas tienen una pérdida de metilación del 50 %, se puede normalizar dividiendo la intensidad relativa de los picos digeridos por el valor obtenido en la muestra o muestras controles sin digerir, obteniéndose, en las regiones improntadas un valor no alterado de 0.5 ± 0.15 y un valor de 1 ± 0.2 en el resto de posiciones.

10. Análisis de segregación de marcadores microsatélite

La amplificación de regiones microsatélites nos permite, si los marcadores son informativos, además de confirmar las alteraciones en número de copia detectadas por la técnica de CGH-array en el paciente, averiguar si se trata de un alteración heredada de uno de los progenitores o que ha surgido *de novo* en el paciente, pudiendo en este último caso, distinguir el origen de la alteración (paterna o materna).

Las condiciones y el programa de PCR general utilizados para la amplificación de estos microsatélites se encuentran en los apartados 3.1.1. y 3.2.1. de material y métodos respectivamente, con pequeñas modificaciones indicadas en el listado de los marcadores empleados (anexo VI).

Para confirmar que la reacción de PCR ha funcionado correctamente, primero se realizó un testado en gel de agarosa al 1-1.5 %. Posteriormente, para poder ver y analizar los fragmentos obtenidos tras la amplificación, se resolvieron por electroforesis capilar, si alguno de los dos cebadores estaba marcado con un fluorocromo o mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida si no estaba marcado (apartados 4.2 y 4.3 de material y métodos).

11. PCR cuantitativa

La qPCR nos permite confirmar ganancias o pérdidas, en regiones que no son abordables por otras técnicas (marcadores, MLPA o FISH) y determinar el carácter heredado o *de novo* de esas alteraciones, al estudiar tanto al paciente como a sus progenitores.

En este trabajo utilizamos un fluorocromo no específico (SYBR Green de Roche) y el termociclador LightCycler 480 (Roche). Para evaluar si una región tiene un cambio de dosis en una muestra dada, se realiza una cuantificación relativa, comparando la amplificación en esa región y en otra región conocida no alterada de eficiencia equivalente, de la muestra con el supuesto cambio de dosis frente a muestras o mezcla de muestras de referencia con dosis normal.

Se trabaja con valores de C_q calculándose el $\Delta\Delta C_q$ y el RQ (cuantificación relativa), que son parámetros que nos permiten comparar los resultados de

distintos experimentos e interpretarlos. Se considera que un fragmento está deleciónado cuando tiene un valor de RQ de 0.5, duplicado cuando este valor es de 1.5 y triplicado si alcanza un valor de 2 (tabla 20). Hay que tener en cuenta que para una región localizada en el cromosoma X hay que saber el género de la muestra o mezcla de muestras de referencia, sin mezclar DNA de personas de géneros distintos.

Tabla 20: Posibles valores teóricos de RQ en función de la alteración en número de copia presente en la muestra problema.

Alteración	Deleción homocigosis	Deleción hererocigosis	Dosis normal	Duplicación	Triplicación
N copias	0	1	2	3	4
RQ teórico	0/2=0	1/2=0.5	2/2=1	3/2=1.5	4/2=2

Primero, para cada PCR, se realiza una curva de calibración con diluciones seriadas de un DNA o mezcla de DNAs de referencia (60, 30, 15, 7.5 ng/μl). De esta forma se obtiene la eficiencia de la PCR en las condiciones utilizadas y se verifica si con esas condiciones se encuentra dentro de un rango lineal, y por tanto, existe una correlación entre Cq y la cantidad de DNA de partida.

Tras realizar la curva de calibración, se procede a analizar la muestra problema siguiendo el mismo protocolo utilizado en la calibración. Se prepara la muestra de DNA de tal forma que tengamos una concentración total de alrededor de 40 ng/μl. La mezcla de reacción para un volumen final de 10 μl se encuentra en la tabla 21. Todos los cebadores que se han utilizado para el estudio por PCR cuantitativa se encuentran en el anexo VII.

Tabla 21: Reactivos y cantidades utilizadas para qPCR.

Reactivo	[$]_0$	V(μl)	[$]_f$	Casa comercial
Master mix 2 X ¹	2 X	5	1 X	Roche
H ₂ O	-	2.5	-	Roche
Cebador Directo	5 μM	0.5	250 nM	Eurofins mwg operon
Cebador Reverso	5 μM	0.5	250 nM	Eurofins mwg operon
DNA	~40 ng/μl	1	~4 ng/μl	-

¹Contiene el fluorocromo SYBR Green y todos los reactivos necesarios para la PCR (LightCycler 480 SYBR Green I Master; Cat. No. 04 707 516 001).

[$]_0$: concentración inicial; [$]_f$: concentración final.

El programa de PCR habitualmente utilizado es:

Desnaturalización	94 °C	10 min	} 40 ciclos
Amplificación	94 °C	10 s	
	55 °C	10 s	
	72 °C	10 s	
Curva de fusión	95 °C	5 s	
	65 °C	1 min	
	97 °C	(0.57 °C/s)	

Puede haber pequeñas variaciones en la mezcla de reacción y el programa de PCR en función de la región a amplificar, la temperatura de fusión de los cebadores, el tamaño del fragmento (suele estar en torno a 100-200 pb) y características específicas de la secuencia (anexo VII). Para una misma pareja de cebadores y su pareja de referencia, han de utilizarse una misma mezcla de reacción y programa, puesto que se analiza simultáneamente, y deben de ser las mismas condiciones en las que se realizó la curva de calibración, para que se conserve la eficiencia estimada y los resultados sean comparables.

Tanto en la calibración como en el estudio de las muestras, siempre se obtiene la curva de fusión, ya que al usarse fluorocromos inespecíficos, ha de confirmarse que se ha producido una amplificación específica y que no se ha amplificado otra región o se han producido dímeros de cebadores que intercalarían fluorocromo y enmascararían el resultado (figura 28).

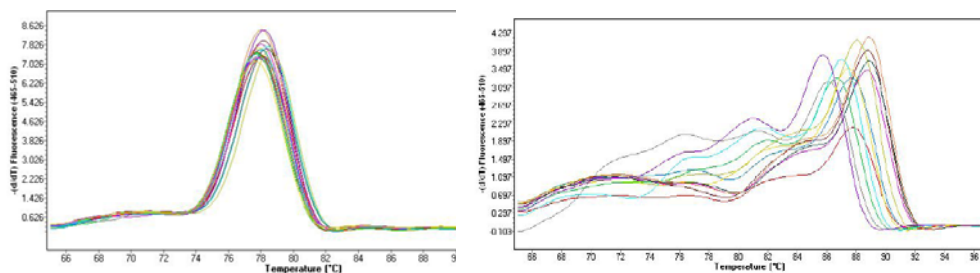


Figura 28: Ejemplo de dos curvas de fusión de qPCR. Curva de fusión de secuencia específica (izquierda) en comparación con curva de fusión de una PCR no específica (derecha).

12. Digestión con enzimas de restricción

En distintos puntos de este trabajo se han utilizado distintas enzimas de restricción que se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 22: Enzimas de restricción utilizadas en este trabajo.

Nombre	Secuencia ¹	Observaciones	Casa comercial
BstXI	CCANNNNN NTGG	T óptima 55°C	Biolabs
HhaI	CGC G	Sensible a metilación ²	Fermentas
HpaII	C CGG	Sensible a metilación ²	Fermentas
RsaI	GT AC		Fermentas
PstI	CTGCA G		Biolabs

¹El símbolo "|" indica el punto de corte en la secuencia reconocida por la enzima.

²Indica que si la secuencia diana se encuentra metilada, no será reconocida por la enzima, y por lo tanto, no será cortada por esta.

Las enzimas HhaI y HpaII, sensibles a metilación, se han utilizado en los protocolos de MS-MLPA y de rastreo de regiones sometidas a impronta respectivamente (apartados 9 y 15 de material y métodos).

12.1 Estudio de Inactivación del cromosoma X

Este estudio, utilizado en este trabajo para ayudar a valorar la posible patogenicidad de alteraciones detectadas en el cromosoma X, se basa en analizar un marcador polimórfico microsatélite contenido en el gen androgénico *AR*. El protocolo utilizado es el descrito por Allen y colaboradores en 1992, con pequeñas modificaciones.

Para realizar esta técnica se trabaja en paralelo con dos alícuotas, una tratada con *Hpa*II, para estudiar el grado de metilación y otra tratada con *Rsa*I, utilizada de control para poder valorar la dosis total. Se utilizan los reactivos indicados en la tabla 23.

Tabla 23: Reactivos y cantidades utilizadas para el estudio de inactivación del cromosoma X.

Reactivo	[I_0]	V(μl)	[I_f]	
H ₂ O	-	10	-	
Master mix	2 X	12	~1 X	
Cebador AR-1*	50 μM	1	2 μM	
Cebador AR-2	50 μM	1	2 μM	
<i>Hpa</i> II	<i>Rsa</i> I	10 U/ μl	0.5	0.2 U/ μl
DNA		~100 ng/ μl	0.5	2 ng/ μl

*cebador marcado con el fluorocromo FAM.

[I_0]: concentración inicial; [I_f]: concentración final.

El programa para la PCR semicuantitativa es el siguiente:

60 min	37 °C	} 28 ciclos
3 min	94 °C	
40 s	96 °C	
1 min	60 °C	
30 s	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

Tras la PCR, se testan 5 μl del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5 %, confirmando que la reacción de PCR no ha fallado en ningún caso, para analizar 1 μl del producto de PCR mediante análisis de fragmentos por electroforesis capilar (apartado 4.3 de material y métodos).

Para calcular el porcentaje del alelo inactivado, es imprescindible tener dos alelos de distinto tamaño, para poder hacer la cuantificación relativa de uno respecto del otro. La relación entre los valores del área relativa obtenidos para la alícuota tratada con *Hpa*II (metilación) debe ser corregida con los valores del área relativa de los mismos alelos tratados con *Rsa*I (control).

Aplicando las siguientes formulas, se obtiene el porcentaje de metilación de cada alelo, y por tanto, el porcentaje de inactivación de cada cromosoma X.

$$\%_{Alelo1} = \frac{A1_{HpaII} / A2_{HpaII}}{A1_{HpaII} / A2_{HpaII} + A1_{RsaI} / A2_{RsaI}} \times 100$$

$$\%_{Alelo2} = 100 - \%_{Alelo1}$$

A1: Área del pico obtenido para el alelo 1 correspondiente a la intensidad de la señal.

A2: Área del pico obtenido para el alelo 2 correspondiente a la intensidad de la señal.

12.2 Mapa de restricción

Tanto la enzima BstXI como las enzimas RsaI y PstI se utilizaron para realizar un mapa de restricción en dos casos distintos a partir de fragmentos de PCR de 11 y 1.9 Kb respectivamente (apartados 1.5.2.2.1. y 1.5.2.2.3. de resultados), siguiendo el siguiente protocolo de digestión (tabla 24).

Tabla 24: Reactivos utilizados para la digestión enzimática.

Reactivo	V(μl)	Reactivo	V(μl)
BstXI (10 U/μl)	1	RsaI (10 U/μl)	0.5
Tampón 3 10 X (Biolabs) ¹	1	PstI (20 U/μl)	0.5
DNA (PCR)	8	Tampón Tango 10 X (Fermenta) ²	1
		DNA (PCR)	8

¹Composición del tampón 1 X: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ y 100 μg/ml BSA a un pH 7.9.

²Composición del tampón 1 X: 66 mM KCH₃CO₂, 33 mM Tris-CH₃CO₂H, 10 mM Mg(CH₃CO₂)₂ y 100 μg/ml BSA a un pH 7.9.

La mezcla de reacción se digirió durante una hora a 55 °C para la digestión con BstXI y a 37 °C para la digestión con RsaI y PstI. El análisis de los fragmentos se hizo en un gel de poliacrilamida al 12 % (apartado 4.2 de material y métodos), confirmándose que no había restos de DNA sin digerir.

13. Heterodúplex

Técnica de cribado basada en el reconocimiento de las distintas estructuras que se forman al rehibridar dos cadenas de DNA en condiciones no desnaturalizantes según los cambios de su secuencia. Se obtienen diferentes perfiles electroforéticos en función de si la muestra de DNA esta formada por el heterocigoto o cualquiera de los dos homocigotos para un punto dado de la secuencia (figura 29).

En este trabajo se utilizó esta herramienta para el rastreo de mutaciones en el gen *MYT1L*, en los exones 6, 7, 9, 14, 21, 24 y 25. Las secuencias de los cebadores utilizados, marcados con TAMRA, se encuentran en el anexo VIII. Se prepararon dos mezclas de reacción haciéndose PCR múltiples para el análisis de heterodúplex. Los grupos de cebadores se encuentran en la tabla 25. Las condiciones de PCR se encuentran en la tabla 26 y el programa de PCR fue un syn/araF modificado (apartado de 3.2.1.2. de material y métodos y anexo VIII).

Una vez hecha y testada la PCR en un gel de agarosa al 1%, el programa para generar los heterodúplex fue el siguiente:

5 min 98 °C
 5 min 90 °C
 5 min 80 °C
 10 min 75 °C
 10 min 60 °C
 30 min 40 °C
 30 min 25 °C
 ∞ 4 °C

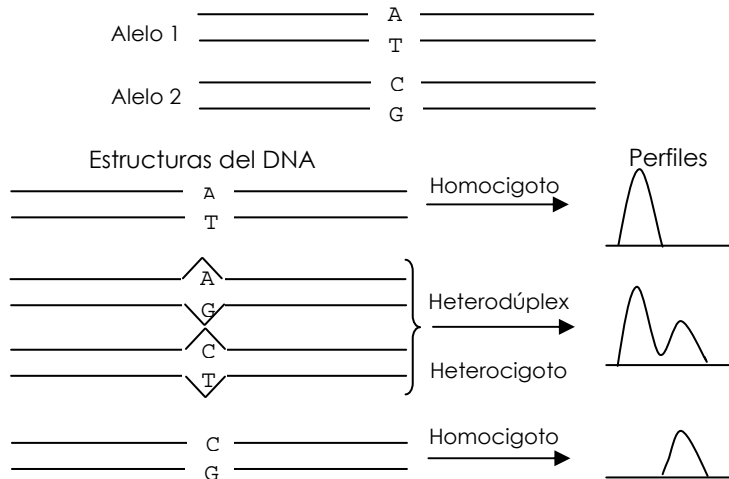


Figura 29: Esquema representativo de los posibles hallazgos en un análisis de heterodúplex. Los perfiles representados son ficticios, dependen del tamaño y la secuencia global, así como de la posición y el tipo de cambio producido. Al analizar los resultados en el secuenciador, podemos obtener distintos perfiles de picos en función de si la muestra presenta, como en este ejemplo, un SNP o varios cambios distintos. Comparando los perfiles obtenidos en distintas muestras se pueden establecer grupos con perfiles equivalentes, secuenciándose solo algunos individuos de estos grupos y confirmando que perfiles iguales tienen la misma secuencia. De esta forma se ahorra tiempo y recursos que de otra manera se emplearían secuenciando todas las muestras.

La electroforesis capilar para visualizar los resultados se realizó por la Dra. Esteban, facultativo de la Unidad de Biología Molecular del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, en el equipo cedido por la Unidad de Genética al servicio de Biología Molecular de este mismo Hospital (ABI-3130 Applied Biosystems). Las condiciones generales de este proceso se han indicado en el apartado 4.3 de material y métodos. En función de los picos obtenidos para cada uno de los tres fragmentos estudiados en cada mezcla, se seleccionaron las muestras a secuenciar. La reacción de secuenciación se hizo a partir de la PCR múltiple usada para el análisis de heterodúplex, usando como cebador el reverso del fragmento de interés, que no estaba marcado. En aquellos casos donde la secuencia no era clara, como en el exón 21, se realizó la PCR de nuevo en esas muestras solo para dicho exón secuenciando tanto con el cebador directo, sin marcar, como con el reverso.

Tabla 25: Cebadores utilizados para el análisis de heterodúplex del gen *MYT1L*.

	Cebador ¹	Tamaño (pb)	V(μl)	[i](μM)	V _i (μl)
Mezcla 1	MYT1L6D*	435	25	12.5	100
	MYT1L7R		25	12.5	
	MYT1L9D*	545	22.5	11.25	
	MYT1L9R		22.5	11.25	
	MYT1L24D*	267	2.5	1.25	
	MYT1L24R		2.5	1.25	
Mezcla 2	MYT1L14D*	383	10	5	100
	MYT1L14R		13	6.5	
	MYT1L21D*	362	32	16	
	MYT1L21R		22	11	
	MYT1L25D*	549	13	6.5	
	MYT1L25R		10	5	

¹La concentración inicial de todos los cebadores es de 50 μM.

*Cebador marcado con TAMRA.

[i]: concentración final en la mezcla de cebadores; V_i: volumen final de la mezcla de cebadores.

Tabla 26: Reactivos y cantidades utilizadas para la PCR para el análisis de heterodúplex.

Reactivo	[i] ₀	V(μl)	[i] _f
H ₂ O	-	18.4	-
Tampón 10 X	10 X	2.5	1 X
dNTP	10 mM	0.6	240 μM
Mezcla de cebadores	-	2	-
Taq polimerasa	5 U/μl	0.5	0.1 U/μl
DNA	~100 ng/μl	1	4 ng/μl

[i]₀: concentración inicial; [i]_f: concentración final.

14. Metilación generalizada (HPLC)

La determinación de los niveles de metilación generalizada en el genoma se realizó en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), como colaboración con la Dra. Berdasco del grupo del Dr. Esteller. Para ello se utilizó la técnica de HPLC, empleando el protocolo descrito en Berdasco *et al.* (2009).

De forma resumida, la metodología utilizada consiste en hidrolizar el DNA con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina, seguido de la separación de los nucleósidos por HPLC en fase reversa y la identificación de cada uno de los nucleósidos por espectroscopia de masas, cuantificando la cantidad de citosina metilada según el área relativa de los picos obtenidos para citosina metilada y sin metilar.

$$\%C^{met} = \frac{Area_{C^{met}}}{Area_{C^{met}} + Area_C} \times 100$$

15. Rastreo de regiones sometidas a impronta

Para estudiar el grado de metilación de cuatro *loci* sometidos a impronta en nuestra serie de pacientes, utilizamos un protocolo empleado en la práctica asistencial de nuestro laboratorio descrito por Martínez *et al.* (2006) con modificaciones, basado en digestión con enzima sensible a metilación y PCR múltiple semicuantitativa, que permite determinar los niveles de dosis y metilación de estos cuatro *loci* (*KCNQ1OT1*, *H19*, *SNRPN* y *MEG3*).

Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran en el anexo VIII. Se prepara una mezcla de cebadores según la siguiente tabla:

Tabla 27: Cebadores utilizados para el rastreo de regiones sometidas a impronta.

Cebador ¹	Tamaño (pb)	V(μl) ²	[Γ](μM) ²	V _f (μl)
SNRPN_F*	487	13	6.5	100
SNRPN_R		13	6.5	
H19_F*	431	11	5.5	
H19_R		11	5.5	
MEG3_F*	386	11	5.5	
MEG3_R		11	5.5	
KCNQ1OT1_F* ^a	369	15	7.5	
KCNQ1OT1_R		15	7.5	

¹La concentración inicial de todos los cebadores es de 50 μM.

²Tanto los volúmenes de cebador utilizado como, en consecuencia, las concentraciones finales de cada cebador, se ajustaban al prepararse una nueva mezcla para optimizar los resultados, especialmente cuando se usaba un nuevo cebador, ya que de un pedido a otro la eficiencia en su síntesis y su marcaje podía variar, por lo que los valores aquí indicados son representativos.

^aEn este trabajo, se comenzó a utilizar el cebador KCNQ1OT1n_F*, observándose una disminución parcial en muchos casos debida a la presencia de un polimorfismo descrito en dicho cebador. Tras el análisis en población normal, confirmando que no había una asociación con ese SNP y la DI (apartado 4.5 de resultados), se sustituyó dicho cebador por KCNQ1OT1_F*, no obstante la secuencia de ambos cebadores se encuentra en el anexo VIII.

*Cebador marcado con FAM; [Γ]: concentración final en la mezcla de cebadores; V_f: volumen final de la mezcla de cebadores.

Para poder valorar la dosis y la metilación, de forma análoga al MS-MLPA descrito en el apartado 9 de material y métodos, se hacen dos alícuotas, con y sin enzima de restricción, utilizados los reactivos y preparando la mezcla de reacción indicados en la tabla 28.

El programa de PCR engloba un primer paso para que se produzca la digestión con la enzima HpaII de 60 min a 37 °C, seguido del programa PWA indicado en el apartado 3.2.1.3. de material y métodos.

Tras la PCR, se testan 5 μl del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5 %, confirmando que la reacción de PCR no ha fallado en ningún caso, para analizar 1 μl del producto de PCR mediante análisis de fragmentos por electroforesis capilar usando como patrón de tamaños 500-ROX (apartado 4.3 de material y métodos).

Tabla 28: Reactivos y cantidades utilizadas para la PCR semicuantitativa en el rastreo de alteraciones en regiones sometidas a impronta.

Reactivo		$[i]_0$	$V(\mu\text{l})$	$[i]_f$		
H ₂ O		-	9.25	-		
Master mix		2 X	12.5	1 X		
DMSO		-	1.25	5 %		
Mezcla de cebadores		-	1	-		
HpaII	H ₂ O	10 U/ μl	-	0.5	0.2 U/ μl	-
DNA		~100 ng/ μl	0.5	2 ng/ μl		

$[i]_0$: concentración inicial; $[i]_f$: concentración final.

16. Bases de datos

Hoy en día tenemos acceso a un gran número de bases de datos que nos sirven como herramienta para consultar, dentro de una región de interés, entre otras cosas, los genes contenidos, la función e importancia de dichos genes y donde se expresan, su posible relación con la DI, si existen variantes de número de copias en población control, o si por el contrario se conocen casos considerados patológicos con alteraciones similares. Estas herramientas, entre otras cosas, nos ayudan a clasificar las alteraciones detectadas como benignas o patológicas. A continuación se mencionaran algunas de las que han sido más ampliamente utilizadas en este trabajo y la información que se puede obtener de ellas de forma muy resumida.

16.1 UCSC

(<http://genome.ucsc.edu/>)

Esta página web, desarrollada por la Universidad de California, Santa Cruz, permite visualizar cualquier región del genoma humano y presenta información y vínculos con otras bases de datos relacionadas, clasificadas en distintas categorías (como expresión, regulación, variaciones y repeticiones, etc.) según la información que se requiera consultar (figura 30).

Tiene acceso a las distintas versiones del genoma humano (en este trabajo siempre nos referiremos a la versión Build37/Hg19). La información se puede visualizar tanto en forma gráfica como en tabla, donde se puede extraer información estadística de la región consultada, como el número de elementos de búsqueda contenidos en una región o grupos de regiones de interés.

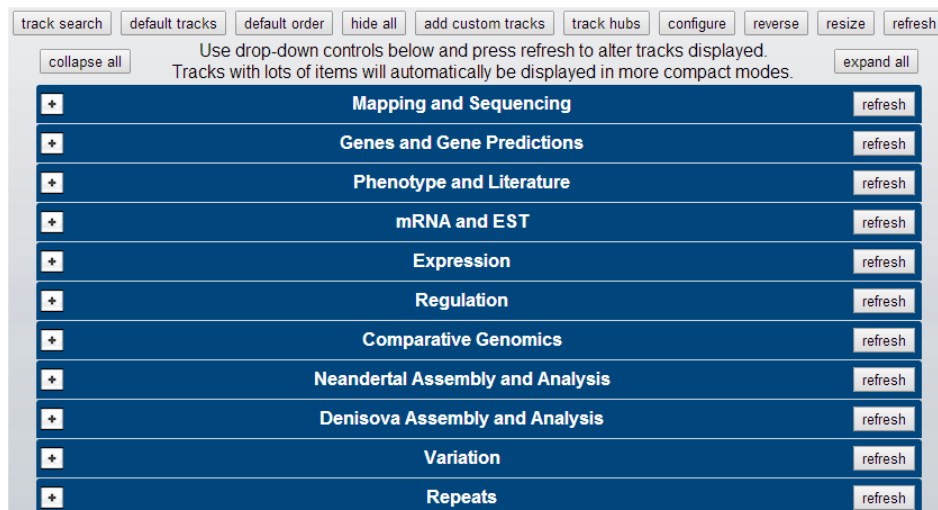


Figura 30: Opciones de búsqueda de la página web UCSC.

16.2 NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

La página del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) proporciona acceso a información biomédica y genómica. Tiene acceso a distintas bases de datos como por ejemplo:

- Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>): Para la búsqueda de información bibliográfica.
- GENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>): Proporciona una amplia información sobre un gen en concreto, nombre, breve descripción, posición y orientación, información bibliográfica, secuencia completa del gen, su mRNA y su proteína, etc.
- UNIGene (www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene): Proporciona información sobre la expresión génica al identificar transcritos de un mismo *locus*; analiza la expresión por el tejido, estado de salud y la edad.
- OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>): Bien por su código o por su nombre, se puede realizar una búsqueda en esta página obteniendo información complementaria sobre un gen o síndrome.
- GeneReviews (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>): Proporciona una amplia información sobre distintos síndromes (información clínica, molecular, diagnóstico diferencial, asesoramiento genético y posibles tratamientos).
- Map viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>): Permite obtener información sobre una región genómica concreta con vínculos a otras páginas como GENE y OMIM.
- SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>): Base de datos sobre los SNPs conocidos, donde se indica, entre otros datos, su frecuencia en la población.
- ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>): Base de datos de alteraciones genéticas y fenotipos asociados en humanos.

- Biosystems (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/>): Enumerar los genes, proteínas u otro tipo de moléculas involucrados en una ruta biológica de interés o indica las rutas en las que está involucrado un determinado gen o proteína.

16.3 DGV (*Database of Genomic Variants*)

(<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>)

Se puede acceder directamente o a través del UCSC entre otros, recopila y proporciona información sobre las CNVs descritas en población general. Indica el sistema de detección utilizado, el tamaño, el número de individuos estudiados y el número de casos detectados con esa CNV entre otros datos.

16.4 Búsqueda de CNVs consideradas patológicas

Dado que las alteraciones detectadas en pacientes con discapacidad intelectual suelen ser muy poco recurrentes, para buscar casos con alteraciones similares, poder comparar la clínica de los pacientes y aclarar la posible implicación de la alteración en la patología, existen distintas bases de datos que recogen casos descritos indicando el tipo de alteración, la clínica del paciente, el patrón de herencia, etc. Las más utilizadas en este trabajo son las siguientes:

- DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*, <http://decipher.sanger.ac.uk/>): En esta base de datos se encuentra información de distintas alteraciones de cambio de dosis, los fenotipos asociados a los pacientes, y el patrón de herencia si es conocido en cada caso. Además, permite comparar distintos casos con afectación total o parcial de una misma región.

- ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays*, <https://www.iscaconsortium.org/>): Esta base de datos contiene información de CGH-array de individuos con fenotipos que incluyen la discapacidad intelectual, el autismo o el retraso en el desarrollo.

- ECARUCA (*European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*, www.ecaruca.net/): Esta base de datos recoge información citogenética y clínica de alteraciones cromosómicas raras, incluyendo deleciones y duplicaciones.

16.5 Expresión génica

En ocasiones es importante saber dónde se expresa un gen, bien para poder estimar la repercusión de una alteración, o bien para saber si se expresa en un tejido accesible donde se pueda estudiar la presencia de RNA o proteína. Podemos consultar la expresión génica utilizando distintas fuentes:

- GeneHub-GEPIS

(<http://research-public.gene.com/Research/genentech/genehub-gepis/>):

Es una herramienta bioinformática para deducir patrones de expresión de genes en distintos tejidos, normales y cancerosos, basado en la abundancia de las secuencias EST (*Expressed Sequence Tag*) en humanos y ratones. Esta herramienta se basa en la base de datos GeneHub, que integra información de genes y proteínas de varias bases de datos. También se puede acceder a esta información a través del UCSC.

- Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>): A través del NCBI, ya mencionado en ese apartado.

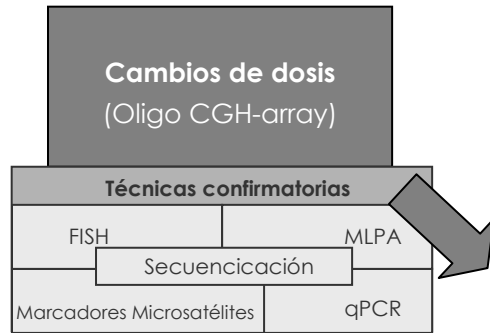
16.6 Otras bases de datos o fuentes de información de interés

- GeneImprint (<http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>): Contiene información sobre genes cuya regulación esta sometida a impronta.
- miRBase (<http://www.mirbase.org/>): Proporciona información actualizada de los miRNA conocidos en la especie humana.
- UniProt (<http://www.uniprot.org/>): Recoge una amplia información sobre proteínas (función, estructura, expresión, etc.)
- GO (Gene Ontology, <http://geneontology.org/>): Describe las funciones moleculares, procesos biológicos asociados y/o componentes celulares en los que pueden participar los productos génicos.
- GeneMANIA: (www.genemania.org/): Herramienta que permite establecer relaciones funcionales entre grupos de genes seleccionados.

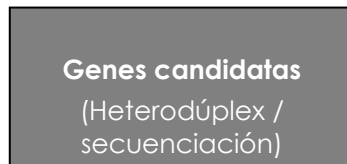
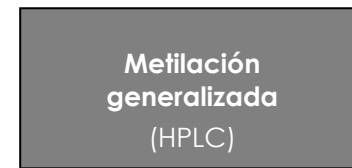
17. Esquema de trabajo

Para aclarar mejor la metodología empleada en este estudio, a continuación se representa un diagrama que intenta mostrar, de forma simplificada, un resumen de esquema de trabajo seguido.

Alteraciones genéticas



Alteraciones epigenéticas



**Diagnóstico y
asesoramiento genético**



Figura 31: Diagrama que representa el esquema de trabajo seguido.

*"Las ciencias tienen las raíces amargas,
pero muy dulces los frutos."
(Aristóteles)*

RESULTADOS





Para el cálculo del número de genes en una región cromosómica dada, a menos que se especifique lo contrario, se ha optado por utilizar el número de genes *RefSeq* obtenidos del UCSC eliminando duplicidades correspondientes principalmente al distinto procesamiento de las isoformas. Además, para el cálculo de los percentiles de talla, peso y/o perímetro cefálico, por un lado, para recién nacidos, se ha tomado como referencia las tablas utilizadas en el Servicio de Pediatría, Sección de Neonatología del Hospital Universitario y Politécnico "La Fe" (Lubchenko *et al.*, 1963 y 1966), y por otro lado, para medidas posteriores, se han utilizado como referencia las tablas del estudio longitudinal del crecimiento 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 Conselleria de Sanitat).

1. Cambio de dosis

1.1 Descripción general de los resultados obtenidos en los estudios por CGH-array

En este trabajo se han analizado las muestras de DNA de 395 pacientes con trastornos del neurodesarrollo en busca de cambios de dosis génica mediante la técnica de CGH-array, encontrándose 220 CNVs en 152 casos (anexo IX y figura 32).

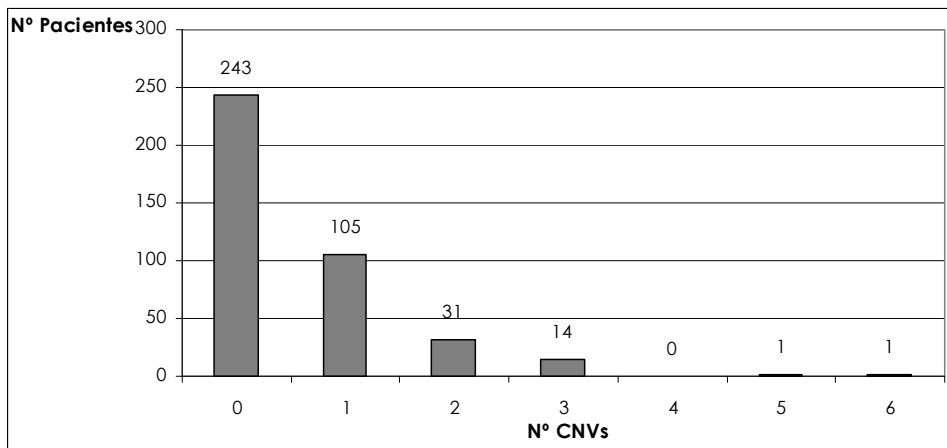


Figura 32: Representación del número de pacientes en función del número de CNV detectadas en cada caso por CGH-array.

Estas variantes fueron clasificadas como benignas, patológicas, patológicas de penetrancia incompleta (pip: *pathogenic incomplete penetrance*) o de significado incierto (VOUS: *variant of uncertain significance*) tras un análisis exhaustivo en base a distintos parámetros como la herencia, el tamaño, los genes afectados y si estaba descrita previamente en bases de datos y/o bibliografía, utilizando los siguientes criterios (Miller *et al.*, 2010; Monfort, 2014; Roselló, 2014):

- Patológica: alteración detectada en pacientes con una clínica similar a nuestro caso o cuyo tamaño y función de los genes contenidos nos indica que es la causa de la clínica observada.

- Patológica de penetrancia incompleta: alteración descrita como patológica que puede estar presente en población control o cambio que por su tamaño, genes afectados y/o casos descritos se consideraría patológica pero ha sido heredada de un progenitor que no presenta clínica.

- Benigna: variante descrita en población control.

- VOUS: cambio que, en el momento de su revisión, no cumplía los criterios necesarios para ser clasificada como patológica, patológica de penetrancia incompleta o benigna.

Además, las variantes clasificadas inicialmente de significado incierto se han revisado otra vez a finales de 2014, para ver si con los nuevos avances científicos se podían reclasificar como variantes benignas, patológicas o patológicas de penetrancia incompleta. En la tabla 29 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 29: Clasificación de las 220 CNVs en función de su repercusión clínica.

Resultado		Benigna	VOUS	pip	Patológica	TOTAL	%	
Tipo	Deleciones	52	2	9	46	109	49.55	
	Duplicaciones	58	22	11	20	111	50.45	
Herencia	<i>de novo</i>	6	6	2	47	61	27.73	
	Translocación desequilibrada de origen ¹	♀	0	1	0	6	11	5.00
		♂	0	0	0	4		
	Heredada	♀	23	2	9	7	79	35.91
		♂	19	9	9	1		
	Desconocida		62	6	0	1	69	31.36
Tamaño promedio (Kb)		183	490	1387	5028	1779	-	
Total CNVs		110	24	20	66	220	100	
%		50.0	10.9	9.1	30	100		

¹Translocaciones equilibradas en alguno de los progenitores heredadas de forma desequilibrada en el paciente.

♀: materna; ♂: paterna

En función del número y el tipo de variantes detectadas en cada caso, los pacientes fueron diagnosticados como portadores de alteración patológica o patológica de penetrancia incompleta, si presentaban al menos un cambio de dosis clasificado como tal; sin alteración causal conocida, si no se encontró ningún cambio de dosis o los cambios detectados se habían clasificado como variantes benignas; o como portadores de VOUS cuando se había encontrado al menos una variante de significado incierto (tablas 30).

Tabla 30: Clasificación de los pacientes en función del tipo de variación detectada.

Conclusión	Nº pacientes	%
Normal ¹	304	77.0
VOUS	15	3.8
pip	18	4.5
Patológicos	58	14.7

¹En este apartado se han incluido los 243 casos en los que no se detectó ninguna alteración.

De los 58 pacientes con alteraciones clasificadas como patológicas, 8 presentaban más de un cambio responsable de su clínica y en uno de ellos no se pudo determinar la herencia por falta de colaboración de los progenitores. Además, 8 pacientes presentaban una alteración patológica heredada que no fue clasificada como pip por ser los padres portadores en mosaico, presentar algún rasgo fenotípico (expresividad variable), o tratarse de una alteración ligada al cromosoma X (varones afectados y madres portadoras). Por otro lado, dos alteraciones *de novo* se han clasificado como cambios de penetrancia incompleta al producirse en regiones recurrentes causantes de síndromes descritos donde se ha observado individuos control portadores (síndrome de duplicación 16p11.2 (OMIM 614671) y síndrome de delección 15q11.2 (OMIM 615656)) (anexo IX). Además, las translocaciones desequilibradas transmitidas por un progenitor portador de un reordenamiento equilibrado, pese a su carácter heredado, en este trabajo, se han considerado las CNVs resultantes como *de novo*, ya que ninguno de los progenitores es portador del cambio de dosis generado.

En este trabajo, como se ha explicado en material y métodos (apartado 6) se han utilizado un array comercial y distintas versiones de un array de diseño propio. A continuación se pasará a describir las alteraciones detectadas en función del tipo de array utilizado.

1.1.1. *Resultados del CGH-array comercial*

De los 241 pacientes analizados con el array comercial, en 116 de ellos se detectaron 180 CNVs. En la figura 33 se representa el ideograma de las 55 alteraciones clasificadas como patológicas.

Algunos de los casos que se presentan en este trabajo forman parte de las tesis de la Dra. Monfort (2014) y la Dra. Roselló (2014) en las que se detallan aspectos técnicos y clínicos respectivamente. En este trabajo solo se comentarán aquellos casos que no han sido descritos previamente en estos trabajos, o en los que se aporte un nuevo enfoque que no ha sido presentado hasta ahora.

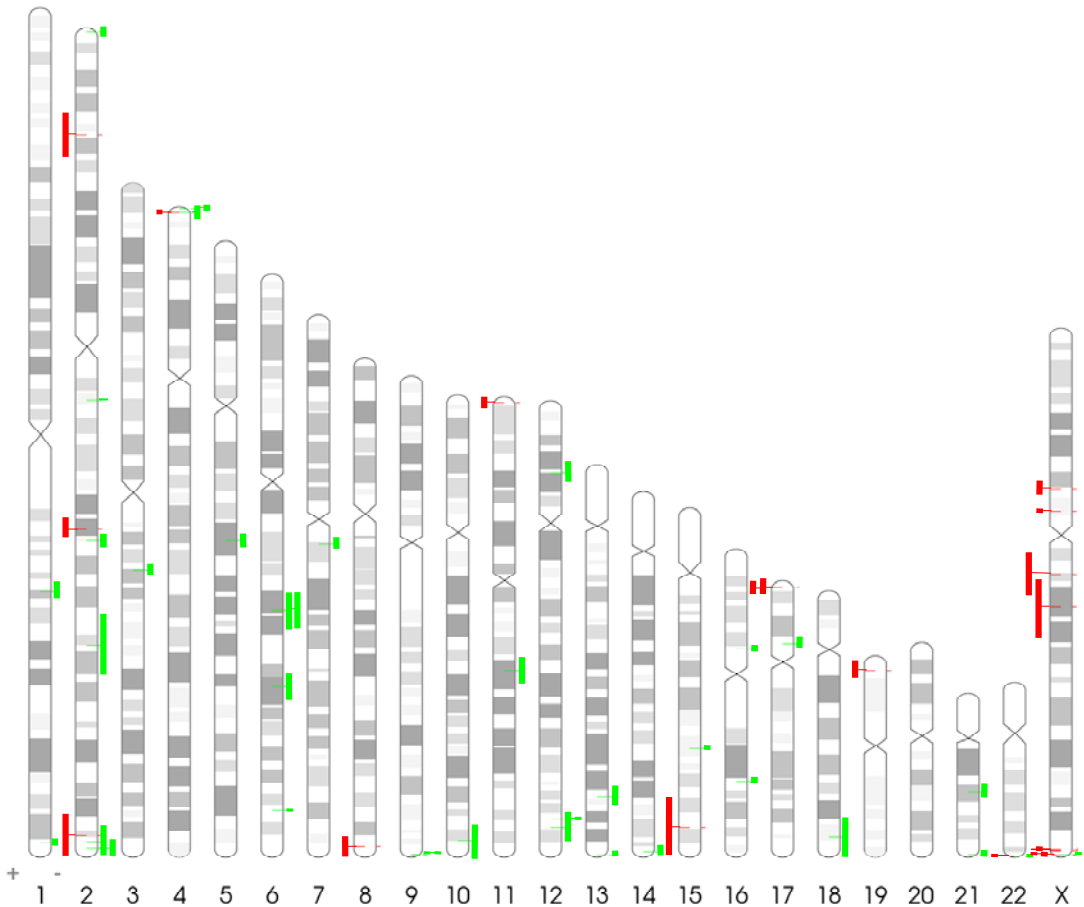


Figura 33: Ideograma en el que se representan las 55 CNV patológicas detectadas por el array comercial en 47 pacientes. En rojo se representan las duplicaciones y en verde las delecciones.

1.1.2. *Resultados del CGH-array de diseño propio*

Se estudiaron 190 pacientes con el array de diseño propio. De ellos, 36 se habían estudiado previamente con el array comercial con resultado normal o con CNVs clasificadas como benignas, excepto dos casos en los que si se había detectado alguna alteración (una patológica y otra VOUS), que se volvieron a estudiar para confirmar o acotar estos cambios de dosis. De los 190 pacientes estudiados, se detectaron 44 CNVs en 41 de ellos, de los cuales 12 cambios de dosis fueron clasificados como patológicos (figura 34).

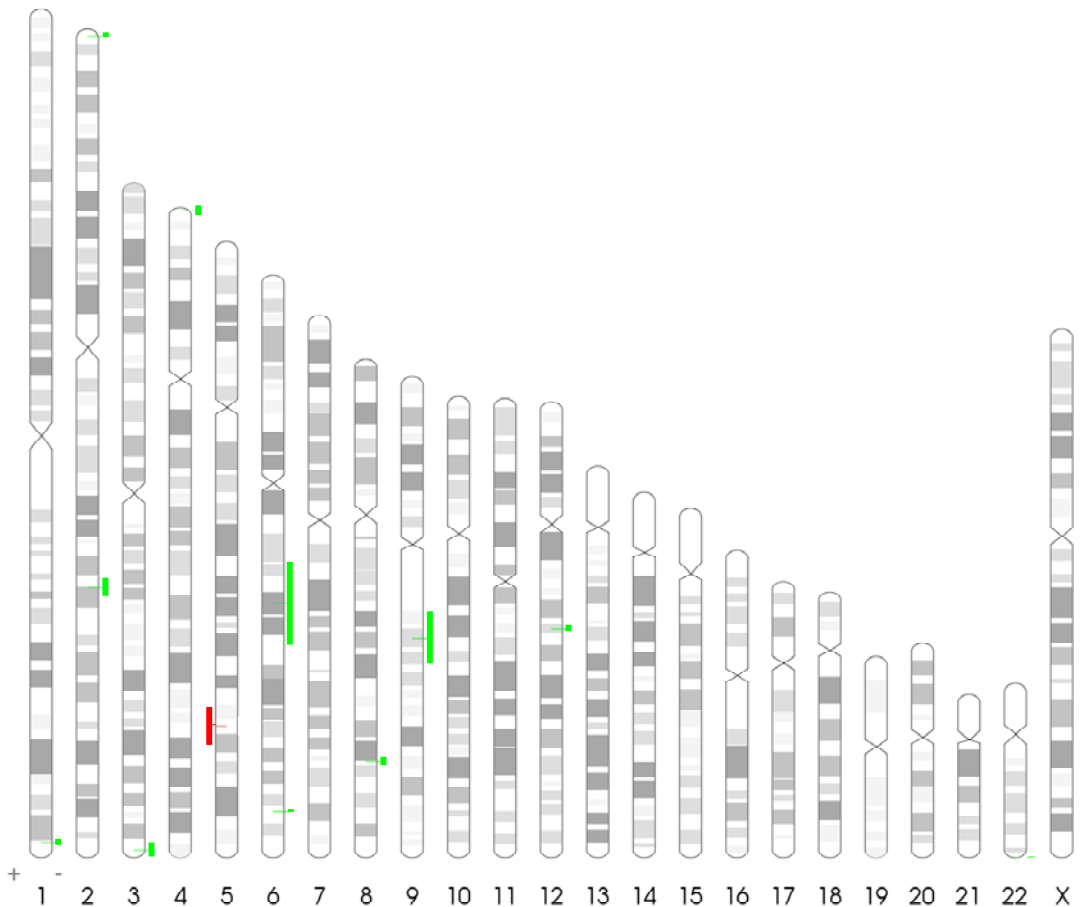


Figura 34: Ideograma en el que se representan las 12 CNV patológicas detectadas por las distintas versiones del array de diseño propio en 12 pacientes. En rojo se representan la única duplicación y en verde las deleciones.

En la tabla 31 se muestra un resumen de la clasificación de las distintas CNVs detectadas por el array de diseño propio y los pacientes portadores de estos cambios.

Tabla 31: Clasificación de las alteraciones detectadas y los pacientes estudiados por el array de diseño propio.

%	Nº CNVs	Clasificación	Nº pacientes	%
36.4	16	Benignas	15	36.6
18.2	8	VOUS	6	14.6
18.2	8	pip	8	19.5
27.3	12	Patológicas	12	29.3
	44	TOTAL	41	

1.2 Alteraciones en genes epigenéticos de interés

1.2.1. *Análisis de enriquecimiento en genes epigenéticos*

Teniendo en cuenta que una de las hipótesis principales de este trabajo es la importancia de la regulación epigenética en el neurodesarrollo, se realizó una valoración del posible enriquecimiento en este tipo de genes en las CNVs detectadas por CGH-array.

Definir qué consideramos como "gen epigenético" es una tarea compleja, tal y como ya se ha comentado en la introducción, dado que no se dispone de un listado exhaustivo de este tipo de genes ni de una definición exacta de lo que se considera un gen epigenético. Después de realizar distintas aproximaciones, para afrontar esta cuestión, se optó por desarrollar un listado de genes clasificados como tales por su función, empleando diferentes herramientas de búsqueda sistemática, en bases de datos asociadas al NCBI (GeneOntology, Biosystems, etc.), con términos específicos como remodelación y modificación de la cromatina, modificación de histonas y metilación del DNA. Posteriormente, este listado fue revisado y se introdujeron modificaciones puntuales. Por un lado se completó mediante búsquedas bibliográficas en Pubmed de genes implicados en la regulación epigenética, haciendo especial hincapié en aquellos genes relacionados con el neurodesarrollo. Por otro lado, este listado se purgó eliminando aquellos genes que, tras una revisión de la información disponible relacionada con ellos, no se encontraron evidencias suficientes para considerarlos como epigenéticos o cuyas mutaciones claramente están asociadas a otras patologías (cáncer, cardiopatías, esterilidad, etc.) no relacionadas con discapacidad intelectual o autismo. Con esta estrategia obtuvimos un listado de más de 500 genes (anexo X).

Partiendo de esta relación de genes, utilizando la herramienta *Table Browser* del UCSC, pudimos obtener el número de genes considerados como epigenéticos dentro y fuera de nuestras CNVs, diferenciando entre aquellas claramente patológicas (figura 35), aquellas con una posible repercusión en la clínica de los pacientes (patológicas de penetrancia incompleta y VOUS) y las que son claramente benignas. Para cada tipo de CNV, según la distribución del número de genes, se calculó la razón de odds (OR: *odds ratio*) y se aplicó un análisis de frecuencia de X^2 (chi-cuadrado) (figura 36). Como resultado se observó un enriquecimiento significativo en genes epigenéticos en las CNVs claramente patológicas (tabla 32).

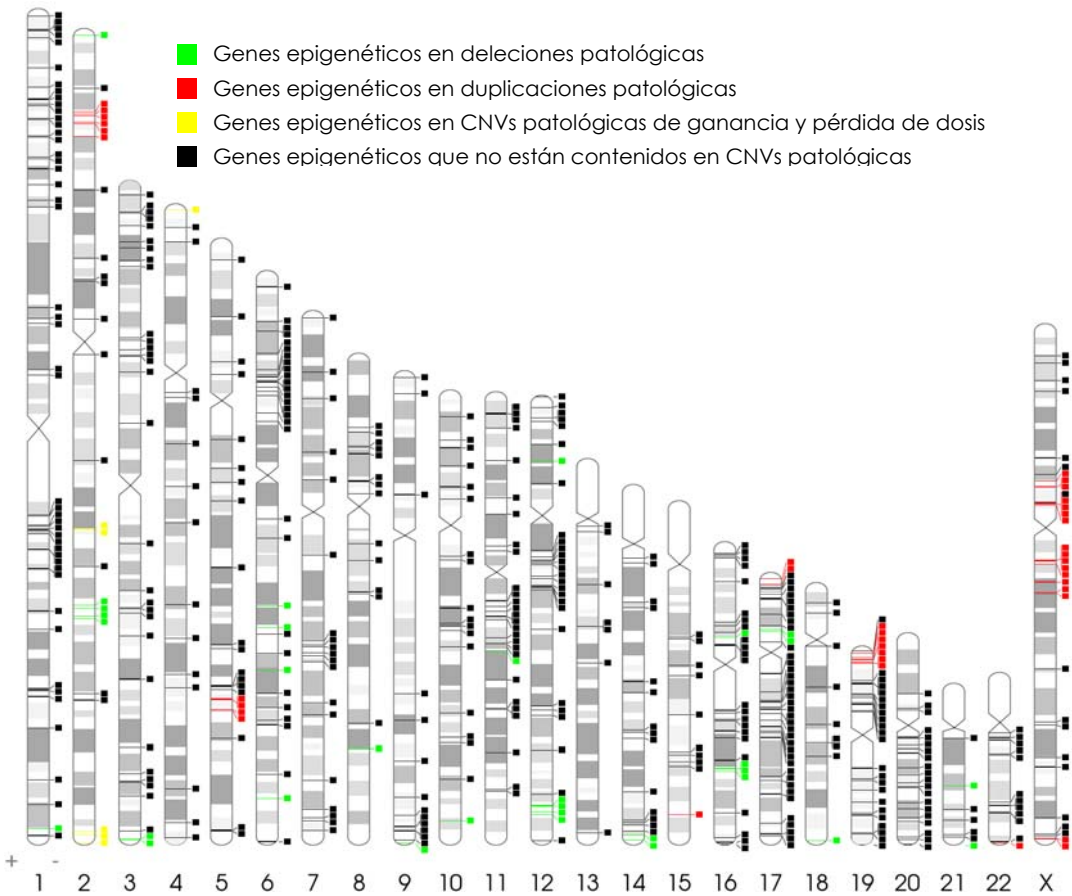


Figura 35: Distribución en el genoma de los genes seleccionados como epigenéticos. Representación de la distribución en el genoma de los 510 genes, diferenciando los 32 genes delecionados (verde), 38 genes duplicados (rojo) y 6 genes con ganancia y pérdida de dosis (amarillo) en las CNVs patológicas de nuestra serie, frente a los 434 genes no alterados en este tipo de CNVs.

A

		Genes epigenéticos		
		+	-	
CNV	+	a	b	Nº genes CNVs
	-	c	d	Nº genes fuera
		Nº genes epigenéticos	Nº genes no epigenéticos	Nº genes genoma

B

$$OR = \frac{a/c}{b/d}$$

Figura 36: Herramientas estadísticas para la valoración del enriquecimiento de genes epigenéticos en CNVs. (A) Representación de la tabla de contingencia 2x2 utilizada para el cálculo de OR y χ^2 en el análisis de enriquecimiento en genes epigenéticos de las CNVs detectadas mediante CGH-array en nuestra serie de pacientes. (B) Fórmula utilizada para el cálculo del OR.

Tabla 32: Resultado del análisis de enriquecimiento en genes epigenéticos en función del tipo de CNV.

		Nº total de genes	Nº genes epigenéticos	OR	X ² (p)
Nº genes en genoma		26313	510	-	-
CNVs	Patológica	2829	76	1.5	9.338(0.002)
	pip+VOUS	500	9	0.9	0.051 (0.821)
	Benigna	250	2	0.4	1.169(0.280)

Datos obtenidos de la herramienta *Table Browser* del UCSC el 17-4-2015.

Llama la atención que los genes epigenéticos aparecen sobrerrepresentados en las variantes patológicas e infrarrepresentados en las variantes benignas. Para valorar si la tendencia observada según el tipo de CNV era significativa, se calculó el estadístico de tendencia lineal X^2_{TL0} (chi-cuadrado de tendencia lineal), obteniéndose un valor significativo de dicha relación ($p = 0.036$).

Teniendo en cuenta que uno de los criterios utilizados en el diseño del array a la carta era la selección de genes implicados en la regulación epigenética, para valorar si el enriquecimiento observado en las CNVs patológicas era debido a un sesgo por el propio diseño, se volvieron a calcular los parámetros estadísticos teniendo en cuenta únicamente las CNVs detectadas mediante el array comercial, obteniéndose resultados muy similares (OR = 1.5; $p = 0.003$).

Además, teniendo en cuenta que las CNVs patológicas incluyen alteraciones de tamaño mucho mayor que las observadas en las CNVs clasificadas como patológicas de penetrancia incompleta, de significado incierto o benignas, para eliminar este efecto en nuestra estimación se repitieron los cálculos para las CNVs patológicas de un tamaño inferior a 5 Mb observándose un enriquecimiento incluso mayor y más significativo en este grupo, con un OR de 1.8 ($p = 0.0004$).

1.2.2. *Genes epigenéticos causantes de DI*

Entre los 58 casos con CNVs patológicas, hemos encontrado que en al menos 17, las alteraciones detectadas afectan a algún gen implicado en la regulación epigenética, causante de DI y responsable de la clínica de los pacientes (tabla 33). A continuación comentaremos estas alteraciones, los genes de interés contenidos en ellas y la repercusión clínica de estos cambios de dosis.

Tabla 33: Listado de los 17 casos con alteraciones patológicas que contienen genes epigenéticos que causan DI.

Paciente	Alteración			Epigenética			
	CNV	Coordenada mínima (Hg19)	Genes	Gen	Síndrome asociado	OMIM	Función
X841	duplicación	chrX:152684501-153780138	53	<i>MECP2</i>	Duplicación de MECP2 /Rett	300260/ 312750	Unión a DNA metilado
CGM1330	duplicación	chrX:153197498-153409354	10				
CGM2040	duplicación	chrX:153277239-153576940	10				
CGM2402	deleción	chr2:148602407-152354323	20	<i>MBD5</i>	Deleción 2q23.1	156200	
CGM2161	duplicación	chr2:143986161-150012071	14		Duplicación 2q23.1	Mullegama <i>et al.</i> , 2014	
CGM3782	duplicación	chrX:65815490-78426724	108	<i>ATRX</i>	Duplicación de ATRX	Martínez <i>et al.</i> , 2014	
XF1702	duplicación	chrX:72433198-91125471	68				
CGM3263	deleción	chr16:67316868-68712116	44	<i>CTCF</i>	DI sindrómica	615502	Remodelación de la cromatina
3298	deleción	chr8:117165801-119123513	10	<i>RAD21</i>	Cornelia de Lange	614701	
5357	deleción	chr1:244006388-245028327	10	<i>ZBTB18</i>	Deleción 1q44	612337	
CGM3244	deleción	chr17:16822683-20193169	67	<i>RAI1</i>	Smith-Magenis	182290	
CGM2428	deleción	chr6:157357928-157454332	1	<i>ARID1B</i>	Coffin-Siris	135900	
CGM2143	deleción	chr2:238619349-243199373	72	<i>HDAC4</i>	Braquidactilia con DI	600430	Modificación de histonas
CGM3785	deleción	chr2:234343084-243199373	103				
CGM1388	deleción	chr9:139794076-141213431	57	<i>EHMT1</i>	Kleefstra	610253	
CGM1397	deleción	chr9:139999668-141213431	41				
XF2761	duplicación	chrX:53221610-54223027	14	<i>HUWE1</i>	DI no sindrómica ligada al cromosoma X	Froyen <i>et al.</i> , 2012	

1.2.2.1. *MECP2*

Utilizando el array comercial se detectaron tres CNVs distintas en la región Xq28 que contienen al gen *MECP2* en tres pacientes no relacionados entre sí (X841, CGM1330 y CGM2040) (figura 37). El gen *MECP2*, como ya se ha mencionado en la introducción de este trabajo es un gen epigenético cuyo aumento de dosis causa el síndrome de Duplicación de *MECP2* principalmente en varones (apartado 3.1.1.2. de la introducción).

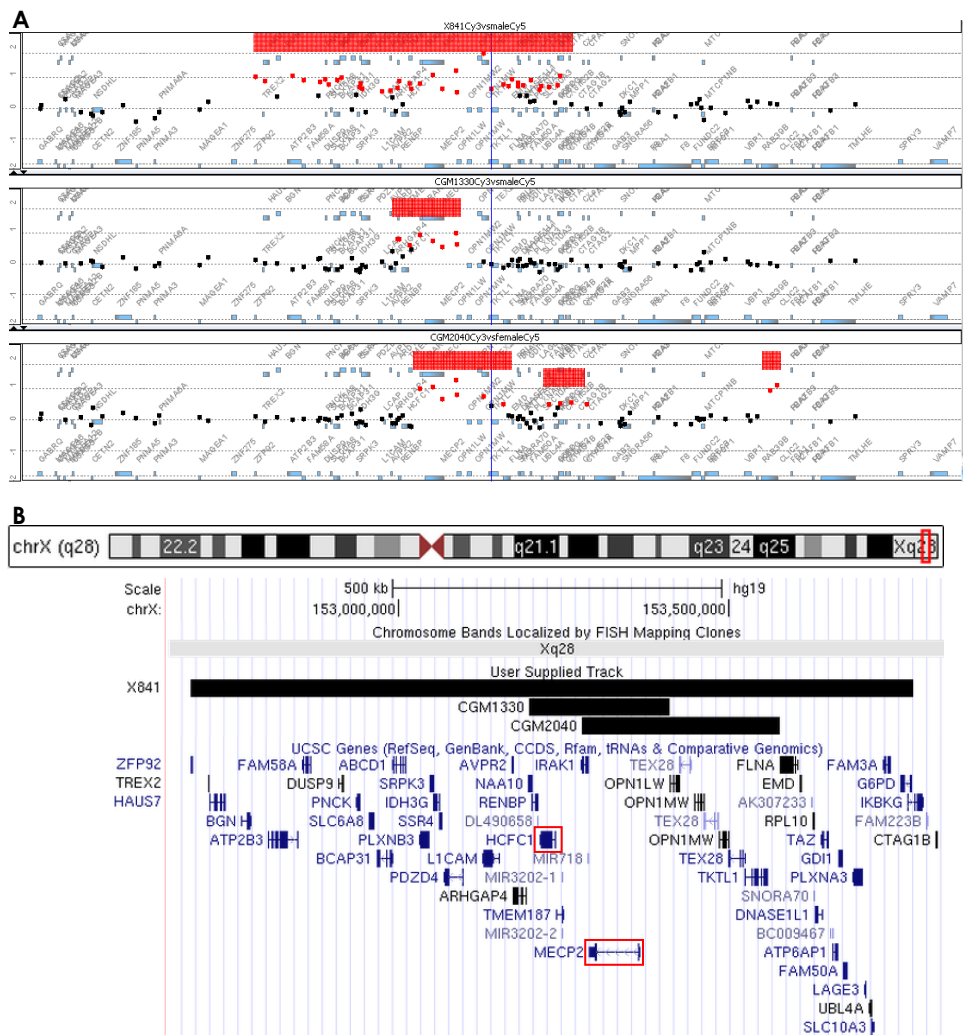


Figura 37: Duplicaciones detectadas en la región Xq28 que contienen al gen *MECP2*. (A) Representación obtenida del Workbench de las distintas duplicaciones de *MECP2* detectadas mediante CGH-array en muestras de DNA de tres pacientes distintos (X841, CGM1330 y CGM2040). (B) Imagen obtenida del UCSC donde se puede visualizar la región mínima alterada en cada caso (cuadro negro) y la posición de los genes contenidos (*MECP2* y *HCFC1* recuadrados en rojo).

Los pacientes X841 y CGM1330 son dos varones. En el análisis del DNA de ambos pacientes mediante el CGH-array comercial se detectaron distintas CNVs que afectaban tanto al gen *MECP2* como al gen *HCFC1*, un regulador transcripcional asociado a cromatina causante de diferentes trastornos del neurodesarrollo tanto por mutaciones de pérdida de función como de ganancia de función (Jolly *et al.*, 2015). Mediante el estudio por MLPA (P245 y P015) de la muestra de DNA de los pacientes y sus progenitores, además de confirmarse las duplicaciones, se pudo determinar en los dos casos que las alteraciones habían sido heredadas de sus madres, portadoras asintomáticas. Por otro lado, mediante FISH (sonda RP11-119A22) se pudo descartar que el segmento duplicado se localizara en otro *locus*.

Por otro lado, el caso CGM2040 se trata de una mujer. En el estudio por CGH-array comercial se detectó un reordenamiento complejo en la región Xq28, con un LogRatio en la región alterada que contenía al gen *MECP2* sugestivo de triplicación (LogRatio promedio 0.83 ± 0.29). Se utilizaron distintas técnicas para validar y complementar este resultado. Mediante MLPA (P245 y P015) se observó que la alteración era *de novo* y afectaba a *MECP2* e *IRAK1* pero no a otros genes de la región como *SLC6A8*, *IDH3G* y *L1CAM*. Además, al comparar el valor relativo de dosis de la región alterada en la paciente con varones y mujeres portadores de duplicación, el resultado obtenido con ambos MLPAs fue igualmente compatible con una triplicación. Este resultado fue confirmado utilizando PCR cuantitativa. Mediante FISH también se pudo descartar que este material extra se localizara en un autosoma, al observarse solo dos señales correspondientes a la sonda específica para *MECP2* que se localizaban en los cromosomas X. Además, dada la diferencia de intensidad entre ambas señales, el resultado era indicativo de que el reordenamiento se hubiera producido en tándem (figura 38).

Por regla general, las mujeres portadoras de duplicación en Xq28 son asintomáticas ya que presentan una inactivación sesgada del cromosoma X portador de la alteración. Para averiguar por qué nuestra paciente presentaba clínica compatible con el síndrome de Duplicación de *MECP2* (ver a continuación) se realizó el estudio de inactivación del cromosoma X en la paciente y su madre. Mientras que la paciente presentaba un ratio de inactivación de sus cromosomas X de 75:25, con una mayor inactivación del alelo materno, su madre tenía un porcentaje de inactivación cercano al 50 %. Por marcadores microsatélites no se pudo averiguar el origen parental de la alteración, por lo que se planteó una nueva estrategia para averiguarlo. Teniendo en cuenta el porcentaje de inactivación (metilación) de cada uno de los dos cromosomas X, se calculó de forma teórica el ratio de metilación esperado de la región promotora de *MECP2* considerando varias localizaciones posibles de las dos copias extras del gen (ambas en el cromosoma X de origen materno, una copia extra en cada cromosoma X, ambas en el cromosoma X de origen paterno o en un autosoma que no sufre el fenómeno de inactivación) (figura 39B). Para obtener este valor de nuestra muestra, con cebadores específicos de la región promotora de *MECP2*, localizados dentro de una isla CpG, se realizó el análisis de los niveles de metilación de forma análoga a la descrita para las regiones sometidas a impronta en una reacción multiplex semicuantitativa (apartado 15 de material y métodos), usando como referencia el promedio de los valores obtenidos para las regiones sometidas a impronta estudiadas (*H19*, *SNRPN* y *KCNQ1OT1*). Con esta estrategia se obtuvo un ratio

compatible con una triplicación de origen paterno (figura 39). Este caso, dada sus peculiaridades, fue publicado en 2011 (Mayo *et al.*, 2011).

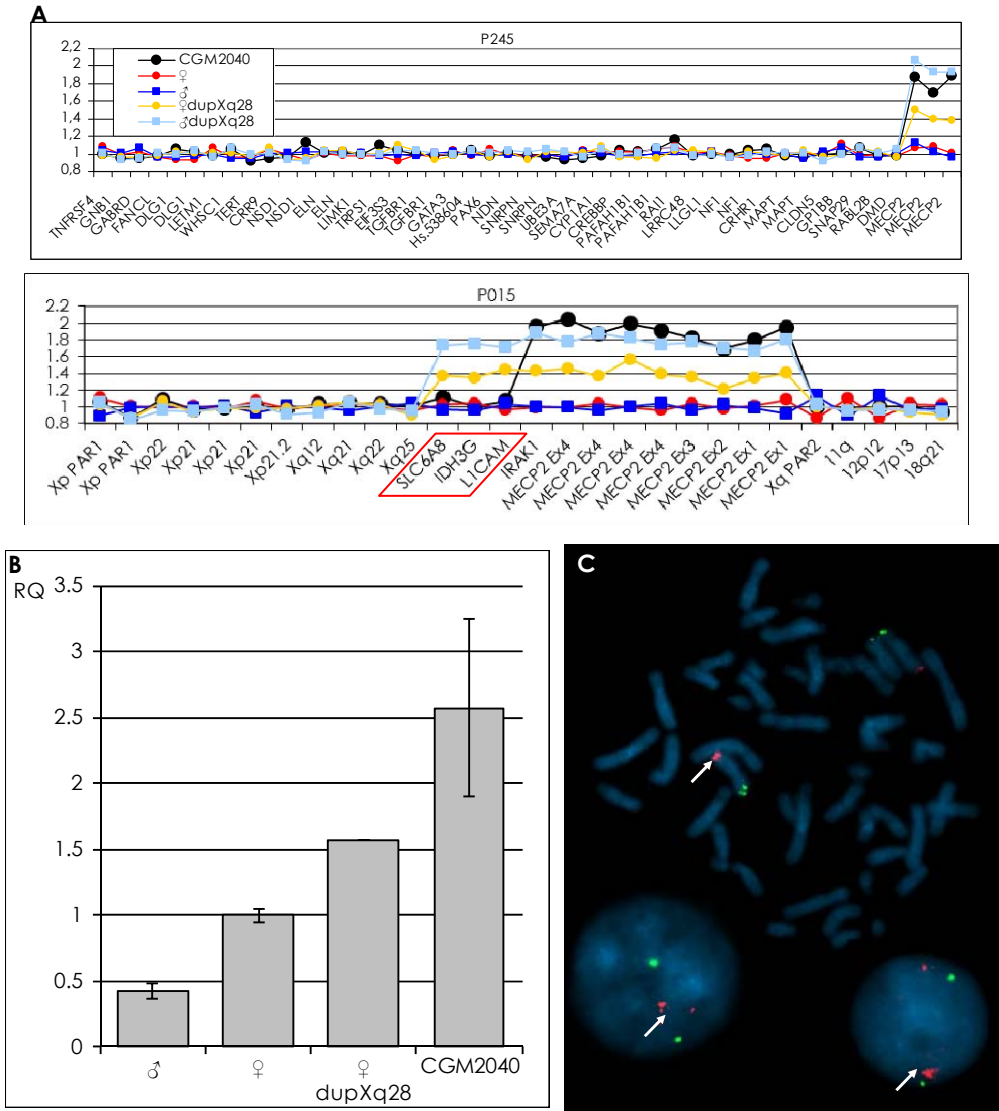


Figura 38: Estudios complementarios realizados en muestras de la paciente CGM2040. (A) MLPA (P245 arriba y P015 abajo) de la paciente, sus progenitores, y muestra control de varón afecto y mujer portadora. En un recuadro rojo se muestran los genes no alterados en la paciente y sí en las muestras control. (B) qPCR de cebadores específicos de *MECP2* usando como referencia la dosis de una región autosómica (gen *RABL5*) para calcular el dCt y el valor de mujer no portadora para calcular el ddCt. (C) FISH. Marcado en rojo el clon RP11-119A22 (localizado en *MECP2*) y en verde la sonda telomérica TelVisionXp/Yp. La flecha blanca indica las señales aumentadas de *MECP2* correspondientes a la triplicación. ♂: varón, ♀: mujer, ♂ dupXq28: varón afecto; ♀ dupXq28: mujer portadora; RQ: cuantificación relativa.

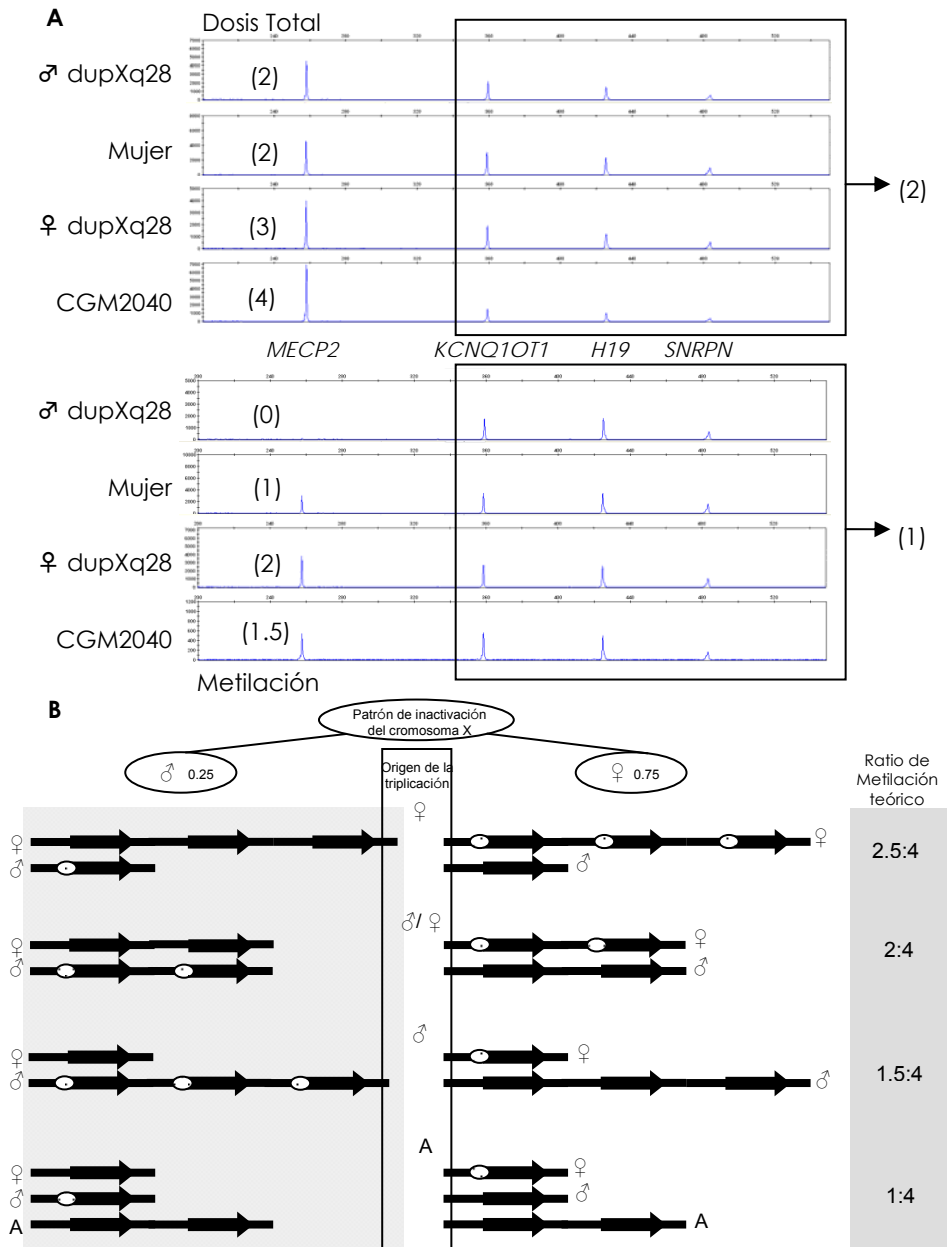


Figura 39: Representación de los resultados obtenidos en el análisis de metilación de la región promotora de *MECP2*. (A) Resultado de uno de los dos estudios de dosis y metilación de regiones improntadas realizados, incluyendo cebadores para la región metilada del promotor de *MECP2*. Entre paréntesis se indica la dosis génica en cada caso. (B) Diagrama de distintos ratios teóricos de metilación del promotor de *MECP2*, según la posible localización de la región triplicada, teniendo en cuenta el porcentaje de metilación de cada uno de los dos cromosomas X. La flecha negra representa al gen *MECP2* y el círculo moteado la región promotora metilada. ♂: cromosoma paterno; ♀ dupXq28: varón afecto; ♀: cromosoma materno; ♀ dupXq28: mujer portadora; A: autosoma.

Los tres pacientes presentan rasgos clínicos compatibles con el síndrome de Duplicación de MECP2, mostrando además la paciente CGM2040 otros rasgos que recuerdan al síndrome de Rett, con un desarrollo normal los primeros meses de vida, hasta que se produjo un estancamiento en el séptimo mes, o la presencia de estereotipias de lavado de manos (tabla 34).

Tabla 34: Comparativa de los rasgos clínicos asociados al síndrome de Duplicación de MECP2 con las características que presentan los tres casos detectados en nuestra serie.

Rasgos clínicos	Síndrome	X841	CGM1330	CGM2040 ¹
Tamaño (Kb)	variable (200 mínimo)	1096	212	300
Dosis	duplicación	duplicación	duplicación	triplicación
Género	varones	varón	varón	mujer
Rasgos faciales Orejas grandes Puente nasal hundido Prognatismo	variable	+	+	+
		+	-	+
		+	-	+
Deambulación	≥2 años	3 años	5 años	2 años
Lenguaje	ausente- escaso	ausente	ausente	escaso
DI	moderada- grave	grave	moderada	grave
TEA	+	+	+	-
Tono muscular	hipotonía	normal	hipertonía	normal
Convulsiones	+	-	+	+

¹Mayo *et al.*, 2011.

Negrita: Rasgos clínicos alterados en los tres casos.

1.2.2.2. MBD5

La proteína codificada por el gen *MBD5*, con un dominio MBD de unión a DNA metilado y un dominio PWWP que reconoce histonas metiladas, se asocia a heterocromatina (Laget *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). La haploinsuficiencia de este gen es responsable del síndrome de Delección 2q23.1 (OMIM 156200) que cursa con DI grave entre otros rasgos clínicos. Dentro de la región 2q31.1 se encuentra también el gen *EPC2*, homólogo humano de un componente de uno de los complejos acetiltransferasa de histonas en levadura (NuA4) (Doyon *et al.*, 2004).

En este trabajo hemos encontrado dos pacientes con alteraciones que contienen estos genes (figura 40).

El paciente CGM2402 presenta una delección de 3.8 Mb (chr2:148602407-152354323) que contiene 20 genes. Esta alteración fue confirmada mediante el estudio familiar con marcadores microsatélite (D2S2335). Este estudio permitió además determinar que se trataba de una alteración surgida *de novo* en el cromosoma de origen paterno.

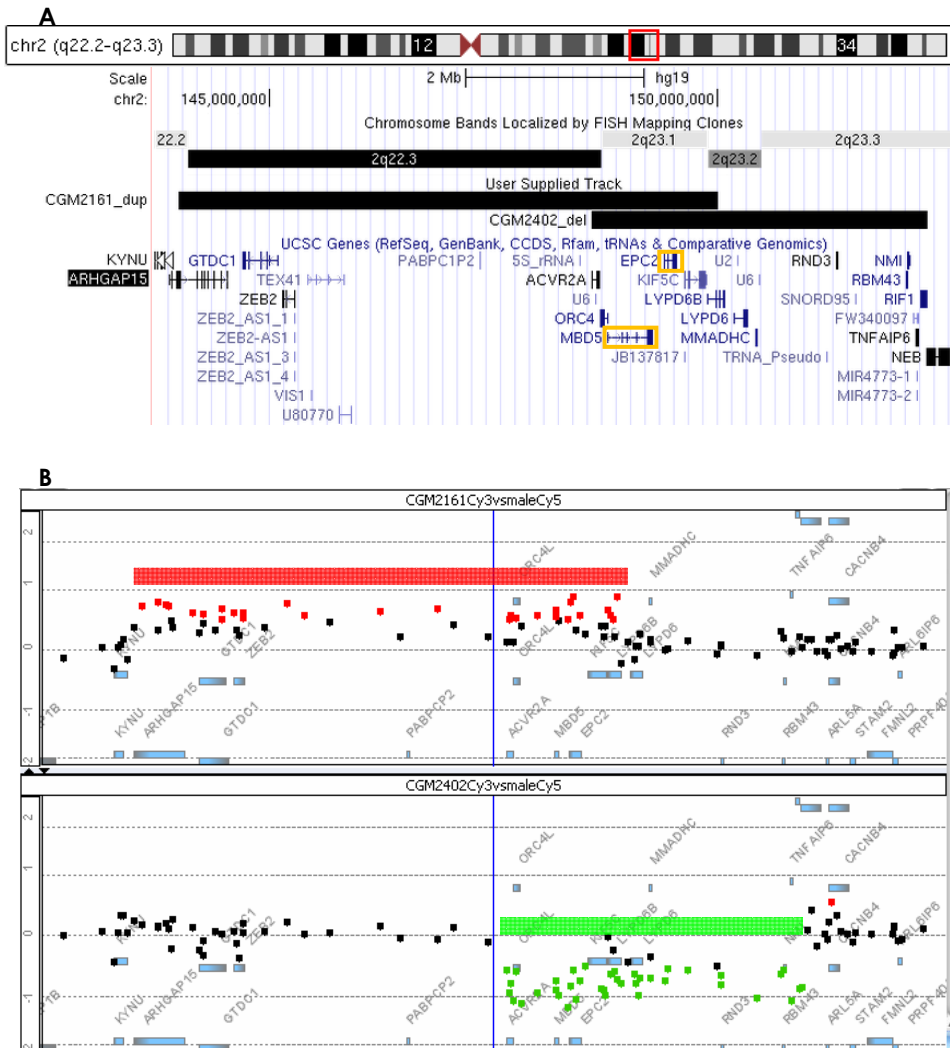


Figura 40: Representación de las CNVs detectadas en 2q23 que contienen al gen *MBD5*. (A) Representación obtenida del UCSC donde se puede visualizar la región mínima alterada en cada caso (cuadro negro) y la posición de los genes contenidos en la región (*MBD5* y *EPC2* recuadrados en naranja). (B) Imagen obtenida del Workbench, donde se muestra el resultado del análisis del CGH-array para esta región en el paciente CGM2161 (arriba) y CGM2402 (abajo). del: delección; dup: duplicación.

Por otro lado, el paciente CGM2161 presenta una duplicación de 6.0 Mb (chr2:143986161-150012071), que contiene 14 genes, incluyendo a *ZEB2* un represor transcripcional cuya haploinsuficiencia se asocia al síndrome de Mowat-Wilson (OMIM 235730), que cursa con DI. Tanto por PCR cuantitativa, como por estudio de segregación familiar de marcadores microsatélites (D2S151 y D2S2335) se pudo confirmar la alteración y determinar que se trataba de una CNV surgida *de novo* en el cromosoma de origen materno. Además, el resultado del estudio por FISH de la región era compatible con una duplicación en tándem.

Este caso se ha publicado recientemente dentro de una serie de pacientes que ha permitido describir la clínica asociada al síndrome de Duplicación 2q23.1 y compararlo con el síndrome de Delección (Mullegama *et al.*, 2014).

En la tabla 35 se encuentra, de forma resumida, los rasgos clínicos más relevantes de estos dos pacientes en comparación con los síndromes asociados a CNV en la región 2q23.1. La clínica asociada al síndrome de Duplicación 2q23.1 es ligeramente menos grave. Destaca que ambos pacientes presentan talla baja y microcefalia, rasgos característicos de la delección.

Tabla 35: Características principales de los síndromes de delección y duplicación de la región 2q23.1 en comparación con la clínica presentada por los dos pacientes con una CNV que afecta a gen *MBD5*.

Rasgos clínicos	S delección	CGM2402	CGM2161	S duplicación
Alteración <i>MBD5</i>	del	del	dup	dup
Talla baja	+	+	+	-
Microcefalia	+	+	+	-
Rasgos dismórficos	+	+	+	+
Anomalías congénitas				
Braquidactilia	+	+	-	-
Clinodactilia	+	+	5º dedo	5º dedo
DI	grave	grave	moderado	variable
Retraso motor	+	+ (D2a)	+ (D19m)	+
Retraso del lenguaje	grave	ausencia (4a)	ausencia (3a)	+
Alteraciones del comportamiento	+	+	+	+
TEA	+	-	+	+
Convulsiones	+	-	-	raro

a: años; D: deambulación; del: delección; dup: duplicación; m: meses.

1.2.2.3. *ATRX*

Utilizando el CGH-array comercial, se han detectado dos duplicaciones distintas que contienen al gen *ATRX* en dos varones, CGM3782 y XF1702 (figura 41). Las mutaciones o delecciones de este gen epigenético causa DI ligado al cromosoma X (apartado 3.1.4. de la introducción).

La duplicación presente en el paciente CGM3782 se localiza en Xq12-q21.1 con un tamaño de 12.6 Mb (chrX:65815490-78426724). Esta región contiene al menos 108 genes distintos, entre los que se encuentran 13 genes asociados a DI ligada al cromosoma X, incluyendo, además de *ATRX*, al menos 4 genes más cuya función está relacionada con la regulación epigenética:

- *HDAC8*: Se trata de un gen que codifica para una desacetilasa de histonas que actúa como represor transcripcional al participar en el proceso de compactación de la cromatina. Mutaciones en este gen se han asociado tanto al síndrome de Cornelia de Lange (OMIM 3008829), como al síndrome de Wilson-Turner (OMIM 309585), ambos con DI entre otros rasgos clínicos.

- *TAF1*: Codifica para la subunidad mayor del complejo TFIID, necesario para la función de la RNA polimerasa II, y es capaz de unirse a la histona H4 acetilada

gracias a sus bromodominos. Una inserción intrónica en este gen causa al síndrome de la distonía-parkinsonismo ligado al X (OMIM 314250).

- *ZMYM3*: Codifica para una proteína que forma parte de un complejo de desacetilasa de histonas y ha sido propuesto recientemente como gen candidato a DI por Philips *et al.* (2014).

- *MED12*: Este gen codifica para una proteína que forma parte del complejo mediador, que actúa de nexo entre distintos factores de transcripción y la RNA polimerasa II. MED12 interactúa directamente con EHMT2, una metiltransferasa de histonas, para la represión transcripcional de un subconjunto de genes específicos de neuronas (Ding *et al.*, 2008). Mutaciones en este gen pueden ocasionar trastornos como el síndrome de Lujan-Fryns, el síndrome de Opitz-Kaveggia o el síndrome de Ohdo (OMIM 309520, 305450, 300895) que cursan con DI.

Mediante MLPA (SALSA P106) se confirmó la alteración y se observó que se trata de una duplicación heredada de su madre, que no presenta síntomas, y en la que no se pudo determinar el grado de inactivación de cada uno de sus cromosomas X, dado que el marcador microsatélite del gen AR utilizado no era informativo.

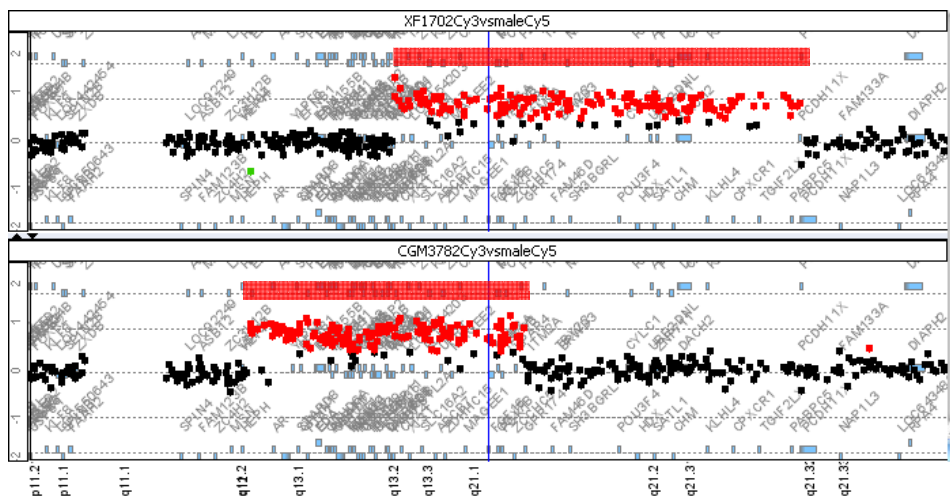


Figura 41: Representación de las duplicaciones detectadas mediante CGH-array que contienen al gen *ATRX*. Imagen obtenida del Workbench (XF1702 arriba y CGM3782 abajo). La posición del gen *ATRX* se encuentra marcada por la línea vertical azul.

El paciente XF1702 presenta una duplicación de mayor tamaño (18.7 Mb) en Xq13.2-q21.31 (chrX:72433198-91125471). Esta región contiene al menos 68 genes, que incluyen, además del gen *ATRX*, otros *loci* de interés:

- *BRWD3*: Gen asociado a DI (OMIM 300659), que codifica para una proteína con un bromodominio, implicada en la modificación de la cromatina.
- 7 genes más relacionados con DI ligada al cromosoma X (*SLC16A2*, *ZDHHC15*, *MAGT1*, *COX7B*, *ATP7A*, *PGK1* y *ZNF711*).
- TSIX y XIST, implicados en proceso de inactivación del cromosoma X.

- *NAP1L2* (OMIM 300026): gen que codifica para una proteína de ensamblaje del nucleosoma específica de neurona. En experimentos con ratones, se ha visto que esta proteína juega un papel importante en la regulación transcripcional durante la diferenciación neuronal a través del control de la acetilación de histonas (Attia *et al.*, 2007).

Dado el gran tamaño de la alteración se revisó el resultado obtenido del cariotipo del paciente confirmándose que la alteración era visible citogenéticamente. Tras realizar un cariotipo a los progenitores del paciente se observó que su madre también era portadora asintomática de la duplicación, por lo que se determinó el patrón de inactivación del cromosoma X, que era preferencial de uno de los dos cromosomas (100% metilado).

Tabla 36: Principales rasgos clínicos de los pacientes con duplicación de *ATRX* en comparación con la clínica asociada al síndrome ATR-X.

Rasgos clínicos	Síndrome	CGM3782	XF1702
Alteración <i>ATRX</i>	mutaciones/ deleciones	duplicación	duplicación
Genero	varones	varón	varón
Retraso del crecimiento	+	+	+
Microcefalia	+	+	+
Rasgos dismórficos			
Hipoplasia medio-facial	+	+	-
Orejas dismórficas	+	+	+
Ojos, párpados	+	+	-
Nariz	+	+	-
Boca	+	+	+
Micrognatia	+	+	+
Anomalías congénitas			
Genitales	+	+	+
Esqueléticas	+	+	-
Discapacidad intelectual	+	grave	moderado
Retraso motor	+	+	+
Lenguaje	+	ausente	muy limitado
Rasgos autistas	minoritario	+	-
Alteraciones del comportamiento	minoritario	+	+
Hipotonía	+	+	+

La mayoría de los rasgos clínicos de ambos pacientes son similares entre si y comunes a los presentes en pacientes con pérdida de función de este gen (tabla 36). Estos dos casos han sido publicados recientemente proponiendo a *ATRX* como principal gen responsable de la clínica de estos pacientes, sin excluir la contribución de otros genes duplicados (Martínez *et al.*, 2014).

1.2.2.4. CTCF

El paciente CGM3263, presenta una deleción de 1.4 Mb detectada mediante el CGH-array comercial en el cromosoma 16 (chr16:67316868-68712116) que afecta a 44 genes (figura 42). Dentro de esta región se encuentra el gen *CTCF*,

que codifica para un regulador transcripcional con dedos de zinc que puede unirse tanto a complejos de acetilasas como a desacetilasas de histonas, participando tanto en la activación como en la represión transcripcional. Mutaciones en este gen se asocian con DI, microcefalia, rasgos dismórficos y anomalías congénitas variables (OMIM 615502). Además la región delecionada también contiene otro gen epigenético, *PRMT7*, que codifica para una metiltransferasa de arginina que puede actuar sobre histonas (H3R2).

Mediante el estudio de segregación familiar con marcadores microsatélite (D16S3025, D16S3085 y D16S3107), además de confirmarse la alteración en el paciente, se pudo determinar que se trataba de un cambio surgido *de novo* en el cromosoma de origen materno.

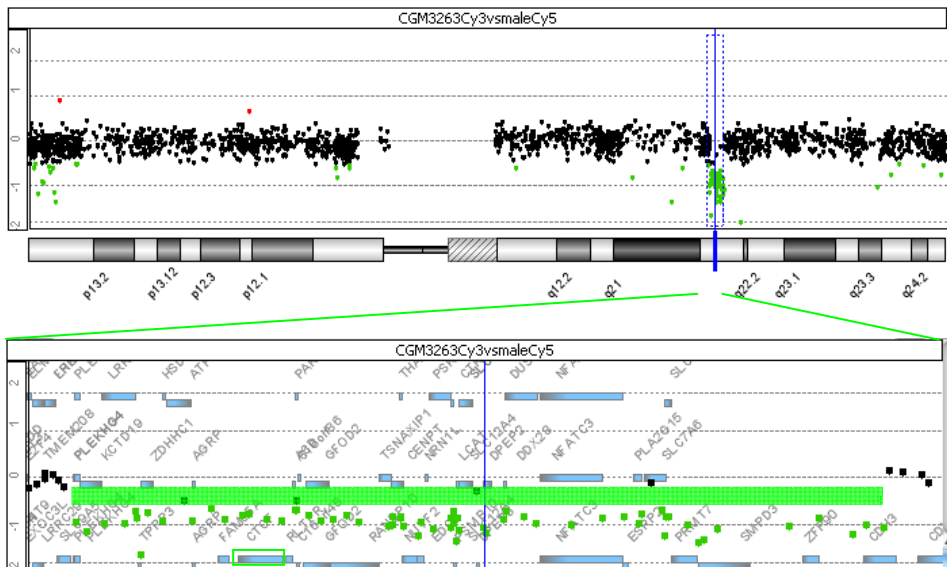


Figura 42: Representación de la deleción que afecta al gen *CTCF* en el paciente CGM3263. Imagen obtenida del Workbench donde la posición del gen *CTCF* se ha resaltado en la parte inferior con un recuadro verde.

La clínica que presenta el paciente es compatible con la descrita en otros casos con alteraciones en el gen *CTCF*. Nuestro paciente nació con hipotonía neonatal y con 13 años, aunque la hipotonía no persistía, presentaba microcefalia, DI leve, retraso motor y del lenguaje (deambulación a los 3 años y primeras palabras a los 4 años), estereotipias manuales, anomalías congénitas (aracnodactilia, pies valgus, hiperlaxitud ligamentosa, alteraciones cardiacas y criptorquidia intervenida) y rasgos dismórficos (anomalía de Pierre Robin, orejas de implantación baja, hipermetropía, ptosis palpebral en ojo izquierdo intervenida, nariz prominente y *filtrum* largo).

1.2.2.5. *RAD21*

En el análisis con la última versión del array de diseño propio se detectó en una paciente (3298) una deleción en el cromosoma 8 (chr8:117165801-119123513) de 2.0 Mb que afecta a 10 genes, incluido *RAD21* (figura 43) y corresponde a

una deleción parcial de la región delecionada en el síndrome de Langer Giedion (OMIM 150230).

El gen *RAD21* es un elemento fundamental del complejo de cohesinas, cuya principal función es la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis. Este gen se ha considerado como epigenético por su papel, junto con *CTCF*, en la estructuración del DNA. El síndrome de Cornelia de Lange (OMIM 614701), que se caracteriza por DI de grado variable, rasgos dismórficos faciales característico, retraso en el crecimiento, microcefalia y algunas anomalías congénitas (principalmente en manos y pies, pero también en distintos órganos), está causado por la haploinsuficiencia de *RAD21*, entre otras causas.

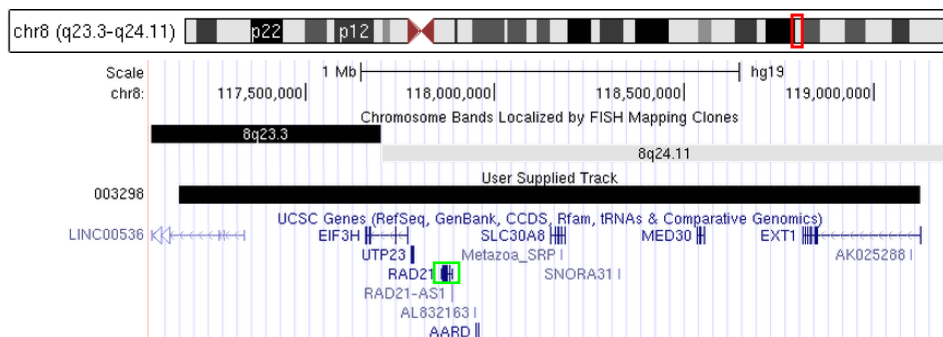


Figura 43: Representación de la deleción que contiene el gen *RAD21* en la paciente 3298. Imagen obtenida del UCSC, en la parte superior se encuentra el ideograma del cromosoma 8 y en la parte inferior se muestra la deleción mínima y los genes que contiene, destacándose *RAD21* en un recuadro verde.

La deleción detectada en esta paciente fue confirmada tanto por MLPA (SALSA P096) como por FISH (RP11-57A9). El estudio realizado en sus progenitores, permitió además determinar que se trataba de una alteración que había surgido *de novo* en ella (figura 44).

Dada la corta edad de la paciente en el momento de su evaluación (apenas 6 meses), no se pueden valorar muchos de los rasgos neurológicos (incluidos la DI, TEA o el retraso del lenguaje). No obstante, presentaba un fenotipo similar al síndrome de Cornelia de Lange, con retraso del crecimiento y psicomotor, microcefalia, hipotonía, rasgos dismórficos (orejas grandes, cejas muy espesas, hipotelorismo con ptosis palpebral, pestañas largas y abundantes, punta nasal grande y bulbosa con narinas hipoplásicas, columela marcada, labio superior fino y paladar ojival) y anomalías congénitas (hipertriosis, mamilas separadas, laringomalacia, reflujo vesico-uretral).

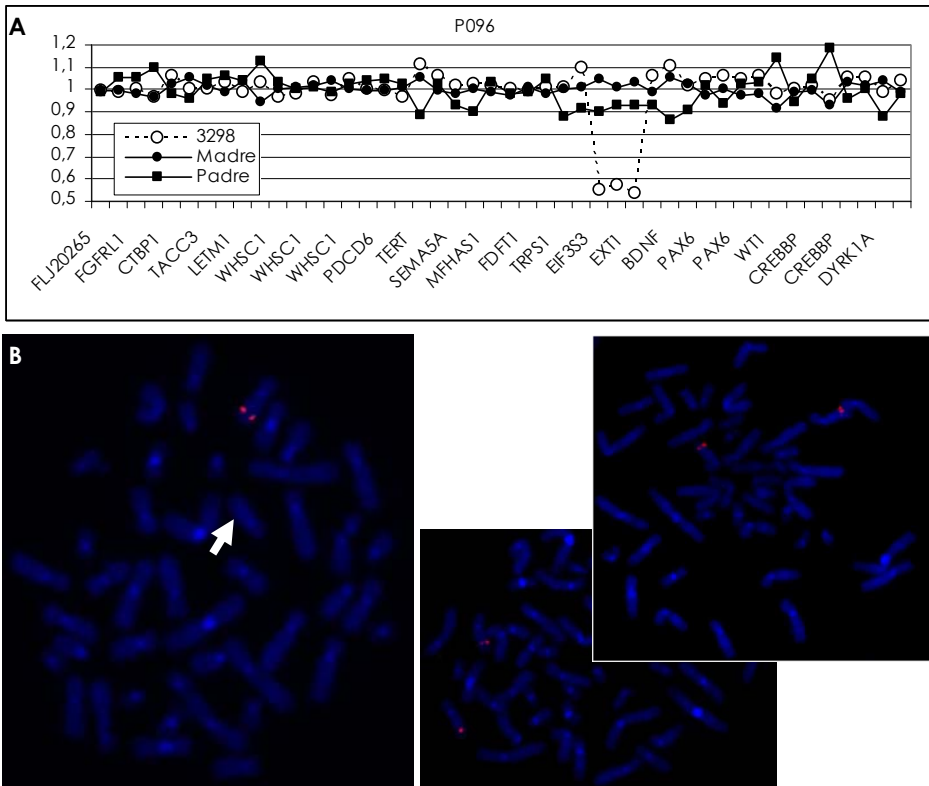


Figura 44: Estudios complementarios realizados en muestras de la paciente 3298. (A) MLPA (SALSA P096) de la paciente y sus progenitores. (B) FISH de la paciente (izquierda) y sus progenitores (derecha). Marcado en rojo el clon RP11-57A9 (localizado en *SLC30A8*). La flecha blanca indica el cromosoma 8 que contiene la delección, determinado mediante sonda control centromérica.

1.2.2.6. *ZBTB18*

En el estudio con la última versión del array de diseño propio se detectó en una paciente (5357) una delección en la región 1q44 de 1.0 Mb (chr1:244006388-245028327) que afecta a 10 genes, incluyendo a los genes *ZBTB18*, *AKT3*, *COX20* y *HNRNPU* (figura 45).

El gen *ZBTB18* codifica para una proteína con dedos de zinc tipo C2H2 que recluta complejos proteicos remodeladores de la cromatina, actuando como represor transcripcional de genes implicados en el desarrollo neuronal. Este gen está asociado al síndrome de genes contiguos de delección 1q44 (OMIM 612337), caracterizado por DI con lenguaje escaso o ausente, convulsiones, microcefalia, retraso del crecimiento, algunos rasgos dismórficos y agenesia del cuerpo calloso (ACC). Además el gen *AKT3*, una serin-treonin quinasa que participa en el desarrollo cerebral, se relaciona con la microcefalia de estos casos; y los genes *COX20* y *HNRNPU*, se asocian a las convulsiones (Ballif *et al.*, 2012).

Esta alteración fue confirmada por MLPA (SALSA P264), pudiendo, al realizar también el estudio en sus progenitores, determinar que se trataba de una alteración surgida *de novo* en la paciente.

La paciente 5357 presenta unas rasgos clínicos compatibles con el síndrome de deleción 1q44, con una DI grave, retraso motor (sedestación a los 12 meses sin deambulación) y ausencia del lenguaje, TEA, convulsiones febriles, importante microcefalia (41cm, percentil <3), talla baja (percentil <3) y algunos rasgos dismórficos (fisuras palpebrales hacia arriba, estrabismo divergente, raíz nasal ancha y labios gruesos). Por otro lado, en la RMN no se detectó ninguna alteración relevante.

Además en nuestra serie también encontramos otro caso, publicado en 2009, (paciente CGM1527) con una deleción *de novo* en la región 1q44 (chr1:244571975-245724815) de 1.2 Mb que afecta a 9 genes entre los que no se incluye *ZBTB18* (figura 45). El paciente CGM1527 presenta rasgos clínicos asociados al síndrome de deleción 1q44 pero con una afectación más leve (DI leve, retraso del lenguaje, convulsiones febriles, talla baja (percentil 3) y algunos rasgos dismórficos y anomalías congénitas que no incluyen la agenesia del cuerpo calloso (Orellana *et al.*, 2009).

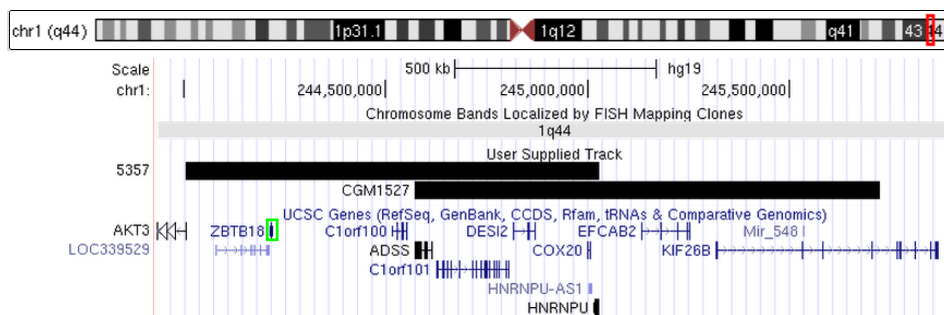


Figura 45: Representación de las deleciones en 1q44. Imagen obtenida del UCSC, en la parte superior se encuentra el ideograma del cromosoma 1 y en la parte inferior se muestra la localización de las deleciones detectadas en los pacientes 5357 y CGM1527, destacándose *ZBTB18* en un recuadro verde.

1.2.2.7. *RAI1*

En la paciente CGM3244, utilizando el array comercial, se detectó una deleción de 3.4 Mb en el cromosoma 17 (chr17:16822683-20193169) que contiene 67 genes, incluyendo al gen *RAI1*. Este gen participa en la regulación transcripcional, contribuyendo en los procesos de remodelación de la cromatina. Su haploinsuficiencia causa el síndrome de Smith-Magenis (OMIM 182290), que se caracteriza por DI con retraso motor y del lenguaje graves, alteraciones del comportamiento, y algunos rasgos dismórficos, además de poder presentar en un alto porcentaje de casos (50-75 %) otras rasgos como anomalías esqueléticas, hipoacusia o estatura baja antes de la edad adulta.

Mediante el estudio con técnicas complementarias de la paciente y sus progenitores (MLPA SALSA P245), se pudo confirmar la alteración y determinar que había surgido *de novo* en ella.

Muchos de los rasgos clínicos que presenta esta paciente son compatibles con el síndrome de Smith-Magenis: DI grave con retraso del motor (deambulación a los 18 meses) y ausencia del lenguaje a los 15 años de edad, trastornos del comportamiento y rasgos autistas, con microcefalia, talla y peso bajos (percentil <3), rasgos dismórficos (asimetría facial, orejas dismórficas, sinofridia, fisuras

palpebrales estrechas y hacia abajo, estrabismo divergente, raíz nasal ancha, *filtrum* corto, labio superior fino, fisura palatina y mentón prominente), anomalías congénitas (manos toscas con braquidactilia y pliegue simiesco, escoliosis y cifosis, alteración en los genitales e hipertricosis) e hipoacusia. Las pruebas de imagen (EEG, TAC y RMN) fueron normales.

1.2.2.8. *ARID1B*

La paciente CGM2428 presenta una delección *de novo* que afecta parcialmente al gen *ARID1B* detectada por ambos arrays (chr6:157357928-157454332). Este gen, considerado como epigenético al codificar para una proteína que forma parte del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF, ha sido recientemente asociado al síndrome de Coffin-Siris (Tsurusaki *et al.*, 2012; Santen *et al.*, 2012 y 2014). Este caso cuya delección conlleva la formación de un gen quimera se desarrolla más adelante en el apartado 1.5.2.2.2. de resultados. No obstante, muchos de los rasgos que presenta la paciente son achacables a la haploinsuficiencia de este gen.

1.2.2.9. *HDAC4*

En el análisis con el array comercial se detectaron 2 delecciones diferentes en 2q37 que contenían al gen *HDAC4*. Como ya se ha comentado en la introducción (apartado 3.1.3.), la haploinsuficiencia de este gen, una desacetilasa de histonas, causa el síndrome de Braquidactilia con DI. Además, también se detectaron otras dos duplicaciones distintas que afectan a *HDAC4*: una duplicación completa detectada por el array comercial y una parcial utilizando el array de diseño propio (figura 46).

En el paciente CGM2143, se detectó, con el array comercial, una delección terminal en el cromosoma 2 de 4.6 Mb (chr2:238619349-243199373). Esta alteración contiene 72 genes, dentro de los cuales, además de *HDAC4*, se encuentra *ING5* que codifica para una proteína con dominios tipo PHD que se asocia a complejos específicos de modificación de histonas como distintas acetiltransferasas. Utilizando marcadores microsatélite (D2S2285, D2S140 y D2S2585) se pudo confirmar la alteración y determinar que se trataba de una delección *de novo* en el cromosoma de origen paterno (figura 47).

En el estudio de DNA del paciente CGM3785 con el array comercial se detectó la presencia de dos alteraciones terminales, una delección en 2q37 de 8.9 Mb que contenía al menos a 103 genes y una duplicación en 15q26.3 de 738 Kb que afectaba a 21 genes [arr 2q37(234,343,084-243,199,373)x1, 15q26.3(101,793,090-102,531,392)x3] compatible con una translocación. Se realizó un análisis por FISH empleando sondas teloméricas (Tel 2q y Tel 15q) sobre extensiones de células en metafase del paciente y sus progenitores confirmándose que el paciente presentaba un cromosoma derivado heredado de su madre [46,XY,der(2)t(2;15)(q37;q26.3)mat], portadora equilibrada de una translocación recíproca (46,XX,t(2;15)(q37;q26.3)). Además, en el estudio por cariotipo y FISH en muestra de su hermana se observó que había heredado de su madre el cromosoma derivado complementario, con delección de la región 15q26.3 y duplicación de la región 2q37 que contenía a *HADC4* [46,XX,der(15)t(2;15)(q37;q26.3)mat], presentando ésta anomalías cardíacas y renales pero con un desarrollo neurológico normal con 5 años y medio de edad.

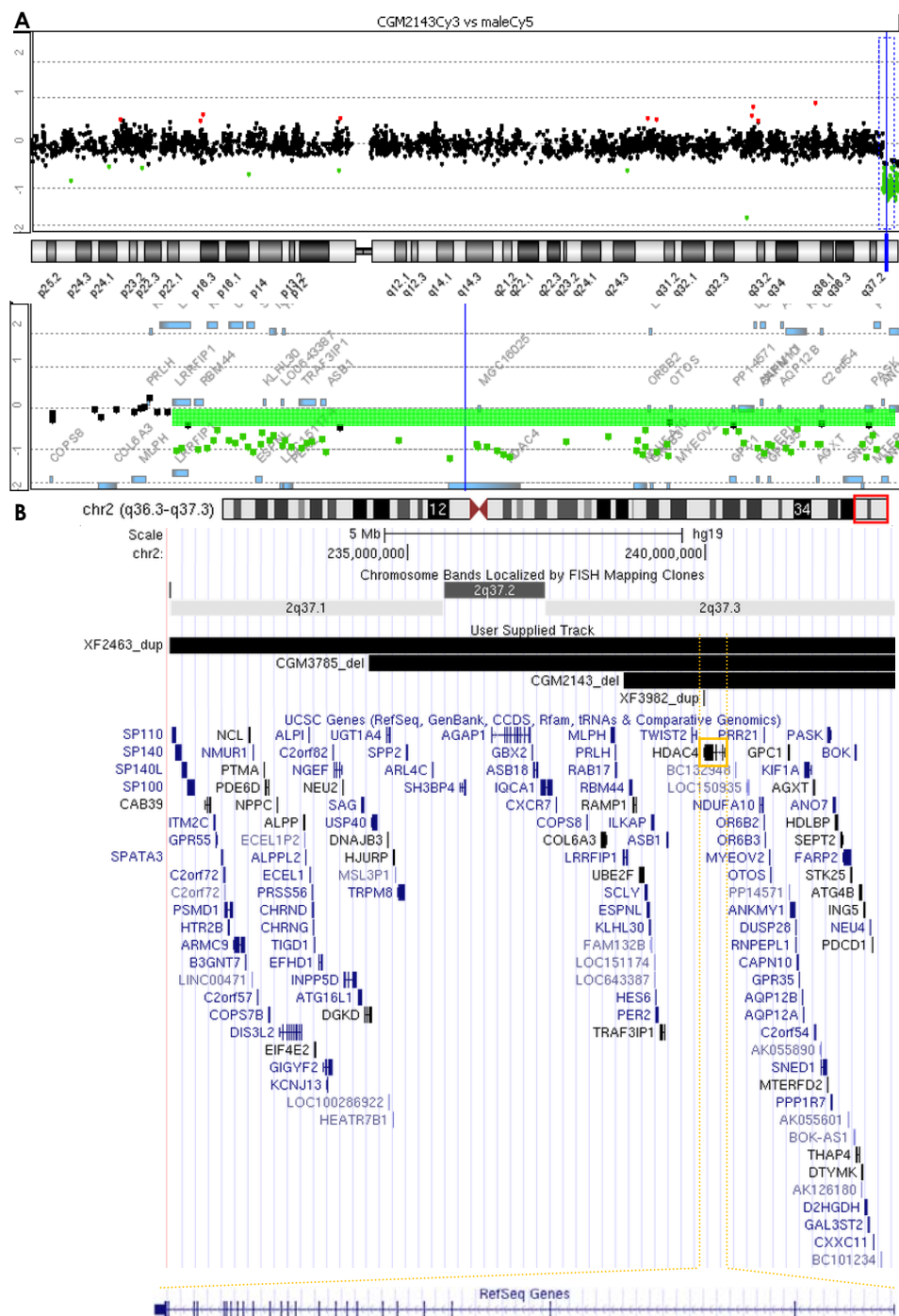


Figura 46: Representación de los cambios de dosis detectadas que afectan al gen *HDAC4*. (A) Ejemplo del resultado obtenido en el análisis por CGH-array para el paciente CGM2143. (B) Imagen obtenida del UCSC donde se puede visualizar las regiones mínimas alterada en los cuatro casos (CGM3785, CGM2143, XF2463 y XF3982) que afectan al gen *HDAC4*, recuadrado en naranja y representado abajo.

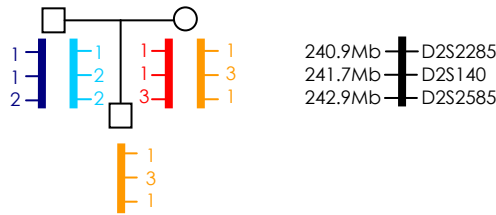


Figura 47: Estudio de segregación familiar con marcadores microsatélite en la región 2q37 del paciente CGM2143.

Por otro lado, en el análisis mediante el array comercial en muestra del DNA del paciente XF2463, se detectó una deleción de 2.3 Mb en el extremo 2p25 de 12 genes anotados que incluye el gen *MYT1L* (apartado 1.2.3.6. de resultados) y una duplicación de 12.2 Mb en el extremo 2q37 de 159 genes, incluyendo a *HDAC4* [arr 2p25.3(39,193-2,325,614)x1, 2q37(230,994,184-243,041,364)x3]. Mediante el estudio del paciente y sus progenitores por FISH y marcadores microsatélites (D2S2393, D2S2968 y D2S2585), se pudo averiguar que se trataba de una alteración *de novo* que se debía a un cromosoma 2 derivado (figura 48).

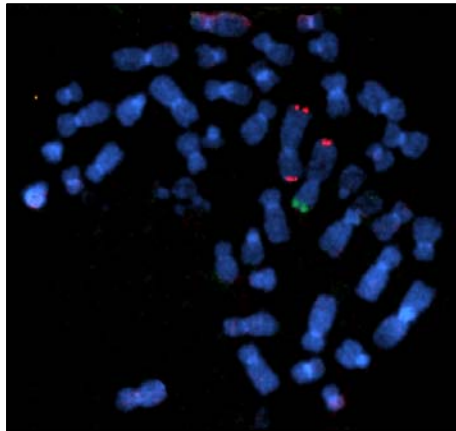


Figura 48: Resultado del FISH en el paciente XF2463. Se utilizaron sondas teloméricas (2q marcado en rojo y 2p marcado en verde). El cromosoma derivado tiene 2 señales rojas del telómero q con ausencia de señales verdes del telómero p.

Finalmente, en el análisis con el array de diseño propio de muestra de DNA del paciente XF3982 se detectó una duplicación de 81 sondas contenidas en los últimos tres exones del gen *HDAC4* (chr2:239969870-239976515) (figura 49). También se realizó el estudio por array de la muestra de sus progenitores observándose que el padre era portador de la misma duplicación. En la base de datos DECIPHER se ha descrito un caso con DI y una duplicación similar heredada de un progenitor y clasificada como una alteración de significado incierto (DECIPHER 282351). Dado el carácter heredado de la alteración y la existencia en población sana de al menos una duplicación parcial del gen que contenían esta región (nsv818118), esta CNV fue clasificada como una variante de efecto desconocido.

RESULTADOS

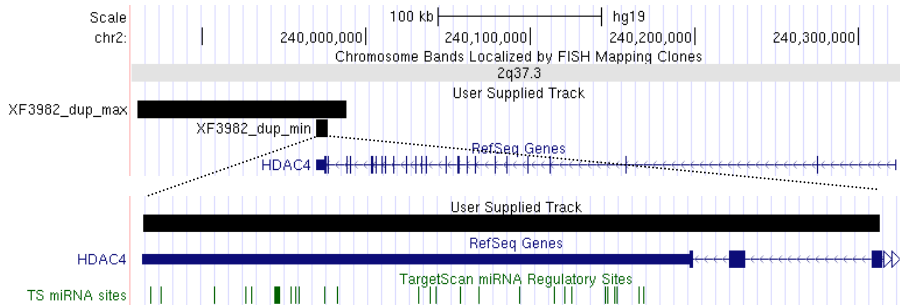


Figura 49: Duplicación parcial de *HDAC4* en el paciente XF3982. Imagen del UCSC donde se representa el tamaño máximo (max) y mínimo (min) de la duplicación (dup). En la parte inferior se puede ver una ampliación de la duplicación mínima, los exones afectados del gen y las posibles regiones diana para miRNAs en la región 3'UTR del gen.

Tabla 37: Características principales del síndrome de Braquidactilia con DI en comparación con la clínica presentada por los pacientes con alteración en el gen *HDAC4*.

Rasgos clínicos	Síndrome	CGM2143	CGM3785	XF2463	XF3982
Alteración <i>HDAC4</i>	mut/del	del	del	dup	dup parcial
Talla baja	+	+	+	nd	-
Obesidad	+	-	-	-	-
Hipotonía	+	neonatal	+	+	-
Rasgos dismórficos					
Cara redondeada	+	-	-	+	-
Frente abultada	+	-	-	-	-
Orejas dismórficas	+	+	-	+	-
Cejas arqueadas	+	+	-	-	-
Ojos, hundidos	+	-	-	-	-
Fisuras palpebrales ↑	+	-	-	+	-
<i>Epicanthus</i>	+	+	-	-	+
Alas nasales hipoplásica	+	+	-	-	-
Columela prominente	+	-	+	-	-
Labio superior fino	+	-	-	-	-
Anomalías congénitas					
Braquimetafalangia 3-5D	+	-	+	-	-
Hiperlaxitud articular	+	+	+	-	-
Cardiopatía	+	-	+	-	-
Escoliosis	+	-	+	-	-
Discapacidad intelectual	+	+	+	+	nv
Rasgos autistas	+	+	-	-	+

D: dedo; del: delección; dup: duplicación; mut: mutación; nd: dato no disponible; nv: dato no valorable; ↑: hacia arriba.

Los dos pacientes con delección del gen *HDAC4* presentan algunos rasgos clínicos característicos del síndrome asociado, mientras que los pacientes con duplicación de este gen presentan características más inespecíficas (tabla 37). También hay que tener en cuenta que dos de estos casos (CGM3785 y XF2463)

son portadores de cromosomas derivados con afectación de un gran número de genes que pueden contribuir a su clínica.

1.2.2.10. *EHMT1*

En nuestro trabajo, en dos pacientes no relacionados (CGM1388 y CGM1397), se detectaron dos deleciones terminales distintas que afectan al gen *EHMT1* (figura 50). Como ya se ha indicado en la introducción (apartado 3.1.2.), este gen codifica para una metiltransferasa de histonas y se considera responsable del síndrome de Kleefstra tanto por deleciones, translocaciones o mutaciones puntuales.

Mediante MLPA (SALSA P036) y FISH con sondas teloméricas del cromosoma 9, se confirmaron las alteraciones y que ambas se habían producido *de novo* en los pacientes. Además, realizando un análisis de segregación con marcadores microsatélites (D9S1090 y D9S1838) se pudo determinar que ambas CNVs eran de origen paterno.

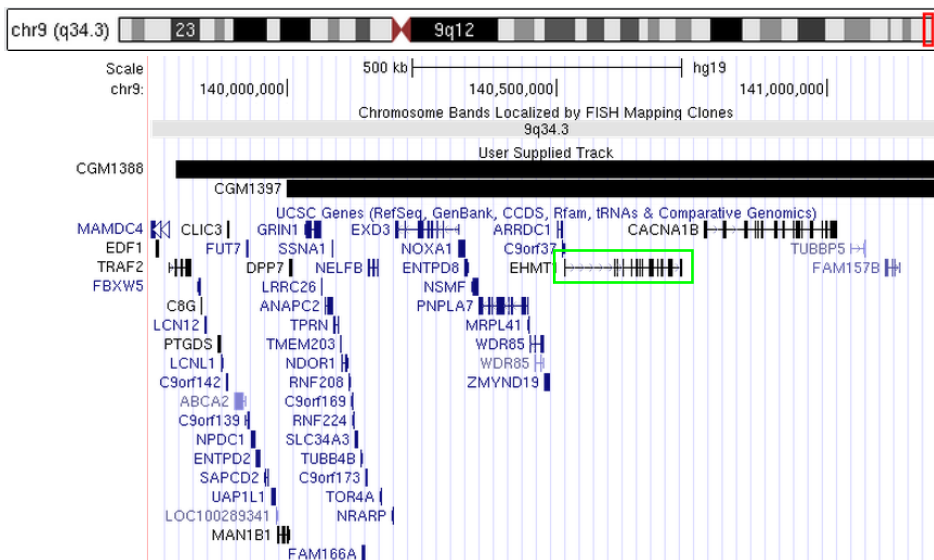


Figura 50: Representación de las deleciones que afectan al gen *EHMT1*. Imagen obtenida del UCSC donde se puede visualizar, la región mínima alterada en cada caso (cuadro negro) y la posición de los genes contenidos en la región estando el gen *EHMT1* recuadrados en verde.

Ambos casos presentan una clínica compatible con el síndrome de Kleefstra: con DI, retraso motor (deambulación >2 años), grave afectación del lenguaje (escaso o ausente) y algunos trastornos del comportamiento; además de varias anomalías congénitas que pueden estar presentes en esta patología (tabla 38).

Tabla 38: Características principales del síndrome de Kleefstra en comparación con la clínica presentada por los pacientes con delección del gen *EHMT1*.

Rasgos clínicos	Síndrome	CGM1388	CGM1397
Alteración <i>EHMT1</i>	mut/del	del	del
Hipotonía	+	+	-
Microcefalia	+	-	+
Obesidad	~50 %	-	-
Rasgos dismórficos			
Hipoplasia medio-facial	+	-	-
Sinofridia	+	-	-
Labio en arco de cupido	+	-	-
Labio inferior evertido y grueso	+	-	-
Macroglosia	+	+	-
Prognatismo	+	+	-
Anomalías congénitas			
Alteraciones cardiacas	~50 %	-	+
Problemas de audición	variable	sordera	sordera
Infecciones de repetición	variable	-	+
Anomalías dentarias	variable	-	+
Discapacidad intelectual	severa-moderada	leve	grave
Retraso motor	+	+	+
Retraso grave del lenguaje	+	+	+
Alteraciones del comportamiento	+	+	+
Convulsiones	30 %	-	+

1.2.2.11. *HUWE1*

En el análisis por CGH-array del paciente XF2761, se detectaron dos duplicaciones en el cromosoma X: una de 605 Kb en Xp11.3 que afecta a dos genes y otra de 101 Kb en Xp11.22 que contiene 14 genes, entre los que se incluyen cuatro relacionados con la regulación epigenética, asociados a DI ligada al cromosoma X síndrómica (figura 51):

- *HUWE1* (OMIM 300697): Codifica para una E3 Ubiquitin-ligasa y, entre otras funciones, participa en la ubiquitinación de histonas. Alteraciones en este gen se asocian a DI, tanto por pérdida de función (OMIM 300706), como por duplicación (Froyen *et al.*, 2012), siendo el principal gen candidato definido por la región mínima que causa DI.

- *KDM5C* (OMIM 314690): Da lugar a una proteína con dominios PHD y actividad H3K4 tri-demetilasa que ocasiona a DI síndrómica tipo Claes-Jensen (OMIM 300534).

- *PHF8* (OMIM 300560): La proteína codificada por este gen es un desmetilasa de histonas que actúa sobre residuos de lisina. La DI tipo Siderius (OMIM 300263) está causada por alteraciones en este gen.

- *SMC1A* (OMIM 300040): Participa en la cohesión de las cromátidas hermanas durante el ciclo celular. Mutaciones en este gen son una de las causas del síndrome de Cornelia de Lange (OMIM 300590).

Además, esta región contiene al gen *HSD17B10* cuyas mutaciones también causan un trastorno neurológico con DI (OMIM 300438).

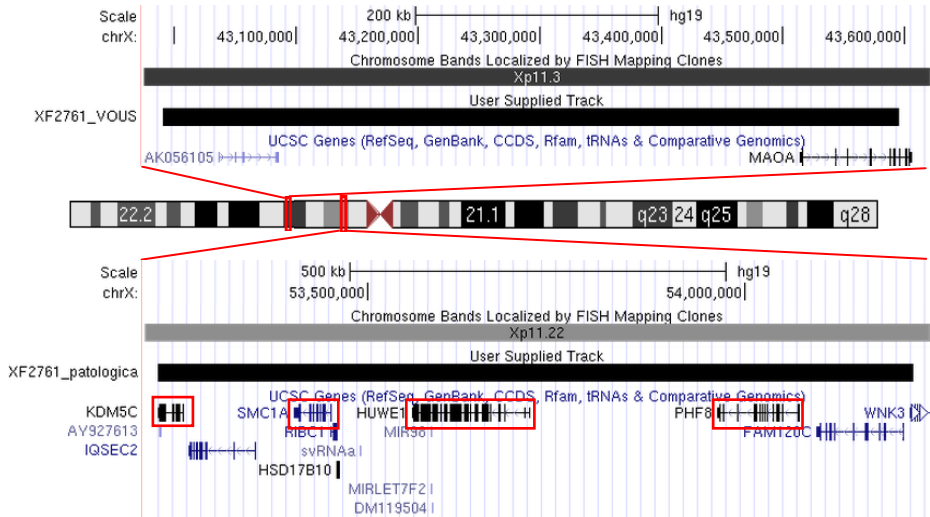


Figura 51: Representación de las dos duplicaciones en el cromosoma X detectadas en el paciente XF2761. Imagen modificada del UCSC, en la parte central se encuentra el ideograma del cromosoma X, donde dos recuadros rojos indican la posición de las regiones alteradas: arriba la duplicación en Xp11.3 y abajo la duplicación en Xp11.22 que contiene a los genes *KDM5C*, *SMC1A*, *HUWE1* y *PHF8* (recuadrados en rojo).

Ambas alteraciones fueron confirmadas por distintas técnicas (PCR semicuantitativa para la primera y marcadores microsatélite y MLPA (SALSA P106) para confirmar la segunda CNV). El estudio del paciente y sus progenitores, permitió determinar que se trataba de duplicaciones heredadas de su madre, que presentaba una inactivación preferencial de uno de sus cromosomas X.

Este paciente presenta un fenotipo similar al síndrome de Williams, con una DI leve, retraso del desarrollo motor y del lenguaje (deambulación a los 19 meses y primeras palabras a los 3 años), alteraciones del comportamiento, convulsiones, anomalías congénitas (cardíacas y renales) y orejas dismórficas y de implantación baja.

1.2.3. Genes epigenéticos candidatos a DI

Para la búsqueda de genes epigenéticos candidatos de trastornos del neurodesarrollo, se realizó un análisis sistemático a partir del listado recopilatorio de genes de la maquinaria epigenética realizado en el presente trabajo (anexo X) en las CNVs patológicas. El resultado obtenido fue revisado exhaustivamente, incluyendo además algún gen de especial interés que se encontraba alterado en CNVs no clasificada como patológica pero que podría contribuir a la clínica del paciente portador (pip y VOUS). En base a esto se proponen 8 genes distintos afectados en 14 CNVs de nuestra serie (tabla 39).

Tabla 39: Listado de los casos con alteraciones que contienen genes epigenéticos candidatos de DI.

Paciente	Alteración			Epigenética		
	CNV	Coordenada mínima (hg19)	Genes	Gen	OMIM	Función
CGM2350	duplicación	chr2:24480866-37896840	131	<i>DNMT3A</i>	615879	Metilación del DNA
CGM1525	duplicación	chr4:1389650-2502695	21	<i>WHSC1</i>	194190	Modificación de histonas
CGM897	delección	chr4:0-3770271	70			
CGM2135	delección	chr4:0-2110334	46			
XF2623	delección	chr12:122227674-123370690	26	<i>SETD1B</i>	611055	
CGM2353	delección	chr12:121001126-129467568	107	<i>PRDM13</i>	-	
CGM1414	delección	chr6:93875961-103179934	29			
XF1774	delección	chr6:93875961-104137788	29			
6186	delección	chr6:84527142-108400331	97	<i>ANKRD12</i>	610616	Remodelación de la cromatina
CGM708	duplicación	chr18:9182473-9477374	3			
XF2463	delección	chr2:0-2325614	12			
CGM1778	delección	chr2:1844493-1983593	1	<i>MYT1L</i>	613084	
CGM2451	delección	chr18:66753631-78077248	50	<i>SALL3</i>	605079	
CGM2103	duplicación	chr22:18896972-20900660	52	<i>DGCR8</i>	188400	Procesamiento de ncRNA

1.2.3.1. DNMT3A

En el estudio de DNA de la paciente CGM2350 por CGH-array se detectó una duplicación de 13.4 Mb en el cromosoma 2 (chr2:24480866-37896840) que contiene 131 genes (figura 52). Esta alteración incluye a *DNMT3A* que codifica para una DNA metiltransferasa *de novo* esencial para el establecimiento de los patrones de metilación del DNA durante el desarrollo. Mutaciones de pérdida de función en este gen se asocian al síndrome Tatton-Brown-Rahman (OMIM 615879), síndrome de herencia autosómico-dominante que cursa con talla alta, macrocefalia y rasgos faciales característicos, además de la DI.

No obstante, la duplicación contiene además otros genes epigenéticos, como *DPY30*, componente de un complejo metiltransferasa de histonas; *NCOA1*, con actividad histona acetiltransferasa; *SUPT7L*, componente de un complejo acetiltransferasa de histonas y *BRE*, que forma parte de un complejo que reconoce y desubiquitina a H2K63; así como varios genes más asociados al neurodesarrollo.

Mediante el estudio familiar por marcadores microsátelites (D2S144, D2S2247, D2S367) se confirmó la alteración en la paciente y que había surgido *de novo* en la misma.

Esta paciente, presentaba DI leve con retraso del desarrollo motor y del lenguaje (deambulación a los 22 meses, inicio del habla después de los 3 años), talla baja (percentil <3), microcefalia y algunos rasgos dismórficos (cara triangular con labios en forma de V invertida y micrognatia).

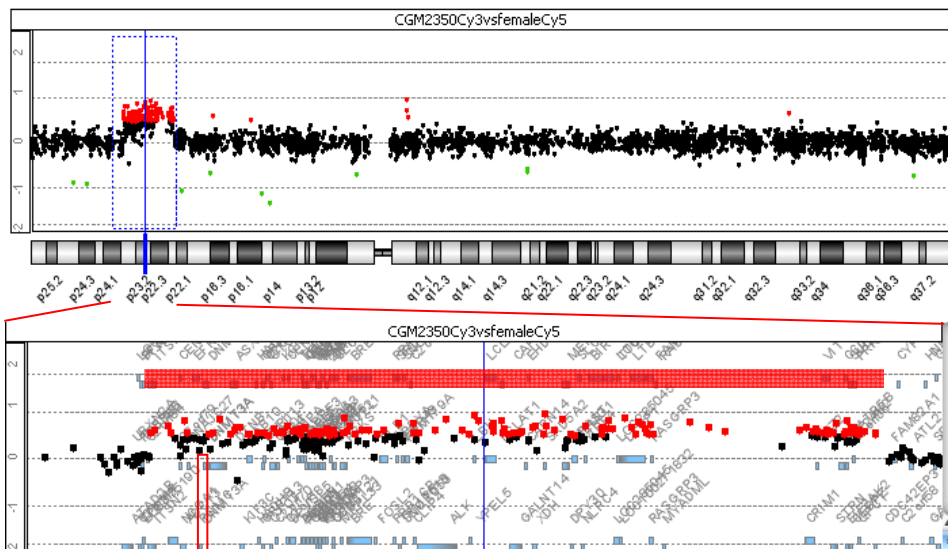


Figura 52: Representación de la duplicación que contiene el gen *DNMT3A* en la paciente CGM2350. Imagen obtenida del Workbench donde la posición del gen *DNMT3A* se ha resaltado con un recuadro rojo.

1.2.3.2. WHSC1

Se han detectado tres alteraciones distintas en 4p16.3, que contienen la región crítica del síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH, OMIM 194190). Este síndrome se caracteriza por DI, retraso grave en el crecimiento pre- y postnatal y del

desarrollo psicomotor, hipotonía y convulsiones, con unos rasgos faciales característicos ("casco de guerrero griego"). Las CNVs detectadas en nuestra serie incluyen a los dos genes candidatos de esta región (figura 53). El gen

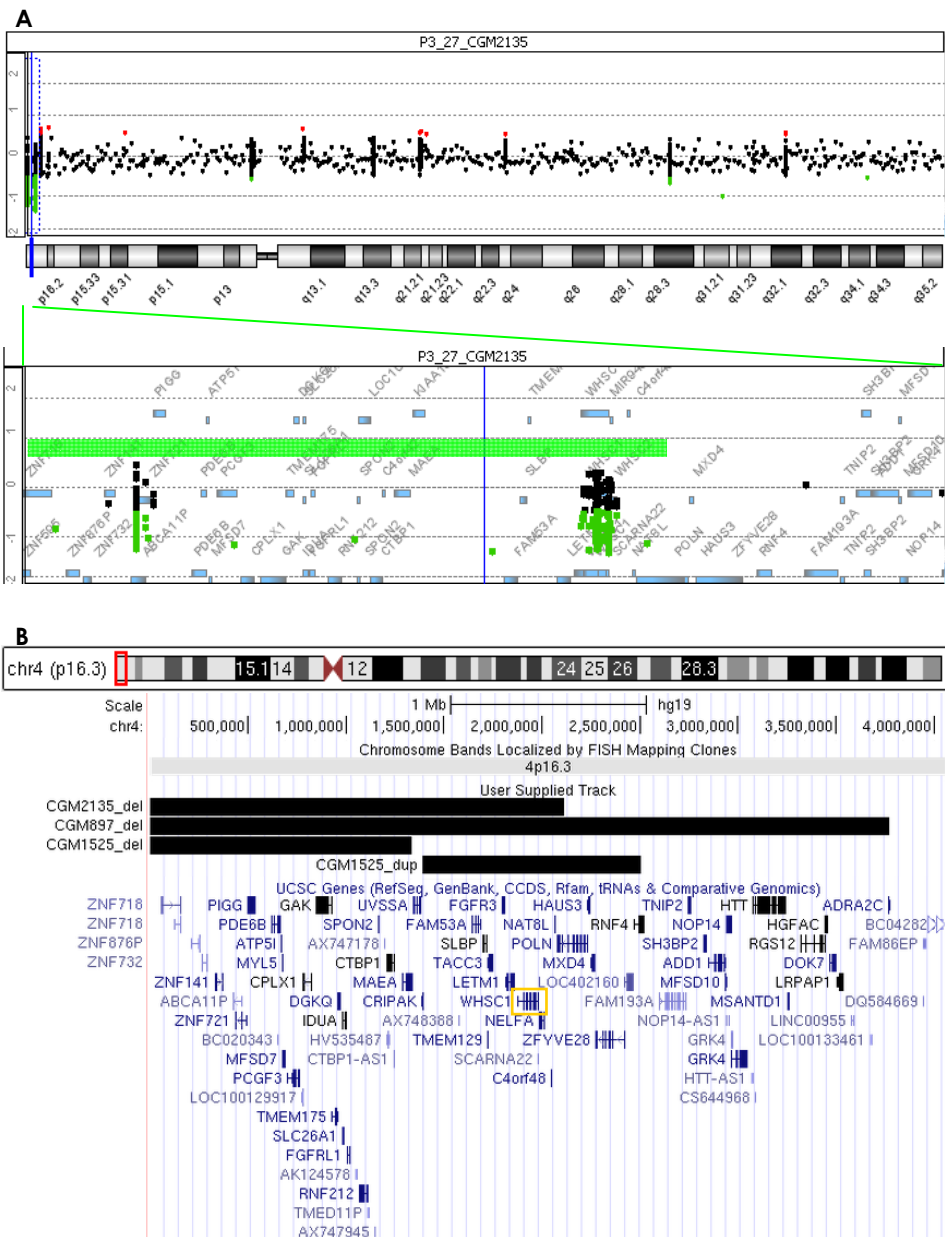


Figura 53: Representación de los cambios de dosis detectados que afectan al gen *WHSC1*. (A) Ejemplo del resultado obtenido en el análisis por CGH-array para el paciente CGM2135. (B) Imagen obtenida del UCSC donde se puede visualizar las regiones mínimas alterada en los tres casos (CGM1525, CGM2135 y CGM897) que afectan al gen *WHSC1*, recuadrado en naranja.

WHSC1, que codifica para una proteína con dominios PWWP y PHD con actividad metiltransferasa de histona. Esta proteína participa en la regulación transcripcional uniéndose al DNA y reclutando HDACs (Kim *et al.*, 2008; Nimura *et al.*, 2009; Pei *et al.*, 2011). Por otra parte, también está afectado el gen *LETM1*, asociado a las convulsiones que presentan estos pacientes (Endele *et al.*, 1999).

El paciente CGM1525, presenta dos CNVs patológicas en la región 4p16.3: una deleción terminal de 1.3 Mb que contiene 30 genes, entre los que se encuentra el gen *FGFRL1*, cuya deleción se asocia a retraso del lenguaje y sobrepeso (Matoso *et al.*, 2014), y una duplicación de 1.1 Mb que afecta a 21 genes, incluido el gen *WHSC1* [arr 4p16.3(1-1,333,192)x1, 4p16.3(1,389,650-2,502,695)x3]. Estudios complementarios mediante MLPA en el paciente y sus progenitores, permitieron determinar que ambas alteraciones habían surgido *de novo* en el paciente.

Los detalles relativos al caso CGM897, portadora de un cromosoma derivado de una translocación paterna equilibrada [46,XX,der(4)t(4;11)(p16.3;p15.5)pat], se encuentran detallados en el apartado 4.2 de resultados y está incluido en una recientemente publicación de este grupo (Mayo *et al.*, 2015a).

Por último, en el paciente CGM2135 se detectó una deleción terminal *de novo* en el cromosoma 4 de 2.1 Mb que afecta a 46 genes con la tercera versión del array de diseño propio (chr4:0-2110334). Esta alteración fue confirmada por MLPA (SALSAs P245 y P096).

En la siguiente tabla se comparan los rasgos clínicos más relevantes de estos pacientes con los asociados al síndrome de Wolf-Hirschhorn.

Tabla 40: Características principales del síndrome de Wolf-Hirschhorn en comparación con la clínica presentada por los pacientes con una CNV que afecta a gen *WHSC1*.

Rasgos clínicos	Síndrome	CGM1525 ¹	CGM897 ²	CGM2135
Alteración <i>WHSC1</i>	deleción	duplicación	deleción	deleción
Retraso en el crecimiento	+	-	-	+
Microcefalia	+	-	+	+
Rasgos dismórficos				
Hipertelorismo	+	+	+	+
Puente nasal amplio	+	+	+	-
Micrognatia	+	-	-	+
Discapacidad intelectual	grave	grave	+	moderada
Retraso motor	grave	+	grave	+
Retraso del lenguaje	+	+	ausente	+
Hipotonía	+	-	+	+
Alteraciones del comportamiento	variable	+	-	+
Convulsiones	+	+	+	+

¹Roselló *et al.*, 2009.

²Mayo *et al.*, 2015a.

- Dos genes relacionados con el neurodesarrollo sin mutaciones conocidas que tengan consecuencias clínicas *DYNLL1* y *CIT*.

En la tabla 41 se encuentran resumidos los rasgos clínicos principales de los dos pacientes de nuestra serie en comparación con la clínica presentada por Palumbo *et al.* (2015) en los tres casos recopilados con alteración de *SETD1B* (figura 54).

Tabla 41: Principales rasgos clínicos de los dos pacientes con delección en 12q24.31 en comparación con la clínica asociada a *SETD1B*.

Rasgos clínicos	Palumbo <i>et al.</i> , 2015	XF2623	CGM2353
Tamaño (Mb)	variable (~0.24)	1.1	8.5
CNV	delección	delección	delección
Género	mujeres	mujer	mujer
Edad	8 - 11 años	12 años	3 años
Peso y talla	variable	percentil 25	percentil <3
Retraso del desarrollo/DI	+	leve	moderado
Alteraciones del comportamiento	+	hiperactividad	hiperactividad
Retraso motor	no disponible	deambulación 18 meses	no deambula
Tono muscular	no disponible	hipotonía	hipotonía
Retraso del lenguaje	no disponible	2.5 años	ausente
Convulsiones	1/3	+	+
Rasgos dismórficos			
Orejas dismórficas	3/3	-	-
Fisuras palpebrales	arriba (2/3) abajo (1/3)	-	+
Puente nasal ancho	2/3	-	+
Labio inferior grueso			
evertido	2/3	-	-
Paladar ojival	2/3	-	-
Dientes anómalos	3/3	+	-
Macroglosia	2/3	-	-
Anomalías congénitas			
Dedos afilados	3/3	-	-
Hipoglucemia neonatal	2/3	-	-

1.2.3.4. *PRDM13*

El gen *PRDM13*, que codifica para una metiltransferasa de histonas, pertenece a una familia génica implicada en la modificación de histonas y con varios miembros que participan en el desarrollo del sistema nervioso como *PRDM1*, *PRDM8*, *PRDM16*, *PRDM3* o *PRDM14*. Además, recientemente se ha descrito el papel de *PRDM13* en el control del equilibrio entre neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, la regulación de la diversidad neuronal y la neurogénesis (Chang *et al.*, 2013; Hanotel *et al.*, 2014). Este gen se encuentra dentro de la región asociada al síndrome de delección 6q16 que presenta una clínica similar

al síndrome de Prader-Willi (obesidad, hiperfagia, hipotonía, manos y pies pequeños, anomalías oculares y de la visión y retraso global del desarrollo) (Bonaglia *et al.*, 2008).

Además, se han propuesto otros genes candidatos en esta región:

- *EPHA7* (OMIM 602190): Receptor tipo tirosin-quinasa implicado en el desarrollo del sistema nervioso central.
- *MCHR2* (OMIM 606111): Codifica para un receptor de un neuropéptido (MCH) que se expresa en el sistema nervioso central y periférico y desempeña un papel importante en el control del comportamiento alimentario y el metabolismo energético.
- *SIM1* (OMIM 603128): Factor de transcripción con expresión en el periodo de neurogénesis, cuya alteración podría estar implicado en anomalías craneofaciales y cerebrales.
- *GRIK2* (OMIM 138244): Codifica para un receptor de glutamato cuyas mutaciones causan DI (OMIM 611092) con un patrón de herencia autosómico recesivo.

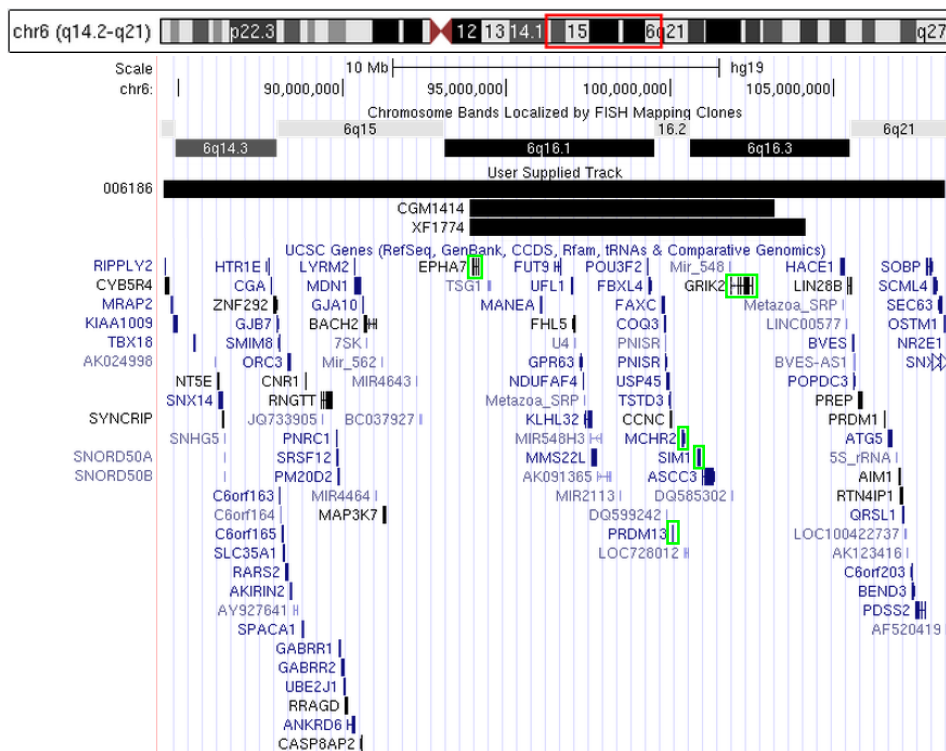


Figura 55: Representación de las deleciones detectadas en la región 6q16. Imagen modificada del UCSC donde se pueden visualizar las regiones mínimas delecionadas en los tres casos y los genes contenidos en la región. *PRDM13* y los otros genes candidatos (*EPHA7*, *MCHR2*, *SIM1* y *GRIK2*) están recuadrados verde.

Hemos encontrado tres pacientes con esta región delecionada, dos cuya alteración fue detectada por el array comercial (CGM1414 y XF1774) y otro caso (6186) con una deleción mayor detectada con el array de diseño propio (v4). Los pacientes CGM1414 y XF1774 presentan deleciones de 9.3 Mb (chr6:93875961-103179934) y 10.3 Mb (chr6:93875961-104137788) respectivamente, afectando ambas CNVs a los mismos 29 genes, mientras que el paciente 6186 presenta una deleción de 23.9 Mb (chr6:84527142-108400331) que contiene 97 genes, incluyendo a *POPDC3*, que se expresa en músculo cardiaco y puede estar implicado en el desarrollo del corazón (figura 55). En los tres casos se realizó un estudio familiar con marcadores microsatélite (D6S300, D6S1716, D6S468) confirmándose la alteración y pudiendo determinar que en todos los pacientes había surgido *de novo*.

El paciente XF1774 presenta además una duplicación *de novo* en el cromosoma 16 (16p11.2) de 522.5 Kb asociada al síndrome de duplicación 16p11.2 (OMIM 614671) de penetrancia incompleta, que se ha asociado a DI, retraso del lenguaje, autismo y trastornos del comportamiento, microcefalia y algunos rasgos dismórficos.

Los rasgos clínicos principales de los tres casos se encuentran resumidos en la tabla 42.

Tabla 42: Principales rasgos clínicos de los tres pacientes con deleción en 6q16 en comparación con los asociados a este síndrome.

Rasgos clínicos	Síndrome	CGM1414	XF1774	6186
Tamaño (Mb)	-	9.3	10.3	23.9
CNV	deleción	deleción	deleción	deleción
Tono muscular	hipotonía	normal	hipotonía / hipertonía	hipotonía
Obesidad	+	+	-	-
DI	+	+	leve	grave
Retraso motor	+	+(D 3a)	+(D 2a)	+(S 6a)
Retraso del lenguaje	+	+(1 ^{eras} palabras 2a)	+(4a)	+ ausencia
Rasgos dismórficos	variable: micrognatia, orejas dismórficas, de implantación baja	orejas de implantación baja, raíz nasal hundida, labios gruesos	orejas de implantación baja, hipertelorismo y lengua bífida	orejas dismórficas, hipertelorismo, <i>epicantus</i> , raíz nasal ancha, comisuras boca hacia abajo
Anomalías congénitas	de la visión	miopía	miopía, esqueléticas	miopía, cardiopatía

a: años; D: deambulación; S: sedestación.

1.2.3.5. *ANKRD12*

En el estudio mediante CGH-array comercial de la paciente CGM708, en principio, no se detectó ninguna alteración patológica, mientras que al realizar este mismo estudio con el array de diseño propio (v1) se detectó una duplicación en la región 18p11.22 que afectaba al gen *ANKRD12*. Revisando manualmente los valores de LogRatio del array comercial en esa región y comparando los resultados de los dos arrays, se determinó que la alteración tenía un tamaño mínimo de 295 Kb (chr18:9182473-9477374) afectando a tres genes: *ANKRD12*, *TWSG1* y *RALBP1* (figura 56). Además, mediante el análisis con PCR cuantitativa del DNA de la paciente y sus progenitores, se confirmó que se trataba de una duplicación heredada de su padre.

Mientras que la información disponible de *TWSG1*, posible modulador de desarrollo del cartílago y diferenciación de los condrocitos, y de *RALBP1*, que puede participar en distintos procesos como la endocitosis, parece indicar que su función no está relacionada con los trastornos del neurodesarrollo, pensamos que *ANKRD12* puede ser un buen candidato. Este gen pertenece a una familia proteica con varios miembros asociados a DI: *ANKRD11*, cuyas mutaciones causan el síndrome KBG (OMIM 148050), y *ANK3*, cuyas mutaciones son responsables de DI sindrómica (OMIM 615493). Además, se expresa en cerebro y puede actuar como represor transcripcional al interactuar con HDACs, al igual que *ANKRD11*, por lo que lo consideramos como gen epigenético.

Aun así, dado su carecer heredado y la falta de otras evidencias, como otros casos descritos, de momento se ha catalogado esta alteración como de significado incierto.

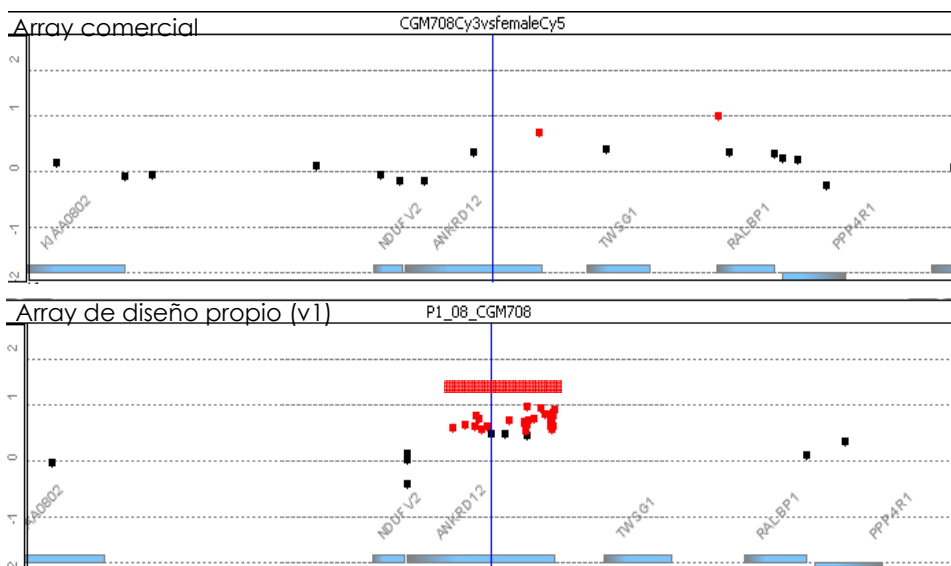


Figura 56: Resultado del estudio por CGH-array en la paciente CGM708. Representación obtenida del Workbench del análisis obtenido por el CGH-array comercial (arriba), en contraposición con el resultado obtenido con el CGH-array de diseño propio (abajo).

La paciente CGM708 presenta DI, con retraso en el desarrollo motor (deambulaci3n a los 2 a1os) y ausencia del lenguaje con m1s de 10 a1os, trastornos del comportamiento y rasgos autistas, hipoton1a pre y postnatal, con algunos rasgos dism3rficos (asimetr1a facial con hipoplasia medio-facial, orejas de implantaci3n baja, frente prominente, hipertelorismo con fisuras palpebrales estrechas y hacia abajo, estrabismo convergente, *epicantus*, ra1z nasal hundida, narinas antevertidas, *filtrum* corto y comisuras de los labios hacia abajo, con labios gruesos) y anomal1as en las manos (clinodactilia, con agenesia de la falange terminal del quinto dedo y pliegue simiesco bilateral). Adem1s, en la l1nea paterna existen antecedentes de DI y sospecha de TEA.

1.2.3.6. MYT1L

MYT1L, forma parte de la familia de factores de transcripci3n de mielina (*MYT1*), con expresi3n preferencial en sistema nervioso embrionario en mam1feros, fundamentalmente en neuronas en proceso de diferenciaci3n. (Kim *et al.*, 1997). En levaduras se ha visto que es capaz de interactuar con *Sin3b* y unirse a HDACs (Romm *et al.*, 2005). Adem1s, alteraciones en este gen se han asociado a distintos trastornos del comportamiento como esquizofrenia (Vrijenhoek *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012), depresi3n (Wang *et al.*, 2010) o autismo

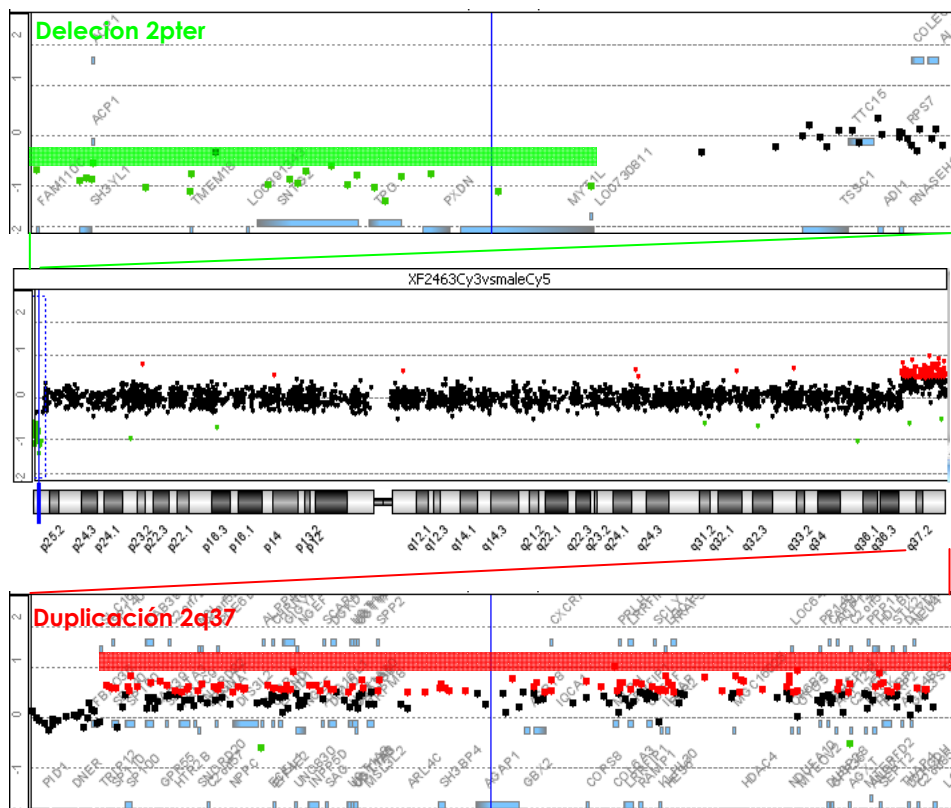


Figura 57: Resultado del CGH-array en el paciente XF2463. Ideograma del cromosoma 2 (centro), ampliaci3n de la regi3n 2pter delecionada (arriba) y la 2q37 duplicada (abajo).

(Meyer *et al.*, 2012); y más recientemente se ha demostrado su implicación en la DI (Stevens *et al.*, 2011; de Rocker *et al.*, 2015). En el estudio con CGH-array de nuestra serie de pacientes hemos encontrado dos casos con CNVs que afectan a este gen.

En el paciente XF2463, como ya se ha comentado previamente (apartado 1.2.2.9. de resultados), a raíz de los resultados obtenidos del análisis del array comercial y un estudio por FISH posterior, se detectó la presencia de un cromosoma 2 derivado, con la región 2pter que incluía al gen *MYT1L* delecionada y una duplicación de la región 2q37 (figura 57).

Posteriormente, en la paciente CGM1778, utilizando la versión 2 del array de diseño propio, se observó una deleción de al menos 139 Kb contenida en el gen *MYT1L* [arr 2p25.3(1,843,177x2,1,844,493-1,983,593x1,2,000,941x2)dn], que no estaba presente en sus padres (figura 58). Esta deleción implica la pérdida de los exones 6 a 20, pudiendo también afectar al exón 21 (contenido en la zona de incertidumbre por ausencia de sondas). Mediante qPCR se confirmó tanto la alteración en la paciente como que ninguno de sus progenitores era portador de dicho cambio de dosis (figura 59).

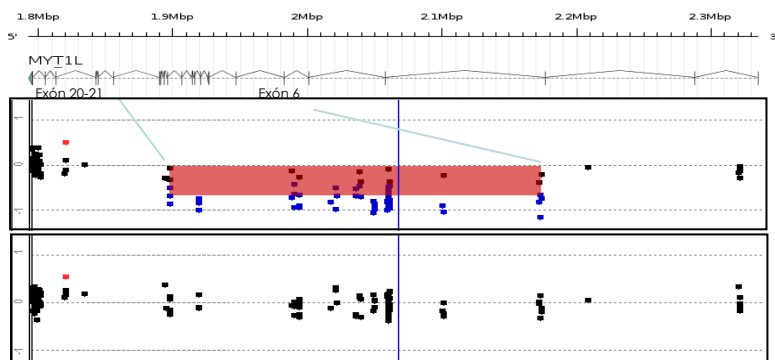


Figura 58: Resultado del análisis del CGH-array de diseño propio (v2) en el gen *MYT1L*. Esquema del gen y la posición de sus exones (arriba). Resultado de la paciente CGM1778 (centro) y sus padres (padre frente a madre, abajo).

La paciente CGM1778, presentó un retraso de crecimiento intrauterino con un peso al nacer de 2700 g (percentil 10-25) e hipotonía neonatal. A los cuatro años y medio pesaba 18 Kg (percentil 50) y medía 109 cm (percentil 90), tenía microcefalia, estrabismo convergente y miopía, con otitis y convulsiones recurrentes. En cuanto a los rasgos neurológicos, presenta un desarrollo psicomotor y del lenguaje alterado (deambulación a los 31 meses, primeras palabras a los 18 meses y frases con cuatro años), con TEA y alteraciones del comportamiento. No controla esfínteres durante la noche y va a un colegio de educación especial. Las exploraciones complementarias (EEG, RMN y TAC) fueron normales. Este caso ha sido publicado recientemente (Mayo *et al.*, 2015b).

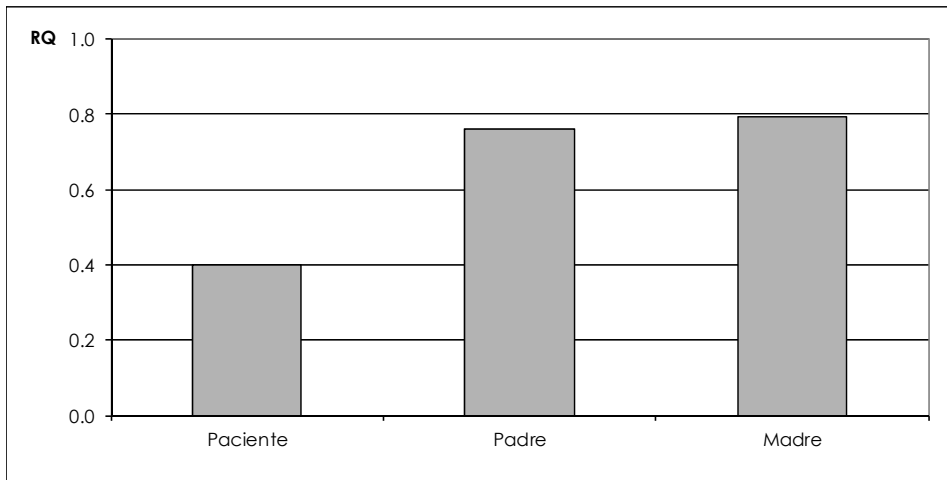


Figura 59: Análisis confirmatorio del resultado obtenido por array en la paciente CGM1778 mediante qPCR. Se utilizó una pareja de cebadores localizados en el exón 14 del gen *MYT1L* como región dentro de la alteración y la pareja de cebadores localizados en el exón 24 como región control. RQ: Cuantificación relativa.

1.2.3.7. *SALL3*

SALL3 pertenece a una familia de cuatro genes que participan en la modificación de la cromatina y el desarrollo embrionario. Esta familia génica incluye a *SALL1*, que forma parte del complejo de desacetilasa de histonas NuRD y cuyas mutaciones provocan el síndrome de Townes-Brocks (OMIM 107480), que puede asociar ocasionalmente DI; y a *SALL4* que interacciona con DNA-metiltransferasas y HDACs, puede participar en el desarrollo de neuronas motoras y se asocia al síndrome acro-reno-ocular (OMIM 607323). En concreto *SALL3* es capaz de interaccionar con DNMT3A (apartado 1.2.3.1. de resultados) inhibiendo su función y reduciendo la metilación de islas CpG (Shikauchi *et al.*, 2009). Además, en ratones, se ha observado por un lado, que las proteínas codificadas por *sall1* y *sall3* presentan estructuras similares con patrones de expresión muy parecidos, y por otro, que *knockout* de *sall3* mueren después del nacimiento con alteraciones tanto de varias estructuras orales (paladar, epiglotis, lengua) como de la morfología de los nervios craneales, lo que demuestra su importancia en el desarrollo embrionario (Parrish *et al.*, 2004). Por último, el gen *SALL3* se localiza en la región terminal del cromosoma 18 (18q23), dentro de la región asociada al síndrome de delección 18q (OMIM 601808). Este síndrome de genes contiguos de fenotipo variable se caracteriza por DI y distintas malformaciones congénitas que incluyen hipoacusia, anomalías de la sustancia blanca del cerebro, defectos cardíacos y malformaciones orofaciales y deficiencia de hormona del crecimiento, habiéndose propuesto a *SALL3* como gen candidato para las malformaciones orofaciales (Dostal *et al.*, 2009).

En este sentido, el paciente CGM2451 presenta una delección terminal *de novo* de 11.3 Mb en el cromosoma 18 (chr18:66753631-78077248) que contienen 50 genes entre los que se incluye el gen *SALL3*. Los rasgos clínicos de este paciente son compatibles con el síndrome de delección 18q, e incluyen DI con retraso motor (deambulación a los 18 meses), ausencia del lenguaje, alteraciones del comportamiento y rasgos autistas. También presenta retraso del crecimiento

postnatal, al pasar del percentil >90 de talla y peso al nacer, a un percentil <3 con 3 años de edad, hipoacusia, paladar elevado y otros rasgos dismórficos menores.

1.2.3.8. *DGCR8*

El gen *DGCR8* se encuentra dentro de la región delecionada en el síndrome de genes contiguos DiGeorge (OMIM 188400) cuyos rasgos principales incluyen dificultades en el aprendizaje con malformaciones congénitas (defectos cardíacos, anomalías del paladar), rasgos dismórficos e inmunodeficiencia. Este gen participa en la síntesis de miRNAs y es por ello clasificado como epigenético (Berdasco y Esteller, 2013).

En la paciente CGM2103, mediante el análisis por CGH-array y estudios posteriores por otras técnicas (MLPA SALSAs P245 y P023), se detectó una duplicación heredada de su padre en el cromosoma 22 (chr22:18896972-20900660) de 2.0 Mb, dentro de la región del Síndrome de DiGeorge, que afectaba a 52 genes, entre los que se incluye, además del gen *DGCR8*, el gen *HIRA*, una chaperona de histonas.

Los rasgos clínicos de esta paciente, incluyen retraso de crecimiento intrauterino, con un peso, talla y perímetro cefálico en el percentil <10 al nacimiento (40 semanas de gestación: 2300 g, 43 cm y 31 cm respectivamente). A los 22 meses persistía la microcefalia y el bajo peso y talla, con retraso motor (sostén cefálico a los 2 meses, sin sedestación) ausencia del lenguaje, epilepsia e hipotonía. Además esta paciente presenta DI, rasgos autistas, anomalías congénitas (manos y pies pequeños, alteración renal y nervios auditivos alterados), rasgos dismórficos (orejas de implantación baja y rotadas, hipertelorismo, sinofridia y labio superior fino) y RMN alterada (disgenesia del cuerpo caloso).

1.3 Otras alteraciones en regiones de interés detectadas por el array de diseño propio

1.3.1. Alteraciones patológicas

En este trabajo, como ya se ha mencionado, hemos detectado, con el array de diseño propio, 12 alteraciones patológicas, de las cuales 6 ya han sido mencionadas al contener algún gen epigenético causante o propuesto como candidato de DI (apartados 1.2.2. y 1.2.3. de resultados). Las 6 alteraciones patológicas restantes se encuentran resumidas en la tabla 43.

La mayoría de estos pacientes presentan una clínica claramente compatible con el síndrome asociado a la alteración correspondiente, aunque en algunos casos el espectro fenotípico de estas patologías puede ser muy variable o con rasgos clínicos poco específicos. Por ejemplo, el paciente 5712 no presenta el retraso del crecimiento ni la microcefalia habitualmente asociados al síndrome de deleción 2q24, pero sí otros rasgos como convulsiones, relacionadas con alteraciones en canales de sodio como el codificado por el gen *SCN2A*, contenido dentro de la deleción de este paciente.

Tabla 43: Listado de los casos con CNVs patológicas relacionadas con algún síndrome descrito cuyo gen causal, si se conoce, no es epigenético.

Paciente	Alteración				Asociación a DI		
	CNV	Coordenada mínima (hg19)	Tamaño (Kb)	Genes	Gen/ <i>locus</i>	Síndrome asociado	OMIM/ Orphanet (O-)
4874	delección	chr22:51123040-51304566	182	4	<i>SHANK3</i>	Phelan-McDermid	606232
5712	delección	chr2:161423818-166303505	4880	23	2q24	Delección 2q24	O-1617
3045	delección	chr3:194202266-197404280	3202	53	3q29	Delección 3q29	609425
4245 ¹	duplicación	chr5:136857910-147307654	10450	171	5q31.3	Delección 5q31.3	O-314655
3570	delección	chr9:69348984-84116288	14767	70	9q21.13	Delección 9q21	O-352665
881	delección	chr12:65557000-67604067	2047	15	12q14	Delección 12q14	O-94063

¹La alteración detectada es una duplicación cuando el síndrome descrito va asociado a delección.

Tabla 44: Listado de alteraciones intragénicas en posibles genes candidatos de DI.

Paciente	Alteración				Gen	
	CNV	Coordenada mínima (hg19)	Herencia	Clasificación	Nombre	Exones
CGM1778 ¹	delección	chr2:1844493-1983593	<i>de novo</i>	patológica	<i>MYT1L</i>	6-21
XF3982	duplicación	chr2: 239969870- 239976515	paterna	VOUS	<i>HDAC4</i>	25-27
XF2605	duplicación	chr6:56915520-56920035	paterna	VOUS	<i>KIAA1586</i>	3-4
CGM2428	delección	chr6:157357928-157454332	<i>de novo</i>	patológica	<i>ARID1B</i>	6-8
XF3851	delección	chr7:146471342-146558801	paterna	pip	<i>CNTNAP2</i>	2-3
CGM2844	duplicación	chr11:128838665-128838752	paterna	VOUS	<i>RICS</i>	último
CGM742	duplicación	chr11:128838665-128838752	desconocida	VOUS		

¹Caso publicado (Mayo *et al.*, 2015b).

1.3.2. *Alteraciones intragénicas*

De las 44 alteraciones detectadas con el array de diseño propio, 16 son intragénicas, con un rango de tamaños que oscila de 83 pb a 139 Kb (promedio 36.6 Kb), siendo la mayoría heredadas de uno de los progenitores. Dentro de estas alteraciones, solo dos deleciones *de novo* han sido clasificadas como patológicas y otras dos heredadas como patológicas de penetrancia incompleta. El resto han sido clasificadas como VOUS o benignas (5 y 7 respectivamente). Del total de las CNVs intragénicas se han seleccionado aquellas que se considera que pueden tener mayor relevancia en los trastornos del neurodesarrollo (tabla 44).

1.3.2.1. *MYT1L*

Como ya se ha mencionado en el apartado de resultados 1.2.3.6., entre las deleciones que afectan al gen *MYT1L* se ha detectado una deleción intragénica *de novo* de al menos 139 Kb en la paciente CGM1778 [arr 2p25.3(1,843,177x2,1,844,493-1,983,593x1,2,000,941x2)dn].

1.3.2.2. *HDAC4*

Esta duplicación ya ha sido mencionada en el apartado de resultados 1.2.2.9. al desarrollar las alteraciones detectadas que afectan al gen *HDAC4*. Se trata de una duplicación heredada de al menos 6.6 Kb detectada en el paciente XF3982 [arr 2q37.3(239,860,936x2,239,969,870-239,976,515x3,239,988,380x2)pat].

1.3.2.3. *KIAA1586*

Como se detallará en el apartado 1.5.2.2.3. de resultados, en muestra de la paciente XF2605 se ha detectado una duplicación aparentemente intragénica de al menos 4.5 Kb en el gen *KIAA1586* heredada de su padre [arr 6p12.1(56,911,417x2, 56,915,520-56,920,035x3, 57,070,165x2)pat]. Un análisis más detallado de la alteración y estudios posteriores permitieron determinar que la duplicación afectaba también a otro gen y generaba un gen quimera entre ambos.

1.3.2.4. *ARID1B*

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.2.2.8. de resultados, en muestra de la paciente CGM2428 se ha detectado una deleción *de novo* aparentemente intragénica de 96.4 Kb en el gen *ARID1B* [arr 6q25.3(157,281,757x2,157,357,928-157,454,332x158,069,431x2)dn]. Al igual que el caso anterior, estudios posteriores de esta alteración pudieron determinar la afectación de otro gen y la formación de un gen quimera. Este caso se describirá más adelante en el apartado 1.5.2.2.2. de resultados.

1.3.2.5. *CNTNAP2*

En el estudio mediante la versión 2 del CGH-array de diseño propio en muestra del paciente XF3851 y sus progenitores se detectó una deleción intragénica de al menos 87.5 Kb en el gen *CNTNAP2* heredada de su padre [arr 7q35(146,471,309x2,146,471,342-146,558,801x1,146,740,940x2)pat] (figura 60). Esta alteración afecta a 2 exones del gen (exón 2-3).

El gen *CNTNAP2* forma parte de la familia de las neurexinas que funcionan en el sistema nervioso de los vertebrados como moléculas de adhesión celular y receptores. La proteína codificada por este gen (CASPR2), localizada en los nodos de axones mielinizados, media las interacciones entre las neuronas y glia durante el desarrollo del sistema nervioso y está implicada en la localización de

los canales de potasio dentro de los axones diferenciadores (Poliak *et al.*, 1999; Rodenas-Cuadrado *et al.*, 2014). Además, está directamente ligado y regulado por FOXP2, un factor de transcripción relacionado con el habla y el desarrollo del lenguaje (Vernes *et al.*, 2008). El gen *CNTNAP2* ha sido asociado a varios trastornos del desarrollo neurológico, como el autismo (OMIM 612100) o la epilepsia (OMIM 610042).

El paciente XF3851 nació a las 39 semanas con un peso de 2430 g (percentil <10) y una talla de 47 cm (percentil 10-25), mientras que a la edad de 4 años y 3 meses pesaba 24.5 Kg (percentil >97) y medía 110 cm (percentil 90-97). Anduvo a los 14 meses y presentaba un retraso del lenguaje (primeras palabras a los 2 años, frases a los 3 años) y ecolalia con rasgos autistas. Además, el padre del paciente presenta un comportamiento que hace sospechar que padezca el síndrome de Asperger y por la línea paterna existen antecedentes de autismo y trastornos mentales (esquizofrenia y depresión). Dado el carácter heredado de la deleción y los antecedentes familiares, fue clasificada como una alteración patológica de penetrancia incompleta.



Figura 60: Resultado del estudio por CGH-array en el paciente XF3851. Representación obtenida del Workbench en el análisis del CGH-array de diseño propio en el paciente (arriba) y sus progenitores (padre frente a madre; abajo).

1.3.2.6. *RICS*

El gen *RICS*, también llamado *ARHGAP32*, codifica para una proteína de activación de GTPasa asociada a neurona que puede regular la morfología de la espina dendrítica y participar en la diferenciación de las células neuronales durante la formación de extensiones de neuritas (Okabe *et al.*, 2003).

En dos pacientes no relacionados (CGM2844 y CGM742) utilizando distintas versiones del array de diseño propio (v2 y v3 respectivamente) se detectó una duplicación de 3 sondas contenidas en 87 pb de la región 3'UTR del gen *RICS* [arr 11q24.3(128,838,646x2,128,838,665-128,838,752x3,128,838,777x2)] (figura 61).

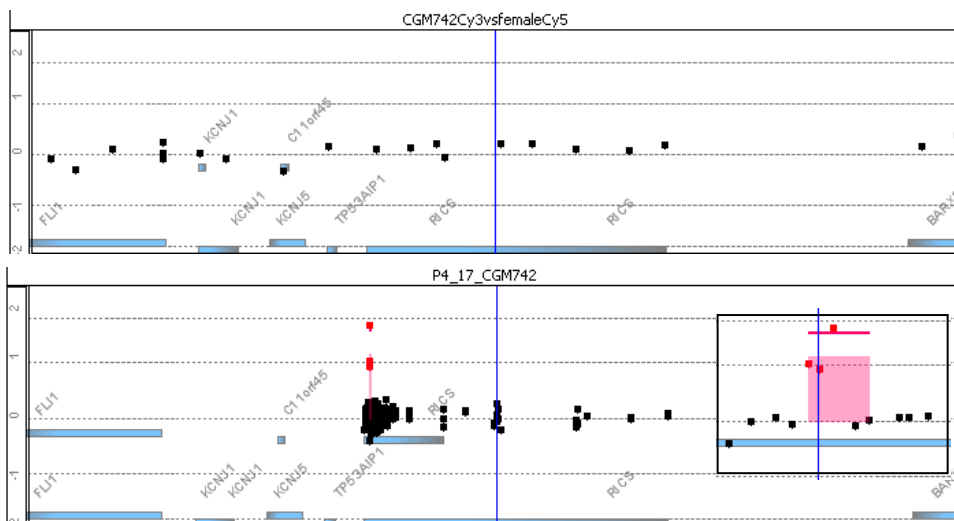


Figura 61: Resultado del estudio por CGH-array en la paciente CGM742. Representación obtenida del Workbench del análisis realizado por el CGH-array comercial (arriba), en contraposición con el resultado obtenido con el CGH-array de diseño propio (abajo), con una ampliación de la región alterada a la derecha.

Esta duplicación recurrente fue clasificada como VOUS, ya que se localiza en la región 3'UTR del gen, sin poder valorar el efecto sobre la expresión de RICS, al menos en uno de los dos casos había sido heredada de un progenitor, y la clínica de ambos pacientes es discordante, siendo al rasgo principal del paciente CGM2844 un TEA mientras que la paciente CGM742 presenta una clínica mucho más florida. La comparación de los rasgos clínicos principales de estos dos casos se encuentra resumida en la tabla 45.

Tabla 45: Comparativa de los principales rasgos clínicos de los dos pacientes con duplicación intragénica del gen *RICS*.

Rasgos clínicos	CGM2844	CGM742
CNV	duplicación	duplicación
Herencia	paterna	no determinado
Genero	varón	mujer
Edad	23 años	5 años y 5 meses
Crecimiento		
Prenatal	talla y peso p>90	talla y peso p50-75
Postnatal	altura p50; peso p75	altura p10; peso p<3
Microcefalia	-	+
DI	-	grave
TEA	+	+
Trastornos del comportamiento	hiperactividad	hiperactividad y estereotipias
Retraso motor	+ (deambulación 16 meses)	+ (deambulación 2 años)

Rasgos clínicos	CGM2844	CGM742
Retraso del lenguaje	+ (primeras palabras 3 años)	+ (ausencia con 5 años)
Convulsiones	-	+ (crisis hipertónicas)
Rasgos dismórficos	-	fisuras palpebrales estrechas, nariz alargada y afilada, micrognatia
Anomalías congénitas	-	implantación baja del pelo, cardiopatía
Otros rasgos	-	ceguera

p: percentil

1.4 Alteraciones en elementos reguladores

1.4.1. *Análisis de enriquecimiento en elementos ultraconservados*

Uno de los objetivos de esta tesis era estudiar la implicación en los trastornos del neurodesarrollo de elementos que puedan participar en la regulación génica como los UCEs. En un análisis previo con parte de los resultados de esta serie publicado en 2010, se observó un enriquecimiento de UCEs en CNVs patológicas (Martínez *et al.*, 2010). En este trabajo se ha completado este análisis para toda la serie, determinando el número de UCEs dentro y fuera de nuestras CNVs (patológicas, patológicas de penetrancia incompleta y VOUS, o benignas) utilizando la herramienta *Table Browser* del UCSC. El enriquecimiento en estos elementos se estima calculando el cociente entre el número de UCEs observados y el número de UCEs esperados en estas regiones (razón de enriquecimiento; RE). Asumiendo una distribución aleatoria de los UCEs en el genoma, el número de elementos esperados se obtiene multiplicando el número total de elementos ultraconservados (481 UCEs) por la proporción del genoma que representan las CNVs. Para valorar la significación de esta relación se realiza una estimación de X^2 basándose también en el número de elementos observados y esperados (figura 62).

Al igual que en los resultados preliminares publicados en 2010, se observa un enriquecimiento altamente significativo de UCEs en deleciones patológicas ($p < 0.0001$), mientras que en aquellas alteraciones cuya repercusión no está clara (pip y VOUS) se observa un empobrecimiento, siendo más evidente en los polimorfismos benignos, que no contienen ningún UCE (tabla 46).

$$NE_e = \frac{NE_{genoma} \times T(pb)_{CNV}}{T(pb)_{genoma}}$$

$$RE = \frac{NE_o}{NE_e} \quad X^2 = \frac{(NE_o - NE_e)^2}{NE_e}$$

Figura 62: Fórmulas utilizadas para el análisis de enriquecimiento. e: esperados; NE: número de elementos; o: observados; T: tamaño.

Tabla 46: Análisis de enriquecimiento de UCEs en CNVs.

Alteración	CNV	Tamaño (Mb)	Nº UCEs	RE	p
Patológica	total	279.0	82	1.92	<0.0001
	delección	179.5	63	2.29	<0.0001
	duplicación	117.1	20	1.11	0.23
pip+VOUS	total	25.7	2	0.51	0.33
	delección	11.4	1	0.57	0.57
	duplicación	21.3	1	0.31	0.20
Benigna	total	17.0	0	-	0.11
	delección	6.5	0	-	0.32
	duplicación	11.7	0	-	0.18
Genoma	-	3137	481	-	-

Datos obtenidos de la herramienta *Table Browser* del UCSC el 17-4-2015.

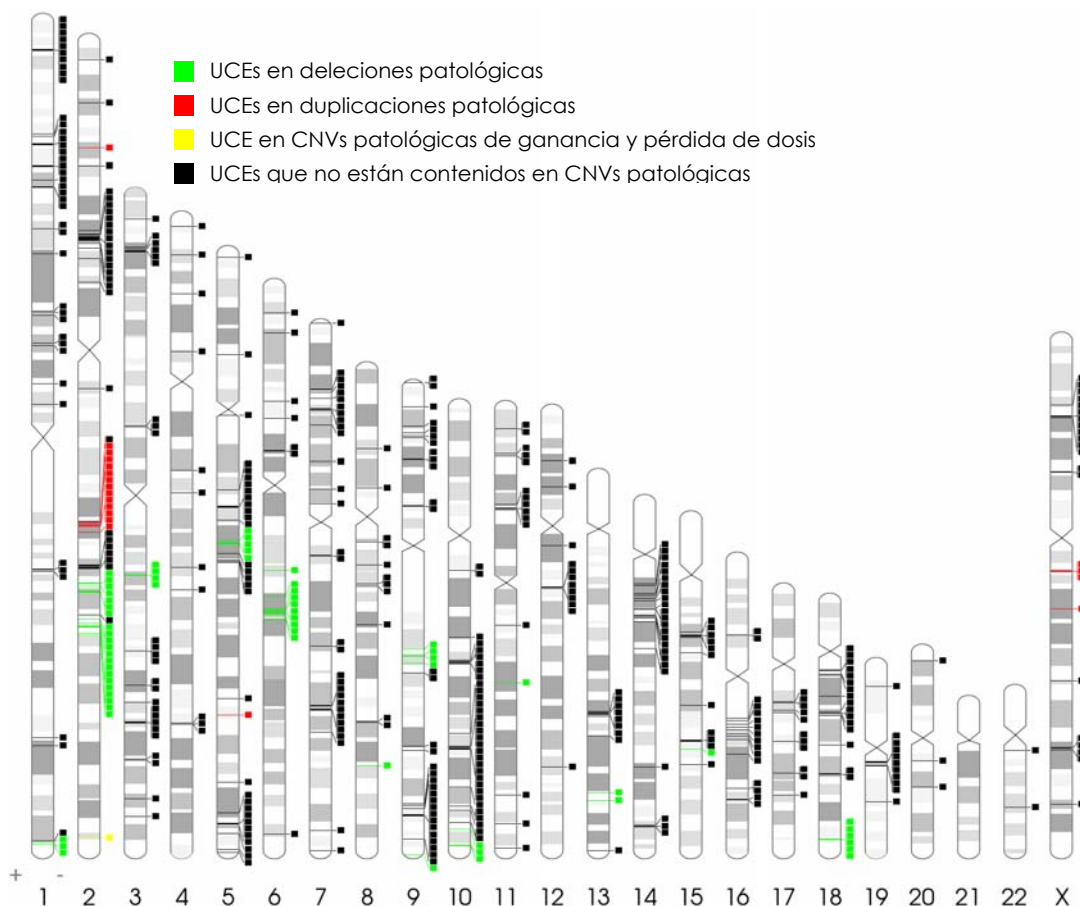


Figura 63: Distribución en el genoma de los elementos ultraconservados. Representación de la distribución en el genoma de los 481 UCEs, diferenciando los contenidos en CNVs patológicos: 62 en deleciones (verde), 19 en duplicaciones (rojo) y uno (uc. 110) en delección y duplicación (amarillo), frente a los 419 UCEs no alterados en las CNVs de nuestra serie.

Los UCEs se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma, exceptuando los cromosomas 21 e Y, estando a menudo agrupados. Los UCEs contenidos en las CNVs patológicas no son exclusivamente aquellos que se encuentran agrupados, sino que también se observan algunos aislados contenidos en este tipo de alteraciones (figura 63).

1.4.2. Análisis de enriquecimiento en miRNAs

Al igual que los elementos ultraconservados, los miRNAs pueden participar en la regulación génica. De forma análoga al apartado anterior se ha calculado la razón de enriquecimiento y significatividad mediante la estimación de X^2 para cada tipo de CNVs (patológicas, patológicas de penetrancia incompleta y VOUS, o benignas) detectada en nuestra serie (figura 62). En este caso se ha observado un enriquecimiento de miRNA muy significativo ($p < 0.0001$) en CNVs cuya repercusión en la clínica de los pacientes no está del todo esclarecida (pip y VOUS) y en duplicaciones patológicas ($p = 0.0004$), mientras que en el total de CNVs patológicas y en las CNVs benignas el número de miRNAs se ajusta a los valores esperados (tabla 47).

Tabla 47: Análisis de enriquecimiento de miRNAs en CNVs.

Alteración	CNV	tamaño (Mb)	Nº miRNAs	RE	p
Patológica	total	279.0	94	1.13	0.25
	delección	179.5	42	0.78	0.11
	duplicación	117.1	56	1.60	0.0004
pip+VOUS	total	25.7	64	8.32	<0.0001
	delección	11.4	10	2.92	0.0004
	duplicación	21.3	63	9.88	<0.0001
Benigna	total	17.0	7	1.37	0.40
	delección	6.5	3	1.53	0.46
	duplicación	11.7	4	1.14	0.79
Genoma	-	3137	938	-	-

Datos obtenidos de la herramienta *Table Browser* del UCSC el 17-4-2015.

Al igual que los UCEs, los miRNAs se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma, estando a menudo agrupados, y de igual forma, los miRNAs contenidos en las CNVs patológicas tampoco son exclusivamente aquellos que se encuentran agrupados, sino que también se observan algunos aislados (figura 64).

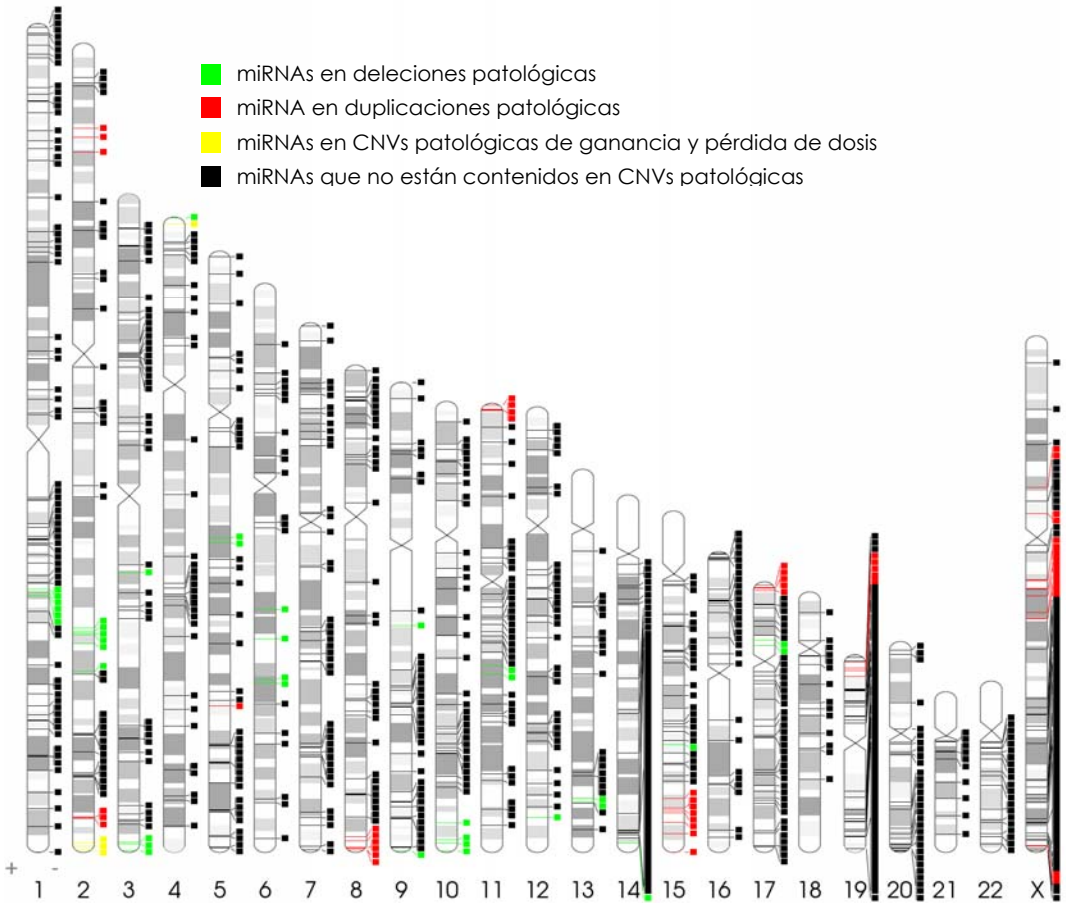


Figura 64: Distribución en el genoma de los miRNAs. Representación de la distribución en el genoma de los 938 miRNAs, diferenciando los contenidos en CNVs patológicas: 38 en deleciones (verde), 52 en duplicaciones (rojo) y 4 en deleción y duplicación (amarillo), frente a los 844 miRNAs no alterados en las CNVs de nuestra serie de pacientes.

1.4.3. Aplicación del array de diseño propio para la detección de alteraciones en miRNAs y UCEs

En el análisis específico de los resultados de los CGH-arrays de diseño propio en busca de CNVs que afectaran a miRNAs o/y UCEs nos encontramos:

- Casos con alteraciones de gran tamaño que contenían genes presumiblemente responsables de la patología.
- Alteraciones que no se pudieron confirmar o se consideraron artefactuales por la alta incidencia de casos alterados, tanto en pacientes como en controles, además de una elevada variabilidad de los valores de LogRatio.
- CNVs que, aun estando confirmadas, no pudieron asociarse con la clínica que presentaba el paciente ni considerarse como patogénicas.

Por ejemplo, en la paciente 4023, con la cuarta versión del array dirigido, encontramos una delección de una única sonda (A_18_P15691324) en el cromosoma 6 que delimitaba una alteración con un tamaño comprendido entre 60 pb y 142 Kb (figura 65A). Esta alteración afectaba al miRNA *MIR30C2* cuyos genes diana validados incluyen a genes asociados a la DI como *HDAC4*, *ARHGEF6* y *PIK3R2*. No obstante, al confirmar la alteración por PCR cuantitativa se pudo determinar que se trataba de un cambio heredado de su madre sana, por lo que se clasificó como una variante probablemente benigna (figura 65B).

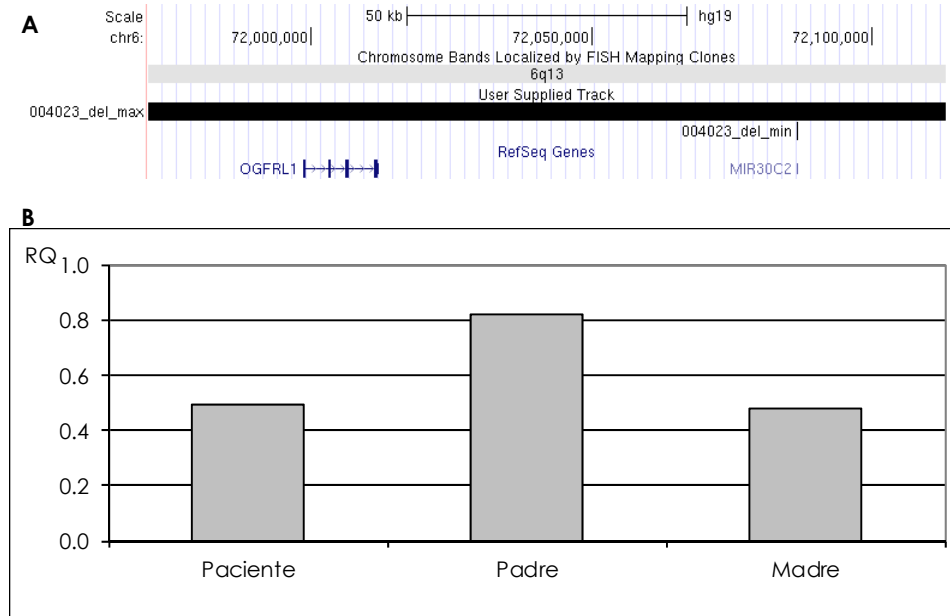


Figura 65: Delección de *MIR30C2* en la paciente 4023. (A) Imagen del UCSC donde se representa el tamaño máximo (del_max) y mínimo (del_min) de la delección. (B) Valores de cuantificación relativa (RQ) en el análisis por qPCR, utilizando cebadores contenidos en la región máxima alterada (6q13) y en el gen *A2BP1* (16p13.3) para calcular el dCt.

1.5 Análisis de la zona gris

Para intentar buscar posibles mecanismos que favorezcan la formación de las CNVs detectadas, se hizo un análisis de las zonas de incertidumbre con el fin de identificar elementos que pudieran participar en estos reordenamientos. En primer lugar, se estableció la zona de incertidumbre de cada extremo donde se localiza el punto de rotura en el que se ha producido el reordenamiento cromosómico, o zona gris, de cada uno de los 220 cambios de dosis detectados. Estas regiones se encuentran delimitadas por la última sonda alterada y la primera conservada de cada extremo de las CNVs (figura 25). Hay que tener en cuenta que estas zonas grises son dependientes del diseño del array y las peculiaridades de las distintas regiones cromosómicas. En base a esto, de este grupo de regiones no se valoraron:

- CNVs teloméricas (24): 6 translocaciones desequilibradas, 5 heredadas y una *de novo*, que generaban cada una, una delección y una duplicación telomérica. Además, 12 CNVs teloméricas simples, 11 delecciones y una duplicación.

- CNVs centroméricas (3): Cambios de dosis cuya zona gris contenía la región centromérica, siendo dos de ellas de cromosomas acrocéntricos, sin sonda conservada en el brazo corto del cromosoma.

- Translocaciones insercionales (1): Una translocación insercional intracromosómica heredada de forma desequilibrada ya estudiada por FISH y descrita en López-Carrasco *et al.* (2014).

Dado que afectan a regiones amplias y complejas, como los cambios de dosis teloméricos y centroméricos, que podrían alterar los resultados del análisis de la zona gris. De esta manera se seleccionaron 192 CNVs que daban lugar a un total de 384 zonas grises.

Además, se evaluaron las regiones de incertidumbre restantes para eliminar aquellas de mayor tamaño que pudieran enmascarar los resultados del estudio sin perder resolución. Para ello, observando la distribución global de los tamaños de las zonas de incertidumbre, se seleccionaron 344, que corresponden a un 90 % de las mismas, con un tamaño máximo de 315 Kb, que corresponde al punto de inflexión de la curva obtenida al representar el número de regiones según su tamaño (figura 66).

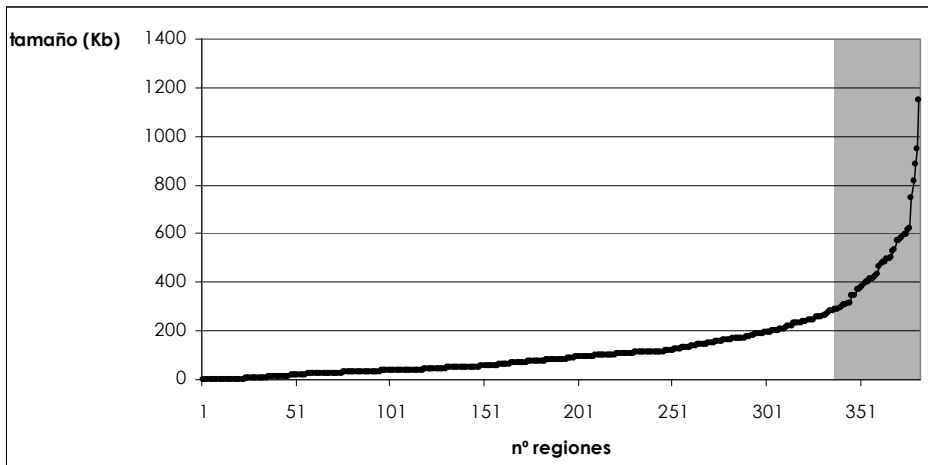


Figura 66: Representación del tamaño de las 384 zonas de incertidumbre. En fondo gris se resaltan el 10 % de las regiones que no se tendrán en cuenta en los posteriores análisis por su elevado tamaño.

Finalmente se compararon las distribuciones de tamaños de las zonas grises seleccionadas en función del tipo de CNV, sin observarse grandes diferencias en la distribución de los dos grupos (figura 67).

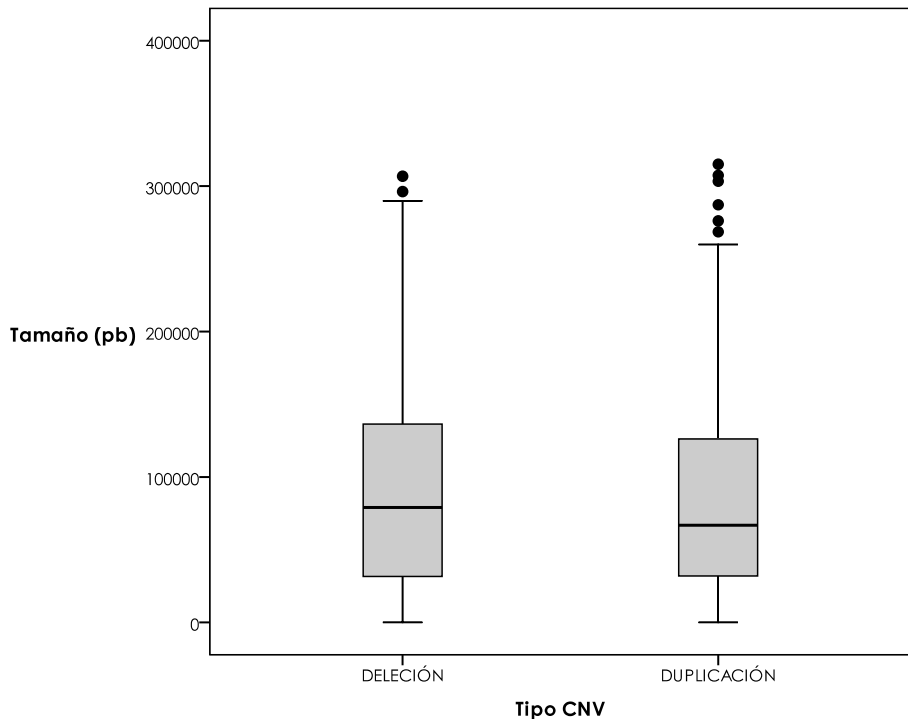


Figura 67: Diagrama de cajas donde se representa la distribución de tamaños de las 344 regiones de incertidumbre seleccionadas en función del tipo de CNV (163 deleciones y 181 duplicaciones).

1.5.1. Análisis de enriquecimiento en la zona gris de distintos elementos de interés

Una vez delimitadas 344 regiones de incertidumbre de las CNV obtenidas en el estudio por CGH-array, se realizó un análisis de enriquecimiento de forma análoga a lo descrito en el apartado 1.4.1. de resultados pero teniendo en cuenta las distintas isoformas génicas (figura 62). Se seleccionaron distintos tipos de elementos que de una u otra forma hubieran podido contribuir a la aparición de los reordenamientos cromosómicos, como zonas de cromatina abierta, duplicaciones segmentarias o elementos altamente repetitivos, pero también un posible enriquecimiento en genes o regiones conservadas y regiones que pudieran participar en la regulación de la expresión génica, como islas CpG o regiones diana de miRNAs. El resultado obtenido en este análisis de enriquecimiento se muestra en la tabla 48.

Solo se observa una razón de enriquecimiento superior a 2 para duplicaciones segmentarias, así como para genes, especialmente los de tipo RNAs largos intergénicos no codificantes (lincRNA), siendo estos casos altamente significativos aplicando un análisis de frecuencia de χ^2 ($p < 0.0001$). De forma menos llamativa, en estas regiones también se ha encontrado un enriquecimiento significativo ($p < 0.0001$) en otros elementos de interés como las islas CpG o los elementos Alu.

Tabla 48: Análisis de enriquecimiento en las zonas grises. N° de elementos de interés presentes en las 344 regiones de incertidumbre seleccionadas en comparación con la distribución en el genoma completo.

Tipo de elementos	Genoma N° elementos	Zona gris N° elementos (Razón de enriquecimiento)		
		Total	Deleciones	Duplicaciones
Genes (Ref Seq)	52095	1297 (2.49)	614(2.40)	683(2.56)
Genes retrotraspuestos	13742	181 (1.32)	92 (1.37)	89 (1.27)
lincRNAs	21630	671 (3.10)	393 (3.71)	278 (2.51)
sno/miRNAs	1341	21 (1.56)	12 (1.83)	9 (1.31)
UCE	481	2 (0.42)	1 (0.42)	1 (0.41)
TS miRNAs	54199	381 (0.70)	163 (0.61)	218 (0.79)
Islas CpG	28691	494 (1.72)	201 (1.43)	293 (2.00)
TFBS	5797266	5377 (0.92)	26780 (0.94)	26497 (0.89)
DNasa	1281988	14562 (1.13)	6489 (1.03)	8073 (1.23)
LINE	1498690	15772 (1.05)	7832 (1.07)	7940 (1.04)
SINE	1793723	22279 (1.24)	10876 (1.24)	11403 (1.24)
Alu	1194734	16308 (1.36)	7988 (1.36)	8310 (1.36)
Duplicaciones segmentarias	51599	2303 (4.46)	1104 (4.36)	1199 (4.55)

En negrita se indican aquellos casos con un ratio superior a 2 o inferior a 0.5 en el global de las zonas grises. Datos obtenidos de la herramienta *Table Browser* del UCSC el 23-10-2014.

1.5.2. *Generación de genes quimera*

Dado el enriquecimiento en genes en las zonas grises que hemos detectado, nos planteamos la posibilidad de que los reordenamientos cromosómicos pudieran generar genes quimera, es decir, nuevos genes generados por la fusión de dos genes distintos, en mayor frecuencia a la esperada por azar. Para valorar esta posibilidad, en el caso de las deleciones, ambos genes que formen parte de la quimera tienen que estar en la misma orientación, y cada uno en una de las dos zonas de incertidumbre que delimitan la alteración. El caso de las duplicaciones es más complejo, y para valorar la posibilidad de que se genere un gen quimera, primero habría de conocerse si la duplicación se ha producido en tándem o en otro *locus*, donde igualmente podría formar nuevos genes como resultado de la inserción de material extra. Este dato *a priori* no se puede conocer si no se realizan estudios complementarios, que no siempre son factibles. Además, en función de la orientación de la duplicación, el número de posibilidades variaría, por lo que, sin conocer la localización y orientación de la duplicación, es muy complicado hacer una estimación teórica de los posibles genes quimera que se podrían haber generado de una forma fiable (figura 68).

En base a esto se decidió hacer una estimación teórica de posibles genes quimeras solo en las zonas grises de las deleciones detectadas.

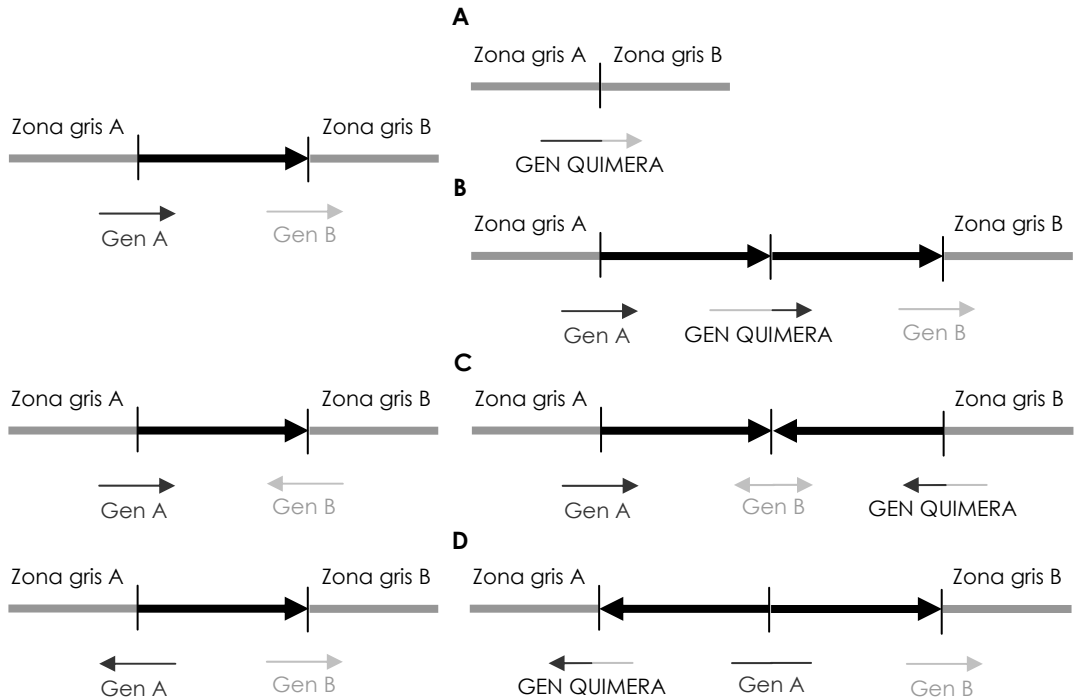


Figura 68: Representación de distintas posibilidades que podrían dar lugar a genes quimera en deleciones (A) o duplicaciones en tándem, tanto en la misma orientación (B) como en orientación invertida (C y D). A la izquierda se representa el entorno genómico sin la CNV. La incertidumbre acerca de la posible formación de genes quimera obtenidos a partir de duplicaciones es muy elevada si no se conoce la posición (en tándem o en otro *locus*) ni la orientación (invertido o no) del fragmento duplicado.

1.5.2.1. Estimación teórica de posibles genes quimeras por delección

Hay que tener en cuenta que cuanto mayor es el tamaño de la zona de incertidumbre, delimitada por la resolución del array utilizado, mayor es la probabilidad de encontrarnos genes dentro, y por tanto, aumenta teóricamente la posibilidad de que se pueda formar algún gen quimera. Para simplificar este análisis teórico, se partió de las 163 zonas grises por delección seleccionadas al eliminar el 10 % de las zonas de incertidumbre de mayor tamaño (apartado 1.5 de resultados y figura 67 de dicho apartado). De estas regiones se eliminaron aquellas que solo representaban uno de los dos extremos de la alteración, siendo la zona gris correspondiente al otro extremo de mayor tamaño, seleccionando así 68 deleciones distintas para analizar si es factible la generación de posibles genes quimera.

Las 68 alteraciones seleccionadas corresponden a 38 clasificadas como variantes benignas, 2 de significado incierto, 5 patológicas de penetrancia

- En 27 alteraciones se descartó la posibilidad de generación de un gen quimera, bien por ausencia de genes en uno de los extremos (6 CNVs), por encontrarse en diferente orientación (9 CNVs) o por localizarse ambos puntos de rotura dentro de un mismo gen (12 CNVs).

- En 41 de las alteraciones se encontraron genes en la misma orientación en ambas regiones de incertidumbre lo que podría dar lugar a genes quimera. De estas 41 regiones, al menos cuatro de ellas afectarían a genes de una misma familia, por lo que la posible repercusión de esos genes quimera sería cuestionable. Nueve casos presentan varios genes en distintas orientaciones en ambas regiones flanqueantes por lo que las posibilidades de genes quimera son muy variadas con este nivel de resolución. Finalmente, 12 de estas alteraciones, presentan un solo gen en cada zona gris en la misma orientación, pudiendo generarse un gen quimera si el punto de rotura se encuentra intragénico en ambos.

1.5.2.2. Estudios confirmatorios de genes quimeras en casos seleccionados

Teniendo en cuenta toda la serie de pacientes, se seleccionaron tres casos, dado su interés, para realizar distintos estudios que permitieran confirmar o descartar la generación de un gen quimera a raíz de la CNV detectada por CGH-array. A continuación se detallarán los resultados obtenidos en estos casos.

1.5.2.2.1. Quimera *LIMS1-RANBP2* por delección de novo

El paciente CGM2433 se incluyó en el proyecto por presentar DI moderada, retraso motor y del lenguaje, trastornos del comportamiento, hipotonía, microcefalia, anomalías congénitas y algunos rasgos dismórficos. El estudio en DNA del paciente mediante CGH-array comercial en busca de CNVs detectó una delección que afectaba a dos genes que tiene la misma orientación: *LIMS1* y *RANBP2* (figura 70).

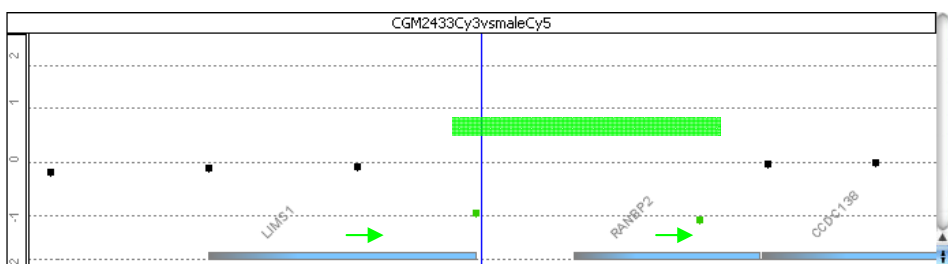


Figura 70: Representación de la delección detectada mediante CGH-array en muestra de DNA del paciente CGM2433. En la imagen obtenida del Workbench se observan dos sondas delecionadas (A_14_P129225 y A_14_P113906), estando las zonas de incertidumbre que flanquean la alteración contenidas en dos genes con la misma orientación cromosómica: *LIMS1* y *RANBP2*. La región mínima alterada está indicada con un recuadro y la orientación de los genes con flechas.

LIMS1 codifica para una proteína altamente conservada formada por cinco dominios LIM en tándem (Rearden 1994; Wu 2004). Además, distintos estudios apoyan que *LIMS1* participa en adhesión focal, transducción de señal entre la matriz extracelular y las redes intracelulares, y en la formación y mantenimiento de la polaridad neuronal (Li *et al.*, 1999; Wu 1999; Li *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007; Jafiani *et al.*, 2011). Por otro lado, *RANBP2* es un componente del complejo que forma el poro nuclear (Yokoyama *et al.*, 1995) con un amplio rango de funciones como facilitar el tráfico proteico y la sumolización (Pichler *et al.*, 2002), el mantenimiento energético de neuronas (Cai *et al.*, 2001; Aslanukov *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007) o la estabilidad cromosómica (Dawlaty *et al.*, 2008), habiéndose asociado algunas mutaciones de cambio de sentido en *RANBP2* con encefalopatía necrotizante (Neilson *et al.*, 2003, 2009). En base a esto, parece que ambos genes podrían tener papeles importantes aunque muy diferentes en el desarrollo del sistema nervioso central.

Dado el interés de los genes y la posibilidad de generación de un gen quimera entre ambos, se realizaron pruebas complementarias para intentar confirmar esta hipótesis.

Primero se caracterizó el punto de rotura a cada lado de la deleción. Para ello, se acotó la deleción basándonos en el método de *Primer walking* según Chinault y Carbon (1979), diseñando cebadores en ambas zonas de incertidumbre con una distancia promedio entre ellos de 5 Kb (8 directos dentro de *LIMS1*: *LIMS1_F1-8*; y 5 reversos dentro de *RANBP2*: *RANBP2_R1-5*) y utilizando reactivos y programas específicos para PCRs de tamaños grandes con cada pareja de cebadores (apartados 3.1.2. y 3.2.2. de material y métodos y anexo VIII). Con esta estrategia observamos que las parejas de cebadores *LIMS1_F2-RANBP2_R4* y *LIMS1_F3-RANBP2_R4* mostraban una banda específica en el paciente de aproximadamente 11 Kb y 6 Kb respectivamente (figura 71).

Mediante la digestión con la enzima *BstXI* del producto de PCR *LIMS1_F2-RANBP2_R4* y el análisis del patrón de bandas obtenido tras la digestión, se pudo delimitar aún más la deleción (apartado 12.2 de material y métodos). En base a esto se diseñó una nueva pareja de cebadores (*LIMS1_F3.5-RANBP2_R3.5*), con la que se realizó una nueva PCR con muestra del paciente y sus progenitores. Solo amplificó el DNA proveniente del paciente, indicando que se trataba de una alteración *de novo*. La secuenciación de ese producto de PCR y la comparación de la secuencia obtenida con las de referencia para *LIMS1* y *RANBP2* permitió delimitar la deleción y localizar el punto de rotura en *LIMS1* en la posición chr2:109274856-109274870 y en *RANBP2* en la posición chr2:109397243-109397257 (figura 72).

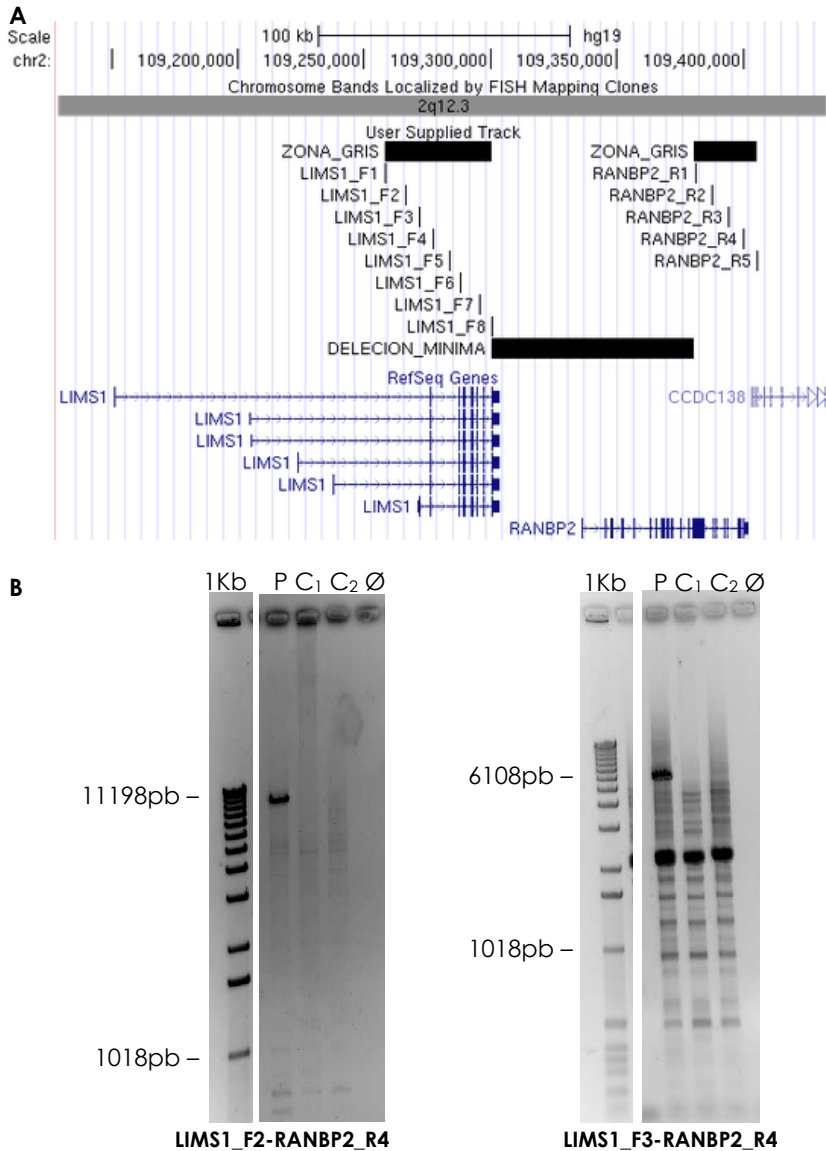


Figura 71: Estrategia para acotar los puntos de rotura que han generado la deleción en la muestra del paciente CGM2433. (A) Representación del UCSC de la localización de los cebadores diseñados en ambas zonas de incertidumbre para acotar el punto de rotura. (B) Imagen del resultado de las PCRs con banda específica para la muestra del paciente (P) y dos controles (C), con la pareja de cebadores LIMS1_F2-RANBP2_R4 (izquierda) y LIMS1_F3-RANBP2_R4 (derecha). Gel al 1 % Agarosa. Ø: Control negativo (sin DNA); 1Kb: Patrón de pesos moleculares 1 Kb (Invitrogen).

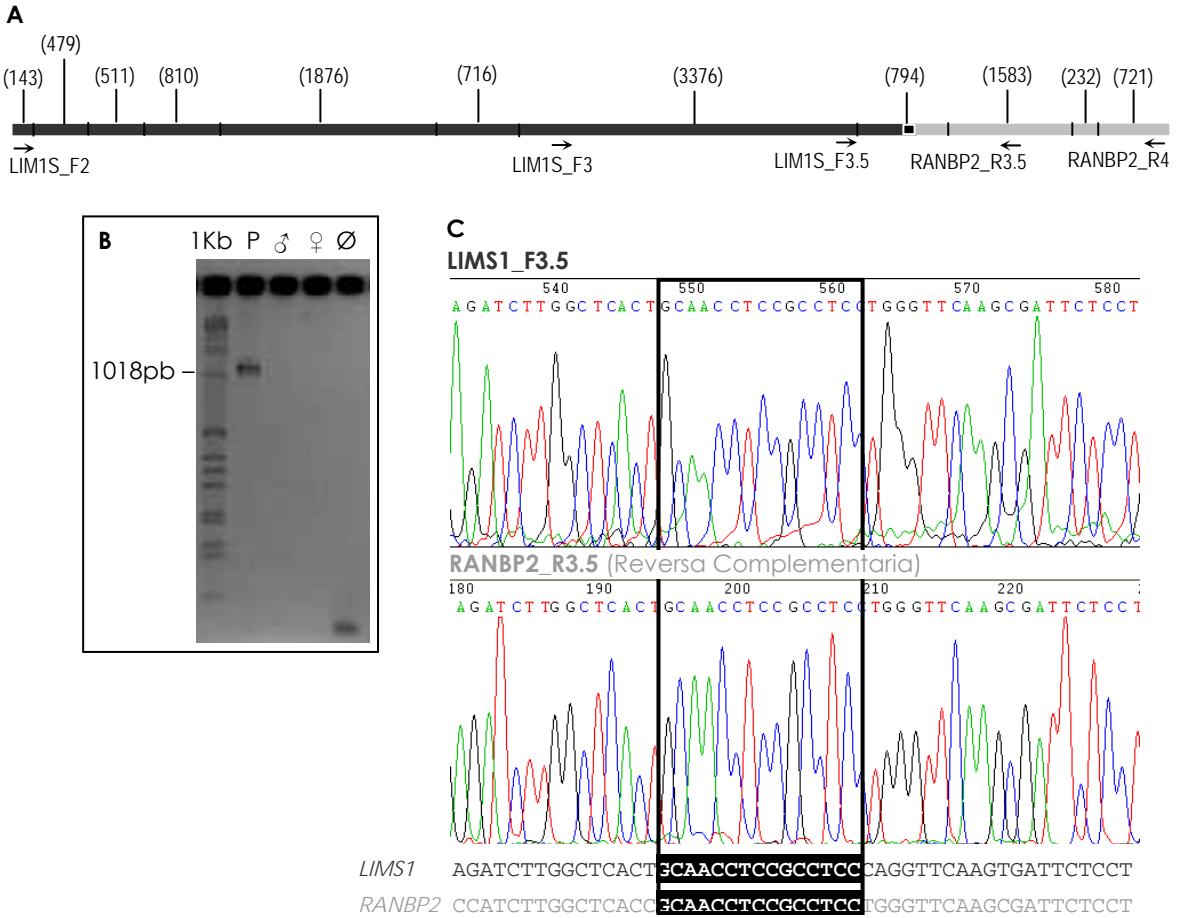


Figura 72: Representación de los pasos seguidos para caracterizar los puntos de rotura que han dado lugar a la deleción en la muestra CGM2433. (A) Esquematación del patrón de digestión del producto de PCR LIM1S_F2-RANBP2_R4 con BstXI, indicando el tamaño de cada fragmento entre paréntesis. (B) Resultado de la PCR realizada con muestra del paciente (P) y sus progenitores (♂ y ♀) utilizando los cebadores LIM1S_F3.5-RANBP2_R3.5. (C) Resultado de la secuenciación de la PCR anterior, recuadrando en negro la secuencia homóloga de 15 nucleótidos donde se ha producido la rotura del DNA que ha dado lugar a la deleción. En la parte inferior se muestran las secuencias de referencia para ambos genes. ∅: Control negativo (sin DNA); 1Kb: Patrón de pesos moleculares 1 Kb (Invitrogen).

Ambos puntos de rotura de la deleción presentan una gran homología con 15 nucleótidos idénticos, flanqueados por secuencias con microhomología entre ambas secuencias correspondientes a dos elementos Alu distintos (figura 73).

26. Las isoformas de *LIMS1* cuyo primer exón es codificante no están en pauta de lectura con el exón 26 de *RANBP2*.

Utilizando las secuencias de cDNA de ambos genes, se diseñó una nueva pareja de cebadores localizada en el exón 2 del gen *LIMS1* (*LIMS1E2F*) y en los exones 26 y 27 de *RANBP2* (*RANBP2E26-27R*), que daría lugar a un amplicón de 208 pb en el RNA del paciente. Esta PCR se realizó con muestra de cDNA proveniente del paciente y de una muestra control, produciéndose solo la amplificación en el paciente. Finalmente se realizó la secuenciación de este producto de PCR para confirmar que se trataba de la secuencia esperada (figura 74).

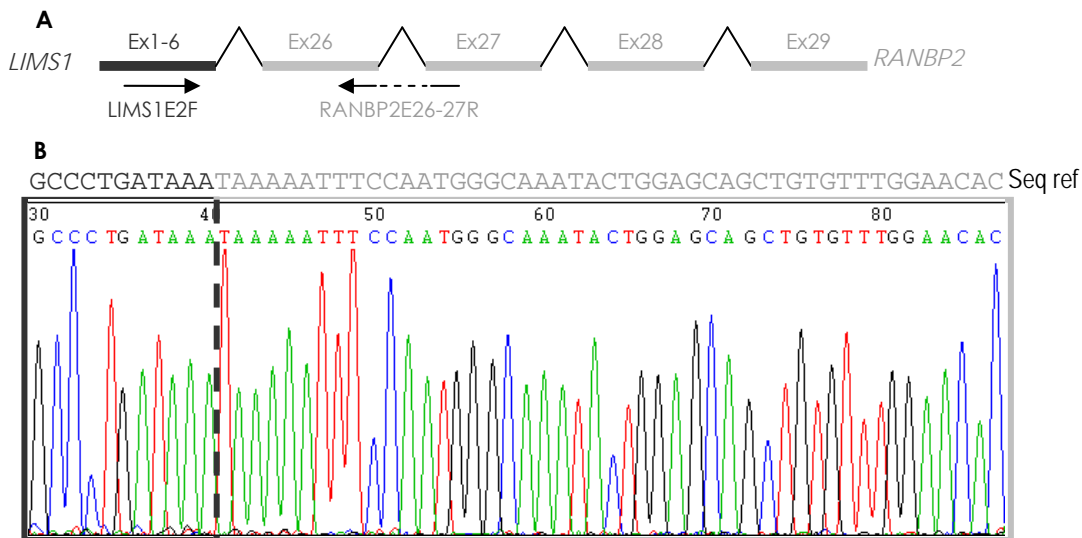


Figura 74: Estudios confirmatorios de la existencia de un transcrito de fusión entre *LIMS1* y *RANBP2* en muestra de cDNA del paciente CGM2433. (A) Esquema del gen quimera analizado con la representación de los cebadores utilizados para la RT-PCR en la parte inferior. (B) Resultado de la reacción de secuenciación del fragmento amplificado por RT-PCR a partir de cDNA del paciente, separándose en dos recuadros la secuencia perteneciente a cada uno de los genes y mostrándose en la parte superior la secuencia de referencia esperada del transcrito de fusión.

Además, mediante un análisis de alineamiento de la secuencia obtenida por PCR frente al genoma (BLAST) se confirmó que este fragmento pertenecía a los genes *LIMS1* y *RANBP2*, sin presentar homología con otra región distinta del genoma.

Teniendo en cuenta las secuencias codificantes de ambos genes, es decir, que el exón 2 de *LIMS1* no es codificante y que la primera metionina a partir del exón 26 de *RANBP2* se localiza en el siguiente exón, el transcrito de fusión obtenido podría tener una pauta de lectura abierta teórica correspondiente a los últimos exones de *RANBP2* (27-29). La región promotora de esta hipotética proteína correspondería principalmente al gen *LIMS1* mientras que la región codificante estaría formada por 260 aa pertenecientes al extremo C-terminal de *RANBP2*. Este péptido contendría el dominio conservado denominado *cyclophilin-ABH-like* (cd01926) implicado en el proceso de plegamiento de proteínas.

Para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar un *Western blot*, que no se pudo realizar por no existir anticuerpos comerciales específicos para esa región de la proteína.

Todos los cebadores utilizados en este apartado y las condiciones de PCR se encuentran en el anexo VIII.

1.5.2.2. Quimera *ARID1B-ZDHHC14* por delección de *nov*

La paciente CGM2428 se incluyó en el proyecto cuando tenía 5 años por presentar DI moderada, retraso motor y del lenguaje, microcefalia, rasgos dismórficos y algunas anomalías congénitas, con un percentil de talla y peso de 3-10. El estudio en DNA de la paciente mediante CGH-array comercial en busca de CNVs detectó una delección que afectaba al gen *ARID1B*. Para acotar mejor esta alteración y validar el array de diseño propio se repitió el estudio con la primera versión de este array, confirmándose el resultado (figura 75).

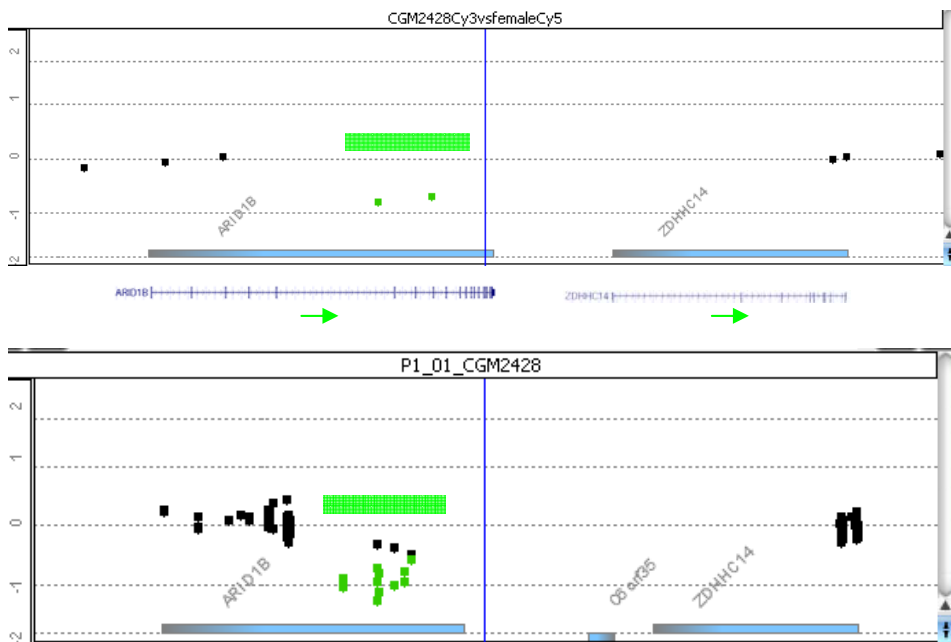


Figura 75: Representación de la delección detectada mediante CGH-array en muestra de DNA de la paciente CGM2428. En la parte superior se encuentra el resultado obtenido con el CGH-array comercial, mientras que en la parte inferior se encuentra el resultado del CGH-array de diseño propio (v1). Ambas imágenes se han obtenido del *Workbench*. En la parte central se ha integrado a escala la representación de los genes *ARID1B* y *ZDHHC14* obtenida del UCSC con la orientación de cada uno de ellos indicada con una flecha. La región alterada en cada array está indicada con un recuadro verde.

Las regiones de incertidumbre que delimitaban la delección contenían parcialmente dos genes: *ARID1B* y *ZDHHC14*. En el momento en el que se obtuvieron estos resultados, estos genes no se habían relacionado con ninguna patología. La información que se tenía de ambos genes era la siguiente: *ARID1B* formaba parte de una familia proteica con capacidad de unión al DNA

implicada en el control del crecimiento, la diferenciación y el desarrollo celular (Wilsker *et al.* 2002); mientras que no se disponía de mucha información relacionada con el gen *ZDHHC14*, aparte de que codificaba para una proteína con dedos de zinc y, por tanto, podría estar implicada en la regulación de la expresión génica.

En base a esto, se intentó confirmar la posibilidad de que se hubiera generado un nuevo gen quimera entre estos genes, pero, dado que en este caso las zonas de incertidumbre eran de mayor tamaño (76 Kb y 615 Kb respectivamente) se optó por otra estrategia basada en PCR cuantitativa. Se diseñaron parejas de cebadores localizados en región exónica de ambos genes. Mediante PCR cuantitativa, se pudo determinar que se trataba de una alteración *de novo*, y acotar la región delecionada entre el exón 5 y 6 del gen *ARID1B* y el exón 1 y 2 del gen *ZDHHC14* (figura 76).

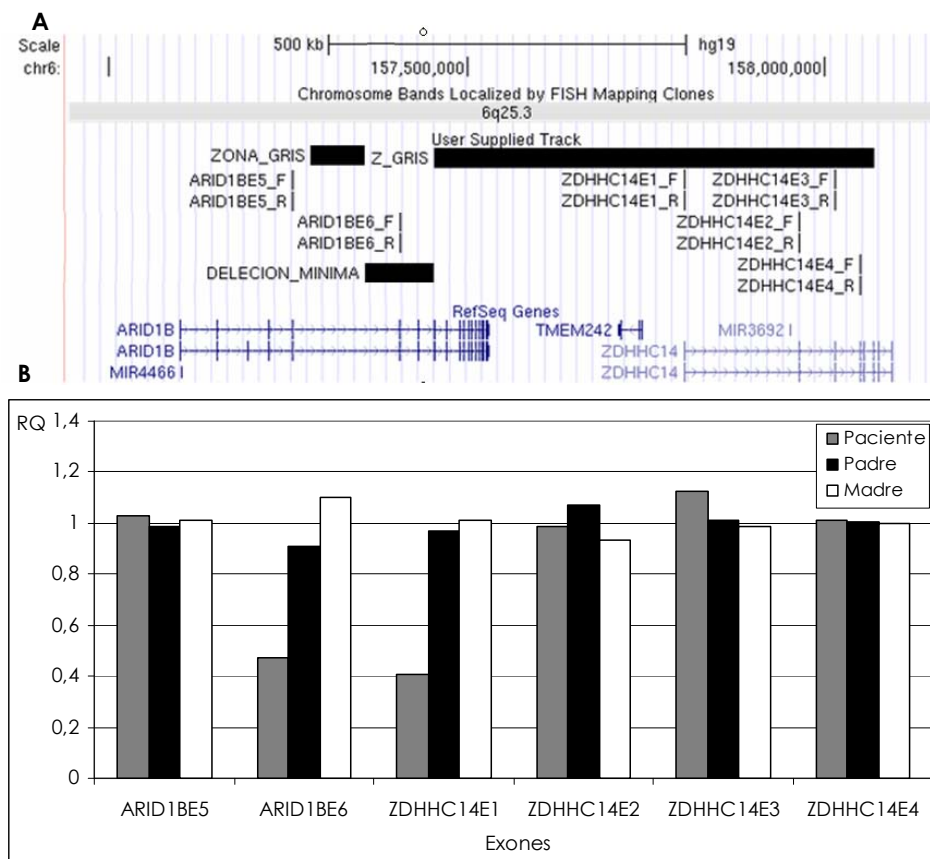


Figura 76: Estrategia basada en qPCR para acotar los puntos de rotura que han generado la deleción en la muestra de la paciente CGM2428. (A) Representación del UCSC de la localización de los cebadores diseñados en exones de *ARID1B* y *ZDHHC14*. (B) Diagrama de barras que representa el resultado obtenido en la qPCR (cantidad relativa frente a un gen de referencia de cada una de las muestras en los distintos genes analizados).

Para confirmar la existencia de un transcrito de fusión formado por la combinación de ambos genes, utilizando cDNA de la paciente y muestra control, se realizó una PCR con las parejas de cebadores exónicos ARID1BE5_F-ZDHHC14E2_R y ARID1BE5_F-ZDHHC14E3_R. En ambos casos solo amplificó la muestra de la paciente. El producto de PCR específica del transcrito de fusión se secuenció, confirmándose que se trataba de la secuencia esperada. El alineamiento de la secuencia obtenida por RT-PCR frente al genoma (BLAST), confirmó que este fragmento pertenecía a los genes *ARID1B* y *ZDHHC14*, sin presentar homología con ninguna otra región ni del genoma ni del transcriptoma. Además se utilizaron cebadores específicos para cada gen (*ARID1BE5_F-ARID1BE6_R* y *ZDHHC14E1_F-ZDHHC14E2_R* respectivamente), como control positivo de la PCR, observándose banda tanto en la muestra de la paciente como en el control. El resultado de esta RT-PCR mostró que el nivel de expresión del gen quimera es similar al mRNA intacto de *ARID1B* (figura 77).

Todos los cebadores utilizados en este apartado y las condiciones de PCR se encuentran en los anexos VII y VIII.

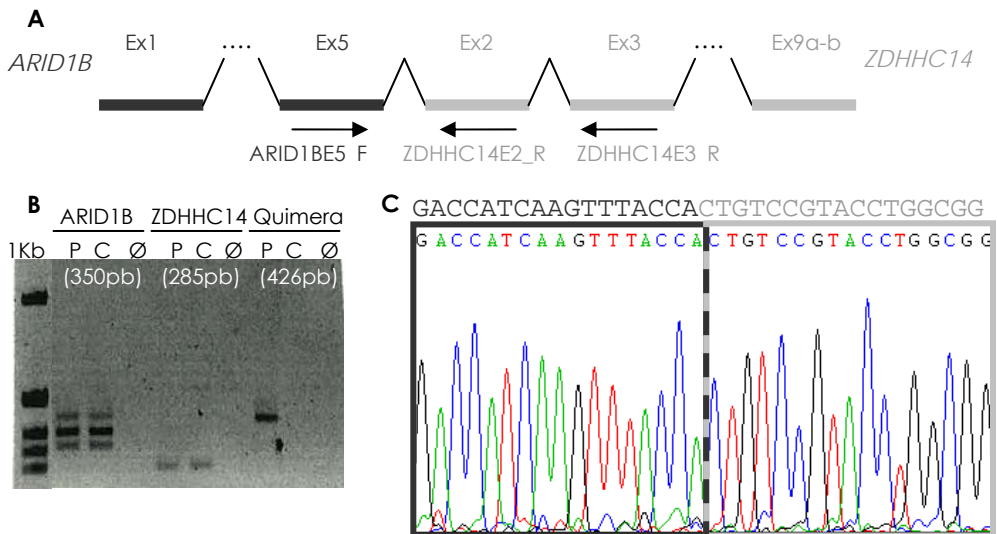


Figura 77: Estudios confirmatorios de la existencia de un transcrito de fusión entre *ARID1B* y *ZDHHC14* en muestra de cDNA de la paciente CGM2428. (A) Esquema del gen quimera analizado, con la representación de los cebadores utilizados para la RT-PCR en la parte inferior. (B) Resultado de la RT-PCR de la muestra de la paciente (P) y muestra control (C) para los cebadores específicos de *ARID1B*, *ZDHHC14* y el gen quimera formado por ambos. (C) Resultado de la reacción de secuenciación del fragmento amplificado por RT-PCR del gen quimera, separándose en dos recuadros la secuencia perteneciente a cada uno de los genes y mostrándose en la parte superior la secuencia de referencia esperada del transcrito de fusión. Ø: Control negativo (sin cDNA); 1Kb: Patrón de pesos moleculares 1 Kb (Invitrogen).

Según la base de datos de Refseq, *ARID1B* codifica para dos isoformas distintas que se diferencian por el procesamiento alternativo del exón 3 (la isoforma 2 con 20 exones y 2249 aa, y la isoforma 1 con 19 exones y 2236 aa). Por otro lado, el gen *ZDHHC14* con 9 exones codifica también para dos isoformas distintas que

se diferencian en el último exón (figura 76A). El transcrito de fusión formado por ambos genes no se encuentra en la misma pauta de lectura, por lo que codificaría para una hipotética proteína de 722 aa formada por 679 aa correspondientes al extremo N-terminal de ARID1B y 43 aa en su extremo C-terminal que corresponderían a una nueva secuencia peptídica.

Para confirmar esta hipótesis se trató de detectar la presencia de la proteína quimera. Dada la existencia de anticuerpo comercial específico para la región 1-422 aa de ARID1B (Santa Cruz Biotechnology sc-32762), y que mediante RT-PCR se había confirmado que la expresión del mensajero procedente de leucocitos de *ARID1B* y del gen quimera era equivalente, se intentó poner a punto la técnica de *Western blot* para detectar ARID1B (230 KDa). Para ello se utilizó muestra de proteínas obtenidas de sangre periférica de un individuo sano y como proteína control se utilizó anticuerpo comercial específico para la actina (42 KDa; SIGMA A1978). Pese a los distintos intentos realizados, solo se consiguió detectar la presencia de actina, y no se observó ninguna banda con los anticuerpos específicos para ARID1B, por lo que se abandonó esta vía para confirmar la existencia de la proteína quimera.

Con posterioridad a la realización de este estudio, se publicaron varios trabajos en los que se demostró que distintas alteraciones en el gen *ARID1B*, incluidas las deleciones completas y parciales, causan el síndrome de Coffin-Siris (Tsurusaki *et al.*, 2012; Santen *et al.*, 2012 y 2014). En base a eso se revisó la clínica de esta paciente y se confirmó que presentaba rasgos clínicos compatibles con este síndrome:

- Datos neonatales: Peso en percentil 10-25 (2740 g a las 42 semanas); trastorno alimenticio.
- Discapacidad intelectual moderada.
- Retraso motor (inicio de deambulación a los 18 meses) y pobre coordinación.
- Retraso del lenguaje: A los cinco años comenzó a hablar con ayuda de logopeda.
- Microcefalia.
- Rasgos dismórficos: Hipertriosis y sinofridia pero escaso cabello en el cuero cabelludo con abundante pérdida; cara redonda, con orejas dismórficas (pequeñas y de implantación baja), raíz nasal hundida, labios gruesos y dientes separados.
- Anomalías congénitas: Uñas de los pies distróficas, uñas del quinto dedo de la mano hipoplásicas, clinodactilia y braquidactilia en manos.
- Talla baja: Percentil 3-10.

Además presentaba micrognatia, hipotelorismo y pigmentación de la piel alterada con manchas acrómicas aunque no presenta otros rasgos también asociados al síndrome de Coffin-Siris como la agenesia de cuerpo calloso o hipotonía.

1.5.2.2.3. Quimera ZNF451-KIAA1586 por duplicación heredada

La paciente XF2605 se incluyó en el proyecto cuando tenía 5 años por presentar DI moderada, retraso motor y del lenguaje, trastornos del comportamiento, autismo, rasgos dismórficos y agenesia parcial del cuerpo calloso. Mediante la primera versión del CGH-array de diseño propio en busca de CNVs se detectó una duplicación que afectaba al gen *KIAA1586*, y cuya zona gris centromérica incluía a varios genes (figura 78).

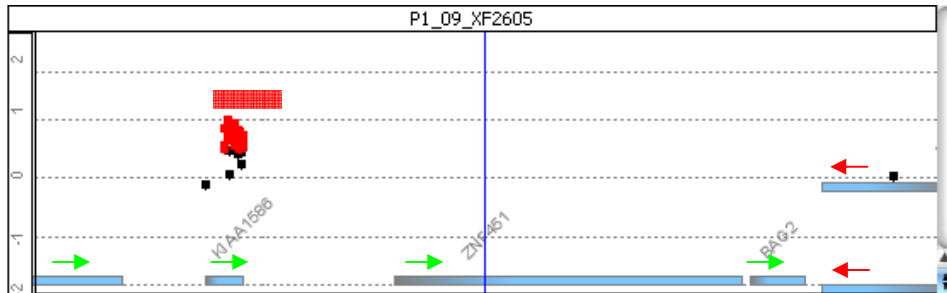


Figura 78: Representación de la duplicación detectada mediante CGH-array en muestra de DNA de la paciente XF2605. En la imagen obtenida del Workbench se observan las sondas duplicadas y las flanqueantes conservadas que delimitan las zonas de incertidumbre. La región mínima alterada está indicada con un recuadro rojo, mientras que la orientación de los genes se ha indicado con flechas,

El gen *KIAA1586* fue seleccionado como candidato funcional asociado a autismo en base a las publicaciones de Bucan y colaboradores (2009) y Pinto y colaboradores (2010). Los primeros lo consideraron como un gen de susceptibilidad a autismo al estar deletado en 5 de 1771 pacientes con TEA no emparentados y no encontrarlo alterado en los 2538 controles estudiados, aunque también se encontró deletado en algunos familiares de los pacientes afectados (hermanos y/o padres). Por otro lado, Pinto y colaboradores (2010) consideraron a *KIAA1586* como gen candidato de autismo en el análisis de CNVs de baja frecuencia (<1 %). No se dispone de mucha más información relacionada con este gen aparte de que codifica para una proteína de dedos de zinc, y por tanto con capacidad de unión a DNA, con expresión en cerebro y tejido embrionario.

Dentro de la zona gris centromérica, se encuentra el gen *ZNF451*, que también codifica para una proteína de dedos de zinc y actúa como factor transcripcional con amplia expresión génica.

Estos dos genes comparten una duplicación segmentaria de más de 1.7 Kb con un 98 % de homología de secuencia que contiene los primeros exones de ambos. En base a esto, se intentó confirmar la posibilidad de que se hubiera generado un gen quimera entre estos genes mediado por la presencia de la duplicación segmentaria (figura 79).

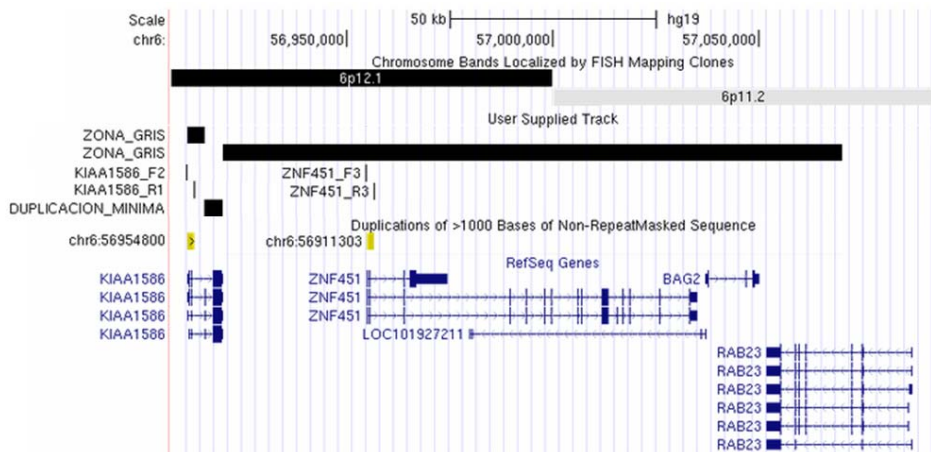


Figura 79: Estrategia para confirmar la generación por duplicación de un gen quimera mediado por duplicación segmentaria en la muestra de la paciente XF2605. Imagen del UCSC donde se encuentra representada la región mínima duplicada, las zonas grises que la delimitan, los cebadores diseñados en los genes *KIAA1586* y *ZNF451*, flanqueantes a las duplicaciones segmentarias, las propias duplicaciones segmentarias y los genes localizados en toda la región representada.

Mediante PCR se amplificó un fragmento del tamaño esperado del gen quimera tanto en la paciente como en su padre. Digiriendo el fragmento obtenido con las enzimas de restricción *RsaI* y *PstI* se obtuvo un patrón de digestión compatible con el gen quimera (apartado 1.2 de material y métodos). Además la secuenciación de ambos extremos de la PCR permitió confirmar la generación del gen quimera (figura 80).

Analizando la localización de la duplicación segmentaria y comparando las secuencias de ambos genes utilizando el BLAST, el gen quimera estaría formado al menos por la región promotora del gen *ZNF451* y la mayor parte de la región codificante del gen *KIAA1586*, pudiendo ser la región 5'UTR y los dos primeros exones codificantes de cualquiera de los dos genes, dado que se encuentran dentro de la duplicación segmentaria y presentan una gran homología de secuencia (figura 81).

Por lo tanto, la duplicación presente en la paciente XF2605 se trata de una alteración heredada que da lugar a un gen quimera entre los genes *KIAA1586* y *ZNF451*. Esta alteración fue clasificada como VOUS, dado su carácter heredado de un progenitor aparentemente sano.

Los cebadores utilizados en este apartado y las condiciones de PCR se encuentran en el anexo VIII.

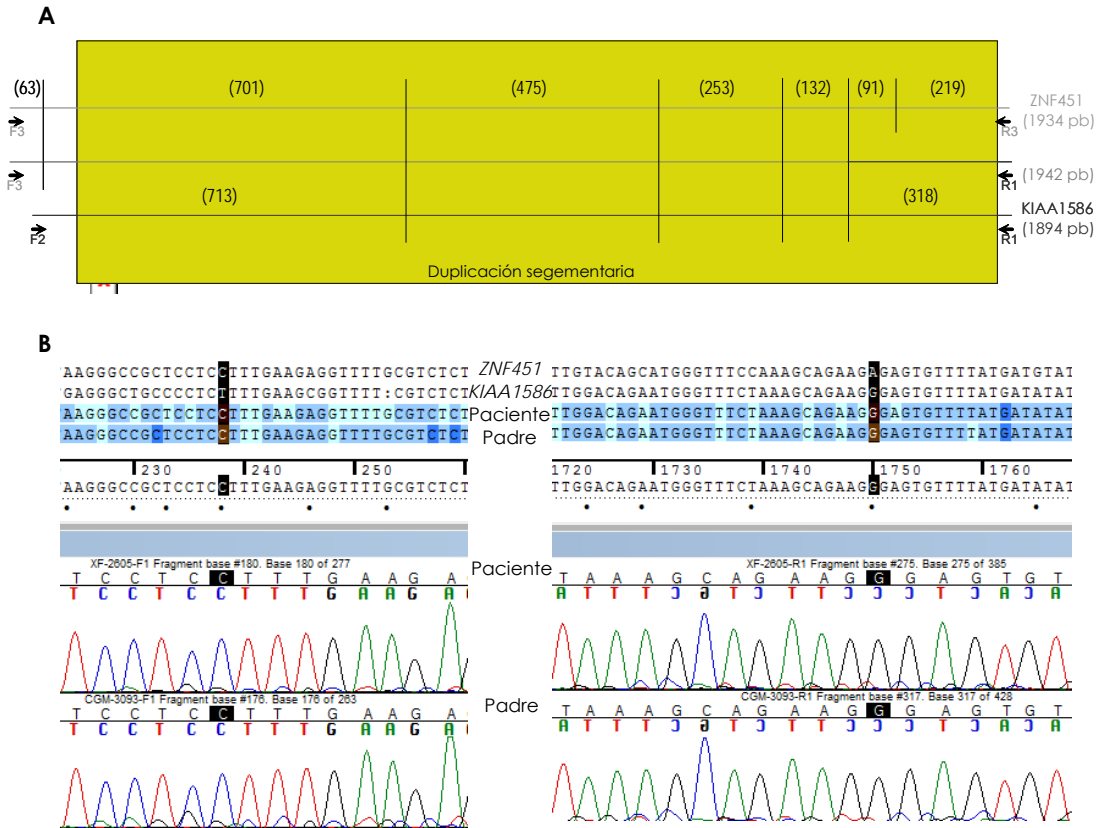


Figura 80: Estudios confirmatorios de la existencia del gen quimera entre *ZNF451* y *KIAA1586* en muestra de la paciente X2605. (A) Patrones de digestión con *RsaI* y *PstI* en el producto de PCR de la muestra de la paciente. En la parte central se representa el patrón obtenido para el gen quimera (producto de PCR *ZNF451_F3-KIAA1586_R1*), mientras que en los extremos se representan los patrones esperados y obtenidos para los genes *ZNF451* y *KIAA1586* respectivamente (producto de PCR *ZNF451_F3/R3* y *KIAA1586_F2/R1*), marcándose en un recuadro amarillo la localización de la duplicación segmentaria. (B) Resultado de la secuenciación de ambos extremos de la PCR. En la parte superior se indican las secuencias de referencia de los genes *ZNF451* y *KIAA1586* y las obtenidas de las muestras de la paciente y su padre, mientras que en la parte inferior se muestra el cromatograma de las secuencias.

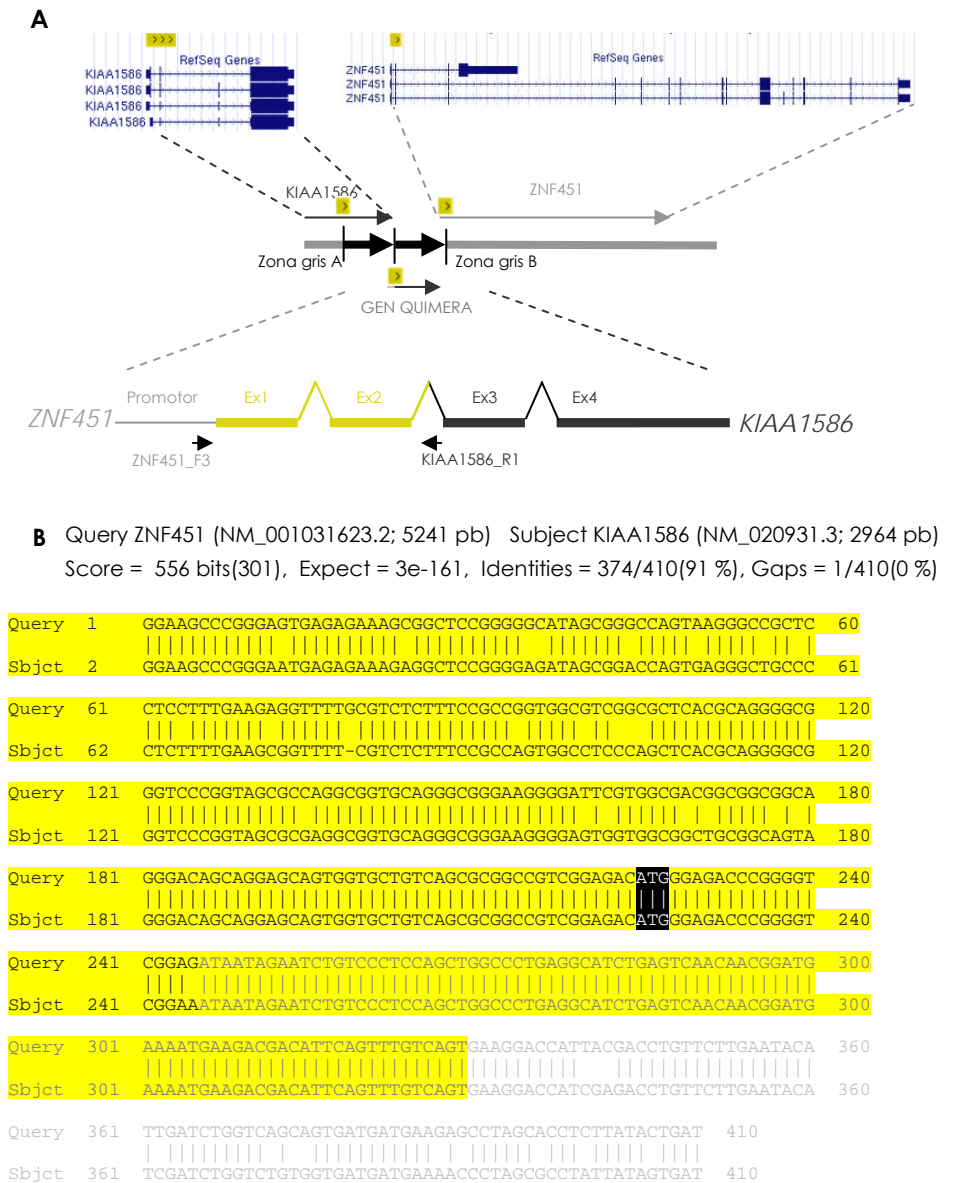


Figura 81: Esquema del gen quimera generado en la muestra de la paciente XF2605. (A) Representación de los genes y las duplicaciones segmentarias (extraído del UCSC) y el gen quimera resultante. (B) Zona de alta homología del cDNA de ambos genes (los tres primeros exones) mostrándose en escala de grises los distintos exones, en amarillo la secuencia contenida dentro de las duplicaciones segmentarias y en negro el primer codón (BLAST).

2. Genes candidatos

2.1 Rastreo de mutaciones en el gen *MYT1L*

En base a las manifestaciones clínicas del primer paciente con alteración cromosómica del gen *MYT1L* (XF2463, apartado 1.2.3.6. de resultados), se hizo una selección de 69 pacientes que presentaban DI y microcefalia, para realizar un rastreo de mutaciones en este gen. De los 25 exones que forman *MYT1L*, se seleccionaron 10, bien por su implicación en dominios funcionales como el dominio MYT1 o los dedos de zinc de unión al DNA (exones 6, 7, 10, 14, 15, 16, 21), o bien por representar más del 25 % de la región codificante del gen, como el exón 10 formado por 972 nucleótidos (figura 82). El rastreo de mutaciones se hizo bien mediante análisis de heterodúplex (apartado 13 de material y métodos), confirmando los cambios de los distintos patrones obtenidos por secuenciación (figura 83), o bien directamente por secuenciación (exones 10, 15 y 16). En este rastreo se detectaron 17 cambios distintos en 52 pacientes, de los cuales, 16 se consideraron como polimorfismos, por no implicar un cambio de aminoácido, por ser clasificado como benigno con el estudio *in silico* realizado con la herramienta bioinformática Polymorphism Phenotyping v2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) o por no afectar al procesamiento del RNA mensajero según el predictor *in silico* de Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (tabla 49).

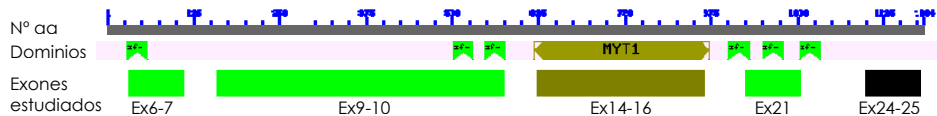


Figura 82: Representación de los dominios funcionales principales de *MYT1L*. Imagen modificada del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP_055840.2). Abajo se han representado las regiones correspondientes a las secuencias analizadas. MYT1: dominio encontrado en *MYT1*; Zf: dominio de unión a DNA (dedos de cinc).

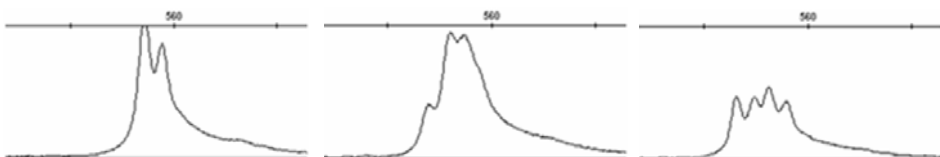


Figura 83: Ejemplo de tres patrones distintos obtenidos por heterodúplex del exón 9 de *MYT1L*.

La única alteración considerada de interés fue una mutación puntual que provoca un cambio de arginina a cisteína en una posición altamente conservada, detectada en la paciente CGM1428 (figura 84). El análisis *in silico* de la mutación c.31C>T (p.R11C), usando la herramienta bioinformática *Polymorphism Phenotyping v2*, (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), predecía como patológica esta alteración (figura 85). Al estudiar a los progenitores se observó que esta mutación puntual se encontraba presente en la muestra procedente de la madre de la paciente, que es una mujer aparentemente sana.

Tabla 49: Resumen de los 17 cambios detectados en el rastreo de mutaciones del gen *MYT1L*.

Variante	Localización		Nº casos ¹	FE	FO
rs7561518 c.1-70T>C	chr2:1983619	Intrón 5	27(3)	0.455	0.239
rs201761335 c.31C>T (p.R11C) (PP2 = 1.000)	chr2:1983519	Exón 6	1	0.0002	0.007
c.36G>A (p.T12T)	chr2:1983514		1	-	0.007
rs2304009 c.56-69G>A	chr2:1983395	Intrón 6	13	0.184	0.094
rs2304008 c.56-48T>G	chr2:1983374		22 (3)	0.436	0.203
rs17338581 c.89+52C>T	chr2:1983241	Intrón 7	5	0.019	0.036
rs3748989 c.291G>A (p.E97E)	chr2:1946968	Exón 9	4	0.172	0.029
c.291G>T (p.E97D) (PP2 = 0.005)			1	-	0.007
rs3748988 c.345T>C (p.D115D)	chr2:1946914		30 (3)	0.488	0.261
rs2241686 c.924C>T (p.N306N)	chr2:1926617	Exón 10	2	0.017	0.014
rs13399855 c.1053G>A (p.P351P)	chr2:1926488		6	0.036	0.043
rs1529667 c.1104C>A (p.P368P)	chr2:1926437		7	0.011	0.051
rs75247762 c.2394G>A (p.Q798Q)	chr2:1893133	Exón 16	7(1)	0.075	0.065
c.2430C>T (p.G810G)	chr2:1893097		1	-	0.007
rs71442304 c.2478C>T (p.P826P)	chr2:1893049		4	0.035	0.029
rs6728368 c.3027A>G (p.G1009G)	chr2:1842968	Exón 21	33(4)	0.4551	0.297
rs6728368 c.3027A>T (p.G1009G)			2	0.0101	0.014

¹Nº de casos con la alteración en heterocigosis, entre paréntesis se indica el nº de casos con la alteración presente en homocigosis.

FE: frecuencia esperada, frecuencia alélica del alelo minoritario descrita en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; FO: frecuencia observada; PP2: puntuación obtenida por el PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

Negrita: alteración considerada de significado clínico incierto.

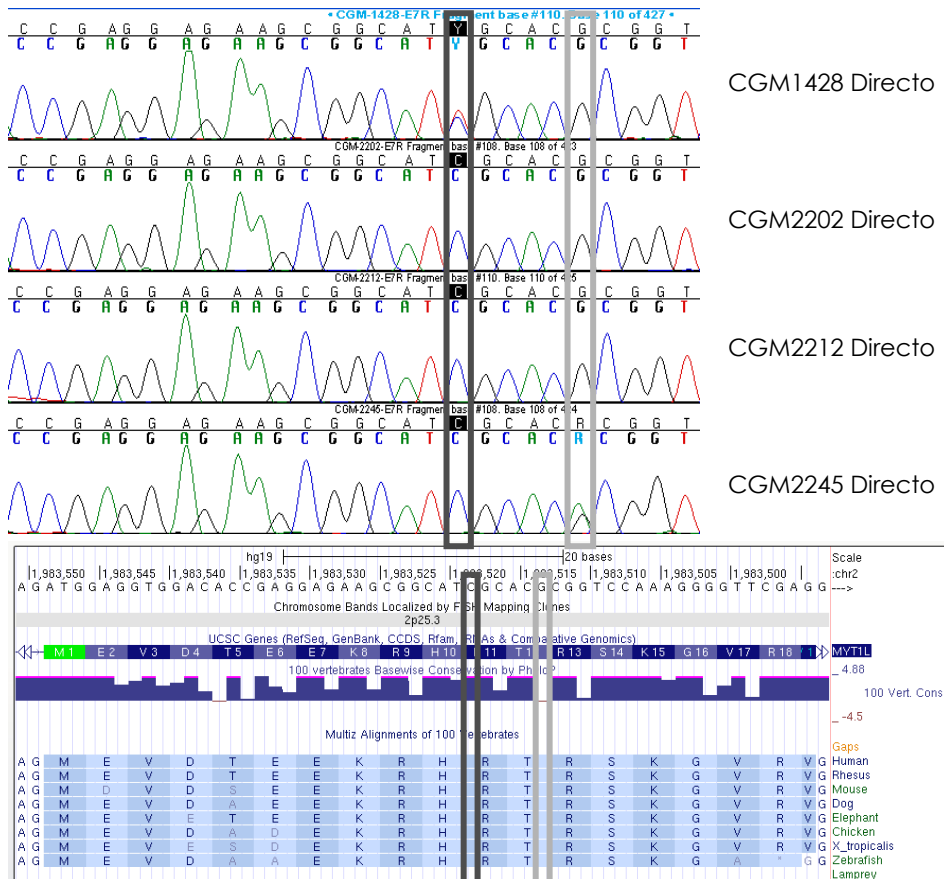


Figura 84: Ejemplo de cambios detectados en *MYT1L*. Se muestra el resultado de la secuenciación directa en el exón 6 de 4 pacientes donde se observan los cambios c.31C>T (p.R11C) y c.36G>A (p.T12T) en dos de ellos (arriba). El recuadro gris oscuro resalta la posición c.31 (p.11) y el recuadro gris claro muestra la posición c.36 (p.12). Abajo se muestra el grado de conservación y los aminoácidos afectados según el UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>).

La paciente CGM1428 presentó un retraso del crecimiento intrauterino y oligoamnios, con un peso al nacer de 1900 g (percentil <3). Además, presentó hipotonía y durante su primer año de vida tuvo dificultades de alimentación debido a la fisura palatina que tenía. A los ocho meses fue diagnosticada de *ductus* arterioso persistente y tuvo neumonías recurrentes durante los primeros 4 años de vida. También presentaba microcefalia, hipoacusia neurosensorial, manos toscas, pies planos valgus, escoliosis, hipersensibilidad cutánea, asimetría facial y otros rasgos dismórficos como nariz bulbosa con narinas antevertidas. Por último, esta paciente presenta un retraso del desarrollo leve, ya que no anduvo hasta los 18 meses y, la última vez que se vio en consulta, con 14 años, no era capaz de correr y tenía un retraso de cinco años en capacidades como la lectura y la escritura. El electroencefalograma fue normal.

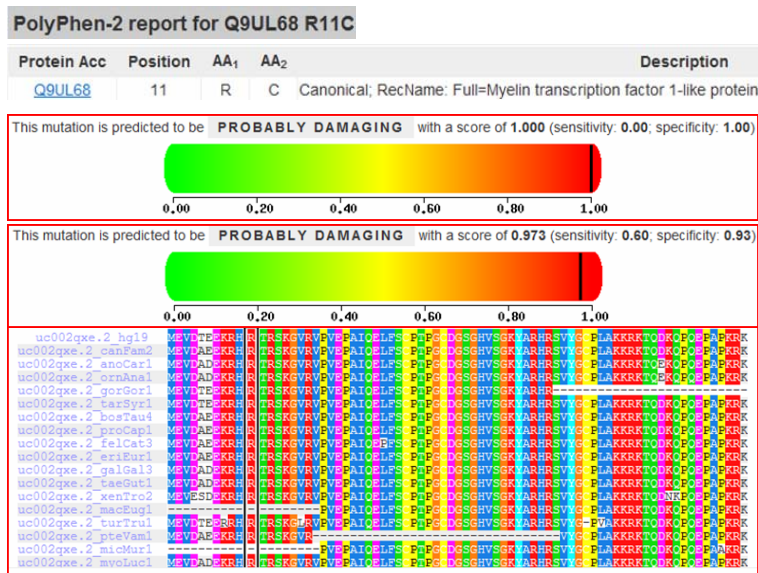


Figura 85: Predicción *in silico* de la patogenicidad del cambio c.31C>T (p.R11C) en *MYT1L*. Se ha utilizado la herramienta bioinformática Polymorphism Phenotyping v2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

3. Metilación generalizada

Para valorar la posible existencia de alteraciones en la metilación global del DNA genómico en pacientes con trastornos del neurodesarrollo de causa desconocida, en primer lugar se evaluaron diferentes técnicas en muestras control seleccionadas de los 36 controles positivos disponibles con mutaciones o cambios de dosis que afectaban a genes de la maquinaria epigenética (anexo II), comparando el resultado con muestras de controles sanos.

Primero se intentó aplicar la técnica de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). Para ello se adquirió el kit comercial Imprint® Methylated DNA Quantification Kit (Sigma) que contiene todos los reactivos necesarios: placa donde se realiza la reacción de ELISA, anticuerpos de captura de DNA metilado y detección, las distintas soluciones (para la unión del DNA, de lavado, de bloqueo, de revelado y de parada de la reacción) e incluso una muestra de DNA control de metilación (50 ng/μl); y se siguió el protocolo especificado por la casa comercial (figura 86).

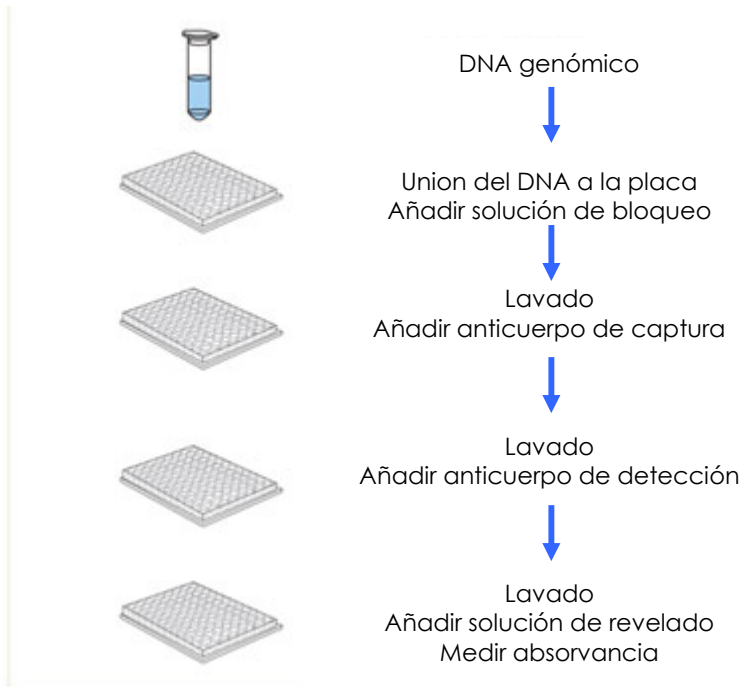


Figura 86: Esquema del protocolo utilizado en el Kit de cuantificación de DNA metilado aplicando la técnica de ELISA. Imagen modificada de la página web de la casa comercial SIGMA (<http://www.sigmaaldrich.com/>).

Esta técnica permite determinar niveles relativos de metilación respecto a una muestra de referencia, que en nuestro caso fue el DNA control proporcionado por la casa comercial. La determinación de los niveles de metilación de las muestras se realiza por colorimetría, siendo la cantidad de DNA metilado proporcional a la absorbancia obtenida. Se realizaron varios intentos para poner la técnica a punto, incluyendo blancos y la curva estándar de la muestra control. Los resultados que obtuvimos presentaban varios inconvenientes:

- Curva de calibración:

Por un lado, para valores por debajo de 50 ng del DNA control no se encontraba una buena correlación con la DO (densidad óptica). Además el valor de la constante de la ecuación de la recta de regresión obtenida daba un valor de DO muy superior al obtenido en los blancos. Por otro lado, la pendiente de la curva tiene un valor muy bajo, lo que nos indica que variaciones significativas de la cantidad de DNA de partida no afectaban al valor de DO obtenido en el rango de ~50-200 ng, y por ende, a la cantidad de DNA metilado estimada por esta técnica (figura 87).

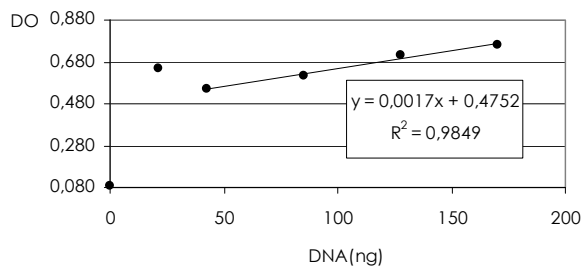


Figura 87: Curva de calibración estándar del ELISA para la cuantificación de DNA metilado. Los valores de la DO de las distintas diluciones de la muestra control representados han sido corregidos restándose el valor promedio de la DO de los blancos, considerado ruido de fondo.

- Valores de absorbancia:

La dispersión de los valores de DO obtenidos, tanto en las muestras problema como en la muestra control, fue muy amplia, obteniéndose resultados incoherentes. Por ejemplo, se obtuvo algún valor de porcentaje de metilación relativo al DNA control ampliamente superior al 100 %. Además, tras determinar el porcentaje de citosinas metiladas en algunas de esas mismas muestras por HPLC, el método de referencia, se observó una clara ausencia de correlación entre los valores obtenidos por las dos técnicas (figura 88).

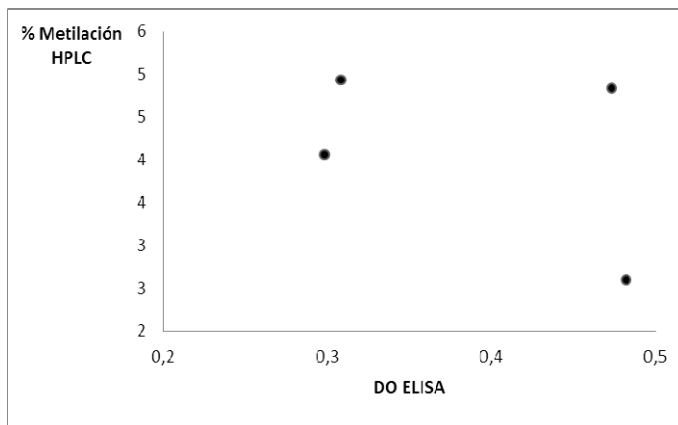


Figura 88: Representación de la falta de correlación entre los resultados obtenidos por la técnica ELISA frente al HPLC en la cuantificación de DNA metilado. Ejemplo de los valores obtenidos por las dos técnicas en cuatro muestras distintas.

En base a todo eso y tras ponernos en contacto con la casa comercial, sin llegar ninguna solución, y averiguar además que otros grupos habían tenido problemas similares con la aplicación de la técnica ELISA, decidimos descartar esta estrategia para la determinación de los niveles de metilación.

Posteriormente, se intentó diseñar un nuevo método para la determinación de DNA metilado centrado en las secuencias Alu basado en la digestión con enzima de restricción y PCR cuantitativa, sin éxito.

Tabla 50: Pacientes con alteración genética conocida en genes implicados en la regulación epigenética seleccionados como controles positivos para el estudio preliminar de metilación generalizada por HPLC.

Muestra	Genero	Edad	Gen	Alteración genética	% C Metilada	Desviación estándar
CGM478	Mujer	0.1	<i>CHD7</i>	Mutación c.4877delC p.S1626fs dn	3.927	0.079
XF2463		1.7	<i>HDAC4</i>	Duplicación arr 2p25.3(1-2,325,614)x1, 2q37(230,994,184-243,199,373)x3 dn	5.400	0.157
CGM1258 ¹		2	<i>MECP2</i>	Mutación c.1357C>T p.R453X	4.934	0.047
EX655 ¹		6.9	<i>MECP2</i>	Mutación c.904c>T p.P302S	2.595	0.057
EX713 ¹		26	<i>MECP2</i>	Mutación c.1163_1206del44 p.P388fs	4.827	0.050
CGM1397		11	<i>EHMT1</i>	Delección arr 9q34.3(139,999,668-141,213,431)x1 dn	5.711	0.012
XF2019 ¹	Varón	1.9	<i>CHD7</i>	Duplicación 46,XY,t(4;7)(q11;q21).arr 8q12(59,373,672-62,371,000)x3. Ish der(4)t(4;7;8)(4pter-q11::8q12::7q21-7qter)(wcp8+) der(7)(7pter- 7q21::4p11-4pter)	3.900	0.130
CGM2143		2.7	<i>HDAC4</i>	Delección arr 2q37.3(238,619,349-243,199,373)x1 dn	5.383	0.130
X841		6	<i>MECP2</i>	Duplicación arr Xq28(152,654,501-153,780,138)x3 mat	4.062	0.050
CGM1388		4	<i>EHMT1</i>	Delección arr 9q34.3(139,794,076-141,213,431)x1 dn	5.794	0.111
XF2761		6.2	<i>HUWE1</i>	Duplicación arr Xp11.22(53,221,610-54,223,027)x3 mat	4.478	0.059
EX155 ¹		9	<i>ATRX</i>	Mutación (Lossi <i>et al.</i> , 1999) c.5459G>A p.R1742K mat	3.604	0.032
XF1702		2	<i>ATRX</i>	Duplicación arr Xq13.2-q21.31(72,433,198-91,125,471)x3 mat	5.717	0.030

Muestra	Genero	Edad	Gen	Alteración genética	% C Metilada	Desviación estándar
CGM858	Varón	4	<i>RPS6KA3</i>	Mutación c.407 C>T p.A136V	4.698	0.035
EX411 ¹		28	<i>RPS6KA3</i>	Inserción (Martínez-Garay <i>et al.</i> , 2003) c.244-8ins2800pb(LINE1) p.K81fs	3.704	0.046
EX125 ¹		23	<i>RPS6KA3</i>	Duplicación (Madrigal <i>et al.</i> , 2007) arr Xp22.12(19,761,845-20,893,188)x3 mat	3.910	0.046
EX124 ¹		26	<i>RPS6KA3</i>	Duplicación (Madrigal <i>et al.</i> , 2007) arr Xp22.12(19,761,845-20,893,188)x3 mat	3.395	0.135

¹Pacientes que no pertenecen a la serie estudiada en el presente trabajo.

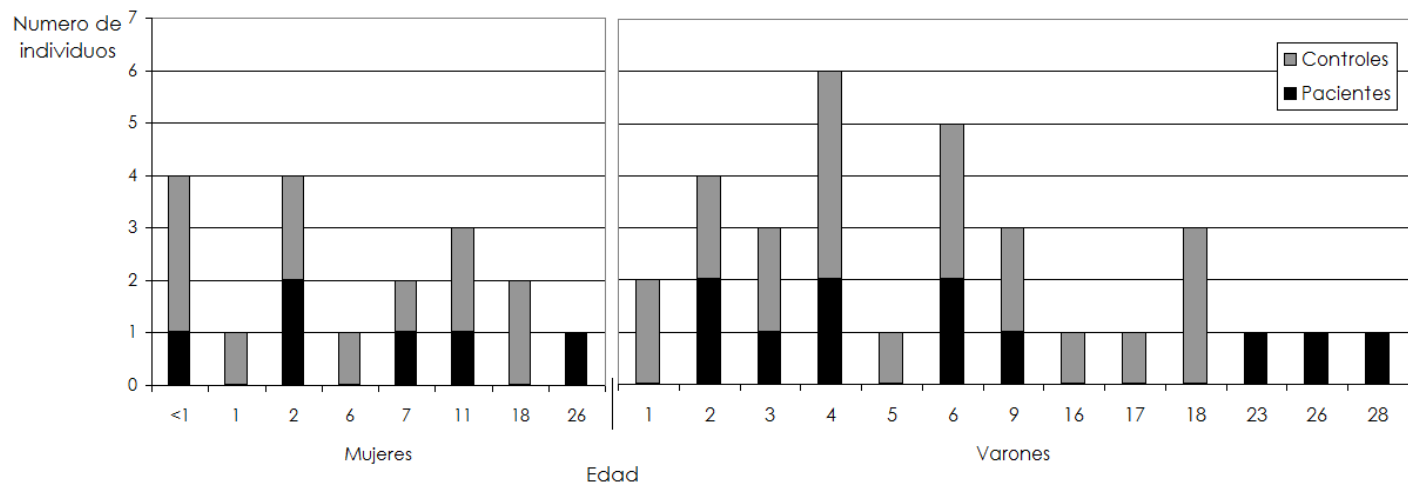


Figura 89: Distribución de género y edad en los individuos analizados por HPLC. Representación del número de muestras en función del género y la edad, en pacientes con alteración genética conocida en genes implicados en la regulación epigenética frente a los individuos sanos seleccionados como controles. Por cada paciente se intentó seleccionar uno o dos controles de su mismo género y edad cercana, teniendo en cuenta que la edad máxima de nuestro grupo control era de 18 años.

Finalmente, dado los fracasos previos, nos pusimos en contacto con el grupo del IDIBELL del Dr. Esteller, para realizar como colaboración la determinación de los niveles de metilación generalizada en el genoma mediante la técnica HPLC (apartado 14 de material y métodos).

Inicialmente se realizó un estudio caso-control en una selección de casos formada por 17 muestras de pacientes con alteración genética conocida en genes implicados en la regulación epigenética (tabla 50) y 33 individuos control, de forma que la distribución por género y edad en los dos grupos fuera lo más parecida posible (figura 89). En los 17 pacientes se obtuvo un valor promedio de 4.472 % de citosinas metiladas (IC 95 % 3.990-4.954 %), mientras que en el grupo control la media fue de 5.121 % (IC 95 % 4.688-5.552 %). El diagrama de cajas de ambas poblaciones y el gráfico Q-Q Normal se encuentran representados en la figura 90, además, el test de Shapiro-Wilk nos confirma que ambas distribuciones pueden considerarse normales (valor p de 0.423 para el grupo de pacientes y 0.197 para el grupo control). La prueba de Levene indica que ambas varianzas se pueden considerar iguales ($p=0.185$), y en base a eso, la prueba t de student nos indica que la diferencia observada entre las medias del grupo de pacientes y controles no es significativa ($p=0.061$; IC 95 % para la diferencia -0.312-1.329 %).

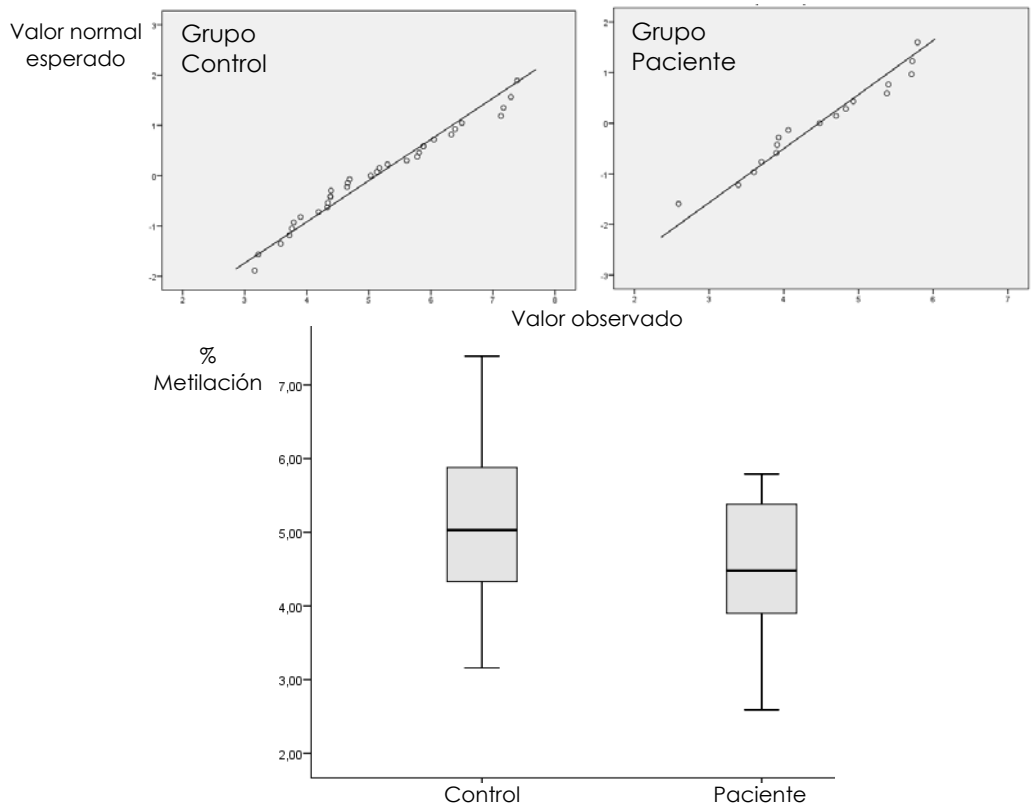


Figura 90: Distribución normal del porcentaje de citosinas metiladas. Representación gráfica de la distribución normal del porcentaje de citosinas metiladas en el grupo control de individuos sanos y el grupo de pacientes con alteración genética conocida en genes implicados en la regulación epigenética. Arriba, gráfico Q-Q Normal para ambos grupos. Abajo, Diagrama de cajas.

Por otra parte, para visualizar la distribución del porcentaje de citosinas metiladas en cada grupo en función del género, se representó un diagrama de cajas apareadas (figura 91) sin observarse diferencias importantes entre el grupo de controles y pacientes de género femenino, pero con una mayor diferencia entre los grupos de género masculino. Para poder apreciar además el efecto de la edad, se realizó una representación gráfica en función de este parámetro (figura 92), observándose que en las mujeres, tanto del grupo control como del grupo de pacientes, no hay una tendencia a variar el porcentaje de citosinas con la edad, mientras que en los varones parece observarse una disminución con los años.

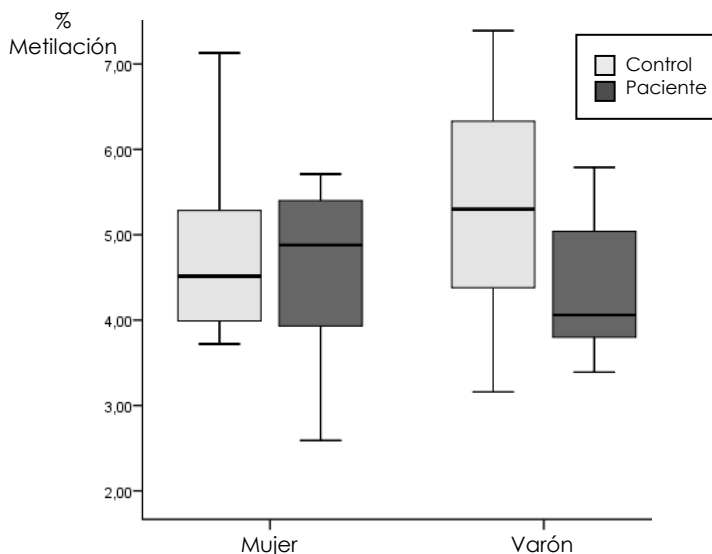


Figura 91: Diagrama de cajas apareadas según el género. Representación gráfica de la distribución del porcentaje de citosinas metiladas en el grupo control y de pacientes subdividido según el género masculino o femenino de los componentes de cada grupo.

Teniendo esto en cuenta, se realizó un análisis de regresión lineal multivariante introduciendo un término de interacción género-edad, e incluyendo ambas variables en el modelo (por el principio jerárquico), para poder valorarlas como posibles variables de confusión (tabla 51). El resultado de este análisis indica que hay un efecto significativo en el valor de metilación debida tanto al género ($p = 0.020$) como a la interacción género-edad ($p = 0.037$), lo que concuerda con lo observado en la figura 92 donde se muestra un efecto en el grupo de género masculino según su edad. En cualquier caso, no se han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de metilación entre el grupo de pacientes con mutaciones en genes de la maquinaria epigenética y el grupo control de individuos sanos ($p = 0.106$), que era el objetivo de este estudio.

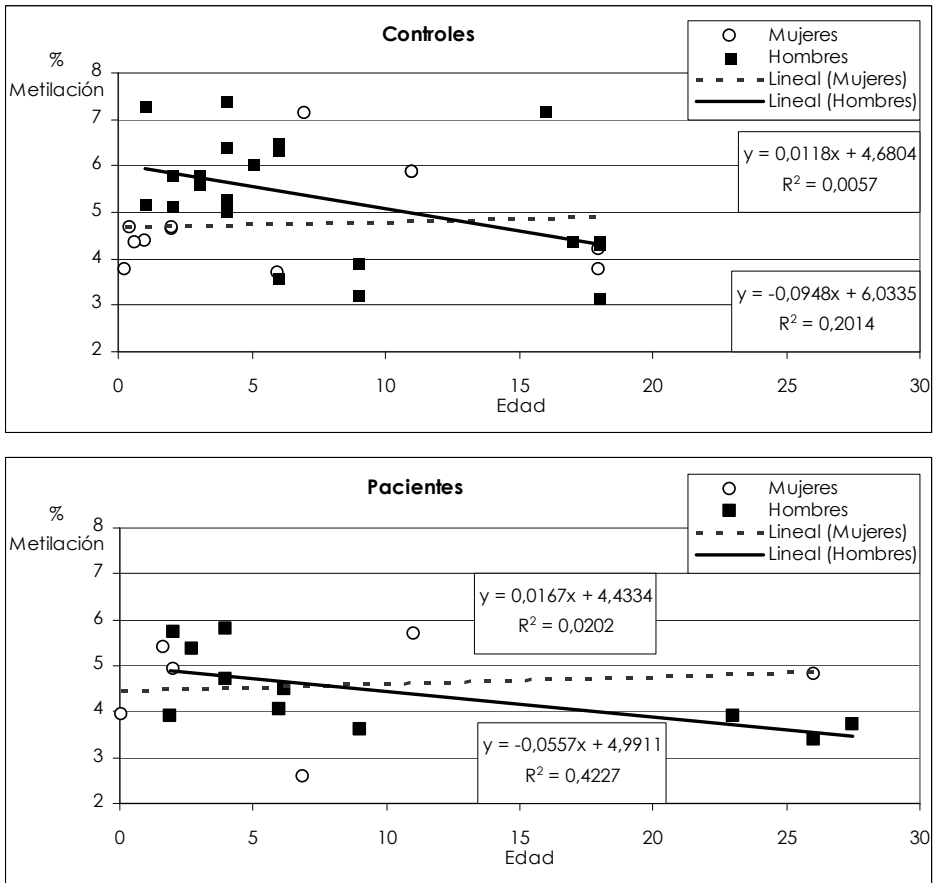


Figura 92: Representación gráfica de la distribución del porcentaje de citosinas metiladas según el género y la edad en paciente y controles. Arriba grupo control; abajo grupo de pacientes.

Tabla 51: Análisis multivariante del porcentaje de metilación en citosinas. Se incluye, además de las variables grupo (control, 0; o paciente, 1), género (femenino, 0; o masculino, 1) y edad (en años), la variable de interacción entre el género y la edad.

	C no E		C E	t	p	IC B (95 %)	
	B	ES	Beta				
constante	4.756	0.356	-	13.378	0.000	4.040	5.472
grupo	-0.527	0.319	-0.217	-1.651	0.106	-1.170	0.116
género	1.065	0.443	0.444	2.404	0.020	0.173	1.956
edad	0.016	0.034	0.105	0.474	0.638	-0.052	0.085
género-edad	-0.090	0.042	-0.569	-2.146	0.037	-0.175	-0.006

C: Coeficiente; E: estandarizado; ES: Error estándar; IC: Intervalo de confianza.

4. Regiones sometidas a impronta

Se realizó el rastreo de alteraciones de la metilación en 4 *loci* sometidos a impronta (*KCNQ1OT1*, *H19*, *SNRPN* y *MEG3*). Se estudiaron 385 pacientes de nuestra serie, de los que se disponía de muestra, sin tener en cuenta las posibles alteraciones detectadas previamente, en un ensayo ciego (apartado 15 de material y métodos). Las muestras con un valor relativo fuera del rango considerado normal (0.8-1.2) fueron confirmadas por otro método. Como ya se ha especificado en el apartado 9 de material y métodos, las alteraciones en *KCNQ1OT1* y *H19* fueron validadas mediante MLPA con la SALSA de MS-MLPA ME030, y las alteraciones en *SNRPN* fueron validadas con la SALSA ME028. Además, las alteraciones en *MEG3* y la posible existencia de disomía uniparental en los otros *loci* se valoraron con marcadores microsatélite de cada región (anexo VI). Los resultados obtenidos, publicados recientemente, se detallan a continuación (Mayo *et al.*, 2015a) (figura 93).

En este estudio se observaron 5 casos con patrones alterados en la metilación de alguno de los *loci* analizados. A continuación se detalla cada uno de estos casos.

4.1 *KCNQ1OT1*

El paciente CGM1484 presenta una pérdida de metilación del 80 % sin cambio de dosis génica (figura 93). Este resultado fue confirmado por las 4 sondas sensibles a metilación del MS-MLPA localizadas en la región sometida a impronta del gen *KCNQ1OT1* (SALSA ME-030), obteniendo un porcentaje de pérdida de metilación promedio del 83 %. El análisis de segregación de marcadores microsatélite del cromosoma 11 en el paciente y sus progenitores descartó la DUP como el mecanismo genético responsable de la alteración en la impronta del gen *KCNQ1OT1*. Este paciente había sido analizado además por el array comercial de oligonucleótidos sin detectarse ninguna alteración de dosis.

En cuanto a la clínica de este paciente, nació a las 36 semanas de gestación, con 2940 g de peso (percentil 50-70) y 51 cm de longitud (percentil >90). Presentaba un ligero retraso motor, ya que no anduvo hasta los 16 meses, y a los 12 años presentaba una pobre coordinación. Además tenía un retraso del lenguaje, ya que no habló hasta los 3 años. En cuanto a los rasgos clínicos, a los 12 años tenía abombamiento de la frente, implantación alta del cabello, macrocefalia, dolicocefalia y almohadillas fetales, con 160 cm de estatura (percentil >97). Presenta una DI moderada, atendiendo a un colegio de educación especial, además tiene problemas de sociabilidad y tics oculares (Mayo *et al.*, 2012).

4.2 *H19*

La paciente CGM897 presenta una hipermetilación en el *locus H19*, con aumento de dosis en *H19* y *KCNQ1OT1* (figura 93).

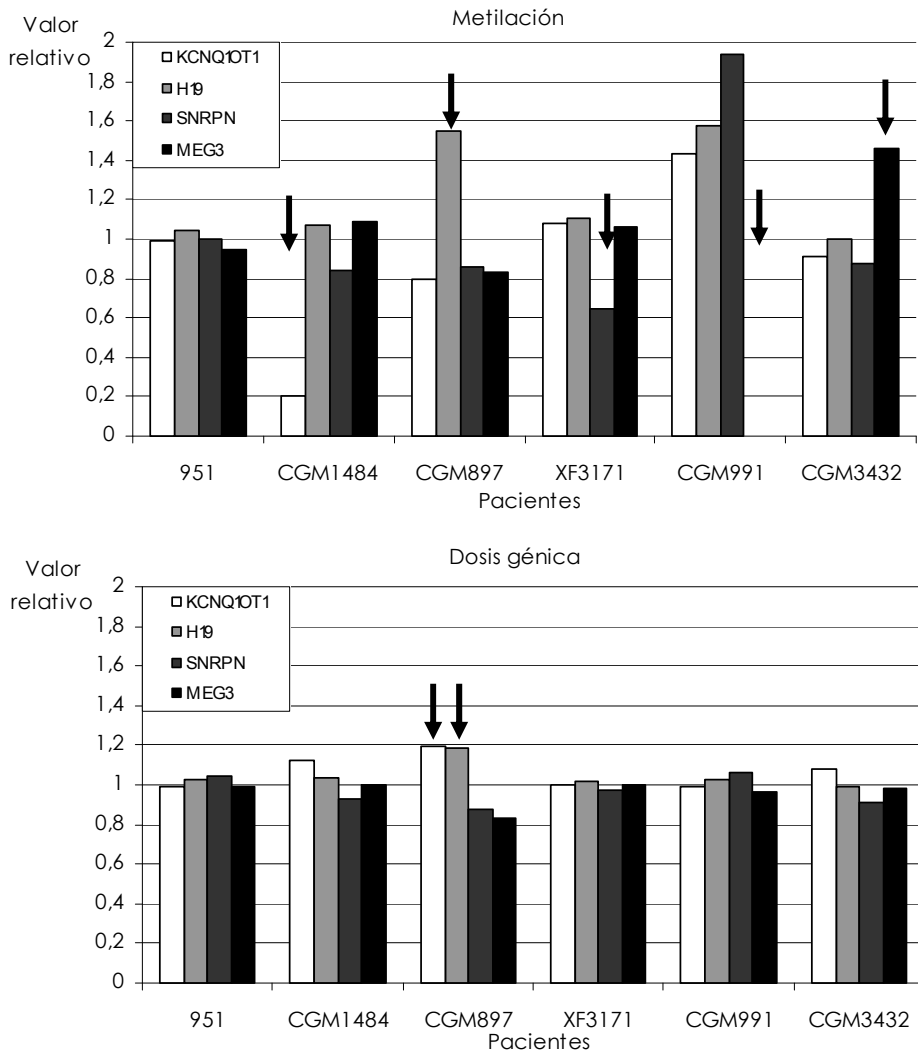


Figura 93: Resultados positivos en el rastreo de alteraciones de la metilación en *loci* sometidos a impronta. Se representa el valor relativo de dosis y metilación de los cuatro *loci* estudiados: *KCNQ1OT1*, *H19*, *SNRPN* y *MEG3*. El primer caso de la izquierda representa el resultado del estudio en la muestra de un paciente sin alteración. Las flechas indican los parámetros alterados.

Previamente, este caso había sido estudiado por MLPA (SALSA P036 y P245) detectándose una duplicación 11p y una delección 4p con las sondas teloméricas de los cromosomas 4 y 11. Mediante el análisis FISH de extensiones de sangre periférica de la paciente y sus progenitores con sondas teloméricas comerciales (tel 4p, tel 11p, tel 4q y tel 11q) se pudo averiguar que la paciente presentaba un cromosoma 4 derivado de una translocación paterna equilibrada (figura 94). Finalmente mediante el estudio por CGH-array se delimitó la alteración, mostrando un reordenamiento complejo con una duplicación de 3.1 Mb del extremo terminal del brazo corto del cromosoma 11 y

una deleción de 3.7 Mb del extremo terminal del brazo corto del cromosoma 4 que contiene al gen *WHSC1*, en la región crítica del síndrome de Wolf-Hirschhorn [arr 4p16.3(1-3,770,271)x1 pat, 11p15.5p15.4(1-3,381,999)x3 pat] (apartado 1.2.3.2. de resultados).

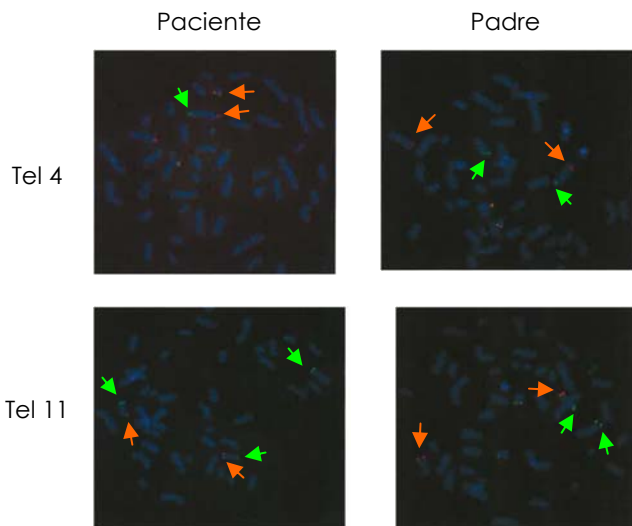


Figura 94: Resultado del análisis FISH en la paciente CGM897 y su padre con sondas teloméricas del cromosoma 4 y 11. Las sondas teloméricas del brazo corto se encuentran marcadas en verde (Spectrum Green) y las sondas del brazo largo en naranja (Spectrum Orange). El padre es portador de una translocación aparentemente equilibrada [46,XY,t(4;11)(p16.2;p15.4)], mientras que la paciente presenta el cromosoma 4 derivado y el cromosoma 11 normal. Las flechas naranjas y verdes indican la posición de hibridación de cada sonda.

La paciente nació a término (40 semanas) con un peso de 3.360 g (percentil 50-75) y una longitud de 52 cm (percentil 90). A los 8 años de edad presentaba hipotonía y algunos rasgos dismórficos como asimetría facial, frente prominente, hipertelorismo, fisuras palpebrales hacia arriba, puente nasal prominente, comisuras de los labios hacia abajo, macroglosia y orejas dismórficas. Además presentaba anomalías congénitas como microcefalia, pelo de implantación baja, hernia umbilical (onfalocele), y dedos afilados, convulsiones, retraso del desarrollo (deambulación a los 4 años y ausencia del habla) y DI.

4.3 *SNRPN*

En la paciente XF3171 se detectó una pérdida de metilación de alrededor del 40 % en el gen *SNRPN* sin alteración de la dosis génica (figura 93). Este resultado fue confirmado por las 4 sondas sensibles a metilación del MS-MLPA localizadas en la región sometida a impronta del gen *SNRPN* (SALSA ME-028), obteniendo en todas ellas un porcentaje de metilación similar, con un valor promedio del 36 %. El análisis de segregación de marcadores microsatélite del cromosoma 15 en la paciente y sus progenitores descartó la DUP como el mecanismo genético responsable de la alteración en la impronta del gen *SNRPN*. Además, esta

paciente había sido analizada por el array de diseño propio (v3) sin detectarse ninguna alteración de dosis.

Se trata de una niña nacida a las 39 semanas de gestación, con 3255 g de peso (percentil 50-70) y 52 cm de longitud (percentil 90). Cuando tenía casi 8 años su peso era de 38 Kg (percentil >97) y su altura era de 135 cm (percentil >97). En el examen clínico de la paciente se percibieron algunos rasgos dismórficos como hipertelorismo, estrabismo, puente nasal elevado, *filtrum* corto, micrognatia y orejas rotadas y de implantación baja. Presentaba un trastorno generalizado del desarrollo (sedestación a los 14 meses y deambulación a los 2 años), DI y comportamiento alterado (agresividad hacia los demás). Además, a la edad de 3 años solo era capaz de articular algunas palabras. La RMN y EEG fueron normales.

4.4 MEG3

Se encontraron dos casos con alteración en el gen *MEG3*, uno de ellos con DUP paterna y el otro con DUP materna.

4.4.1. *Disomía uniparental materna*

El paciente CGM991 presentó una pérdida total de metilación en el gen *MEG3* sin alteración de dosis (figura 93). El análisis de segregación de marcadores microsatélite del cromosoma 14 en el paciente y sus progenitores indicó que se trataba de una disomía uniparental materna (figura 95). Además, mediante MLPA (SALSA 020), marcadores microsatélite (D14S72, D14S1023, y D14S990), FISH (RP11-524O1) y CGH-array, en este paciente se había detectado previamente la presencia de una duplicación *in situ* y *de novo* de origen materno de 4.4 Mb en otra región del mismo cromosoma [arr 14q11.2(20,295,211-24,711,159)x3 dn] (Monfort *et al.*; 2007).

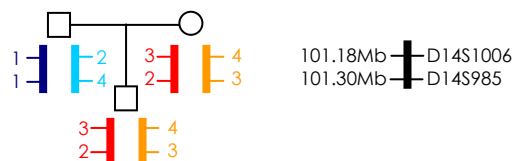


Figura 95: Estudio de marcadores microsatélites del cromosoma 14 del paciente CGM991 y sus progenitores.

Este paciente nació a las 28 semanas de gestación con un peso al nacer de 2350 g (percentil <3), una longitud de 45 cm (percentil <3) y un perímetro craneal de 33 cm (percentil 3-10). A los 13 años presentaba talla baja (144 cm, percentil <3), algunos rasgos dismórficos como coloboma de iris del ojo izquierdo, nariz bulbosa, *filtrum* corto, labios finos, clinodactilia, y sindactilia bilateral parcial de los dedos 2º y 3º de los pies, retrognatia y micrognatia. A los 11 años el desarrollo puberal se detuvo y se produjo un brusco enlentecimiento del crecimiento. Presenta hipogenitalismo, con niveles normales de hormonas como la testosterona, GH, FSH y LH. Por último, presenta un retraso en el desarrollo motor y del lenguaje (empezó a andar a los 16 meses y dijo sus primeras palabras a los 2 años) y leve DI (Monfort *et al.*, 2007).

4.4.2. *Disomía uniparental paterna*

La muestra del paciente CGM3432 mostró una hipermetilación de *MEG3* sin cambio de dosis (figura 93). El análisis de segregación de marcadores microsatélite del cromosoma 14 en el paciente y sus progenitores indicó que se trataba de una disomía uniparental paterna por no disyunción en la meiosis II (figura 96).

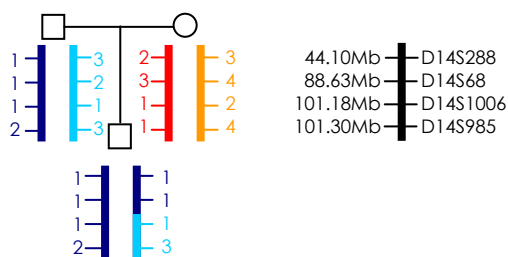


Figura 96: Estudio de marcadores microsatélites del cromosoma 14 en la paciente CGM3432 y sus progenitores.

Además, los estudios de análisis de cambio de dosis por CGH-array mostraron una duplicación en el cromosoma 4 de 146 Kb, que afecta a 5 genes, siendo dos de ellos de especial interés:

- el gen *FGFR3*, que codifica para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos cuyas mutaciones provocan diversas patologías óseas, pudiendo algunas de ellas estar asociadas a DI, como el síndrome CATSHL (OMIM 610474)
- el gen *TACC3*, que codifica para una proteína que parece tener un papel importante en la estabilización del huso mitótico.

Esta alteración fue confirmada por MLPA (SALSA 358) viéndose además que se trataba de una CNV heredada de su padre [arr 4p16.3(1,694,662-1,841,014)x3 pat] (figura 97).

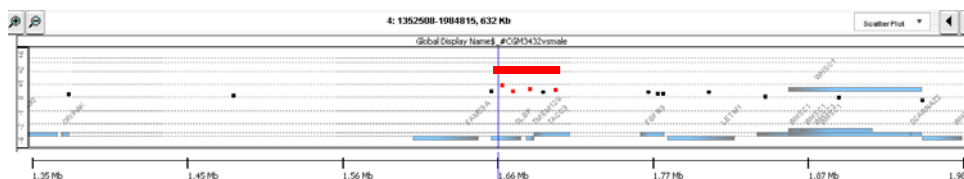


Figura 97: Duplicación detectada mediante el array comercial en el paciente CGM3432.

El paciente nació a las 36 semanas. Durante el embarazo se observó la presencia de polihidroamnios, fémur corto y onfalocele. Pesó 3675 g al nacer (percentil >90) con una longitud de 49 cm (percentil 75-90) y perímetro craneal de 36 cm (percentil >90) con un Apgar 2/5. Además presentaba hipotonía neonatal, y problemas de alimentación. A los 10 años su peso era de 29 Kg (percentil 25) y su talla de 132 cm (percentil 25), persistiendo la hipotonía. Presentaba rasgos dismórficos como frente prominente, estrabismo divergente, ptosis y fisuras palpebrales hacia arriba, puente nasal prominente, labios gruesos, ausencia de algunos dientes, prognatismo y orejas dismórficas. También tenía algunas anomalías congénitas además del onfalocele corregido

quirúrgicamente al nacer, como traqueomalacia, *ductus* arterioso, escoliosis, hernia inguinal, braquidactilia del tercer, cuarto y quinto metacarpo, y pies planos y valgus. Por último presentaba retraso motor y del lenguaje (anduvo y dijo sus primeras palabras a los 3 años y habló frases cortas a los 4), una discapacidad intelectual moderada y trastornos de conducta con agresividad hacia los demás y pesadillas nocturnas. La RMN y EEG fueron normales.

4.5 Polimorfismo en *KCNQ1OT1*

Durante el rastreo de alteraciones nos dimos cuenta que en algunos paciente se observaba una ligera disminución del valor relativo de *KCNQ1OT1* no confirmada por MS-MLPA. Revisando la secuencia de los cebadores utilizados, vimos que el cebador directo *KCNQ1OT1n_F* contenía un SNP cerca del extremo 3' (rs7940500), y mediante secuenciación confirmamos que esos casos eran portadores en homocigosis o heterocigosis de este polimorfismo. Por un lado, para evitar interferencias y falsos positivos en el estudio de los cambios de metilación y dosis, se diseñó un nuevo cebador que no contuviera dicho cambio (*KCNQ1OT1_F*). Por otro lado, para analizar la posible repercusión de dicho polimorfismo en nuestra población, se intentó, primero rastrear por SSCP's y HRM pacientes y controles sin éxito en el diseño, para posteriormente pasar al análisis por secuenciación directamente. En la figura 98 se representan los cebadores diseñados en la región.

De los 170 pacientes analizados con la pareja de cebadores sensibles al polimorfismo rs7940500, 21 presentaban el cambio en heterocigosis y 3 en homocigosis, con una frecuencia del polimorfismo del 7.9 %. Mientras que en 100 individuos control analizados, el polimorfismo rs7940500 se detectó en 12 casos en heterocigosis y en uno en homocigosis con una frecuencia del polimorfismo del 7.0 %. El análisis estadístico de estos valores nos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia observada en el grupo de pacientes y los individuos control con un valor de p igual a 0.689 (IC 95 % para la diferencia de -3.6 a 5.5 %).

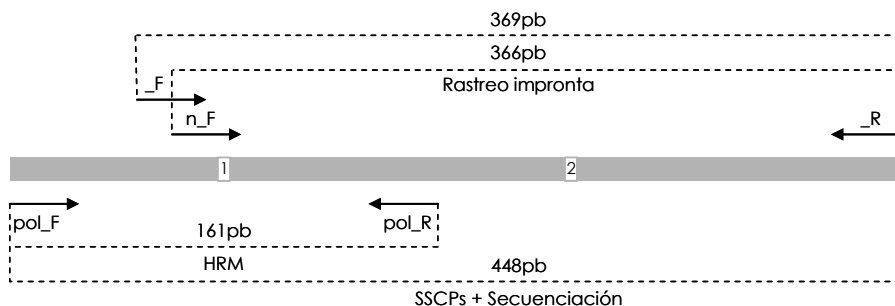


Figura 98: Esquema representativo de la región amplificada en *KCNQ1OT1*. En la figura se indican los cebadores utilizados, los tamaños de las regiones amplificadas y los polimorfismos contenidos en ella. El [1] corresponde al polimorfismo rs7940500 y el [2] al rs11023840. En la parte superior se encuentran los cebadores utilizados en el rastreo de regiones sometidas a impronta y en la parte inferior, las regiones amplificadas para el estudio del polimorfismo rs7940500. La secuencia, posición y condiciones de PCR de los cebadores contenidos en esta figura se encuentran en el anexo VIII con su nombre completo.

*"The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them."
(Sir William Bragg)*

DISCUSIÓN





1. Cambio de dosis

Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo, en la búsqueda de cambios de dosis génica en nuestra serie de pacientes se ha utilizado tanto un array comercial como uno de diseño propio, específico para el estudio de trastornos del neurodesarrollo. Parte de los resultados obtenidos con el array comercial han sido presentados en las tesis de la Dra. Monfort (2014) y la Dra. Roselló (2014) (anexo IX), pero en este trabajo dichos resultados se han utilizado para analizarlos con nuevos enfoques no realizados previamente, como la valoración de las alteraciones en genes de la maquinaria epigenética o el análisis de las zonas de incertidumbre que contienen los puntos de rotura, así como para realizar una interpretación global de la serie. Por otro lado, el objetivo de realizar un array a la carta se centraba en poder detectar alteraciones de pequeño tamaño en genes de interés sin perder una resolución suficiente para seguir detectando alteraciones mayores.

1.1 Valoración de los resultados del Array de diseño propio

Tal y como se ha descrito en resultados (apartado 1.1.2.) con las distintas versiones del array de diseño propio se estudiaron un total de 190 pacientes, detectándose 44 CNVs en 41 de ellos (tabla 31). Doce de estas alteraciones fueron clasificadas como patológicas, y por ende, responsables de la clínica que afectaba a estos pacientes (figura 34). De estas alteraciones, la mitad contienen genes epigenéticos patológicos (*ARID1B*, *RAD21* y *ZBTB18*) o candidatos (*WHSC1*, *PRDM13* y *MYT1L*) y las otras seis afectan a genes o *loci* asociados a distintos síndromes, siendo la clínica de estos pacientes compatible con ellos (apartado 1.3.1. de resultados).

Además ocho alteraciones fueron clasificadas como patológicas de penetrancia incompleta, de las cuales seis son recurrentes y están descritas como tales en la bibliografía: el síndrome de delección 16p13.11 (ORPHANET 261236), el síndrome de duplicación 16p13.11 (ORPHANET 261243) y el síndrome de delección 15q11.2 (OMIM 615656). Pueden existir diversos factores que expliquen por qué este tipo de CNVs detectadas en pacientes con trastorno del neurodesarrollo también pueden estar presentes en individuos sanos y en muchos casos ser heredadas de un progenitor asintomático:

- Que el gen o *locus* responsable, en el caso de las deleciones o las duplicaciones que conlleven una pérdida funcional, tenga un patrón de herencia recesiva, siendo necesaria la presencia de una segunda alteración en el otro alelo para que se manifiesten los síntomas.
- Que la CNV constituya un factor de predisposición que requiera la presencia de otra alteración o factores que condicionen la aparición del trastorno.
- Que los posibles genes causales contenidos en la región alterada tengan una expresión específica de alelo en el sistema nervioso central.
- Que la supuesta asociación entre la CNV y los trastornos del neurodesarrollo no sea real, sino que esté basada en resultados poco fiables o sometidos a sesgos (de publicación, de selección, de análisis, etc.)

En estos casos, hasta que no se aclaren los mecanismos que contribuyen a la expresión fenotípica de estas variantes, su utilidad diagnóstica es sumamente

limitada. Un ejemplo lo encontramos en el paciente CGM3476, portador de una deleción *de novo* de 2.9 Mb en el cromosoma 15 causante del denominado síndrome de deleción 15q11.2 [arr 15q11.1-q11.2(20,314,765-23,217,514)x1 dn] (anexo IX). Este síndrome se asocia a un fenotipo variable que puede abarcar desde la normalidad hasta DI con retraso motor y del lenguaje, algunos rasgos dismórficos y diversas alteraciones del comportamiento, incluyendo el TEA (Burnside *et al.*, 2011; Vanlerberghe *et al.*, 2015). Pese a tratarse de una CNV *de novo* asociada a un síndrome, dado que esta alteración no explicaba el cuadro clínico extremadamente grave de este paciente (hipotonía, DI y autismo graves, con ausencia de capacidad deambulatoria, del sostén cefálico y del lenguaje), se continuó con los estudios genéticos de este caso. Mediante un panel dirigido de secuenciación masiva diseñado por nuestro grupo de investigación se detectó una mutación patológica en el gen *SLC16A2* responsable del síndrome de Allan-Herndon-Dudley (OMIM 300523). Se trata de un síndrome neurológico de herencia ligada al cromosoma X causado por la deficiencia del transportador celular de hormona tiroidea SLC16A2 (MCT8). La clínica asociada a este síndrome se caracteriza por un retraso global del desarrollo con una alteración profunda del desarrollo cognitivo, discapacidad intelectual (IQ <30), falta de adquisición del lenguaje, graves alteraciones neuromotoras, hipotonía central con evolución a tetraplejia espástica y un perfil característico de alteraciones endocrinas. Dado que las manifestaciones clínicas que presenta nuestro paciente, incluido el perfil hormonal, son altamente coincidentes con las descritas en el síndrome de Allan-Herndon-Dudley, la contribución a la clínica de la deleción 15q11 es más que cuestionable. Por lo tanto, es de vital importancia ser prudentes sobre la implicación de las alteraciones de penetrancia incompleta de cara al asesoramiento genético de las familias y al seguimiento de los pacientes.

1.1.1. Comparación de los resultados obtenidos con otras series publicadas

Se ha realizado una revisión bibliográfica en busca de publicaciones de otros trabajos que hayan utilizado una aproximación similar, con arrays de diseños propios para el estudio de la discapacidad intelectual. En la tabla 52 se compara la información disponible de los diseños, protocolos y resultados de nuestra serie de pacientes con la información disponible de otros cinco estudios en diferentes series de pacientes con DI y/o TEA.

La mayoría de estos estudios, al igual que el presente trabajo, ha utilizado como plataforma la de la casa comercial *Agilent*, realizando la hibridación de muestra de paciente frente a control. Cabe destacar que no se observan mejores resultados ni con diseños más resolutivos (mayor número de sondas y mejor resolución promedio), ni con un mayor número de genes/regiones seleccionados. En cuanto a los resultados obtenidos por cada estudio, hay que tener en cuenta que se trata de series diferentes de pacientes, con distintos criterios de selección y estudios genéticos previos, además de las diferencias en el diseño, la estrategia y la interpretación de los resultados obtenidos.

En el trabajo de Vallespín *et al.* (2013) es donde *a priori* se consiguen mejores resultados. Sin embargo en este estudio no se especifica si las alteraciones clasificadas como causales son heredadas o *de novo*, por lo que una fracción de las alteraciones que se presentan como patológicas podrían ser de

Tabla 52: Comparativa de las características del diseño de nuestro array de diseño propio con los descritos en la bibliografía.

Características	Nuestra serie	Tucker <i>et al.</i> , 2014	Vallespín <i>et al.</i> , 2013	Kousoulidou <i>et al.</i> , 2013	Wisniowiecka-Kowalik <i>et al.</i> , 2013	Boone <i>et al.</i> , 2010
Casos estudiados	190	165	540	50	145	3743
Criterios selección	DI/TEA	DI	DI/TEA/AC	TEA	TEA	DI/TEA
Criterio de hibridación	P vs C Si procede ♂ vs ♀	Tríos P vs ♀ P vs ♂	P vs C	-	P vs C	P vs C
Plataforma	<i>Agilent</i>	<i>NimbleGen</i>	<i>Agilent</i>	<i>Agilent</i>	<i>Agilent</i>	<i>Agilent</i>
Nº sondas diseño	4X44K 8X60K	12X135K	8X60K	400K	180K	180K
Nº genes seleccionados	364-453 ^a	1397	386 regiones	9269 regiones	~1700	~1700
Resolución promedio	156-398 Kb	-	175 Kb ^b	13 Kb ^b	13 Kb	13 Kb
Nº sondas alteración	2	5	3	-	3	-
Valor LogRatio alteración	>0.399 <-0.399	>0.2 <-0.2	>0.3 <-0.3	-	-	>0.2 <-0.2
Método Validación	Marcadores qPCR, MLPA, FISH	qPCR	-	qPCR	FISH	FISH, PCR, MLPA
Alteraciones detectadas	44	176 <i>de novo</i>	697	20	-	-
Alteraciones confirmadas	40	36	-	20	16	41
Alteraciones patológicas	12	13	104	2	3	15
Pacientes diagnosticados	12	11	104	2	3	15
% pacientes diagnosticados	6.3	6.7	19.2	4.0	2.1	0.4

^aEn la versión 4 con diseño 8X60K se incluyeron 1162 genes de baja prioridad con una densidad de sondas menor (1-5 sondas por gen).

^bCobertura promedio de las sondas "genómicas", distribuidas por todo el genoma (*backbone*).

~: Aproximadamente; ♂: Padre; ♀: Madre; AC: anomalías congénitas; C: Controles; P: Paciente.

penetrancia incompleta. Además, en muchos de los casos no se había hecho ningún estudio citogenético o molecular previo y el análisis por CGH-array era la primera herramienta diagnóstica utilizada. Mientras que en nuestra serie de pacientes, como ya se ha mencionado en material y métodos (apartado 1.1), previamente, además del cariotipo, en la gran mayoría de los casos se habían realizado diversos estudios genéticos encaminados a descartar las alteraciones más recurrentes y probables según los fenotipos de cada caso, incluyéndose en nuestro estudio solo aquellos pacientes sin un diagnóstico genético. Por otro lado, Rodríguez-Revengea *et al.* (2013) también compararon la eficiencia diagnóstica de este mismo array de diseño propio con dos array comerciales de 44K y 244K en tres series distintas de pacientes. En este caso detectaron un mayor número de alteraciones patológicas con menor número de CNVs polimórficas con el array de diseño propio, aunque todas las alteraciones patológicas detectadas en las tres series, menos una duplicación intragénica detectada por el array de 244K, podrían haber sido identificadas por cualquier de las tres plataformas. Todo esto enfatiza la importancia de la selección de los pacientes incluidos en estas series y los estudios previos realizados en los mismos, que puede ser un factor determinante en la eficiencia diagnóstica de los estudios por CGH-array (Rodríguez-Revengea *et al.*, 2013; Roselló *et al.*, 2014).

Siguiendo con la comparación de los resultados de los distintos arrays de diseño propio, en el otro extremo, el estudio presentado por Boone *et al.* (2010) consigue identificar la causa patológica en un menor porcentaje de casos, a pesar de usar un array con mayor resolución. En este caso, la clínica de los sujetos incluidos en el estudio no estaba definida, aunque la mayoría de los pacientes descritos presentaban DI/TEA. Además, este estudio solo se centra y describe alteraciones intragénicas. Por lo que en este análisis, tanto la serie poco seleccionada como la interpretación sesgada de los resultados, centrada únicamente en las alteraciones intragénicas, podrían explicar su baja eficiencia. En este sentido, Wiśniowiecka-Kowalnik *et al.* (2013), utilizando el mismo diseño de array en una serie seleccionada de pacientes con TEA, de los cuales más de un tercio presentaban DI, consiguen diagnosticar un porcentaje mayor de casos, sin centrarse únicamente en alteraciones intragénicas. En este último estudio detectaron en tres pacientes tres deleciones *de novo* probablemente patológicas y cuatro CNVs patológicas de penetrancia incompleta en otros tres pacientes distintos. Finalmente, en el estudio de Kousoulidou *et al.* (2013) centrado también en TEA, pese a usar el array con mayor número de sondas y regiones seleccionadas, solo se detectaron dos alteraciones claramente patológicas en dos pacientes distintos de un total de 20 alteraciones en 14 casos diferentes propuestas como candidatas de susceptibilidad a autismo, de las cuales 17 eran heredadas de un progenitor sano.

Por último, Tucker *et al.* (2014) también realizaron un diseño en el que seleccionaron, entre otros, genes de la maquinaria epigenética. De las 36 alteraciones confirmadas, centrándose solo en los cambios de dosis que afectan a genes asociados previamente a DI encontraron 11 CNVs patológicas, la mayoría intragénicas, siendo tres de ellas cambios que afectaban a genes epigenéticos. Además, detectaron dos duplicaciones probablemente patológicas. No obstante, con la estrategia utilizada de hibridar muestra del paciente frente a cada uno de los progenitores en dos arrays distintos se centraron solo en las alteraciones *de novo* y prácticamente duplicaron el gasto por paciente estudiado, obteniendo un resultado muy similar a los de nuestro

grupo. Por otro lado, hay que tener en consideración que en este estudio queda todavía pendiente evaluar las alteraciones patológicas en los nuevos genes candidatos.

Todos estos estudios demuestran la dificultad diagnóstica de pacientes con TEA, donde en general el porcentaje de casos diagnosticados es menor que aquellos estudios más centrados en DI.

Hay que tener en cuenta que en nuestra población de estudio se habían eliminado los casos con resultado patológico obtenidos mediante otras técnicas de cribado como MLPA de regiones teloméricas o de síndromes de deleción recurrentes (22q11, Xq28, etc.). Además, como se comentará en el siguiente apartado, 35 de los pacientes de nuestra serie ya habían sido estudiados por el array comercial sin encontrar ninguna alteración patológica. Y por último, no se han tenido en cuenta las alteraciones patológicas de penetrancia incompleta para calcular el porcentaje de pacientes diagnosticados. No obstante, los resultados obtenidos son muy similares al otro array de diseño centrado en genes epigenéticos (Tucker *et al.*, 2014), pese a que nuestra serie incluía un porcentaje de casos con TEA, donde en general la eficiencia diagnóstica obtenida es menor que en casos con DI sindrómica.

1.1.2. CGH-array de diseño propio vs comercial

En el estudio por CGH-array de nuestra serie, formada por 395 pacientes, se utilizó un array comercial en 241 y un array de diseño propio en 190, estudiándose 36 pacientes por ambas diseños. Hay que tener en cuenta que las dos series no son comparables, ya que los pacientes estudiados por el CGH-array comercial, recogidos durante un periodo de tiempo mayor, en su mayoría presentaban una clínica más florida (Roselló, 2014; Roselló *et al.*, 2014), mientras que muchos de los pacientes estudiados por el array de diseño propio presentaban un fenotipo menos severo y más centrado en TEA. No obstante, en los 36 pacientes estudiados previamente con el array comercial y posteriormente por el array de diseño propio encontramos:

- 22 casos en los que no se encontró ninguna alteración con ninguno de las dos aproximaciones.

- Tres pacientes en los que el array de diseño propio permitió acotar la alteración detectada previamente por el array comercial: la única alteración patológica estudiada con ambos diseños que afectaba al gen *ARID1B* (apartado 1.5.2.2.2 de resultados) y dos CNV clasificadas como benignas.

- Siete pacientes en los que el array comercial mostró alguna alteración que no fue detectada con el array de diseño propio, con un tamaño promedio de 288 Kb (rango de 722 a 10.9 Kb). Estas CNVs incluyen seis cambios de dosis clasificados como benignos y solo una duplicación de 722 Kb clasificada como VOUS. Seis de estas alteraciones no fueron detectadas ya que en las distintas versiones de array de diseño propio estas regiones no contenían al menos dos sondas, que es el criterio utilizado en este trabajo para la detección de CNVs, y solamente una duplicación clasificada como benigna no fue confirmada con el array de diseño propio pese a tener siete sondas en esa región al no detectarse dos consecutivas alteradas (figura 99).

- Cinco casos con distintas alteraciones detectadas con el array de diseño propio que habían pasado desapercibidas en el array comercial, con un tamaño promedio de 412 Kb (rango de 1.7 Mb a 87pb). Estas alteraciones incluyen: la duplicación que afecta parcialmente al gen candidato *ANKRD12*

(apartado 1.2.3.5. de resultados), una delección de 1.7 Mb clasificada como benigna y tres alteraciones intragénicas, de las cuales dos duplicaciones clasificadas como VOUS contenidas en los genes *RICS* y *KIAA1586*, se han seleccionado como CNVs de especial interés (apartado 1.3.2. de resultados) y la otra alteración intragénica clasificada como benigna, fue detectada en un paciente que también era portador de otra variante benigna ya mencionada previamente, detectada con el array comercial pero que no se confirmó con el array de diseño propio por falta de sondas suficientes en esa región.

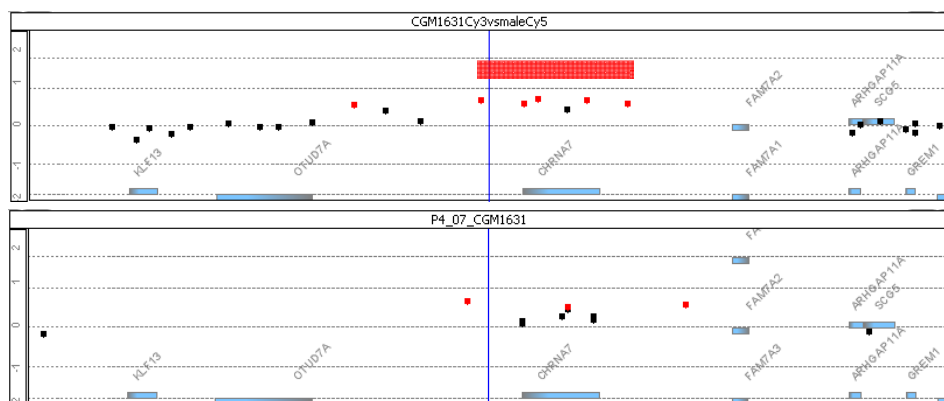


Figura 99: Resultado obtenido por ambos arrays en el paciente CGM1631. Representación obtenida del Workbench del análisis obtenido por el CGH-array comercial (arriba), en contraposición con el resultado obtenido con el CGH-array de diseño propio (abajo).

Resumiendo, aunque el número de pacientes estudiados por ambos arrays es pequeño, inferior al 10 % de la serie, la única alteración claramente patológica presente en este grupo de pacientes ha sido detectada por ambos arrays. En más del 60 % de los casos no se detectó ninguna alteración por ambas estrategias, y de las alteraciones discordantes, el array de diseño propio presenta una mejor eficiencia en la detección de alteraciones que pudieran tener repercusión clínica, especialmente alteraciones intragénicas de menor tamaño.

En este sentido Tucker *et al.*, (2014) también comparaban los resultados obtenidos en su array de diseño propio con los resultados de distintos arrays comerciales en alguno de los casos que se habían estudiado por ambos diseños. En 9 de los 11 casos con alteración patológica detectada por el array de diseño propio, se realizó también un array comercial, sin detectarse la alteración patológica en tres de ellos, pese a que una de ellas contenía 30 sondas en el array comercial utilizado. Por otro lado, una alteración de significado incierto de 3.5 Mb detectada con un array comercial pasó desapercibida en el array dirigido por falta de sondas en esa región.

En conclusión, el diseño realizado con una alta densidad de sondas en genes y regiones de interés y una selección de sondas genómicas que permiten una buena resolución a lo largo de todo el genoma es una buena estrategia para detectar tanto alteraciones intragénicas como CNV patológicas de mayor tamaño.

1.1.3. Alteraciones intragénicas

Actualmente existen arrays comerciales con una densidad de sondas mayor, que *a priori* permitirían detectar alteraciones intragénicas. Sin embargo, en la práctica, los filtros utilizados para la detección de alteraciones en este tipo de diseños suelen ser más estrictos, incluyendo un número de oligonucleótidos mayor. Además, los criterios para la selección de sondas se basan más en la ausencia de homologías que en criterios funcionales. Por lo que las alteraciones exónicas de pequeño tamaño pueden perfectamente pasar desapercibidas en este tipo de arrays.

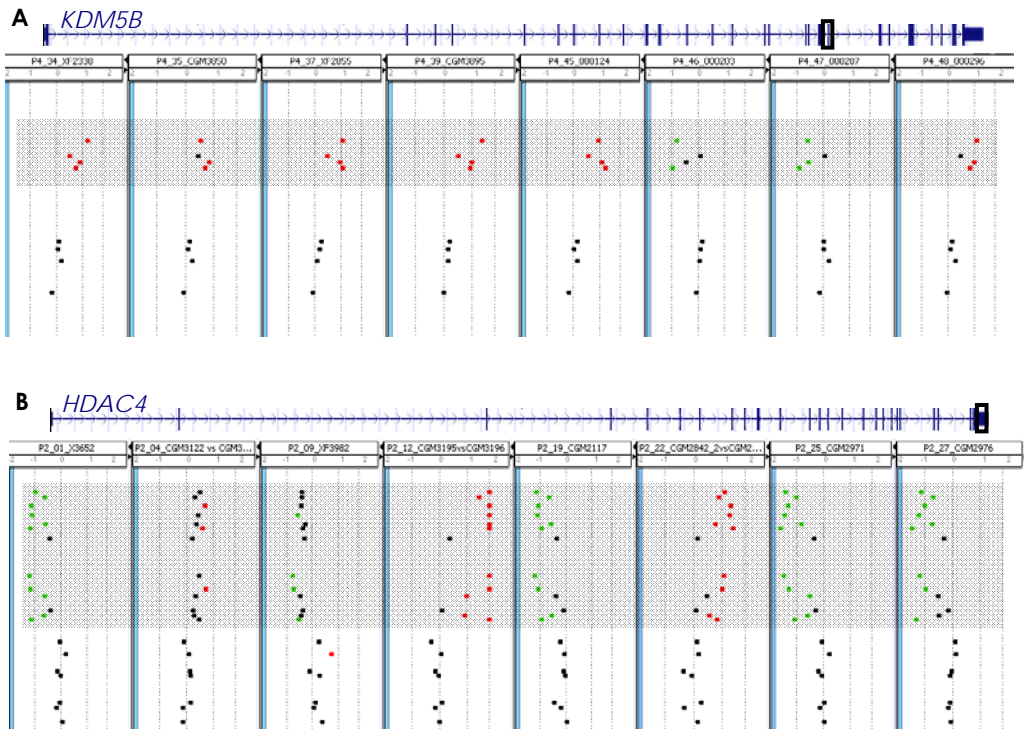


Figura 100: Ejemplos de alteraciones de pequeño tamaño detectadas en el array de diseño propio consideradas como artefactos. Representación obtenida del Workbench de 8 pacientes distintos con cuatro sondas en el gen *KDM5B* (A) y 13 sondas en el gen *HDAC4* (B) resaltadas en un recuadro gris. En la parte superior de cada imagen se indica con un recuadro negro la localización de dichas sondas exónicas respecto del gen.

En el array de diseño propio se intentó tener representadas todas las regiones exónicas de los genes seleccionados. Además, en el análisis inicial de los resultados se tuvieron en cuenta todas las posibles alteraciones a partir de dos sondas consecutivas con un valor de LogRatio fuera del rango considerado dentro de la normalidad. Esta aproximación tiene el inconveniente de que muchas de las CNVs de pequeño tamaño detectadas por el array no se confirmaron por otras técnicas alternativas, considerándose artefactos técnicos, siendo además muchas de estas variaciones recurrentes en un gran número de pacientes (figura 100). Estos artefactos, que pueden deberse a la baja calidad

de las sondas y/o de las muestras, dificultan un análisis rápido y resolutivo de estos arrays, por lo que la eficiencia diagnóstica de esta estrategia, de cara a la práctica clínica puede ser cuestionable.

Por otro lado, de las 44 alteraciones reales detectadas por el array de diseño propio, teniendo en cuenta la región mínima alterada, 16 fueron intragénicas, lo que supone más de 1/3 de los cambios de dosis detectados por este array, de las cuales un 44 % fueron clasificadas como cambios sin repercusión clínica. Por comparación, solo 18 de las 180 alteraciones detectadas en el array comercial son intragénicas (10 %), de las cuales más del 80 % son benignas. Esto indica que un diseño centrado en regiones exónicas de genes de interés es más adecuado para detectar pequeñas CNVs intragénicas que pudieran tener repercusión clínica, aunque el porcentaje de este tipo de alteraciones clasificadas como benignas sigue siendo muy alto. No obstante, desde el punto de vista de la investigación, algunas de las CNVs intragénicas pueden ayudar a aclarar la implicación de genes candidatos para la DI en los trastornos del neurodesarrollo. Hay que tener en cuenta que muchas alteraciones detectadas por CGH-array afectan a varios genes que pueden contribuir a la clínica de los pacientes (síndromes de genes contiguos). Además, la gran heterogeneidad de alteraciones presentes en este tipo de pacientes, en muchas ocasiones dificulta encontrar una serie de casos lo suficientemente grande, con CNVs similares y rasgos clínicos comparables que permitan determinar la posible patogenicidad de un gen en concreto. Tanto las mutaciones que afectan a único gen como las alteraciones intragénicas pueden ayudar a esclarecer su contribución en los trastornos del neurodesarrollo. En este sentido, podemos comentar algunos casos de nuestra serie:

- La delección *de novo* de al menos 15 exones del gen *MYT1L* (apartado 1.2.3.6. de resultados). Como ya se ha comentado en los resultados, este gen es un buen candidato para distintos trastornos del neurodesarrollo y el comportamiento. Sin embargo, la mayoría de casos descritos presentan CNVs de mayor tamaño que afectan a un número mayor de genes, lo que dificulta la interpretación de la repercusión de la alteración de *MYT1L* en la clínica que presentan estos pacientes. Esta delección intragénica, que se discutirá más ampliamente en el apartado 2.1 de la discusión, junto con otros hallazgos de nuestro estudio y la información disponible de otros trabajos publicados, ha contribuido a aclarar la implicación de las alteraciones de *MYT1L* en los trastornos del neurodesarrollo.

- La delección que afecta a los exones 2 y 3 del gen *CNTNAP2* (apartado 1.3.2.5. de resultados) provoca un cambio en la pauta de lectura que da lugar a un condón de parada prematuro. Como ya se ha comentado en resultados, este gen es un buen candidato funcional para la DI y además ha sido asociado a distintos trastornos del neurodesarrollo que incluyen al autismo y el retraso del lenguaje, presentes ambos rasgos en nuestro paciente. Además, alteraciones en homocigosis o doble heterocigosis compuesta de *CNTNAP2* causan un cuadro clínico más severo de DI tipo Pitt-Hopkins (Zweier *et al.*, 2009; Zweier, 2012). Una revisión reciente sobre este gen que recopila la información disponible sobre sus alteraciones y el efecto fenotípico que pueden producir, incluyendo el hecho de que algunos de estos cambios han sido heredados de progenitores aparentemente sanos, concluye que el papel de las alteraciones de *CNTNAP2* en heterocigosis en los trastornos del neurodesarrollo todavía no está aclarado (Poot *et al.*, 2015). En nuestro caso, al tratarse de una alteración heredada de

un progenitor con sospecha de padecer síndrome de Asperger y antecedentes en su familia de trastornos mentales, esta CNV fue clasificada como patológica de penetrancia incompleta, apoyando la heterogeneidad fenotípica asociada a las alteraciones de este gen.

- La duplicación en la región 3'UTR del gen *RICS* detectada en dos pacientes distintos (apartado 1.3.2.6. de resultados). Aunque *a priori* se trata de un buen gen candidato funcional, al observar la discordancia entre los rasgos clínicos que presentan ambos pacientes, y que al menos uno de ellos había heredado dicha alteración de un progenitor sano, no se puede atribuir un carácter patogénico a esta alteración. Por otro lado, hay que tener en cuenta que se trata de duplicaciones, que con los estudios realizados, no se ha podido determinar si el fragmento duplicado se encuentra en tándem o en otro *locus*, y además afecta a la región 3'UTR del gen, por lo que no se puede predecir el efecto de esta alteración sobre la expresión del gen *RICS*. No obstante, aunque esta CNV ha sido clasificada como una variante de significado incierto, no se puede descartar la implicación en los trastornos del neurodesarrollo de otro tipo de alteraciones en este gen. En este sentido, recientemente *RICS* ha sido propuesto como gen candidato para autismo en pacientes con deleciones en la región distal 11q (Akshoomoff *et al.*, 2015).

Por último, no hay que olvidar que una alteración intragénica en un gen patológico no implica necesariamente la patogenicidad de dicha alteración. Un ejemplo lo encontramos en la duplicación que afecta a los tres últimos exones del gen *HDAC4* que fue heredada de un progenitor sano (paciente XF3902). La haploinsuficiencia de este gen causa el síndrome de Braquidactilia con DI. Tal y como se ha comentado en el apartado 1.2.2.9. de resultados, dado que este paciente presentaba un TEA sin braquidactilia ni otros rasgos asociados al síndrome, el carácter heredado de la alteración y la existencia en población sana de al menos una duplicación parcial del gen que contenía esta región, esta CNV fue clasificada como VOUS pese a afectar a un gen conocido patológico.

Resumiendo, las alteraciones intragénicas patológicas no son muy frecuentes, lo que supone una baja eficiencia diagnóstica desde el punto de vista asistencial. No obstante, la utilización de un diseño centrado en genes de interés aumenta la posibilidad de identificar alteraciones patológicas que pasarían desapercibidas en un diseño comercial y aclarar su posible repercusión en el neurodesarrollo,

1.2 Alteraciones en genes implicados en la maquinaria epigenética

La hipótesis fundamental de esta tesis es que las alteraciones de la regulación génica mediada por los procesos epigenéticos tienen una especial relevancia entre las causas de los trastornos del neurodesarrollo. Para demostrar esta hipótesis a lo largo de este trabajo se han realizado distintas aproximaciones. Dentro del estudio de los cambios de dosis se analizó el enriquecimiento respecto al genoma de este tipo de genes, además de valorar de forma específica tanto los genes patológicos conocidos como los posibles genes candidatos para los trastornos del neurodesarrollo.

1.2.1. Análisis de enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento en genes epigenéticos permitió determinar un enriquecimiento significativo en las alteraciones patológicas respecto al genoma. Además, se pudo determinar una tendencia lineal significativa que mostraba un empobrecimiento de dichos genes entre las CNVs benignas y un aparente efecto neutro en alteraciones patológicas de penetrancia incompleta y en cambios de significado incierto (apartado 1.2.1. de resultados). Este efecto en el grupo de alteraciones cuya implicación clínica es desconocida puede ser debido a que este grupo contenga tanto alteraciones patológicas enriquecidas en genes epigenéticos como CNVs sin implicación clínica empobrecidas en estos genes, aunque con los conocimientos actuales, no se puedan separar ambos grupos. Además, el enriquecimiento en genes epigenéticos en el conjunto de cambios de dosis patológicos no está sesgado ni por el propio diseño del CGH-array, donde se han seleccionado este tipo de genes, ni por el tamaño de las alteraciones, mayor en las clasificadas como causales, ya que, utilizando únicamente los resultados del array comercial o eliminando del análisis aquellas CNVs de mayor tamaño que las observadas en los otros grupos de alteraciones, se obtenía un enriquecimiento incluso mayor de genes epigenéticos en las CNVs patológicas, con un *odds ratio* de 1.8 para alteraciones patológicas menores de 5 Mb, es decir, casi el doble de lo esperado.

Estos resultados son claramente sugestivos de la importancia de los genes implicados en la regulación epigenética sobre los trastornos del neurodesarrollo, así como que el nivel de expresión de muchos de estos genes se encuentra altamente regulado, de forma que son especialmente sensibles a las pérdidas o ganancias de dosis.

1.2.2. Genes epigenéticos patológicos

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mitad de las alteraciones patológicas detectadas con el array de diseño propio afectan a genes epigenéticos patológicos o candidatos. Teniendo en cuenta la serie completa, del total de 58 casos con alteraciones patológicas, 17 de ellos presentan CNVs que contienen algún gen epigenético conocido causante de DI (apartado 1.2.2 de resultados), lo que supone un 29 % de los casos con CNVs patológicas. Además, hay que tener en cuenta que en muchas ocasiones, estas regiones alteradas contienen varios genes epigenéticos agrupados, habiendo más de uno patológico o de interés, como se resume en la tabla 53.

En la mayoría de los casos presentados en el apartado 1.2.2. de resultados la clínica que presentan estos pacientes es totalmente compatible con el síndrome asociado a la alteración que presentan. Pero nuestros resultados también han contribuido a definir algunos de estos síndromes ya descritos y ampliar el conocimiento sobre la implicación de distintas alteraciones que afectan a estos genes epigenéticos.

Por ejemplo, el síndrome de Duplicación de MECP2 originariamente se consideraba como una patología con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X que afectaba a varones, siendo las mujeres portadoras asintomáticas, gracias a una inactivación preferencial del cromosoma X portador de la duplicación. En nuestro estudio hemos diagnosticado a dos varones afectados portadores de dos duplicaciones distintas que contienen al gen

Tabla 53: Listado de alteraciones patológicas cuyo gen causal es epigenético y además contienen otros genes de la maquinaria epigenética de interés.

Paciente	Alteración	Genes epigenéticos	
		Patológicos	De interés
X841	arr Xq28(152,684,501-153,780,138x3) mat	<i>MECP2</i> , <i>HCFC1</i>	
CGM1330	arr Xq28(153,197,498-153,409,354x3) mat		
CGM2040	arr Xq28(153,277,239-153,576,940x4) dn		
CGM2402	arr 2q22.3-q23.3(148,602,407-152,354,323x1) dn	<i>MBD5</i>	<i>EPC2</i>
CGM2161	arr 2q22.2-23.2(143,986,161-150,012,071x3) dn		
CGM3782	arr Xq12-q21.1(65,815,490-78,426,724x3) mat	<i>ATRX</i> , <i>HDAC8</i> , <i>TAF1</i> , <i>MED12</i>	<i>ZMYM3</i>
XF1702	arr Xq13.2-q21.31(72,433,198-91,125,471x3) mat	<i>ATRX</i> , <i>BRWD3</i>	<i>NAP1L2</i>
CGM3263	arr 16q22.1(67,316,868-68,712,116x1) dn	<i>CTCF</i>	<i>PRMT7</i>
CGM2143	arr 2q37(238,619,349-243,199,373x1) dn		
CGM3785	arr 2q37(234,343,084-243,199,373)x1, 15q26.3(101,793,090-102,531,392)x3	<i>HDAC4</i>	<i>ING5</i>
XF2761	arr Xp11.22(53,221,610-54,223,027x3) mat	<i>HUWE1</i> , <i>KDM5C</i> , <i>PHF8</i> , <i>SMC1A</i>	

MECP2 heredadas de sus madres asintomáticas, pero también hemos diagnosticado a una mujer con las manifestaciones clínicas típicas de esta patología, portadora de un reordenamiento complejo *de novo* en la región Xq28 que incluye la triplicación de *MECP2* (apartado 1.2.2.1. de resultados).

Anterior a nuestro trabajo solo había algunas publicaciones en las que se describían mujeres afectadas de este síndrome debido a translocaciones cromosómicas, en las que el segmento de cromosoma X translocado sobre un autosoma había perdido la capacidad de inactivarse, dando lugar a una disomía funcional de los genes duplicados (Bialer *et al.*, 2003; Lachlan *et al.*, 2004; Sanlaville *et al.*, 2005; Auber *et al.*, 2010; Makrythanasis *et al.*, 2010). En nuestro estudio, publicado en 2011 (Mayo *et al.*, 2011), demostramos que la triplicación observada en la muestra de nuestra paciente se localizaba en el cromosoma X de origen paterno, mayoritariamente activo en sangre periférica. Además, dado que la alteración presente en este caso solo incluía dos de los 8 genes contenidos en el la región mínima duplicada descrita por Bauters *et al.* (2008) (*MECP2* e *IRAK1*), planteamos que la duplicación de algunos de los restantes 6 genes (*AVPR2*, *ARHGAP4*, *NAA10*, *RENBP*, *HCFC1* o *TMEM187*) podría ser la responsable de la selección negativa de las células con la duplicación Xq28 en el cromosoma X activo en las mujeres, lo que conllevaría una inactivación preferencial. Revisando la función y expresión de estos genes, propusimos como candidatos a dos de ellos: *NAA10*, que forma parte de un complejo acetiltransferasa N-terminal cuyas mutaciones causan el síndrome de Ogden (OMIM 300855), entre otros, y puede participar en el desarrollo neuronal (Sugiura *et al.*, 2003); y *HCFC1*, que como ya se ha mencionado, es un regulador transcripcional asociado a cromatina causante de diferentes trastornos del

neurodesarrollo tanto por pérdida como por ganancia de función (Jolly *et al.*, 2015).

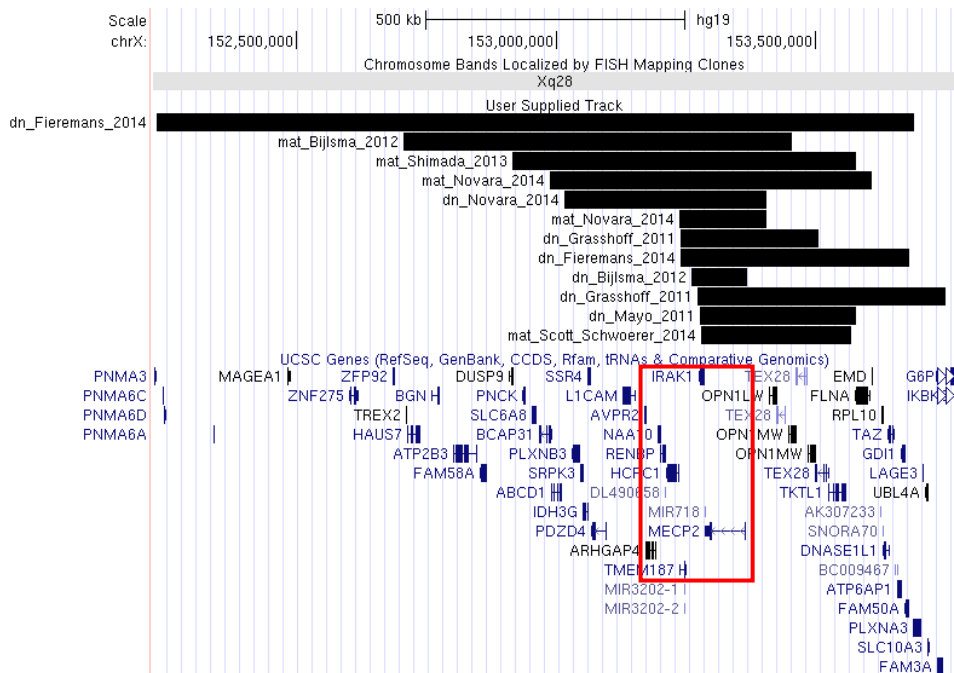


Figura 101: Representación de las distintas duplicaciones de *MECP2* intracromosómicas descritas en mujeres con manifestaciones clínicas. Imagen obtenida del UCSC. Recuadro rojo: región mínima descrita por Bauters *et al.* (2008) dn: de novo; mat: heredada de su madre.

Posteriormente a nuestro trabajo, se han publicado otros casos en los que se presentan mujeres afectadas portadoras de duplicaciones intracromosómicas (Grasshoff *et al.*, 2011; Bijlsma *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2013; Fieremans *et al.*, 2014; Novara *et al.*, 2014; Scott Schworer *et al.*, 2014). Dentro de este grupo de pacientes, la mayoría de los casos (7 de 12) se ajustan al modelo propuesto, sin afectación de los genes antedichos. No obstante, la gravedad de la clínica es variable al igual que el patrón de inactivación del X, que va desde aleatorio hasta una inactivación preferencial del cromosoma no portador de la duplicación. Además, las alteraciones detectadas son tanto *de novo*, en siete de los casos, como heredadas, en los cinco restantes, con un tamaño variable que incluye en algunos casos los genes que habíamos propuesto como candidatos responsables de la selección negativa (figura 101). En base a esto, también es posible, tal y como hipotetizan Fieremans y colaboradores (2014), que en algunos casos donde se observa una activación preferencial del cromosoma portador de la duplicación, se deba a una mutación más perjudicial en el otro cromosoma X, que fuerza la activación del cromosoma portador de la duplicación *MECP2*. No obstante, la hipótesis de Fieremans *et al.* (2014) no explicaría aquellos casos con una inactivación al azar. Por lo tanto,

parece que la duplicación de *MECP2* podría manifestarse clínicamente en mujeres heterocigotas por diferentes mecanismos.

Por último, cabe destacar que hasta ahora solo se han descrito cinco varones con triplicación del gen *MECP2* que asocian un fenotipo más severo (del Gaudio *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2012; Wax *et al.*, 2013), siendo hasta ahora nuestra paciente el único caso de mujer afecta portadora de triplicación de este gen.

En relación al gen *MBD5* cuya haploinsuficiencia causa el síndrome de Deleción 2q23.1, hemos encontrado dos pacientes con afectación de este gen, uno que presenta una deleción de 3.8 Mb y otro con una duplicación de 6.0 Mb (apartado 1.2.2.2. de resultados). Este último caso, junto con otra serie formada por 22 pacientes más, ha contribuido a describir los rasgos clínicos asociados al síndrome de Duplicación 2q23.1 (Mullegama *et al.*, 2014). En este trabajo se indica que el único gen contenido en la duplicación de estos 23 pacientes es *MBD5*, quien probablemente es el responsable de las manifestaciones clínicas presentes en el síndrome de Duplicación 2q23.1. Además, la comparación del fenotipo observado en los pacientes con ambos síndromes recíprocos muestra que, aunque los rasgos clínicos asociados al síndrome de duplicación son ligeramente menos graves, comparten la mayoría de las características que los definen, incluyendo la DI, el retraso motor y del lenguaje, las alteraciones del comportamiento, los rasgos autistas y algunos de los rasgos dismórficos asociados. Cabe destacar que *MECP2* y *MBD5* son genes de la misma familia que codifican para proteínas de unión a DNA metilado en las que tanto la pérdida como la ganancia de dosis da lugar a una afectación neurológica muy parecida.

Un efecto similar lo encontramos también con el gen *ATRX* donde, hasta ahora, tal y como se indica en la introducción (apartado 3.1.4.) mutaciones o deleciones en este gen causan DI sindrómica. Este trabajo incluye dos casos con duplicaciones en la región Xq13.2–q21.1 que contienen a *ATRX* (apartado 1.2.2.3. de resultados). Estos pacientes presentan una clínica muy similar entre ellos que además recuerda a los rasgos asociados a la pérdida de función de este gen y han permitido proponer que la duplicación de *ATRX* contribuye a los principales rasgos clínicos observados en pacientes con duplicación de esta región (Martínez *et al.*, 2014). No obstante, no se descarta la aportación de otros genes contenidos en dichas duplicaciones, entre los que se encuentran varios causantes de DI, de los que al menos otros tres participan igualmente en la maquinaria epigenética (tabla 53).

MECP2, *MBD5* y *ATRX* son tres genes que forman parte de distintos complejos multiprotéicos que participan en el control de la expresión génica a través de la regulación epigenética. En una revisión de Birchler y Veitia (2012) recaban distintos estudios que describen la importancia de la proporción estequiométrica de las distintas macromoléculas que forman parte de los complejos proteicos, de tal forma que tanto la reducción como el aumento de uno de sus componentes puede producir un efecto fenotípico dominante negativo similar. Por tanto, tanto la deleción como la duplicación pueden ocasionar una disminución de la cantidad de producto funcional que se puede formar (figura 102).

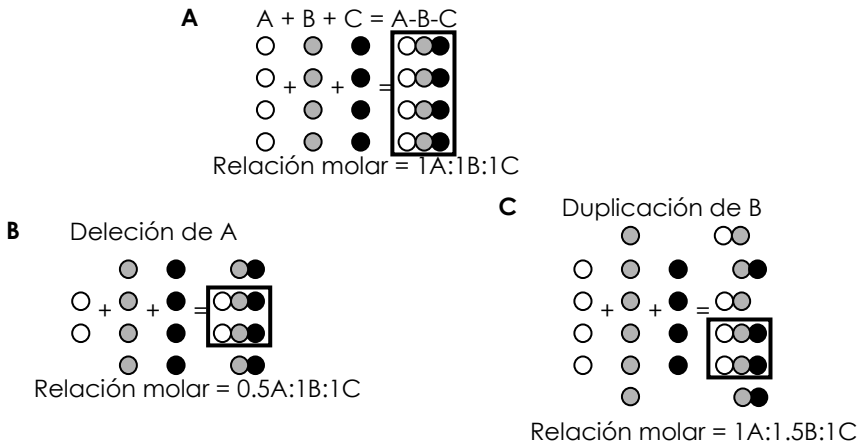


Figura 102: Ejemplos del efecto del desequilibrio estequiométrico en la formación de complejos proteicos funcionales. Imagen basada en Birchler y Veitia (2012). (A) Condición normal con un balance estequiométrico en particular entre las cantidades molares de los distintos componentes del complejo. (B) Efecto de la deleción del monómero A que conduce a una disminución del rendimiento de trímero, porque no hay suficiente A para completar la reacción. (C) Efecto de la duplicación del monómero B que también conduce a una disminución en el número de complejo funcional formado al secuestrar a los otros componentes sin formar el trímero completo. Un recuadro resalta las unidades de complejo funcional formada en cada caso y en la parte inferior de cada figura se indica la relación molar de cada condición.

Sin embargo, en relación a *HDAC4*, cuya haploinsuficiencia es responsable de la mayoría de manifestaciones clínicas del síndrome de braquidactilia con DI (apartado 3.1.3. de la introducción), según los resultados de nuestro estudio la patogenicidad de la duplicación es bastante dudosa. En nuestra serie de pacientes hemos encontrado cuatro casos con CNVs que afectan a este gen, dos deleciones y dos duplicaciones (apartado 1.2.2.9. de resultados, figura 46). En cuanto a las duplicaciones, uno de los paciente es portador de un cromosoma 2 derivado que tiene como consecuencia la deleción de 2.3 Mb en el extremo 2p25, que contiene, entre otros al gen candidato para la DI *MYT1L* (apartado 2.1 de discusión) y una duplicación de 12.2 Mb en el extremo 2q37 que incluye a *HDAC4*, por lo que es difícil valorar la repercusión de la duplicación de este gen en este caso en concreto. La segunda duplicación de *HDAC4* es una alteración intragénica de los últimos 3 exones del gen que había sido heredada de un progenitor sano, por lo que su significado clínico es, aunque incierto, probablemente benigno. Por otro lado, uno de los pacientes con deleción de *HDAC4* y manifestaciones clínicas compatibles con el síndrome de Braquidactilia con DI, es portador de un cromosoma 2 derivado [46,XY,der(2)t(2;15)(q37;q26.3)mat] que genera una pérdida de 8.9 Mb en el cromosoma 2 que afecta a 103 genes, entre los que se incluye *HDAC4*, y una duplicación de 738 Kb del cromosoma 15 que contiene a 21 genes. Sin embargo su hermana, con el cromosoma derivado complementario [46,XX,der(15)t(2;15)(q37;q26.3)mat], y por tanto, portadora de una duplicación de la región 2q37, tiene un desarrollo neurológico normal (apartado 1.2.2.9. de resultados). Estos resultados nos hacen pensar que la afectación en el

neurodesarrollo de la duplicación de la región 2q37, que contiene a *HDAC4*, debe de ser escasa o nula. En la base de datos DECIPHER tan solo se han descrito dos casos con retraso en el neurodesarrollo que presentan sendas duplicaciones *de novo* en esta región, ambas mayores de 9 Mb, sin afectación conocida de otras regiones cromosómicas (DECIPHER 285957; 259590). El escaso número de duplicaciones patológicas descritas y el gran número de genes incluidos estaría de acuerdo con la escasa relevancia clínica de las duplicaciones de *HDAC4*.

Por otro lado, en relación al gen *ZBTB18*, asociado al síndrome de delección 1q44, en nuestro estudio hemos detectado una delección en esta región que contiene este gen en una paciente cuyos rasgos clínicos son compatibles con este síndrome, excepto por la ausencia de agenesia o hipoplasia del cuerpo calloso (apartado 1.2.2.6. de resultados). Este rasgo tanto nuestro grupo como otros autores lo habían asociado previamente al gen *ZBTB18* (Orellana *et al.*, 2009; Ballif *et al.*, 2012; Perlman *et al.*, 2013), pero recientemente se ha publicado un caso con mutación puntual *de novo* en *ZBTB18*, que al igual que nuestra paciente, presenta todos los rasgos característicos del síndrome de delección 1q44 excepto la afectación del cuerpo calloso (de Munnik *et al.*, 2014). Estos dos casos avalan la importancia clínica de este gen, aunque no necesariamente implica la agenesia de cuerpo calloso.

Finalmente, la haploinsuficiencia de *ARID1B* se ha asociado en los últimos años al síndrome de Coffin-Siris (Tsurusaki *et al.*, 2012; Santen *et al.*, 2012 y 2014). En nuestra serie hemos detectado una delección que afectaba a este gen y da lugar a la formación de un gen quimera con *ZDHC14* (apartado 1.5.2.2.2. de resultados). La mayoría de los rasgos clínicos que presenta la paciente portadora de esta delección son compatibles con el síndrome de Coffin-Siris, lo que apoya la implicación de las alteraciones de *ARID1B* en este síndrome. No obstante, la posible repercusión clínica del gen quimera generado se discutirá más adelante en el apartado 1.4.2. de la discusión

1.2.3. Genes epigenéticos candidatos de DI

En este trabajo también se han identificado 14 CNVs que afectan a 8 genes de la maquinaria epigenética considerados como candidatos y muy probablemente implicados en el neurodesarrollo (apartado 1.2.3. de resultados). Doce de estas alteraciones eran *de novo* y se han clasificado como patológicas. Por el contrario, las otras dos CNVs fueron heredadas: la alteración que afecta al gen *DGCR8* se considera como patológica de penetrancia incompleta, mientras que la alteración que afecta al gen *ANKRD12* se catalogó como VOUS. Las funciones de los distintos genes candidatos engloban los principales mecanismos epigenéticos: metilación del DNA, proteínas modificadoras de histonas (metiltransferasa de histonas), factores que participan en la remodelación de la cromatina y subunidades de complejos que participan en la síntesis de ncRNAs (miRNAs). Además, son buenos candidatos para la DI por su participación en el desarrollo embrionario neurológico y/o con expresión en cerebro. A continuación se detallarán las conclusiones a las que se ha llegado con nuestros resultados en relación a estos genes.

Alguno de estos genes se encuentran dentro de regiones cuya delección es causante de síndromes descritos y en algunos casos ya han sido propuestos como genes candidatos para estos trastornos del neurodesarrollo, como por ejemplo el gen *WHSC1*, candidato para el síndrome de Wolf-Hirschhorn, un

síndrome de delección de genes contiguos en la región 4p16.3. En nuestro estudio hemos detectado tres alteraciones que afectan a esta región (apartado 1.2.3.2. de resultados):

- Una delección terminal *de novo* que contiene a este gen en un paciente con rasgos clínicos compatibles con el síndrome.
- Otra delección que afecta a *WHSC1* generada por un cromosoma derivado de una translocación paterna que también origina una duplicación en la región 11p15 y que se comentará más adelante (apartado 4 de discusión).
- Y un reordenamiento complejo en la región 4p16.3 que tiene como consecuencia una delección terminal y una duplicación más proximal que contiene al gen *WHSC1*.

Los tres casos presentan DI, retraso motor y del lenguaje y las regiones alteradas también afectan a otros genes. En la bibliografía también se han descrito otros casos con deleciones menores. Okamoto *et al.* (2013) presentaron un paciente con una delección de 109 Kb que afectaba a los genes *FGFR3*, *LETM1* y *WHSC1* asociada a una clínica de Wolf-Hirschhorn aunque con ausencia de algunas características del síndrome como hipotonía, retraso motor o convulsiones. Otra publicación reciente presenta tres pacientes portadores de deleciones de pequeño tamaño (377-67 Kb) que afectan a *LETM1* y *WHSC1* con retraso del crecimiento y del desarrollo pero sin convulsiones (Andersen *et al.*, 2014). Aunque el gen *LETM1* se había propuesto como responsable de las convulsiones habituales en pacientes con este síndrome, los cuatro casos publicados no apoyan esta hipótesis. Sin embargo, tanto nuestros pacientes como los publicados con deleciones menores, presentan siempre retraso del neurodesarrollo, evidenciado incluso en aquellos pacientes menores de 3 años, por lo que el gen *WHSC1* sigue siendo un buen candidato para la DI.

El gen *SETD1B*, que codifica para una metiltransferasa de histonas, también ha sido propuesto recientemente como gen candidato para el nuevo síndrome de delección 12q24.31 que cursa con DI (Palumbo *et al.*, 2015). En este trabajo se basan en 3 casos con distintas deleciones *de novo* cuya región mínima común contiene cinco genes (*SETD1B*, *HPD*, *PSMD9*, *WDR66* y *BCL7A*). Nuestro grupo ha detectado otras dos deleciones *de novo* distintas que contienen esta región mínima (apartado 1.2.3.3. de resultados). No obstante, la baja correlación de las características clínicas presentes en los tres casos recopilados por Palumbo y colaboradores con los dos pacientes de nuestra serie (tabla 41) nos induce a pensar que se trata de un buen gen candidato para DI no sindrómica, dada la ausencia de otras características clínicas comunes.

SALL3 ha sido propuesto como candidato para las malformaciones orales asociadas al síndrome de delección 18q, dada su participación en el desarrollo embrionario (Dostal *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestra serie hemos detectado una delección de 11.3 Mb que afecta a este gen en un paciente que presenta DI, retraso motor y ausencia de lenguaje y como malformación oral solo se observa una elevación del paladar (apartado 1.2.3.7. de resultados). Pese al gran tamaño y el número de genes afectados, en base a que otros genes de la familia causan síndromes asociados a DI o participan en el desarrollo neuronal (*SALL1* y *SALL4*), que *SALL3* es capaz de inhibir la función de *DNMT3A* (Shikauchi *et al.*, 2009) y que se expresa en cerebro, consideramos que también se puede considerar como un gen candidato para DI. En cualquier caso, sería

recomendable disponer de pacientes con una alteración más específica de este gen para confirmar su implicación en el neurodesarrollo.

También hemos detectado tres deleciones distintas en la región del síndrome 6q16 para el que se han propuesto varios genes candidatos que también están contenidos en las alteraciones detectadas por nuestro grupo (*EPHA7*, *MCHR2*, *SIM1* y *GRIK2*) (apartado 1.2.3.4. de resultados). Nosotros además proponemos a *PRDM13* como nuevo gen candidato en base a recientes publicaciones que describen su implicación en la neurogénesis y la regulación de la función y diversidad neuronal (Chang *et al.*, 2013; Hanotel *et al.*, 2014). Por otro lado, cabe destacar, que de los tres casos que hemos presentado, el paciente que tiene una alteración mayor es el único que presenta entre sus rasgos clínicos una cardiopatía y tiene delecionado al gen *POPDC3*, que se expresa en músculo cardiaco y puede estar implicado en el desarrollo del corazón.

Además, en nuestra serie hemos detectado dos deleciones distintas que afectan a otro gen candidato de DI, *MYT1L*. Estas dos CNVs ya mencionadas previamente en apartados anteriores, incluyen una deleción intragénica de *MYT1L* y otra consecuencia de un cromosoma 2 derivado que también da lugar a una duplicación del extremo 2q37 que contiene a *HDAC4* (apartado 1.2.3.6. de resultados). Estas dos alteraciones junto con los resultados obtenidos en otros estudios realizados se comentarán más ampliamente en el apartado 2.1 de la discusión centrado en este gen.

Por otro lado, en el presente estudio se han detectado duplicaciones que afectan a dos genes cuya implicación en la DI es más conocida por su haploinsuficiencia: *DNMT3A* y *DGCR8*. Las mutaciones de pérdida de función en *DNMT3A*, que codifica para una DNA metiltransferasa *de novo* que participa en el establecimiento de los patrones de metilación del DNA durante el desarrollo, son responsables del síndrome Tatton-Brown-Rahman que cursa con DI, talla alta y macrocefalia (OMIM 615879). En este trabajo hemos detectado una duplicación de este gen en una paciente que sin embargo tiene talla baja y microcefalia (apartado 1.2.3.1. de resultados). Este efecto contrario sobre algunos rasgos fenotípicos, como el crecimiento, en cambios de dosis complementarios, ya se ha observado en otros síndromes conocidos. Por ejemplo, el síndrome de Sotos y su duplicación complementaria, o los síndromes de deleción y duplicación 19p13.13 descritos por Dolan *et al.* (2010) presentan un efecto opuesto en el desarrollo, caracterizado por un sobrecrecimiento y macrocefalia en los casos de deleción, y talla baja y microcefalia asociados a la duplicación (Dolan *et al.*, 2010; Žilina *et al.*, 2013; Novara *et al.*, 2014). También se ha descrito este efecto en otras CNVs recíprocas recurrentes, como en la región 1q21.1, donde la microcefalia o la macrocefalia está presente en los pacientes portadores de la deleción o duplicación respectivamente; o en la región 16p11.2, donde se observa el efecto contrario respecto al perímetro craneal (Brunetti-Pierri *et al.*, 2008; Shinawi *et al.*, 2010; Bernier *et al.*, 2015). Además, este fenómeno es similar al observado en algunos síndromes de impronta, como la contraposición del retraso del crecimiento del síndrome de Silver-Russell y la macrosomía del síndrome Beckwith-Wiedemann causados por alteraciones complementarias de la impronta en la región 11p15 (apartados 3.2.4. y 3.2.5. de la introducción). Por lo que, aunque no se han descrito en la bibliografía más casos con duplicación *de novo* de *DNMT3A*, se considera que tanto la pérdida como la ganancia de dosis de este gen pueden causar DI.

En la región asociada al síndrome de DiGeorge que afecta al gen *DGCR8*, hemos detectado una duplicación heredada (apartado 1.2.3.8. de resultados). Al contrario que la mayoría de casos que presentan la delección 22q11, que suelen ser *de novo*, muchos casos de duplicación de esta región son heredados de progenitores sanos, por lo que aparentemente se trata de una alteración de penetrancia incompleta y expresividad variable (McDonald-McGinn *et al.*, 2013). Por otro lado, en base a la información disponible sobre *DGCR8*, se considera que su delección podría explicar las alteraciones cardiovasculares y neurológicas que presentan estos pacientes (Berdasco y Esteller, 2013). Por ejemplo, estudios en ratón demuestran que la haploinsuficiencia de *DGCR8* causa alteraciones del comportamiento y disfunción neuronal dado su papel en la síntesis de miRNA (Stark *et al.*, 2008; Fénelon *et al.*, 2011; Schofield *et al.*, 2011). Nuestra paciente, sin embargo, no presenta ningún defecto cardiaco conocido aunque sí tiene DI, retraso motor, ausencia del lenguaje y rasgos autistas entre otros rasgos clínicos. Aunque no se puede descartar la implicación de otros genes duplicados en la región, en base a nuestros resultados y la información disponible del gen *DGCR8*, lo hemos considerado como gen candidato para trastornos del neurodesarrollo.

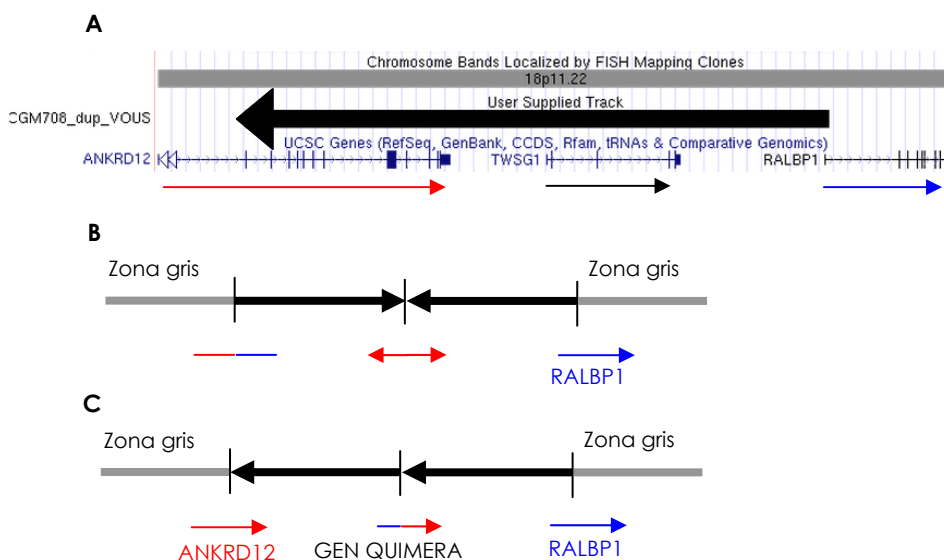


Figura 103: Representación de dos posibles reordenamientos que darían lugar a la duplicación del gen *ANKRD12*. (A) Imagen del entorno genómico sin la CNV, modificada del UCSC, indicándose la posición de la región mínima duplicada en la parte central y los genes afectados y su orientación en la inferior. (B) Duplicación invertida que generaría la haploinsuficiencia de *ANKRD12*. (C) Duplicación en tándem en la misma orientación que generaría un gen quimera *RALBP1- ANKRD12*.

Finalmente, también proponemos como gen candidato para la DI al gen *ANKRD12* basándonos en una duplicación, pese a ser un cambio heredado (apartado 1.2.3.5. de resultados). Por un lado, esta CNV afecta de forma parcial a *ANKRD12*, por lo que el efecto es difícil de evaluar. Según la orientación del segmento duplicado podría dar lugar a la pérdida de función del gen, si la

región duplicada está invertida, o a la formación de un gen quimera con *RALBP1*, si esta región se encuentra en la misma orientación (figura 103). Por otro lado, la información disponible sobre la función de los otros dos genes afectados (*TWSG1* y *RALBP1*) no parece indicar que puedan participar en el neurodesarrollo. Por el contrario, *ANKRD12* pertenece a una familia de genes cuyas mutaciones causan DI (*ANKRD11* y *ANK3*), se expresa en cerebro y puede actuar como represor transcripcional. Además, se ha propuesto a *BCORL1*, un parálogo de la *ANKRD12* localizado en el cromosoma X, como candidato para DI, al detectarse una mutación probablemente patológica en dos hermanos con DI grave (Schuurs-Hoeijmakers *et al.*, 2013). Respecto al carácter heredado de esta alteración, una posible explicación podría ser que presentara un patrón de herencia recesivo o sometido a impronta. En este sentido, Lerer y colaboradores (2005) describieron una deleción que afectaba al gen *ANKRD15* en una familia con varios casos con parálisis cerebral que sigue un patrón de herencia dependiente del origen paterno de la alteración. No obstante sería necesario completar los estudios para poder validar alguna de estas hipótesis y encontrar más casos con alteración de este gen para poder confirmar y definir su implicación en los trastornos del neurodesarrollo.

En resumen, en este trabajo se han seleccionado 8 genes epigenéticos alterados en 14 CNVs distintas que por su función se consideran buenos candidatos para la DI. No obstante, para poder validar la patogenicidad de la mayoría de estos genes, serían necesarios estudios funcionales o bien reunir un mayor número de pacientes que ayuden a definir los rasgos clínicos asociados, ya que hay muy poca casuística en la bibliografía, sobre todo para la duplicación de *DNMT3*, *ANKRD12* y *DGCR8*, y la deleción de *SETD1B*, *PRDM13* y *SALL3*.

1.2.4. Importancia de los genes epigenéticos en el neurodesarrollo

Como ya se ha mencionado anteriormente, de los 58 casos con CNVs patológicas, 17 presentan CNVs que contienen algún gen epigenético causante de DI. Además, 12 pacientes son portadores de CNVs *de novo* (10 deleciones y dos duplicaciones) que afectan a 6 genes epigenéticos (*DNMT3A*, *WHSC1*, *SETD1B*, *PRDM13*, *MYT1L* y *SALL3*) que proponemos como nuevos genes candidatos por deleción o duplicación. En base a esto, en nuestra serie de pacientes, se estima que entre el 29 % y el 50 % de las CNVs patológicas presentan afectación de genes de la maquinaria epigenética con repercusión clínica sobre el neurodesarrollo y otras anomalías congénitas. Aunque no se puede excluir, que otros genes diferentes puedan asimismo contribuir al cuadro clínico de los pacientes, se confirma la importancia de los genes responsables de los procesos epigenéticos en el neurodesarrollo, así como que éstos sean especialmente vulnerables a los cambios de dosis.

Solamente 13 pacientes de nuestra serie (el 22 %) son portadores de deleciones patológicas que no afectan a ningún gen que hayamos clasificado como epigenético.

El resto corresponden a distintas CNVs que, aunque contienen genes relacionados con la maquinaria epigenética, su efecto sobre el fenotipo que presentan los pacientes portadores no está claro. Por un lado, nueve casos presentan una CNV que afecta a algún gen epigenético candidato pero que también contiene genes patogénicos conocidos, con un patrón de herencia autosómico dominante o ligado al X, y que justifican la clínica de estos casos,

por lo que la implicación de los genes epigenéticos en el fenotipo en estos pacientes se considera *a priori* menos probable. Por otro lado, siete casos son portadores de CNVs que, aunque contienen algún gen epigenético, su implicación en el fenotipo de estos pacientes es difícil de establecer, dada la escasa información disponible sobre dichos genes y que el número total de genes afectados es elevado (superior a 100). Para esclarecer el papel de estos genes sería necesario recopilar grandes series y definir regiones mínimas más delimitadas que permitieran relacionar los fenotipos observados con los genes contenidos en ellas.

Finalmente, la aplicación de nuevas tecnologías como la secuenciación masiva a este tipo de pacientes también puede ayudar a aclarar la función de los genes epigenéticos en los trastornos del neurodesarrollo. En este sentido, estudios realizados recientemente por nuestro grupo de investigación con un panel dirigido de genes de diseño propio en el que se ha realizado una selección de pacientes que incluye algunos de esta serie, han detectado en un alto porcentaje de casos una mutación patológica en algún gen epigenético como *HDAC8*, *ARID1B*, *RPS6KA3* o *KMT2D* (manuscrito en preparación). No obstante, tanto el diseño del panel como la selección de los pacientes, con rasgos clínicos en muchos de los casos recurrentes en síndromes epigenéticos conocidos, pueden justificar estos resultados. Sin embargo, revisando distintos estudios de exoma publicados centrados en los trastornos del neurodesarrollo también encontramos que los genes epigenéticos suponen entre un 6 y un 20 % de los genes probablemente causales, lo que sigue apoyando la importancia de estos genes en el neurodesarrollo (Neale *et al.*, 2012; O'Roak *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2014; Willemsen y Kleefstra, 2014).

1.3 Alteraciones en elementos reguladores

Dentro de la búsqueda de causas de trastornos del neurodesarrollo, en este trabajo, además de estudiar alteraciones que puedan afectar a genes de interés, también hemos valorado la implicación de otros elementos del genoma que puedan intervenir en la regulación de la expresión génica como elementos ultraconservados y miRNAs. Con el diseño de array realizado, utilizando sondas específicamente seleccionadas para valorar estas regiones, no se ha conseguido identificar CNVs que afecten exclusivamente a este tipo de elementos o que hubieran pasado desapercibidas sin esta aproximación de diseño. Hay que tener en cuenta que su pequeño tamaño dificulta el poder obtener sondas específicas para estas regiones que proporcionen unos resultados óptimos. No obstante, los resultados obtenidos sugieren que los cambios de dosis patológicos que afectan solo a un UCE o un miRNA, de existir, serían muy poco frecuentes. Alternativamente, cabe la posibilidad de que no se haya estudiado el tipo de paciente portador de este tipo de alteraciones, ya que las consecuencias clínicas podrían ser relativamente benignas, como una discapacidad intelectual leve, no asociada a otros rasgos clínicos. Por otra parte, no se puede excluir que las alteraciones de este tipo de elementos supongan más un factor de predisposición que un cambio patológico *per se*.

En este sentido, la importancia de los miRNAs en CNVs relacionadas con DI ya ha sido estudiada por Qiao *et al.* (2013), quienes encontraron un mayor contenido de miRNAs en CNVs *de novo* en comparación con CNVs polimórficas o heredadas en pacientes con DI. El estudio de enriquecimiento en las CNVs detectadas en nuestra serie de pacientes demuestra que los UCEs se

encuentran enriquecidos en el conjunto de deleciones patológicas, mientras que el enriquecimiento en miRNAs en nuestra serie es más evidente en las duplicaciones patológicas y CNVs cuya repercusión clínica no está del todo esclarecida (pips y VOUS). Esta aparente asociación diferencial en función del tipo de CNVs patológicas podría explicarse por los distintos mecanismos en que estos elementos participan en la regulación génica. Como ya se ha comentado en la introducción (apartado 2.1.4.), los miRNAs se unen al extremo 3'UTR de sus transcritos diana y actúan a través de distintos mecanismos que incluyen la represión de su traducción, o la degradación del mRNA, por lo que su sobreexpresión en las duplicaciones podría causar una disminución en la expresión génica. Por otro lado, la función de los UCEs no se ha esclarecido por completo, pero existen evidencias que apuntan a que algunos de estos elementos podrían participar en la regulación de la expresión génica como potenciadores transcripcionales (Baira *et al.*, 2008; Licastro *et al.*, 2010). En base a esto, su delección tendría como consecuencia la reducción de la expresión de sus genes diana. Por consiguiente, tanto la sobreexpresión de algunos miRNAs como la pérdida de UCEs podrían tener efectos equivalentes para la expresión génica. Además, se ha descrito la participación de elementos ultraconservados en otras funciones de interés como el procesamiento de mRNA y la regulación epigenética (Baira *et al.*, 2008), así como la transcripción de algunos UCEs que pueden actuar como ncRNAs (Feng *et al.*, 2006; Licastro *et al.*, 2010). En este sentido, una reciente publicación demuestra como un lncRNA transcrito a partir de un UCE regula el procesamiento de un miRNA, lo que relaciona a los UCEs y los miRNAs mostrando que su papel en la regulación de la expresión génica es complejo y puede estar relacionado (Liz *et al.*, 2014).

1.4 Zona Gris

1.4.1. Análisis de enriquecimiento

Para intentar aclarar posibles mecanismos que dan lugar a las CNVs detectadas se realizó un análisis de enriquecimiento de distintos elementos que hubieran podido contribuir a la aparición de los reordenamientos cromosómicos, como zonas de cromatina abierta, duplicaciones segmentarias o elementos altamente repetitivos (tabla 48). Para ello se revisó la presencia de este tipo de elementos en las zonas grises o de incertidumbre flanqueantes a las CNVs que contienen los puntos de rotura que dieron lugar a estos reordenamientos (apartado 1.5 de resultados).

Como cabría esperar se ha observado un enriquecimiento significativo en duplicaciones segmentarias, en una proporción mayor a cuatro veces de lo esperado (RE = 4.46). La participación de estos elementos en la generación de CNVs mediante recombinación homóloga no alélica (NAHR: *Non-Allelic Homologous Recombination*) se conoce desde hace tiempo, con distintos ejemplos de CNVs recurrentes causantes de diferentes síndromes que cursan con DI mediadas por este mecanismo, tales como el síndrome de Williams (delección 7q11.23), el síndrome Prader-Willi y de Angelman (delección 15q11.2) o el síndrome de DiGeorge (delección 22q11) (Lupski, 1998). No obstante, para que tenga lugar este tipo de mecanismo es necesaria la localización de duplicaciones segmentarias de secuencias con una alta homología en ambos puntos de rotura (Gu *et al.*, 2008). Sin embargo, la inmensa mayoría de CNVs analizadas no se encuentran flanqueadas por una misma duplicación segmentaria. Además, existen otros mecanismos complejos que explican los

reordenamientos cromosómicos no recurrentes como la unión de extremos no homóloga (NHEJ: *Non-Homologous End Joining*) o el bloqueo de la horquilla de replicación y cambio de hebra molde (FoSTeS: *Fork Stalling and Template Switching*). Aunque en estos casos no se requiere una región con homología de secuencia en ambos puntos de rotura para que se produzca el reordenamiento, se ha observado que el entorno genómico puede favorecer este tipo de mecanismos (Gu *et al.*, 2008). Existen distintas publicaciones que apuntan hacia la importancia de las duplicaciones segmentarias en estos dos mecanismos. Por ejemplo, Inoue *et al.*, (2002) identificaron en dos familias sendas deleciones distintas del gen *PLP1* causante del síndrome Pelizeaus-Merbacher (OMIM 312080) cuyos puntos de rotura distales estaban localizados en duplicaciones segmentarias. Shaw y Lupski (2005) analizaron los puntos de rotura de cuatro deleciones distintas no recurrentes en la región 17p11.2 causantes del síndrome de Smith-Magenis observando una alta proporción de duplicaciones segmentarias (3/8) y elementos Alu (5/8). Por otro lado, Bauters *et al.* (2008) describieron un alto contenido de duplicaciones segmentarias en uno de los dos puntos de rotura flanqueantes de 16 duplicaciones distintas de *MECP2* (8/32). Además, en este último estudio también observaron un enriquecimiento en elementos Alus y un alto contenido en C/G en estos puntos de rotura. En nuestra serie, aunque menos llamativo, también se ha observado un aumento respecto al genoma de este tipo de secuencias, con una razón de enriquecimiento para los elementos Alu del 1.36 y para las islas CpG del 1.72 (tabla 48), siendo ambos incrementos estadísticamente significativos ($p < 0.0001$). Por lo tanto, nuestros resultados avalan la importancia de las duplicaciones segmentarias y las regiones altamente repetitivas tipo Alu en la generación de reordenamientos cromosómicos, pese a que sería necesario completar los estudios para llegar a aclarar el o los mecanismos moleculares que los generan.

También se analizó el enriquecimiento de otro tipo de elementos, como genes u otras regiones que pudieran participar en la regulación de la expresión génica, como UCEs o regiones diana de miRNAs, observándose respecto al genoma un enriquecimiento altamente significativo en regiones que se transcriben, especialmente de lincRNAs (tabla 48). Las secuencias génicas pueden ser vulnerables a sufrir roturas y reordenamientos al descondensarse la cromatina y verse expuestos durante el proceso de su transcripción. Los lincRNAs, como su propio nombre indica, son RNAs largos no codificantes que se localizan en regiones intergénicas. Se han identificado más de 10000 lincRNA en el genoma humano (Hangauer *et al.*, 2013). Un ejemplo de lincRNA es H19, una secuencia que no se traduce y que está sometida a impronta, expresándose de manera normal únicamente el alelo materno. La alteración de la expresión de H19 causa tanto el síndrome de Silver-Russell como el síndrome de Beckwith-Wiedemann, en función del origen parental del alelo afectado (apartado 3.2 de la introducción). Estos RNAs pueden participar en un gran número de procesos, como el neurodesarrollo o la gametogénesis, aunque su función en estos procesos no está del todo esclarecida (Guttman *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2014). Además, la mayoría de los lincRNA son específicos de tejidos, con una alta representación en testículos en hombres, expresándose también en el ovocito y estadios tempranos del desarrollo embrionario en pez cebra (Cabilli *et al.*, 2011; Ulitsky *et al.*, 2011). El enriquecimiento en los puntos de rotura de CNVs podría, por lo tanto, estar relacionado con la transcripción de estos RNAs durante la gametogénesis o estadios tempranos del desarrollo embrionario.

No obstante, hay que tener en cuenta, que por el diseño de los arrays, la mayoría de sondas se localizan en regiones exónicas, por lo que se podría argumentar que este aumento de regiones codificantes en las zonas de incertidumbre respecto al genoma es debido a un efecto del diseño experimental. En cualquier caso, un enriquecimiento en genes en los puntos de rotura, como consecuencia indirecta, podría favorecer la formación de genes quimera, como resultado del ensamblaje de ambos extremos, si cada uno de ellos se localiza dentro de un gen distinto en la orientación adecuada. En el apartado siguiente se analizará, en base a nuestros resultados, la formación de genes quimera y su posible repercusión en los trastornos del neurodesarrollo.

1.4.2. *Genes quimera*

En este estudio se ha estimado que en un 60 % de las deleciones con zona gris inferior a 315 Kb se podría formar un gen quimera, al afectar cada extremo a genes distintos en la misma orientación. Por falta de recursos, no se ha podido realizar un análisis práctico sistemático que permitiera validar esta estimación. No obstante, se ha podido realizar el estudio del punto de ruptura en tres pacientes con DI, confirmándose la formación de genes quimera en todos los casos. En relación a los mecanismos que han generado estas CNVs, pese a la baja casuística estudiada, hemos encontrado evidencias que señalan la importancia de la recombinación homóloga no alélica en estos procesos. En un caso los puntos de ruptura se encuentran dentro de elementos Alu, mientras que en otro se localizan en una duplicación segmentaria, lo que nos permite hipotetizar que estos genes de fusión se han formado por NAHR debido a la alta homología de las secuencias flanqueantes.

En cuanto a los detalles de estos tres genes quimera, el primer transcrito de fusión confirmado está formado por el primer exón de *LIMS1* y los últimos 4 exones de *RANBP2*. Como ya se ha comentado en el apartado 1.5.2.2.1. de resultados, ambos genes tienen diferentes funciones de importancia en el desarrollo del SNC. Además, no se han descrito CNVs que afecten solo a estos dos genes aunque sí se han registrado en distintas bases de datos deleciones mucho más grandes, que incluyen, total o parcialmente, a *LIMS1* y *RANBP2* entre otros genes (DGV esv2720498; DECIPHER 252497; ISCA nssv579951), sin ser ninguna de estas alteraciones compatible con la generación de un gen quimera. Aunque la haploinsuficiencia de estos genes puede ser patológica no se puede excluir que el gen de fusión también pueda contribuir al fenotipo del paciente. El transcrito quimera resultante contiene el dominio conservado de *cyclophilin_ABH_like*, implicado en los procesos de plegamiento de proteínas. Por tanto, la proteína quimérica podría interferir la función de RANBP2, al competir por sus dianas, actuando como un efector negativo dominante, mediante el bloqueo de las proteínas diana de RANBP2 o mediante la generación de un mal plegamiento de las mismas. Además, la expresión de este nuevo producto proteico estará controlada por la secuencia promotora (y factores de transcripción que se unen a ella) del gen *LIMS1*, que presenta un patrón de expresión diferente al de *RANBP2* (figura 104).

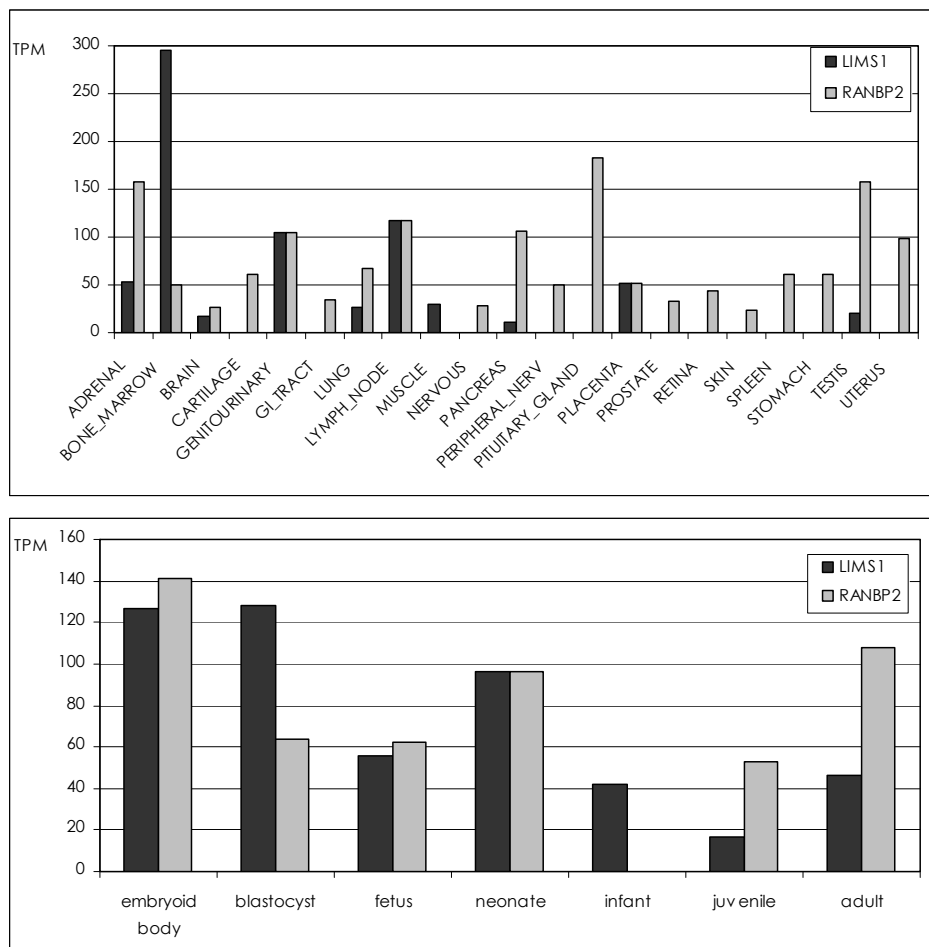


Figura 104: Patrones de expresión de *LIMS1* y *RANBP2*. Arriba se representa la expresión según distintos tejidos (GeneHub-Gepis); y abajo según el estado de desarrollo (Unigene).TPM: transcritos por millón.

El segundo transcrito de fusión generado por una delección da lugar a un gen quimera formado por los exones 1 a 5 del gen *ARID1B* y todos los exones de *ZDHHC14*, excepto el primero. Como ya se ha comentado en el apartado 1.5.2.2.2. de resultados, no se dispone de mucha información sobre *ZDHHC14* y recientemente *ARID1B* ha sido identificado como gen causal del síndrome Coffin-Siris (Tsurusaki *et al.*, 2012; Santen *et al.*, 2012 y 2014). Pese a que las características clínicas de la paciente son compatibles con este síndrome (trastorno alimenticio neonatal, DI, retraso motor y del lenguaje, talla baja, clinodactilia y braquidactilia en manos, uñas distróficas de los pies y las del quinto dedo de la mano hipoplásicas además de otros rasgos dismórficos), también presenta otros rasgos como micrognatia, hipotelorismo y pigmentación anormal de la piel y no presenta otras características asociadas con el síndrome como agenesia de cuerpo calloso o hipotonía. Esto es consistente con la amplia variabilidad clínica asociada a alteraciones en *ARID1B*, que llevó a Santen *et al.*

(2014) a proponer que otros factores genéticos podrían modificar el fenotipo asociado a la haploinsuficiencia en *ARID1B*. En nuestro caso, este factor podría ser la generación de un transcrito de fusión. Además, Backx *et al.* (2011) describió otro paciente con discapacidad intelectual y agenesia del cuerpo calloso portador de una translocación equilibrada $t(6;14)(q25.3;q13.2)$ que genera dos transcritos de fusión recíprocos en pauta de *ARID1B* y *MRPP3*, lo que supone otro ejemplo de la variación clínica en *ARID1B* que podría estar condicionada por la formación de genes quimera.

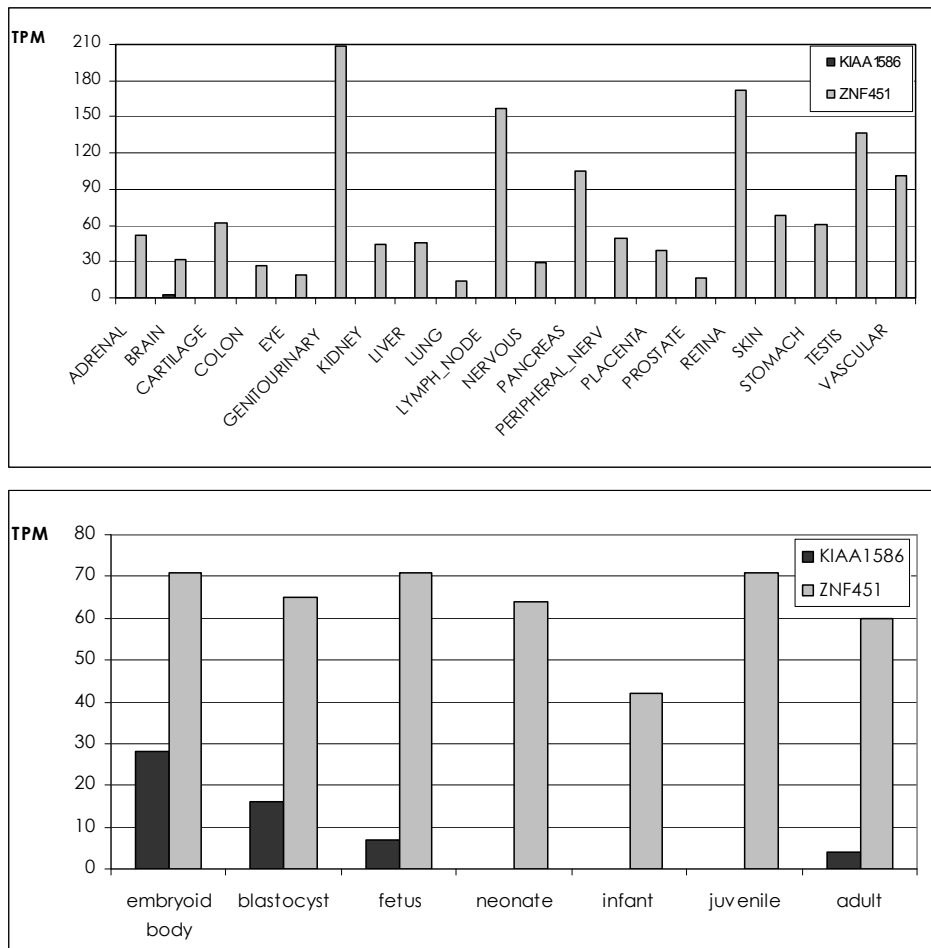


Figura 105: Patrones de expresión de *KIAA1586* y *ZNF451*. Arriba se representa la expresión según distintos tejidos (GeneHub-Gepis); y abajo según el estado de desarrollo (Unigene).TPM: transcritos por millón.

Finalmente, en este estudio solo se ha seleccionado y confirmado un único caso donde el gen quimérico es debido a una duplicación heredada (apartado 1.5.2.2.3. de resultados). La quimera generada por la duplicación contiene la región promotora del *ZNF451* y la mayoría de la región codificante de *KIAA1586*

mientras que la región 5'UTR y los dos primeros exones codificantes están incluidos en una duplicación segmentaria y pueden ser de cualquiera de los dos genes. Por lo tanto la expresión del gen quimera, constituido principalmente por *KIAA1586*, sería regulada por la región del promotor de *ZNF451*, y ya que ambos genes tienen diferentes patrones de expresión, la expresión de este producto proteico estaría desregulada (figura 105). *KIAA1586* ha sido propuesto como gen candidato para TEA por distintos grupos, como ya se ha indicado en el apartado 1.5.2.2.3. de resultados. Sin embargo, la pérdida de una copia de *KIAA1586* mediada por esta duplicación segmentaria necesariamente irá acompañada por una desregulación significativa de la expresión de *ZNF451*, que pasa a ser regulada por el promotor de *KIAA1586*. Dado que los patrones de expresión de ambos genes son muy diferentes, proponemos que no solo la haploinsuficiencia de *KIAA1586*, sino la desregulación de la expresión de *ZNF451* podría ser responsable de la presunta asociación con el autismo.

Por otro lado, estudios posteriores de nuestro grupo, utilizando un panel de diseño propio de secuenciación masiva, permitieron detectar una mutación *de novo* en el exón 5 del gen *ZBTB20* (c.1832G>C; p.Cys611Ser) en esta paciente. Recientemente se han descrito algunas mutaciones de cambio de aminoácido en este gen que afectan al mismo dominio proteico alterado en este caso y que causan el síndrome de Primrose (OMIM 259050) (Cordeddu *et al.*, 2014), el cual es completamente compatible con la clínica de este caso (principalmente DI, TEA y otros trastornos del comportamiento). Estos recientes hallazgos, junto con el carácter heredado de la duplicación que genera el gen quimera, permiten descartar su implicación en la clínica de esta paciente. Esto hace pensar que los cambios de dosis en esta región mediados por la duplicación segmentaria pueden tener distintas consecuencias. Una duplicación daría lugar a la sobreexpresión del gen *KIAA1586*, regulada por el promotor de *ZNF451*, en apariencia sin repercusión clínica. Mientras que una delección tendría como consecuencia la expresión de *ZNF451* bajo la regulación de la región promotora de *KIAA1586*, lo que conlleva la disminución de su expresión en múltiples tejidos, incluido el cerebro (figura 105). Por lo tanto, habría que reevaluar el gen candidato a TEA en esta región y valorar la posibilidad de que en lugar de la haploinsuficiencia de *KIAA1586*, fuera la desregulación en la expresión de *ZNF451* causada por la delección el verdadero factor de predisposición a autismo.

Los genes quimera derivados de CNVs han sido descritos en ocasiones asociados a otras patologías diferentes del cáncer (Cheung *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013). Hasta ahora, solo cuatro casos han sido documentados en la literatura con discapacidad intelectual asociada a transcritos de fusión *de novo*. Tres de ellos fueron causados por translocaciones cromosómicas generando dos transcritos de fusión recíprocos (Nothwang *et al.*, 2001; Ramocki *et al.*, 2003; Backx *et al.*, 2011) y solo uno debido a una delección intersticial (Hackmann *et al.*, 2013). En la bibliografía únicamente se ha encontrado una publicación con un estudio similar al presentado en este trabajo. Holt *et al.* (2012) realizaron un análisis sistemático para evaluar la generación de transcritos de fusión derivados de CNVs raros asociados con TEA en pacientes y controles, centrándose en cambios con una frecuencia poblacional menor a 1 % y un tamaño mayor a 30 Kb. En base a esto estimaron que 134 de 2382 (5.6 %) CNVs raros presentes en 889 pacientes con TEA podría conducir a un transcrito de fusión, encontrando una frecuencia similar en un grupo control. De todas estas alteraciones

seleccionaron cinco duplicaciones, de las que solo pudieron confirmar la formación de un único transcrito de fusión, presente tanto en pacientes como en sujetos no afectados, llegando a la conclusión de que no había evidencias de que los genes de fusión generados por CNVs condujeran a susceptibilidad para el autismo. No obstante, hay que tener en cuenta que la evaluación de la generación de genes quiméricos asociados a patologías como los TEA y la DI, con una baja tasa de recurrencia y una gran diversidad de CNVs, no es fácil, especialmente, como ya se ha comentado en resultados (apartado 1.5.2.) para el caso de las duplicaciones, que pueden producirse en tándem o en otro *locus* y con diferente orientación. Por lo que las conclusiones presentadas por Holt *et al.* pueden ser prematuras, máxime al no centrarse en CNVs *de novo*. Para ratificar la implicación de la formación de los transcritos de fusión en el fenotipo de este tipo de pacientes, sería necesario, confirmar la formación de la proteína quimera con un *Western blot*, y posteriormente poder hacer estudios de expresión en animales modelo, lo que se escapa a los medios y recursos disponibles por nuestro grupo de investigación. Los resultados obtenidos en este trabajo avalan no obstante la importancia de tener en cuenta la posible generación de genes quimera a la hora de valorar la repercusión clínica de CNVs. Además, el empleo de arrays más resolutivos y nuevas tecnologías como la secuenciación masiva permitirán acotar mejor las zonas grises y hacer una estimación más realista de la proporción de genes quimera que se pueden producir en este tipo de reordenamientos, facilitando la identificación de posibles transcritos de fusión generados por CNV en pacientes con trastorno del neurodesarrollo.

Hoy en día, el análisis por CGH-array es ampliamente utilizado en el estudio de la DI pero generalmente solo se buscan la pérdida o ganancia de dosis génica, y en muchos casos las regiones que contienen los puntos de rotura no están bien definidas. En teoría, la ocurrencia o no de un gen quimera podría explicar las diferentes consecuencias clínicas de deleciones o duplicaciones similares, ya que los puntos de ruptura podrían ser diferentes y por ende su repercusión. Por lo tanto, la posibilidad de generar un nuevo gen quimera, que puede ser responsable o contribuir al fenotipo observado, también debe tomarse en consideración en el análisis de los resultados de los CGH-arrays.

2. Genes candidatos

Además del rastreo del genoma mediante el análisis por CGH-array en busca de CNVs implicados en los trastornos del neurodesarrollo, también se ha realizado una búsqueda y estudio dirigido en algunos genes considerados de interés. En este trabajo se han presentado únicamente los resultados obtenidos en relación al gen *MYT1L*.

2.1 MYT1L

Como se ha indicado en resultados (apartado 1.2.3.6.) se ha considerado *MYT1L* como un buen gen candidato tanto por su función, al tratarse de un factor transcripcional que se expresa preferentemente en sistema nervioso embrionario y que podría reclutar HDACs en la regulación de la transcripción neuronal (Kim *et al.*, 1997, Romm *et al.*, 2005), así como por las distintas publicaciones que lo relacionan con diferentes trastornos del neurodesarrollo o el comportamiento.

En este sentido, en 2008, Vrijenhoek y colaboradores propusieron por primera vez la asociación de CNVs que afectaban a *MYT1L* con la esquizofrenia y Addington y Rapoport (2009) presentaron dos pacientes con duplicaciones parciales de *MYT1L*, relacionando estas CNVs con la esquizofrenia de inicio en la infancia. Además, un meta-análisis de cinco estudios diferentes mostró una fuerte asociación entre duplicaciones de tamaño variable que afectan a este gen y la esquizofrenia (odds ratio = 15.7; $p = 0.001$) (Lee *et al.* 2012) y otra reciente publicación refirió la co-segregación de una duplicación de *MYT1L* con esquizofrenia en una familia (Van den Bossche *et al.*, 2013). Por otro lado, los estudios de asociación de SNPs en *MYT1L* mostraron una asociación significativa de algunos de estos SNPs con el trastorno depresivo grave o la esquizofrenia (Wang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012).

Otras publicaciones han relacionado alteraciones en *MYT1L* con autismo, DI, trastornos del comportamiento y obesidad. Por un lado, Meyer *et al.* (2012), presentaron a *MYT1L* como gen candidato para el autismo basándose en el estudio de dos hermanastros con TEA portadores de una duplicación parcial de *MYT1L* heredada de su madre sana, que era portadora en mosaico de la duplicación. Por otro lado, Stevens y colaboradores, en 2011, lo propusieron como gen candidato para la DI apoyándose en diferentes deleciones en 2p25.3 que afectaban a este gen en ocho pacientes distintos (tres hermanos, tres casos no relacionados y dos pacientes DECIPHER), destacando además la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad en estos casos (7/8). No obstante, de estos ocho pacientes, solo una portadora de una deleción *de novo* de 0.47 Mb (chr2:1773253-2246341) presentaba una alteración que afectara exclusivamente a *MYT1L* y entre los datos clínicos disponibles de este caso, no se incluía el sobrepeso, sino únicamente la DI y el autismo (DECIPHER 255713). Además, Rio *et al.*, (2013), describieron un curioso caso de dos gemelas monocigóticas con una alteración discordante en 2p25.3 que contenía a *MYT1L*, donde una gemela era portadora de la deleción y presentaba DI, obesidad e hiperactividad, mientras que la otra gemela era portadora en mosaico tanto de la deleción como de la duplicación, mostrando un trastorno del espectro autista. Recientemente, Doco-Fenzy *et al.* (2014) presentaron cinco casos con distintas deleciones que afectan a *MYT1L* en pacientes con DI, obesidad de desarrollo temprano y distintos trastornos del comportamiento, comentando la posible implicación de *MYT1L* en este fenotipo entre otros genes de la región.

Por otra parte, de Ligf y colaboradores (2012), mediante secuenciación de exoma completo, identificaron una mutación puntual *de novo* en *MYT1L* (c.2636+1G>A) en una paciente con alto peso al nacer (4750 g) que presentó problemas de alimentación e hipotonía neonatal. Esta paciente a los doce años mostraba parámetros normales de crecimiento, DI grave, TEA y algunos rasgos dismórficos leves. Bonaglia *et al.* (2014) presentó otro caso con una deleción terminal *de novo* en 2p25.3 de 1.9 Mb que contenía a *MYT1L* en un paciente con DI moderada, TDAH y obesidad. Más recientemente, de Rocker y colaboradores (2015), basándose en una serie de 22 pacientes con diferentes alteraciones en *MYT1L* (deleciones, mutaciones y duplicaciones parciales), han descrito las principales características clínicas asociadas a la haploinsuficiencia de *MYT1L* como DI (22/22), retraso del lenguaje (22/22), trastornos del comportamiento (19/22) y sobrepeso (17/19).

Tabla 54: Recopilación de los datos clínicos publicados relacionados con alteraciones en *MYT1L* y los trastornos del neurodesarrollo.

Fuente	Nº total pacientes	Nº pacientes solo <i>MYT1L</i> afectado	Rasgos clínicos				
			DI	Retraso lenguaje	TEA	Trastorno del comportamiento (hiperactividad)	Sobrepeso/obesidad
Stevens <i>et al.</i> (2011)	6	0	6	1/1	1	4 (3)	6
Meyer <i>et al.</i> (2012)	2	0	1	1	2	no descrito	no descrito
Ligt <i>et al.</i> (2012)	1	1	1	1	1	1 (1)	0
Rio <i>et al.</i> , (2013)	2	0	1	2	1	1 (1)	1
Doco-Fenzy <i>et al.</i> (2014)	5	0	5	4	3	5 (2)	5
Bonaglia <i>et al.</i> (2014)	1	0	1	1	0	1 (1)	1
de Rocker <i>et al.</i> (2015)	22	10	22	22	8	19 (6)	17
TOTAL	39	11	37	32	16	31 (14)	30
%	-	28	95	94	41	84 (38)	81

En el estudio con CGH-array de nuestra serie de pacientes hemos encontrado dos casos con CNVs que afectan a este gen.

Primero, detectamos la presencia de un cromosoma 2 derivado (paciente XF2463) con una deleción en el extremo 2p25 que incluye a *MYT1L* y una duplicación de más de 150 genes en la región 2q37 (apartados 1.2.2.9. y 1.2.3.6. resultados). Las características clínicas que presenta este paciente no se pueden asignar exclusivamente a la deleción de *MYT1L*, pudiendo contribuir a su fenotipo, por ejemplo, la sobreexpresión de genes como *HDAC4*, *NPPC* y/o *DIS3L2* localizados en la región duplicada (Williams *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2013; Tassano *et al.*, 2013). No obstante, la patogenicidad de estos genes está asociada a su pérdida de dosis, no a su ganancia, por lo que la duplicación de la región 2q37, aun afectando a tantos genes, podría tener un bajo efecto en la clínica de este paciente tal y como se ha comentado en el apartado 1.2.2. de la discusión. Además, cabe destacar que nuestro paciente no presenta algunos de los rasgos clínicos comúnmente asociados a la deleción de *MYT1L* como obesidad o TEA.

En base a los rasgos clínicos principales de este caso, el único caso de nuestra serie con alteración detectada en *MYT1L* en ese momento, se realizó una selección de pacientes para hacer un rastreo de mutaciones en *MYT1L* (apartado 2.1 de resultados). Como resultado de este estudio se detectaron diversas variantes (tabla 49) de las que destacamos una mutación en el exón 6 (c.31C>T, p.R11C) en una paciente que presenta un retraso del desarrollo leve y otros rasgos dismórficos con un desarrollo del lenguaje normal y ausencia de otros rasgos clínicos como TEA, trastornos del comportamiento u obesidad. Esta alteración, aunque afecta a un aminoácido muy conservado y ha sido predicha como patológica según el PolyPhen-2, no afecta a un dominio

funcional conocido, ha sido heredada de su madre sana y recientemente ha sido descrita en dbSNP con una muy baja frecuencia poblacional (frecuencia del alelo minoritario igual a 0.0002), por lo que podría tratarse de una variante neutra. No obstante, no se pueden descartar otras posibilidades, como que fuese una variante de baja penetrancia, una condición recesiva o un mosaicismo en la madre, aunque de tener significado clínico, probablemente se trataría de una afectación leve de la función de *MYT1L*.

Posteriormente, se detectó una delección intragénica en *MYT1L* (apartado 1.2.3.6. de resultados). Esta paciente compartía los rasgos neurológicos más comunes de otros casos con alteración en *MYT1L* (DI, retraso del lenguaje, TEA y trastorno del comportamiento que incluye hiperactividad) pero con parámetros normales de crecimiento (percentil 50 de peso y 90 de talla a los 4 años). Además, presentaba una gran similitud clínica con el caso por mutación puntual *de novo* descrito por de Ligt *et al.* (2012) compartiendo también otros rasgos clínicos como la hipotonía y las dificultades de alimentación en el período neonatal.

Resulta llamativa la ausencia de sobrepeso/obesidad en nuestros pacientes en contraposición con la alta incidencia de este rasgo referida en la bibliografía (tabla 54). Esto se podría relacionar con la posibilidad de que la obesidad estuviera condicionada por la delección de otro gen, proximal a *MYT1L*, no afectado en nuestros pacientes. En este sentido, distintos estudios relacionan la tendencia a la obesidad con la pérdida de *TMEM18* (Willer *et al.*, 2009; Almén *et al.*, 2010; Doco-Fenzy *et al.*, 2014), que codifica para una proteína transmembrana implicada en la respuesta migratoria de los precursores neuronales a factores secretados por la glía (Jurvansuu *et al.*, 2008). Sin embargo, no todos los pacientes que presentan obesidad y alteración en 2p25.3 presentan afectación de este gen (Stevens *et al.*, 2011). Hay que destacar que el número de casos con afectación exclusiva de *MYT1L* es muy reducido. En este sentido, solo de Rocker *et al.* (2015) recoge este rasgo clínico en 9 de los 10 pacientes con afectación única de este gen: dos de ellos con mutación, otros dos con delección y cinco de ellos con duplicación parcial, siendo tres de ellos de una misma familia. No obstante, teniendo en cuenta la definición de la OMS de sobrepeso, y de obesidad, con valores de índice de masa corporal igual o superior a 25 para el primero e igual o superior a 30 para la segunda, revisando los valores de talla y peso disponibles en 8 de estos 9 pacientes con sobrepeso u obesidad, solo tres de ellos serían estrictamente obesos y ninguno tendría sobrepeso.

Por otra parte, de los 11 casos descritos cuya alteración afecta exclusivamente a *MYT1L*, seis de ellos presentan TEA, al igual que la paciente portadora de la delección intragénica descrita en este trabajo, por lo que concluimos que la asociación con el autismo es realmente mucho más frecuente que la obesidad.

Resumiendo, en base a nuestros propios resultados y los datos publicados, podemos concluir que *MYT1L* es un gen patológico causante de DI y frecuentemente autismo, aunque la asociación propuesta con otros rasgos como la obesidad es más discutible. Además, aquellas delecciones de mayor tamaño que afectan a otros genes en la región, pueden contribuir al fenotipo de los pacientes.

3. Metilación generalizada

Tal y como se ha mencionado en la introducción (apartado 2), la regulación epigenética es un proceso complejo, siendo la metilación del DNA el mecanismo mejor estudiado. Los niveles globales de metilación pueden variar por distintos factores, tanto exógenos como endógenos. La importancia de los factores exógenos quedó demostrada por los estudios en gemelos monocigotos (Dempster *et al.*, 2011; Martino *et al.*, 2013), y puede deberse a un gran número de factores como la dieta o la exposición a distintos agentes externos (Davis y Uthus, 2004; Fustinoni *et al.*, 2012; Gadgil *et al.*, 2014). Entre los factores endógenos se incluyen el género o la edad, que se comentarán más adelante. Existen distintos estudios que relacionan la alteración global de la metilación con una gran diversidad de patologías como diabetes (Zhao *et al.*, 2012; Maghbooli *et al.*, 2014), hipertensión (Smolarek *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013), distintos trastornos psiquiátricos (Shimabukuro *et al.*, 2007; Dempster *et al.*, 2011; Melas *et al.*, 2012) o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Chouliaras *et al.*, 2013; Coppieters *et al.*, 2014), pero sin lugar a dudas la hipometilación global observada en cáncer es el fenómeno más estudiado y conocido (Friso *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Se han utilizado distintos métodos para evaluar los niveles globales de metilación. Por un lado el método de referencia se basa en la fragmentación del DNA en nucleótidos y la cuantificación de citosinas y citosinas metiladas por HPLC, calculándose el porcentaje de metilación en función del porcentaje de citosinas metiladas respecto al total de citosinas del genoma. Es una técnica que permite una cuantificación total de la metilación del genoma y aunque existen distintas modificaciones y mejoras de esta estrategia, en general, requiere una gran cantidad de DNA y un equipamiento que no está disponible en la mayoría de laboratorios de genética. Por otro lado, se han diseñado un gran número de estrategias distintas basadas en un tratamiento previo que permite diferenciar el DNA metilado, principalmente con enzimas de restricción sensibles a metilación o bisulfito sódico, seguido de un análisis multi-*loci* de amplio espectro utilizando técnicas como la pirosecuenciación o los arrays. Estas estrategias, además de utilizar equipamiento no siempre accesible como un pirosecuenciador o una plataforma de arrays, realizan una estimación de la metilación limitada a las secuencias estudiadas, pudiendo obtenerse distintos resultados, según la metodología, muestra y diseño experimental utilizado, lo que complica aún más el estudio global de la metilación y su interpretación (Lisanti *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, el análisis realizado de los niveles de citosinas metiladas en DNA por HPLC no nos permitió apreciar diferencias significativas entre los niveles de metilación del grupo de pacientes con alteración genética conocida en genes implicados en la regulación epigenética frente al grupo control de individuos sanos. Hay que tener en cuenta que el grupo de individuos analizado fue reducido, ya que se trataba de un estudio piloto para valorar la utilidad de emplear esta técnica en muestras de pacientes con trastornos del neurodesarrollo. No obstante, en un estudio publicado recientemente, en el que se analizaron muestras de DNA de sangre periférica de 81 pacientes con DI y 19 controles mediante array de metilación, tampoco se detectó un cambio en el patrón de metilación global de pacientes frente a controles (Kolarova *et al.*, 2015).

Por otra parte, tanto en la serie de pacientes como en la de controles, hemos detectado una tendencia significativa de disminución de la tasa global de metilación a lo largo de la edad pediátrica, que se evidencia de forma específica en varones (apartado 3 de resultados).

Existe un gran número de publicaciones en las que se ha valorado la variación de los niveles de metilación con el género y la edad. En general, se han publicado distintas evidencias que asocian una hipometilación del DNA con la edad, de especial importancia en tejidos como el cerebro (Pogribny y Vanyushin, 2010). Más concretamente, en humanos, distintos estudios confirman estos hallazgos (Fuke *et al.*, 2004; Shimabukuro *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009; Heyn *et al.*, 2012), aunque también existe alguna publicación en la que no se ha observado esta asociación (Hsiung *et al.*, 2007; Rusiecki *et al.*, 2008; Perng *et al.*, 2012). Estas diferencias pueden deberse, tal y como ya se ha comentado, a distintos factores relacionados con el diseño del estudio como el tamaño muestral, o el rango de edad de los individuos estudiados. No obstante, hay que tener en cuenta que la variación de los niveles de metilación es pequeña para un rango amplio de edad, y puede variar en función del tipo de determinación. En este sentido Zhu *et al.* (2012), en un estudio de la variación global de la metilación en elementos altamente repetitivos, observaron una relación inversa con la edad estadísticamente significativa en los elementos Alus, aunque con una disminución de solo el 0.2 % entre individuos menores de 48 y mayores de 75 años, mientras que la metilación de los elementos LINEs no variaba de forma significativa con la edad, con el mismo valor promedio de metilación para los individuos en este mismo rango de edad. Es importante resaltar que no hemos encontrado ningún otro estudio sobre la tasa global de metilación con la edad centrado en la edad pediátrica, salvo el de Perng y colaboradores (2012), quienes detectan igualmente una disminución de la metilación con la edad en varones en elementos LINE, que en su caso no alcanza estrictamente la significación. Cabe la posibilidad que en ese estudio, esta relación sea menos evidente por centrarse en un rango más estrecho de edad (de 5 a 12 años).

En cuanto a la diferencia entre hombres y mujeres, en la mayoría de estudios suele ser pequeña, con unos niveles de metilación ligeramente superiores en varones (Fuke *et al.*, 2004; Shimabukuro *et al.*, 2007; Perng *et al.*, 2012) aunque este incremento no llega a ser estadísticamente significativo en otro estudio (Hsiung *et al.*, 2007), e incluso puede ser superior en mujeres, como la variación de la metilación de los elementos Alus descrita por Zhu *et al.* (2012).

En cualquier caso, los modelos que hemos obtenido han sido pobres, con R^2 inferiores al 0.5, lo que nos confirma la importancia de otros factores (exógenos o endógenos) sobre la variación global de la metilación del DNA. Nos planteamos que uno de los factores que podrían influir sobre la tasa global de metilación es la heterocromatina constitutiva. Básicamente formada por secuencias altamente repetitivas, la heterocromatina se encuentra altamente metilada, por lo que la presencia de distintos polimorfismos cromosómicos que afectan al tamaño de estas regiones, como en los satélites y tallos de los cromosomas acrocéntricos o en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16, pueden contribuir a la variabilidad individual de los niveles globales de la metilación. Si además tenemos en cuenta que una gran parte del cromosoma Y está formado por este tipo de cromatina, se podría justificar un mayor valor promedio en varones frente a mujeres.

Por todo esto, decidimos no seguir adelante con este tipo de estudios en pacientes con DI y TEA, centrándonos en el estudio de alteraciones de la metilación en regiones específicas.

4. Regiones sometidas a impronta

Una de las hipótesis de este trabajo era que patrones epigenéticos alterados en tejidos accesibles como la sangre periférica podrían servir de marcadores de alteraciones epigenéticas en otros tejidos menos accesibles, como el sistema nervioso. En base a esto, centrándonos en la impronta, se realizó un rastreo de alteraciones en la metilación de cuatro *loci* distintos (*KCNQ1OT1*, *H19*, *SNRPN* y *MEG3*) en nuestra serie de pacientes, sin tener en cuenta los posibles cambios de dosis detectados previamente, en busca de nuevos síndromes de impronta (apartado 4 de resultados).

Con este estudio hemos sido capaces de completar el diagnóstico genético en cinco pacientes con DI: Se ha detectado una hipermetilación de *H19* (debido a una duplicación 11p de origen paterno), dos disomías uniparentales del cromosoma 14 (DUP(14)) que afectaban al gen *MEG3* y dos casos con pérdida parcial de la metilación en *KCNQ1OT1* y *SNRPN* respectivamente.

Además de DI, retraso motor y del lenguaje, estos cinco casos presentaban anomalías de crecimiento, con peso y longitud al nacer y/o altura en el momento del examen inferior o igual al percentil 10 o mayor o igual al percentil 90, mientras que en el total de la serie estudiada solo el 42 % de los pacientes presentaba estos rasgos. Esto concuerda con las características clínicas más habituales entre los síndromes de impronta conocidos, como el retraso en el crecimiento o el sobrecrecimiento pre y/o postnatal (Eggermann *et al.*, 2015). Además, otras características recurrentes en estos cinco pacientes son alteraciones del comportamiento (tres casos) macro o microcefalia (dos casos), hipotonía (dos casos), hipertelorismo (tres casos) y estrabismo (dos casos).

La hipermetilación de *H19* es consecuencia de un reordenamiento cromosómico que ya había sido detectado mediante CGH-array: un cromosoma 4 derivado de una translocación paterna equilibrada que da lugar a la duplicación de 3.1 Mb del extremo terminal del brazo corto del cromosoma 11, que afecta a ambas regiones sometidas a impronta de este cromosoma, y una deleción de 3.7 Mb del extremo terminal del brazo corto del cromosoma 4 que contiene al gen *WHSC1*, en la región crítica del síndrome de Wolf-Hirschhorn (apartados 1.2.3.2. y 4.2 de resultados). La confirmación mediante el estudio de metilación de este resultado valida la estrategia utilizada en el rastreo de alteraciones de impronta en *loci* específicos en una paciente que presenta dos síndromes distintos, el SBW debido a la duplicación de origen paterno de 11p15, y el SWH como consecuencia de la deleción 4p16. Estos dos síndromes tienen algunas características fenotípicas contradictorias, como la macrosomía en el SBW frente al retraso del crecimiento asociado al SWH, lo que puede dificultar su diagnóstico clínico. En este sentido nuestra paciente presenta rasgos clínicos de ambos síndromes, por un lado la asimetría facial, macroglosia, y onfanocela característicos del SBW, y por otro DI con ausencia del lenguaje, microcefalia, hipotonía, convulsiones y unos rasgos faciales más característicos del SWH (Battaglia *et al.*, 2010; Shuman *et al.*, 2010). Se ha sugerido que el número de casos con una CNV en la región crítica de SBW podría ser mayor de lo esperado por lo que el análisis exclusivo de metilación en estos casos puede ser

insuficiente para proporcionar un diagnóstico clínico preciso y un asesoramiento genético adecuado, siendo este caso un ejemplo de ello (Baskin *et al.*, 2014).

Por otro lado, se han detectado dos alteraciones distintas que afectan al gen *MEG3*: una desmetilación completa debida a una DUP(14) materna y una hipermetilación debida a una DUP(14) paterna (apartado 4.4 de resultados). Los rasgos clínicos del primer caso son totalmente atribuibles al síndrome de Temple causado por la DUP(14) materna. Anteriormente, sin embargo, como consecuencia del estudio genómico por CGH-array, se había detectado una duplicación *de novo* de 4.4 Mb en este mismo cromosoma que se había considerado inicialmente como patológica y responsable del fenotipo del paciente [arr 14q11.2(20,295,211-24,711,159)x3 dn] (Monfort *et al.*, 2007). Como consecuencia de este estudio se pudo reevaluar esta alteración y reclasificarla como una variante de significado incierto. El segundo caso presenta una clínica compatible con el síndrome de Kagami-Ogata causado por la DUP(14) paterna, un síndrome muy poco conocido, por lo que el presente caso nos permite ampliar el espectro de rasgos fenotípicos asociados a la pérdida de función del gen *DLK1*, principal candidato de las anomalías asociadas a la DUP(14) paterna cuya expresión está reprimida por la hipermetilación de *MEG3*.

Finalmente, los resultados más interesantes de este estudio corresponden a la pérdida parcial de metilación en dos *loci* distintos (apartados 4.1 y 4.3 de resultados). Por un lado, una pérdida parcial de la metilación en *SNRPN* asociada habitualmente al síndrome de Angelman en una paciente que, aunque presenta algunas características clínicas que podrían ser compatibles con una variante leve de ese síndrome (DI con retraso del lenguaje y motor), no presenta las características cardinales de la enfermedad, como microcefalia, movimientos atáxicos, convulsiones o un comportamiento distintivo (Dagli y Williams, 2011). Además, la presencia de otras características que no se asocian al SA tales como el crecimiento excesivo y algunos rasgos dismórficos faciales (hipertelorismo, puente nasal elevado, *filtrum* corto, micrognatia y orejas de implantación baja) sugieren que se trata de otro síndrome distinto. Por otro lado, se ha detectado la pérdida parcial de la metilación en *KCNQ1OT1* relacionada específicamente con el síndrome de Beckwith-Wiedemann en un paciente con ausencia de las características típicas de este síndrome, como defectos de la pared abdominal, macroglosia o hemihipertrofia. Por el contrario, este paciente presenta un fenotipo que recuerda sobremanera al síndrome de Sotos: sobrecrecimiento, retraso motor con una pobre coordinación, DI moderada y problemas sociales, con algunos de los rasgos faciales típicos como frente olímpica, implantación alta del pelo y macrocefalia. Por otra parte, destaca la ausencia de otros rasgos faciales característicos (fisuras palpebrales inclinadas hacia abajo y barbilla puntiaguda), hipotonía neonatal, manos grandes o anomalías cardíacas (Tatton-Brown *et al.*, 2012). La asociación entre desmetilación de *KCNQ1OT1* y un síndrome de sobrecrecimiento semejante al Sotos fue descrita previamente por el grupo de Baujat en una serie seleccionada de pacientes con fenotipo similar al síndrome de Sotos pero sin alteración del gen *NSD1*, responsable de la mayoría de casos conocidos de esta enfermedad (Baujat *et al.*, 2004). La recurrencia de esta asociación apunta a que efectivamente se trata de un nuevo síndrome cuya causa actualmente se desconoce.

Estos dos casos confirmarían la hipótesis de partida en la que se planteaba que alteraciones en este tipo de estudios, centrados en *loci* conocidos de DNA

obtenido de sangre periférica, servirían de marcadores de nuevos síndromes de impronta causados por alteraciones epigenéticas desconocidas que podrían estar restringidas a tejidos no accesibles como el SNC.

Como ya se ha comentado en la introducción (apartado 3.2), hay varias publicaciones que describen defectos de metilación multi-*loci* en diferentes grupos de pacientes con síndromes de impronta (Arima *et al.*, 2005; Mackay *et al.*, 2006; Perez-Nanclares *et al.*, 2012; Poole *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 2014; Mackay *et al.*, 2015). En base a estos datos, Azzi *et al.* (2009) propusieron que en estos casos el *locus* más desmetilado es el que marcaría el fenotipo dominante. No obstante, hay que tener en cuenta que el patrón de metilación diferencial puede variar según el tejido o el momento dado del desarrollo. En nuestros casos, la desmetilación parcial observada no explica el fenotipo de ambos pacientes, y tal y como Girardot *et al.* (2013) sugieren, podría tratarse de la afectación de otro *locus* improntado hoy en día desconocido. Dado que las regiones de metilación diferencial (DMR) son variables en función del tipo de tejido y del momento del desarrollo, y que el tejido de mayor interés en este tipo de pacientes no es accesible, como por ejemplo tejido cerebral en el desarrollo embrionario, un análisis global de todas las DMR en muestra accesible (como el DNA genómico obtenido a partir de sangre periférica) podría no mostrar un hallazgo significativo, lo que dificulta la descripción de nuevos trastornos de impronta que podrían estar asociados a la DI en esos casos.

No obstante, distintos estudios apuntan a que los síndromes de impronta pueden estar infradiagnosticados (Poole *et al.*, 2010; Kolarova *et al.*, 2015), y pese a que actualmente en los pacientes con DI idiopática se recomienda como primera aproximación el estudio mediante array genómico (Manning *et al.*, 2010), hay que tener en cuenta que muchos de los síndromes de impronta quedan sin diagnosticar tras este tipo de análisis, tal y como confirman los resultados mostrados en esta tesis. Una posible explicación para una afectación multi-*loci* de la impronta, podría ser la presencia de mutaciones en genes que codifican para factores *trans* que participan en el establecimiento de la impronta, como los genes propuestos *NLRP2* o *ZFP57* entre otros (Mackay *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009). Sin embargo, un requisito previo para llevar a cabo un análisis de genoma o exoma completo en busca de mutaciones en estos genes sería tener una serie de pacientes clínica y epigenéticamente homogénea con el fin de poder interpretar los resultados, lo que es muy complejo en una patología tan heterogénea como los trastornos del neurodesarrollo.

Por último, tres de los cinco casos con alteraciones en regiones sometidas a impronta presentan además distintas CNVs que pueden o no contribuir a su fenotipo, y que en cualquier caso podrían conducir a una interpretación diagnóstica errónea. Este tipo de hallazgos indican la importancia que puede tener complementar los estudios epigenéticos y genéticos para realizar un correcto diagnóstico y asesoramiento genético.

*"Lo bueno riñe con lo mejor."
(Francisco Martínez Castellano)*

CONCLUSIONES





1. El diseño del array realizado, con una alta densidad de sondas en genes y regiones con valor clínico demostrado y una selección de sondas genómicas que permiten una buena resolución a lo largo de todo el genoma, es una buena estrategia para detectar tanto alteraciones intragénicas como CNVs patológicas de mayor tamaño.

2. El número de alteraciones intragénicas detectadas que son patológicas es minoritario, mientras que las benignas representan un alto porcentaje, por lo que el rendimiento diagnóstico respecto a este tipo de alteraciones puede ser bajo. Sin embargo, las CNVs intragénicas en genes candidatos de DI pueden ayudar a aclarar la contribución de estos genes en los trastornos del neurodesarrollo.

3. En nuestra serie de pacientes se ha observado un enriquecimiento significativo en genes implicados en la regulación epigenética en CNVs patológicas, así como un empobrecimiento de este tipo de genes entre las CNVs benignas.

4. En las CNVs patológicas detectadas, un elevado porcentaje (entre el 29 y el 50 %) contiene algún gen de la maquinaria epigenética cuya alteración tiene repercusión clínica. Estos resultados confirman la importancia de los genes responsables de los procesos epigenéticos en el neurodesarrollo, así como que éstos sean especialmente vulnerables a los cambios de dosis.

5. No se han detectado alteraciones causales que afecten exclusivamente a UCEs o miRNAs. No obstante, se ha obtenido un enriquecimiento significativo de estos elementos en CNVs patológicas, lo que sugiere que la desregulación de la expresión génica, mediada por este tipo de elementos, podría suponer un factor de predisposición para los trastornos del neurodesarrollo.

6. En la interpretación de los resultados obtenidos en un CGH-array es importante no solo valorar las regiones mínimas alteradas, sino también las zonas de incertidumbre donde se localizan los puntos de rotura de las CNVs y la posible implicación de los elementos contenidos en ellas.

7. En las zonas de incertidumbre donde se localizan los puntos de rotura, se ha detectado un enriquecimiento significativo de determinados elementos que podrían participar en la formación de los reordenamientos cromosómicos. Por un lado, las secuencias repetitivas, como duplicaciones segmentarias o los elementos Alu, podrían intervenir directamente en los complejos mecanismos que generan estos reordenamientos. Por otra parte, las secuencias que se transcriben, como los lincRNAs, pueden ser vulnerables a sufrir roturas, al descondensarse la cromatina y verse expuestos durante su transcripción, en etapas clave como la gametogénesis o estadios tempranos del desarrollo embrionario.

8. El enriquecimiento de genes en los puntos de rotura podría favorecer la formación de genes quimera cuya contribución al fenotipo ayudaría a explicar las diferentes consecuencias fenotípicas de deleciones o duplicaciones aparentemente equivalentes.

9. La haploinsuficiencia del gen *MYT1L* causa discapacidad intelectual frecuentemente asociada a autismo.

10. El nivel de metilación global del DNA es variable entre individuos y depende del género y la edad entre otros factores, por lo que su posible utilidad clínica como marcador de un trastorno de la maquinaria epigenética se considera *a priori* cuestionable.

11. Hemos encontrado evidencias de dos nuevos síndromes de impronta. El estudio de los patrones de metilación de distintas regiones improntadas conocidas, en DNA obtenido de sangre periférica, puede servir de marcador de nuevos síndromes de impronta causados por alteraciones epigenéticas multi-*loci*.

12. Dentro de las causas genéticas responsables de los trastornos del neurodesarrollo, el fenotipo de los pacientes con DI idiopática puede deberse a una combinación de factores que incluyen, reordenamientos genómicos, mutaciones puntuales o alteraciones epigenéticas, lo que dificulta la valoración clínica inicial de estos pacientes y la orientación de los estudios genéticos pertinentes. En estos casos, realizar una completa evaluación de estos factores, permite aumentar la probabilidad de llegar a un diagnóstico certero que posibilite un correcto asesoramiento a las familias.

*"En la Ciencia la única verdad sagrada,
es que no hay verdades sagradas."
(Carl Sagan)*

BIBLIOGRAFÍA





Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonca BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med.* 2013;368(26):2467-75. doi: 10.1056/NEJMoa1302160.

Addington AM, Rapoport JL. The genetics of childhood-onset schizophrenia: when madness strikes the prepubescent. *Curr Psychiatry Rep.* 2009;11(2):156-61.

Akshoomoff N, Mattson SN, Grossfeld PD. Evidence for autism spectrum disorder in Jacobsen syndrome: identification of a candidate gene in distal 11q. *Genet Med.* 2015;17(2):143-8. doi: 10.1038/gim.2014.86.

Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 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.* 1992;51(6):1229-39.

Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. Overview and Concepts. En: Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, editores. *Epigenetics* (pp. 23-40) 1ª Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor laboratory Press, 2007. ISBN: 978-0879697242.

Almén MS, Jacobsson JA, Shaik JH, Olszewski PK, Cedernaes J, Alsiö J, Sreedharan S, Levine AS, Fredriksson R, Marcus C, Schiöth HB. The obesity gene, TMEM18, is of ancient origin, found in majority of neuronal cells in all major brain regions and associated with obesity in severely obese children. *BMC Med Genet.* 2010;11:58. doi: 10.1186/1471-2350-11-58.

Andersen EF, Carey JC, Earl DL, Corzo D, Suttie M, Hammond P, South ST. Deletions involving genes WHSC1 and LETM1 may be necessary, but are not sufficient to cause Wolf-Hirschhorn Syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(4):464-70. doi: 10.1038/ejhg.2013.192.

Arima T, Kamikihara T, Hayashida T, Kato K, Inoue T, Shirayoshi Y, Oshimura M, Soejima H, Mukai T, Wake N. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(8):2650-60.

Aslanukov A, Bhowmick R, Guruju M, Oswald J, Raz D, Bush RA, Sieving PA, Lu X, Bock CB, Ferreira PA. RanBP2 modulates Cox11 and hexokinase I activities and haploinsufficiency of RanBP2 causes deficits in glucose metabolism. *PLoS Genet.* 2006;2(10):e177.

Attia M, Rachez C, De Pauw A, Avner P, Rogner UC. Nap112 promotes histone acetylation activity during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(17):6093-102.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):241-57.

Auber B, Burfeind P, Thiels C, Alsat EA, Shoukier M, Liehr T, Nelle H, Bartels I, Salinas-Riester G, Laccone F. An unbalanced translocation resulting in a duplication of Xq28 causes a Rett syndrome-like phenotype in a female patient. *Clin Genet.* 2010;77(6):593-7. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01363.x.

Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med.* 1944;79(2):137-58.

Azzi S, Rossignol S, Steunou V, Sas T, Thibaud N, Danton F, Le Jule M, Heinrichs C, Cabrol S, Gicquel C, Le Bouc Y, Netchine I. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum Mol Genet.* 2009;18(24):4724-33. doi: 10.1093/hmg/ddp435.

Backx L, Seuntjens E, Devriendt K, Vermeesch J, Van Esch H. A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. *Cytogenet Genome Res.* 2011;132(3):135-43. doi: 10.1159/000321577.

Badens C, Martini N, Courrier S, DesPortes V, Touraine R, Levy N, Ederly P. ATRX syndrome in a girl with a heterozygous mutation in the ATRX Zn finger domain and a totally skewed X-inactivation pattern. *Am J Med Genet A.* 2006;140(20):2212-5.

Baira E, Greshock J, Coukos G, Zhang L. Ultraconserved elements: genomics, function and disease. *RNA Biol.* 2008;5(3):132-4.

Ballif BC, Rosenfeld JA, Traylor R, Theisen A, Bader PI, Ladda RL, Sell SL, Steinrath M, Surti U, McGuire M, Williams S, Farrell SA, Filiano J, Schnur RE, Coffey LB, Tervo RC, Stroud T, Marble M, Netzloff M, Hanson K, Aylsworth AS, Bamforth JS, Babu D, Niyazov DM, Ravnar JB, Schultz RA, Lamb AN, Torchia BS, Bejjani BA, Shaffer LG. High-resolution array CGH defines critical regions and candidate genes for microcephaly, abnormalities of the corpus callosum, and seizure phenotypes in patients with microdeletions of 1q43q44. *Hum Genet.* 2012;131(1):145-56. doi: 10.1007/s00439-011-1073-y.

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381-95. doi: 10.1038/cr.2011.22.

Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(2). pii: a018382. doi: 10.1101/cshperspect.a018382.

Baskin B, Choufani S, Chen YA, Shuman C, Parkinson N, Lemyre E, Micheil Innes A, Stavropoulos DJ, Ray PN, Weksberg R. High frequency of copy number variations (CNVs) in the chromosome 11p15 region in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet.* 2014;133(3):321-30. doi: 10.1007/s00439-013-1379-z.

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

Battaglia A, Carey JC, South ST, Wright TJ. Wolf-Hirschhorn Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Baujat G, Rio M, Rossignol S, Sanlaville D, Lyonnet S, Le Merrer M, Munnich A, Gicquel C, Cormier-Daire V, Colleaux L. Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004;74(4):715-20.

Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Ignatius J, Raynaud M, Hollanders K, Govaerts K, Vandenreijt K, Niel F, Blanc P, Stevenson RE, Fryns JP, Marynen P, Schwartz CE, Froyen G. Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res.* 2008;18(6):847-58. doi: 10.1101/gr.075903.107.

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

Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013;132(4):359-83. doi: 10.1007/s00439-013-1271-x.

Berdasco M, Fraga MF, Esteller M. Quantification of global DNA methylation by capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2009;507:23-34. doi: 10.1007/978-1-59745-522-0_2.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009;23(7):781-3. doi: 10.1101/gad.1787609.

Bernier R, Steinman KJ, Reilly B, Wallace AS, Sherr EH, Pojman N, Mefford HC, Gerdtz J, Earl R, Hanson E, Goin-Kochel RP, Berry L, Kanne S, Snyder LG, Spence S, Ramocki MB, Evans DW, Spiro JE, Martin CL, Ledbetter DH, Chung WK. Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant. *Genet Med.* 2015 Jun 11. doi: 10.1038/gim.2015.78. [publicación electrónica antes de su publicación impresa].

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000;9(16):2395-402.

Bialer MG, Taff I, Shanmugham A, Lagrave D, White BJ. De novo trisomy Xq28-pter detected by subtelomeric FISH screening. *Am J Hum Genet* 2003, 73:30.

Bijlsma EK, Collins A, Papa FT, Tejada MI, Wheeler P, Peeters EA, Gijlsbers AC, van de Kamp JM, Kriek M, Losekoot M, Broekma AJ, Crolla JA, Pollazzon M, Mucciolo M, Katzaki E, Disciglio V, Ferreri MI, Marozza A, Mencarelli MA, Castagnini C, Dosa L, Ariani F, Mari F, Canitano R, Hayek G, Botella MP, Gener B, Mínguez M, Renieri A, Ruivenkamp CA. Xq28 duplications including MECP2 in five females: Expanding the phenotype to severe mental retardation. *Eur J Med Genet.* 2012;55(6-7):404-13. doi: 10.1016/j.ejmg.2012.02.009.

Birchler JA, Veitia RA. Gene balance hypothesis: connecting issues of dosage sensitivity across biological disciplines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(37):14746-53. doi: 10.1073/pnas.1207726109.

Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447(7143):396-8.

Bird TD. Myotonic Dystrophy Type 1. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Bonaglia MC, Ciccone R, Gimelli G, Gimelli S, Marelli S, Verheij J, Giorda R, Grasso R, Borgatti R, Pagone F, Rodríguez L, Martínez-Frías ML, van Ravenswaaij C, Zuffardi O. Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(12):1443-9. doi: 10.1038/ejhg.2008.119.

Bonaglia MC, Giorda R, Zanini S. A new patient with a terminal de novo 2p25.3 deletion of 1.9 Mb associated with early-onset of obesity, intellectual disabilities and hyperkinetic disorder. *Mol Cytogenet.* 2014;7:53. doi: 10.1186/1755-8166-7-53.

Boone PM, Bacino CA, Shaw CA, Eng PA, Hixson PM, Pursley AN, Kang SH, Yang Y, Wiszniewska J, Nowakowska BA, del Gaudio D, Xia Z, Simpson-Patel G, Immken LL, Gibson JB, Tsai AC, Bowers JA, Reimschisel TE, Schaaf CP, Potocki L, Scaglia F, Gambin T, Sykulski M, Bartnik M, Derwinska K, Wisniowiecka-Kowalik B, Lalani SR, Probst FJ, Bi W, Beaudet AL, Patel A, Lupski JR, Cheung SW, Stankiewicz P. Detection of clinically relevant exonic copy-number changes by array CGH. *Hum Mutat.* 2010;31(12):1326-42. doi: 10.1002/humu.21360.

Bradley EA, Thompson A, Bryson SE. Mental retardation in teenagers: prevalence data from the Niagara region, Ontario. *Can J Psychiatry.* 2002;47(7):652-9.

Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang SH, Pursley A, Lotze T, Kennedy G, Lansky-Shafer S, Weaver C, Roeder ER, Grebe TA, Arnold GL, Hutchison T, Reimschisel T, Amato S, Geraghty MT, Innis JW, Obersztyn E, Nowakowska B, Rosengren SS, Bader PI, Grange DK, Naqvi S, Garnica AD, Bernes SM, Fong CT, Summers A, Walters WD, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung SW, Patel A. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet.* 2008;40(12):1466-71. doi: 10.1038/ng.279.

Bucan M, Abrahams BS, Wang K, Glessner JT, Herman EI, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Imielinski M, Hadley D, Bradfield JP, Kim C, Gidaya NB, Lindquist I, Hutman T, Sigman M, Kustanovich V, Lajonchere CM, Singleton A, Kim J, Wassink TH, McMahon WM, Owley T, Sweeney JA, Coon H, Nurnberger JL, Li M, Cantor RM, Minshew NJ, Sutcliffe JS, Cook EH, Dawson G, Buxbaum JD, Grant SF, Schellenberg GD, Geschwind DH, Hakonarson H. Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000536. doi: 10.1371/journal.pgen.1000536.

Bulcao Macedo D, Nahime Brito V, Latronico AC. New causes of central precocious puberty: the role of genetic factors. *Neuroendocrinology.* 2014;100(1):1-8. doi: 10.1159/000366282.

Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet.* 2011;130(4):517-28. doi: 10.1007/s00439-011-0970-4..

Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011;25(18):1915-27. doi: 10.1101/gad.17446611.

Cai Y, Singh BB, Aslanukov A, Zhao H, Ferreira PA. The docking of kinesins, KIF5B and KIF5C, to Ran-binding protein 2 (RanBP2) is mediated via a novel RanBP2 domain. *J Biol Chem.* 2001;276(45):41594-602.

Chang JC, Meredith DM, Mayer PR, Borromeo MD, Lai HC, Ou YH, Johnson JE. Prdm13 mediates the balance of inhibitory and excitatory neurons in somatosensory circuits. *Dev Cell.* 2013;25(2):182-95. doi: 10.1016/j.devcel.2013.02.015.

Chang SC, Tucker T, Thorogood NP, Brown CJ. Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Front Biosci.* 2006;11:852-66.

Chen B, Cepko CL. HDAC4 regulates neuronal survival in normal and diseased retinas. *Science.* 2009;323(5911):256-9. doi: 10.1126/science.1166226.

Cheung HC, Yatsenko SA, Kadapakkam M, Legay H, Su J, Lupski JR, Plon SE. Constitutional tandem duplication of 9q34 that truncates EHMT1 in a child with ganglioglioma. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58(5):801-5. doi: 10.1002/pbc.23219.

Chinault AC, Carbon J. Overlap hybridization screening: isolation and characterization of overlapping DNA fragments surrounding the leu2 gene on yeast chromosome III. *Gene.* 1979;5(2):111-26.

Cho KI, Cai Y, Yi H, Yeh A, Aslanukov A, Ferreira PA. Association of the kinesin-binding domain of RanBP2 to KIF5B and KIF5C determines mitochondria localization and function. *Traffic.* 2007;8(12):1722-35.

Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, Steinbusch HW, Coleman PD, Rutten BP, van den Hove DL. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging.* 2013;34(9):2091-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021.

Christodoulou J, Ho G. MECP2 Related Disorders. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Clynes D, Gibbons RJ. ATRX and the replication of structured DNA. *Curr Opin Genet Dev.* 2013;23(3):289-94. doi: 10.1016/j.gde.2013.01.005.

Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(9):461-6. doi: 10.1016/j.tibs.2013.06.011.

Coppieters N, Dieriks BV, Lill C, Faull RL, Curtis MA, Dragunow M. Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiol Aging.* 2014;35(6):1334-44. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031.

Cordeddu V, Redeker B, Stellacci E, Jongejan A, Fragale A, Bradley TE, Anselmi M, Ciolfi A, Cecchetti S, Muto V, Bernardini L, Azage M, Carvalho DR, Espay AJ,

Male A, Molin AM, Posmyk R, Battisti C, Casertano A, Melis D, van Kampen A, Baas F, Mannens MM, Bocchinfuso G, Stella L, Tartaglia M, Hennekam RC. Mutations in ZBTB20 cause Primrose syndrome. *Nat Genet.* 2014;46(8):815-7. doi: 10.1038/ng.3035.

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. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet.* 1997;72(4):468-77.

Dagli AI, Williams CA. Angelman Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(10):988-95.

Dawlaty MM, Malureanu L, Jeganathan KB, Kao E, Sustmann C, Tahk S, Shuai K, Grosschedl R, van Deursen JM. Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell.* 2008;133(1):103-15. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.045.

de La Fuente R, Baumann C, Viveiros MM. Role of ATRX in chromatin structure and function: implications for chromosome instability and human disease. *Reproduction.* 2011;142(2):221-34. doi: 10.1530/REP-10-0380.

de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C, del Rosario M, Hoischen A, Scheffer H, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA, Vissers LE. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012;367(20):1921-9. doi: 10.1056/NEJMoa1206524.

de Munnik SA, García-Miñaur S, Hoischen A, van Bon BW, Boycott KM, Schoots J, Hoefsloot LH, Knoers NV, Bongers EM, Brunner HG. A de novo non-sense mutation in ZBTB18 in a patient with features of the 1q43q44 microdeletion syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(6):844-6. doi: 10.1038/ejhg.2013.249.

de Rocker N, Vergult S, Koolen D, Jacobs E, Hoischen A, Zeeman S, Bang B, Béna F, Bockaert N, Bongers EM, de Ravel T, Devriendt K, Giglio S, Faivre L, Joss S, Maas S, Marle N, Novara F, Nowaczyk MJ, Peeters H, Polstra A, Roelens F, Rosenberg C, Thevenon J, Tümer Z, Vanhauwaert S, Varvagiannis K, Willaert A, Willemsen M, Willems M, Zuffardi O, Coucke P, Speleman F, Eichler EE, Kleefstra T, Menten B. Refinement of the critical 2p25.3 deletion region: the role of MYT1L in intellectual disability and obesity. *Genet Med.* 2015;17(6):460-6. doi: 10.1038/gim.2014.124.

de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod.* 2014;29(12):2838-43. doi: 10.1093/humrep/deu256.

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.

del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, Neul JL, Patel A, Lee JA, Irons M, Berry SA, Pursley AA, Grebe TA, Freedenberg D, Martin RA, Hsich GE, Khera JR, Friedman NR, Zoghbi HY, Eng CM, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW, Roa BB. Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med*. 2006;8(12):784-92.

Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, Kalidindi S, Picchioni M, Kravariti E, Touloupoulou T, Murray RM, Mill J. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet*. 2011;20(24):4786-96. doi: 10.1093/hmg/ddr416

Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(10):1147-55. doi: 10.1038/nsmb.2669.

Ding N, Zhou H, Esteve PO, Chin HG, Kim S, Xu X, Joseph SM, Friez MJ, Schwartz CE, Pradhan S, Boyer TG. Mediator links epigenetic silencing of neuronal gene expression with x-linked mental retardation. *Mol Cell*. 2008;31(3):347-59. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.023.

Doco-Fenzy M, Leroy C, Schneider A, Petit F, Delrue MA, Andrieux J, Perrin-Sabourin L, Landais E, Aboura A, Puechberty J, Girard M, Tournaire M, Sanchez E, Rooryck C, Ameil A, Goossens M, Jonveaux P, Lefort G, Taine L, Cailley D, Gaillard D, Leheup B, Sarda P, Geneviève D. Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(4):471-9. doi: 10.1038/ejhg.2013.189

Doherty ES, Lacbawan FL. 2q37 Microdeletion Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Dolan M, Mendelsohn NJ, Pierpont ME, Schimmenti LA, Berry SA, Hirsch B. A novel microdeletion/microduplication syndrome of 19p13.13. *Genet Med*. 2010;12(8):503-11. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181e59291.

Dostal A, Nemeckova J, Gaillyova R. The 18q deletion syndrome and analysis of the critical region for orofacial cleft at 18q22.3. *J Craniomaxillofac Surg*. 2009;37(5):272-5. doi: 10.1016/j.jcms.2008.12.002.

Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Côté J. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol*. 2004;24(5):1884-96.

Driscoll DJ, Miller JL, Schwartz S, Cassidy SB. Prader-Willi Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Eggermann T, Netchine I, Temple IK, Tümer Z, Monk D, Mackay D, Grønsvov K, Riccio A, Linglart A, Maher ER. Congenital imprinting disorders: EUCID.net - a

network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):23. doi: 10.1186/s13148-015-0050-z.

Endele S, Fuhry M, Pak SJ, Zabel BU, Winterpacht A: LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2b)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* 1999; 60: 218–225.

Fehr S, Bebbington A, Nassar N, Downs J, Ronen GM, DE Klerk N, Leonard H. Trends in the diagnosis of Rett syndrome in Australia. *Pediatr Res*. 2011;70(3):313-9. doi: 10.1038/pr.2011.538.

Fénelon K, Mukai J, Xu B, Hsu PK, Drew LJ, Karayiorgou M, Fischbach GD, Macdermott AB, Gogos JA. Deficiency of Dgcr8, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(11):4447-52. doi: 10.1073/pnas.1101219108.

Feng J, Bi C, Clark BS, Mady R, Shah P, Kohtz JD. The Efv-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev*. 2006;20(11):1470-84.

Fieremans N, Bauters M, Belet S, Verbeeck J, Jansen AC, Seneca S, Roelens F, De Baere E, Marynen P, Froyen G. De novo MECP2 duplications in two females with intellectual disability and unfavorable complete skewed X-inactivation. *Hum Genet*. 2014;133(11):1359-67. doi: 10.1007/s00439-014-1469-6.

Fitaw Y, Boersma JM. Prevalence and impact of disability in north-western Ethiopia. *Disabil Rehabil*. 2006;28(15):949-53.

Fombonne E Epidemiological studies of pervasive developmental disorder. En: Volkmar F, Paul R, Klin A, Cohen D, editores. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders* (pp. 42–69). Volumen 1.3ª Ed. Hoboken, NJ: Wiley. 2005. ISBN: 978-0471716983.

Forero DA, van der Ven K, Callaerts P, Del-Favero J. miRNA genes and the brain: implications for psychiatric disorders. *Hum Mutat*. 2010;31(11):1195-204. doi: 10.1002/humu.21344.

Fradin D, Cheslack-Postava K, Ladd-Acosta C, Newschaffer C, Chakravarti A, Arking DE, Feinberg A, Fallin MD. Parent-of-origin effects in autism identified through genome-wide linkage analysis of 16,000 SNPs. *PLoS One*. 2010;5(9). pii: e12513. doi: 10.1371/journal.pone.0012513.

Friso S, Udali S, Guarini P, Pellegrini C, Pattini P, Moruzzi S, Girelli D, Pizzolo F, Martinelli N, Corrocher R, Olivieri O, Choi SW. Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(3):348-55. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0859.

Froyen G, Belet S, Martinez F, Santos-Rebouças CB, Declercq M, Verbeeck J, Donckers L, Berland S, Mayo S, Roselló M, Pimentel MM, Fintelman-Rodrigues N, Hovland R, Rodrigues dos Santos S, Raymond FL, Bose T, Corbett MA, Sheffield L, van Ravenswaaij-Arts CM, Dijkhuizen T, Coutton C, Satre V, Siu V, Marynen P. Copy-number gains of HUWE1 due to replication- and recombination-based rearrangements. *Am J Hum Genet*. 2012;91(2):252-64. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.06.010

Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda T, Miura K, Miyazaki T, Ogura C, Okazaki Y, Jinno Y. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet.* 2004;68(Pt 3):196-204.

Fustinoni S, Rossella F, Polledri E, Bollati V, Campo L, Byun HM, Agnello L, Consonni D, Pesatori AC, Baccarelli A, Bertazzi PA. Global DNA methylation and low-level exposure to benzene. *Med Lav.* 2012;103(2):84-95.

Gadgil MS, Joshi KS, Naik SS, Pandit AN, Oti SR, Patwardhan BK. Association of homocysteine with global DNA methylation in vegetarian Indian pregnant women and neonatal birth anthropometrics. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27(17):1749-53. doi: 10.3109/14767058.2013.879702.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196(2):261-82.

Girardot M, Feil R, Llères D. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics.* 2013;5(6):715-28. doi: 10.2217/epi.13.66.

Gos M. Epigenetic mechanisms of gene expression regulation in neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2013;73(1):19-37.

Grasshoff U, Bonin M, Goehring I, Ekici A, Dufke A, Cremer K, Wagner N, Rossier E, Jauch A, Walter M, Bauer C, Bauer P, Horber K, Beck-Woedl S, Wieczorek D. De novo MECP2 duplication in two females with random X-inactivation and moderate mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(5):507-12. doi: 10.1038/ejhg.2010.226.

Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 2008;1(1):4. doi: 10.1186/1755-8417-1-4.

Guo W, Jiang H, Gray V, Dedhar S, Rao Y. Role of the integrin-linked kinase (ILK) in determining neuronal polarity. *Dev Biol.* 2007;306(2):457-68.

Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* 2009;458(7235):223-7. doi: 10.1038/nature07672.

Hackmann K, Matko S, Gerlach EM, von der Hagen M, Klink B, Schrock E, Rump A, Di Donato N. Partial deletion of GLRB and GRIA2 in a patient with intellectual disability. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(1):112-4. doi: 10.1038/ejhg.2012.97.

Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 2013;9(6):e1003569. doi: 10.1371/journal.pgen.1003569.

Hanotel J, Bessodes N, Thélie A, Hedderich M, Parain K, Van Driessche B, Brandão Kde O, Kricha S, Jorgensen MC, Grapin-Botton A, Serup P, Van Lint C, Perron M, Pieler T, Henningfeld KA, Bellefroid EJ. The Prdm13 histone methyltransferase encoding gene is a Ptf1a-Rbpj downstream target that suppresses glutamatergic and promotes GABAergic neuronal fate in the dorsal neural tube. *Dev Biol.* 2014;386(2):340-57. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.12.024.

Henikoff S, Smith MM. Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(1). pii: a019364. doi: 10.1101/cshperspect.a019364.

Hershey A, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol.* 1952;36(1):39-56.

Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(26):10522-7. doi: 10.1073/pnas.1120658109.

Holt R, Sykes NH, Conceição IC, Cazier JB, Anney RJ, Oliveira G, Gallagher L, Vicente A, Monaco AP, Pagnamenta AT. CNVs leading to fusion transcripts in individuals with autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(11):1141-7. doi: 10.1038/ejhg.2012.73.

Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, Kelsey KT. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(1):108-14.

Hu N, Strobl-Mazzulla PH, Bronner ME. Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol.* 2014;396(2):159-68. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.034.

Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol.* 2008;6(1):e22. doi: 10.1371/journal.pbio.0060022.

Inoue K, Osaka H, Thurston VC, Clarke JT, Yoneyama A, Rosenbarker L, Bird TD, Hodes ME, Shaffer LG, Lupski JR. Genomic rearrangements resulting in PLP1 deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females. *Am J Hum Genet.* 2002;71(4):838-53.

Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet.* 2014;51(8):495-501. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102396.

Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans. *Mol Aspects Med.* 2013;34(4):826-40. doi: 10.1016/j.mam.2012.06.009.

Jatiani A, Pannizzo P, Gualco E, Del-Valle L, Langford D. Neuronal PINCH is regulated by TNF- α and is required for neurite extension. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2011;6(3):330-40. doi: 10.1007/s11481-010-9236-5.

Jolly LA, Nguyen LS, Domingo D, Sun Y, Barry S, Hancarova M, Plevova P, Vlckova M, Havlovicova M, Kalscheuer VM, Graziano C, Pippucci T, Bonora E, Sedlacek Z, Gecz J. HCFC1 loss-of-function mutations disrupt neuronal and neural progenitor cells of the developing brain. *Hum Mol Genet.* 2015;24(12):3335-47. doi: 10.1093/hmg/ddv083.

Jurvansuu J, Zhao Y, Leung DS, Boulaire J, Yu YH, Ahmed S, Wang S. Transmembrane protein 18 enhances the tropism of neural stem cells for glioma cells. *Cancer Res.* 2008;68(12):4614-22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5291.

Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T. Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet*. 2015 Feb 18. doi: 10.1038/ejhg.2015.13. [publicación electrónica antes de su publicación impresa].

Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*. 2011;90(3):430-40. doi: 10.1093/cvr/cvr097.

Kernohan KD, Vernimmen D, Gloor GB, Bérubé NG. Analysis of neonatal brain lacking ATRX or MeCP2 reveals changes in nucleosome density, CTCF binding and chromatin looping. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(13):8356-68. doi: 10.1093/nar/gku564.

Kim JG, Armstrong RC, v Agoston D, Robinsky A, Wiese C, Nagle J, Hudson LD. Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J Neurosci Res*. 1997;50(2):272-90.

Kim JY, Kee HJ, Choe NW, Kim SM, Eom GH, Baek HJ, Kook H, Kook H, Seo SB. Multiple-myeloma-related WHSC1/MMSET isoform RE-IIBP is a histone methyltransferase with transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol*. 2008;28(6):2023-34. doi: 10.1128/MCB.02130-07.

King BH, Toth KE, Hodapp RM, Dykens EM. Intellectual Disability. En: BJ Sadock, VA Sadock, P Ruiz, editores. *Comprehensive Textbook of Psychiatry* (pp. 3444-3474). Volumen 2. 9ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN: 978-0781768993.

Kishi N, Macklis JD. Dissecting MECP2 function in the central nervous system. *J Child Neurol*. 2005;20(9):753-9.

Kistner-Griffin E, Brune CW, Davis LK, Sutcliffe JS, Cox NJ, Cook EH Jr. Parent-of-origin effects of the serotonin transporter gene associated with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011;156(2):139-44. doi: 10.1002/ajmg.b.31146.

Kleefstra T, Nillesen WM, Yntema HG. Kleefstra Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Kolarova J, Tangen I, Bens S, Gillissen-Kaesbach G, Gutwein J, Kautza M, Rydzanicz M, Stephani U, Siebert R, Ammerpohl O, Caliebe A. Array-based DNA methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype. *Eur J Med Genet*. 2015;58(8):419-25. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.05.001.

Kousoulidou L, Moutafi M, Nicolaides P, Hadjiloizou S, Christofi C, Paradesiotou A, Anastasiadou V, Sismani C, Patsalis PC. Screening of 50 cyprriot patients with autism spectrum disorders or autistic features using 400K custom array-CGH. *Biomed Res Int*. 2013;2013:843027. doi: 10.1155/2013/843027.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.

Kramer JM, van Bokhoven H. Genetic and epigenetic defects in mental retardation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):96-107. doi: 10.1016/j.biocel.2008.08.009.

Lachlan KL, Collinson MN, Sandford RO, van Zyl B, Jacobs PA, Thomas NS. Functional disomy resulting from duplications of distal Xq in four unrelated patients. *Hum Genet.* 2004;115(5):399-408.

Laget S, Joulie M, Le Masson F, Sasai N, Christians E, Pradhan S, Roberts RJ, Defossez PA. The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PLoS One.* 2010;5(8):e11982. doi: 10.1371/journal.pone.0011982.

Lalani SR, Hefner MA, Belmont JW, Davenport SLH. CHARGE Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Lee Y, Mattai A, Long R, Rapoport JL, Gogtay N, Addington AM. Microduplications disrupting the MYT1L gene (2p25.3) are associated with schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2012;22(4):206-9. doi: 10.1097/YPG.0b013e328353ae3d.

Leonard H, Petterson B, Bower C, Sanders R. Prevalence of intellectual disability in Western Australia. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2003;17(1):58-67.

Lerer I, Sagi M, Meiner V, Cohen T, Zlotogora J, Abeliovich D. Deletion of the ANKRD15 gene at 9p24.3 causes parent-of-origin-dependent inheritance of familial cerebral palsy. *Hum Mol Genet.* 2005;14(24):3911-20. doi:10.1093/hmg/ddi415.

Li F, Zhang Y, Wu C. Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 24):4589-99.

Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, Zhu W, Zhang B. The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(9):e106290. doi: 10.1371/journal.pone.0106290.

Li S, Bordoy R, Stanchi F, Moser M, Braun A, Kudlacek O, Wewer UM, Yurchenco PD, Fässler R. PINCH1 regulates cell-matrix and cell-cell adhesions, cell polarity and cell survival during the peri-implantation stage. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 13):2913-21.

Li W, Wang X, Zhao J, Lin J, Song XQ, Yang Y, Jiang C, Xiao B, Yang G, Zhang HX, Lv LX. Association study of myelin transcription factor 1-like polymorphisms with schizophrenia in Han Chinese population. *Genes Brain Behav.* 2012;11(1):87-93. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00734.x.

Licastro D, Gennarino VA, Petrera F, Sanges R, Banfi S, Stupka E. Promiscuity of enhancer, coding and non-coding transcription functions in ultraconserved elements. *BMC Genomics.* 2010;11:151. doi: 10.1186/1471-2164-11-151.

Lisanti S, Omar WA, Tomaszewski B, De Prins S, Jacobs G, Koppen G, Mathers JC, Langie SA. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation

in human cells and tissues. *PLoS One*. 2013;8(11):e79044. doi: 10.1371/journal.pone.0079044.

Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009;462(7271):315-22. doi: 10.1038/nature08514.

Liz J, Portela A, Soler M, Gómez A, Ling H, Michlewski G, Calin GA, Guil S, Esteller M. Regulation of pri-miRNA processing by a long noncoding RNA transcribed from an ultraconserved region. *Mol Cell*. 2014;55(1):138-47. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.005.

López-Carrasco A, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Mayo S, Martínez F, Orellana C. Localización cromosómica de duplicaciones submicroscópicas en pacientes con trastornos del neurodesarrollo para identificar casos con alto riesgo de recurrencia familiar. *Med Clin (Barc)*. 2014;142(12):531-7. doi: 10.1016/j.medcli.2013.04.034.

Lossi AM, Millán JM, Villard L, Orellana C, Cardoso C, Prieto F, Fontés M, Martínez F. Mutation of the XNP/ATR-X gene in a family with severe mental retardation, spastic paraplegia and skewed pattern of X inactivation: demonstration that the mutation is involved in the inactivation bias. *Am J Hum Genet*. 1999;65(2):558-62.

Lubchenco LO, Hansman C, Boyd E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics*. 1966;37(3):403-8.

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

Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journel H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan JM, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Gecz J, Hamel BC, van Bokhoven H, de Brouwer AP. Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(4):444-53. doi: 10.1038/ejhg.2008.208.

Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*. 1998;14(10):417-22.

Ma H, Zhang W, Hu J, Yu Z, Chen Y, Luo Q, Shi X, Zhang Y, Song R, Zhou Z, Shen G, Fu J. Analysis of global DNA methylation levels in human blood using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*. 2009;15(4):555-61. doi: 10.1255/ejms.1007.

Mackay DJ, Boonen SE, Clayton-Smith J, Goodship J, Hahnemann JM, Kant SG, Njølstad PR, Robin NH, Robinson DO, Siebert R, Shield JP, White HE, Temple IK. A

maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet.* 2006;120(2):262-9.

Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP, Hahnemann JM, Kordonouri O, Masoud AF, Oestergaard E, Storr J, Ellard S, Hattersley AT, Robinson DO, Temple IK. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet.* 2008;40(8):949-51. doi: 10.1038/ng.187.

Mackay DJ, Eggermann T, Buiting K, Garin I, Netchine I, Linglart A, de Nanclares GP. Multifocus methylation defects in imprinting disorders. *Biomol Concepts.* 2015;6(1):47-57. doi: 10.1515/bmc-2014-0037.

Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Armengol L, González E, Rodríguez B, Badenas C, Sánchez A, Martínez F, Guitart M, Fernández I, Arranz JA, Tejada M, Pérez-Jurado LA, Estivill X, Milà M. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics.* 2007;8:443.

Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med.* 2014;16(12):903-12. doi: 10.1038/gim.2014.46.

Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Larijani B, Pasalar P, Keshtkar AA. Association between alterations in global DNA methylation and predisposing factors in diabetes: a high pressure liquid chromatography based study. *Minerva Med.* 2014 Jul 31. [publicación electrónica antes de su publicación impresa].

Majnemer A, Shevell MI. Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. *J Pediatr.* 1995;127(2):193-9.

Makrythanasis P, Moix I, Gimelli S, Fluss J, Aliferis K, Antonarakis SE, Morris MA, Béna F, Bottani A. De novo duplication of MECP2 in a girl with mental retardation and no obvious dysmorphic features. *Clin Genet.* 2010;78(2):175-80. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01371.x.

Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 2010;12(11):742-5. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181f8baad.

Marcelis CLM, de Brouwer APM. Feingold Syndrome 1. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Martínez F, León AM, Monfort S, Oltra S, Roselló M, Orellana. Robust, Easy, and Dose-Sensitive Methylation Test for the Diagnosis of Prader-Willi and Angelman Syndromes. *Genetic Testing.* 2006;10:174-177.

Martínez F, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Blesa D, Quiroga R, Mayo S, Orellana C. Enrichment of ultraconserved elements among genomic imbalances causing mental delay and congenital anomalies. *BMC Med Genomics*. 2010;3:54. doi: 10.1186/1755-8794-3-54.

Martínez F, Roselló M, Mayo S, Monfort S, Oltra S, Orellana C. Duplication at Xq13.3-q21.1 with syndromic intellectual disability, a probable role for the ATRX gene. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(4):918-23. doi: 10.1002/ajmg.a.36371.

Martínez-Garay I, Ballesta MJ, Oltra S, Orellana C, Palomeque A, Moltó MD, Prieto F, Martínez F. Intronic L1 insertion and F268S, novel mutations in RPS6KA3 (RSK2) causing Coffin-Lowry syndrome. *Clin Genet*. 2003;64(6):491-6.

Martino D, Loke YJ, Gordon L, Ollikainen M, Cruickshank MN, Saffery R, Craig JM. Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance. *Genome Biol*. 2013;14(5):R42. doi: 10.1186/gb-2013-14-5-r42.

Matoso E, Ramos F, Ferrão J, Pires LM, Mascarenhas A, Melo JB, Carreira IM. Interstitial 287 kb deletion of 4p16.3 including FGFR1 gene associated with language impairment and overgrowth. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):87. doi: 10.1186/s13039-014-0087-2.)

Maulik PK, Harbour CK. Epidemiology of Intellectual Disability. En: JH Stone, M Blouin, editores. *International Encyclopedia of Rehabilitation*. Buffalo: CIRRIE, 2010. Disponible online: <http://cirrie.buffalo.edu/encyclopedia/en/article/144/>

Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil*. 2011;32(2):419-36. doi: 10.1016/j.ridd.2010.12.018.

Mayo S, Garin I, Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Zazo C, de Naclares GP, Martínez F. Hypomethylation of the KCNQ1OT1 imprinting center of chromosome 11 associated to Sotos-like features. *J Hum Genet*. 2012;57(2):153-6. doi: 10.1038/jhg.2011.145.

Mayo S, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Orellana C, Martínez F. In Pursuit of New Imprinting Syndromes by Epimutation Screening in Idiopathic Neurodevelopmental Disorder Patients. *Biomed Res Int*. 2015a;2015a:341986. doi: 10.1155/2015/341986.

Mayo S, Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Armstrong J, Català V, Martínez F. De novo interstitial triplication of MECP2 in a girl with neurodevelopmental disorder and random X chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res*. 2011;135(2):93-101. doi: 10.1159/000330917.

Mayo S, Roselló M, Monfort S, Oltra S, Orellana C, Martínez F. Haploinsufficiency of MYT1L gene causes Intellectual Disability frequently associated to behavioral disorder. *Genet Med*. 2015b;17(8):683-4. doi: 10.1038/gim.2015.86.

McConkey R, Mulvany F, Barron S. Adult persons with intellectual disabilities on the island of Ireland. *J Intellect Disabil Res*. 2006;50(Pt 3):227-36.

McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11.2 Deletion Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

McLaren J, Bryson SE. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am J Ment Retard.* 1987;92(3):243-54.

Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev.* 2007;87(3):799-823.

Mehler MF. Epigenetics and the nervous system. *Ann Neurol.* 2008;64(6):602-17. doi: 10.1002/ana.21595.

Melas PA, Rogdaki M, Ösby U, Schalling M, Lavebratt C, Ekström TJ. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *FASEB J.* 2012;26(6):2712-8. doi: 10.1096/fj.11-202069.

Meyer E, Lim D, Pasha S, Tee LJ, Rahman F, Yates JR, Woods CG, Reik W, Maher ER. Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet.* 2009;5(3):e1000423. doi: 10.1371/journal.pgen.1000423.

Meyer KJ, Axelsen MS, Sheffield VC, Patil SR, Wassink TH. Germline mosaic transmission of a novel duplication of PXDN and MYT1L to two male half-siblings with autism. *Psychiatr Genet.* 2012;22(3):137-40. doi: 10.1097/YPG.0b013e32834dc3f5.

Milá M, Ramos F, Tejada MI; Grupo AEGH/CIBERER. Guía clínica de las patologías asociadas al Gen FMR1: Síndrome X Frágil, Insuficiencia Ovárica Primaria (FXPOI) y síndrome de Temblor Ataxia (FXTAS). *Med Clin (Barc).* 2014;142(5):219-25. doi: 10.1016/j.medcli.2013.05.025.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biasecker 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, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749-64. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006.

Moeschler JB, Shevell M; American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics.* 2006;117(6):2304-16.

Monfort S, Blesa D, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Cigudosa JC, Martínez F. Duplication of 14q11.2 associates with short stature and mild mental retardation: a putative relation with quantitative trait loci. *Am J Med Genet A.* 2007;143(4):382-4.

Monfort S. Aplicación de nuevas tecnologías para la detección de reordenamientos genómicos en pacientes con retraso del neurodesarrollo y

anomalías congénitas. Universidad de Valencia, departamento de Genética, programa de Genética Molecular y Evolución, Valencia, 2014. ISBN: 978-1321093308.

Moore T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.* 1991;7(2):45-9.

Morris MR, Astuti D, Maher ER. Perlman syndrome: overgrowth, Wilms tumor predisposition and DIS3L2. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013;163C(2):106-13. doi: 10.1002/ajmg.c.31358.

Mullegama SV, Rosenfeld JA, Orellana C, van Bon BW, Halbach S, Repnikova EA, Brick L, Li C, Dupuis L, Rosello M, Aradhya S, Stavropoulos DJ, Manickam K, Mitchell E, Hodge JC, Talkowski ME, Gusella JF, Keller K, Zonana J, Schwartz S, Pyatt RE, Waggoner DJ, Shaffer LG, Lin AE, de Vries BB, Mendoza-Londono R, Elsea SH. Reciprocal deletion and duplication at 2q23.1 indicates a role for MBD5 in autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):57-63. doi: 10.1038/ejhg.2013.67.

Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V, Polak P, Yoon S, Maguire J, Crawford EL, Campbell NG, Geller ET, Valladares O, Schafer C, Liu H, Zhao T, Cai G, Lihm J, Dannenfelser R, Jabado O, Peralta Z, Nagaswamy U, Muzny D, Reid JG, Newsham I, Wu Y, Lewis L, Han Y, Voight BF, Lim E, Rossin E, Kirby A, Flannick J, Fromer M, Shakir K, Fennell T, Garimella K, Banks E, Poplin R, Gabriel S, DePristo M, Wimbish JR, Boone BE, Levy SE, Betancur C, Sunyaev S, Boerwinkle E, Buxbaum JD, Cook EH Jr, Devlin B, Gibbs RA, Roeder K, Schellenberg GD, Sutcliffe JS, Daly MJ. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature.* 2012;485(7397):242-5. doi: 10.1038/nature11011.

Neilson DE, Adams MD, Orr CM, Schelling DK, Eiben RM, Kerr DS, Anderson J, Bassuk AG, Bye AM, Childs AM, Clarke A, Crow YJ, Di Rocco M, Dohna-Schwake C, Dueckers G, Fasano AE, Gika AD, Giannis D, Gorman MP, Grattan-Smith PJ, Hackenberg A, Kuster A, Lentschig MG, Lopez-Laso E, Marco EJ, Mastroianni S, Perrier J, Schmitt-Mechelke T, Servidei S, Skardoutsou A, Uldall P, van der Knaap MS, Goglin KC, Tefft DL, Aubin C, de Jager P, Hafler D, Warman ML. Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. *Am J Hum Genet.* 2009;84(1):44-51. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.12.009.

Neilson DE, Eiben RM, Waniewski S, Hoppel CL, Varnes ME, Bangert BA, Wiznitzer M, Warman ML, Kerr DS. Autosomal dominant acute necrotizing encephalopathy. *Neurology.* 2003;61(2):226-30.

Nimura K, Ura K, Shiratori H, Ikawa M, Okabe M, Schwartz RJ, Kaneda Y. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature.* 2009;460(7252):287-91. doi: 10.1038/nature08086.

Northrup H, Koenig MK, Au KS. Tuberous Sclerosis Complex. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Nothwang HG, Kim HG, Aoki J, Geisterfer M, Kübart S, Wegner RD, van Moers A, Ashworth LK, Haaf T, Bell J, Arai H, Tommerup N, Ropers HH, Wirth J. Functional

hemizyosity of PFAH1B3 due to a PFAH1B3-CLK2 fusion gene in a female with mental retardation, ataxia and atrophy of the brain. *Hum Mol Genet.* 2001;10(8):797-806.

Novara F, Simonati A, Sicca F, Battini R, Fiori S, Contaldo A, Criscuolo L, Zuffardi O, Ciccone R. MECP2 duplication phenotype in symptomatic females: report of three further cases. *Mol Cytogenet.* 2014;7(1):10. doi: 10.1186/1755-8166-7-10.

Novara F, Stanzial F, Rossi E, Benedicenti F, Inzana F, Di Gregorio E, Brusco A, Graakjaer J, Fagerberg C, Belligni E, Silengo M, Zuffardi O, Ciccone R. Defining the phenotype associated with microduplication reciprocal to Sotos syndrome microdeletion. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(8):2084-90. doi: 10.1002/ajmg.a.36591.

Okabe T, Nakamura T, Nishimura YN, Kohu K, Ohwada S, Morishita Y, Akiyama T. RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9920-7.

Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T. 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(6):1465-9. doi: 10.1002/ajmg.a.35910.

Oliveira J, Oliveira ME, Kress W, Taipa R, Pires MM, Hilbert P, Baxter P, Santos M, Buermans H, den Dunnen JT, Santos R. Expanding the MTM1 mutational spectrum: novel variants including the first multi-exonic duplication and development of a locus-specific database. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):540-9. doi: 10.1038/ejhg.2012.201.

Orellana C, Roselló M, Monfort S, Oltra S, Quiroga R, Ferrer I, Martínez F. Corpus callosum abnormalities and the controversy about the candidate genes located in 1q44. *Cytogenet Genome Res.* 2009;127(1):5-8. doi: 10.1159/000279261.

O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD, Turner EH, Stanaway IB, Vernot B, Malig M, Baker C, Reilly B, Akey JM, Borenstein E, Rieder MJ, Nickerson DA, Bernier R, Shendure J, Eichler EE. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature.* 2012;485(7397):246-50. doi: 10.1038/nature10989.

Palumbo O, Palumbo P, Delvecchio M, Palladino T, Stallone R, Crisetti M, Zelante L, Carella M. Microdeletion of 12q24.31: report of a girl with intellectual disability, stereotypies, seizures and facial dysmorphisms. *Am J Med Genet A.* 2015;167A(2):438-44. doi: 10.1002/ajmg.a.36872.

Parrish M, Ott T, Lance-Jones C, Schuetz G, Schwaeger-Nickolenko A, Monaghan AP. Loss of the Sall3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality. *Mol Cell Biol.* 2004;24(16):7102-12.

Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, Bergsagel PL, Wang L, You Z, Lou Z. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature.* 2011;470(7332):124-8. doi: 10.1038/nature09658.

Perez-Nanclares G, Romanelli V, Mayo S, Garin I, Zazo C, Fernandez-Rebollo E, Martínez F, Lapunzina P, de Nanclares GP; Spanish PHP Group. Detection of hypomethylation syndrome among patients with epigenetic alterations at the

GNAS locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):E1060-7. doi: 10.1210/jc.2012-1081.

Perlman SJ, Kulkarni S, Manwaring L, Shinawi M. Haploinsufficiency of ZNF238 is associated with corpus callosum abnormalities in 1q44 deletions. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(4):711-6. doi: 10.1002/ajmg.a.35779.

Peng W, Rozek LS, Mora-Plazas M, Duchin O, Marin C, Forero Y, Baylin A, Villamor E. Micronutrient status and global DNA methylation in school-age children. *Epigenetics.* 2012;7(10):1133-41. doi: 10.4161/epi.21915.

Philips AK, Sirén A, Avela K, Somer M, Peippo M, Ahvenainen M, Doagu F, Arvio M, Kääriäinen H, Van Esch H, Froyen G, Haas SA, Hu H, Kalscheuer VM, Järvelä I. X-exome sequencing in Finnish families with intellectual disability—four novel mutations and two novel syndromic phenotypes. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:49. doi: 10.1186/1750-1172-9-49.

Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell.* 2002;108(1):109-20.

Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Bryson SE, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chung BH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Cytrynbaum C, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green A, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizzi R, Kim C, Klauck SM, Kolevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ, McGrath J, McMahan WM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Pilorge M, Piven J, Ponting CP, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Sequeira AF, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stein O, Sykes N, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapduram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Webber C, Weksberg R, Wing K, Wittmeyer K, Wood S, Wu J, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Devlin B, Ennis S, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Hallmayer J, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI Jr, Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Scherer SW, Sutcliffe JS, Betancur C. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature.* 2010;466(7304):368-72. doi: 10.1038/nature09146.

Pogribny IP, Vanyushin BF. Age-related genomic hypomethylation. En: Tollefsbol TO, editor. *Epigenetics of Aging* (pp-11-28). London: Springer. 2010. ISBN: 978-1441906380.

Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*. 1999;24(4):1037-47.

Poole RL, Baple E, Crolla JA, Temple IK, Mackay DJ. Investigation of 90 patients referred for molecular cytogenetic analysis using aCGH uncovers previously unsuspected anomalies of imprinting. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(8):1990-3. doi: 10.1002/ajmg.a.33530.

Poole RL, Docherty LE, Al Sayegh A, Caliebe A, Turner C, Baple E, Wakeling E, Harrison L, Lehmann A, Temple IK, Mackay DJ; International Clinical Imprinting Consortium. Targeted methylation testing of a patient cohort broadens the epigenetic and clinical description of imprinting disorders. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(9):2174-82. doi: 10.1002/ajmg.a.36049.

Poot M. Connecting the CNTNAP2 Networks with Neurodevelopmental Disorders. *Mol Syndromol*. 2015;6(1):7-22. doi: 10.1159/000371594.

Qiao Y, Badduke C, Mercier E, Lewis SM, Pavlidis P, Rajcan-Separovic E. miRNA and miRNA target genes in copy number variations occurring in individuals with intellectual disability. *BMC Genomics*. 2013;14:544. doi: 10.1186/1471-2164-14-544.

Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-Wide Association Studies for common human diseases. *Nat Rev Genet*. 2011;12(8): 529–541.

Ramocki MB, Dowling J, Grinberg I, Kimonis VE, Cardoso C, Gross A, Chung J, Marfin CL, Ledbetter DH, Dobyns WB, Millen KJ. Reciprocal fusion transcripts of two novel Zn-finger genes in a female with absence of the corpus callosum, ocular colobomas and a balanced translocation between chromosomes 2p24 and 9q32. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(7):527-34.

Ratnakumar K, Bernstein E. ATRX: the case of a peculiar chromatin remodeler. *Epigenetics*. 2013;8(1):3-9. doi: 10.4161/epi.23271.

Raymond FL. Monogenic Causes of Mental Retardation. En Knight SJL, editor. *Genetics of Mental Retardation. Monographs in Human Genetics* (pp.89-100) Volumen 18. Oxford: Karger, 2010. ISBN: 978-3805592802

Real Academia de la Lengua Española. *Ortografía de la lengua española*. Madrid: Espasa, 2010. ISBN: 978-8467034264.

Rearden A. A new LIM protein containing an autoepitope homologous to "senescent cell antigen". *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201(3):1124-31.

Riggs AD, Martienssen RA, Russo VEA. Introduction. En: Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (eds). *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation* (pp. 1–4). New York: CSHL Press, 1996. ISBN 978-0879694906.

Rio M, Royer G, Gobin S, de Blois MC, Ozilou C, Bernheim A, Nizon M, Munnich A, Bonnefont JP, Romana S, Vekemans M, Turleau C, Malan V. Monozygotic twins discordant for submicroscopic chromosomal anomalies in 2p25.3 region detected by array CGH. *Clin Genet*. 2013;84(1):31-6. doi: 10.1111/cge.12036.

Roberts TC, Morris KV, Wood MJ. The role of long non-coding RNAs in neurodevelopment, brain function and neurological disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1652). pii: 20130507. doi: 10.1098/rstb.2013.0507.

Robles Bello MA. Incidencia y prevalencia del síndrome de Down. *Revista síndrome de Down*. 2007;24(93):68-70.

Rodenas-Cuadrado P, Ho J, Vernes SC. Shining a light on CNTNAP2: complex functions to complex disorders. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(2):171-8. doi: 10.1038/ejhg.2013.100.

Rodríguez-Revenga L, Vallespín E, Madrigal I, Palomares M, Mur A, García-Miñaur S, Santos F, Mori MÁ, Lapunzina P, Mila M, Nevado J. A parallel study of different array-CGH platforms in a set of Spanish patients with developmental delay and intellectual disability. *Gene*. 2013;521(1):82-6. doi: 10.1016/j.gene.2013.02.043.

Romm E, Nielsen JA, Kim JG, Hudson LD. Myt1 family recruits histone deacetylase to regulate neural transcription. *J Neurochem*. 2005;93(6):1444-53.

Roselló M, Martínez F, Monfort S, Mayo S, Oltra S, Orellana C. Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations. *Eur J Paediatr Neurol*. 2014;18(5):558-66. doi: 10.1016/j.ejpn.2014.04.010.

Roselló M, Monfort S, Orellana C, Ferrer-Bolufer I, Quiroga R, Oltra S, Martínez F. Submicroscopic duplication of the Wolf-Hirschhorn critical region with a 4p terminal deletion. *Cytogenet Genome Res*. 2009;125(2):103-8. doi: 10.1159/000227833.

Roselló MP. Características clínicas y relación genotipo-fenotipo en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y anomalías congénitas causados por reordenamientos genómicos. Universidad de Valencia, departamento de Bioquímica y Biología Molecular, programa de Biología Molecular y Genética, Valencia, 2014. ISBN: 978-1321093315.

Rusiecki JA, Baccarelli A, Bollati V, Tarantini L, Moore LE, Bonfeld-Jorgensen EC. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ Health Perspect*. 2008;116(11):1547-52. doi: 10.1289/ehp.11338.

Saal HM. Russell-Silver Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Sadakierska-Chudy A, Filip M. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs. *Neurotox Res*. 2015;27(2):172-97. doi: 10.1007/s12640-014-9508-6.

Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(6):437-47.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volumen 1. 3ª Ed. New York: CSHL Press, 2001. ISBN: 978-0879695774.

Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 2011;70(5):863-85. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.002.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.

Sanlaville D, Prieur M, de Blois MC, Genevieve D, Lapierre JM, Ozilou C, Picq M, Gosset P, Morichon-Delvallez N, Munnich A, Cormier-Daire V, Baujat G, Romana S, Vekemans M, Turleau C. Functional disomy of the Xq28 chromosome region. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(5):579-85.

Santen GW, Aten E, Sun Y, Almomani R, Gilissen C, Nielsen M, Kant SG, Snoeck IN, Peeters EA, Hilhorst-Hofstee Y, Wessels MW, den Hollander NS, Ruivenkamp CA, van Ommen GJ, Breuning MH, den Dunnen JT, van Haeringen A, Kriek M. Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*. 2012;44(4):379-80. doi: 10.1038/ng.2217.

Santen GW, Clayton-Smith J; ARID1B-CSS consortium. The ARID1B phenotype: what we have learned so far. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2014;166C(3):276-89. doi: 10.1002/ajmg.c.31414.

Sarajlija A, Kusic-Tepavcevic D, Nikolic Z, Savic Pavicevic D, Obradovic S, Djuric M, Pekmezovic T. Epidemiology of Rett Syndrome in Serbia: Prevalence, Incidence and Survival. *Neuroepidemiology*. 2015;44(1):1-5.

Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1412-7.

Schofield CM, Hsu R, Barker AJ, Gertz CC, Belloch R, Ullian EM. Monoallelic deletion of the microRNA biogenesis gene Dgcr8 produces deficits in the development of excitatory synaptic transmission in the prefrontal cortex. *Neural Dev*. 2011;6:11. doi: 10.1186/1749-8104-6-11.

Schuurs-Hoeijmakers JH, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE, van de Vondervoort II, van Bon BW, de Ligt J, Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Neveling K, del Rosario M, Hira G, Reitano S, Vitello A, Failla P, Greco D, Fichera M, Galesi O, Kleefstra T, Grealley MT, Ockeloen CW, Willemsen MH, Bongers EM, Janssen IM, Pfundt R, Veltman JA, Romano C, Willemsen MA, van Bokhoven H, Brunner HG, de Vries BB, de Brouwer AP. Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *J Med Genet*. 2013;50(12):802-11. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101644.

Scott Schwoerer J, Laffin J, Haun J, Raca G, Friez MJ, Giampietro PF. MECP2 duplication: possible cause of severe phenotype in females. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(4):1029-34. doi: 10.1002/ajmg.a.36380.

Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*. 2004;5(3):R13.

Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Michael M. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S.Karger, 2013. ISBN: 978-3318022537.

Shaw CJ, Lupski JR. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet*. 2005;116(1-2):1-7.

Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic yield of subspecialists' evaluation of young children with global developmental delay. *J Pediatr*. 2000;136(5):593-8.

Shikauchi Y, Saiura A, Kubo T, Niwa Y, Yamamoto J, Murase Y, Yoshikawa H. SALL3 interacts with DNMT3A and shows the ability to inhibit CpG island methylation in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol*. 2009;29(7):1944-58. doi: 10.1128/MCB.00840-08.

Shimabukuro M, Sasaki T, Imamura A, Tsujita T, Fuke C, Umekage T, Tochigi M, Hiramatsu K, Miyazaki T, Oda T, Sugimoto J, Jinno Y, Okazaki Y. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2007;41(12):1042-6.

Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev*. 2013;35(5):411-9. doi: 10.1016/j.braindev.2012.07.010.

Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, Pursley A, Clark G, Lee J, Proud M, Stocco A, Rodriguez DL, Kozel BA, Sparagana S, Roeder ER, McGrew SG, Kurczynski TW, Allison LJ, Amato S, Savage S, Patel A, Stankiewicz P, Beaudet AL, Cheung SW, Lupski JR. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet*. 2010;47(5):332-41. doi: 10.1136/jmg.2009.073015.

Shuman C, Beckwith JB, Smith AC, Weksberg R. Beckwith-Wiedemann Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Smolarek I, Wyszko E, Barciszewska AM, Nowak S, Gawronska I, Jablecka A, Barciszewska MZ. Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension. *Med Sci Monit*. 2010;16(3):CR149-155.

Sneppen K, Dodd IB. A simple histone code opens many paths to epigenetics. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(8):e1002643. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002643.

Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, Barañano K, McClellan R, Jamal L, Naidu S, Fatemi A. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol*. 2014;76(4):473-83. doi: 10.1002/ana.24251.

Stark KL, Xu B, Bagchi A, Lai WS, Liu H, Hsu R, Wan X, Pavlidis P, Mills AA, Karayiorgou M, Gogos JA. Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet*. 2008;40(6):751-60. doi: 10.1038/ng.138.

Stevens CA. Rubinstein-Taybi Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Stevens SJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Janssen JW, Klein Wassink-Ruiter JS, van Essen AJ, Dijkhuizen T, van Rheenen J, Heuts-Vijgen R, Stegmann AP, Smeets EE, Engelen JJ. MYT1L is a candidate gene for intellectual disability in patients with

2p25.3 (2pter) deletions. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(11):2739-45. doi: 10.1002/ajmg.a.34274.

Stevenson RE, Schwartz CE, Schroer RJ. X-linked mental retardation. New York: Oxford University Press, 2000. ISBN: 978-0195129816.

Stevenson RE. Alpha-Thalassemia X-Linked Intellectual Disability Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-5.

Sugiura N, Adams SM, Coriveau RA. An evolutionarily conserved N-terminal acetyltransferase complex associated with neuronal development. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40113-20.

Tang SS, Fernandez D, Lazarou LP, Singh R, Fallon P. MECP2 triplication in 3 brothers - a rarely described cause of familial neurological regression in boys. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012;16(2):209-12. doi: 10.1016/j.ejpn.2011.07.011.

Tassano E, Buttgerit J, Bader M, Lerone M, Divizia MT, Bocciardi R, Napoli F, Pala G, Sloan-Béna F, Gimelli S, Gimelli G. Genotype-Phenotype Correlation of 2q37 Deletions Including NPPC Gene Associated with Skeletal Malformations. *PLoS One*. 2013;8(6):e66048.

Tatton-Brown K, Cole TRP, Rahman N. Sotos Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet*. 1991;28:511-4.

Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*. 2012;44(4):376-8. doi: 10.1038/ng.2219.

Tucker T, Zahir FR, Griffith M, Delaney A, Chai D, Tsang E, Lemyre E, Dobrzyniecka S, Marra M, Eydoux P, Langlois S, Hamdan FF, Michaud JL, Friedman JM. Single exon-resolution targeted chromosomal microarray analysis of known and candidate intellectual disability genes. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(6):792-800. doi: 10.1038/ejhg.2013.248.

Uliitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*. 2011;147(7):1537-50. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.055.

Vallespín E, Palomares Bralo M, Mori MÁ, Martín R, García-Miñaur S, Fernández L, de Torres ML, García-Santiago F, Mansilla E, Santos F, M-Montaño VE, Crespo MC, Marín S, Martínez-Glez V, Delicado A, Lapunzina P, Nevado J. Customized high resolution CGH-array for clinical diagnosis reveals additional genomic

imbalances in previous well-defined pathological samples. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(8):1950-60. doi: 10.1002/ajmg.a.35960.

Van Den Bossche MJ, Strazisar M, Cammaerts S, Liekens AM, Vandeweyer G, Depreeuw V, Mattheijssens M, Lenaerts AS, De Zutter S, De Rijk P, Sabbe B, Del-Favero J. Identification of rare copy number variants in high burden schizophrenia families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013;162B(3):273-82. doi: 10.1002/ajmg.b.32146

Van Esch H. MECP2 Duplication Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editores. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015*.

Van Esch H. MECP2 Duplication Syndrome. *Mol Syndromol*. 2012;2(3-5):128-136.

Van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM. Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet*. 2002;39(8):546-53.

Van Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JM, Koevoets C, Wanders RJ, Hennekam RC. Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study. *Am J Ment Retard*. 2005;110(4):253-67.

Vanlerberghe C, Petit F, Malan V, Vincent-Delorme C, Bouquillon S, Boute O, Holder-Espinasse M, Delobel B, Duban B, Vallee L, Cuisset JM, Lemaitre MP, Vantuyghem MC, Pigeyre M, Lanco-Dosen S, Plessis G, Gerard M, Decamp M, Mathieu M, Morin G, Jedraszak G, Bilan F, Gilbert-Dussardier B, Fauvert D, Roume J, Cormier-Daire V, Caumes R, Puechberty J, Genevieve D, Sarda P, Pinson L, Blanchet P, Lemeur N, Sheth F, Manouvrier-Hanu S, Andrieux J. 15q11.2 microdeletion (BP1-BP2) and developmental delay, behaviour issues, epilepsy and congenital heart disease: A series of 52 patients. *Eur J Med Genet*. 2015;58(3):140-7. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.01.002.

Varmuza S, Mann M. Genomic imprinting--defusing the ovarian time bomb. *Trends Genet*. 1994;10(4):118-23.

Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*. 2004;119(4):555-66.

Velasco E, Infante M, Durán M, Pérez-Cabornero L, Sanz DJ, Esteban-Cardenosa E, Miner C. Heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis for rapid mutation detection in large multiexon genes. *Nat Protoc*. 2007;2(1):237-46.

Verma RS, Babu A. *Human chromosomes: manual of basic techniques*. New York: Pergamon Press, 1989. ISBN: 978-0080357744.

Vernes SC, Newbury DF, Abrahams BS, Winchester L, Nicod J, Groszer M, Alarcón M, Oliver PL, Davies KE, Geschwind DH, Monaco AP, Fisher SE. A functional genetic link between distinct developmental language disorders. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2337-45. doi: 10.1056/NEJMoa0802828.

Vossaert L, Meert P, Scheerlinck E, Glibert P, Van Roy N, Heindryckx B, De Sutter P, Dhaenens M, Deforce D. Identification of histone H3 clipping activity in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 2014;13(1):123-34. doi: 10.1016/j.scr.2014.05.002.

Vrijenhoek T, Buizer-Voskamp JE, van der Stelt I, Strengman E; Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP) Consortium, Sabatti C, Geurts van Kessel A, Brunner HG, Ophoff RA, Veltman JA. Recurrent CNVs disrupt three candidate genes in schizophrenia patients. *Am J Hum Genet.* 2008;83(4):504-10. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.09.011.

Wada T, Sugie H, Fukushima Y, Saitoh S. Non-skewed X-inactivation may cause mental retardation in a female carrier of X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X): X-inactivation study of nine female carriers of ATR-X. *Am J Med Genet A.* 2005;138(1):18-20.

Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942;1:18-20.

Wang JC, Passage MB, Yen PH, Shapiro LJ, Mohandas TK. Uniparental heterodisomy for chromosome 14 in a phenotypically abnormal familial balanced 13/14 Robertsonian translocation carrier. *Am J Hum Genet.* 1991;48:1069-74.

Wang T, Zeng Z, Li T, Liu J, Li J, Li Y, Zhao Q, Wei Z, Wang Y, Li B, Feng G, He L, Shi Y. Common SNPs in myelin transcription factor 1-like (MYT1L): association with major depressive disorder in the Chinese Han population. *PLoS One.* 2010;5(10):e13662. doi: 10.1371/journal.pone.0013662.

Wang X, Falkner B, Zhu H, Shi H, Su S, Xu X, Sharma AK, Dong Y, Treiber F, Gutin B, Harshfield G, Snieder H. A genome-wide methylation study on essential hypertension in young African American males. *PLoS One.* 2013;8(1):e53938. doi: 10.1371/journal.pone.0053938.

Wax JR, Pinette MG, Smith R, Chard R, Carlin A. Second-trimester prenatal and prefrontal skin thickening - association with MECP2 triplication syndrome. *J Clin Ultrasound.* 2013;41(7):434-7. doi: 10.1002/jcu.22065.

West AE, Orlando V. Epigenetics in Brain Function. *Neuroscience.* 2014;264:1-218.

Willemsen MH, Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet.* 2014;85(2):101-10. doi: 10.1111/cge.12244

Willemsen MH, Vulto-van Silfhout AT, Nillesen WM, Wissink-Lindhout WM, van Bokhoven H, Philip N, Berry-Kravis EM, Kini U, van Ravenswaaij-Arts CM, Delle Chiaie B, Innes AM, Houge G, Kosonen T, Cremer K, Fannemel M, Stray-Pedersen A, Reardon W, Ignatius J, Lachlan K, Mircher C, Helderma van den Enden PT, Mastebroek M, Cohn-Hokke PE, Yntema HG, Drunat S, Kleefstra T. Update on Kleefstra Syndrome. *Mol Syndromol.* 2012;2(3-5):202-212.

Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, Berndt SI, Elliott AL, Jackson AU, Lamina C, Lettre G, Lim N, Lyon HN, McCarroll SA, Papadakis K, Qi L, Randall JC, Roccasecca RM, Sanna S, Scheet P, Weedon MN, Wheeler E, Zhao JH, Jacobs LC, Prokopenko I, Soranzo N, Tanaka T, Timpson NJ, Almgren P, Bennett A, Bergman RN, Bingham SA, Bonnycastle LL, Brown M, Burt NP, Chines P, Coin L, Collins FS, Connell JM, Cooper C, Smith GD, Dennison EM, Deodhar P,

Elliott P, Erdos MR, Estrada K, Evans DM, Gianniny L, Gieger C, Gillson CJ, Guiducci C, Hackett R, Hadley D, Hall AS, Havulinna AS, Hebebrand J, Hofman A, Isomaa B, Jacobs KB, Johnson T, Jousilahti P, Jovanovic Z, Khaw KT, Kraft P, Kuokkanen M, Kuusisto J, Laitinen J, Lakatta EG, Luan J, Luben RN, Mangino M, McArdle WL, Meitinger T, Mulas A, Munroe PB, Narisu N, Ness AR, Northstone K, O'Rahilly S, Purmann C, Rees MG, Ridderstråle M, Ring SM, Rivadeneira F, Ruukonen A, Sandhu MS, Saramies J, Scott LJ, Scuteri A, Silander K, Sims MA, Song K, Stephens J, Stevens S, Stringham HM, Tung YC, Valle TT, Van Duijn CM, Vimalaswaran KS, Vollenweider P, Waeber G, Wallace C, Watanabe RM, Waterworth DM, Watkins N; Wellcome Trust Case Control Consortium, Wittteman JC, Zeggini E, Zhai G, Zillikens MC, Altshuler D, Caulfield MJ, Chanoock SJ, Farooqi IS, Ferrucci L, Guralnik JM, Hattersley AT, Hu FB, Jarvelin MR, Laakso M, Mooser V, Ong KK, Ouwehand WH, Salomaa V, Samani NJ, Spector TD, Tuomi T, Tuomilehto J, Uda M, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Deloukas P, Frayling TM, Groop LC, Hayes RB, Hunter DJ, Mohlke KL, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, Wichmann HE, McCarthy MI, Boehnke M, Barroso I, Abecasis GR, Hirschhorn JN; Genetic Investigation of ANthropometric Traits Consortium. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet.* 2009;41(1):25-34. doi: 10.1038/ng.287.

Williams SR, Aldred MA, Der Kaloustian VM, Halal F, Gowans G, McLeod DR, Zondag S, Toriello HV, Magenis RE, Elsea SH. Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *Am J Hum Genet.* 2010;87(2):219-28. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.07.011.

Wilsker D, Patsialou A, Dallas PB, Moran E. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell Growth Differ.* 2002;13(3):95-106.

Wiśniowiecka-Kowalik B, Kastory-Bronowska M, Bartnik M, Derwińska K, Dymczak-Domini W, Szumbaraska D, Ziemka E, Szczałuba K, Sykulski M, Gambin T, Gambin A, Shaw CA, Mazurczak T, Obersztyn E, Bocian E, Stankiewicz P. Application of custom-designed oligonucleotide array CGH in 145 patients with autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(6):620-5. doi: 10.1038/ejhg.2012.219.

Wu C. Integrin-linked kinase and PINCH: partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 24):4485-9.

Wu C. The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1692(2-3):55-62.

Wu H, Coskun V, Tao J, Xie W, Ge W, Yoshikawa K, Li E, Zhang Y, Sun YE. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science.* 2010;329(5990):444-8. doi: 10.1126/science.1190485.

Wu H, Zeng H, Lam R, Tempel W, Amaya MF, Xu C, Dombrovski L, Qiu W, Wang Y, Min J. Structural and histone binding ability characterizations of human PWWP domains. *PLoS One.* 2011;6(6):e18919. doi: 10.1371/journal.pone.0018919.

Xie ZH, Bo SY, Zhang XT, Liu M, Zhang ZX, Yang XL, Ji SR, Yan H, Sui XL, Na X, Guo SH, Wu ZL. Sampling survey on intellectual disability in 0 approximately 6-year-old

children in China. *J Intellect Disabil Res.* 2008;52(12):1029-38. doi: 10.1111/j.1365-2788.2008.01048.x.

Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Panté N, Ohba T, Nishii K, Kuma K, Hayashida T, Miyata T, Aebi U, Fukui M, Nishimoto T. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature.* 1995;376(6536):184-8.

Zhao J, Goldberg J, Bremner JD, Vaccarino V. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. *Diabetes.* 2012;61(2):542-6. doi: 10.2337/db11-1048.

Zhou H, Hu H, Lai M. Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biol Cell.* 2010;102(12):645-55. doi: 10.1042/BC20100029.

Zhu ZZ, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, Yang AS, Vokonas P, Lissowska J, Fustinoni S, Pesatori AC, Bonzini M, Apostoli P, Costa G, Bertazzi PA, Chow WH, Schwartz J, Baccarelli A. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):126-39. doi: 10.1093/ije/dyq154.

Žilina O, Reimand T, Tammur P, Tillmann V, Kurg A, Õunap K. Patient with dup(5)(q35.2-q35.3) reciprocal to the common Sotos syndrome deletion and review of the literature. *Eur J Med Genet.* 2013;56(4):202-6. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.01.008.

Zweier C, de Jong EK, Zweier M, Orrico A, Ousager LB, Collins AL, Bijlsma EK, Oortveld MA, Ekici AB, Reis A, Schenck A, Rauch A. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in *Drosophila*. *Am J Hum Genet.* 2009;85(5):655-66. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.10.004.

Zweier C. Severe Intellectual Disability Associated with Recessive Defects in CNTNAP2 and NRXN1. *Mol Syndromol.* 2012;2(3-5):181-185.

*Al referir en el texto las distintas publicaciones online de GeneReviews, se ha decidido poner como año el de la última actualización consultada y no el de su creación.

*“Lo poco que he aprendido carece de valor,
comparado con lo que ignoro y no desespero en aprender.”
(René Descartes)*



Anexo I Hoja de recogida de datos clínicos y consentimiento informado.**Proyecto de investigación en trastornos del desarrollo**

Nombre..... Sexo varón mujer Fecha.....
 Fecha de nacimiento..... Edad..... Talla..... Peso.....
 Dirección.....
 Hospital de procedencia..... Médico solicitante.....
 Padre..... FN..... Teléfono.....
 Madre..... FN..... Teléfono.....

1. Gestación

Fecundación Natural Reproducción asistida: ICSI *otros*.....
 Amniocentesis /Biopsia corial no sí Resultado..... RCIU no sí
 Anomalías ecográficas..... Oligoamnios Hidramnios
 Semanas de gestación..... Parto: Natural Cesárea.....
 Incidencias.....

2. Datos pre/ neonatales

Talla nacimiento..... Peso nacimiento..... Perímetro craneal..... Apgar.....
 Hipotonía Hipertonía T. de succión T. de la alimentación
 Otros.....

3. Dismorfia cráneo-facial

Asimetría Hipertelorismo Hipotelorismo Hidrocefalia: tipo.....
 Fisura palpebrales: normal arriba abajo estrechas epicanthus *otros*.....
 Ojos: coloboma estrabismo conver. diver. *otros*.....
 Cejas: sinotridia rectas muy pobladas altas *otros*.....
 Orejas: Imp. baja rotadas dismórficas *otros*.....
 Mandíbula: micrognatia prognatismo retrognatia *otros*.....
 Nariz: raíz ancha puente hundido bulbosa larga/afilada.....
 Filtrum: corto largo plano fisura palatina labio leporino *otros*.....
 Boca: comisuras abajo labio sup. fino labios gruesos macroglosia *otros*.....
 Dientes: ausencia implantación anómala alteraciones esmalte *otros*.....
 Pelo: hipertricosis implantación baja ralo *otros*.....
 Cráneo: microcefalia macrocefalia craneosinostosis *otros*.....
 Otros.....

4. Anomalías congénitas

Desarrollo somático: normal anómalo *especificar percentil*: Peso..... Talla.....
 Manos: toscas almohadilladas braquidactilia Imp. baja pulgar.....
 Dedos: sindactilia..... clinodactilia braquidactilia aracnodactilia.....
 Corazón: soplo funcional CIA CIV ductus.....
 Alteraciones renales:..... Alteraciones esqueléticas:.....
 Alteraciones genitales:..... Alteraciones cutáneas:.....
 Otros.....

1

(continua en la pagina siguiente)

5. Hasgos neurologicos

- Retraso mental: leve moderado grave CI: Hipotonía Hipertonía
- Desarrollo motor: normal alterado Sost. Cef. Sedest. Deamb.
- Pot. Evoc. Audit. Sordera Cieguera trastornos del sueño
- TAC/RMN: fecha resultado
- convulsiones *especificar* EEG: fecha resultado
- Test neuropsicológicos realizados
- Retraso del lenguaje: 1ª palabras 1ª frases ausencia ecolalia
- comprensión verbal comprensión, expresión facial pobreza semántica/gramatical
- vocalización deficiente falta de gesticulación dificultad para encontrar la palabra adecuada
- uso del "tú" o el "él" para sustituir el "yo" respeta turno de palabra comprende lenguaje figurado
- mutismo selectivo sólo frases cortas (sin prosa)
- Estereotipias:** aleteo balanceo correr en círculos repetición frases *otras*
- Conducta** rutinas rituales apego objetos resistencia cambio fascinación partes de objetos
- evita la mirada no actividades grupo falta del conocimiento de otros agresividad
- indiferencia al afecto falta de empatía hiperactividad intereses restringidos
- Otros

6. Historia familiar

Consanguinidad tipo

Antecedentes de:

- | | | |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Trastornos mentales | <input type="checkbox"/> Abortos | <input type="checkbox"/> anomalías congénitas |
| <input type="checkbox"/> esquizofrenia | <input type="checkbox"/> TEA | <input type="checkbox"/> trastornos de conducta |
| <input type="checkbox"/> bipolar | <input type="checkbox"/> retraso mental | |
| <input type="checkbox"/> depresión | | |

Especificar

ÁRBOL FAMILIAR

Anexo II Casos control con alteración en algún gen implicado en la regulación epigenética.

Tabla 55: Listado de los casos con alteración en algún gen implicado en la regulación epigenética seleccionados como posibles controles positivos para los estudios de metilación.

Muestra	Síndrome	Alteración	Gen	Género	Edad(años)			
CGM1258	Rett	Mutación	<i>MECP2</i>	M	2			
CGM1297				M	3			
CGM2023				M	1			
EX655				M	6.9			
EX713				M	26			
EX787				M	23			
EX789				M	18 meses			
EX932				M	2			
EX951				M	13 meses			
EX982				M	3			
EX1029				M	39			
X2687				M	3			
CGM1330				Duplicación de <i>MECP2</i>	Duplicación		V	10
X841							V	6
CGM2040	Triplicación	M	7					
CGM478	CHARGE	Mutación	<i>CHD7</i>	M	1 mes			
XF2019		Duplicación		V	23 meses			
CGM1388	Kleefstra	Delección	<i>EHMT1</i>	V	4			
CGM1397				M	11			
CGM709	Rubinstein-Taybi	Delección	<i>CREBBP</i>	V	6			
CGM1930				M	2 meses			
CGM2616				-	Duplicación	M	1 mes	
CGM2143	Braquidactilia con DI	Delección	<i>HDAC4</i>	V	2.7			
XF2337				V	10			
XF2463				-	Duplicación	M	20 meses	
EX124 ¹	-	Duplicación		V	26			
EX125 ¹				V	23			
EX441	Coffin-Lowry	Mutación	<i>RPS6KA3</i>	V	28			
EX484 ²				V	11			
EX485 ²				V	11			
CGM858				V	4			
				EX153	V	14		
EX154	α-talasemia - DI ligado al X	Mutación	<i>ATRX</i>	V	11			
EX155				V	9			
X1702				-	Duplicación	V	2	
XF2761	-	Duplicación	<i>HUWE1</i>	V	6.2			

¹Hermanos

²Gemelos monovitelinos

Anexo III Diseño del array a la carta.

El diseño del array a la carta se ha ido modificando con el paso del tiempo, llegando a tener 4 versiones distintas. La estructura general en todos los casos es común, seleccionando grupos de sondas en función de las distintas regiones de interés (genes candidatos, genómicas, regiones promotoras, UCEs y miRNAs). Las distintas modificaciones que se han producido incluyen, tanto la incorporación de nuevas regiones candidatas, como la eliminación de regiones no deseadas o sondas que proporcionaban resultados no concluyentes o artefactuales.

Para el diseño del array a la carta, primero se realizó la selección de genes y regiones de interés. En las siguientes tablas se indican dichas regiones seleccionadas a lo largo de las distintas versiones.

Tabla 56: Genes seleccionados para el diseño del array a la carta en las distintas versiones (v1-4).

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>A2BP1</i>	Cp	16	6916	1-4
<i>ABAT</i>	CfA	16	8823	1-4
<i>ACTL6B*</i>	Cf	7	100247	1-4
<i>ADARB1</i>	Cp	21	46570	1-4
<i>ADNP2</i>	Cp	18	77883	1-4
<i>ADRB2</i>	CfA	5	148207	1-4
<i>AGAP1</i>	Cp	2	236718	2-4
<i>AHI1</i>	P	6	135712	2-4
<i>AKT3</i>	Cp	1	243837	1-4
<i>AMIGO2</i>	Cp	12	45758	3-4
<i>ANKRD11*</i>	Cp	16	89446	1-4
<i>ANKRD12*</i>	Cp	18	9211	1-4
<i>AP1S2</i>	P	X	15859	1-4
<i>APBA1</i>	Cf	9	72165	1-4
<i>ARHGAP15</i>	Cp	2	144206	1-4
<i>ARHGEF6</i>	P	X	135806	1-4
<i>ARID1B*</i>	Cp	6	157315	1-4
<i>ARID3B*</i>	Cp	15	74862	1-4
<i>ARSF</i>	Cp	X	3008	1-4
<i>ARX</i>	P	X	25028	1-4
<i>ASCC3</i>	Cp	6	101143	1-4
<i>ASTN2</i>	CfA	9	119682	1-4
<i>ATP6AP2</i>	P	X	40453	1-4
<i>ATP7A</i>	P	X	77236	1-4
<i>ATRX*</i>	P	X	76901	1-4
<i>AUTS2</i>	CfA	7	69661	1-4
<i>AVPR1A</i>	Cf	12	63543	2-4
<i>BCOR*</i>	P	X	39934	1-4
<i>BDNF</i>	Cf	11	27709	1-4
<i>BEGAIN</i>	Cp	14	101020	2-4
<i>BRWD3*</i>	P	X	79998	1-4
<i>BZRAP1</i>	CfA	17	56392	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>C3orf58</i>	P	3	143701	2-4
<i>CA6</i>	CfA	1	9021	1-4
<i>CACNA1C</i>	CfA	12	2485	1-4
<i>CACNA1D</i>	CfA	3	53688	1-4
<i>CACNA1F</i>	CfA	X	49076	1-4
<i>CACNA1G</i>	CfA	17	48671	1-4
<i>CACNA1H</i>	CfA	16	1238	1-4
<i>CADM1</i>	CfA	11	115210	1-4
<i>CADPS2</i>	CfA	7	122243	1-4
<i>CAMK2G</i>	Cf	10	75603	2-4
CASK	P	X	41578	1-4
<i>CBS</i>	CfA	21	44485	1-4
<i>CDH10</i>	Cp	5	24566	2-4
CDH18	Cp	5	20025	1-4
<i>CDH2</i>	Cf	18	23898	3-4
<i>CDH6</i>	Cp	5	31260	1-4
<i>CDH9</i>	Cp	5	26960	2-4
CDKL5	P	X	18558	1-4
<i>CEBPA</i>	Cf	19	33792	1-4
<i>CEBPB</i>	Cf	20	48808	1-4
CHD5*	Cp	1	6201	1-4
CHD6*	Cp	20	40139	1-4
CHD7*	P	8	61685	1-4
CHD8*	Cp	14	21879	1-4
<i>CHMP1B</i>	Cf	18	11853	1-4
<i>CHN1</i>	P	2	175767	2-4
<i>CHRNA7</i>	Cp	15	32392	2-4
CLIP2	P	7	73762	1
<i>CLN8</i>	Cf	8	1723	1-4
<i>CLOCK*</i>	Cf	4	56356	4
<i>CNR1</i>	CfA	6	88852	1-4
CNTN4	P	3	2621	1-4
<i>CNTNAP2</i>	Cf	7	146966	1-4
<i>CRABP1</i>	Cp	15	78637	1-4
<i>CREB1</i>	Cf	2	208432	1-4
CREBBP*	P	16	3853	1-4
<i>CSMD1</i>	Cf	8	3823	1-4
CTCF*	Cf	16	67635	1-4
CTNND2	Cp	5	11438	1-4
<i>CTXN1</i>	Cf	19	7990	1-4
CUL4B*	P	X	119684	1-4
<i>CXorf36</i>	Cp	X	45034	4
<i>DAB1</i>	Cf	1	58238	1-4
<i>DAPK1</i>	CfA	9	90218	1-4
<i>DCDC2</i>	Cf	6	24278	1-4
DCX	P	X	110596	1-4
<i>DDX11</i>	CfA	12	31242	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>DDX17</i>	Cp	22	38891	1-4
<i>DGCR8*</i>	Cp	22	20084	2-4
<i>DHCR7</i>	P	11	71152	2-4
<i>DISC1</i>	Cp	1	231970	2-4
<i>DLG1</i>	Cp	3	196897	1-4
<i>DLG2</i>	Cp	11	83900	1-4
<i>DLG3</i>	P	X	69695	1-4
<i>DLG4</i>	Cf	17	7108	2-4
<i>DLGAP2</i>	CfA	8	1553	1
<i>DLK1</i>	Cf	14	101197	1-4
<i>DLX1</i>	Cp	2	172952	2-4
<i>DLX2</i>	Cp	2	172966	2-4
<i>DNAJC2*</i>	Cf	7	102969	2-4
<i>DNER</i>	Cf	2	230401	1-4
<i>DNM3</i>	Cp	1	172096	1-4
<i>DNMT1*</i>	Cf	19	10275	1-4
<i>DNMT3A*</i>	Cf	2	25511	1-4
<i>DNMT3B*</i>	Cf	20	31374	1-4
<i>DNMT3L*</i>	Cf	21	45674	1-4
<i>DPP10</i>	CfA	2	116261	1-4
<i>DPP6</i>	CfA	7	154135	1-4
<i>DRD1</i>	Cf	5	174869	2-4
<i>DRD2</i>	Cf	11	113313	2-4
<i>DRD3</i>	CfA	3	113873	1-4
<i>DRD4</i>	Cf	11	639	2-4
<i>DSCAM</i>	Cf	21	41802	1-4
<i>DVL1</i>	Cp	1	1278	1-4
<i>DYRK1A</i>	Cp	21	38839	1-4
<i>EBP</i>	P	X	48384	1-4
<i>EEF2</i>	Cp	19	3981	1-4
<i>EEF2K</i>	Cp	16	22259	1-4
<i>EHMT1*</i>	P	9	140622	1-4
<i>EHMT2*</i>	Cf	6	31857	4
<i>EIF4E</i>	Cf	4	99826	1-4
<i>ELP4*</i>	Cf	11	31625	3-4
<i>EMID2</i>	Cp	7	101104	1-4
<i>EN2</i>	CfA	7	155254	1-4
<i>EP300*</i>	P	22	41532	2-4
<i>EPC2*</i>	Cp	2	149474	1-4
<i>EPHA7</i>	Cp	6	94040	1-4
<i>EYA1*</i>	P	8	72355	3-4
<i>EZH2*</i>	P	7	148543	4
<i>FAM58A</i>	P	X	152512	3-4
<i>FANCL</i>	Cp	2	58427	1-4
<i>FBXO40</i>	CfA	3	121331	1-4
<i>FGD1</i>	P	X	54497	1-4
<i>FHIT</i>	Cp	3	60486	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
FLNA	P	X	153590	1-4
<i>FLYWCH2</i>	Cp	16	2941	1-4
<i>FMR1*</i>	P	X	147013	1-4
<i>FOXG1</i>	Cf	14	29238	1-4
<i>FOXP1</i>	P	3	71319	2-4
FOXP2	Cf	7	114193	1-4
FTSJ1	P	X	48340	1-4
<i>GABRA4</i>	CfA	4	46958	1-4
<i>GABRB1</i>	CfA	4	47231	1-4
<i>GABRB3</i>	CfA	15	26903	1-4
<i>GABRD</i>	Cp	1	1956	1-4
<i>GALNT13</i>	CfA	2	155019	1-4
<i>GAN</i>	Cf	16	81381	1-4
<i>GNAS</i>	CfA	20	57451	1
<i>GPC1</i>	Cp	2	241391	1-4
GPC3	P	X	132895	1-4
<i>GPR6</i>	Cf	6	110301	1-4
<i>GRIA2</i>	Cf	4	158214	2-4
<i>GRIK1</i>	Cf	21	31111	1-4
GRIK2	Cp	6	102182	1-4
<i>GRIN1</i>	Cf	9	140048	2-4
<i>GRIN2A</i>	CfA	16	10066	1-4
<i>GRIN2B</i>	Cf	12	13924	2-4
<i>GRM3</i>	Cf	7	86384	2-4
<i>GRM5</i>	Cf	11	88517	2-4
<i>GRM7</i>	Cf	3	7343	2-4
<i>GRM8</i>	CfA	7	126481	1-4
GRPR	Cp	X	16157	1-4
<i>GRTP1</i>	Cp	13	113998	1-4
GTF2I	P	7	74124	1-4
<i>GTF2IRD1</i>	Cp	7	73943	2-4
HBII-85	P	15	25324	1
HCCS	P	X	11135	1-4
<i>HDAC1*</i>	Cf	1	32778	2-4
<i>HDAC10*</i>	Cf	22	50687	2-4
<i>HDAC11*</i>	Cf	3	13535	2-4
HDAC2*	Cf	6	114275	1-4
<i>HDAC3*</i>	Cf	5	141008	2-4
<i>HDAC4*</i>	P	2	240146	2-4
<i>HDAC5*</i>	Cf	17	42178	2-4
<i>HDAC6*</i>	Cf	X	48672	2-4
<i>HDAC7*</i>	Cf	12	48185	2-4
<i>HDAC8*</i>	Cf	X	71671	2-4
<i>HDAC9*</i>	Cf	7	18786	2-4
HESX1	P	3	57233	1-4
<i>HIP1</i>	P	7	75266	2-4
<i>HNRNPU</i>	Cp	1	245021	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>HOXA1</i>	CfA	7	27134	1-4
<i>HOXA2</i>	Cf	7	27141	1-4
<i>HOXB1</i>	CfA	17	46608	1-4
<i>HOXB2</i>	Cf	17	46621	1-4
<i>HPRT1</i>	P	X	133614	1-4
<i>HRAS</i>	CfA	11	534	1-4
<i>HSD17B10</i>	P	X	53460	1-4
<i>HTR1B</i>	CfA	6	78173	1-4
<i>HTR2A</i>	CfA	13	47439	1-4
<i>HTR3A</i>	CfA	11	113853	1-4
<i>HTR3C</i>	CfA	3	183775	1-4
<i>HTR7</i>	CfA	10	92559	1-4
<i>HTT</i>	Cf	4	3161	1-4
<i>HUWE1*</i>	P	X	53636	1-4
<i>ID1</i>	Cp	20	30194	1-4
<i>IGBP1</i>	P	X	69370	1-4
<i>IL1RAPL1</i>	P	X	29290	1-4
<i>IMMP2L</i>	CfA	7	110753	1-4
<i>IPW</i>	Cp	15	25365	2-4
<i>ISL1</i>	Cf	5	50685	1-4
<i>ITGA4</i>	Cf	2	182362	2-4
<i>ITGAX</i>	Cf	16	31380	1-4
<i>ITGB1</i>	Cf	10	33218	1-4
<i>ITGB3</i>	Cf	17	45361	2-4
<i>JAG1</i>	P	20	10585	3-4
<i>JARID2*</i>	Cp	6	15384	4
<i>JMJD1C*</i>	CfA	10	65076	1-4
<i>KAT6B*</i>	Cp	10	76690	4
<i>KCNK9</i>	P	8	140739	3-4
<i>KCNMA1</i>	CfA	10	79013	1-4
<i>KCTD7</i>	Cp	7	66100	1-4
<i>KDM2B*</i>	Cf	12	121943	4
<i>KDM4B*</i>	Cp	19	5061	1-4
<i>KDM5B*</i>	Cf	1	202737	2-4
<i>KDM5C*</i>	P	X	53238	1-4
<i>KDM6A*</i>	P	X	44852	4
<i>KDM8*</i>	Cp	16	27224	1-4
<i>KIAA0319</i>	Cf	6	24595	1-4
<i>KIAA1586</i>	CfA	6	56916	1-4
<i>KIF1A</i>	Cf	2	241706	1
<i>KIF7</i>	P	15	87986	3-4
<i>KMT2D*</i>	P	12	49431	2-4
<i>KNTC1</i>	Cp	12	123061	1
<i>L1CAM</i>	P	X	153134	1-4
<i>L3MBTL</i>	Cp	20	42157	1-4
<i>LAMP2</i>	P	X	119582	1-4
<i>LARP6</i>	Cp	15	71135	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>LHX4</i>	Cf	1	180222	1-4
LIMK1	P	7	73517	1
<i>LIMS1</i>	Cp	2	109226	1-4
<i>LIN7A</i>	Cf	12	81261	1-4
<i>LIX1</i>	Cf	5	96453	1-4
<i>LMX1A</i>	Cf	1	165248	1-4
<i>LOC646196</i>	Cp	2	26519	1
<i>LRFN5</i>	Cp	14	41295	3-4
<i>LRRC49</i>	Cp	15	71264	1-4
<i>LYNX1</i>	Cp	8	143859	1-4
<i>MACROD2</i>	P	20	15005	4
<i>MAGEL2</i>	Cp	15	23890	4
MAOA	P	X	43561	1-4
MAOB	P	X	43684	1-4
<i>MAP2</i>	CfA	2	210522	1-4
MAP2K2	Cp	19	4107	1-4
<i>MAP2K3</i>	Cp	17	21203	1-4
<i>MAPRE3</i>	Cp	2	27222	1-4
MAP1	P	17	44039	1-4
<i>MARCKS</i>	Cf	6	114182	1-4
<i>MARK1</i>	CfA	1	220770	1-4
<i>MATK</i>	Cp	19	3782	1-4
MBD1*	Cf	18	47802	1-4
<i>MBD3*</i>	CfA	19	1585	1-4
<i>MBD4*</i>	CfA	3	129154	1-4
MBD5*	P	2	149025	1-4
<i>MBTPS2</i>	P	x	21881	4
<i>MCPH1</i>	CfA	8	6385	1-4
<i>MDGA2</i>	CfA	14	47726	1-4
MECP2*	P	X	153325	1-4
MED12*	P	X	70350	1-4
MEF2C	P	5	88098	1-4
MEG3*	Cf	14	101310	1-4
MID1	P	X	10501	1-4
<i>MKRN3</i>	Cp	15	23812	4
<i>MSRB2</i>	Cp	10	23398	1-4
<i>MSX1</i>	Cf	4	4864	1-4
<i>MTF1*</i>	CfA	1	38300	1-4
<i>MTOR</i>	Cf	1	11245	1-4
<i>MYT1*</i>	Cf	20	62828	1-4
MYT1L*	Cp	2	2064	1-4
<i>NAV2</i>	Cf	11	19939	1-4
NBEA	Cf	13	35882	1-4
<i>NCAM2</i>	Cp	21	22641	1-4
<i>NCBP2</i>	Cp	3	196666	1-4
NDE1	Cp	16	15779	1-4
<i>NDN</i>	Cp	15	23932	2-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>NDNL2</i>	CfA	15	29561	1-4
<i>NEFH</i>	Cf	22	29882	1-4
<i>NENF</i>	Cf	1	212618	1-4
<i>NFIX</i>	P	19	13158	2-4
<i>NGF</i>	Cf	1	115855	1-4
<i>NHS</i>	P	X	17574	1
<i>NIPBL*</i>	P	5	36971	2-4
<i>NKAIN2</i>	Cp	6	124636	1-4
<i>NLGN1</i>	CfA	3	173559	1-4
<i>NLGN3</i>	P	X	70378	1-4
<i>NLGN4X</i>	P	X	5977	1-4
<i>NLRP2*</i>	P	19	55495	1-4
<i>NLRP7*</i>	P	19	55447	1-4
<i>NNAT</i>	Cf	20	36151	1-4
<i>NOTCH1</i>	Cf	9	139415	1-4
<i>NPAS2</i>	CfA	2	101525	1-4
<i>NRCAM</i>	CfA	7	107942	1-4
<i>NRG1</i>	Cf	8	32514	1-4
<i>NRG4</i>	Cp	15	76270	1-4
<i>NRP1</i>	Cf	10	33545	1-4
<i>NRP2</i>	CfA	2	206605	1-4
<i>NRXN1</i>	Cf	2	50703	1-4
<i>NSD1*</i>	P	5	176644	1-4
<i>NTAN1</i>	Cp	16	15141	1-4
<i>NTF3</i>	Cf	12	5573	1-4
<i>NTM</i>	Cp	11	131724	2-4
<i>NTN1</i>	Cf	17	9036	1-4
<i>NTN4</i>	Cf	12	96118	1-4
<i>NTNG1</i>	CfA	1	107854	1-4
<i>NTRK1</i>	CfA	1	156841	1-4
<i>NTRK2</i>	Cf	9	87461	2-4
<i>NTRK3</i>	CfA	15	88610	1-4
<i>NXF5</i>	P	X	101100	1-4
<i>OCRL</i>	P	X	128700	1-4
<i>OFD1</i>	P	X	13770	1-4
<i>OLIG1</i>	Cf	21	34444	1-4
<i>OPHN1</i>	P	X	67458	1-4
<i>OPRM1</i>	CfA	6	154388	1-4
<i>OXR</i>	CfA	3	8802	1-4
<i>PAFAH1B1</i>	P	17	2543	1-4
<i>PAK1</i>	Cp	11	77109	1-4
<i>PAK2*</i>	Cp	3	196513	1-4
<i>PAK3</i>	P	X	110402	1-4
<i>PAR1</i>	Cp	15	25382	2-4
<i>PARD6G</i>	Cp	18	77960	1-4
<i>PARK2</i>	CfA	6	162459	1-4
<i>PCDH10</i>	CfA	4	134092	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>PCDH9</i>	CfA	13	67341	1-4
<i>PDHA1</i>	P	X	19371	1-4
<i>PER1*</i>	CfA	17	8050	1-4
<i>PGK1</i>	P	X	77371	1-4
<i>PHF21A*</i>	Cf	11	46047	2-4
<i>PHF6</i>	P	X	133535	1-4
<i>PHF8*</i>	P	X	54017	1-4
<i>PITX1</i>	CfA	5	134367	1-4
<i>PLEKHG5</i>	Cf	1	6553	1-4
<i>PLN</i>	CfA	6	118876	1-4
<i>POMC</i>	Cf	2	25388	1-4
<i>PON1</i>	CfA	7	94940	1-4
<i>PQBP1</i>	P	X	48758	1-4
<i>PRKG2</i>	Cp	4	82073	2-4
<i>PRPS1</i>	P	X	106883	1-4
<i>PTCH1</i>	Cp	9	98242	2-4
<i>PTCHD1</i>	CfA	X	23384	1-4
<i>PTEN</i>	P	10	89676	1-4
<i>PTF1A</i>	Cp	10	23482	1-4
<i>PTPRN2</i>	Cp	7	157856	2-4
<i>PTPRT</i>	Cp	20	41260	1-4
<i>RAB39B</i>	P	X	154491	1-4
<i>RAB3A</i>	Cp	19	18311	1-4
<i>RAI1*</i>	P	17	17650	1-4
<i>RANBP2</i>	Cp	2	109369	1-4
<i>RAPGEF4</i>	CfA	2	173759	1-4
<i>RASGEF1B</i>	Cp	4	82371	2-4
<i>RB1CC1</i>	CfA	8	53581	1-4
<i>RELN</i>	P	7	103371	1-4
<i>REST*</i>	Cf	4	57786	1-4
<i>RFWD2</i>	CfA	1	176045	1-4
<i>RGS11</i>	Cf	16	322	1-4
<i>RGS6</i>	Cf	14	72717	1-4
<i>RGS7</i>	Cf	1	241230	1-4
<i>RGS9</i>	Cf	17	63179	1-4
<i>RHOF</i>	Cp	12	122224	1-4
<i>RICS</i>	Cf	11	128949	1-4
<i>RIMS3</i>	CfA	1	41109	1-4
<i>RNF2*</i>	Cf	1	185043	2-4
<i>ROBO1</i>	CfA	3	79143	1-4
<i>RPA1</i>	Cp	17	1768	4
<i>RPL10</i>	CfA	X	153629	1-4
<i>RPS6KA2</i>	CfA	6	167049	1-4
<i>RPS6KA3*</i>	P	X	20226	1-4
<i>RPS6KA6</i>	Cp	X	83381	4
<i>SALL1*</i>	P	16	51178	1-4
<i>SALL4*</i>	P	20	50410	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
<i>SCN1A</i>	CfA	2	166888	1-4
<i>SCN2A</i>	CfA	2	166201	1-4
<i>SDC3</i>	Cf	1	31362	1-4
<i>SEMA3E</i>	P	7	83136	4
<i>SEMA4C</i>	Cf	2	97531	1-4
<i>SEMA5A</i>	CfA	5	9291	1-4
<i>SERPINA7</i>	P	X	105280	1-4
<i>SERPINI1</i>	Cf	3	167498	1-4
<i>SEZ6L2</i>	CfA	16	29897	1-4
<i>SH3BGRL2</i>	Cp	6	80377	1-4
<i>SHANK2</i>	Cp	11	70411	2-4
<i>SHANK3</i>	P	22	51142	1-4
<i>SHH</i>	Cf	7	155600	1-4
<i>SHROOM4</i>	P	X	50446	1-4
<i>SIM1</i>	Cp	6	100875	1-4
<i>SIM2</i>	P	21	38097	1-4
<i>SIN3A*</i>	Cf	15	75704	4
<i>SIN3B*</i>	Cf	19	16966	1-4
<i>SLC16A2</i>	P	X	73697	1-4
<i>SLC25A12</i>	CfA	2	172696	1-4
<i>SLC4A10</i>	Cp	2	162661	1-4
<i>SLC4A4</i>	Cp	4	72245	1-4
<i>SLC6A3</i>	Cf	5	1419	1-4
<i>SLC6A4</i>	Cf	17	28543	1-4
<i>SLC6A8</i>	P	X	152958	1-4
<i>SLC9A6</i>	Cp	X	135099	1-4
<i>SLC9A9</i>	CfA	3	143276	1-4
<i>SLITRK1</i>	P	13	84454	2-4
<i>SMC1A*</i>	P	X	53425	1-4
<i>SMC3</i>	P	10	112346	2-4
<i>SMS</i>	P	X	21986	1-4
<i>SOX10</i>	Cp	22	38374	1-4
<i>SOX2</i>	P	3	181431	4
<i>SOX3</i>	P	X	139586	1-4
<i>SP1*</i>	Cf	12	53792	1-4
<i>SP5</i>	Cp	2	171573	1-4
<i>SPEN</i>	Cf	1	16221	2-4
<i>STAG2</i>	Cf	X	123165	2-4
<i>STK24</i>	Cp	13	99166	1-4
<i>STMN2</i>	Cf	8	80550	1-4
<i>STX1A</i>	Cp	7	73124	4
<i>STXBP1</i>	P	9	130415	1-4
<i>SUCLG2</i>	CfA	3	67565	1-4
<i>SUPT16H</i>	Cp	14	21836	1-4
<i>SYCP1</i>	Cf	1	115468	1-4
<i>SYN1</i>	P	X	47455	1-4
<i>SYN2</i>	Cf	3	12137	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
SYNGAP1	P	6	33405	1-4
SYP	P	X	49050	1-4
<i>TBL1XR1*</i>	Cp	3	176827	1-4
TBX1	P	22	19750	1-4
<i>TBXA2R</i>	Cp	19	3601	1-4
TCF4	P	18	53096	1-4
TDRD9*	Cp	14	104457	1-4
<i>TGFBR1</i>	Cp	9	101892	1
<i>THAP10</i>	Cp	15	71179	1-4
TIMM8A	P	X	100602	1-4
<i>TLE3</i>	Cp	15	70365	1-4
<i>TMEM195</i>	Cp	7	15421	1-4
TMOD2	Cf	15	52076	1-4
<i>TNFRSF19</i>	Cf	13	24202	1-4
TRAPPC9	P	8	141106	1-4
TRDMT1*	Cf	10	17214	1-4
<i>TRIM45</i>	Cp	1	117659	1-4
<i>TSC1</i>	P	9	135793	2-4
<i>TSC2</i>	P	16	2118	2-4
TSPAN7	P	X	38484	1-4
<i>UBAC2</i>	Cp	13	99946	1-4
<i>UBE2A*</i>	P	X	118716	1-4
<i>UBE2H</i>	CfA	7	129533	1-4
UBE3A	P	15	25633	1-4
<i>UNC5A</i>	Cf	5	176273	1-4
UPF3B	P	X	118977	1-4
<i>USP9X</i>	Cp	X	41020	1-4
<i>VAMP4</i>	Cp	1	171692	1-4
<i>WAC*</i>	Cp	10	28867	4
<i>WDR66</i>	Cp	12	122399	2-4
<i>WDR7</i>	Cp	18	52659	3-4
<i>WDR8</i>	Cp	1	3557	1-4
<i>WHSC1*</i>	Cp	4	1929	1-4
<i>WHSC1L1*</i>	Cf	8	38186	4
<i>WHSC2</i>	Cp	4	1998	1-4
<i>WSB1</i>	Cp	17	25631	1-4
<i>YWHAH</i>	Cf	22	32347	2-4
<i>ZBTB18*</i>	Cp	1	244219	1-4
<i>ZBTB20</i>	Cp	3	114424	4
<i>ZCCHC8</i>	Cp	12	122971	1
<i>ZDHHC14</i>	Cp	6	157949	1-4
ZDHHC15	P	X	74666	1-4
ZDHHC9	P	X	128959	1-4
ZEB2	P	2	145212	1-4
<i>ZFHX4</i>	Cp	8	77687	4
<i>ZNF347</i>	Cp	19	53652	1-4
ZNF385B	Cp	2	180516	1-4

Gen	Categoría	Cromosoma	Posición (Kb, Hg19)	Versión del array
ZNF41	P	X	47324	1-4
ZNF551	Cp	19	58197	1-4
ZNF674	P	X	46381	1-4
ZNF711	P	X	84514	1-4
ZNF721	Cp	4	464	1-4
ZNF778	Cp	16	89290	1-4
ZNF804A	Cp	2	185634	2-4
ZNF81	Cp	X	47739	4
ZSCAN4	Cp	19	58185	1-4

*Genes clasificados como epigenéticos en base a su función.

Negrita: genes de alta prioridad para el diseño de la versión1 (genes patológicos y candidatos funcionales y posicionales de alta prioridad).

Cf: Candidato funcional; CfA: candidato funcional asociado a Autismo; Cp: Candidato posicional; P: candidato patológico.

Tabla 57: Genes clasificados como de baja prioridad en la v4 del array de diseño propio.

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
ABCF1	ASH1L	BCCIP	C11orf30	CCDC101
ABL1	ASH2L	BCL2	C14orf169	CCL1
ACTB	ASMT	BCL2L1	C17orf49	CCL11
AEBP2	ASXL1	BCL6	C17orf79	CCL13
AHR	ASXL2	BCORL1	C20orf20	CCL15
AIFM1	ASXL3	BCR	C20orf7	CCL16
AIMP1	ASZ1	BHLHE41	C3	CCL17
AKT1	ATF1	BHMT	C4A	CCL18
ALKBH8	ATF2	BIRC5	C5	CCL19
ALX1	ATF3	BMI1	CABIN1	CCL2
ALX4	ATF4	BMP2	CACNA1A	CCL20
ANAPC2	ATF7IP	BPTF	CACNA1B	CCL21
ANAPC4	ATM	BRCA1	CACNA1E	CCL23
ANKRA2	ATR	BRCA2	CACNA1I	CCL24
ANKRD1	ATXN3	BRCC3	CACNA1S	CCL25
ANKRD17	ATXN7L3	BRD1	CAMTA2	CCL26
ANXA5	AURKA	BRD2	CARD18	CCL3
APBB1	AURKB	BRD3	CARM1	CCL4
APC	AURKC	BRD4	CASP1	CCL5
APEX1	BABAM1	BRD7	CASP10	CCL7
APEX2	BAG6	BRD8	CASP8	CCL8
APPL1	BAHD1	BRDT	CAT	CCNB1
APPL2	BANP	BRE	CBX1	CCNB2
ARID1A	BAP1	BRIP1	CBX2	CCNC
ARID2	BARX1	BRPF1	CBX3	CCND1
ARNT	BAX	BRPF3	CBX4	CCND2
ARRB1	BAZ1A	BRWD1	CBX5	CCNE1
AS3MT	BAZ1B	BTG1	CBX6	CCNF
ASF1A	BAZ2A	BTG2	CBX7	CCNG1
ASF1B	BAZ2B	C10orf90	CBX8	CCNG2

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
CCNH	CHD9	CYP2E1	ENY2	FTSJ2
CCNO	CHEK1	CYP7A1	EP400	FTSJ3
CCNT1	CHEK2	DACH1	EPAS1	FTSJD2
CCNT2	CHST11	DAPK3	EPC1	G0S2
CCR1	CIB1	DDB1	EPHA4	GADD45A
CCR2	CIDEA	DDB2	EPHB3	GADD45G
CCR3	CIITA	DDIT3	EPHX2	GAS6
CCR4	CIR1	DDX5	ERBB2	GATA1
CCR5	CKS1B	DDX53	ERCC1	GATA2
CCR6	CKS2	DEK	ERCC2	GATA3
CCR7	COPS2	DGAT2	ERCC3	GATA4
CCR8	COQ3	DHH	ERCC4	GATA6
CCR9	COQ5	DIRAS3	ERCC5	GATAD2A
CD40LG	CRP	DKK1	ERCC6	GDF15
CDC16	CRY1	DKK2	ERCC8	GF1B
CDC20	CRYAB	DLX3	ESCO1	GLI2
CDC34	CSF2	DLX4	ESCO2	GLI3
CDC42EP1	CSNK2A1	DLX5	ESR1	GML
CDC73	CSRP2BP	DLX6	ESR2	GMNN
CDH1	CTBP1	DMAP1	ESRRA	GNAS
CDH11	CTBP2	DMBX1	ESRRB	GPX1
CDH13	CTCFL	DMC1	ESRRG	GSG2
CDK1	CTNNB1	DNAJA1	ESX1	GSK3A
CDK2	CTR9	DNAJB4	ETF1	GSPT1
CDK4	CTSA	DNM2	ETS1	GSR
CDK5R1	CUL1	DOT1L	ETS2	GSTM3
CDK5RAP1	CUL2	DPF3	EXO1	GTF2B
CDK6	CUL3	DPY30	EYA2	GTF2F1
CDK7	CUX1	DPYD	EYA3	GTF2H1
CDK8	CX3CR1	DR1	EYA4	GTF2H2
CDKN1A	CXCL1	DRGX	EZH1	GTF3C4
CDKN1B	CXCL10	DTX3L	FAM175A	GTSE1
CDKN2A	CXCL11	DZIP3	FAM48A	H2AFY
CDKN2B	CXCL12	E2F1	FAM65A	H2AFY2
CDKN3	CXCL13	E2F4	FANCG	HAND1
CDX1	CXCL14	E2F6	FASLG	HAND2
CDX2	CXCL16	ECE2	FBXO10	HAT1
CDY1B	CXCL2	EDF1	FBXO11	HCFC1
CDY2A	CXCL3	EED	FEN1	HELLS
CDYL	CXCL5	EFNB1	FMO1	HEMK1
CDYL2	CXCL6	EGF	FMO5	HENMT1
CEBPG	CXCL9	EGR1	FOS	HERC5
CECR2	CXCR1	EGR3	FOXA1	HES1
CHD1	CXCR2	EID1	FOXA2	HEY1
CHD1L	CXCR7	ELK1	FOXA3	HEY2
CHD2	CXXC1	ELP3	FOXD3	HGF
CHD3	CYP1A1	EMX1	FOXO1	HHEX
CHD4	CYP1B1	EN1	FOXP3	HIC1

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
HIF1A	HS6ST2	ING2	KIT	MCRS1
HINFP	HSF1	ING3	KITLG	MDM2
HIRA	HSP90AB1	ING4	KLF2	MEAF6
HLTF	HSPA1A	ING5	KLF4	MECOM
HLX	HSPA1L	INMT	KNTC1	MED1
HMG20A	HSPA2	INO80	KPNA2	MED13
HMG20B	HSPA4	INO80B	KRAS	MED14
HMGA1	HSPA5	INO80C	L3MBTL1	MED16
HMGN2	HSPA6	INO80D	L3MBTL2	MED17
HMGN3	HSPA8	IP6K3	L3MBTL3	MED24
HMGN5	HSPB1	IRF1	L3MBTL4	MED4
HMOX1	HSPD1	IRS4	LARP7	MEF2A
HNF1A	HSPE1	IRX3	LBX1	MEF2B
HNF4A	HSPH1	IRX4	LBX2	MEF2D
HOPX	HUS1	ISL2	LCMT1	MEIS1
HOXA10	ICMT	ITGB3BP	LEO1	MEIS2
HOXA11	IFNA2	JAK2	LHX1	MEN1
HOXA3	IGF2R	JHDM1D	LIG1	MEOX1
HOXA5	IGFBP1	JMJD4	LIG3	MET
HOXA7	IGFBP6	JMJD6	LIG4	METTL10
HOXA9	IGHMBP2	JMJD7	LIMK1	METTL11A
HOXB13	IKZF1	JMJD8	LIN28B	METTL11B
HOXB3	IL10	JUN	LMX1B	METTL12
HOXB4	IL10RA	JUNB	LOX	METTL13
HOXB5	IL10RB	JUND	LPIN1	METTL14
HOXB7	IL13	KANSL1	LRWD1	METTL20
HOXB8	IL13RA1	KANSL2	LTA	METTL2A
HOXB9	IL17C	KANSL3	LTB	METTL2B
HOXC10	IL18	KAT2A	LTB4R	METTL3
HOXC11	IL1A	KAT2B	MAD2L1	METTL6
HOXC12	IL1B	KAT5	MAD2L2	METTL7A
HOXC13	IL1F10	KAT6A	MAEL	METTL7B
HOXC4	IL1R1	KAT7	MAGEA1	METTL8
HOXC5	IL1RN	KAT8	MAGEA2B	MGEA5
HOXC6	IL22	KCNA1	MAP2K6	MGLL
HOXC8	IL36A	KDM1A	MAP3K7	MGMT
HOXC9	IL36B	KDM1B	MAPK12	MIF
HOXD1	IL36G	KDM2A	MAPK8	MIXL1
HOXD10	IL36RN	KDM3A	MAX	MKI67
HOXD11	IL37	KDM3B	MBD2	MKX
HOXD12	IL5	KDM4A	MBD6	MLH1
HOXD13	IL5RA	KDM4C	MBIP	MLH3
HOXD3	IL6	KDM4D	MBTD1	MLL
HOXD4	IL6R	KDM4DL	MCL1	MLL3
HOXD8	IL8	KDM5A	MCM2	MLL4
HOXD9	IL9	KDM5D	MCM3	MLL5
HR	IL9R	KDM6B	MCM4	MMS19
HS3ST1	ING1	KIAA1267	MCM5	MNAT1

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
MORF4L1	NEUROD1	NSUN5	PHF3	PRDM2
MORF4L2	NF1	NSUN5P1	PHF5A	PRDM4
MOS	NF2	NSUN5P2	PHF7	PRDM5
MOV10	NFAT5	NSUN6	PHOX2B	PRDM6
MPG	NFATC1	NSUN7	PICK1	PRDM7
MPHOSPH8	NFATC2	NTHL1	PIK3C2A	PRDM8
MRE11A	NFATC3	NUDT21	PIK3CA	PRDM9
MSH2	NFATC4	OGG1	PITX2	PRDX1
MSH3	NFKB1	OGT	PITX3	PRDX2
MSH4	NFKB2	OLIG2	PIWIL2	PRKAA1
MSH5	NFKBIA	OTP	PIWIL4	PRKAA2
MSH6	NFYB	OTX1	PKN1	PRKCA
MSL1	NID2	OTX2	PKN2	PRKCB
MSL2	NKX2-2	PADI4	PLD6	PRKCH
MSL3	NKX3-1	PAF1	PML	PRKDC
MSL3P1	NLGN2	PARP1	PMP22	PRMT1
MSX2	NNMT	PARP2	PMS1	PRMT10
MT2A	NONO	PARP3	PMS2	PRMT2
MTA1	NOP2	PAX1	PMS2P3	PRMT3
MTA2	NOS2	PAX3	PNKP	PRMT5
MTF2	NOTCH2	PAX5	PNMT	PRMT6
MTR	NPTX1	PAX6	POLB	PRMT7
MUTYH	NR0B1	PAX9	POLD3	PRMT8
MYB	NR0B2	PAXIP1	POLE3	PROP1
MYC	NR1D1	PBRM1	POLE4	PROX1
MYCN	NR1D2	PCBP4	POLL	PSMC3
MYF5	NR1H2	PCGF1	POR	PSMC5
MYO5B	NR1H3	PCGF2	POU2AF1	PTGS1
MYOCD	NR1H4	PCGF3	POU4F1	PTPRA
MYOD1	NR1I2	PCGF5	POU4F2	PYGO2
MYSM1	NR1I3	PCGF6	POU5F1	RAB3B
N4BP2	NR2C1	PCMT1	PPARA	RAB3D
N6AMT1	NR2C2	PCNA	PPARD	RAB6A
NAA60	NR2E1	PDGFRA	PPARG	RAD1
NAB2	NR2E3	PDHX	PPARGC1A	RAD17
NANOG	NR2F1	PHB	PPARGC1B	RAD18
NBN	NR2F2	PHC1	PPP1CC	RAD21
NCOA1	NR2F6	PHC2	PPP1R15A	RAD23A
NCOA2	NR3C1	PHC3	PPP1R8	RAD23B
NCOA3	NR3C2	PHF1	PRDM1	RAD50
NCOA4	NR4A1	PHF13	PRDM1	RAD51
NCOA6	NR5A1	PHF15	PRDM10	RAD51B
NCOR1	NR6A1	PHF16	PRDM11	RAD51C
NCOR2	NRAS	PHF17	PRDM12	RAD51D
NEIL1	NRIP1	PHF19	PRDM13	RAD52
NEIL2	NSUN2	PHF2	PRDM14	RAD54L
NEIL3	NSUN3	PHF20	PRDM15	RAD9A
NEK6	NSUN4	PHF21B	PRDM16	RAF1

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
RAG1	SAP18	SMARCA2	STAT6	TGS1
RAG2	SAP30	SMARCA4	STK11	THBD
RARA	SATB1	SMARCA5	SUDS3	THPO
RARB	SATB2	SMARCA1	SUMO1	THRA
RARG	SCMH1	SMARCA1	SUPT3H	THR8
RASD1	SCML2	SMARCB1	SUPT7L	TIMP3
RASSF1	SEMA4A	SMARCC1	SUV39H1	TLK1
RB1	SERPINB2	SMARCC2	SUV39H2	TLK2
RBBP4	SERPINB5	SMOC2	SUV420H1	TLX1
RBBP5	SERPINE1	SMUG1	SUV420H2	TLX3
RBBP7	SERTAD1	SMYD1	SUZ12	TMEM66
RBBP8	SESN1	SMYD2	TACSTD2	TNF
RBL1	SETD1A	SMYD3	TADA1	TNFRSF1A
RBL2	SETD1B	SMYD4	TADA2A	TNFSF10
RBP2	SETD2	SMYD5	TADA2B	TOLLIP
RBPJ	SETD3	SNAI1	TADA3	TOP2A
RCBTB1	SETD4	SNRPN	TAF1	TOP2B
RCOR1	SETD5	SOD1	TAF10	TOP3A
REL	SETD6	SOD2	TAF12	TOP3B
RELA	SETD7	SOX1	TAF1L	TP53
RELB	SETD8	SOX11	TAF2	TP73
RERE	SETDB1	SOX12	TAF4	TRAF6
RET	SETDB2	SOX13	TAF5	TREX1
REV1	SETMAR	SOX14	TAF5L	TRIM10
RFC1	SH3PXD2A	SOX15	TAF6	TRIM15
RFXANK	SHOX	SOX17	TAF6L	TRIM27
RING1	SHOX2	SOX18	TAF7	TRIM68
RNASEL	SIK1	SOX21	TAF9	TRIP4
RNF168	SIRT1	SOX30	TAF9B	TRMT112
RNF20	SIRT2	SOX4	TAL1	TRPM3
RNF40	SIRT6	SOX5	TBL1X	TRRAP
RNF8	SIX1	SOX6	TBP	TSHZ1
RORA	SIX2	SOX7	TBX5	TSPYL2
ROS1	SIX3	SOX8	TCF21	UBA1
RPA3	SIX4	SOX9	TCF7	UBAP2L
RPS6KA5	SIX6	SP2	TCF7L2	UBE2B
RRP8	SKI	SP3	TDG	UBE2E1
RUNX1	SKP1	SPI1	TDGF1	UBE2N
RUNX3	SKP2	SPP1	TDRD1	UBN1
RUVBL1	SLC30A4	SRC	TDRD3	UBR2
RUVBL2	SLC34A2	SRCAP	TDRD5	UCP1
RXRA	SLK	SS18L1	TET1	UGT1A4
RXRB	SMAD1	STAT1	TFAP2A	UHRF1BP1
RXRG	SMAD2	STAT2	TFAP4	UIMC1
RYBP	SMAD4	STAT3	TFDP1	UNG
S100A4	SMAD5	STAT4	TFDP2	USF1
SALL2	SMAD9	STAT5A	TGFB1	USP11
SAP130	SMARCA1	STAT5B	TGIF1	USP16

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
<i>USP21</i>	<i>VSNL1</i>	<i>WVVOX</i>	<i>XRCC6</i>	<i>ZAK</i>
<i>USP22</i>	<i>VSX1</i>	<i>XAB2</i>	<i>XRCC6BP1</i>	<i>ZBTB16</i>
<i>USP3</i>	<i>WBSCR22</i>	<i>XCR1</i>	<i>YAF2</i>	<i>ZBTB7A</i>
<i>USP7</i>	<i>WBSCR27</i>	<i>XPA</i>	<i>YEATS2</i>	<i>ZFP57</i>
<i>UTP3</i>	<i>WDR11</i>	<i>XPC</i>	<i>YEATS4</i>	<i>ZFPM2</i>
<i>UTY</i>	<i>WDR5</i>	<i>XRCC1</i>	<i>YWHAB</i>	<i>ZHX2</i>
<i>VAX1</i>	<i>WDR82</i>	<i>XRCC2</i>	<i>YWHAE</i>	<i>ZIC1</i>
<i>VAX2</i>	<i>WDR92</i>	<i>XRCC3</i>	<i>YY1</i>	<i>ZMYND15</i>
<i>VDR</i>	<i>WNT5A</i>	<i>XRCC4</i>	<i>YY1AP1</i>	<i>ZMYND8</i>
<i>VHL</i>	<i>WRN</i>	<i>XRCC5</i>	<i>YY2</i>	<i>ZNF217</i>
<i>VPS72</i>	<i>WT1</i>			

Tabla 58: Posición cromosómica de los elementos ultraconservados.

Nombre	Posición (Hg19)	Nombre	Posición (Hg19)
uc.1	chr1:10597697-10597903	uc.37	chr1:115280053-115280254
uc.2	chr1:10732543-10732749	uc.38	chr1:163939955-163940178
uc.3	chr1:10751165-10751389	uc.39	chr1:164023535-164023890
uc.4	chr1:10758249-10758607	uc.40	chr1:164637962-164638208
uc.5	chr1:10781351-10781564	uc.41	chr1:213598767-213598982
uc.6	chr1:10795121-10795421	uc.42	chr1:215889032-215889297
uc.7	chr1:10836133-10836388	uc.43	chr1:243896035-243896291
uc.8	chr1:10851818-10852033	uc.44	chr1:244217707-244217936
uc.9	chr1:10925410-10925611	uc.45	chr1:245016686-245016888
uc.10	chr1:10965574-10965848	uc.46	chr1:245017603-245017819
uc.12	chr1:35650227-35650427	uc.47	chr2:7774651-7774877
uc.13	chr1:36359190-36359426	uc.48	chr2:20478333-20478630
uc.14	chr1:38495004-38495216	uc.49	chr2:33813409-33813615
uc.15	chr1:38561076-38561308	uc.50	chr2:38976301-38976522
uc.16	chr1:38628199-38628409	uc.51	chr2:57972559-57972765
uc.17	chr1:38802151-38802387	uc.52	chr2:59108186-59108459
uc.18	chr1:44715661-44715898	uc.53	chr2:59133311-59133542
uc.19	chr1:44990312-44990567	uc.54	chr2:59199403-59199611
uc.20	chr1:45002372-45002640	uc.55	chr2:59746578-59746817
uc.21	chr1:49112986-49113220	uc.56	chr2:59947831-59948032
uc.22	chr1:51006231-51006538	uc.57	chr2:60139240-60139485
uc.23	chr1:51035777-51036005	uc.58	chr2:60297963-60298165
uc.24	chr1:51099145-51099480	uc.59	chr2:60298383-60298602
uc.25	chr1:51166034-51166268	uc.60	chr2:60441560-60441776
uc.26	chr1:63369646-63369857	uc.61	chr2:60687573-60687898
uc.27	chr1:63369880-63370169	uc.62	chr2:60780682-60780915
uc.28	chr1:70696713-70697067	uc.63	chr2:61752501-61752778
uc.29	chr1:87822383-87822601	uc.64	chr2:63194091-63194335
uc.30	chr1:88029000-88029242	uc.65	chr2:66298591-66298802
uc.31	chr1:88928018-88928270	uc.66	chr2:73175003-73175249
uc.33	chr1:97271737-97272048	uc.67	chr2:104736726-104736942
uc.34	chr1:97280172-97280379	uc.68	chr2:143914722-143914976
uc.35	chr1:98002282-98002486	uc.69	chr2:144112110-144112410
uc.36	chr1:109240428-109240691	uc.70	chr2:144437339-144437575

Nombre	Posición (Hg19)	Nombre	Posición (Hg19)
uc.71	chr2:144712856-144713103	uc.118	chr3:70872092-70872310
uc.72	chr2:144714972-144715378	uc.119	chr3:114433467-114433767
uc.73	chr2:144762313-144762513	uc.120	chr3:114435039-114435308
uc.74	chr2:144825963-144826500	uc.121	chr3:114575474-114575766
uc.75	chr2:145145850-145146085	uc.122	chr3:114611891-114612105
uc.76	chr2:145161133-145161467	uc.123	chr3:136983544-136984035
uc.77	chr2:145185765-145186060	uc.124	chr3:137048444-137048730
uc.78	chr2:145188354-145188601	uc.125	chr3:137068317-137068581
uc.79	chr2:145197177-145197471	uc.126	chr3:137125648-137125918
uc.80	chr2:145200852-145201145	uc.127	chr3:147030708-147030979
uc.81	chr2:147134065-147134275	uc.128	chr3:147049638-147049936
uc.82	chr2:156727099-156727308	uc.129	chr3:152164387-152164598
uc.83	chr2:156991627-156991922	uc.130	chr3:157776574-157776797
uc.84	chr2:157194706-157194914	uc.131	chr3:157990040-157990246
uc.85	chr2:157551414-157551661	uc.132	chr3:158026159-158026366
uc.86	chr2:157660110-157660449	uc.133	chr3:158026478-158026754
uc.87	chr2:157900269-157900558	uc.134	chr3:158245904-158246114
uc.88	chr2:162095042-162095353	uc.135	chr3:168834283-168834483
uc.89	chr2:162238673-162238979	uc.136	chr3:169193952-169194298
uc.90	chr2:162273027-162273232	uc.137	chr3:180436857-180437241
uc.91	chr2:163045022-163045228	uc.138	chr3:185649296-185649714
uc.92	chr2:164450679-164450987	uc.139	chr4:4523440-4523777
uc.93	chr2:164661907-164662169	uc.140	chr4:13009870-13010092
uc.94	chr2:164844170-164844369	uc.141	chr4:24529162-24529456
uc.95	chr2:171571530-171571780	uc.142	chr4:41750069-41750327
uc.96	chr2:172820674-172820934	uc.143	chr4:76579124-76579341
uc.97	chr2:172822631-172823072	uc.144	chr4:83346665-83346869
uc.98	chr2:172956518-172956755	uc.145	chr4:105346313-105346560
uc.99	chr2:172958381-172958778	uc.146	chr4:111916476-111916689
uc.100	chr2:174114780-174114986	uc.147	chr4:151236383-151236690
uc.101	chr2:174774481-174774734	uc.148	chr4:151493952-151494191
uc.102	chr2:174946409-174946746	uc.149	chr4:151494193-151494396
uc.103	chr2:174969672-174969904	uc.150	chr5:3512621-3512882
uc.104	chr2:174986934-174987149	uc.151	chr5:32380137-32380350
uc.105	chr2:174989787-174990009	uc.152	chr5:50335638-50335838
uc.106	chr2:175025423-175025628	uc.153	chr5:72195686-72195925
uc.107	chr2:175207608-175207844	uc.154	chr5:72210015-72210217
uc.108	chr2:176940357-176940730	uc.155	chr5:76934364-76934570
uc.109	chr2:177503338-177503561	uc.156	chr5:76935419-76935631
uc.110	chr2:237071382-237071624	uc.157	chr5:76941161-76941367
uc.111	chr3:9471461-9471756	uc.158	chr5:77140253-77140476
uc.483	chr3:17592729-17593130	uc.159	chr5:77147932-77148403
uc.112	chr3:18169564-18169909	uc.160	chr5:77268844-77269165
uc.113	chr3:18676404-18676650	uc.161	chr5:77358529-77358806
uc.114	chr3:18844450-18844743	uc.162	chr5:81147361-81147578
uc.115	chr3:19034158-19034376	uc.163	chr5:87168623-87168998
uc.116	chr3:70566424-70566629	uc.164	chr5:87240405-87240607
uc.117	chr3:70871840-70872090	uc.165	chr5:87692933-87693156

Nombre	Posición (Hg19)	Nombre	Posición (Hg19)
uc.166	chr5:87961805-87962114	uc.214	chr7:31402398-31402640
uc.167	chr5:88179624-88179824	uc.215	chr7:42192585-42192846
uc.168	chr5:90928793-90929012	uc.216	chr7:50358155-50358466
uc.169	chr5:92921017-92921220	uc.217	chr7:54636656-54636876
uc.170	chr5:93227670-93227979	uc.218	chr7:69802975-69803260
uc.171	chr5:93575847-93576054	uc.219	chr7:69980780-69980989
uc.172	chr5:93650719-93650936	uc.220	chr7:96633916-96634172
uc.173	chr5:133726160-133726435	uc.221	chr7:96641301-96641649
uc.174	chr5:138643654-138643913	uc.222	chr7:114057171-114057371
uc.175	chr5:158341838-158342087	uc.223	chr7:114058185-114058452
uc.176	chr5:167332695-167332940	uc.224	chr7:114063019-114063313
uc.177	chr5:170417629-170417885	uc.225	chr7:114072855-114073055
uc.178	chr5:170417998-170418246	uc.226	chr7:114209318-114209522
uc.179	chr5:170628212-170628430	uc.227	chr7:114295316-114295546
uc.180	chr5:170628489-170628713	uc.228	chr7:115116697-115116961
uc.181	chr5:170629479-170629756	uc.229	chr7:115134645-115134940
uc.182	chr5:170703079-170703317	uc.230	chr7:115319461-115319698
uc.183	chr5:171384520-171384755	uc.231	chr7:115582117-115582340
uc.184	chr5:173385292-173385521	uc.232	chr7:121944606-121944852
uc.185	chr5:178044307-178044717	uc.233	chr7:150828314-150828579
uc.186	chr5:179046197-179046501	uc.234	chr7:156812385-156812656
uc.187	chr6:10394677-10394888	uc.235	chr8:25775921-25776147
uc.188	chr6:16299384-16299598	uc.236	chr8:37250469-37250735
uc.189	chr6:36567517-36568089	uc.237	chr8:53137902-53138369
uc.190	chr6:41523440-41523639	uc.238	chr8:53167117-53167474
uc.191	chr6:51076794-51077001	uc.239	chr8:59942373-59942672
uc.192	chr6:51148997-51149240	uc.240	chr8:65492539-65492744
uc.193	chr6:86321686-86322004	uc.241	chr8:65497130-65497331
uc.194	chr6:93969064-93969264	uc.242	chr8:66149297-66149561
uc.195	chr6:97663356-97663628	uc.243	chr8:77690962-77691177
uc.196	chr6:98116540-98116760	uc.244	chr8:105962349-105962669
uc.197	chr6:98362799-98363022	uc.245	chr8:106333832-106334170
uc.198	chr6:98719889-98720195	uc.246	chr8:119123218-119123501
uc.199	chr6:98813855-98814110	uc.247	chr9:969154-969514
uc.200	chr6:98995533-98995786	uc.248	chr9:974189-974410
uc.201	chr6:100051984-100052223	uc.249	chr9:8095728-8095987
uc.202	chr6:100973983-100974212	uc.250	chr9:13939910-13940118
uc.203	chr6:163991704-163991906	uc.251	chr9:15874309-15874521
uc.204	chr7:1265904-1266105	uc.252	chr9:16710753-16710983
uc.205	chr7:20829789-20830040	uc.253	chr9:17332212-17332433
uc.206	chr7:21003765-21004263	uc.254	chr9:23496725-23497003
uc.207	chr7:21811493-21811722	uc.255	chr9:23691768-23691999
uc.208	chr7:23561670-23561887	uc.256	chr9:23692234-23692439
uc.209	chr7:23561888-23562137	uc.257	chr9:37215204-37215467
uc.210	chr7:26697078-26697334	uc.258	chr9:37324424-37324624
uc.211	chr7:26729472-26729762	uc.259	chr9:79627879-79628186
uc.212	chr7:27141938-27142142	uc.260	chr9:81472424-81472654
uc.213	chr7:27183132-27183332	uc.261	chr9:81871574-81871884

Nombre	Posición (Hg19)	Nombre	Posición (Hg19)
uc.262	chr9:83727722-83727976	uc.310	chr10:114404223-114404451
uc.263	chr9:86590284-86590490	uc.311	chr10:120074402-120074620
uc.264	chr9:86590492-86590758	uc.312	chr10:120076537-120076858
uc.265	chr9:108118471-108118687	uc.313	chr10:121340174-121340404
uc.266	chr9:109378292-109378534	uc.314	chr10:124852203-124852404
uc.267	chr9:125053890-125054092	uc.315	chr10:124852615-124852849
uc.268	chr9:125606828-125607078	uc.316	chr10:126905565-126905804
uc.269	chr9:126537937-126538153	uc.317	chr10:131446338-131446555
uc.270	chr9:128304069-128304346	uc.318	chr10:131691586-131691906
uc.271	chr9:128304352-128304562	uc.319	chr11:8304695-8305010
uc.272	chr9:128432588-128432800	uc.320	chr11:8317834-8318168
uc.273	chr9:128517598-128517918	uc.321	chr11:15624424-15624627
uc.274	chr9:128521871-128522197	uc.322	chr11:16316351-16316573
uc.275	chr9:128584116-128584370	uc.323	chr11:16475336-16475535
uc.276	chr9:128605812-128606243	uc.324	chr11:30557521-30557745
uc.277	chr9:128607710-128607985	uc.325	chr11:31685644-31685878
uc.278	chr9:128646165-128646401	uc.326	chr11:31785680-31785994
uc.279	chr9:128672559-128672894	uc.327	chr11:31786284-31786551
uc.280	chr9:128678006-128678225	uc.328	chr11:31825663-31825893
uc.281	chr9:135495525-135495762	uc.329	chr11:32197992-32198298
uc.282	chr9:140042490-140042696	uc.330	chr11:66393896-66394102
uc.283	chr10:50604757-50605033	uc.331	chr11:83195159-83195376
uc.284	chr10:50606856-50607064	uc.332	chr11:116232690-116233026
uc.285	chr10:70515991-70516222	uc.333	chr11:124644647-124644916
uc.286	chr10:77139024-77139275	uc.334	chr11:131867945-131868166
uc.287	chr10:77495943-77496199	uc.335	chr12:16715414-16715627
uc.288	chr10:77727183-77727405	uc.336	chr12:24292006-24292256
uc.289	chr10:77990539-77990792	uc.337	chr12:41749179-41749396
uc.290	chr10:78042282-78042487	uc.338	chr12:53858489-53858711
uc.291	chr10:78283624-78283854	uc.339	chr12:54071096-54071347
uc.292	chr10:98715455-98715671	uc.340	chr12:54090832-54091090
uc.293	chr10:102372669-102372911	uc.341	chr12:54382918-54383231
uc.294	chr10:102373617-102374060	uc.342	chr12:54410494-54410720
uc.295	chr10:102375100-102375308	uc.343	chr12:54422441-54422828
uc.296	chr10:102415106-102415566	uc.344	chr12:54426886-54427139
uc.297	chr10:102419220-102419583	uc.345	chr12:54447600-54447900
uc.298	chr10:102447658-102448016	uc.346	chr12:106976510-106976711
uc.299	chr10:102509435-102509644	uc.347	chr13:71793988-71794196
uc.300	chr10:102547118-102547325	uc.348	chr13:72063357-72063596
uc.301	chr10:102567791-102568074	uc.349	chr13:72121302-72121504
uc.302	chr10:102979180-102979520	uc.350	chr13:72256100-72256339
uc.303	chr10:103052427-103052698	uc.351	chr13:72668900-72669154
uc.304	chr10:103082504-103082775	uc.352	chr13:72694165-72694364
uc.305	chr10:103211435-103211739	uc.353	chr13:72771553-72771875
uc.306	chr10:103212039-103212262	uc.354	chr13:78976829-78977063
uc.307	chr10:103243983-103244214	uc.355	chr13:95618882-95619109
uc.308	chr10:103245812-103246088	uc.356	chr13:98008820-98009070
uc.309	chr10:103267031-103267298	uc.357	chr13:112716337-112716578

Nombre	Posición (Hg19)	Nombre	Posición (Hg19)
uc.358	chr14:26378034-26378259	uc.406	chr16:69680364-69680574
uc.359	chr14:26914968-26915291	uc.407	chr16:69681155-69681480
uc.360	chr14:26915382-26915668	uc.408	chr16:72821045-72821296
uc.361	chr14:29233135-29233401	uc.409	chr16:73092871-73093114
uc.362	chr14:29348752-29348990	uc.410	chr17:35012230-35012448
uc.363	chr14:29861319-29861583	uc.411	chr17:35329619-35329847
uc.364	chr14:30712759-30712965	uc.412	chr17:35336486-35336753
uc.365	chr14:30742362-30742639	uc.413	chr17:37566519-37566790
uc.366	chr14:31382707-31382908	uc.414	chr17:38249174-38249419
uc.367	chr14:33844463-33844760	uc.415	chr17:46663906-46664112
uc.368	chr14:34068576-34068803	uc.416	chr17:46670887-46671172
uc.369	chr14:34122617-34122829	uc.417	chr17:46682312-46682533
uc.370	chr14:34202571-34202963	uc.418	chr17:56082228-56082444
uc.371	chr14:36020189-36020484	uc.419	chr17:56082715-56083003
uc.372	chr14:36043035-36043311	uc.420	chr17:62496771-62497003
uc.373	chr14:36581807-36582200	uc.421	chr18:22693155-22693499
uc.374	chr14:37715913-37716136	uc.422	chr18:22748188-22748413
uc.375	chr14:37777220-37777519	uc.423	chr18:22756355-22756577
uc.376	chr14:45565750-45566039	uc.424	chr18:22767779-22767993
uc.377	chr14:45579023-45579239	uc.425	chr18:22865207-22865531
uc.378	chr14:80327477-80327727	uc.426	chr18:23915592-23915853
uc.379	chr14:97431368-97431619	uc.427	chr18:24237199-24237413
uc.380	chr14:97762594-97762825	uc.428	chr18:30353209-30353447
uc.381	chr14:97879290-97879527	uc.429	chr18:34480541-34480778
uc.382	chr15:35918912-35919111	uc.430	chr18:35063650-35063862
uc.383	chr15:36819927-36820195	uc.431	chr18:35178600-35178829
uc.384	chr15:36965393-36965658	uc.432	chr18:35564932-35565142
uc.385	chr15:37185670-37185878	uc.433	chr18:36063632-36063837
uc.386	chr15:37522009-37522211	uc.434	chr18:44770788-44771036
uc.387	chr15:42032054-42032291	uc.435	chr18:53089931-53090157
uc.388	chr15:57425525-57425822	uc.436	chr18:53254241-53254450
uc.389	chr15:67665385-67665655	uc.437	chr18:72357658-72357872
uc.390	chr15:67878170-67878374	uc.438	chr18:72357874-72358114
uc.391	chr15:68040304-68040614	uc.439	chr18:72363031-72363293
uc.392	chr15:70392134-70392389	uc.440	chr18:72363365-72363693
uc.393	chr15:74914242-74914516	uc.441	chr18:72568592-72568839
uc.394	chr16:24579003-24579251	uc.442	chr18:72592712-72592960
uc.395	chr16:24579003-24579251	uc.443	chr19:8527269-8527507
uc.396	chr16:49094731-49094938	uc.444	chr19:30494779-30495166
uc.397	chr16:49735848-49736158	uc.445	chr19:30566435-30566744
uc.398	chr16:49735848-49736158	uc.446	chr19:30747854-30748125
uc.399	chr16:50848991-50849204	uc.447	chr19:30767781-30768053
uc.400	chr16:51671487-51671692	uc.448	chr19:30841530-30841761
uc.401	chr16:52494715-52494964	uc.449	chr19:31003541-31003830
uc.402	chr16:53654385-53654629	uc.450	chr19:31587626-31587836
uc.403	chr16:54323855-54324060	uc.451	chr19:31806620-31806844
uc.404	chr16:55223357-55223591	uc.452	chr19:31827947-31828150
uc.405	chr16:59575395-59575604	uc.453	chr19:42437317-42437641

Nombre	Posición (Hg19)	Nombre	Posición (Hg19)
uc.454	chr20:4866440-4866647	uc.469	chrX:25018053-25018274
uc.455	chr20:34328379-34328623	uc.470	chrX:25401216-25401556
uc.456	chr20:42087756-42088075	uc.471	chrX:41208371-41208609
uc.457	chr22:19395909-19396119	uc.472	chrX:41379306-41379507
uc.458	chr22:36148492-36148695	uc.473	chrX:70373224-70373445
uc.459	chrX:21534560-21534814	uc.474	chrX:70468843-70469052
uc.460	chrX:24823511-24823785	uc.475	chrX:70766055-70766451
uc.461	chrX:24864797-24865193	uc.476	chrX:81789599-81789836
uc.462	chrX:24894826-24895604	uc.477	chrX:103041491-103041699
uc.463	chrX:24915882-24916156	uc.478	chrX:122599457-122599708
uc.464	chrX:24916158-24916927	uc.479	chrX:122613751-122614052
uc.465	chrX:24917481-24917790	uc.480	chrX:123235272-123235473
uc.466	chrX:24946458-24946806	uc.481	chrX:123235475-123235678
uc.467	chrX:25008354-25009084	uc.482	chrX:139170488-139170782
uc.468	chrX:25017563-25018051		

Tabla 59: Listado de miRNAs utilizados para la búsqueda de sondas en las distintas versiones del array de diseño propio.

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-553	chr1:100746796-100746864	1-4
hsa-mir-1273d	chr1:10287775-10287861	2-4
hsa-mir-197	chr1:110141514-110141589	1-4
hsa-mir-200b	chr1:1102483-1102578	1-4
hsa-mir-200a	chr1:1103242-1103332	1-4
hsa-mir-429	chr1:1104384-1104467	1-4
hsa-mir-4256	chr1:113004391-113004455	2-4
hsa-mir-320b-1	chr1:117214370-117214449	2-4
hsa-mir-942	chr1:117637264-117637350	1-4
hsa-mir-3118-1	chr1:142667288-142667363	2-4
hsa-mir-3118-2	chr1:143163749-143163822	2-4
hsa-mir-3118-3	chr1:143424140-143424215	2-4
hsa-mir-4257	chr1:150524404-150524490	2-4
hsa-mir-554	chr1:151518271-151518367	1-4
hsa-mir-190b	chr1:154166140-154166219	1-4
hsa-mir-4258	chr1:154948168-154948259	2-4
hsa-mir-92b	chr1:155164967-155165063	1-4
hsa-mir-555	chr1:155316140-155316236	1-4
hsa-mir-9-1	chr1:156390132-156390221	1-4
hsa-mir-765	chr1:156905922-156906036	1-4
hsa-mir-4259	chr1:159869768-159869869	2-4
hsa-mir-556	chr1:162312335-162312430	1-4
hsa-mir-921	chr1:166123979-166124035	1-4
hsa-mir-1255b-2	chr1:167967897-167967964	2-4
hsa-mir-557	chr1:168344761-168344859	1-4
hsa-mir-3119-1	chr1:170120518-170120603	2-4
hsa-mir-3119-2	chr1:170120518-170120603	2-4
hsa-mir-1295	chr1:171070868-171070947	2-4
hsa-mir-214	chr1:172107937-172108047	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-3120	chr1:172107947-172108028	2-4
hsa-mir-199a-2	chr1:172113674-172113784	1-4
hsa-mir-488	chr1:176998498-176998581	1-4
hsa-mir-3121	chr1:180407448-180407525	2-4
hsa-mir-1290	chr1:19223564-19223642	2-4
hsa-mir-1278	chr1:193105632-193105713	2-4
hsa-mir-181b-1	chr1:198828001-198828111	1-4
hsa-mir-181a-1	chr1:198828172-198828282	1-4
hsa-mir-1231	chr1:201777738-201777830	1-4
hsa-mir-135b	chr1:205417429-205417526	1-4
hsa-mir-29c	chr1:207975196-207975284	1-4
hsa-mir-29b-2	chr1:207975787-207975868	1-4
hsa-mir-205	chr1:209605477-209605587	1-4
hsa-mir-4260	chr1:209796788-209796855	2-4
hsa-mir-3122	chr1:212250954-212251027	2-4
hsa-mir-1256	chr1:21314806-21314925	2-4
hsa-mir-215	chr1:220291194-220291304	1-4
hsa-mir-194-1	chr1:220291498-220291583	1-4
hsa-mir-664	chr1:220373879-220373961	2-4
hsa-mir-320b-2	chr1:224444705-224444843	2-4
hsa-mir-1182	chr1:231155573-231155670	2-4
hsa-mir-4253	chr1:23189651-23189719	2-4
hsa-mir-3115	chr1:23370797-23370865	2-4
hsa-mir-1537	chr1:236016299-236016360	2-4
hsa-mir-3123	chr1:241295571-241295646	2-4
hsa-mir-3124	chr1:249120575-249120642	2-4
hsa-mir-1976	chr1:26881032-26881084	2-4
hsa-mir-801	chr1:28975111-28975206	1
hsa-mir-1302-2	chr1:30365-30503	2-4
hsa-mir-4251	chr1:3044538-3044599	2-4
hsa-mir-4254	chr1:32224260-32224336	2-4
hsa-mir-551a	chr1:3477258-3477354	1-4
hsa-mir-552	chr1:35135199-35135295	1-4
hsa-mir-4255	chr1:37627163-37627235	2-4
hsa-mir-30e	chr1:41220026-41220118	1-4
hsa-mir-30c-1	chr1:41222955-41223044	1-4
hsa-mir-761	chr1:52302015-52302074	2-4
hsa-mir-3116-1	chr1:62544457-62544531	2-4
hsa-mir-3116-2	chr1:62544460-62544528	2-4
hsa-mir-4252	chr1:6489893-6489956	2-4
hsa-mir-101-1	chr1:65524116-65524191	1-4
hsa-mir-3117	chr1:67094122-67094200	2-4
hsa-mir-1262	chr1:68649200-68649293	2-4
hsa-mir-186	chr1:71533313-71533399	1-4
hsa-mir-34a	chr1:9211726-9211836	1-4
hsa-mir-760	chr1:94312387-94312467	1-4
hsa-mir-137	chr1:98511625-98511727	1-4
hsa-mir-1287	chr10:100154974-100155064	2-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-608	chr10:102734741-102734841	1-4
hsa-mir-3158-1	chr10:103361173-103361254	2-4
hsa-mir-3158-2	chr10:103361173-103361254	2-4
hsa-mir-146b	chr10:104196268-104196341	1-4
hsa-mir-1307	chr10:105154009-105154158	2-4
hsa-mir-936	chr10:105807846-105807944	1-4
hsa-mir-609	chr10:105978546-105978641	1-4
hsa-mir-548e	chr10:112748683-112748771	2-4
hsa-mir-4295	chr10:114393928-114394013	2-4
hsa-mir-2110	chr10:115933863-115933938	2-4
hsa-mir-4296	chr10:126721351-126721439	2-4
hsa-mir-548q	chr10:12767252-12767352	2-4
hsa-mir-4297	chr10:131641562-131641638	2-4
hsa-mir-378c	chr10:132760850-132760931	2-4
hsa-mir-202	chr10:135061014-135061124	1-4
hsa-mir-4293	chr10:14425198-14425276	2-4
hsa-mir-1265	chr10:14478574-14478660	2-4
hsa-mir-511-1	chr10:17887106-17887193	1-4
hsa-mir-511-2	chr10:18134035-18134122	1-4
hsa-mir-1915	chr10:21785490-21785570	2-4
hsa-mir-603	chr10:24564613-24564710	1-4
hsa-mir-604	chr10:29833932-29834026	1-4
hsa-mir-938	chr10:29891192-29891275	1-4
hsa-mir-3156-1	chr10:45659461-45659536	2-4
hsa-mir-4294	chr10:50193556-50193632	2-4
hsa-mir-605	chr10:53059332-53059415	1-4
hsa-mir-548f-1	chr10:56367633-56367717	2-4
hsa-mir-3155	chr10:6194158-6194240	2-4
hsa-mir-1296	chr10:65132716-65132808	2-4
hsa-mir-1254	chr10:70519074-70519171	2-4
hsa-mir-606	chr10:77312215-77312311	1-4
hsa-mir-346	chr10:88024450-88024545	1-4
hsa-mir-107	chr10:91352503-91352584	1-4
hsa-mir-3157	chr10:97824071-97824156	2-4
hsa-mir-607	chr10:98588425-98588521	1-4
hsa-mir-34b	chr11:111383662-111383746	1-4
hsa-mir-34c	chr11:111384163-111384240	1-4
hsa-mir-4301	chr11:113320744-113320810	2-4
hsa-mir-4299	chr11:11678197-11678269	2-4
hsa-mir-125b-1	chr11:121970464-121970552	1-4
hsa-let-7a-2	chr11:122017229-122017301	1-4
hsa-mir-100	chr11:122022936-122023016	1-4
hsa-mir-3167	chr11:126858353-126858438	2-4
hsa-mir-3159	chr11:18409333-18409407	2-4
hsa-mir-4298	chr11:1880693-1880766	2-4
hsa-mir-675	chr11:2017988-2018061	1-4
hsa-mir-483	chr11:2155363-2155439	1-4
hsa-mir-610	chr11:28078361-28078457	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-670	chr11:43581205-43581303	2-4
hsa-mir-129-2	chr11:43602943-43603033	1-4
hsa-mir-3160-1	chr11:46473354-46473439	2-4
hsa-mir-3160-2	chr11:46473356-46473437	2-4
hsa-mir-3161	chr11:48118333-48118410	2-4
hsa-mir-210	chr11:568088-568198	1-4
hsa-mir-130a	chr11:57408670-57408759	1-4
hsa-mir-3162	chr11:59362549-59362631	2-4
hsa-mir-611	chr11:61559966-61560033	1-4
hsa-mir-1908	chr11:61582632-61582712	2-4
hsa-mir-1237	chr11:64136073-64136175	1-4
hsa-mir-192	chr11:64658608-64658718	1-4
hsa-mir-194-2	chr11:64658826-64658911	1-4
hsa-mir-612	chr11:65211928-65212028	1-4
hsa-mir-3163	chr11:66701904-66701977	2-4
hsa-mir-3164	chr11:68850643-68850726	2-4
hsa-mir-548k	chr11:70130060-70130176	2-4
hsa-mir-3165	chr11:71783273-71783348	2-4
hsa-mir-139	chr11:72326106-72326174	1-4
hsa-mir-302e	chr11:7255996-7256068	2-4
hsa-mir-326	chr11:75046135-75046230	1-4
hsa-mir-708	chr11:79113065-79113153	1-4
hsa-mir-4300	chr11:81601782-81601878	2-4
hsa-mir-3166	chr11:87909669-87909761	2-4
hsa-mir-1261	chr11:90602288-90602370	2-4
hsa-mir-1304	chr11:93466839-93466930	2-4
hsa-mir-548l	chr11:94199660-94199746	2-4
hsa-mir-1260b	chr11:96074601-96074690	2-4
hsa-mir-1827	chr12:100583661-100583727	2-4
hsa-mir-619	chr12:109230683-109230782	1-4
hsa-mir-1302-1	chr12:113132838-113132981	2-4
hsa-mir-620	chr12:116586364-116586459	1-4
hsa-mir-1178	chr12:120151438-120151529	2-4
hsa-mir-4304	chr12:123495213-123495275	2-4
hsa-mir-613	chr12:12917582-12917677	1-4
hsa-mir-614	chr12:13068762-13068852	1-4
hsa-mir-920	chr12:24365354-24365429	1-4
hsa-mir-4302	chr12:26026952-26027012	2-4
hsa-mir-1291	chr12:49048226-49048313	2-4
hsa-mir-1293	chr12:50627924-50627995	2-4
hsa-mir-196a-2	chr12:54385521-54385631	1-4
hsa-mir-615	chr12:54427733-54427829	1-4
hsa-mir-148b	chr12:54730999-54731098	1-4
hsa-mir-1228	chr12:57588286-57588359	1-4
hsa-mir-616	chr12:57912945-57913042	1-4
hsa-mir-26a-2	chr12:58218391-58218475	1-4
hsa-let-7i	chr12:62997465-62997549	1-4
hsa-mir-548c	chr12:65016288-65016385	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-1279	chr12:69666936-69666998	2-4
hsa-mir-200c	chr12:7072861-7072929	1-4
hsa-mir-141	chr12:7073259-7073354	1-4
hsa-mir-1252	chr12:79813036-79813101	2-4
hsa-mir-617	chr12:81226311-81226408	1-4
hsa-mir-618	chr12:81329514-81329612	1-4
hsa-mir-1244-3	chr12:9392062-9392147	2-4
hsa-mir-492	chr12:95228173-95228289	1-4
hsa-mir-331	chr12:95702195-95702289	1-4
hsa-mir-1251	chr12:97885686-97885756	2-4
hsa-mir-135a-2	chr12:97957589-97957689	1-4
hsa-mir-4303	chr12:98389160-98389226	2-4
hsa-mir-623	chr13:100008384-100008482	1-4
hsa-mir-4306	chr13:100295312-100295403	2-4
hsa-mir-1267	chr13:108183518-108183596	2-4
hsa-mir-2276	chr13:24736554-24736643	2-4
hsa-mir-4305	chr13:40238170-40238272	2-4
hsa-mir-320d-1	chr13:41301963-41302011	2-4
hsa-mir-621	chr13:41384901-41384997	1-4
hsa-mir-3168	chr13:41675154-41675236	2-4
hsa-mir-16-1	chr13:50623108-50623197	1-4
hsa-mir-15a	chr13:50623254-50623337	1-4
hsa-mir-759	chr13:53384184-53384275	2-4
hsa-mir-1297	chr13:54886106-54886183	2-4
hsa-mir-3169	chr13:61773931-61774014	2-4
hsa-mir-622	chr13:90883435-90883531	1-4
hsa-mir-17	chr13:92002858-92002942	1-4
hsa-mir-18a	chr13:92003004-92003075	1-4
hsa-mir-19a	chr13:92003144-92003226	1-4
hsa-mir-20a	chr13:92003318-92003389	1-4
hsa-mir-19b-1	chr13:92003445-92003532	1-4
hsa-mir-92a-1	chr13:92003567-92003645	1-4
hsa-mir-3170	chr13:98860777-98860854	2-4
hsa-mir-342	chr14:100575991-100576090	1-4
hsa-mir-345	chr14:100774195-100774293	1-4
hsa-mir-770	chr14:101318726-101318824	1-4
hsa-mir-493	chr14:101335396-101335485	1-4
hsa-mir-337	chr14:101340829-101340922	1-4
hsa-mir-665	chr14:101341369-101341441	1-4
hsa-mir-431	chr14:101347343-101347457	1-4
hsa-mir-433	chr14:101348222-101348315	1-4
hsa-mir-127	chr14:101349315-101349412	1-4
hsa-mir-432	chr14:101350819-101350913	1-4
hsa-mir-136	chr14:101351038-101351120	1-4
hsa-mir-370	chr14:101377475-101377550	1-4
hsa-mir-379	chr14:101488402-101488469	1-4
hsa-mir-411	chr14:101489661-101489757	1-4
hsa-mir-299	chr14:101490130-101490193	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-380	chr14:101491353-101491414	1-4
hsa-mir-1197	chr14:101491900-101491988	2-4
hsa-mir-323	chr14:101492068-101492154	1-4
hsa-mir-758	chr14:101492356-101492444	1-4
hsa-mir-329-1	chr14:101493121-101493201	1-4
hsa-mir-329-2	chr14:101493436-101493520	1-4
hsa-mir-494	chr14:101495970-101496051	1-4
hsa-mir-1193	chr14:101496388-101496466	2-4
hsa-mir-543	chr14:101498323-101498401	1-4
hsa-mir-495	chr14:101500091-101500173	1-4
hsa-mir-376c	chr14:101506026-101506092	1-4
hsa-mir-376a-2	chr14:101506405-101506485	1-4
hsa-mir-654	chr14:101506555-101506636	1-4
hsa-mir-376b	chr14:101506772-101506872	1-4
hsa-mir-376a-1	chr14:101507118-101507186	1-4
hsa-mir-300	chr14:101507699-101507782	1-4
hsa-mir-1185-1	chr14:101509313-101509399	2-4
hsa-mir-1185-2	chr14:101510534-101510620	2-4
hsa-mir-381	chr14:101512256-101512331	1-4
hsa-mir-487b	chr14:101512791-101512875	1-4
hsa-mir-539	chr14:101513657-101513735	1-4
hsa-mir-889	chr14:101514237-101514316	1-4
hsa-mir-544	chr14:101514994-101515085	1-4
hsa-mir-655	chr14:101515886-101515983	1-4
hsa-mir-487a	chr14:101518782-101518862	1-4
hsa-mir-382	chr14:101520642-101520718	1-4
hsa-mir-134	chr14:101521023-101521096	1-4
hsa-mir-668	chr14:101521594-101521660	1-4
hsa-mir-485	chr14:101521755-101521828	1-4
hsa-mir-453	chr14:101522527-101522606	1
hsa-mir-323b	chr14:101522555-101522637	2-4
hsa-mir-154	chr14:101526091-101526175	1-4
hsa-mir-496	chr14:101526909-101527011	1-4
hsa-mir-377	chr14:101528386-101528455	1-4
hsa-mir-541	chr14:101530831-101530915	1-4
hsa-mir-409	chr14:101531636-101531715	1-4
hsa-mir-412	chr14:101531783-101531874	1-4
hsa-mir-369	chr14:101531934-101532004	1-4
hsa-mir-410	chr14:101532248-101532328	1-4
hsa-mir-656	chr14:101533060-101533138	1-4
hsa-mir-1247	chr14:102026623-102026759	2-4
hsa-mir-4309	chr14:103005980-103006063	2-4
hsa-mir-203	chr14:104583741-104583851	1-4
hsa-mir-1201	chr14:20794605-20794690	2-4
hsa-mir-208a	chr14:23857804-23857875	1-4
hsa-mir-208b	chr14:23887195-23887272	1-4
hsa-mir-4307	chr14:27377847-27377931	2-4
hsa-mir-3171	chr14:28102410-28102484	2-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-624	chr14:31483851-31483948	1-4
hsa-mir-3172	chr14:32954300-32954379	2-4
hsa-mir-4308	chr14:55344830-55344911	2-4
hsa-mir-548h-1	chr14:64561741-64561843	2-4
hsa-mir-625	chr14:65937819-65937904	1-4
hsa-mir-1260	chr14:77732560-77732633	2-4
hsa-mir-3173	chr14:95604255-95604323	2-4
hsa-mir-1302-10	chr15:102500661-102500799	2-4
hsa-mir-3118-4	chr15:21038123-21038198	2-4
hsa-mir-3118-6	chr15:22049273-22049348	2-4
hsa-mir-1268	chr15:22513228-22513280	2-4
HBII-85-21	chr15:25333949-25334043	2-4
HBII-85-22	chr15:25335068-25335162	2-4
HBII-85-23	chr15:25336931-25337025	2-4
HBII-85-24	chr15:25339182-25339276	2-4
HBII-85-25	chr15:25342808-25342902	2-4
HBII-85-26	chr15:25344644-25344742	2-4
HBII-85-27	chr15:25346720-25346814	2-4
HBII-85-28	chr15:25349787-25349880	2-4
HBII-85-29	chr15:25351666-25351751	2-4
hsa-mir-211	chr15:31357234-31357344	1-4
hsa-mir-1233-1	chr15:34674269-34674351	2-4
hsa-mir-1233	chr15:34674270-34674351	1
hsa-mir-1233-2	chr15:34820490-34820572	2-4
hsa-mir-1233	chr15:34820491-34820572	1
hsa-mir-626	chr15:41983782-41983876	1-4
hsa-mir-4310	chr15:42158692-42158749	2-4
hsa-mir-627	chr15:42491767-42491864	1-4
hsa-mir-1282	chr15:44085856-44085957	2-4
hsa-mir-147b	chr15:45725247-45725327	1-4
hsa-mir-1266	chr15:52569313-52569397	2-4
hsa-mir-628	chr15:55665137-55665232	1-4
hsa-mir-2116	chr15:59463381-59463461	2-4
hsa-mir-190	chr15:63116155-63116240	1-4
hsa-mir-422a	chr15:64163128-64163218	1-4
hsa-mir-1272	chr15:65054585-65054714	2-4
hsa-mir-4311	chr15:66332570-66332670	2-4
hsa-mir-4312	chr15:69094188-69094264	2-4
hsa-mir-629	chr15:70371710-70371807	1-4
hsa-mir-630	chr15:72879557-72879654	1-4
hsa-mir-631	chr15:75645951-75646026	1-4
hsa-mir-4313	chr15:76054555-76054656	2-4
hsa-mir-184	chr15:79502129-79502213	1-4
hsa-mir-549	chr15:81134318-81134414	1-4
hsa-mir-1276	chr15:86313726-86313809	2-4
hsa-mir-1179	chr15:89151337-89151428	2-4
hsa-mir-7-2	chr15:89155055-89155165	1-4
hsa-mir-9-3	chr15:89911247-89911337	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-3174	chr15:90549986-90550073	2-4
hsa-mir-3175	chr15:93447628-93447705	2-4
hsa-mir-1469	chr15:96876489-96876536	2-4
hsa-mir-548h-2	chr16:11400296-11400384	2-4
hsa-mir-193b	chr16:14397823-14397906	1-4
hsa-mir-365-1	chr16:14403141-14403228	1-4
hsa-mir-3179-1	chr16:14995364-14995448	2-4
hsa-mir-3180-1	chr16:15005076-15005170	2-4
hsa-mir-1972-1	chr16:15104177-15104254	2-4
hsa-mir-484	chr16:15737150-15737229	1-4
hsa-mir-3179-2	chr16:16394015-16394099	2-4
hsa-mir-3180-2	chr16:16403735-16403823	2-4
hsa-mir-3177	chr16:1784985-1785067	2-4
hsa-mir-3180-3	chr16:18496034-18496128	2-4
hsa-mir-3179-3	chr16:18505750-18505834	2-4
hsa-mir-1225	chr16:2140195-2140285	1-4
hsa-mir-940	chr16:2321747-2321841	1-4
hsa-mir-3178	chr16:2581922-2582006	2-4
hsa-mir-548w	chr16:26036557-26036631	2-4
hsa-mir-762	chr16:30905223-30905306	2-4
hsa-mir-1826	chr16:33965507-33965592	2-4
hsa-mir-3181	chr16:50776215-50776288	2-4
hsa-mir-138-2	chr16:56892429-56892513	1-4
hsa-mir-3176	chr16:593276-593366	2-4
hsa-mir-328	chr16:67236223-67236298	1-4
hsa-mir-1538	chr16:69599710-69599771	2-4
hsa-mir-140	chr16:69966983-69967083	1-4
hsa-mir-1972-2	chr16:70064248-70064325	2-4
hsa-mir-768	chr16:71792295-71792398	1
hsa-mir-662	chr16:820182-820277	1-4
hsa-mir-3182	chr16:83541950-83542013	2-4
hsa-mir-1910	chr16:85775226-85775306	2-4
hsa-mir-744	chr17:11985215-11985313	1-4
hsa-mir-548h-3	chr17:13446845-13446963	2-4
hsa-mir-22	chr17:1617196-1617281	1-4
hsa-mir-1288	chr17:16185327-16185402	2-4
hsa-mir-33b	chr17:17717149-17717245	1-4
hsa-mir-1180	chr17:19247818-19247887	2-4
hsa-mir-132	chr17:1953201-1953302	1-4
hsa-mir-212	chr17:1953564-1953674	1-4
hsa-mir-1253	chr17:2651371-2651476	2-4
hsa-mir-451	chr17:27188386-27188458	1-4
hsa-mir-144	chr17:27188550-27188636	1-4
hsa-mir-423	chr17:28444096-28444190	1-4
hsa-mir-3184	chr17:28444103-28444178	2-4
hsa-mir-193a	chr17:29887014-29887102	1-4
hsa-mir-365-2	chr17:29902429-29902540	1-4
hsa-mir-632	chr17:30677127-30677221	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-923	chr17:33478179-33478233	1
hsa-mir-2909	chr17:35391041-35391110	2-4
hsa-mir-2117	chr17:41522173-41522253	2-4
hsa-mir-4315-1	chr17:43552728-43552801	2-4
hsa-mir-152	chr17:46114526-46114613	1-4
hsa-mir-1203	chr17:46233788-46233873	2-4
hsa-mir-10a	chr17:46657199-46657309	1-4
hsa-mir-196a-1	chr17:46709851-46709921	1-4
hsa-mir-3185	chr17:46801769-46801837	2-4
hsa-mir-142	chr17:56408592-56408679	1-4
hsa-mir-454	chr17:57215118-57215233	1-4
hsa-mir-301a	chr17:57228496-57228582	1-4
hsa-mir-21	chr17:57918626-57918698	1-4
hsa-mir-633	chr17:61021575-61021673	1-4
hsa-mir-4315-2	chr17:62818147-62818220	2-4
hsa-mir-634	chr17:64783189-64783286	1-4
hsa-mir-548d-2	chr17:65467604-65467701	1-4
hsa-mir-635	chr17:66420591-66420689	1-4
hsa-mir-195	chr17:6920933-6921020	1-4
hsa-mir-497	chr17:6921229-6921341	1-4
hsa-mir-324	chr17:7126615-7126698	1-4
hsa-mir-636	chr17:74732531-74732630	1-4
hsa-mir-4316	chr17:75393065-75393136	2-4
hsa-mir-657	chr17:79099075-79099173	1-4
hsa-mir-3065	chr17:79099676-79099755	2-4
hsa-mir-338	chr17:79099682-79099749	1-4
hsa-mir-1250	chr17:79106995-79107108	2-4
hsa-mir-3186	chr17:79418129-79418214	2-4
hsa-mir-4314	chr17:7991373-7991465	2-4
hsa-mir-3183	chr17:925715-925799	2-4
hsa-mir-3156-2	chr18:14830164-14830241	2-4
hsa-mir-320c-1	chr18:19263470-19263558	2-4
hsa-mir-133a-1	chr18:19405658-19405746	1-4
hsa-mir-1-2	chr18:19408964-19409049	1-4
hsa-mir-320c-2	chr18:21901649-21901699	2-4
hsa-mir-302f	chr18:27878875-27878926	2-4
hsa-mir-187	chr18:33484780-33484889	1-4
hsa-mir-4318	chr18:35237097-35237178	2-4
hsa-mir-924	chr18:37202086-37202139	1-4
hsa-mir-4319	chr18:42550046-42550131	2-4
hsa-mir-1539	chr18:47013742-47013792	2-4
hsa-mir-4320	chr18:47652868-47652933	2-4
hsa-mir-122	chr18:56118305-56118390	1-4
hsa-mir-4317	chr18:6374359-6374424	2-4
hsa-mir-4322	chr19:10341088-10341161	2-4
hsa-mir-1181	chr19:10514133-10514214	2-4
hsa-mir-1238	chr19:10662797-10662880	1-4
hsa-mir-638	chr19:10829079-10829179	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-199a-1	chr19:10928101-10928172	1-4
hsa-mir-24-2	chr19:13947100-13947173	1-4
hsa-mir-27a	chr19:13947253-13947331	1-4
hsa-mir-23a	chr19:13947400-13947473	1-4
hsa-mir-181c	chr19:13985512-13985622	1-4
hsa-mir-181d	chr19:13985688-13985825	1-4
hsa-mir-639	chr19:14640354-14640452	1-4
hsa-mir-1470	chr19:15560358-15560419	2-4
hsa-mir-1909	chr19:1816157-1816237	2-4
hsa-mir-3188	chr19:18392886-18392971	2-4
hsa-mir-3189	chr19:18497371-18497444	2-4
hsa-mir-640	chr19:19545871-19545967	1-4
hsa-mir-1270-1	chr19:20510080-20510163	2-4
hsa-mir-1270-2	chr19:20579239-20579322	2-4
hsa-mir-1227	chr19:2234060-2234148	1-4
hsa-mir-4321	chr19:2250637-2250717	2-4
hsa-mir-637	chr19:3961411-3961510	1-4
hsa-mir-641	chr19:40788449-40788548	1-4
hsa-mir-4323	chr19:42637596-42637665	2-4
hsa-mir-330	chr19:46142251-46142345	1-4
hsa-mir-642	chr19:46178185-46178282	1-4
hsa-mir-769	chr19:46522189-46522307	1-4
hsa-mir-320e	chr19:47212549-47212602	2-4
hsa-mir-7-3	chr19:4770681-4770791	1-4
hsa-mir-3190	chr19:47730198-47730278	2-4
hsa-mir-3191	chr19:47730200-47730276	2-4
hsa-mir-220c	chr19:49063528-49063611	1-4
hsa-mir-4324	chr19:49812053-49812125	2-4
hsa-mir-150	chr19:50004041-50004125	1-4
hsa-mir-99b	chr19:52195864-52195934	1-4
hsa-let-7e	chr19:52196038-52196117	1-4
hsa-mir-125a	chr19:52196506-52196592	1-4
hsa-mir-643	chr19:52785049-52785146	1-4
hsa-mir-512-1	chr19:54169932-54170016	1-4
hsa-mir-512-2	chr19:54172410-54172508	1-4
hsa-mir-1323	chr19:54175221-54175294	2-4
hsa-mir-498	chr19:54177450-54177574	1-4
hsa-mir-520e	chr19:54178964-54179051	1-4
hsa-mir-515-1	chr19:54182256-54182339	1-4
hsa-mir-519e	chr19:54183193-54183277	1-4
hsa-mir-520f	chr19:54185412-54185499	1-4
hsa-mir-515-2	chr19:54188262-54188345	1-4
hsa-mir-519c	chr19:54189722-54189809	1-4
hsa-mir-1283-1	chr19:54191734-54191821	2-4
hsa-mir-520a	chr19:54194134-54194219	1-4
hsa-mir-526b	chr19:54197646-54197729	1-4
hsa-mir-519b	chr19:54198466-54198547	1-4
hsa-mir-525	chr19:54200786-54200871	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-523	chr19:54201638-54201725	1-4
hsa-mir-518f	chr19:54203268-54203355	1-4
hsa-mir-520b	chr19:54204480-54204541	1-4
hsa-mir-518b	chr19:54205990-54206073	1-4
hsa-mir-526a-1	chr19:54209505-54209590	1-4
hsa-mir-520c	chr19:54210706-54210793	1-4
hsa-mir-518c	chr19:54211988-54212089	1-4
hsa-mir-524	chr19:54214255-54214342	1-4
hsa-mir-517a	chr19:54215521-54215608	1-4
hsa-mir-519d	chr19:54216600-54216688	1-4
hsa-mir-521-2	chr19:54219847-54219934	1-4
hsa-mir-520d	chr19:54223349-54223436	1-4
hsa-mir-517b	chr19:54224329-54224396	1-4
hsa-mir-520g	chr19:54225419-54225509	1-4
hsa-mir-516b-2	chr19:54228695-54228780	1-4
hsa-mir-526a-2	chr19:54230175-54230240	1-4
hsa-mir-518e	chr19:54233091-54233179	1-4
hsa-mir-518a-1	chr19:54234259-54234344	1-4
hsa-mir-518d	chr19:54238130-54238217	1-4
hsa-mir-516b-1	chr19:54240098-54240188	1-4
hsa-mir-518a-2	chr19:54242586-54242673	1-4
hsa-mir-517c	chr19:54244566-54244661	1-4
hsa-mir-520h	chr19:54245765-54245853	1-4
hsa-mir-521-1	chr19:54251889-54251976	1-4
hsa-mir-522	chr19:54254464-54254551	1-4
hsa-mir-519a-1	chr19:54255650-54255735	1-4
hsa-mir-527	chr19:54257271-54257356	1-4
hsa-mir-516a-1	chr19:54259994-54260084	1-4
hsa-mir-1283-2	chr19:54261485-54261572	2-4
hsa-mir-516a-2	chr19:54264386-54264476	1-4
hsa-mir-519a-2	chr19:54265597-54265684	1-4
hsa-mir-371	chr19:54290928-54290995	1-4
hsa-mir-372	chr19:54291143-54291210	1-4
hsa-mir-373	chr19:54291958-54292027	1-4
hsa-mir-935	chr19:54485560-54485651	1-4
hsa-mir-1274b	chr19:58024374-58024441	2-4
hsa-mir-220b	chr19:6495958-6496045	1-4
hsa-mir-1302-11	chr19:71972-72110	2-4
hsa-mir-3187	chr19:813583-813653	2-4
hsa-mir-4261	chr2:10332739-10332797	2-4
hsa-mir-4265	chr2:109757945-109758044	2-4
hsa-mir-4266	chr2:109930026-109930081	2-4
hsa-mir-4267	chr2:110827537-110827619	2-4
hsa-mir-1302-3	chr2:114340535-114340673	2-4
hsa-mir-548s	chr2:11907569-11907651	2-4
hsa-mir-4262	chr2:11977058-11977112	2-4
hsa-mir-3125	chr2:12877492-12877570	2-4
hsa-mir-663b	chr2:133014538-133014653	2-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-128-1	chr2:136422966-136423048	1-4
hsa-mir-933	chr2:176032360-176032437	1-4
hsa-mir-10b	chr2:177015030-177015140	1-4
hsa-mir-1246	chr2:177465707-177465780	2-4
hsa-mir-3128	chr2:178120672-178120738	2-4
hsa-mir-1258	chr2:180725562-180725635	2-4
hsa-mir-561	chr2:189162218-189162315	1-4
hsa-mir-1245	chr2:189842817-189842887	2-4
hsa-mir-3129	chr2:189997761-189997837	2-4
hsa-mir-3130-1	chr2:207647957-207648032	2-4
hsa-mir-3130-2	chr2:207647957-207648032	2-4
hsa-mir-3130-3	chr2:207647959-207648030	2-4
hsa-mir-3130-4	chr2:207647959-207648030	2-4
hsa-mir-2355	chr2:207974710-207974797	2-4
hsa-mir-1302-4	chr2:208133998-208134148	2-4
hsa-mir-548f-2	chr2:213290986-213291084	2-4
hsa-mir-26b	chr2:219267368-219267445	1-4
hsa-mir-375	chr2:219866366-219866430	1-4
hsa-mir-3131	chr2:219923409-219923472	2-4
hsa-mir-153-1	chr2:220158832-220158922	1-4
hsa-mir-3132	chr2:220413794-220413869	2-4
hsa-mir-4268	chr2:220771222-220771286	2-4
hsa-mir-1244-1	chr2:232578023-232578108	2-4
hsa-mir-1471	chr2:232756951-232757008	2-4
hsa-mir-562	chr2:233037362-233037457	1-4
hsa-mir-4269	chr2:240227156-240227240	2-4
hsa-mir-149	chr2:241395417-241395506	1-4
hsa-mir-3133	chr2:242417319-242417397	2-4
hsa-mir-1301	chr2:25551508-25551590	2-4
hsa-mir-4263	chr2:28219233-28219316	2-4
hsa-mir-558	chr2:32757219-32757313	1-4
hsa-mir-559	chr2:47604813-47604909	1-4
hsa-mir-217	chr2:56210101-56210211	1-4
hsa-mir-216a	chr2:56216084-56216194	1-4
hsa-mir-216b	chr2:56227848-56227930	1-4
hsa-mir-3126	chr2:69330813-69330887	2-4
hsa-mir-1285-2	chr2:70480049-70480137	2-4
hsa-mir-4264	chr2:79876419-79876485	2-4
hsa-mir-3127	chr2:97464014-97464090	2-4
hsa-mir-3192	chr20:18451258-18451335	2-4
hsa-mir-663	chr20:26188821-26188914	1-4
hsa-mir-1292	chr20:2633422-2633488	2-4
hsa-mir-3193	chr20:30194988-30195043	2-4
hsa-mir-1825	chr20:30825597-30825650	2-4
hsa-mir-644	chr20:33054129-33054223	1-4
hsa-mir-499	chr20:33578178-33578300	1-4
hsa-mir-1289-1	chr20:34041775-34041919	2-4
hsa-mir-103-2	chr20:3898140-3898218	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-103-2-as	chr20:3898148-3898210	2-4
hsa-mir-1259	chr20:47896846-47896957	2-4
hsa-mir-645	chr20:49202322-49202416	1-4
hsa-mir-1302-5	chr20:49231172-49231322	2-4
hsa-mir-3194	chr20:50069441-50069514	2-4
hsa-mir-4325	chr20:55896557-55896647	2-4
hsa-mir-296	chr20:57392669-57392749	1-4
hsa-mir-298	chr20:57393280-57393368	1-4
hsa-mir-646	chr20:58883531-58883625	1-4
hsa-mir-1257	chr20:60528601-60528718	2-4
hsa-mir-3195	chr20:60639857-60639941	2-4
hsa-mir-1-1	chr20:61151512-61151583	1-4
hsa-mir-133a-2	chr20:61162118-61162220	1-4
hsa-mir-124-3	chr20:61809851-61809938	1-4
hsa-mir-3196	chr20:61870130-61870194	2-4
hsa-mir-4326	chr20:61918159-61918218	2-4
hsa-mir-941-1	chr20:62550793-62550882	1-4
hsa-mir-941-2	chr20:62551100-62551189	1-4
hsa-mir-941-3	chr20:62551212-62551301	1-4
hsa-mir-1914	chr20:62572817-62572897	2-4
hsa-mir-647	chr20:62573983-62574079	1-4
hsa-mir-3156-3	chr21:14778704-14778781	2-4
hsa-mir-3118-5	chr21:15017095-15017171	2-4
hsa-mir-99a	chr21:17911408-17911489	1-4
hsa-let-7c	chr21:17912147-17912231	1-4
hsa-mir-125b-2	chr21:17962556-17962645	1-4
hsa-mir-548x	chr21:20058407-20058482	2-4
hsa-mir-155	chr21:26946291-26946356	1-4
hsa-mir-4327	chr21:31747611-31747696	2-4
hsa-mir-802	chr21:37093012-37093106	1-4
hsa-mir-3197	chr21:42539483-42539556	2-4
hsa-mir-3198	chr22:18246945-18247025	2-4
hsa-mir-648	chr22:18463633-18463727	1-4
hsa-mir-185	chr22:20020661-20020743	1-4
hsa-mir-1306	chr22:20073580-20073665	2-4
hsa-mir-1286	chr22:20236656-20236734	2-4
hsa-mir-649	chr22:21388464-21388561	1-4
hsa-mir-301b	chr22:22007269-22007347	1-4
hsa-mir-130b	chr22:22007592-22007674	1-4
hsa-mir-650	chr22:23165269-23165365	1-4
hsa-mir-548j	chr22:26951177-26951289	2-4
hsa-mir-3199-1	chr22:28316512-28316600	2-4
hsa-mir-3199-2	chr22:28316513-28316599	2-4
hsa-mir-3200	chr22:31127543-31127628	2-4
hsa-mir-658	chr22:38240278-38240378	1-4
hsa-mir-659	chr22:38243684-38243781	1-4
hsa-mir-1281	chr22:41488516-41488570	2-4
hsa-mir-33a	chr22:42296947-42297016	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-1249	chr22:45596834-45596900	2-4
hsa-let-7a-3	chr22:46508628-46508702	1-4
hsa-let-7b	chr22:46509565-46509648	1-4
hsa-mir-3201	chr22:48670175-48670227	2-4
hsa-mir-378b	chr3:10371912-10371969	2-4
hsa-mir-885	chr3:10436172-10436246	1-4
hsa-mir-567	chr3:111831647-111831745	1-4
hsa-mir-568	chr3:114035321-114035416	1-4
hsa-mir-198	chr3:120114514-120114576	1-4
hsa-mir-544b	chr3:124451285-124451363	2-4
hsa-mir-548i-1	chr3:125509246-125509395	2-4
hsa-mir-1280	chr3:128081007-128081101	2-4
hsa-mir-4270	chr3:15537745-15537815	2-4
hsa-mir-3134	chr3:15738804-15738878	2-4
hsa-mir-563	chr3:15915277-15915356	1-4
hsa-mir-15b	chr3:160122375-160122473	1-4
hsa-mir-16-2	chr3:160122532-160122613	1-4
hsa-mir-1263	chr3:163889258-163889344	2-4
hsa-mir-720	chr3:164059128-164059238	2-4
hsa-mir-551b	chr3:168269641-168269737	1-4
hsa-mir-569	chr3:170824452-170824548	1-4
hsa-mir-1224	chr3:183959192-183959277	1-4
hsa-mir-1248	chr3:186504460-186504566	2-4
hsa-mir-28	chr3:188406568-188406654	1-4
hsa-mir-944	chr3:189547710-189547798	1-4
hsa-mir-3137	chr3:194855234-194855309	2-4
hsa-mir-570	chr3:195426271-195426368	1-4
hsa-mir-922	chr3:197401366-197401447	1-4
hsa-mir-3135	chr3:20179056-20179133	2-4
hsa-mir-466	chr3:31203195-31203279	2-4
hsa-mir-128-2	chr3:35785967-35786051	1-4
hsa-mir-26a-1	chr3:38010894-38010971	1-4
hsa-mir-138-1	chr3:44155703-44155802	1-4
hsa-mir-564	chr3:44903379-44903473	1-4
hsa-mir-1226	chr3:47891044-47891119	1-4
hsa-mir-2115	chr3:48357849-48357949	2-4
hsa-mir-711	chr3:48616334-48616410	2-4
hsa-mir-425	chr3:49057580-49057667	1-4
hsa-mir-191	chr3:49058050-49058142	1-4
hsa-mir-4271	chr3:49311552-49311619	2-4
hsa-mir-566	chr3:50210758-50210852	1-4
hsa-let-7g	chr3:52302293-52302377	1-4
hsa-mir-135a-1	chr3:52328234-52328324	1-4
hsa-mir-4272	chr3:67275887-67275951	2-4
hsa-mir-3136	chr3:69098108-69098186	2-4
hsa-mir-1284	chr3:71591120-71591240	2-4
hsa-mir-1324	chr3:75679913-75680009	2-4
hsa-mir-4273	chr3:75787430-75787514	2-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-3138	chr4:10080234-10080316	2-4
hsa-mir-1255a	chr4:102251458-102251571	2-4
hsa-mir-576	chr4:110409853-110409951	1-4
hsa-mir-297	chr4:111781737-111781803	1-4
hsa-mir-367	chr4:113569029-113569097	1-4
hsa-mir-302d	chr4:113569159-113569227	1-4
hsa-mir-302a	chr4:113569338-113569407	1-4
hsa-mir-302c	chr4:113569518-113569586	1-4
hsa-mir-302b	chr4:113569640-113569713	1-4
hsa-mir-572	chr4:11370450-11370545	1-4
hsa-mir-1243	chr4:114028018-114028111	2-4
hsa-mir-577	chr4:115577914-115578010	1-4
hsa-mir-1973	chr4:117220880-117220924	2-4
hsa-mir-2054	chr4:126428413-126428462	2-4
hsa-mir-3139	chr4:144264612-144264688	2-4
hsa-mir-548g	chr4:148265780-148265869	2-4
hsa-mir-3140	chr4:153410478-153410568	2-4
hsa-mir-578	chr4:166307393-166307489	1-4
hsa-mir-1979	chr4:166321813-166321889	2-4
hsa-mir-548t	chr4:174189310-174189384	2-4
hsa-mir-4276	chr4:175344945-175345015	2-4
hsa-mir-1305	chr4:183090445-183090531	2-4
hsa-mir-943	chr4:1988110-1988204	1-4
hsa-mir-218-1	chr4:20529897-20530007	1-4
hsa-mir-573	chr4:24521814-24521913	1-4
hsa-mir-4275	chr4:28821203-28821290	2-4
hsa-mir-571	chr4:343945-344041	1-4
hsa-mir-1255b-1	chr4:36427987-36428050	2-4
hsa-mir-574	chr4:38869652-38869748	1-4
hsa-mir-1269	chr4:67142541-67142646	2-4
hsa-mir-4274	chr4:7461754-7461845	2-4
hsa-mir-95	chr4:8007027-8007108	1-4
hsa-mir-575	chr4:83674489-83674583	1-4
hsa-mir-548i-2	chr4:9557788-9557937	2-4
hsa-mir-548p	chr5:100152185-100152269	2-4
hsa-mir-548f-3	chr5:109849529-109849616	2-4
hsa-mir-1244-2	chr5:118310280-118310365	2-4
hsa-mir-1289-2	chr5:132763287-132763398	2-4
hsa-mir-886	chr5:135416176-135416297	1-4
hsa-mir-874	chr5:136983260-136983338	1-4
hsa-mir-584	chr5:148441875-148441972	1-4
hsa-mir-143	chr5:148808480-148808586	1-4
hsa-mir-145	chr5:148810208-148810296	1-4
hsa-mir-378	chr5:149112387-149112453	1-4
hsa-mir-1294	chr5:153726665-153726807	2-4
hsa-mir-3141	chr5:153975571-153975632	2-4
hsa-mir-1303	chr5:154065335-154065421	2-4
hsa-mir-887	chr5:15935290-15935369	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-3142	chr5:159901408-159901490	2-4
hsa-mir-146a	chr5:159912358-159912457	1-4
hsa-mir-103-1	chr5:167987900-167987978	1-4
hsa-mir-103-1-as	chr5:167987908-167987970	2-4
hsa-mir-218-2	chr5:168195150-168195260	1-4
hsa-mir-585	chr5:168690604-168690698	1-4
hsa-mir-4277	chr5:1708899-1708983	2-4
hsa-mir-1271	chr5:175794948-175795034	2-4
hsa-mir-4281	chr5:176056439-176056501	2-4
hsa-mir-1229	chr5:179225277-179225346	1-4
hsa-mir-340	chr5:179442302-179442397	1-4
hsa-mir-4279	chr5:31936207-31936265	2-4
hsa-mir-579	chr5:32394483-32394581	1-4
hsa-mir-580	chr5:36147993-36148090	1-4
hsa-mir-1274a	chr5:41475733-41475804	2-4
hsa-mir-581	chr5:53247333-53247429	1-4
hsa-mir-449a	chr5:54466359-54466450	1-4
hsa-mir-449b	chr5:54466473-54466570	1-4
hsa-mir-449c	chr5:54468089-54468181	2-4
hsa-mir-582	chr5:58999431-58999529	1-4
hsa-mir-4278	chr5:6827965-6828034	2-4
hsa-mir-4280	chr5:86410695-86410771	2-4
hsa-mir-9-2	chr5:87962670-87962757	1-4
hsa-mir-2277	chr5:92956401-92956494	2-4
hsa-mir-583	chr5:95414841-95414916	1-4
hsa-mir-587	chr6:107231999-107232095	1-4
hsa-mir-548b	chr6:119390211-119390308	1-4
hsa-mir-3144	chr6:120336324-120336403	2-4
hsa-mir-588	chr6:126805776-126805859	1-4
hsa-mir-548a-2	chr6:135560297-135560394	1-4
hsa-mir-3145	chr6:138756349-138756431	2-4
hsa-mir-1273c	chr6:155174493-155174570	2-4
hsa-mir-1202	chr6:156267930-156268013	2-4
hsa-mir-1913	chr6:166922841-166922921	2-4
hsa-mir-548a-1	chr6:18572014-18572111	1-4
hsa-mir-3143	chr6:27115404-27115467	2-4
hsa-mir-877	chr6:30552108-30552194	1-4
hsa-mir-1236	chr6:31924615-31924717	1-4
hsa-mir-219-1	chr6:33175611-33175721	1-4
hsa-mir-1275	chr6:33967748-33967828	2-4
hsa-mir-586	chr6:45165410-45165507	1-4
hsa-mir-206	chr6:52009146-52009232	1-4
hsa-mir-133b	chr6:52013720-52013839	1-4
hsa-mir-548u	chr6:57254929-57255010	2-4
hsa-mir-30c-2	chr6:72086662-72086734	1-4
hsa-mir-30a	chr6:72113253-72113324	1-4
hsa-mir-4282	chr6:73677409-73677476	2-4
hsa-mir-2113	chr6:98472406-98472497	2-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-4285	chr7:101936368-101936453	2-4
hsa-mir-548o	chr7:102046188-102046302	2-4
hsa-mir-339	chr7:1062568-1062662	1-4
hsa-mir-592	chr7:126698141-126698238	1-4
hsa-mir-593	chr7:127721912-127722012	1-4
hsa-mir-129-1	chr7:127847924-127847996	1-4
hsa-mir-182	chr7:129410222-129410332	1-4
hsa-mir-96	chr7:129414531-129414609	1-4
hsa-mir-183	chr7:129414744-129414854	1-4
hsa-mir-335	chr7:130135951-130136045	1-4
hsa-mir-29a	chr7:130561505-130561569	1-4
hsa-mir-29b-1	chr7:130562217-130562298	1-4
hsa-mir-490	chr7:136587913-136588041	1-4
hsa-mir-548f-4	chr7:147075108-147075213	2-4
hsa-mir-1975	chr7:148638579-148638654	2-4
hsa-mir-671	chr7:150935506-150935624	1-4
hsa-mir-153-2	chr7:157367027-157367114	1-4
hsa-mir-595	chr7:158325409-158325505	1-4
hsa-mir-1302-6	chr7:18166842-18166932	2-4
hsa-mir-3146	chr7:19744980-19745059	2-4
hsa-mir-1183	chr7:21510675-21510764	2-4
hsa-mir-148a	chr7:25989538-25989606	1-4
hsa-mir-196b	chr7:27209098-27209182	1-4
hsa-mir-550-1	chr7:30329409-30329506	1-4
hsa-mir-550-2	chr7:32772592-32772689	1-4
hsa-mir-548n	chr7:34980371-34980446	2-4
hsa-mir-1200	chr7:36958961-36959037	2-4
hsa-mir-589	chr7:5535449-5535548	1-4
hsa-mir-4283-1	chr7:57023491-57023571	2-4
hsa-mir-3147	chr7:57472730-57472796	2-4
hsa-mir-4283-2	chr7:63081467-63081547	2-4
hsa-mir-4284	chr7:73125646-73125727	2-4
hsa-mir-590	chr7:73605527-73605624	1-4
hsa-mir-1285-1	chr7:91833328-91833412	2-4
hsa-mir-653	chr7:93112071-93112167	1-4
hsa-mir-489	chr7:93113247-93113331	1-4
hsa-mir-591	chr7:95848973-95849068	1-4
hsa-mir-25	chr7:99691182-99691266	1-4
hsa-mir-93	chr7:99691390-99691470	1-4
hsa-mir-106b	chr7:99691615-99691697	1-4
hsa-mir-599	chr8:100548863-100548958	1-4
hsa-mir-875	chr8:100549013-100549089	1-4
hsa-mir-1273	chr8:101036209-101036312	2-4
hsa-mir-3151	chr8:104166841-104166917	2-4
hsa-mir-4286	chr8:10524487-10524580	2-4
hsa-mir-548a-3	chr8:105496596-105496693	1-4
hsa-mir-1322	chr8:10682882-10682953	2-4
hsa-mir-598	chr8:10892715-10892812	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-2053	chr8:113655721-113655812	2-4
hsa-mir-548c-1	chr8:124360273-124360370	1-4
hsa-mir-1204	chr8:128808207-128808274	2-4
hsa-mir-1205	chr8:128972878-128972941	2-4
hsa-mir-1206	chr8:129021143-129021202	2-4
hsa-mir-1207	chr8:129061397-129061484	2-4
hsa-mir-1208	chr8:129162361-129162434	2-4
hsa-mir-30b	chr8:135812762-135812850	1-4
hsa-mir-30d	chr8:135817118-135817188	1-4
hsa-mir-151	chr8:141742662-141742752	1-4
hsa-mir-1302-7	chr8:142867602-142867674	2-4
hsa-mir-937	chr8:144895126-144895212	1-4
hsa-mir-661	chr8:145019358-145019447	1-4
hsa-mir-939	chr8:145619363-145619445	1-4
hsa-mir-1234	chr8:145625475-145625559	1-4
hsa-mir-383	chr8:14710946-14711019	1-4
hsa-mir-548v	chr8:17539086-17539166	2-4
hsa-mir-596	chr8:1765396-1765473	1-4
hsa-mir-320a	chr8:22102474-22102556	2-4
hsa-mir-320	chr8:22102475-22102556	1
hsa-mir-548h-4	chr8:26906369-26906480	2-4
hsa-mir-4287	chr8:27743555-27743633	2-4
hsa-mir-4288	chr8:28362632-28362699	2-4
hsa-mir-3148	chr8:29814787-29814864	2-4
hsa-mir-486	chr8:41517958-41518026	1-4
hsa-mir-124-2	chr8:65291705-65291814	1-4
hsa-mir-2052	chr8:75617927-75617982	2-4
hsa-mir-3149	chr8:77879003-77879086	2-4
hsa-mir-548i-3	chr8:7946462-7946611	2-4
hsa-mir-597	chr8:9599181-9599278	1-4
hsa-mir-3150	chr8:96085141-96085221	2-4
hsa-mir-124-1	chr8:9760897-9760982	1-4
hsa-mir-1302-8	chr9:100125835-100125963	2-4
hsa-mir-32	chr9:111808508-111808578	1-4
hsa-mir-455	chr9:116971713-116971809	1-4
hsa-mir-147	chr9:123007256-123007328	1-4
hsa-mir-600	chr9:125873824-125873922	1-4
hsa-mir-601	chr9:126164803-126164882	1-4
hsa-mir-181a-2	chr9:127454720-127454830	1-4
hsa-mir-181b-2	chr9:127455988-127456077	1-4
hsa-mir-2861	chr9:130548196-130548286	2-4
hsa-mir-199b	chr9:131006999-131007109	1-4
hsa-mir-3154	chr9:131007225-131007309	2-4
hsa-mir-219-2	chr9:131154896-131154993	1-4
hsa-mir-126	chr9:139565053-139565138	1-4
hsa-mir-4292	chr9:139725408-139725475	2-4
hsa-mir-602	chr9:140732870-140732968	1-4
hsa-mir-3152	chr9:18573303-18573377	2-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-491	chr9:20716103-20716187	1-4
hsa-mir-31	chr9:21512113-21512184	1-4
hsa-mir-876	chr9:28863623-28863704	1-4
hsa-mir-873	chr9:28888876-28888953	1-4
hsa-mir-1302-9	chr9:30143-30281	2-4
hsa-mir-101-2	chr9:4850296-4850375	1-4
hsa-mir-1299	chr9:69002238-69002321	2-4
hsa-mir-204	chr9:73424890-73425000	1-4
hsa-mir-7-1	chr9:86584662-86584772	1-4
hsa-mir-4289	chr9:91360750-91360820	2-4
hsa-mir-3153	chr9:91927139-91927221	2-4
hsa-mir-4290	chr9:92785722-92785817	2-4
hsa-mir-4291	chr9:96581638-96581703	2-4
hsa-let-7a-1	chr9:96938238-96938318	1-4
hsa-let-7f-1	chr9:96938628-96938715	1-4
hsa-let-7d	chr9:96941115-96941202	1-4
hsa-mir-2278	chr9:97572243-97572339	2-4
hsa-mir-23b	chr9:97847489-97847586	1-4
hsa-mir-27b	chr9:97847726-97847823	1-4
hsa-mir-3074	chr9:97848295-97848376	2-4
hsa-mir-24-1	chr9:97848302-97848370	1-4
hsa-mir-652	chrX:109298556-109298654	1-4
hsa-mir-4329	chrX:112023945-112024016	2-4
hsa-mir-764	chrX:113873917-113874002	2-4
hsa-mir-1912	chrX:113886018-113886098	2-4
hsa-mir-1264	chrX:113887129-113887198	2-4
hsa-mir-1298	chrX:113949649-113949761	2-4
hsa-mir-1911	chrX:113997743-113997823	2-4
hsa-mir-448	chrX:114058016-114058127	1-4
hsa-mir-1277	chrX:117520356-117520434	2-4
hsa-mir-766	chrX:118780700-118780811	1-4
hsa-mir-220a	chrX:122695945-122696055	1-4
hsa-mir-363	chrX:133303407-133303482	1-4
hsa-mir-92a-2	chrX:133303567-133303642	1-4
hsa-mir-19b-2	chrX:133303700-133303796	1-4
hsa-mir-20b	chrX:133303838-133303907	1-4
hsa-mir-18b	chrX:133304070-133304141	1-4
hsa-mir-106a	chrX:133304227-133304308	1-4
hsa-mir-450b	chrX:133674214-133674292	1-4
hsa-mir-450a-1	chrX:133674370-133674461	1-4
hsa-mir-450a-2	chrX:133674537-133674637	1-4
hsa-mir-542	chrX:133675370-133675467	1-4
hsa-mir-503	chrX:133680357-133680428	1-4
hsa-mir-424	chrX:133680643-133680741	1-4
hsa-mir-934	chrX:135633036-135633119	1-4
hsa-mir-504	chrX:137749871-137749954	1-4
hsa-mir-505	chrX:139006306-139006390	1-4
hsa-mir-320d-2	chrX:140008336-140008384	2-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-890	chrX:145075792-145075869	1-4
hsa-mir-888	chrX:145076301-145076378	1-4
hsa-mir-892a	chrX:145078186-145078261	1-4
hsa-mir-892b	chrX:145078715-145078792	1-4
hsa-mir-891b	chrX:145082570-145082649	1-4
hsa-mir-891a	chrX:145109311-145109390	1-4
hsa-mir-513c	chrX:146271221-146271305	1-4
hsa-mir-513b	chrX:146280561-146280645	1-4
hsa-mir-513a-1	chrX:146294980-146295109	1-4
hsa-mir-513a-2	chrX:146307343-146307470	1-4
hsa-mir-506	chrX:146312237-146312361	1-4
hsa-mir-507	chrX:146312501-146312595	1-4
hsa-mir-508	chrX:146318430-146318545	1-4
hsa-mir-514b	chrX:146331668-146331748	2-4
hsa-mir-509-2	chrX:146340277-146340368	1-4
hsa-mir-509-3	chrX:146341169-146341244	1-4
hsa-mir-509-1	chrX:146342049-146342143	1-4
hsa-mir-510	chrX:146353852-146353926	1-4
hsa-mir-514-1	chrX:146360764-146360862	1-4
hsa-mir-514-2	chrX:146363460-146363548	1-4
hsa-mir-514-3	chrX:146366158-146366246	1-4
hsa-mir-2114	chrX:149396238-149396318	2-4
hsa-mir-4330	chrX:150336693-150336798	2-4
hsa-mir-224	chrX:151127049-151127130	1-4
hsa-mir-452	chrX:151128099-151128184	1-4
hsa-mir-105-1	chrX:151560690-151560771	1-4
hsa-mir-767	chrX:151561892-151562001	1-4
hsa-mir-105-2	chrX:151562883-151562964	1-4
hsa-mir-3202-1	chrX:153246547-153246628	2-4
hsa-mir-3202-2	chrX:153246548-153246627	2-4
hsa-mir-718	chrX:153285370-153285440	2-4
hsa-mir-1184-1	chrX:154115634-154115733	2-4
hsa-mir-1184-2	chrX:154612748-154612847	2-4
hsa-mir-1184-3	chrX:154687177-154687276	2-4
hsa-mir-1308	chrX:22080258-22080312	2-4
hsa-mir-548f-5	chrX:32659590-32659676	2-4
hsa-mir-221	chrX:45605584-45605694	1-4
hsa-mir-222	chrX:45606420-45606530	1-4
hsa-mir-532	chrX:49767753-49767844	1-4
hsa-mir-188	chrX:49768108-49768194	1-4
hsa-mir-500	chrX:49773038-49773122	1-4
hsa-mir-362	chrX:49773571-49773636	1-4
hsa-mir-501	chrX:49774329-49774413	1-4
hsa-mir-500b	chrX:49775279-49775358	2-4
hsa-mir-660	chrX:49777848-49777945	1-4
hsa-mir-502	chrX:49779205-49779291	1-4
hsa-mir-98	chrX:53583183-53583302	1-4
hsa-let-7f-2	chrX:53584152-53584235	1-4

miRNA	Posición (hg19)	Versión del array
hsa-mir-1468	chrX:63005881-63005967	2-4
hsa-mir-223	chrX:65238711-65238821	1-4
hsa-mir-421	chrX:73438211-73438296	1-4
hsa-mir-374b	chrX:73438381-73438453	1-4
hsa-mir-545	chrX:73506938-73507044	1-4
hsa-mir-374a	chrX:73507120-73507192	1-4
hsa-mir-384	chrX:76139697-76139785	1-4
hsa-mir-325	chrX:76225828-76225926	1-4
hsa-mir-4328	chrX:78156690-78156746	2-4
hsa-mir-651	chrX:8095005-8095102	1-4
hsa-mir-548i-4	chrX:83480759-83480836	2-4
hsa-mir-1321	chrX:85090784-85090863	2-4
hsa-mir-361	chrX:85158640-85158712	1-4
hsa-mir-548m	chrX:94318139-94318225	2-4

Gris: miRNA que con nuestro diseño no tienen una sonda clasificada como miRNA a ± 70 pb de dicho miRNA.

Negrita: miRNA considerados de alto interés en el momento del diseño. Basado en la información recogida de las publicaciones de Sempere *et al.* (2004) y Forero *et al.* (2010,) donde se indican miRNA enriquecidos en cerebro humano, desregulados en pacientes o animales con enfermedades mentales, o implicados en mecanismos funcionales del cerebro y las neuronas.

La plataforma de Agilent Technologies permite el diseño de arrays a la carta utilizando sondas prediseñadas que se encuentra accesible a través de su herramienta online (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>), pudiendo hacer una selección de sondas en base a distintos criterios, tal y como se muestra en los ejemplos de la figura 106. Los distintos parámetros que definen la búsqueda son los siguientes:

Información general: En ella se indica el nombre que se quiere dar a la búsqueda de sondas que se va a realizar, la especie y la versión del genoma a utilizar. En nuestro caso, el primer diseño se realizó inicialmente en Hg18, pero posteriormente, junto al resto de versiones, se utilizó la versión del genoma Hg19 (GRCh37).

Opciones de intervalo: En este apartado se pueden definir distintas características que delimitan la región donde se quieren seleccionar las sondas:

- **Región:** Se pueden especificar las coordenadas genómicas (*Genome interval*) o directamente el nombre de los genes (*Gene annotation*). Además se puede expandir la búsqueda en la dirección 3' o/y 5' el número de pb deseado. Esta opción se ha utilizado por un lado, para las sondas de miRNAs, donde se ha ampliado 70 pb en las dos direcciones de la posición de cada miRNA; y por otro, para las sondas de la región promotora de los genes (de la versión 2-4), separando primero el listado de genes en dos grupos según su orientación, y pidiendo después las sondas de cada grupo ampliando 500 pb en la dirección 5' de cada gene.

- **Criterios de inclusión:** Permite especificar si se quieren seleccionar sondas localizadas en exones, en región intragénica, o en cualquier región. Además, en el caso de las sondas exónicas, se puede seleccionar el nivel de confianza (bajo, medio o alto), que indica la confianza relativa en la fuente que se utiliza para delimitar un gen. Un nivel de confianza alto solo utilizará genes

que codifican para proteínas, mientras que un nivel medio puede considerarse como gen aquellos predichos. En la primera versión del array se utilizó un nivel de confianza medio, y se observó que había un gran número de sondas que se localizaban en región intrónica y no exónica como se había especificado. Consultando con el servicio técnico de Agilent nos recomendaron la utilización de un nivel de confianza alto. En las sucesivas versiones se utilizó por tanto un nivel de confianza alto, comprobando que todos nuestros genes tenían sondas. En los casos en que algún gen se encontrara muy pobremente representado, se realizó una nueva búsqueda de sondas específicas para dicho gen.

- **Criterios de exclusión:** Se pueden incluir criterios de exclusión tanto predefinidos por la casa como propios. En nuestro diseño se utilizó esta herramienta principalmente para la selección de sondas en región promotora, excluyendo la región de mRNA en la búsqueda de sondas. Como ya se ha especificado en el apartado 6.2 de material y métodos, en general, en el diseño del array no se utilizó el filtro de exclusión de sondas para regiones catalogadas de CNV porque se comprobó que utilizando ese filtro se eliminaban regiones de interés. No obstante, en la versión 4, para la selección de sondas de baja prioridad, se realizó una doble búsqueda de sondas en estas regiones, una de ellas sin filtro de exclusión, para asegurarse la representación de cada gen con al menos una sonda, y otra con el filtro de exclusión de CNV, para aumentar el número de sondas en esas regiones, asegurándonos que no se encontraban dentro de CNV frecuentes que pudieran dificultar la interpretación de los resultados posteriores.

Opciones de sonda: Especifican qué criterios han de utilizarse para seleccionar las sondas:

- **Filtro:** En este apartado se indica si se quiere hacer una selección de sondas en base a un número total final de sondas (*total probe*), separadas una distancia promedio en pares de bases a específicas (*average spacing*), o si se prefiere indicar un número de sondas por cada uno de los intervalos especificados en las opciones de intervalo (*probe per interval*).

- **Sondas de catálogo:** Se prioriza la selección de sondas del catálogo de sondas de Agilent. Todas nuestras búsquedas de sondas se han hecho con este criterio de selección.

- **Filtro de Tm:** Aunque la mayoría de las sondas disponibles en la base de datos de Agilent cumplen este criterio de Tm, se pueden seleccionar sondas con una Tm no adecuada en aquellas regiones que, por su secuencia específica de nucleótidos, no cumplan este criterio. Dado que una sonda con una Tm fuera del rango óptimo podría dar problemas en la hibridación e interpretación de los resultados, todas nuestras búsquedas de sondas se han hecho aplicando este criterio de selección.

- **Filtro de similitud:** Este filtro clasifica las sondas en función de si la secuencia diana es única en el genoma o no. Existen distintos niveles. Puede no aplicarse este filtro, por lo que este criterio no se tendrá en cuenta y una misma sonda podría hibridar con distintas regiones del genoma. El filtro de similitud exacta (*perfect match filter*) solo excluye aquellas sondas que tienen un 100 % de homología con más de una región del genoma; mientras que el filtro de similitud (*similarity store filter*), es el más restrictivo, elimina de la búsqueda a todas las sondas con alineamiento genómico secundarios en otras regiones, que podrían afectar el rendimiento de dichas sondas.

A

Home Microarray Probe Group **Probe** My Functions My Account Site Maintenance Data CGH

Search Upload Genomic Tiling Reannotate Score Custom Probes DNA Analysis Download

Search Standard Probes Interval Finder **HD Probe Search** SNP Probe Search

Standard HD Probe Search [Info](#) Advanced HD Probe Search [Info](#)

Job Information

Search Name [Info](#) * Select HD Search by * [Info](#)

Species * Gene Annotations [Info](#) NK9 | KIF7 | FAM58A | EYA1 | JAG1 | ELP4 | LRPNS *

Build Number

Probe Options

Filters [Info](#) Extended Interval Boundary [Info](#) 5' Base Pairs 3' Base Pairs

Prefer Catalog Probes [Info](#) Standard Exclusion Interval [Info](#)

Use Tm Filter [Info](#) Custom Exclusion Interval [Info](#)

Similarity Filter [Info](#) Include Regions [Info](#) [Info](#)

B

Search Standard Probes Interval Finder **HD Probe Search** SNP Probe Search

Standard HD Probe Search [Info](#) Advanced HD Probe Search [Info](#)

Job Information

Search Name * Select HD Search by * [Info](#)

Species * Gene Annotations *

Build Number

Probe Options

Filters Extended Interval Boundary

Prefer Catalog Probes Standard Exclusion Interval

Use Tm Filter Custom Exclusion Interval

Similarity Filter Include Regions

Figura 106: Ejemplos de los parámetros utilizados para la selección sondas en el diseño del array a la carta. (A) Parámetros de selección utilizados para las sondas exónicas de los nuevos genes incluidos en el la versión 3 del array. (B) Parámetros de selección utilizados para las sondas de la región promotora de los nuevos genes directos de la versión 4.

Los criterios para la búsqueda de sondas utilizados en las 4 versiones de los arrays de diseño propio se encuentran resumidos en la siguiente tabla.

Tabla 60: Esquema de los criterios de selección y búsqueda de sondas empleados para el diseño del array.

versión	Región ¹		Nº	Opciones de intervalo				Opciones de sondas			Nº sondas	Sondas / región	Total sondas	Total sondas seleccionadas
				Selección ²	Inclusión ³	Exclusión ⁴	Confianza ⁵	Filtro ⁶		Sililitud ⁷				
1	g	↑ ^a	140	NG	E	-	M	NT	21050	S	20201	145	45122	43090
		↓ ^b	224	NG	E	-	M	NT	17000	S	16962	76		
	G	-	Pos	I	-	M	NT	6000	S	6000	-			
	p	172	Pos	T	-	-	DP	150	S	599	3			
	UCE	481	Pos	T	-	-	SI	2	NF	916	2			
	miRNA	541	pos	±70 pb	T	-	-	SI	1	S	444	1		
2	g	420	NG	E	-	H	NT	35500	E	35500	85	43394	42933	
		4 ^c	Pos	T	-	-	SI	3	E	70	17 ^d			
	G	-	pos	T	-	-	NT	6000	S	6000	-			
	p	420	NG	T	mRNA	-	SI	5	E	127	<1			
	UCE	481	pos	T	-	-	SI	2	NF	916	2			
	miRNA	948	pos	±70 pb	T	-	-	SI	1	E	781			1
3	g	420 + 4 ^c	NG/Pos	E/T	-	H/-	NT/SI	35500/3	E	35570	85/17	44914	42940	
		10	NG	E	-	H	NT	800	E	800	80			
	G	-	pos	T	-	-	NT	6000	S	6000	-			
	p	430	NG	T	mRNA	-	SI	5	E	127	<1			
	UCE	481	pos	T	-	-	SI	2	NF	916	2			
	miRNA	948	pos	±70 pb	T	-	-	SI	1	E	781			1

versión	Región ¹	Nº	Opciones de intervalo				Opciones de sondas			Nº sondas	Sondas / región	Total sondas	Total sondas seleccionadas
			Selección ²	Inclusión ³	Exclusión ⁴	Confianza ⁵	Filtro ⁶		Similitud ⁷				
4	g	430 + 4 ^c	NG/Pos	E/T	-	H/-	NT/SI	36300/3	E	36370	84/17	57481	54450
		23	NG	E	-	H	NT	1225	S	1225	53		
	1 ^e	pos	E	-	H	NT	50	S	50	-			
	↓ ^b	1162	pos	T	-	-	NT	1	S	1162	1		
					CNVs	-	NT	4	S	808	<1		
	G	-	pos	T	-	-	NT	16000	S	16000	-		
	p	453	NG	T	mRNA	-	SI	5	E/S	164	<1		
	UCE	481	pos	T	-	-	SI	2	NF	916	2		
miRNA	948	pos	±70 pb	T	-	-	SI	1	E	781	1		

¹Regiones estudiadas: g: genes; G: genómica; p: región promotora.

²Selección del intervalo según: NG: nombre del gen; pos: posición.

³Criterio de inclusión: E: región exónica; I: región intragénica; T: todas las regiones.

⁴Criterio de exclusión.

⁵Confianza génica: M: media; H: Alta.

⁶Filtro de sondas: NT: Número total de sondas; DP: distancia promedio entre sondas; SI: número de sondas por intervalo.

⁷Filtro de similitud: S: similar; E: exacto; NF: sin filtro.

^a↑: Genes clasificados como de alta prioridad. Genes patológicos y algunos candidatos funcionales y posicionales seleccionados.

^b↓: Genes clasificados como de baja prioridad.

^cRegiones intrónicas conservadas seleccionadas (un total de 25) en 4 genes candidatos de alto interés (*MECP2*; *NIPBL*; *RPS6KA3*; *RAI1*).

^dEl número de sondas por región en este caso es distinto al número de sondas por intervalo especificado. Esto es debido a que como región interpretamos los 4 genes seleccionados, pero por intervalo tenemos 25 distintos, ya que hay más de una región intrónica conservada por cada uno de los genes. En promedio, se han obtenido 3 sondas por intervalo.

^eRegión 16p11.2 (chr16:29680214-30094180), asociada a CNV recurrentes en autismo (Sanders *et al.*, 2011).

Grís: equivalente a una versión previa.

Todas las sondas seleccionadas son del catálogo de sondas preferentes de Agilent aplicando el filtro de Tm.

En base a estos datos, se puede apreciar que la versión 2 y 3 son muy similares, y la única diferencia radica en los 10 nuevos genes incluidos, y las sondas exónicas para dichos genes. La versión 4 del array, al utilizar un formato mayor (8X60K), nos ha permitido incrementar principalmente el número de sondas genómicas e incluir un gran número de genes, que, aunque no estén directamente relacionados con la DI, dada su función, se han introducido con una baja representación de sondas. Esto ha mejorado la resolución global del array en esta última versión, sin disminuir de forma significativa la resolución de las regiones candidatas (tabla 19 del apartado de material y métodos).

Para pasar del total de sondas obtenidas al número de sondas final seleccionadas, se hubo de eliminar entre 500 y 3000 sondas aproximadamente, según las versiones del array. Como se ha comentado en material y métodos, en primer lugar, al unificar las sondas obtenidas para las distintas regiones, se observó que algunas se encontraban en más de un grupo, por lo que se eliminaron estas sondas duplicadas dejando solo una. Además, en las sucesivas versiones, en función de los resultados previos obtenidos con las versiones anteriores, se seleccionaron grupos de sondas que daban valores artefactuales o que se encontraban dentro de CNVs frecuentes en nuestra población, para su eliminación en posteriores versiones. Por último, para ajustar el número de sondas final, se eliminaron aquellas que se encontraban más imbricadas. Para ello, en la versión 1 se eliminaron aquellas sondas cuya distancia entre la posición inicial de la misma y la inmediatamente anterior era igual o inferior a 7 pb. En el resto de versiones, se eliminaron las sondas exónicas comprendidas entre las dos sondas cuya distancia entre su posición inicial era igual o inferior a 38 pb en la versión 2 y 25 pb en la versión 3 y 4 (figura 107).

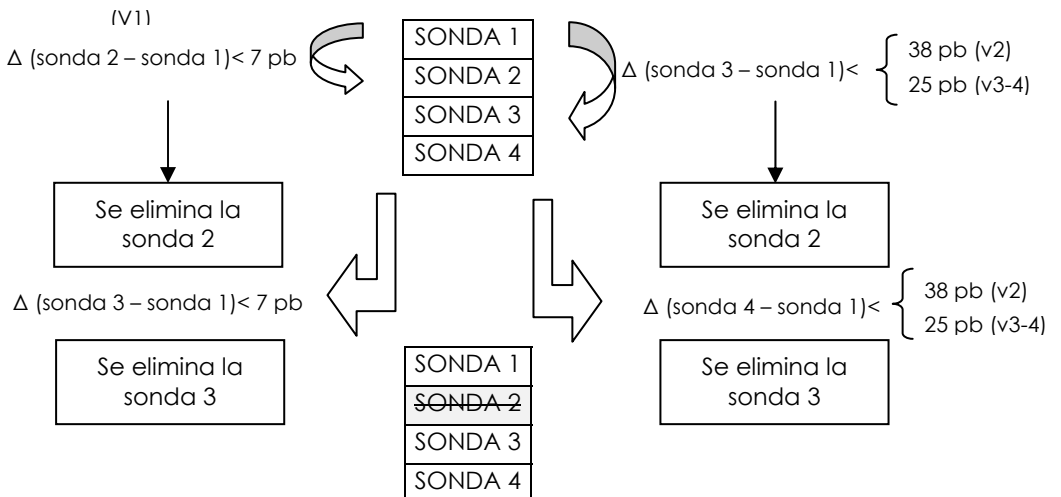


Figura 107: Representación esquemática de los distintos criterios utilizados para la eliminación de sondas imbricadas en el diseño del array a la carta.

Anexo IV Sondas FISH.

Sondas FISH utilizadas para la resolución de algunos casos presentados en este trabajo.

Tabla 61: Sondas comerciales de FISH utilizadas en este trabajo

Nombre	Posición	Fluorocromo	Casa Comercial	Caso
Cep 8	Cep	Aqua	Abbott Molecular	3298
Tel 2p	Tel	Green	Abbott Molecular	XF2463
Tel 2q	Tel	Orange	Abbott Molecular	XF2463 CGM3785
Tel 3q	Tel	Orange	Abbott Molecular	3045
Tel 4p	Tel	Green	Abbott Molecular	CGM897
Tel 4q	Tel	Orange	Abbott Molecular	
Tel 9p	Tel	Green	Abbott Molecular	CGM1388
Tel 9q	Tel	Orange	Abbott Molecular	CGM1397
Tel 11p	Tel	Green	Abbott Molecular	CGM897
Tel 11q	Tel	Orange	Abbott Molecular	
Tel 13q	Tel	Green	Cytocell	CGM245
Tel 15q	Tel	Orange	Abbott Molecular	CGM245 CGM3785
Tel 22q	Tel	Green	Cytocell	4874 CGM165 X2686
Tel Xq/Yq	Tel	Green	Cytocell	CGM2040 X841
Television10	Tel	Mezcal sondas (15q en naranja)	Abbott Molecular	CGM3785

Cep: Centromérica; Tel: Telomérica

Tabla 62: Sondas BACs de FISH utilizadas en este trabajo

Nombre	Localización	Gen	Fluorocromo	Casa Comercial	Caso
RP11-107E5	2q22.3	ZEB2	Orange	CHORI	CGM2161
RP11-375H16	2q23.1	MBD5	Green	CHORI	
RP11-57A9	8q24.11	SLC30A8	Orange	CHORI	3298
RP11-524O1	14q11.2	-	Green	CHORI	CGM991
RP11-52O23	14q21.3	-	Orange	CHORI	
RP11-119A22	Xq28	MECP2	Orange	CHORI	CGM2040 X841

Anexo V Salsas de MLPA.

Hay que tener en cuenta que a lo largo del tiempo, la casa comercial MRC-Holland ha realizado modificaciones en sus mezclas comerciales de sondas pudiendo haber distintas versiones dentro de una misma SALSA, que se encuentran debidamente identificadas para la correcta evaluación de los resultados. No obstante, para simplificar este listado, no se han especificado las diferentes versiones de las salsas utilizadas.

Tabla 63: Listado de las SALSAS comerciales de MLPA utilizadas.

SALSA	Regiones/genes	Patologías
P015	<i>MECP2</i>	Síndrome de Rett Síndrome de duplicación Xq28
P019	Regiones teloméricas: cromosoma 1-11 y X	Reordenamientos subteloméricos
P020	Regiones teloméricas: cromosoma 12-22 e Y	Reordenamientos subteloméricos
P023	22q11	Síndrome de Digeorge Síndrome Velocardiofacial Síndrome de delección 22q11.2
P036	Regiones teloméricas	Reordenamientos subteloméricos
P064	1p36.33 4p16.3 5p15 <i>NSD1</i> (5q35.3) 8q24.12 17p11.2 17p13.3 22q11 15q11/ <i>UBE3A</i> 7q11.23 7p21.1 <i>JAG1</i> (20p12) 22q11.21	Síndrome de delección 1p36 Síndrome de Wolf-Hirschhorn Síndrome de Cri du Chat Síndrome de Sotos Síndrome de Langer-Giedion Síndrome de Smith-Magenis Síndrome de Miller-Dieker Síndrome de Digeorge Síndrome de Prader-Willi/Angelman Síndrome de Williams Síndrome de Saethre-Chotzen Síndrome de Alagille Síndrome de DiGeorge
P070	Regiones teloméricas	Reordenamientos subteloméricos
P096	4p16 5p15 8q24 11p1 <i>CREBBP</i> 21q22 8p2	Síndrome de Wolf-Hirschhorn Síndrome de Cri du Chat Síndrome de Langer-Giedon Síndrome de WARG Síndrome de Rubinstein-Taybi Síndrome de Down Síndrome de Kabuki
P106	16 genes distintos: <i>RPS6KA3; ARX; IL1RAPL1;</i> <i>TSPAN7; PQBP1; HUWE1;</i> <i>OPHN1; ACSL4; PAK3;</i> <i>DCX; AGTR2; ARHGEF6;</i> <i>FMR1; FMR2 (AFF2);</i> <i>SLC6A8; GDI1</i>	RM ligado al cromosoma X

SALSA	Regiones/genes	Patologías
P181	Regiones centroméricas	Alteraciones cromosómicas
P182	Regiones centroméricas	Alteraciones cromosómicas
P208	Regiones teloméricas: 2p; 3p; 6p; 8p	Reordenamientos subtelo méricos
P245	1p36.33 2p16.1 3q29 (DLG1) 4p16.3 5p15 <i>NSD1</i> 7q11.23 8q24 9q22.33 22q11.21 10p15.1 11p13 15q12 15q24 <i>CREBBP</i> <i>PAFAH1B1</i> 17P11.2 <i>NF1</i> 17q21.31 22q13 <i>MECP2</i>	Síndrome de deleción 1p36 Síndrome de deleción 2p16.1 Síndrome de deleción 3q29 Síndrome de Wolf-Hirschhorn Síndrome de Cri du Chat Síndrome de Sotos Síndrome de Williams Síndrome de Langer-Giedon Síndrome de deleción 9q22.3 Síndrome de Digeorge Síndrome de Digeorge (región 10p) Síndrome de WARG Síndrome de Prader-Willi/Angelman Síndrome de deleción 15q24 Síndrome de Rubistein-Taybi Síndrome de Miller-Dieker Síndrome de Smith-Magenis Neurofibromatosis tipo I Síndrome de deleción 17q21.31 Síndrome de Phelan McDermid Síndrome de Rett/duplicación Xq28
P249	Regiones teloméricas: 17p; 18p; 19p; 20p	Reordenamientos subtelo méricos
P264	Regiones teloméricas: 1q; 2q; 3q; 4q	Reordenamientos subtelo méricos
P277	Regiones teloméricas: 5q; 6q; 7q; 8q	Reordenamientos subtelo méricos
P291	Regiones teloméricas: 13q; 14q; 15q; 16q	Reordenamientos subtelo méricos
P297	1q21.1 3q29 7q36.1 12p11.23 15q13 15q24.1 16p11 17q12 18q21.2 (<i>TCF4</i>) 20p12.2 (<i>PAK7</i>)	Síndromes de deleciones
P356	22q11 22q13	Síndrome de Digeorge Síndrome Velocardiofacial Síndrome de deleción 22q11.2 Síndrome de Phelan McDermid
P358	Regiones teloméricas: 4p; 5p; 13q; 14q	Reordenamientos subtelo méricos

SALSA	Regiones/genes	Patologías
P371	2p16 8q24 9q22 (<i>TGFBR1</i>) 11p13 (<i>PAX6</i>) 15q24 17q21 (<i>MAP1</i>)	Síndromes de deleciones
P374	Xq28 (<i>MECP2</i>) 2q23 (<i>MBD5</i>) 7q11 15q11/ <i>UBE3A</i> 17p13 17p11	Síndrome de Rett/duplicación Xq28 Síndrome de deleción 2q23 Síndrome de Williams Síndrome de Prader-Willi/Angelman Síndrome de Miller-Dieker Síndrome de Smith-Magenis

Anexo VI Marcadores microsatélites.

Tabla 64: Listado de los marcadores microsatélites utilizados en este trabajo.

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR
AR-1	X	66.765	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC	288	69.0	Inactivación X (12.1 de material y metodos)
AR-2			GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT		66.0	
D2S125_F	2	241.168	GCAACAGAGTGAGACCCTGA	88-100	59.0	Syn/Araf (tE: 15 s)
D2S125_R			TTCTGGAACCAGATTGTGATTG		59.2	
D2S140_F	2	241.740	GCTACAATGATTTCCAAAGTC	151-167	54.1	Syn/Araf (tE: 15 s)
D2S140_R			GTTGTCCATACTGATCTTACC		55.2	
D2S144_F	2	25.501	TCTCCCTGACAGACTCTGCG	152-200	61.7	Syn/Araf
D2S144_R			GCTGCATAGGCCGTA CTGAG		61.1	
D2S151_F	2	147.787	AACTAAGACACACAACCCCG	211-229	57.6	Syn/Araf
D2S151_R			CCAATTCAGTGGCATTCTATG		56.6	
D2S367_F	2	34.441	TTCTTTGGTCTAAGGGTCAC	137-165	54.3	Syn/Araf
D2S367_R			AGCTTCTTGTTACAGGTGT		54.9	
D2S2247_F	2	27.304	TCCATCTTTTGCGTGC	130-160	54.8	Syn/Araf
D2S2247_R			CCGTGCTCTATGCCAG		54.3	
D2S2285_F	2	240,902	AGGACCACCTCGTTGC	252-262	55.1	Syn/Araf (tE: 15 s)
D2S2285_R			ATGGCTGTGAATGCCTG		56.4	
D2S2335_F	2	148.860	GAGGAGTCAGAATTAATTTGCTT	153-173	56.0	Syn/Araf
D2S2335_R			GCCTACAAATGCCCTATACA		55.4	
D2S2393_F	2	2.719	TGACCATTAGCCTGAAGGA	244-270	56.7	Syn/Araf
D2S2393_R			GGACTGGGGTAAACACCTG		56.2	
D2S2585_F	2	242.926	AGCCTGGGGTGACAAAATCT	175-180	60.9	Syn/Araf (tE: 15 s)
D2S2585_R			AGACGTCTCCAAAGCCAGTT		58.9	
D2S2968_F	2	238.078	ATGGGTGGATGTACAAATGG	171-195	58.0	Syn/Araf
D2S2968_R			TCTTAGTTTATGGCCACCA		58.1	

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR
D5S500_F	5	137.847	ACCTATTCGACCTAATGACTAAAGA	180-211	56.9	Syn/Araf
D5S500_R			ATCGGTGAAATGCAACTACTT		56.4	
D5S618_F	5	89.799	CTACCTGGGTGGGGAA	165-185	54.9	Syn/Araf
D5S618_R			AAGGGCTCAGTATGGAAAAC		55.9	
D5S2090_F	5	147.230	CATGGGCATGTTTCAAAAAT	189-205	56.8	Syn/Araf
D5S2090_R			AGTACCTCCTTAGTAACTCTGGGC		58.5	
D5S2103_F	5	88.729	CTTTGTGAAGATGCCGG	192-218	56.0	Syn/Araf
D5S2103_R			GTTTCAGAGCAGGAGCC		54.1	
D5S2495_F	5	87.074	TATGAGACTGCAAATCGTTCC	220-240	57.8	Syn/Araf
D5S2495_R			CTATTTTAATCTTAAGTTTCCCTGG		56.2	
D6S300_F	6	94.764	AGATACATTGACATTCTTCCGC	188-207	58.2	Syn/Araf
D6S300_R			TCAAAAGCCAAAAGCCTACT		56.8	
D6S468_F	6	101.630	GACTATCTCACTTTTTATCAGGCAG	148-168	56.5	Syn/Araf
D6S468_R			ACATCTCTTCAGACCACAGG		55.1	
D6S1716_F	6	98.744	CATCACAGAGCAGTTTTTGG	163-209	56.9	Syn/Araf
D6S1716_R			CCTTCACTAGAGAAGCACTCAG		56.1	
D9S175_F	9	77.948	GTAATGTGCTAAATACCAGAGTTG	200-230	55.0	Syn/Araf
D9S175_R			CCCTTACCTAGAATGCC		54.6	
D9S933_F	9	83.639	TCCCCACATCACTCAAAGAT	248-296	57.9	Syn/Araf
D9S933_R			TGCTACAATGGCAGAGTTGA		58.0	
D9S1090_F	9	140.798	ACAAAACCCAAAAGCACAGG	131-132	60.0	Syn/Araf
D9S1090_R			AGCGCTTTGTTTGCTGATG		60.1	
D9S1838_F		140.637	ACCCAGCTACTGAGGAGGCTT	159.175	61.7	Syn/Araf
D9S1838_R			GCTTCTGCAGTTGTAGAACCAAAT		62.1	
D11S1984_F	11	1.567	GGGTGACAGCAGCAAAATCT	170-202	56.8	Syn/Araf
D11S1984_R			ACACCTGGATCTTGGACTCA		58.1	
D11S1999_F	11	10.720	TACATGCGCAGCAGGCATATA	109-137	57.8	Syn/Araf
D11S1999_R			GAGTAAACAAGATTGCTAGATAGGC		57.1	

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR
D11S2362_F	11	4.912	TGGACTATAGGACCCCTTC	209-230	57.9	Syn/Araf
D11S2362_R			GAGAACAGCCTGTCCACACCT		57.8	
D12S75_F	12	66.498	GTGGCTCTAAAGCATGACCA	129-141	58.9	Syn/Araf
D12S75_R			ATTTCTTCCACCTGCATGAT		57.0	
D12S1686_F	12	65.665	CTAGGGTCAGAGTTCCTGCT	187-250	56.2	Syn/Araf
D12S1686_R			CACTGTCCAATCAAGTAAGGC		57.3	
D12S1702_F	12	67.359	AGATGGGTAAGGGCA	216-272	51.8	Syn/Araf
D12S1702_R			AGGTATCTATGAGGGGTT		52.5	
D14S68_F	14	88.628	GAGAGGTGGTTTTTCAGTGGT	148-172	56.6	Syn/Araf
D14S68_R			TCAGGGATAGTTGGTGGGTA		57.9	
D14S72_F	14	21.371	TGTAAAGTTTTGTACATGGTGTAAAT	257-271	54.8	Syn/Araf
D14S72_R			TCCTAACATTCTGCTACCCA		55.8	
D14S288_F	14	44.102	AGCTAGACTCTGCCATAAACA	189-209	54.4	Syn/Araf
D14S288_R			TGGAGACAGGAACAACACAC		57.0	
D14S985_F	14	101.30	CAGTGTGACCTTAAACAAGTCG	118-142	57.5	Syn/Araf (tE: 15 s)
D14S985_R			CCTGTGGGGTAGATACACGA		58.4	
D14S990_F	14	23.587	GTCCACTTGGTCATGGAAC	135-161	57.8	Syn/Araf
D14S990_R			AAGTTGCACTGTGACTGGG		57.2	
D14S1006_F	14	101.180	TTCCACAGGGCAAGCAGTA	121-155	60.4	Syn/Araf (tE: 15 s)
D14S1006_R			TTCTGGCAAAACCCAACC		59.5	
D14S1023_F	14	21.442	TGCATTTCCCGTAGACATT	93-109	56.6	Syn/Araf
D14S1023_R			GACTCTTGTAAGTCTTTGAAGCC		56.5	
D15S11_F	15	24.086	GACATGAACAGAGGTAATTTGGTGG	243-263	62.9	Syn/Araf
D15S11_R			GCTCTCTAAGATCACTGGATAGG		56.4	
D15S122_F	15	25.680	GATAATCATGCCCCCA	143-159	57.5	Syn/Araf
D15S122_R			CCCAGTATCTGGCACGTA		55.4	
D15S1035_F	15	22.909	CACCCCATGCAGAGTGAG	175-265	62.7	Syn/Araf
D15S1035_R			CCAAAGGCCAAGACCTGCC		65.5	

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR
D16S405_F	16	15.883	AGTTCTCTGCTGCACCTGGC	114-150	63.1	Syn/Araf
D16S405_R			TGAAATGGGGACCATGAAGG		63.0	
D16S3025_F	16	68.566	TCCATTGGACTTATAACCATG	90-110	55.0	Syn/Araf
D16S3025_R			AGCTGAGAGACATCTGGG		53.4	
D16S3060_F	16	15.860	TGAGCCGAGATTGCACCAA	188-200	63.9	Syn/Araf
D16S3060_R			TGCCACAGGGGATATAAGCC		62.1	
D16S3085_F	16	67.668	GCTATGACCCGACCAGT	174-204	55.4	Syn/Araf
D16S3085_R			CGGAAATGGACCCTTG		55.6	
D16S3107_F	16	67.658	CCAGAGTGATGGGGAATA	234-304	54.1	Syn/Araf
D16S3107_R			TGAGCACTGTCTCAAAAAA		52.7	
DXS1073_F	X	153.829	GGCTGACTCCAGAGGC	217-243	54.9	Syn/Araf
DXS1073_R			CCGAGTTATTACAAAGAAGCAC		55.9	
GABRB3_F	15	26.735	CTCTTGTTCTGTTGCTTTCAATACAC	180-200	63.4	Syn/Araf
GABRB3_R			CACTGTGCTAGTAGATTCAGCTC		56.1	
RGCP_F	X	153.381	TCCAGGTGTTGCCATTGCAG	188	65.5	Syn/Araf
RGCP_R			TGGGAGGACAGTCTCTCCAG		60.4	

E: Elongación; D: Desnaturalización; H: Hibridación; t: tiempo; T: temperatura

Anexo VII PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se ha utilizado principalmente para confirmar alteraciones pequeñas, con zona de incertidumbre amplia, en su mayoría detectadas por el array de diseño propio.

Como estrategia se intentaron diseñar dos parejas de cebadores dentro de cada región alterada. No obstante, en algunas ocasiones las regiones a estudiar eran pequeñas, con secuencias muy repetitivas o ricas en C/G o T/A, lo que dificultaban el diseño de cebadores óptimos para el estudio por qPCR.

Antes de realizar la qPCR siempre se testaban los cebadores en una PCR convencional, para optimizar las condiciones y evitar amplificaciones no deseadas. A continuación se realizaba la curva de calibración para verificar que las condiciones para la qPCR eran adecuadas, calcular la eficiencia de la PCR y confirmar, con la curva de fusión, que la amplificación era específica.

Hay que tener en cuenta que las alteraciones en su mayoría son exclusivas de cada paciente, requiriéndose el diseño específico de cebadores. Para optimizar los recursos, como amplificación de referencia se utilizaban parejas de cebadores empleadas en otros casos con eficiencias conocidas y similares a la del fragmento de interés a amplificar y con curvas de fusión específicas de un único fragmento, sin dímero de cebador ni amplificación inespecífica.

Tras cada qPCR también se testaba el producto de la PCR en un gel de agarosa para confirmar que el fragmento obtenido era del tamaño esperado.

Desde Noviembre de 2013, al tener acceso al equipo QIAxcel Advances (QIAGEN), que permite la resolución de los geles en electroforesis capilar de forma más precisa, se ha empezado a sustituir la qPCR por PCR semicuantitativa. Se trata de una PCR dúplex que se lleva a cabo en un termociclador convencional, con un bajo número de ciclos. En la misma mezcla de PCR se introducen la pareja de cebadores de la región a estudiar, junto con otra pareja de cebadores que amplifique un fragmento de tamaño similar.

Para poder valorar la correcta eficiencia en la determinación de cambios de dosis se intenta elegir como región de referencia alguna localizada en el cromosoma X, y se introducen varios controles de varón y de mujer, que permiten valorar el cambio de dosis de la referencia, y así validar el método. Hay que tener en cuenta que se trata de un método para confirmar alteraciones y valorar su presencia o ausencia en los progenitores. Aunque llevamos poco tiempo empleando esta estrategia, los resultados han sido satisfactorios, suponiendo un ahorro en tiempo, y recursos.

Los cebadores utilizados para realizar estos estudios se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 65: Listado de cebadores diseñados para qPCR en el estudio de los pacientes incluidos en este trabajo.

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR ¹	Eficiencia
Alu_con_F	-	ALU	GTAATCCCAGCACTTTGGGA	242	59.9	Dig 37 °C 1 h; Di 96 °C 10 min; 30 cy; 1 ng DNA; MaeI/HpaII 0.1/0.5 U	1.803
Alu_con_R			GTCGCCAGGCTGGAGTGCA		71.5		
Alu_deg_F	-	ALU	RKRAWSVBARNABWYHNRVR	242	54.2	Alu	-
Alu_deg_R			RTYDYNWVYHRVRVDRYD		54.8		
A2BP1_F	16	7.762	ACATCTGTGCAGTGGAGTTG	226	57.2		2.031
A2BP1_R			GTTACACAACGCAGTCACG		61.4		
AK127963E1_F	9	15.146	CTCAATTGAGTATGCCTCAGG	250	57.4	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.647
AK127963E1_R			CTCCACTTTCTCTCACCAGG		57.4		
ANKRD12E1_F	18	9.137	GACCGGAGATGTTTTCAAGC	179	59.7		-
ANKRD12E1_R			CTCCTTCTCCTTTCTGTC		57.9		
ANKRD12E13_F	18	9.281	GAGGCAACAACATGAAGCTGC	192	63.2	TH 58 °C; tE 5 s	2.103
ANKRD12E13_R			CCATCAGGAAGTACTGACTGC		57.4		
ANKRD12E9_F	18	9.255	AGCCTGATCTTGTTTCGGTATG	340	59.2	TH 58 °C; tE 5 s	-
ANKRD12E9_R			TCCACACTCCTCTGCAGTTC		59.0		
APPq_F	21	27.348	GGTTTGATGAGGGTTGGAGAG	303	60.9	TH 60 °C; tE 15 s DMSO 5 %	1.734
APPq_R			CATTGAGCATGGCTCCACTC		63.0		
ARD1AE4_F	X	153.198	GGAAGAGGACCCAGATGATG	232	59.5		1.390
ARD1AE4_R			AGTTCTCTATCATGGCTCGAG		56.2		
ARID1BE5_F	6	157.257	CATGTCTCAGGAAGGCTATGG	286	59.7	300 nM cebador	1.540
ARID1BE5_R			TATCCAGGACTACAGAGCTCC		56.1		
ARID1BE6_F	6	157.406	GTCTGGCTCCATTGATGACC	235	60.5	300 nM cebador	1.869
ARID1BE6_R			GATACTTGCAGGAGAGATTGG		56.5		
DEFB119-8_5'_F	20	29.964	GGCTGACAGTCTATGGTCG	221	60.7		1.981
DEFB119-8_5'_R			GAGTTGTGTTGGTTACAGAGG		54.8		
FHIT_F	3	61.186	CATGGCCTTGACAACATTG	124	60.0	sqPCR ^a estándar TH 52 °C; tE 15 s; 25 cy	-
FHIT_R			TAAGAGGGAGGACAAGCAGG		59.4		

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR ¹	Eficiencia
HCFC1E1_F	X	153.237	GTGTGTCGAGGCTGTTTCG	237	60.5		1.489
HCFC1E1_R			CCTCAGTCGTAGCCCTCCC		62.1		
HDAC11_F	3	13.523	CAACCCAGCTGTACCAGCA	176	60.9	sqPCR ^a TH 52 °C; tE 15 s; 25 cy	-
HDAC11_R			GAAGCAGATGAGAGTCCAAGG		59.0		
HM13_E5_F	20	30.237	TCTGGTACCTGCTGAGGAAG	177	58.0		1.348
HM13_E6_R			AGGTGCAGGAGCTCTACTCC		58.6		
IntraMBD5-	2	149.327	ACTTCCATCCTCCAGGTCAG	303	59.1		1.587
IntraMBD5-			GCATCTCACAGTGGGTTTCAG		59.3		
JARID2Ex6_F	6	15.469	GTGTATTTTGGAAAGCTCTCAGGATGA	103	63.9	TH 58 °C; tE 5 s	2.121
JARID2Ex6_R			ACTGGCATGAAGATGAAGCATTG		63.6		
JARID2Ex6Up_F	6	15.461	GAGTCATCTCTGGCCTTCTCC	133	60.4	TH 58 °C; tE 5 s	2.226
JARID2Ex6Up_R			CCTTCAGTCAGCAAGGTGC		59.6		
KDM5BE20_F	1	202.710	TGTAGGCCACGACATTCATTG	135	61.9		1.645
KDM5BE20_R			CTCTACATCCTGAAGCCAGTC		56.6		
KIF1A_I27_F	2	241.686	GGAGAGAGCTAACCTGCTGG	158	59.2	TH 58 °C; tE 5 s	1.938
KIF1A_I27_R			CCCTGCTGTGGATGTGTGTC		62.7		
MBD5E9_F	2	149.227	TTAAGGTTCCACCCAGGTCAC	301	61.1	TH 60 °C; tE 15 s DMSO 5 %	1.887
MBD5E9_R			GCTTTGGCTGCTGCTGAGAG		63.8		
MECP2_I2_F	X	153.347	GTCTGCAGTTGTGACAGTTTG	153	56.9		1.785
MECP2_I2_R			AACTGACTACAGATGTTCAACC		53.4		
MYT1L14_F ^b	2	1.907	GAAGCTCGTCGTGTACAAAGC	383	60.1		1.798
MYT1L14_R			GAGTGACCACCACCGCTC		60.3		
MYT1L24_F ^b	2	1.796	ACCACGCGCTCCTAGGTC	267	61.4		1.826
MYT1L24_R			GCATCTACTTTAGGCTGTGCG		60.1		
NLRP13E5_F	19	56.424	ACGATCTCCAGTCAATCACTC	322	56.7	TH 58 °C; tE 5 s	1.861
NLRP13E5_R			AGCACAAAGGACATGGCTGC		63.7		
NLRP5E7_F	19	56.539	GACGACCTCATGGTTCAAGG	245	60.5	TH 58 °C; tE 5 s	1.941
NLRP5E7_R			GAGTGGATATGGAAGCCTGC		59.7		

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR ¹	Eficiencia																																																																																																																															
NTM_F	11	131.781	CCAAAGTGCTTACTCTCTCC	389	58.1	sqPCR ^a estándar TH 52 °C; tD y tH 1 min; tE 45 s; 35 cy	-																																																																																																																															
NTM_R			CCATTCTCGACAGCCACAAC		61.7			PTCH1E18_F	9	98.231	CGTCAGCAGAGTGATTCAGG	211	59.6	TH 58 °C; tE 5 s	1.939	PTCH1E18_R	CTGCACAGAGATCTCGGAGC	61.3	PTCH1E27_F	9	98.209	CTACCCGTGAGACTGACCACG	147	58.3	TH 58 °C; tE 5 s	1.841	PTCH1E27_R	CCTCAGTTGGAGCTGCTTCC	62.4	RABL5E1_F	7	100.965	CTCTCCGTCGCCATGGAAAC	127	65.2	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.796	RABL5E1_R	CCCCACGAAGAGGATCTTGG	64.1	RABL5E4_F	7	100.960	GGCCCTGATGAAGGATGCTC	176	64.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.846	RABL5E4_R	GGCTTCCTTTATCATCTCCAG	57.9	RB1CC1_F	8	53.596	GATCTTATGTGATCGTCCACC	125	56.9		2.050	RB1CC1_R	GTGTCCTTGAAGCAACAGTATG	57.4	RNF160_F	21	30.339	CAGCTCACAACTTGGAGAACG	318	61.0		1.980	RNF160_R	GAGGAGACAAAAGCCTGAAG	60.4	RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814	RT3.8_R	GGAGAAGATGCCCAGAGGAG	61.3	SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8
PTCH1E18_F	9	98.231	CGTCAGCAGAGTGATTCAGG	211	59.6	TH 58 °C; tE 5 s	1.939																																																																																																																															
PTCH1E18_R			CTGCACAGAGATCTCGGAGC		61.3			PTCH1E27_F	9	98.209	CTACCCGTGAGACTGACCACG	147	58.3	TH 58 °C; tE 5 s	1.841	PTCH1E27_R	CCTCAGTTGGAGCTGCTTCC	62.4	RABL5E1_F	7	100.965	CTCTCCGTCGCCATGGAAAC	127	65.2	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.796	RABL5E1_R	CCCCACGAAGAGGATCTTGG	64.1	RABL5E4_F	7	100.960	GGCCCTGATGAAGGATGCTC	176	64.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.846	RABL5E4_R	GGCTTCCTTTATCATCTCCAG	57.9	RB1CC1_F	8	53.596	GATCTTATGTGATCGTCCACC	125	56.9		2.050	RB1CC1_R	GTGTCCTTGAAGCAACAGTATG	57.4	RNF160_F	21	30.339	CAGCTCACAACTTGGAGAACG	318	61.0		1.980	RNF160_R	GAGGAGACAAAAGCCTGAAG	60.4	RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814	RT3.8_R	GGAGAAGATGCCCAGAGGAG	61.3	SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4						
PTCH1E27_F	9	98.209	CTACCCGTGAGACTGACCACG	147	58.3	TH 58 °C; tE 5 s	1.841																																																																																																																															
PTCH1E27_R			CCTCAGTTGGAGCTGCTTCC		62.4			RABL5E1_F	7	100.965	CTCTCCGTCGCCATGGAAAC	127	65.2	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.796	RABL5E1_R	CCCCACGAAGAGGATCTTGG	64.1	RABL5E4_F	7	100.960	GGCCCTGATGAAGGATGCTC	176	64.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.846	RABL5E4_R	GGCTTCCTTTATCATCTCCAG	57.9	RB1CC1_F	8	53.596	GATCTTATGTGATCGTCCACC	125	56.9		2.050	RB1CC1_R	GTGTCCTTGAAGCAACAGTATG	57.4	RNF160_F	21	30.339	CAGCTCACAACTTGGAGAACG	318	61.0		1.980	RNF160_R	GAGGAGACAAAAGCCTGAAG	60.4	RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814	RT3.8_R	GGAGAAGATGCCCAGAGGAG	61.3	SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																	
RABL5E1_F	7	100.965	CTCTCCGTCGCCATGGAAAC	127	65.2	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.796																																																																																																																															
RABL5E1_R			CCCCACGAAGAGGATCTTGG		64.1			RABL5E4_F	7	100.960	GGCCCTGATGAAGGATGCTC	176	64.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.846	RABL5E4_R	GGCTTCCTTTATCATCTCCAG	57.9	RB1CC1_F	8	53.596	GATCTTATGTGATCGTCCACC	125	56.9		2.050	RB1CC1_R	GTGTCCTTGAAGCAACAGTATG	57.4	RNF160_F	21	30.339	CAGCTCACAACTTGGAGAACG	318	61.0		1.980	RNF160_R	GAGGAGACAAAAGCCTGAAG	60.4	RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814	RT3.8_R	GGAGAAGATGCCCAGAGGAG	61.3	SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																												
RABL5E4_F	7	100.960	GGCCCTGATGAAGGATGCTC	176	64.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.846																																																																																																																															
RABL5E4_R			GGCTTCCTTTATCATCTCCAG		57.9			RB1CC1_F	8	53.596	GATCTTATGTGATCGTCCACC	125	56.9		2.050	RB1CC1_R	GTGTCCTTGAAGCAACAGTATG	57.4	RNF160_F	21	30.339	CAGCTCACAACTTGGAGAACG	318	61.0		1.980	RNF160_R	GAGGAGACAAAAGCCTGAAG	60.4	RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814	RT3.8_R	GGAGAAGATGCCCAGAGGAG	61.3	SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																							
RB1CC1_F	8	53.596	GATCTTATGTGATCGTCCACC	125	56.9		2.050																																																																																																																															
RB1CC1_R			GTGTCCTTGAAGCAACAGTATG		57.4			RNF160_F	21	30.339	CAGCTCACAACTTGGAGAACG	318	61.0		1.980	RNF160_R	GAGGAGACAAAAGCCTGAAG	60.4	RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814	RT3.8_R	GGAGAAGATGCCCAGAGGAG	61.3	SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																																		
RNF160_F	21	30.339	CAGCTCACAACTTGGAGAACG	318	61.0		1.980																																																																																																																															
RNF160_R			GAGGAGACAAAAGCCTGAAG		60.4			RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814	RT3.8_R	GGAGAAGATGCCCAGAGGAG	61.3	SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																																													
RT3.9_F	X	153.296	CTCCCTCCCCTCGGTGTTTG	125	66.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.814																																																																																																																															
RT3.8_R			GGAGAAGATGCCCAGAGGAG		61.3			SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059	SEZ6L2E14_R	GCACACAGGTGATGGTGACC	62.5	TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																																																								
SEZ6L2E14_F	16	29.885	TGAAGTACGAGCCGTGCCTG	147	64.7		2.059																																																																																																																															
SEZ6L2E14_R			GCACACAGGTGATGGTGACC		62.5			TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948	TAOK2E12_R	GGAGCTGTGAGAGGTGACTG	58.5	TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																																																																			
TAOK2E12_F	16	29.995	CTGACCAGCCTCGAGAGTAG	210	57.8		1.948																																																																																																																															
TAOK2E12_R			GGAGCTGTGAGAGGTGACTG		58.5			TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-	TTC39BE21_R	TATCTCTGAAGTTAACTACCC	49.9	UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																																																																														
TTC39BE21_F	9	15.172	GAGAGATTTACTGTTGGTCTAC	262	49.9	TH 58 °C; tE 5 s	-																																																																																																																															
TTC39BE21_R			TATCTCTGAAGTTAACTACCC		49.9			UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-	UCE_346_R	CCCATTGTGGCCCTGTTTTG	65.6	UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																																																																																									
UCE_346_F	12	106.977	CTGGAGAAGGCCCTCGGAAC	144	61.3	sqPCR ^a estándar tD 1 min; TH 55 °C; tH 1 min; tE 10 s; 30 cy	-																																																																																																																															
UCE_346_R			CCCATTGTGGCCCTGTTTTG		65.6			UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000	UCE109_1_R	TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG	59.4																																																																																																																				
UCE109_1_F	2	177.503	CCGTGCTCGTTACAATCTGC	271	61.8		2.000																																																																																																																															
UCE109_1_R			TTACTGTCTCAGCAAATCTCTG		59.4																																																																																																																																	

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR ¹	Eficiencia
UCE109_2_F	2	177.504	TGGCAGGTTGTGTCAGAAGTCC	211	61.3		1.810
UCE109_2_R			CGAAATGGTAAAGCCAGGAG		59.7		
ZDHHC14E1_F	6	157.803	AAGACTGCGAGTACAGCCAG	218	58.3	TH 58 °C; tE 5 s DMSO 5 %	1.739
ZDHHC14E1_R			CTCGAAGGCCAAGAAGAGTC		59.3		
ZDHHC14E2_F	6	157.964	GTCTGTAAGACAGAACTGCAG	259	52.7	300 nM cebador	1.751
ZDHHC14E2_R			CAAAGAAGAACAGGATGCCAG		59.9		
ZDHHC14E3_F	6	158.014	CACAGATATCGCAAACGGCAC	161	63.8	300 nM cebador	1.878
ZDHHC14E3_R			CGCAGTTATCACAAGGCTGC		63.1		
ZDHHC14E4_F	6	158.049	CTGCCTCTCATTTCAGAACGG	147	62.2	300 nM cebador	2.341
ZDHHC14E4_R			GACGTGGGTGATAACGAATGC		62.6		
6q13_F	6	72.087	TAGTGCTGCCTGCTCAGTTC	214	59.3		2.263
6q13_R			CTGCATTTTCATGTCTCCCAAC		60.5		

¹Si no se especifican, las condiciones y reactivos utilizados en la qPCR fueron las indicadas en el apartado de material y métodos 11.

^aPCR semicuantitativa que utiliza como reactivos la master mix de la PCR convencional (apartado 3.1.1. de material y métodos y tabla 12).

^bCebadores marcados con TAMRA, diseñados originariamente para aplicar la técnica de heterodúplex (tabla 25 del apartado 13 de material y métodos). Antes de usarse para la qPCR se expusieron a UV.

cy: número de ciclos; E: Elongación; Dig: digestión enzimática; D: Desnaturalización; H: Hibridación; i: inicial; t: tiempo; T: temperatura.

Anexo VIII Otros cebadores**Tabla 66:** Listado de otros cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR
ARID1BE5_F	6	157.257	CATGTCTCAGGAAGGCTATGG	350 ^a	59.7	TH 55 °C; 36 cy
ARID1BE6_R		157.406	GATACTTGCAGGAGAGATTGG		56.5	
ARID1BE5_F	6	157.257	CATGTCTCAGGAAGGCTATGG	177 ^b	59.7	TH 55 °C; 36 cy
ZDHHC14E2_R		157.964	CAAAGAAGAACAGGATGCCAG		59.9	
ARID1BE5_F	6	157.257	CATGTCTCAGGAAGGCTATGG	426 ^b	59.7	TH 55 °C; 36 cy
ZDHHC14E3_R		158.014	CGCAGTTATCACAAAGGCTGC		63.1	
H19_F	11	2.019	GGCAACATGCGGTCTTCAGAC	431	65.3	PWA (Master Mix + 5 % DMSO 60 min 37 °C)
H19_R			TCCGGAGACAGGGCTGAGCA		69.0	
KCNQ1OT1pol_F	11	2.721	CTGATTGGGCGGCAGCAGG	448 ^c	69.6	PWA (Master Mix + 4 % HRM)
KCNQ1OT1pol_R			AGTGCCTCATGCGGCGCTG	161	70.5	
KCNQ1OT1_F			CCTGTCATTGGCCGAAAGAGTC	369	65.3	PWA (Master Mix + 5 % DMSO 60 min 37 °C)
KCNQ1OT1n_F			GTCATTGGCCGAAAGAGTCTGG	366	65.3	
KCNQ1OT1_R			GPTCGAGGGTCTGCTGCAGC		66.8	
KIAA1586_F2	6	56.911-3	TTCGCTGTAGCTCAGAGTC	1891	54.2	LONG EXPAND (Tp3; tE1° 2 min; tE2° 2)
KIAA1586_R1			GAAACATTAGACAGACACTCC		51.3	
LIMS1_F1	2	109.258	CCATTTGAGCAGGATAGAGGATG	>80Kb	62.1	LONG EXPAND (10 + 20 cy)
LIMS1_F2		109.266	TAGGGAATTGAGGACCTCGCAC		64.7	
LIMS1_F3		109.272	GGTAGGGCTCCGAGGGGCTCGC		74.7	
LIMS1_F4		109.277	TCTAGAAATGCTGACCCAGGC		64.8	
LIMS1_F5		109.284	GTGAGGGTATGCCATGAGCTAG		61.0	
LIMS1_F6		109.288	ATCAGTGAGGTGCTTCAGAAGC		61.0	
LIMS1_F7		109.295	GGACAGAAACAGCAAGCTCACC		63.5	
LIMS1_F8		109.300	GAAGCCAGTCTGTAAGAAGTGC		58.3	
RANBP2_R1		109.381	GAGCAGCTGTTACAATGCCACC		64.2	
RANBP2_R2		109.387	CAAGCCAGTCATGAAGCATGCC		67.3	

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR
RANBP2_R3	2	109.394	CAGAATGGGGAGGACTATCAGC	>80Kb	62.2	LONG EXPAND (10 + 20 cy)
RANBP2_R4		109.400	TGGACTGTCCGCCTGTTCCATC		68.9	
RANBP2_R5		109.405	ATCCAAATCACCTGTCAACGAC		61.2	
LIMS1_F3.5	2	109.274	GTGATGAACATGGTGTGTCTGC	1666 ^d	61.5	tD y tE 1min; TH 67 °C; 30 cy
RANBP2_R3.5		109.398	TCAAAAGTGTTTGCTACTGAAGAG		58.0	
LIMS1E2F	2	109.205	TCGCAGTGATGTGAAACTGG	208 ^e	60.9	TH 55 °C; 36 cy
RANBP2E26-27R		109.398-9	TACTTCTACCTCTGGTAGTG		48.9	
MECP2m_F	X	153.362	GACGACACGGCTGGCGGATG	260	71.7	PWA (Master Mix + 5 % DMSO 60 min 37 °C)
MECP2m_R			GCCCAAAGCCCCGAGAAGGG		71.2	
MEG3_F	14	101.294	TCCTGACATGTTGCAGTCTTG	386	59.9	PWA (Master Mix + 5 % DMSO 60 min 37°C)
MEG3_R			CTCCACAACACCCGAAGCCAC		67.3	
MYT1L6F	2	1.983	CCATTAATAGAAATGCCAGGG	435	57.1	Syn/Araf(tD1 ^a 1 min; tE 1 ^a 1 min)
MYT1L7R			AGCTGGAAGGTGCAGTGTG		60.0	
MYT1L9F	2	1.947	TGCTGATGACATTCATGATAAGC	545	60.1	Syn/Araf(tD1 ^a 1 min; tE1 ^a 1 min)
MYT1L9R			GCAATTCACCTTGAACAGTGG		60.5	
MYT1L10F1A	2	1.927	ACGTGCTATCCATGCTGTTG	616	59.7	Syn/Araf(tD1 ^a 1 min; tE1 ^a 1 min; tE2 ^a 45 s)
MYT1L10R1A			GTCTCACTGAGCTTCCTGGC		60.1	
MYT1L10F1B	2	1.926	GAAGCCCATGAACAACGG	619	60.0	Syn/Araf(tD1 ^a 1 min; tE1 ^a 1 min; tE2 ^a 45 s)
MYT1L10R1B			GTCATGTTTTTCATGAGGCA		59.8	
MYT1L14F	2	1.907	GAAGCTCGTCTGTACAAAGC	383	60.1	Syn/Araf(tD1 ^a 1 min; tE1 ^a 1 min)
MYT1L14R			GAGTGACCACCACCGCTC		60.3	
MYT1L15F	2	1.896	CCTGAGTCATCCCTGTCC	424	56.2	
MYT1L15R			GTTACAGTGGCGAGAATGG		61.7	
MYT1L16F	2	1.893	ACGGCAGGACTGTAATCTGG	411	60.1	
MYT1L16R			CATAACGTATGTCAAATGGC		59.0	
MYT1L21F	2	1.843	AGAAGCCACCAGCGAC	362	59.9	Syn/Araf(tD1 ^a 1 min; tE1 ^a 1 min)
MYT1L21R			CTGCTGCCGTATAACCAG		60.4	
MYT1L24F	2	1.796	ACCACGCGCTCCTAGGTC	267	61.4	Syn/Araf(tD1 ^a 1 min; tE1 ^a 1 min)
MYT1L24R			GCATCTACTTTAGGCTGTGCG		60.1	

Nombre	Cromosoma	Posición (Mb, Hg19)	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Condiciones PCR
MYT1L25F	2	1.796	AACTGCTAGAAACATGGGCG	549	60.3	Syn/Araf (tD1 ^a 1 min; tE1 ^a 1 min)
MYT1L25R			ACATGGCAGAACACTATGTCTAG		57.8	
SNRPN_F	15	25.200	AGGTCATTCCGGTGAGGGAGG	487	66.9	PWA (Master Mix + 5 % DMSO 60 min 37 °C)
SNRPN_R			ACCGCAGACACCCGCAATAGG		68.6	
ZDHHC14E1_F	6	157.803	AAGACTGCGAGTACAGCCAG	285 ^a	58.3	TH 55 °C; 36 cy
ZDHHC14E2_R		157.964	CAAAGAAGAACAGGATGCCAG		59.9	
ZNF451_F1	6	56.955	CTTCGCTATCTCACAGGAC	1932 ^f	53.3	LONG EXPAND (Tp3; tE1 ^o 2 min; tE2 ^o 2 min+20 s; TH 56 °C; 22 cy 2 ^o)
KIAA1586_R1		56.913	GAAACATTAGACAGACACTCC		51.3	
ZNF451_F3	6	56.955	CTTCCCAGTGCTTCGCTATC	1942 ^f	60.0	
KIAA1586_R1		56.913	GAAACATTAGACAGACACTCC		51.3	
ZNF451_F3	6	56.955-7	CTTCCCAGTGCTTCGCTATC	1934	60.0	
ZNF451_R3			TGCACATCTGACACTCAACG		59.4	

^aTamaño obtenido para muestra de cDNA.

^bTamaño obtenido para muestra de cDNA de la paciente CGM2428.

^cTamaño obtenido con la pareja de cebadores KCNQ1OT1pol_F y KCNQ1OT1_R para la secuenciación del polimorfismo en *KCNQ1OT1* rs7940500 (figura 98 del apartado 4.5 de resultados)

^dTamaño obtenido para la muestra de DNA del paciente CGM2433, con una delección flanqueada por estos cebadores, que permite determinar los puntos de rotura.

^eTamaño obtenido para muestra de cDNA del paciente CGM2433.

^fTamaño obtenido para la muestra de DNA de la paciente XF2605, con una duplicación en tándem en la misma orientación en esta región debida a la presencia de duplicaciones segmentarias (figura 79 del apartado 1.5.2.2.3. de resultados).

Cy: Ciclos; E: Elongación; D: Desnaturalización; H: Hibridación; t: tiempo; T: temperatura; tp: Tampón.

Anexo IX Alteraciones detectadas por el CGH-array.

Resumen de las 220 alteraciones detectadas en 152 pacientes utilizando el CGH-array.

Tabla 67: Listado de las alteraciones detectadas por CGH-array.

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
000506	dup	Chr16:14701004-16561092	Chr16:15131723-16031538	899815	mat	pip	pip	DPv4
000527	del	Chr22:25594769-25952704	Chr22:25705256-25842509	137253		B	B	DPv4
000881	del	Chr12:65410625-67736525	Chr12:65557000-67604067	2047067	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
001480	del	Chr2:242806154-Tel	Chr2:242886386-243199373	312987		B	B	DPv4
003045	del	Chr3:194106001-197686974	Chr3:194202266-197404280	3202014	pat ^d	P	P	DPv4
003298	del	Chr8:116900829-119692877	Chr8:117165801-119123513	1957712	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
003570	del	Chr9:69001974-84304587	Chr9:69348984-84116288	14767304	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
004023	del	Chr6:71970883-72113246	Chr6:72086610-72086669	59	mat	B	B	DPv4
004245	dup	Chr5:136261995-147392105	Chr5:136857910-147307654	10449744	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
004874	del	Chr22:51117879-Tel	Chr22:51123040-51304566	181526	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
005357	del	Chr1:243896255-246176039	Chr1:244006388-245028327	1021939	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
005415	del	Chr8:119779-3141756	Chr8:221611-3141739	2920128	mat	pip	pip	DPv4
005712	del	Chr2:160675575-166550667	Chr2:161423818-166303505	4879687	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
005974	dup	Chr16:15141953-19078690	Chr16:15517893-18962664	3444771	pat	pip	pip	DPv4
006186	del	Chr6:84240237-108487749	Chr6:84527142-108400331	23873189	<i>de novo</i>	P	P	DPv4
006208	dup	Chr13:67477795-67804148	Chr13:67697247-67804128	106881	pat	B	B	DPv4
CGM1043	del	Chr2:242815972-243041305	Chr2:242930600-242948040	17440		B	B	44K
	dup	Chr16:89833634-89941858	Chr16:89849284-89909419	60135		B		
CGM1208 ^{a,b}	del	Chr7:64435453-65269808	Chr7:64691936-64865279	173343	pat	B	pip	44K
	dup	Chr16:28335137-29284026	Chr16:28574360-29042118	467758	pat	pip		
	del	Chr22:25621981-25973050	Chr22:25664618-25892253	227635	mat	B		
CGM1217	del	Chr15:43850223-44042984	Chr15:43888927-43895704	6777		B	B	44K

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
CGM1239	dup	Chr7:100959652-101149639	Chr7:100967127-101092194	125067		B	B	44K
CGM1330 ^{a,b}	dup	ChrX:153171807-153505485	ChrX:153197498-153409354	211856	mat	P	P	44K
CGM1353 ^{a,b}	del	Chr1:168697476-174002163	Chr1:168757792-173884316	5126524	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM1356	dup	Chr17:25403505-25832835	Chr17:25636226-25774462	138236	mat	B	B	44K
CGM1372	dup	ChrX:78873820-79678199	ChrX:78970992-79508682	537690	mat	B	B	44K/DPv1
CGM1388 ^{a,b}	del	Chr9:139728550- Tel	Chr9:139794076-141213431	1419355	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM1393	dup	Chr3:100287817-100451345	Chr3:100354612-100433025	78413		B	B	44K
	dup	Chr17:44159862-44345038	Chr17:44210763-44268753	57990		B		
CGM1397 ^{a,b}	del	Chr9:139982629- Tel	Chr9:139999668-141213431	1213763	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM1414 ^{a,b}	del	Chr6:93720661-103642236	Chr6:93875961-103179934	9303973	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM1416	del	Chr16:14944619-15131723	Chr16:15048751-15111295	62544		B	B	44K
	del	Chr18:77804066- Tel	Chr18:77893886-78077248	183362	<i>de novo</i>	B		
CGM1427 ^a	dup	Chr6:80233567-80837262	Chr6:80366636-80752027	385391	<i>de novo</i>	VOUS	VOUS	44K
	del	Chr12:7985548-8201351	Chr12:8003414-8088660	85246		B		
	dup	Chr17:37360552-37531398	Chr17:37410077-37498132	88055	<i>de novo</i>	VOUS		
CGM1428	dup	Chr10:114874668-115441426	Chr10:114925825-115349054	423229	mat	B	B	44K
CGM1449	dup	Chr3:176430981-176882077	Chr3:176738433-176845203	106770		B	B	44K
CGM1458	dup	Chr15:88069167-88255489	Chr15:88120864-88149881	29017	pat	B	B	44K
CGM1484	del	Chr3:151368907-151591250	Chr3:151531699-151542568	10869		B	B	44K
	del	Chr7:110984268-111202287	Chr7:111127238-111202272	75034	pat	B		DPv2
CGM1503	dup	ChrX:6457462-8266181	ChrX:6551155-8032120	1480965	mat	B	B	44K
CGM1513 ^{a,b}	dup	Chr19:56300764-56668715	Chr19:56320223-56590093	269870	<i>de novo</i>	VOUS	VOUS	44K
CGM1525 ^{a,b}	dup	Chr2:130921957-131513263	Chr2:131095247-131317673	222426		B	P	44K
	dup	Chr4:1333192-2691316	Chr4:1389650-2502695	1113045	<i>de novo</i>	P		
	del	Chr4:Tel-1389650	Chr4:0-1333192	1333192	<i>de novo</i>	P		
CGM1526 ^{a,b}	del	Chr5:85915904-90281252	Chr5:86106756-90077119	3970363	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM1527 ^{a,b}	del	Chr1:244464177-245870660	Chr1:244571975-245724815	1152840	<i>de novo</i>	P	P	44K
	dup	Chr9:33941881-34257917	Chr9:33971695-34115732	144037	pat	B		

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
CGM1551	del	Chr7:142759905-142919951	Chr7:142834647-142881395	46748		B	B	44K
CGM1603	dup	Chr6:168303092-168776873	Chr6:168311806-168473515	161709		B	B	44K
CGM1606 ^{a,b}	dup	ChrX:15859056-16578235	ChrX:16006389-16414693	408304	mat	pip	P	44K
	del	ChrX:154032314-154754117	ChrX:154133238-154560375	427137	<i>de novo</i>	P		
CGM1616	del	Chr12:7985548-8201351	Chr12:8003414-8088660	85246		B	B	44K
	dup	Chr12:58347455-59906948	Chr12:58843780-59405585	561805		B		
	del	Chr22:25621981-25973050	Chr22:25664618-25892253	227635		B		
CGM1631	dup	Chr15:31946933-32914081	Chr15:32021733-32510863	489130		B	B	44K
CGM165 ^{a,b}	dup	Chr8:143822407-143993747	Chr8:143859553-143992031	132478	mat	B	P	44K
	del	Chr22:51065908- Tel	Chr22:51177316-51304566	127250	<i>de novo</i>	P		
CGM1690	dup	Chr15:91242175-91459028	Chr15:91326064-91346803	20739		B	B	44K
CGM1693	del	Chr6:31779203-31797657	Chr6:31785578-31785727	149		B	B	44K
	dup	Chr7:158365401-158738830	Chr7:158445076-158695253	250177		B		
	del	Chr19:53617810-53656381	Chr19:53642531-53642950	419	mat	B		
CGM1696 ^{a,b}	del	Chr16:21806358-22645706	Chr16:21837492-22380197	542705	pat	pip	pip	44K
CGM1778	del	Chr2:1843177-2000941	Chr2:1844493-1983593	139100	<i>de novo</i>	P	P	DPv2
CGM1819 ^{a,b}	dup	Chr1:2542452-3102665	Chr1:2857518-2976478	118960		B	P	44K
	dup	Chr8:140427744- Tel	Chr8:140630416-146364022	5733606	PTep	P		
	del	Chr14:103898743- Tel	Chr14:103923455-107349540	3426085	PTep	P		
CGM1847 ^a	del	Chr12:29423589-29617583	Chr12:29474867-29532012	57145	mat	B	VOUS	44K
	dup	Chr15:22885696-23656936	Chr15:22925956-23085096	159140		VOUS		
CGM1900	del	Chr8:107104146-107676317	Chr8:107307812-107670002	362190		B	B	44K
CGM1954	dup	Chr2:97651409-98279234	Chr2:98021533-98274335	252802		B	B	44K
CGM1988	dup	Chr1:145194113-146564743	Chr1:145413388-145747269	333881		B	B	44K
CGM2010	del	Chr1:196711149-196863036	Chr1:196746064-196797163	51099		B	B	44K
CGM2031	dup	Chr5:32063009-32173291	Chr5:32110734-32149723	38989		B	B	44K
	dup	Chr5:39021227-39480867	Chr5:39063628-39383383	319755	mat	B		

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
CGM2040 ^{a,b}	dup ^c	ChrX:153246726-153595473	ChrX:153277239-153576940	299701	<i>de novo</i>	P	P	44K
	dup	ChrX:153713921-153927864	ChrX:153740375-153877929	137554	<i>de novo</i>	VOUS		
	dup ^c	ChrX:154490709-154841396	ChrX:154535119-154560375	25256	<i>de novo</i>	P		
CGM2050	del	Chr16:31864886-34363661	Chr16:32279544-33965593	1686049	<i>de novo</i>	B	B	DPv2
CGM2103 ^{a,b}	dup	Chr15:32077007-32438884	Chr15:32248451-32404023	155572		B	pip	44K
	dup	Chr15:34653105-35045797	Chr15:34667002-34870346	203344		B		
	dup	Chr22:18641468-20937255	Chr22:18896972-20900660	2003688	pat	pip		
CGM2109	dup	Chr8:98673367-99053978	Chr8:98701262-98906333	205071	pat	B	B	44K
CGM2115	del	Chr3:151167962-151591250	Chr3:151368848-151542568	173720		B	B	44K
	dup	Chr7:16834622-17492751	Chr7:17003308-17378970	375662		B		
	dup	Chr22:25621981-25973050	Chr22:25664618-25892253	227635		B		
CGM2135	del	Chr4:Tel-2631177	Chr4:0-2110334	2110334	<i>de novo</i>	P	P	DPv3
CGM2143	del	Chr2:238573705- Tel	Chr2:238619349-243199373	4580024	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM2161 ^b	dup	Chr2:143798251-150071692	Chr2:143986161-150012071	6025910	<i>de novo</i>	P	P	44K
	del	Chr13:20762840-21113475	Chr13:20797139-21059969	262830		B		
CGM2173	dup	Chr5:32063009-32230408	Chr5:32110734-32149723	38989		B	B	44K
CGM2179 ^{a,b}	del	Chr11:76450825-84245609	Chr11:76508974-83962341	7453367	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM2182 ^{a,b}	dup	Chr16:14780194-16899617	Chr16:15048751-16305736	1256985	pat	pip	pip	44K
CGM2249	del	Chr1:16806077-17303386	Chr1:17048732-17231817	183085	<i>de novo</i>	B	B	44K
	dup	Chr11:82584340-82708153	Chr11:82610479-82686570	76091	mat	B		
	dup	Chr13:20405620-20579198	Chr13:20419333-20431339	12006	mat	B		
	del	Chr14:99152069-99319989	Chr14:99180936-99183632	2696	pat	B		
	dup	Chr16:69976847-70286515	Chr16:70052164-70193942	141778	<i>de novo</i>	B		
	dup	ChrX:142180738-142543090	ChrX:142346870-142444678	97808	pat	B		
CGM2254	dup	Chr7:16911011-17492751	Chr7:17003308-17378970	375662		B	B	44K
CGM227 ^a	dup	Chr5:73084745-73985153	Chr5:73201951-73924173	722222	pat	VOUS	VOUS	44K

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
CGM2295	del	Chr3:151368907-151591250	Chr3:151531699-151542568	10869		B	B	44K
	del	Chr16:14944619-15131723	Chr16:15048751-15111295	62544		B		
	dup	Chr22:22283340-22599852	Chr22:22323105-22569881	246776		B		
CGM2350 ^{a,b}	dup	Chr2:24448930-38156727	Chr2:24480866-37896840	13415974	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM2353	del	Chr12:120965439-129626837	Chr12:121001126-129467568	8466442	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM2402 ^b	del	Chr2:148372396-152433379	Chr2:148602407-152354323	3751916	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM2403	del	Chr1:152538994-152595100	Chr1:152573130-152586281	13151		B	B	44K
CGM2406	del	Chr16:2904859-2998808	Chr16:2941231-2984890	43659		B	B	44K
CGM2428 ^b	del	Chr6:157281757-158069431	Chr6:157357928-157454332	96404	<i>de novo</i>	P	P	44K/DPv1
CGM2433 ^b	del	Chr2:109258450-109405259	Chr2:109300532-109380702	80170	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM2447	dup	Chr3:100287817-100526981	Chr3:100354612-100399827	45215		B	B	44K
CGM245 ^{a,b}	del	Chr2:110427254-111406838	Chr2:110841715-110980401	138686		B	P	44K
	del	Chr13:113715020-Tel	Chr13:113761409-115169878	1408469	PTEm	P		
	dup	Chr15:84772030-Tel	Chr15:85163836-102531392	17367556	PTEm	P		
CGM2451 ^b	dup	Chr10:135234843-135404471	Chr10:135352372-135372492	20120		B	P	44K
	del	Chr18:66678319-Tel	Chr18:66753631-78077248	11323617	<i>de novo</i>	P		
CGM2477	dup	Chr1:117546699-118003202	Chr1:117624672-117910953	286281	mat	VOUS	VOUS	44K
CGM2494 ^b	del	Chr16:70052223-70286515	Chr16:70166165-70193942	27777		B		44K
	del	Chr21:27120088-30566589	Chr21:27177642-30530902	3353260	mat ^d	P	P	44K
CGM2543	del	Chr7:100886535-100998732	Chr7:100959597-100967178	7581	mat	B	B	44K
CGM2706	dup	Chr15:20190607-23907607	Chr15:20575646-23022285	2446639	pat	VOUS	VOUS	DPv3
CGM2733 ^b	dup	Chr3:1189694-2142282	Chr3:1262393-1855132	592739	pat	B	P	44K
	dup	Chr15:88811188-89241955	Chr15:89003623-89172013	168390		VOUS		
	dup	Chr17:84346-4516861	Chr17:116543-4463172	4346629	<i>de novo</i>	P		
CGM2756 ^b	del	Chr2:171975862-189839147	Chr2:172021514-189735296	17713782	<i>de novo</i>	P	P	44K
	del	Chr22:22283340-22599852	Chr22:22323105-22569881	246776		B		
CGM2761	del	Chr9:14887101-15225981	Chr9:15104399-15185751	81352	pat	B	B	44K

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
CGM2783	dup	Chr1:16948177-17303386	Chr1:17048732-17231817	183085		B	B	44K
	dup	Chr1:104124994-104307649	Chr1:104163704-104297301	133597		B		44K
CGM2822 ^b	del	Chr14:99152069-99319989	Chr14:99180936-99183632	2696		B	pip	44K
	dup	Chr16:15256745-18546700	Chr16:15492317-18012461	2520144	mat	pip		
CGM2844	dup	Chr11:128838646-128838777	Chr11:128838665-128838752	87	pat	VOUS	VOUS	DPv2
CGM2882	del	Chr10:125952849-Tel	Chr10:126061025-135534747	9473722		P	P	44K
CGM2935	del	Chr7:148106427-148112473	Chr7:148106438-148106607	169	pat	B	B	DPv2
CGM2952 ^b	del	Chr16:29325694-30332522	Chr16:29673954-30198600	524646	pat	pip	pip	44K
CGM3051	del	Chr8:6658721-8621658	Chr8:7239491-7671790	432299	mat	B	B	DPv3
CGM3244	del	Chr17:16532793-20221636	Chr17:16822683-20193169	3370486	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM3263	del	Chr16:67294372-68723501	Chr16:67316868-68712116	1395248	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM3328	del	Chr16:7761085-7762588	Chr16:7761126-7762500	1374	pat	VOUS	pip	DPv3
	del	Chr16:14403232-17055214	Chr16:14648925-16561151	1912226	mat	pip		
CGM3432	dup	Chr4:1521506-1879000	Chr4:1694662-1841014	146352	pat	VOUS	VOUS	44K
CGM3476	del	Chr15:20190607-23513755	Chr15:20314765-23217514	2902749	<i>de novo</i>	pip	pip	DPv4
CGM3547	del	Chr12:18137127-24283358	Chr12:18240372-24102551	5862179	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM3782	dup	ChrX:65605124-78528055	ChrX:65815490-78426724	12611234	mat ^e	P	P	44K
CGM3785	del	Chr2:234296830-Tel	Chr2:234343084-243199373	8856289	PTEm	P	P	44K
	dup	Chr15:101735411-Tel	Chr15:101793090-102531392	738302	PTEm	VOUS		
CGM3810	dup	Chr22:25594769-26120412	Chr22:25705256-25952763	247507		B	B	DPv4
CGM3826	dup	Chr16:14648984-15820103	Chr16:15131723-15820042	688319	mat	pip	pip	DPv3
CGM548 ^{a,b}	dup	ChrX:45059882-49121150	ChrX:45178321-49094187	3915866	<i>de novo</i>	P	P	44K
CGM659	del	Chr19:58153740-58231179	Chr19:58185471-58209183	23712	pat	B	B	44K
CGM708 ^a	dup	Chr18:9158079-9538006	Chr18:9182473-9477374	294901	pat	VOUS	VOUS	44K/DPv1
CGM742	dup	Chr11:128838646-128838777	Chr11:128838665-128838752	87		VOUS	VOUS	DPv3
CGM781	dup	Chr1:120351499-Tel	Chr1:120436417-121184327	747910		B	B	44K
CGM872	del	Chr10:23297250-23725899	Chr10:23409844-23617546	207702	pat	B	B	44K

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
CGM897 ^{a,b}	del	Chr4:Tel-4209141	Chr4:0-3770271	3770271	PTEp	P	P	44K
	dup	Chr11:Tel-3402850	Chr11:0-3381999	3381999	PTEp	P		
CGM912 ^{a,b}	dup	Chr1:248480809-249212609	Chr1:249104603-249172869	68266	mat	B	P	44K
	del	Chr7:65972732-69364259	Chr7:66096058-68886247	2790189	de novo	P		
	del	Chr16:28335137-30332522	Chr16:28543104-30198600	1655496	de novo	P		
CGM979	dup	Chr6:168343888-168776873	Chr6:168371416-168581212	209796		B	B	44K
CGM991 ^{a,b}	dup	Chr14:Tel-24729172	Chr14:20295211-24711159	4415948	de novo	VOUS	VOUS	44K
CR218	del	Chr16:14944619-15144120	Chr16:15048751-15131782	83031		B	B	44K
X1145	dup	ChrX:7398800-8266181	ChrX:7555292-8032120	476828	mat	B	B	44K
X1186 ^{a,b}	del	Chr3:108633467-108914743	Chr3:108665289-108813807	148518	de novo	B	P	44K
	del	Chr13:94540477-100425168	Chr13:94625639-100169918	5544279	de novo	P		
X1237	dup	Chr5:32063009-32173291	Chr5:32110734-32149723	38989		B	B	44K
X1772	del	Chr15:Tel-23656936	Chr15:20849110-23085096	2235986	mat	pip	pip	44K
X2403	dup	Chr12:2162750-3326248	Chr12:2438871-3259131	820260	mat	B	B	44K
X2629 ^{a,b}	del	Chr15:70092799-71403932	Chr15:70167271-71341978	1174707	mat ^f	P	P	44K
	del	Chr17:223241-687869	Chr17:295122-674398	379276	de novo	B		
X2686 ^{a,b}	dup	Chr3:100287817-100451345	Chr3:100354612-100399827	45215		B	P	44K
	dup	Chr22:50649428- Tel	Chr22:50654303-51304566	650263	de novo	P		
X3159 ^a	dup	Chr7:39746879-40231130	Chr7:39847384-40173449	326065		VOUS	VOUS	44K
	dup	Chr16:15256745-15677026	Chr16:15492317-15632657	140340		VOUS		
X3361 ^{a,b}	dup	Chr17:Tel-4387305	Chr17:0-4254776	4254776	PTEm	P	P	44K
	del	Chr21:46225707- Tel	Chr21:46291010-48129895	1838885	PTEm	P		
X841 ^{a,b}	del	ChrX:127083788-127246982	ChrX:127184944-127186288	1344		VOUS	P	44K
	dup	ChrX:152515593-153822666	ChrX:152684501-153780138	1095637	mat ^e	P		
X926	del	Chr2:242815972-243041305	Chr2:242930600-242948040	17440		B	B	44K
XF1338 ^{a,b}	dup	Chr16:14780194-16276056	Chr16:14944560-16249607	1305047	pat	pip	pip	44K
	del	Chr17:21217974-21703467	Chr17:21254997-21501929	246932	pat	B		
XF1526 ^{a,b}	del	Chr20:39924852-42612787	Chr20:40029237-42574442	2545205	pat	pip	pip	44K

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
XF1587	dup	Chr8:104198025-104430376	Chr8:104220546-104415498	194952	mat	B	B	44K
XF1701 ^{a,b}	del	Chr3:112080944-115523728	Chr3:112198329-115440031	3241702	<i>de novo</i>	P	P	44K
XF1702 ^{a,b}	dup	ChrX:72323534-91173852	ChrX:72433198-91125471	18692273	mat ^e	P	P	44K
XF1774 ^{a,b}	dup	Chr1:40154508-40303910	Chr1:40206892-40224348	17456	pat	B	P	44K
	del	Chr6:93720661-104454132	Chr6:93875961-104137788	10261827	<i>de novo</i>	P		
	dup	Chr7:126882785-127052026	Chr7:126921418-127024040	102622	mat	B		
	dup	Chr16:29674013-30198553	Chr16:29674848-30197341	522493	<i>de novo</i>	pip		
	dup	ChrX:148845683-149185262	ChrX:148886475-149014466	127991	mat	B		
XF2085	dup	Chr12:8071941-8201351	Chr12:8078311-8088660	10349		B	B	44K
	dup	Chr17:559213-674339	Chr17:602561-667034	64473		B		
	dup	ChrX:42990279-43626670	ChrX:43359500-43595681	236181		B		
XF2184 ^{a,b}	del	Chr11:4408233-4717952	Chr11:4594629-4674790	80161	pat	B	pip	44K
	dup	Chr16:29325645-30332522	Chr16:29673954-30198600	524646	mat	pip		
XF2296 ^b	del	Chr6:117315978-125146392	Chr6:117454656-124979701	7525045	<i>de novo</i>	P	P	44K
XF2307	del	Chr3:151167962-151591250	Chr3:151368848-151542568	173720		B	B	44K
	dup	Chr5:32063009-32173291	Chr5:32110734-32149723	38989		B		
XF2463 ^{a,b}	dup	Chr2:230906744- Tel	Chr2:230994184-243199373	12205189	<i>de novo</i>	P	P	44K
	del	Chr2:Tel-3081968	Chr2:0-2325614	2325614	<i>de novo</i>	P		
XF2481	del	Chr7:155446906-155596400	Chr7:155596206-155596289	83	pat	B	B	DPv2
XF2548	del	ChrX:26157547-26867471	ChrX:26211706-26658260	446554	mat	B	B	44K/DPv1
XF2605	dup	Chr6:56911417-57070165	Chr6:56915520-56920035	4515	pat	VOUS	VOUS	DPv1
XF2623 ^{a,b}	del	Chr12:122219063-123446410	Chr12:122227674-123370690	1143016	<i>de novo</i>	P	P	44K
XF2690	del	Chr16:14648984-15730753	Chr16:15131723-15154174	22451	mat	pip	pip	DPv3
	dup	Chr19:54177650-54291152	Chr19:54182179-54291034	108855	<i>de novo</i>	VOUS		
XF2711 ^{a,b}	dup	Chr20:29467996-30229197	Chr20:29888477-30193658	305181	pat	VOUS	VOUS	44K
XF2761 ^{a,b}	dup	ChrX:42892830-43626670	ChrX:42990220-43595681	605461	mat	VOUS	P	44K
	dup	ChrX:53186683-54291049	ChrX:53221610-54223027	1001417	mat ^e	P		
XF3024	del	Chr3:59908117-59999727	Chr3:59954371-59997178	42807	pat	B	B	DPv3

Paciente	CNV ¹	Coordenadas tamaño mínimo (Hg19) ²	Coordenadas tamaño máximo (Hg19) ²	Tamaño mínimo (pb)	Herencia ³	Clasificación ⁴		Tipo array ⁵
						CNV	Paciente	
XF3064	dup	Chr3:4125019-4403236	Chr3:4354703-4356052	1349		B	B	44K
XF3555	del	Chr7:107789127-107789322	Chr7:107789150-107789287	137	mat	B	B	DPv3
	del	Chr14:42373648-42680573	Chr14:42373669-42373765	96	mat	B		
XF3851	del	Chr7:146471309-146740940	Chr7:146471342-146558801	87459	pat	pip	pip	DPv2
XF3884	del	Chr12:122413642-122441539	Chr12:122437605-122439490	1885	pat	B	B	DPv2
XF3982	dup	Chr2:239860936-239988380	Chr2:239969870-239976515	6645	pat	VOUS	VOUS	DPv2
XF977 ^{a,b}	dup	Chr19:1926016-6908670	Chr19:1952590-6887622	4935032	PTE ^m	P	P	44K

¹del; delección; dup: duplicación.

²Para establecer las coordenadas de las alteraciones teloméricas se ha decidido indicar como *TeI* para la supuesta posición conservada que delimitaría el tamaño máximo y 0 (para el telómero p) o la última posición del cromosoma (para el telómero q) para la última posición alterada que delimitaría el tamaño mínimo.

³mat: materna; m: madre; pat: paterna; p: padre; PTE: portador de translocación equilibrada.

⁴B: benigna; P: patológica; pip: patológica de penetrancia incompleta; VOUS: variante de significado incierto.

⁵44K: array comercial; DP: diseño propio; v: versión.

^aPaciente incluido en la tesis de la Dra. Monfort.

^bPaciente incluido en la tesis de la Dra. Roselló.

^cTriplicación.

^dAlteración en mosaico.

^ePaciente varón con alteración patológica en el cromosoma X heredada de su madre.

^fExpresividad variable en el progenitor.

Anexo X Genes epigenéticos.**Tabla 68:** Listado de los 510 genes considerados como epigenéticos para este trabajo.

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
ACTL6A	BPTF	CHD9	ESCO1	HES1
ACTL6B	BRD1	CIR1	ESCO2	HEY2
AEBP2	BRD2	CLOCK	EYA1	HIC1
ALKBH8	BRD3	CMTR1	EYA2	HIF1A
ANKRA2	BRD4	COPRS	EYA3	HINFP
ANKRD11	BRD7	CREBBP	EZH1	HIRA
ANKRD12	BRD8	CSRP2BP	EZH2	HLTF
APBB1	BRDT	CTCF	FAM175A	HMG20A
APPL1	BRE	CTCFL	FAM65A	HMG20B
APPL2	BRPF1	CTR9	FBXO11	HMGN2
ARID1A	BRPF3	CUL4B	FMR1	HMGN3
ARID1B	BRWD1	CXXC1	FOS	HMGN5
ARID2	BRWD3	DAPK3	FOXA2	HS3ST1
ARID3B	BTG1	DEK	FOXA3	HS6ST2
ARID4A	BTG2	DGAT2	FTSJ2	HUWE1
ARRB1	C10orf90	DGCR8	FTSJ3	ICMT
ASF1A	C11orf30	DMAP1	GATAD2A	IKZF1
ASF1B	C14orf169	DNAJC2	GATAD2B	ING1
ASH1L	C17orf49	DNMT1	GFI1B	ING2
ASH2L	CABIN1	DNMT3A	GLI3	ING3
ASXL1	CAMTA2	DNMT3B	GMNN	ING4
ASXL2	CARM1	DNMT3L	GSG2	ING5
ASXL3	CBX1	DOT1L	GSK3A	INO80
ASZ1	CBX2	DPF3	GSPT1	JADE1
ATF2	CBX3	DPPA3	GTF3C4	JADE2
ATF7IP	CBX4	DPY30	H2AFY	JADE3
ATRX	CBX5	DR1	H2AFY2	JARID2
ATXN7L3	CBX6	DTX3L	HAT1	JHDM1D
AURKA	CBX7	DZIP3	HCFC1	JMJD1C
AURKB	CBX8	EDF1	HDAC1	JMJD6
BABAM1	CCDC101	EED	HDAC10	KANSL1
BAG6	CDH11	EHMT1	HDAC11	KANSL2
BAHD1	CDYL	EHMT2	HDAC2	KANSL3
BANP	CDYL2	EID1	HDAC3	KAT2A
BAZ1A	CECR2	ELP3	HDAC4	KAT2B
BAZ1B	CHD1	ELP4	HDAC5	KAT5
BAZ2A	CHD2	ENY2	HDAC6	KAT6A
BAZ2B	CHD3	EP300	HDAC7	KAT6B
BCOR	CHD4	EP400	HDAC8	KAT7
BCORL1	CHD5	EPC1	HDAC9	KAT8
BHLHE41	CHD6	EPC2	HELLS	KDM1A
BHMT	CHD7	ERCC6	HEMK1	KDM1B
BMI1	CHD8	ERCC8	HENMT1	KDM2A

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
KDM2B	MEG3	PCGF1	RBL1	SKI
KDM3A	METTL14	PCMT1	RBL2	SKP1
KDM3B	MGEA5	PER1	RCBTB1	SMARCA2
KDM4A	MGLL	PER2	RCOR1	SMARCA4
KDM4B	MORF4L1	PHB	RERE	SMARCA5
KDM4C	MORF4L2	PHF1	REST	SMARCB1
KDM4D	MPHOSPH8	PHF10	RING1	SMARCD1
KDM4E	MRGBP	PHF13	RNF168	SMARCC1
KDM5A	MSL1	PHF2	RNF2	SMARCC2
KDM5B	MSL2	PHF20	RNF20	SMARCD1
KDM5C	MSL3	PHF21A	RNF40	SMARCD2
KDM6A	MTA1	PHF8	RNF8	SMARCD3
KDM6B	MTA2	PICK1	RPS6KA3	SMARCE1
KDM8	MTF1	PIK3CA	RPS6KA5	SMC1A
KHDC3L	MTR	PIWIL2	RRP8	SMYD2
KMT2A	MYB	PIWIL4	RSF1	SMYD3
KMT2B	MYOCD	PKN1	RUVBL1	SP1
KMT2C	MYSM1	PKN2	RUVBL2	SP2
KMT2D	MYT1	PLD6	RYBP	SPI1
KMT2E	MYT1L	POLE3	SALL1	SRCAP
KPNA2	NAA60	POLE4	SALL3	SRFBP1
L3MBTL1	NAB2	POU5F1	SALL4	SS18L1
L3MBTL2	NCOA1	PPARGC1B	SAP130	SUDS3
L3MBTL3	NCOA2	PRDM1	SAP18	SUPT20H
L3MBTL4	NCOA6	PRDM13	SAP30	SUPT3H
LCMT1	NCOR1	PRDM6	SARAF	SUPT7L
LEO1	NCOR2	PRDM7	SATB1	SUV39H1
LRWD1	NEK6	PRDM9	SATB2	SUV39H2
MAEL	NIPBL	PRKAA1	SETBP1	SUV420H1
MAGEA1	NKX3-1	PRKAA2	SETD1A	SUV420H2
MAGEA2B	NLRP2	PRKCB	SETD1B	SUZ12
MAPK8	NLRP7	PRMT1	SETD2	TADA1
MBD1	NPTX1	PRMT2	SETD3	TADA2A
MBD2	NR1I3	PRMT3	SETD4	TADA2B
MBD3	NR2C1	PRMT5	SETD5	TADA3
MBD4	NR2E1	PRMT6	SETD6	TAF1
MBD5	NRIP1	PRMT7	SETD7	TAF10
MBD6	NSD1	PRMT8	SETD8	TAF12
MBIP	NSUN2	PYGO2	SETDB1	TAF3
MBTD1	NTMT1	RAB3B	SETDB2	TAF5
MCRS1	NUDT21	RAB3D	SETMAR	TAF5L
MEAF6	OGT	RAB6A	SF3B1	TAF6
MECOM	PADI4	RAD21	SIK1	TAF6L
MECP2	PAF1	RAD9A	SIN3A	TAF7
MED12	PAK2	RAI1	SIN3B	TAF9
MED24	PAX5	RBBP4	SIRT1	TAL1
MEF2B	PAXIP1	RBBP5	SIRT2	TBL1X
MEF2D	PBRM1	RBBP7	SIRT6	TBL1XR1

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
<i>TCF21</i>	<i>TOP2A</i>	<i>UBE2E1</i>	<i>USP3</i>	<i>YEATS4</i>
<i>TDRD1</i>	<i>TOP2B</i>	<i>UBE2N</i>	<i>UTP3</i>	<i>YY1</i>
<i>TDRD3</i>	<i>TRAF6</i>	<i>UBN1</i>	<i>VPS72</i>	<i>ZBTB18</i>
<i>TDRD5</i>	<i>TRDMT1</i>	<i>UBR2</i>	<i>VSNL1</i>	<i>ZBTB7A</i>
<i>TDRD9</i>	<i>TRIM28</i>	<i>UHRF1</i>	<i>WAC</i>	<i>ZFP42</i>
<i>TET1</i>	<i>TRMT112</i>	<i>UHRF1BP1</i>	<i>WDR5</i>	<i>ZFP57</i>
<i>TFAP4</i>	<i>TRRAP</i>	<i>UIMC1</i>	<i>WDR82</i>	<i>ZMYM3</i>
<i>TGS1</i>	<i>TSPYL2</i>	<i>USF1</i>	<i>WDR92</i>	<i>ZMYND15</i>
<i>THBD</i>	<i>UBAP2L</i>	<i>USP16</i>	<i>WHSC1</i>	<i>ZMYND8</i>
<i>TLK1</i>	<i>UBE2A</i>	<i>USP21</i>	<i>WHSC1L1</i>	<i>ZNF217</i>
<i>TLK2</i>	<i>UBE2B</i>	<i>USP22</i>	<i>YEATS2</i>	<i>ZNF335</i>

*"El que hace lo que puede no está obligado a más."
(Lola Peñarubia)*

AGRADECIMIENTOS





Este trabajo no se podría haber llevado a cabo, en primer lugar, sin la colaboración de los pacientes y sus familiares, remitidos desde distintos especialistas de toda la comunidad, que cooperan de forma desinteresada con nuestro grupo de investigación, con el único propósito de mejorar la asistencia proporcionada a estas familias. En segundo lugar, sin la estrecha colaboración de todo el Grupo de Investigación Traslacional en Genética, especialmente de los co-directores de esta tesis. Y por último, sin el apoyo financiero recibido por las distintas entidades públicas y privadas que, a lo largo de estos seis años, han confiado en nuestro trabajo. Especialmente el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, con su contrato Bancaja de investigación para post-residentes (2009/0192), el Instituto de Salud Carlos III (PI08/0648) y la Fundación Ramón Areces (PI2009/0093).

Por otro lado, a nivel personal, a lo largo de toda mi vida ha habido muchas personas que han dejado su impronta y a las que debo agradecer sus enseñanzas, apoyo y afecto, que me ha llevado a donde estoy ahora. No es una tarea fácil, ya que los mecanismos de la estima son complejos. Hay elementos "constitutivos", que parece que siempre están ahí cuando los necesitas, y otros "específicos del desarrollo", que consiguieron dejar una profunda huella aun sin saberlo. Todos ellos se interrelacionan de una forma difícil de explicar o justificar en el mundo del cariño y el aprendizaje. Mis logros se los debo a esas personas, que están detrás de mí, tratando de moldear y dar forma al barro, tolerando los miles de defectos que me ayudan a intentar superar día a día. Pero para entender como se alcanza una meta hay que conocer todo el recorrido desde la salida.

En primer lugar, sin lugar a dudas, debo agradecerlo a mis padres, que me dieron la vida, y desde el minuto cero me han educado, enseñado y mimado, haciendo tantos sacrificios por el camino, de una forma incondicional. A mi hermana, que ha sabido estar ahí en los momentos más difíciles, transmitiéndome su tranquilidad y positivismo. Mis sobrinas, a las que adoro, que no dejan de sorprenderme y recordarme como se ve el mundo a través de los ojos de un niño. Y también estoy muy agradecida a la enorme y maravillosa familia que me rodea: padrinos, tíos, primos... somos muchos y cada uno aporta su grano de arena, desde las travesuras de la infancia y las excursiones por la sierra segoviana, hasta las reuniones familiares en las que, sin darnos cuentas, pasamos de ser los niños a convertirnos en los nuevos adultos, juntando a las recientes generaciones.

No obstante, la curiosidad por la bioquímica y la genética se la debo a una profesora de biología del instituto, estricta y severa, pero una gran pedagoga que consiguió a transmitirme la pasión por la ciencia. Ha habido grandes maestros en mi vida, as my favorite English teacher, who, after so many years, is still a very special friend of mine. Thanks to her, I had the chance to meet people from all over the world in my High School Junior Year (Japan, Chile...). Great people that show me different ways of understanding life, no matter which background, culture, religion or country you are from. People that are still very close to me, even if they are far away. I have very fond memories of my first time

away from home, living with another family in another country and learning to be an older sister.

Ya en la Universidad, comencé otra etapa y el contacto real con el mundo del laboratorio. Primero desde la carrera de químicas, donde pude conocer a grandes compañeros: el "gafe", el trío "calavera" o el cuarteto de la primera fila, con los que pasé tantas horas. Después llegué por fin a bioquímica, disfrutando como una enana, con grandes profesores que me fueron mostrando los entresijos de un mundo tan apasionante como la biología molecular y nuevos amigos con los que disfrutar de los aromas de la ciencia. Cada cual más dispar, cada uno ha tomado un camino, pero todavía encontramos un hueco para poder quedar en el último momento y recordar los viejos tiempos. Durante ese periodo pude empezar a descubrir el mundo de la investigación como alumna interna en el departamento. Pero si de algo estoy realmente agradecida, es por haber tenido la oportunidad de conocer a mi "madre científica", una persona inigualable dentro y fuera del laboratorio, que siempre sabe decirte lo que necesitas oír en cada momento. El mundo de la investigación es un continuo ir y venir de gente, algunos están a tu lado y apenas los conoces, con otros compartes las derrotas y las victorias del día a día de la bancada, como mi "Yang" del grupo de plantas que me pasó el "gusanillo" de la tesis... difícil poder mencionarlos a todos, difícil poder agradecer todo lo que me han aportado.

Después llegaría la etapa de residente, un giro en el camino hacia una aplicación más práctica, y mecánica de la ciencia, pero mucho más aplicada, donde también tuve la gran suerte de encontrar fabulosos compañeros con los que aprender a "resolver marrones". Ese hermano mayor que nunca tuve, la loca por la vida con la que compartí etapas de luces y sombras, y nuestra dulce "alumna en prácticas" que apenas pasó unos meses, pero con la que seguimos en contacto. Después llegarían los "Rs pequeños" especialmente la enamorada del país de los tulipanes y el silencioso "arréglalo todo". Durante esos 4 años pude ir pasando por las distintas secciones e ir aprendiendo diferentes formas de trabajar, pero también vivir muchas más cosas con todo el personal del laboratorio: aprender a dar los buenos días y recibir un caramelo por las mañanas, encontrar facultativos con los que puedes enrolarte en mil actividades (patinaje, defensa personal, salsa...¡quién dijo miedo!), compartir las navidades con el auténtico papa Noel, disfrutar de la compañía de las últimas enfermeras del laboratorio de urgencias y su alegría contagiosa, o hablar con mi loca tocaya, con su visión tan clara de la vida, durante las largas noches de una guardia... También aquí hay mucha gente que me ha ido enseñando, y a las que agradecerles tantas cosas...

Además, con los rotatorios externos, seguí dando más vuelta, aprendiendo en otros centros, con otras maneras de trabajar. El laboratorio forense, con la hiperactiva y meticulosa experta del área de genética. El laboratorio de biología molecular, con su representante recientemente jubilado. Pero sobretodo, la unidad de genética, a la que entré de pura casualidad. Por giros del destino tuve la gran suerte de pasar dos meses en esta unidad, donde pude conocer a mi "padre científico". Una persona con una mente brillante, pero con

un carácter modesto y sencillo, con el que siempre es fácil hablar y hacer alguna apuesta, y cuyo mayor defecto es que no sabe decir que no (cosa que agradezco). Allí me dieron la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación, una pequeña familia de guerreros: el chico para todo que siempre está dispuesto a echar una mano a quien se lo pide, los "cromosomas X" que aportan cordura, desde la energía y el espíritu de lucha o desde la organización y el control tan necesarios, y la benjamina del grupo antes de que yo llegara, que no es consciente de todo lo que vale y de lo que es capaz, y quien fue la primera en darme una oportunidad en el área asistencial. Junto con los nuevos fichajes que van entrando y enriqueciendo el conjunto. Un grupo que intenta estirar los recursos al máximo para obtener el mayor rendimiento de cara a los pacientes, que siempre están tan presentes. Sin ellos este trabajo habría sido imposible. Pero sobretodo agradezco la visión de la ciencia que me han inculcado, lo que realmente es importante de ella, las personas que hay detrás. Sin embargo, en la unidad hay mucha más gente: todas las supervisoras y secretarias que han pasado y he tenido el placer de conocer, el personal técnico, especialmente la joven abuela con sus mil aficiones. Todo un mundo en sí mismo con sus complejas piezas de engranaje.

Y por último, pero no por ello menos importante, a quien me aguanta estos últimos años, sabiendo cuando necesito salir a respirar aire fresco o un achuchón de ánimo, sabiendo cuando callar y dejar que me desahogue sin entender una palabra de lo que digo, estando ahí para mí, de una manera casi casual. Quien no deja de intentar enseñarme a "contar historias" mientras se entrelazan las nuestras.

Después de tantos años, tantos giros en el camino, llega el momento de terminar otra etapa y comenzar una nueva. Me siento una persona muy afortunada, que ha tenido la suerte de encontrar grandes compañeros de viaje.

A los que ya no están, a los que siguen en mi vida, a los que están por llegar.

GRACIAS

