

**Identificació de variants en nombre de còpies i correlació clínica
en una població adulta amb discapacitat intel·lectual
i trastorns psiquiàtrics i/o conductuals**

TESI DOCTORAL

Marina Viñas Jornet

Sabadell, 2015

Identificació de variants en nombre de còpies i correlació clínica en una població adulta amb discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics i/o conductuals

Memòria presentada per **Marina Viñas Jornet** per assolir el grau de

Doctora en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesi doctoral realitzada sota la direcció de la **Dra. Míriam Guitart Feliubadaló** a la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell i adscrita al departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la tutoria de la **Dra. Maria Dolors Coll Sandiumenge**

Marina Viñas Jornet
Doctoranda

Míriam Guitart Feliubadaló
Directora

M^{re} Dolors Coll Sandiumenge
Tutora

Desembre 2015

La Dra. Míriam Guitart Feliubadaló, Cap de Secció del Laboratori de Genètica de la Corporació Sanitària Parc Taulí, i la Dra. Maria Dolors Coll Sandiumenge, professora de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEN:

Que la tesi doctoral titulada “Identificació de variants en nombre de còpies i correlació clínica en una població adulta amb discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics i/o conductuals”, presentada per Marina Viñas Jornet per accedir al títol de Doctora en Biologia, s’ha realitzat sota la seva direcció i compleix amb els requisits formals i científics per ser defensada davant el tribunal corresponent.

Aquest treball s’ha realitzat al laboratori de Genètica de la UDIAT-centre diagnòstic, a la Corporació Sanitària Parc Taulí, en el grup d’investigació de Trastorns neuroconductuals d’origen genètic i Síndrome d’Angelman.

Sabadell, 2015

Míriam Guitart Feliubadaló
Directora

Maria Dolors Coll Sandiumenge
Tutora

La recerca duta a terme és fruit d'un projecte del grup de de Trastorns neuroconductuals d'origen genètic i Síndrome d'Angelman de la Corporació Sanitària Parc Taulí (Sabadell) en col·laboració amb el Servei Especialitzat de Salut Mental i Discapacitat Intel·lectual, Institut d'Assistència Sanitària, Parc Hospitalari Martí i Julià (Girona), i ha estat possible gràcies al suport de la Fundació Parc Taulí Institut Universitari UAB i del *Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS)*.



A la meva mare,

A la meva àvia,

Al meu pare.

“Cada dia sabem més i entenem menys”

Albert Einstein

Agraïments

Ha arribat el moment. Ara és quan em vénen al cap totes les persones a qui els hi dec una part d'aquestes pàgines. Totes les persones que d'una manera o d'una altra han contribuït en el projecte i totes les que m'han acompanyat al llarg d'aquest projecte. Agrair amb paraules no és el meu fort, doncs crec que les paraules no són capaces de transmetre els sentiments reals. Però els que em coneixeu crec que ja sabeu com us n'estic d'agraïda a tots i cadascun de vosaltres. Intentaré plasmar-ho el millor possible.

Primer de tot vull agrair a la Míriam que m'obrí les portes del laboratori. Agraeixo molt haver tingut la oportunitat de treballar amb tu. Un dels valors més grans que m'enduc d'aquesta etapa és la passió per la feina que sempre has mostrat. Esforç, hores de dedicació, fins i tot una mica de desesperació en alguns moments (només cal recordar alguns petits entrebancs amb els arrays o la FISH) ... però sempre amb ganes i il·lusió. Moltíssimes gràcies, Míriam, per la confiança que sempre has mostrat en mi.

Agrair també molt especialment a la M^a Dolors la seva dedicació per fer possible aquesta tesi. Gràcies M^a Dolors per donar el teu punt de vista crucial tant pel desenvolupament del projecte com per la meva formació.

Vull agrair a tots i cadascun dels membres de l'equip de Genètica la seva contribució al projecte, però sobretot, la seva contribució en la meva formació com a professional i com a persona, ja que els valors de passió i entusiasme són marca registrada, un segell d'identitat. Gràcies a la Neus, petita però *matona*, amb una energia inesgotable i de moviments ràpids. Gràcies Neus per veure'm sempre amb tants bons ulls. Gràcies a l'Anna Ruiz, una incorporació que va posar una mica de desordre a les *poïates* i una mica d'ordre en els meus moments de dubtes i incerteses. Moltes gràcies Anna. Gràcies a la nostra fantàstica genetista, la Dra. Gabau, que ens aporta un plus que no té preu mostrant-nos les cares que hi ha darrera de cadascuna de les mostres. Moltes gràcies Elisabeth per la teva dedicació i per apropar-nos als veritables protagonistes: els pacients. I dins del laboratori de Genètica del Taulí, no oblidar el duo de "Las Carmenes", que m'han ensenyat la perspectiva microscòpica de la genètica. Gràcies M^a Carmen i Carmeta. I també gràcies a la Veraguas -amb qui comparteixo el trastorn obsessiu-compulsiu per tenir-ho tot en ordre-, l'Encarna i la Mila, amb les que he compartit l'espai i a qui de tant en tant els anava al darrera per demanar tanda pels termocicladors. Gràcies per la vostra paciència.

I a uns quilòmetres de distància, l'equip de Salt que amb paciència i paciència i paciència....han intentat (no sé si puc dir aconseguit) ensenyar-me els misteris de la ment humana. Ramon, moltíssimes gràcies per no desesperar-te i contestar tots els meus dubtes. Susanna, has estat un element fonamental. Moltes gràcies per tota la feina que has fet, que no ha estat poca, quan a més a més d'aquest ball tenies el teu personal. Gràcies i ... felicitats Doctora, et segueixo de ben a prop! I finalment, la vampiresa de l'equip. L'extractora ambulat que fa els quilòmetres que facin falta per obtenir les mostres necessàries. Moltíssimes gràcies Núria. Ah! I no puc deixar de donar les gràcies al David, tot i que crec que no t'ho podré agrair de manera proporcional a l'ajuda prestada, que ha estat significativament única.

Agrair molt especialment als pacients i a les seves famílies.

També voldria agrair la col·laboració de l'Hospital Pere Mata de Reus, en especial a la Dra. Elisabet Vilella. I al Dr. Lluís Armengol agrair la possibilitat d'entrar al seu laboratori i endinsar-me en el món dels arrays de la mà del Manel i la Cristina. Moltíssimes gràcies. I a en Javi, de la UAB, gràcies per mostrar-me com tractar amb *carinyo* als BACs que tant se'm resistien.

I abans de continuar donant les gràcies crec que cal recordar l'esforç que molts va fer ara fa un parell d'anys. Com sabem, el món de la investigació no està passant els seus millors moments i nosaltres no podíem ser-ne una excepció. Amb un projecte que esgotava les seves existències econòmiques però amb les piles professionals ben carregades, va sorgir la idea de muntar un "mercadillo" que es va convertir en un gran Mercat Solidari gràcies al qual es van obtenir recursos per anar avançant al laboratori. És per això que ara és el moment de tornar a agrair a tot l'equip el seu suport i implicació per fer possible que tot seguís endavant. Míriam, M^a Dolors, Neus, Anna i Elisabeth, gràcies per posar-vos la bata fora del laboratori i convertir-vos en venedores. Agrair a la Regidoria de Salut de l'Ajuntament de Sabadell i a la Corporació Sanitària Parc Taulí el seu suport. Agrair a en Sergi Mateu, per participar en la campanya de difusió i a en Carles Iniesta i en Quim Ribalta per la seva col·laboració. Agrair de tot cor a totes les persones i entitats que van contribuir a la recaptació de material i al desenvolupament de les dues edicions. I sobretot, agrair a tothom que va fer aportacions perquè poguéssim continuar treballant. Per sort, va ser tanta i tanta gent que és impossible poder-los anomenar a tots i cadascun d'ells. Companys de feina, amics, familiars, coneguts i desconeguts. Moltíssimes gràcies! Voldria, però, fer un agraïment especial al Mateu i a la seva furgoneta.

Al laboratori de recerca no hi ha ningú més? De tant en tant apareix algú, tot i que ara cada vegada menys...s'amaguen al despatx, abans al Washington i ara al Santa Fe. Sempre al soterrani, això sí, no volen veure la llum del sol. I a més, ara tenen un laboratori al Santa Fe. Però hem compartit una bona colla d'hores al *lab*, a l'*office*, al pati fent el cafetó amb vistes a la mola. Amb sort, *high-definition* i tot! I fins i tot hores fora de l'horari laboral, perquè més que companys de feina, sou una gran família. Sergio, M^a Mercè i MeriJou (la camella vikinga famosa), gràcies per acollir-me quan vaig arribar. Gràcies Malili per les teves *performances*, que encara no entenc com no t'he convençut perquè facis teatre. I la Jéssica...vaia una altra. Com et trobem a faltar, ara el laboratori és més silenciós. Gràcies, Raquel, pel teu somriure constant encara que estiguis esgotada. Portes una energia al damunt que no te l'acabes, *pencona*. Ja poden patir els teus nens, Josep i Marta, no sabeu el que us espera. Ànims nanus, que això ànims nanus! I a tots els que formeu part del fantàstic soterrani, Néstor, Neus, Laura, Jose, Evelyn, Ariadna, Sílvia, Mercè,...i segur que m'acabo deixant a algú. No dona, a tu no se't deixo...Annaaa!!! Quan vaig arribar al taulí ja havies marxat però per sort hi vas tornar. Què hauria fet sinó? Pensa que segueixo les teves passes de ben a prop. Qualsevol moviment que facis...oju que vinc al darrera eh. Gràcies pels teus consells, tant professionals com no professionals.

No es poden acabar els agraïments sense donar les gràcies a totes les persones que han "patit" aquesta tesi des de l'àmbit personal. Gràcies a tots els amics i amigues que heu estat allà intentant entendre què faig. Als que vam créixer junts i encara teniu la paciència d'aguantar-me, Carla, Pere i Marta. A la Glòria, saps que ets el meu puntal. Gràcies per ser-hi sempre! A l'Aleix, per estar preparat per qualsevol SOS durant aquest últim mes. Als *Saturday's*, Quim, Nando, Francesc, Tina, Mireia, David, Virgi, gràcies per aquests "diumenges a la muntanya" tant diferents i per aguantar el meu "humor" d'aquests últims mesos. Família, que això ja està!!! (bé, el meu sentit de l'humor crec que el porto a l'ADN i no el podré canviar). A l'Esteve, gràcies per ser-hi, per resoldre els dubtes existencials i saber-ho tot. Als geganters i medievals, gràcies pels riures, músiques i danses compartides que provoquen onades de somriures, i als cierverus que poc a poc he anat abandonant però sabeu que no deixaré mai de ser-hi. I gràcies als que em vau acompanyar i als que em vau acollir en el gran viatge, un viatge que va servir per carregar les piles i tenir noves perspectives. He après moltes coses de totes i cadascun de vosaltres.

Gràcies a la família, tiets, tietes, cosins, cosines. Gràcies pel vostre suport. Joan i Meritxell, gràcies per venir-me a fer el dinar i mimar-me tant. I gràcies especialment al tiet Joan, saps que ets un dels meus tiets preferits. I a l'Albert, pels teus tàpers i flams.

I el millor, com sempre, es fa esperar. A la meua mare, per fer-me creure que tot el que vulgui fer, ho puc fer. Una dona lliutadora que m'ha ensenyat els valors de dedicació i perseverança en les coses que vols i estimes. Igual que la iaia. Gràcies, iaia, per esenyar-me el valor de la feina ben feta. Sense vosaltres us asseguro que no seria el que sóc. Gràcies per ser-hi sempre!

I finalment, gràcies als que ja no hi sou. Però en el fons, hi sou en tot moment. I sobretot a tu. Però tu si que no tinc paraules. Gràcies, pare!

ÍNDEX

ÍNDEX.....	i
ÍNDEX DE TAULES	v
ÍNDEX DE FIGURES.....	vii
ABREVIACIONS	ix
1 . INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 . Variabilitat genètica i diversitat interindividual.....	3
1.1.1 . Mecanismes de formació de les variants estructurals	6
1.1.2 . Variants en nombre de còpies	9
1.1.2.1 . Variants en nombre de còpies i patologia. Mecanismes d'implicació	11
1.1.2.2 . Bases de dades per la classificació de les variant en nombre de còpies	12
1.2 . Trastorns del neurodesenvolupament i trastorns psiquiàtrics	14
1.2.1 . Discapacitat intel·lectual.....	15
1.2.1.1 . Prevalença de la discapacitat intel·lectual.....	16
1.2.1.2 . Etiologia de la discapacitat intel·lectual.....	17
1.2.2 . Trastorns psiquiàtrics i trastorns de la conducta.....	21
1.2.2.1 . Prevalença dels trastorns psiquiàtrics i dels trastorns de la conducta	22
1.2.2.2 . Etiologia dels trastorns psiquiàtrics	23
1.2.3 . Comorbiditat fenotípica	25
1.2.4 . Aproximacions en l'estudi genètic de la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics.....	27
1.2.5 . Vies i xarxes moleculars implicades en la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics.....	29
1.2.6 . Correlació genotip-fenotip.....	30
1.3 . Tècniques d'anàlisi genètica	32
1.3.1 . Cariotip convencional	32
1.3.2 . Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	32
1.3.3 . <i>Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification</i>	33
1.3.4 . Cariotip molecular.....	35
1.3.5 . Tecnologia de seqüenciació de segona generació.....	37
Hipòtesi	39
Objectius	39

2 .MATERIAL I MÈTODES.....	41
2.1 . Subjectes d'estudi	43
2.1.1 . Cohort d'adults amb diagnòstic dual	43
2.1.1.1 . Estratègia d'anàlisi genètica.....	48
2.1.2 . Estudi cas-control.....	50
2.1.3 . Estudi de segregació de la deleció 2p16.3 en tres famílies	51
2.2 Mètodes	52
2.2.1 . Obtenció de mostres biològiques	52
2.2.2 . Cariotip de bandes G.....	55
2.2.3 . Cribatge de la síndrome X Fràgil	55
2.2.4 . Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	57
2.2.4.1 . Hibridació <i>in situ</i> fluorescent amb sondes comercials.....	57
2.2.4.2 . Hibridació <i>in situ</i> fluorescent amb sondes no comercials.....	60
2.2.5 . <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i>	62
2.2.5.1 . <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i> amb sondes comercials.....	62
2.2.5.2 . <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i> específic de metilació.....	66
2.2.5.3 . <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i> amb sondes no comercials. 71	
2.2.6 . Cariotip molecular.....	72
2.2.6.1 . Anàlisi de les dades	75
2.2.7 . Classificació de les variants en nombre de còpies.....	76
2.2.8 . Interpretació dels resultats.....	77
2.2.9 . Caracterització de punts de trencament	77
2.2.10 . Anàlisi estadístic	80
2.2.10.1 . Anàlisi de les característiques de les variants en nombre de còpies	80
2.2.10.2 . Anàlisi de les variables categòriques.....	80
3 . RESULTATS	83
3.1 . Valoració global del rendiment de les tècniques emprades en l'estratègia diagnòstica.....	85
3.2 . Tècniques de confirmació de les variants en nombre de còpies	90
3.3 . Anomalies genètiques identificades	90
3.3.1 . Síndromes específiques clínicament conegudes	93
3.3.2 . Translocació cromosòmica equilibrada	95
3.3.3 . Variants en nombre de còpies	96
3.3.3.1 . Variants en nombre de còpiespatogèniques	99
3.3.3.1.1 . Alteracions cromosòmiques.....	101
3.3.3.1.2 . Veriants en nombre de còpies recurrents.....	105

3.3.3.1.3 . Variants en nombre de còpies a la mateixa regió cromosòmica en individus no emparentats	109
3.3.3.1.4 . Múltiples variants en nombre de còpies en un únic individu	113
3.3.3.1.5 Altres variants en nombre de còpies patogèniques.....	114
3.3.3.2 . Variants de significació clínica incerta probablement patogèniques	116
3.3.3.2.1 . Germans amb discapacitat intel·lectual	119
3.3.3.2.2 . Variants en nombre de còpies a la mateixa regió cromosòmica en tres individus no emparentats	124
3.3.3.2.3 . Altres variants en nombre de còpies de significació clínica incerta	127
3.3.4. Efecte de les variants en nombre de còpies en el fenotip	132
3.4 . Estudi cas control de variants en nombre de còpies en set regions específiques	133
4 . DISCUSSIÓ	135
4.1 . Avaluació de les tècniques de cribatge i de confirmació	137
4.1.1 . <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i> pel cribatge de regions subtelomèriques	137
4.1.2 . Cariotip molecular pel cribatge del genoma.....	138
4.2 . Tècniques de confirmació.....	139
4.3 . Avaluació de l'estratègia d'anàlisi genètica	140
4.3.1 . Contribució de les variants en nombre de còpies a la discapacitat intel·lectual i als trastorns psiquiàtrics/conductuals	143
4.3.1.1 . Variants en nombre de còpies recurrents.....	146
4.3.1.2 . Variants en nombre de còpies no recurrents	151
4.3.1.2.1 . Variants en nombre de còpies a la mateixa regió cromosòmica en individus no emparentats: del2p16.3 i del7q31.....	152
4.3.1.2.2 . Variants de significació clínica incerta probablement patogèniques.....	155
4.4 . Re-avaluació dels criteris de patogenicitat	162
4.5 . Variabilitat genètica i heterogeneïtat fenotípica	165
4.6 . Perspectives en l'estudi de la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics.....	168
5 . CONCLUSIONS	171
6 . BIBLIOGRAFIA.....	175
7 . ANNEX 1	201
8 . ANNEX 2	210

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1.1: Freqüència i penetrància estimada de les variants en nombre de còpies en síndromes de discapacitat intel·lectual.....	20
Taula 1.2: Epidemiologia genètica dels trastorns psiquiàtrics	23
Taula 1.3: Pleiotropia de variants en nombre de còpies i gens candidats pels trastorns psiquiàtrics	25
Taula 2.1: Tests per l'avaluació cognitiva, psicològica i psiquiàtrica.....	44
Taula 2.2: Trastorns psiquiàtrics	45
Taula 2.3: Individus amb trastorns psiquiàtrics i/o de la conducta	45
Taula 2.4: Dismorfologia enregistrada	46
Taula 2.5: Tests per la valoració cognitiva i psicològica en funció de l'edat.....	51
Taula 2.6: Sondes utilitzades per l'estudi de les síndromes conegudes	57
Taula 2.7: Conjunt de barreges incloses al Kit Totalvision (Vysis).....	58
Taula 2.8: Sondes incloses als kits de MLPA pel cribatge de regions subtelomèriques.....	63
Taula 2.9: Sondes incloses al kit de MLPA específic de metilació.....	66
Taula 2.10: Recomanacions pel disseny de les sondes de MLPA.....	71
Taula 2.11: Valors dels controls de qualitat del cariotip molecular.....	75
Taula 2.12: Bases de dades utilitzades.....	77
Taula 2.13: Variables categòriques analitzades en funció de la presència o absència de variants en nombre de còpies patogèniques i variants de significació clínica incerta probablement patogèniques.....	81
Taula 3.1: Estratègia d'anàlisi genètica i rendiment diagnòstic.....	85
Taula 3.2: Taula pel càlcul de la sensibilitat i especificitat analítica de la MLPA	87
Taula 3.3: Taula pel càlcul de la sensibilitat i especificitat diagnòstica de la tècnica MLPA	88
Taula 3.4: Confirmació de variants en nombre de còpies identificades mitjançant cariotip molecular.....	89
Taula 3.5: Alteracions genètiques identificades en la cohort d'adults amb diagnòstic dual.....	91
Taula 3.6: Pacients amb síndromes clínicament reconegudes	94
Taula 3.7: CNVs identificades en els 86 individus analitzats mitjançant CMA.....	97
Taula 3.8: Fenotip cognitiu i psiquiàtric i genotip dels individus amb variants en nombre de còpies classificades com a patogèniques	100
Taula 3.9: Fenotip dels pacients i familiars portadors de la deleció 2p16.3.....	112
Taula 3.10: Fenotip psiquiàtric i cognitiu i genotip dels individus amb CNVs classificades com a VOUSpp	117
Taula 3.11: Gens candidats inclosos dins de les CNVs classificades com a VOUSpp	117
Taula 3.12: Anàlisi comparatiu de variables categòriques.....	132
Taula 3.13: Característiques dismòrfiques freqüents a la població.....	133
Taula 4.1: Informació general de les tres delecions 7q31 i recull d'onze CNVs descrites a la literatura.....	155
Taula 4.2: Distribució de les variants patogèniques (CNVp i VOUSpp) segons el grau de DI....	166
Taula 4.3: Regions i gens candidats a trastorns psiquiàtrics.....	167

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1: Variabilitat en el genoma humà	5
Figura 1.2: Esquema del mecanisme de recombinació homòloga no-al·lèlica	6
Figura 1.3: Esquema dels mecanismes no replicatius de recombinació no homòloga.....	7
Figura 1.4: Representació dels mecanismes replicatius	8
Figura 1.5: Ideograma de les principals VE polimòrfiques	10
Figura 1.6: Efecte de les CNVs en l'expressió gènica	12
Figura 1.7: Relació de les causes de la discapacitat intel·lectual	20
Figura 1.8: Representació del solapament entre trastorns psiquiàtrics(Burmeister et al. 2008).	22
Figura 1.9: Representació de l'efecte pleiotròpic d'alguns gens associats a discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics.....	26
Figura 1.10: <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i> (MLPA)	34
Figura 1.11: Esquema del cariotip molecular	36
Figura 2.1: Estratègia d'anàlisi genètica.....	49
Figura 2.2: Gràfic obtingut a partir del software <i>GeneMapper</i>	65
Figura 2.3: Esquema de la tècnica de MLPA específic de metilació (MS-MLPA)	68
Figura 2.4: Gràfics obtinguts a partir del software <i>GeneMapper</i> per cada mostra analitzada per MS-MLPA.....	70
Figura 2.5: Localització dels encebadors dissenyats per la caracterització dels punts de trencament.....	78
Figura 3.1: Regió subtelomèrica del cromosoma 22.....	86
Figura 3.2: Freqüència de les diferents alteracions genètiques identificades.....	92
Figura 3.3: Cariotip amb bandes G de la translocació equilibrada t(6;9)(p27;q13).....	95
Figura 3.4: Representació de l'anàlisi mitjançant CMA i de la classificació de CNVs rares.....	97
Figura 3.5: Representació de la longitud de les CNVs en les tres categories.....	98
Figura 3.6: Herència de les variants en nombre de còpies patològiques	99
Figura 3.7: Deleció 16p12.3p11.2	101
Figura 3.8: Duplicació Xp21.3p11.4.....	102
Figura 3.9: Cromosoma X derivatiu.....	104
Figura 3.10: Arbre genealògic de la pacient amb duplicació Xp i deleció Xq.....	104
Figura 3.11: Representació gràfica del resultat de MLPA amb el kit P070 al pacient 98.....	105
Figura 3.12: Representació gràfica de l'estudi de microsatèl·lits del cromosoma 15	106
Figura 3.13: Imatge de cariotip molecular de la deleció 15q13.2q13.3.....	107
Figura 3.14: Representació de UCSC de la regió 15q13.2q13.3	107
Figura 3.15: Representació gràfica del resultat deMLPA amb el kit P036	108
Figura 3.16: Imatge de CMA de la deleció 22q13	108
Figura 3.17: Representació de la localització molecular de les tres delecions 2q16.3	111
Figura 3.18: Arbres genealògics de les tres famílies amb deleció 2q16.3	111
Figura 3.19: Reorganització subtelomèrica identificada al pacient 26	113
Figura 3.20: Deleció 9q31.1q32	114

ÍNDEX FIGURES

Figura 3.21: Imatge de CMA de la deleció 12p12.1	115
Figura 3.22: Herència de les variants de significació clínica incerta probablement patogèniques	116
Figura 3.23: Duplicació 9p24.2p24.1 identificada mitjançant CMA.....	119
Figura 3.24: Arbre geneològic dels pacients 122 (II.1) i 123 (II.2).....	119
Figura 3.25: Representació de UCSC dels gens RefSeq inclosos a la regió 9p24.2p24.1	120
Figura 3.26: Duplicació 15q14q15.1.....	121
Figura 3.27: Representació de UCSC dels gens RefSeq inclosos a la regió 15q14q15.1	122
Figura 3.28: Duplicació 17q24.1q24.2.....	123
Figura 3.29: Deleció 10q21.3.....	124
Figura 3.30: Representació de UCSC del contingut genètic de les tres delecions identificades a 7q31.....	125
Figura 3.31: Deleció 7q31 del pacient 32	125
Figura 3.32: Deleció 7q31 del pacient 151	126
Figura 3.33: Deleció 7q31 de la pacient 115	127
Figura 3.34: Duplicació 3q29 en homozigosi.....	128
Figura 3.35: Arbre geneològic del pacient 34.....	128
Figura 3.36: Deleció 15q26.2.....	129
Figura 3.37: Representació de la localització molecular de la deleció 8p23.1.....	130
Figura 3.38: Representació de la localització molecular de la duplicació 12q24.13.....	130
Figura 3.39: Representació de la localització molecular de la deleció 8q21.13.....	131
Figura 3.40: Representació de la localització molecular de la deleció 2p12.....	131
Figura 4.1: Nou algoritme proposat per l'estudi genètic de la discapacitat intel·lectual i/o diagnòstic dual	143
Figura 4.2: Mapa de CNVs en la cohort d'adults amb diagnòstic dual	145
Figura 4.3: Representació de la regió 15q11q13	147
Figura 4.4: Regió pericentromèrica del cromosoma 16.....	149
Figura 4.5: Regió 22q13.33.....	150
Figura 4.6: Regió 7q31.....	154

ABREVIACIONS

aCGH	array d'hibrdació genòmica comparada
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
CMA	Cariotip molecular
CNV	Variants en nombre de còpies (<i>Copy Number Variant</i>)
CNVb	Variants en nombre de còpies benigne
CNVp	Variants en nombre de còpies patogènica
DC-LD	Diagnostic Criteria-Learning Disabilities
DECIPHER	<i>DatabasE of genomIc varIation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DI	Discapacitat Intel·lectual
DSM	Manual de Diagnòstic i Estadística del Retard Mental (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
ECARUCA	<i>European Cytogeneticists Association</i>
EMBL-EMI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FoSTeS	<i>Fork Stalling and Template Switching</i>
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
ICD	Manual Internacional de Classificació de Malaltia
Indels	Insercions/Delecions
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays
LCR	<i>Low Copy Repeats</i>
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
LTRs	<i>Long Terminal Repeats</i>
MIR	<i>Mammalian Interspersed Repeats</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification</i>
MMBIR	<i>Microhomology-Mediated Break-Induced Replication</i>
MMEJ	<i>Microhomology- Mediated-End-Joining</i>
NAHR	<i>Non-Allelic Homologous Recombination</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NHR	<i>Non-Homologous Recombination</i>
OMS	Organització Mundial de la Salut

ABREVIACIONS

PAC	<i>P1-derived Artificial Chromosome</i>
pb	Parell de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGC	<i>Psychiatric Genomics Consortium</i>
QD	Quocient de Dosi
QI	Quocient Intel·lectual
SA	Síndrome d'Angelman
SL	Síndrome de Legius
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNV	<i>Single Nucleotide Variants</i>
SPW	Síndrome de Prader Willi
SQZ	Esquizofrènia
SVCF	Síndrome VeloCardioFacial
SW	Síndrome de Williams
SXF	Síndrome del X Fràgil
TB	Trastorn Bipolar
TC	Trastorn de la Conducta
TDAH	Trastorn de Dèficit d'Atenció i Hiperactivitat
TEA	Trastorn de l'Espectre Autista
TND	Trastorn del Neurodesenvolupament
TP	Trastorn Psiquiàtric
UCSC	Universitat de Califòrnia de Santa Cruz
VE	Variants Estructurals
VOUS	Variants de significació clínica incerta (<i>Variant Of Unknown Significance</i>)
VOUSpb	Variants de significació clínica incerta probablement benigne
VOUSpp	Variants de significació clínica incerta probablement patogènica
WTCCC	<i>Wellcome Trust Case Control Consortium</i>
XLMR	<i>X-Linked Mental Retardation</i>
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>

1 . INTRODUCCIÓ

1.1 . Variabilitat genètica i diversitat interindividual

Un dels grans reptes dels darrers anys en el camp de la genètica humana ha estat determinar la seqüència d'ADN que conforma el genoma humà. L'ambiciós **Projecte Genoma Humà** iniciat l'any 1990, es proposava determinar les posicions relatives dels aproximadament 3 bilions de nucleòtids (o parells de bases, pb) i identificar els 20.000 o 25.000 gens que hi són presents. Ha estat un esforç internacional de més de tretze anys que ha posat a l'abast de la comunitat científica una seqüència de referència del genoma humà eucromàtic. Aquesta gran fita en la història de la genètica humana és l'inici d'una nova era en els estudis biomèdics, però al mateix temps ha promogut el desenvolupament de noves tecnologies que estan accelerant el coneixement del genoma humà a una gran velocitat.

Les variants en el genoma contribueixen a les diferències fenotípiques entre individus, poblacions i espècies. Aquestes variacions en la seqüència del genoma humà es poden produir a diferents nivells i es classifiquen en dos grans grups: variants en la seqüència i variants estructurals (VE) (Figura 1.1). Les variants en la seqüència, anomenades *single nucleotide variants* (SNV), inclouen canvis de base (mutacions puntuals) i insercions o delecions (Indels) d'un únic nucleòtid respecte a la seqüència de referència. Les VE impliquen reordenaments de segments d'ADN, des d'alteracions que afecten a dos pb fins a alteracions de cromosomes sencers, que es classifiquen en dos grups en funció de si tenen o no tenen un efecte de dosi: variants desequilibrades i variants equilibrades. El projecte del **Consorci Internacional HapMap** va néixer l'any 2002 amb l'objectiu de comparar les seqüències genètiques de diferents individus per identificar regions cromosòmiques que comparteixen variants genètiques. En la fase inicial del projecte, es van analitzar 600.000 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) en 270 mostres de quatre poblacions diferents: 30 trios de Yoruba (Africans), 30 trios de residents del nord i oest d'Europa, 44 individus japonesos i 45 individus xinesos no emparentats. Aquest projecte ha permès disposar d'un mapa d'haplotips (*HapMap*) del genoma humà, on es descriuen els patrons comuns de la variació genètica humana. La informació generada per aquest projecte està a lliure disposició dels investigadors i s'utilitza per la identificació de variants genètiques que afecten a la salut, ja sigui perquè es troben

INTRODUCCIÓ

associades a malalties, a la resposta a fàrmacs o a factors ambientals. Aquesta aproximació va permetre determinar que dues persones no emparentades comparteixen aproximadament el 99,5% de la seva seqüència d'ADN (Consortium 2003).

La incorporació de la tecnologia de seqüenciació massiva o seqüenciació de segona generació (NGS) ha permès abordar la caracterització de la variabilitat en el genoma de poblacions a gran escala. L'any 2007 s'inicia el **1000 Genomes Project** que també té com a objectiu principal categoritzar la variabilitat genètica en l'espècie humana. Mitjançant la seqüenciació del genoma de 2.504 individus de 26 poblacions diferents d'arreu del món, s'ha elaborat un catàleg de 88 milions de variants (84,7 milions d'SNPs, 3,6 milions d'indels i 60.000 VE) que amplia en un 40% el nombre de variants conegudes del genoma humà (Auton et al. 2015). Més del 99,9% de les variants consisteixen en SNPs, però les VE afecten a més pb i s'ha estimat que el genoma conté entre 2.100 i 2.500 VE. En el conjunt de les variants identificades, la majoria són rares (<1% de la població general), però només suposen l'1-4% de les 4-5Mb en què cada genoma individual difereix de la seqüència de referència. Aquest projecte també ha contribuït en la caracterització de la història i demografia de les poblacions humanes ancestrals. El 1000 *Genomes Project* ha contribuït en el desenvolupament de nous mètodes estadístics i algoritmes per gestionar la gran quantitat d'informació que genera la tecnologia de NGS. Les dades originades per aquest projecte s'actualitzen periòdicament en la base de dades pública del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, que actualment conté un total de 144.205.811 SNPs i més 6.623.477 VE.

Les VE representen la major font de variació genòmica, afectant a unes 8,9Mb de la seqüència del genoma humà en comparació a les 3,9Mb afectades per SNPs (Sudmant et al. 2015).

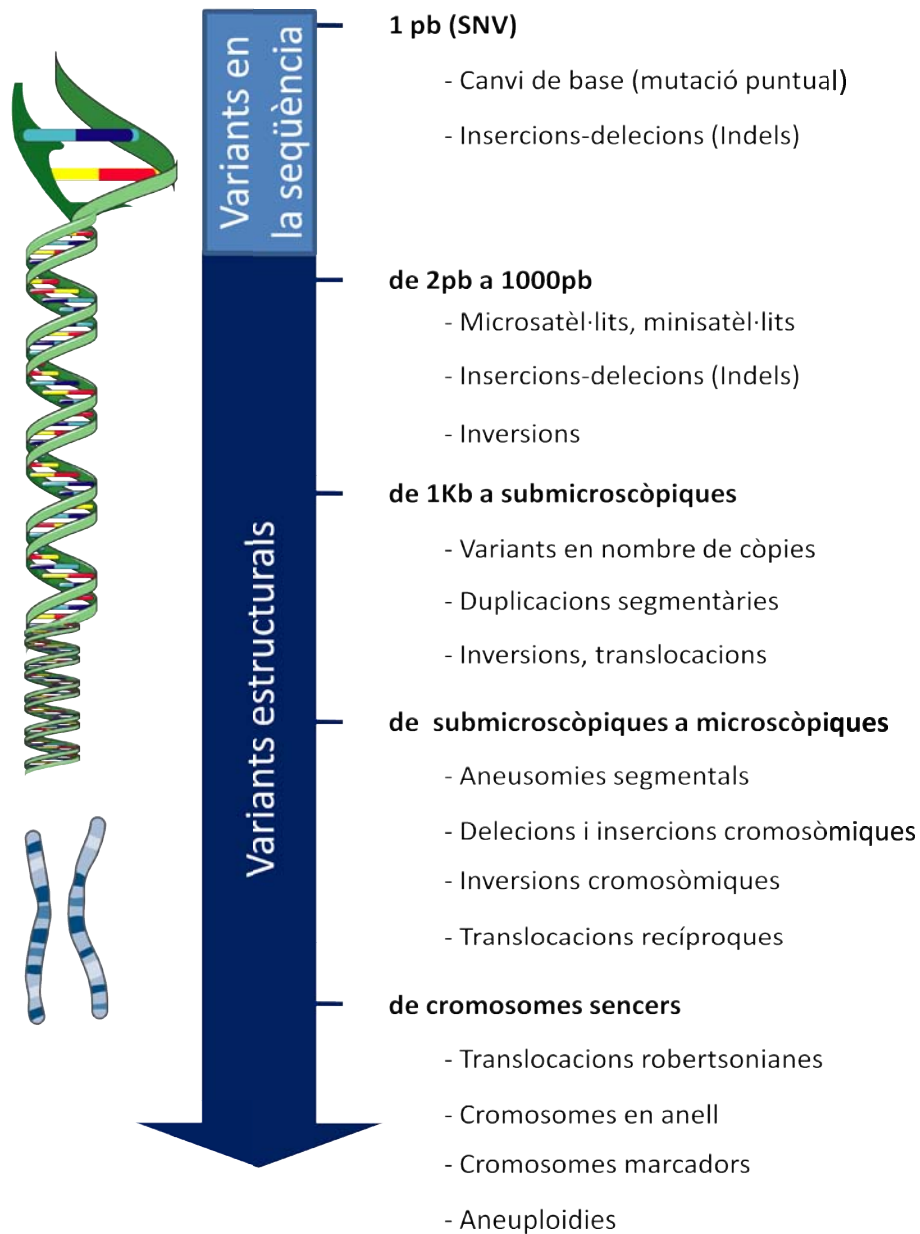


Figura 1.1: Variabilitat en el genoma humà

Es classifiquen en dos grans grups: les variants en la seqüència de nucleòtids i les variants estructurals, on s'engloben les alteracions que impliquen des de 2pb fins a anomalies de cromosomes sencers.

1.1.1. Mecanismes de formació de les variants estructurals

Els canvis en l'estructura cromosòmica es poden originar a partir de dos mecanismes generals:

La **recombinació homòloga no al·lèlica** (NAHR) és una forma de recombinació homòloga que es produeix entre dues regions d'ADN que tenen una elevada similitud en la seqüència (Figura 1.2). Els *low copy repeats* (LCR), també coneguts com a duplicacions segmentàries, són elements de la seqüència altament repetitius i recurrents en el genoma, d'una longitud entre 10Kb i 300Kb i amb un grau de similitud en la seqüència superior al 95%. Aquests segments tenen una elevada predisposició a reorganitzar-se durant la meiosi (Turner et al. 2008) i, en menor freqüència, durant la mitosi (Lam et al. 2006; Lam et al. 2007). La seva distribució en *clústers* al llarg del genoma i l'elevada homologia en la seqüència afavoreix l'aparellament i entrecruament entre les dues regions homòlogues no al·lèliques. La orientació directa de la seqüència dels LCR resulta en delecions i duplicacions, mentre que la orientació invertida de la seqüència homòloga té com a conseqüència la generació d'inversions. La NAHR pot produir-se entre cromosomes homòlegs (intercromosòmic), entre cromàtides germanes (intercromàtid) i dins d'una mateixa cromàtide (intracromàtid).

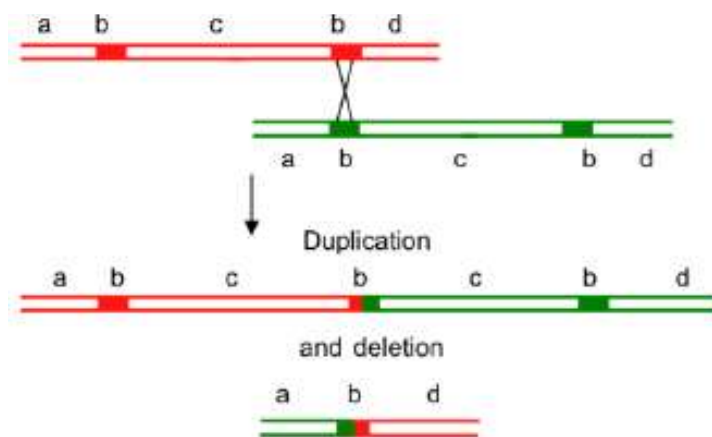


Figura 1.2: Esquema del mecanisme de recombinació homòloga no-al·lèlica

La recombinació i entrecruament (X) es produeix entre els *low copy repeats* (LCR, caixes vermelles i verdes) resultant una duplicació i una delecció recíproca. Esquema obtingut de (Hastings et al. 2009)

La **recombinació no homòloga** (NHR) és el mecanisme majoritari implicat en les reparacions dels trencaments de doble cadena de l'ADN cromosòmic en cèl·lules somàtiques. La reparació es pot produir en regions sense homologia o bé amb segments de microhomologia. Existeixen dos grups de NHR:

- Mecanismes no replicatius (Figura 1.3):
 - *Non-homologous end joining* (NHEJ) o unió d'extremes no homòlegs, que resulta d'un error en la reparació dels trencaments de doble cadena de l'ADN en regions repetitives sense homologia, com són les LTRs (*long terminal repeats*), LINEs (*long interspersed nuclear elements*) i MIRs (*mammalian interspersed repeats*).
 - *Microhomology-mediated end-joining* (MMEJ), es produeix un anellament dels extrems del trencament de doble cadena a partir de segments de 5-25pb d'homologia, produint la pèrdua del material localitzat entre els dos segments de micro-homologia.

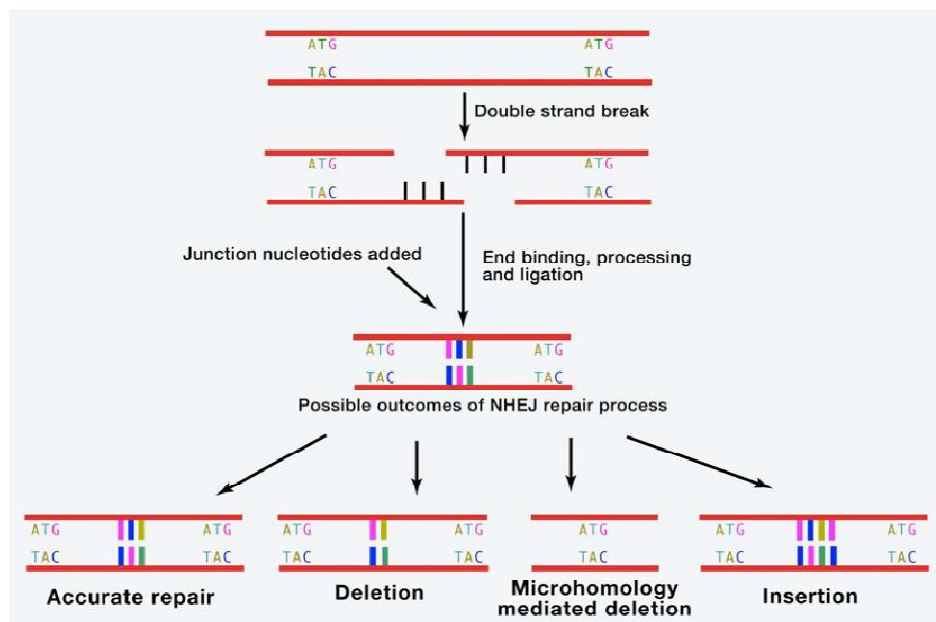


Figura 1.3: Esquema dels mecanismes no replicatius de recombinació no homòloga

L'anellament dels extrems de dobles cadena pot ser entre regions repetitives sense homologia (NHEJ) o entre regions de microhomologia (MMEJ). (Malhotra et al. 2012).

INTRODUCCIÓ

– Mecanismes replicatius (Figura 1.4):

- *Replication fork stalling and template switching* (FoSTeS), en el que la presència d'estructures secundàries bloquegen el progrés de la forca de replicació i l'extrem 3' envaeix una segona forca de replicació. Aquest mecanisme pot esdevenir en delecions, duplicacions, inversions i translocacions en funció de la posició de la segona forca de replicació.
- *Microhomology-mediated break-induced replication* (MMBIR), l'extrem 3' de la forca de replicació, bloquejada per una estructura secundària, presenta un segment de micro-homologia amb una segona forca de replicació i l'envairà per poder seguir amb la replicació.

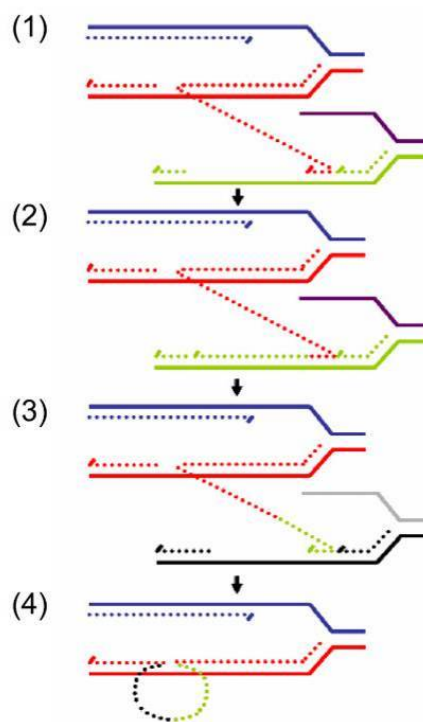


Figura 1.4: Representació dels mecanismes replicatius

(1) Es produeix un embús que impedeix la progressió de la replicació, pel que la cadena motlle (línia puntejada vermella) s'allibera i (2) envaeix una segona forca de replicació (línies contínues verd i lila) (FoSTeS) en la que pot existir micro-homologia en la seqüència (MMBIR). (3) Un cop alliberada de la segona forca de replicació, la forca original pot envair una tercera forca (línies gris i negra). Aquest procés pot succeir diverses vegades fins que (4) es retorna a la forca original. Esquema obtingut de (Gu et al. 2008)

1.1.2. Variants en nombre de còpies

Una de les fonts de variabilitat més importants en el genoma prové de delecions, duplicacions i insercions - col·lectivament anomenades variants en nombre de còpies (CNV) - que alteren l'estat diploide de l'ADN. Aquestes alteracions poden no tenir un efecte fenotípic, representar trets adaptatius o poden ser la base genètica d'una malaltia. La identificació de les CNVs com a font de variabilitat interindividual en població sana i el seu possible impacte en patologia va promoure la realització d'un mapa de CNVs en la població general (Figura 1.5) per establir posteriors associacions amb malalties humanes (Lafrate et al. 2004; Sebat et al. 2004) .

L'any 2006 es va publicar el primer mapa de CNVs en població general. Mitjançant dues plataformes de *microarrays* es van analitzar 120 trios (pacient i progenitors) provinents de quatre poblacions amb ancestres diferents (Redon et al. 2006). En aquesta primera aproximació, es van identificar CNVs en el 12% del genoma, amb una major freqüència de les de mida petita. Es va determinar que aquestes CNVs es troben distribuïdes de manera heterogènia al llarg del genoma i amb una selecció negativa per les regions codificants. En aquest estudi es va establir que la variabilitat entre els genomes de dos individus en forma de CNVs és del 0,7%. Finalment, també es va observar un enriquiment de CNVs en regions properes a 15q11q13, responsable de les síndromes de Prader-Willi (SPW) i Angelman (SA), i la regió 22q11.2, responsable de la síndrome Velocardiofacial (SVCF), suggerint que l'elevada inestabilitat d'aquestes regions s'associava a la presència de LCR flanquejants.

Des d'aleshores, diversos estudis realitzats en població sana han contribuït a definir el mapa de CNVs en el genoma humà. Recentment, Zarrei i col·laboradors han recopilat les dades provinents de 26 estudis en individus sans, procedents de diferents ètnies, per construir un mapa actualitzat de CNVs del genoma humà (Zarrei et al. 2015). Mitjançant aquest meta-anàlisi es va determinar que entre el 4,8% i el 9,5% del genoma humà presenta variabilitat en forma de CNVs, proporció inferior a la descrita en els primers estudis on aquest percentatge era del 12%. Aquest estudi va confirmar una distribució desigual al llarg del genoma, amb una major freqüència de CNVs en les regions subtelomèriques i pericentromèriques, una proporció superior en regions no codificants respecte a les codificants i una proporció inferior en les regions amb gens associats a patologia. Entre el 45% i el 60% de les CNVs s'associen a LCR i el número de CNVs és inversament proporcional a la seva longitud. A més a més, les dades

INTRODUCCIÓ

obtingudes van permetre identificar ~100 gens que poden estar absents en la seqüència genòmica sense produir conseqüències fenotípiques aparents.

En la darrera actualització de la base de dades de variants genòmiques en població general DGV (*Database of Genomic Variants*) hi ha registrades les dades de 67 estudis que inclouen un total de 6.266.574 CNVs, que corresponen a 491.894 regions, i 29.036 inversions localitzades en 1.745 regions

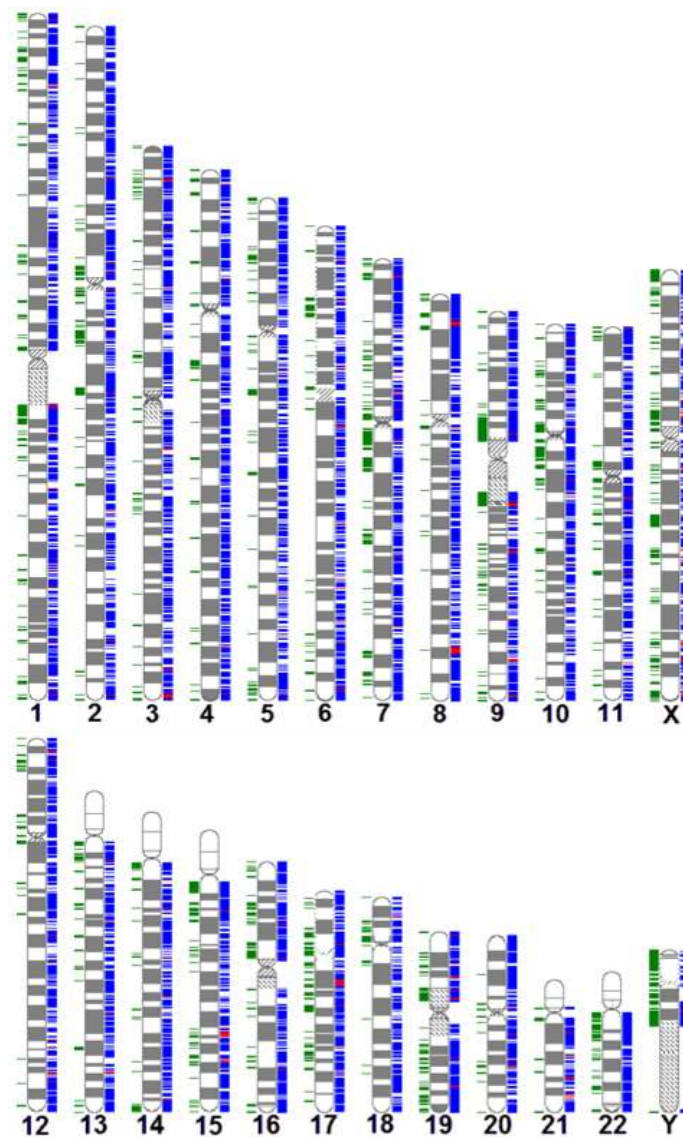


Figura 1.5: Ideograma de les principals VE polimòrfiques

Les barres blaves indiquen les CNVs, les barres vermelles indiquen els punts de trencament d'inversions i les barres verdes a l'esquerra indiquen les duplicacions segmentàries. *Database of Genomic Variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

1.1.2.1 . Variants en nombre de còpies i patologia. Mecanismes d'implicació

La contribució de les CNVs en l'expressió gènica, l'estructura proteica i l'estabilitat cromosòmica així com els seus efectes en el desenvolupament normal de l'individu i en la patologia està clarament reconeguda. S'han descrit diverses CNVs com la base molecular de diferents malalties humanes: mendelianes, esporàdiques i complexes, i amb un ventall fenotípic que engloba des de trastorns cognitius fins a una predisposició a la obesitat, càncer o altres malalties humanes (Malhotra et al. 2012; Weischenfeldt et al. 2013).

Existeixen varis mecanismes pels quals una CNV pot estar implicada en la patologia (Figura 1.6):

- Canvi de dosi gènica : les delecions, les duplicacions i les insercions de segments d'ADN representen pèrdues i guanys dels gens inclosos, que es poden traduir en una alteració de la seva expressió i, en conseqüència, de la funció de la proteïna codificada. Es considera que les regions més conservades en el mapa de CNVs en població general tenen una major sensibilitat de dosi.
- Efecte de posició: la separació física dels gens respecte als seus elements reguladors, o el fet que s'ubiquin sota la regulació de nous factors epigenètics, modifica l'expressió dels gens localitzats dins de la mateixa regió alterada i pot afectar als gens colindants a la reorganització.
- Interrupció gènica: el punt de trencament de la CNV es localitza en el marc de lectura d'un gen, alterant-ne la seva expressió i en resulta una proteïna truncada.
- Fusió de gens: en cadascun dels punts de trencament de la CNV s'altera el marc de lectura d'un gen i es produeix una fusió de les seqüències d'abmdós gens alterats. En resulta en un nou gen de fusió que transcriurà una nova proteïna de fusió. Per tant, hi ha una disminució en l'expressió de la proteïna funcional i s'expressa una nova proteïna que pot tenir implicacions en el fenotip.

INTRODUCCIÓ

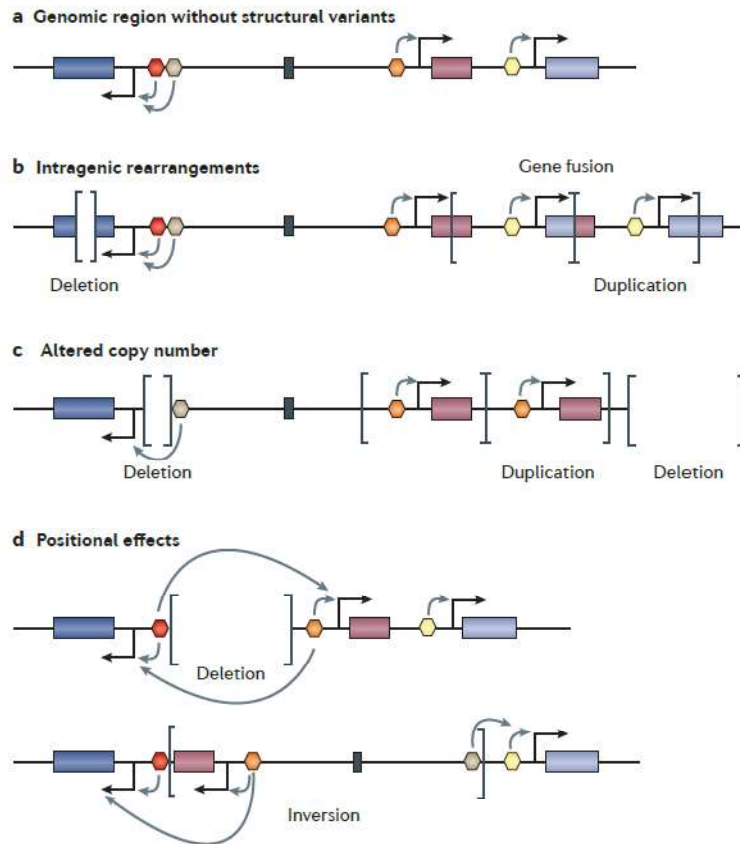


Figura 1.6: Efecte de les CNVs en l'expressió gènica

a) Els gens (caixes) estan regulats per elements reguladors específics (hexàgons marcats de colors diferents indicant la seva especificitat i amb fletxes que indiquen el gen diana) i aïlladors (rectangles negres) que bloquegen l'activitat dels elements reguladors. b) Els punts de trencament intragènics produeixen proteïnes de fusió. c) Guanys i pèrdues de material genòmic poden repercutir en la regulació de la seva expressió i d) juntament amb les insercions, poden resultar en efectes de posició. Esquema obtingut de (Weischenfeldt et al. 2013).

1.1.2.2. Bases de dades per la classificació de les variants en nombre de còpies

Un dels aspectes més importants i difícils en l'anàlisi de CNVs és la seva interpretació i associació amb el fenotip. Actualment hi ha un gran ventall de bases de dades *online* d'accés públic, que són imprescindibles a l'hora d'intentar definir la benignitat o morbiditat d'aquestes CNVs.

La *Database of Genomic Variants* (DGV) creada l'any 2004 recull informació de delecions, duplicacions, insercions i inversions presents en la població general i la seva prevalença, permetent així identificar aquelles CNVs que són polimòrfiques. Actualment integra els

resultats obtinguts de 67 estudis diferents però, en la majoria d'ells, els "individus controls" s'han definit en relació a una patologia determinada sense descartar o descriure si els individus presenten altres característiques clíniques o fenotips.

Malgrat l'elevada freqüència de CNVs en el genoma humà, la majoria de CNVs són rares (<1% de la població general) i tenen per tant una incidència individual molt baixa. És per aquest motiu que s'han creat projectes i consorcis col·laboratius, com per exemple DECIPHER (*DatabasE of genomíC varlation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*), ECARUCA (*European Cytogeneticists Association*) i ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays*), que permeten compartir les dades genètiques i clíniques de malalties genètiques rares. Aquestes bases de dades recullen informació de la dosi, la longitud, els punts de trencament i la classificació de cadascuna de les CNVs, juntament amb la descripció clínica del pacient. També existeixen diversos navegadors d'accés públic que contenen la seqüència de referència del genoma humà i eines interactives de treball, com per exemple el navegador de la Universitat de Califòrnia de Santa Cruz (UCSC) i el navegador d'*Ensembl*, fruit de la unió entre el *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) i el *Wellcome Trust Sanger Institute*. Un altre sistema bioinformàtic d'accés públic és el desenvolupat pel NCBI, que s'encarrega d'emmagatzemar i actualitzar constantment la informació referent a seqüències genòmiques en el *GenBank*, d'indexar articles científics al *PubMed* i de realitzar una recopilació de malalties genètiques humanes en l'*OMIM*. A més a més, ofereix algunes eines bioinformàtiques per a l'anàlisi de seqüències d'ADN,ARN i proteïnes; una de les eines més usades és el *BLAST*.

Aquestes eines permeten obtenir tota la informació disponible referent a una CNV determinada, tant del seu contingut com de l'existència de casos prèviament descrits, que permetrà definir-ne la seva patogenicitat en funció dels criteris de classificació establerts. Sovint, els criteris utilitzats per cada grup o laboratori poden diferir i és per aquest motiu que s'han establert consens de classificació que, malgrat presentar algunes diferències, classifiquen les CNVs en tres grups: patogèniques (CNVp), variants de significació clínica incerta (VOUS) i benignes (CNVb) (Miller et al. 2010; Kearney et al. 2011). Generalment, es considera que les CNVs rares, *de novo* i de gran longitud tenen una major probabilitat de ser patogèniques respecte a les polimòrfiques, a les heretades i a les petites.

1.2 . Trastorns del neurodesenvolupament i trastorns psiquiàtrics

Els trastorns del desenvolupament neurològic o trastorns del neurodesenvolupament (TND) són un grup de condicions heterogènies que provoquen una desviació significativa del “curs” del desenvolupament com a conseqüència dels esdeveniments de salut o de relació i que comprometen l’evolució biològica, psicològica i social de la persona. Els símptomes generalment apareixen al llarg de la infantesa i l’adolescència, en molts casos com a conseqüència d’una maduració anòmala del cervell, i es caracteritzen per un dèficit en l’adquisició d’una varietat d’habilitats que produeixen limitacions en el funcionament personal, social, acadèmic o laboral. Els TND inclouen des de limitacions molt específiques d’aprenentatge o el control de les funcions executives fins a deficiències globals d’habilitats socials o de la intel·ligència. En l’actualitat, el Manual de Diagnòstic i Estadística del Retard Mental (DSM) en la seva cinquena edició (DSM-V) accepta que els TND inclouen la discapacitat intel·lectual (DI), trastorn de l’espectre de l’autisme (TEA), trastorn de dèficit d’atenció i hiperactivitat (TDAH), trastorn específic de l’aprenentatge, trastorns de la comunicació i trastorns motors com tics, però no s’inclouen altres categories de malaltia mental.

El consens en el diagnòstic i classificació dels diferents TND és bàsic pel correcte maneig dels individus afectats. El DSM i el manual Internacional de Classificació de Malaltia (ICD) són sistemes de classificació categòrics que fan referència al diagnòstic, no al trastorn. És a dir, es basen en la manifestació clínica que s’associa a un trastorn determinat, ja que el diagnòstic categòric té només dues possibilitats: el pacient presenta o no presenta el trastorn. Però és important arribar al diagnòstic tenint en compte una escala dimensional amb diagnòstics multivariats que incorporin factors com l’edat d’aparició, la durada i la severitat dels símptomes (Kraemer 2007).

1.2.1. Discapacitat intel·lectual

La terminologia de DI ha estat discutida al llarg dels anys per substituir el terme Retard Mental. Segons la descripció de la Organització Mundial de la Salut (OMS):

“La DI significa una reducció significativa de l’habilitat d’entendre la informació nova o complexa així com una disminució de la capacitat d’aprenentatge i aplicació de noves habilitats, denominat intel·ligència deteriorada. Es tradueix en una disminució de la capacitat a fer front de manera independent (deteriorament social), i comença abans de l’edat adulta, amb un efecte durador en el desenvolupament. La discapacitat no només depèn de les condicions i limitacions en la salut de l’infant, sinó que també depèn, i de manera crucial, en els factors ambientals que donen suport a la plena participació i inclusió de l’infant en la societat.”

Actualment es considera que la DI es caracteritza per un funcionament cognitiu inferior a la mitjana, la coexistència de limitacions en dues o més habilitats adaptatives i una expressió habitualment abans dels 18 anys (Luckasson et al. 2001). Les habilitats adaptatives s’agrupen en tres categories:

- Habilitats conceptuals: llenguatge, alfabetització, autodirecció i conceptes de diners, temps i nombre.
- Habilitats socials: interpersonals, responsabilitat social, autoestima, credulitat, ingenuïtat, resolució de problemes socials i la capacitat de seguir les normes i d’obeir les lleis.
- Habilitats pràctiques: cura personal, habilitats ocupacionals, salut, viatjar, rutines, seguretat, ús dels diners i ús del telèfon.

El grau de la DI s’estima mitjançant tests d’intel·ligència estandarditzats, que es complementen amb escales d’adaptació social en un entorn determinat i amb la valoració global del funcionament intel·lectual realitzat per professionals qualificats. Les capacitats intel·lectuals i l’adaptació social poden variar al llarg del temps, pel que el diagnòstic s’ha de basar en els nivells de funcionament en un moment determinat. El quocient intel·lectual (QI) serveix de punt de tall en el funcionament intel·lectual i es considera que un individu presenta DI quan es

INTRODUCCIÓ

determina un QI inferior a 70. Basant-nos en la descripció del ICD-10, existeixen quatre subdivisions de la DI:

- DI lleu: QI entre 50 i 69. Habitualment va acompanyada de dificultats en l'aprenentatge.
- DI moderada: QI entre 35 i 49. Coexisteix amb retràs important del desenvolupament en la infància, tot i que en la majoria dels casos es pot desenvolupar cert grau d'independència en la cura pròpia, adquirir una comunicació adequada i algunes habilitats escolars. Els adults poden necessitar certs graus variables d'ajuda per viure i treballar en la comunitat.
- DI greu: QI entre 20 i 34. Necessiten un suport continuat.
- DI profunda: QI inferior a 20. Es produeix una limitació important per tenir cura de si mateix, controlar esfínters, comunicar-se i moure's.

Els tests estandarditzats no són funcionals per les primeres etapes de la vida i enlloc de DI s'utilitza la terminologia de trastorn generalitzat del desenvolupament que, en la recent revisió del DSM-V, s'anomena TEA.

La DI s'agrupa en dues categories en funció de la presència o absència d'un fenotip característic associat: DI sindròmica i DI no sindròmica o inespecífica. En la DI sindròmica, els individus presenten una o varies característiques clíniques a més a més de la DI, com per exemple dismòrfia, anomalies congènites, trastorns psiquiàtrics (TP) o trastorns de la conducta (TC) associats. En canvi, la definició de la DI no sindròmica o inespecífica és més controvertida. Tradicionalment ha estat definida per la presència de DI com a única característica clínica. No obstant, descartar la presència d'altres anomalies neurològiques més subtils o TP en aquests pacients és tot un repte, ja que poden ser menys aparents i més difícils de diagnosticar a causa de l'alteració cognitiva (Kaufman et al. 2010), i és per aquest motiu que la distinció entre DI sindròmica i no sindròmica o inespecífica té tendència a desaparèixer.

1.2.1.1. Prevalença de la discapacitat intel·lectual

La DI és la discapacitat més freqüent a la nostra societat afectant a l'1-3% de la població. La variabilitat en la prevalença de la DI ve condicionada per dos factors (Maulik et al. 2011). En primer lloc, els factors inherents a la població d'estudi. S'ha observat una prevalença superior

de DI en les poblacions de nivell econòmic més baix, així com una prevalença superior en població infantil/adolescent respecte a l'adult. En segon lloc, l'eina de diagnòstic utilitzada, on s'obté una prevalença màxima en els estudis que utilitzen únicament escales psicomètriques i una prevalença mínima en els estudis que inclouen els criteris dels manuals ICD i DSM. A més a més d'aquests factors, cal tenir en consideració que els nivells d'intel·ligència no segueixen una distribució normal (Zigler 1967), presentant-se en forma de DI lleu en el 85% dels casos, DI moderada en el 10%, DI greu en el 4% i DI profunda en el 2%.

1.2.1.2. Etiologia de la discapacitat intel·lectual

Aproximadament el 25% dels casos amb DI estan causats per factors ambientals que han alterat el sistema nerviós central de l'individu durant la fase prenatal, perinatal o postnatal. Aquests factors inclouen substàncies tòxiques (drogues o alcohol durant la fase prenatal), exposicions a radiacions, malnutrició, factors immunològics i isquèmies cerebrals. En aproximadament el 30-50% dels casos la DI és el resultat d'una causa genètica, on s'inclouen alteracions cromosòmiques, defectes monogènics, trastorns epigenètics i trastorns metabòlics (Ellison et al. 2013) (Figura 1.7). Actualment es coneixen al voltant d'uns 500 gens associats a DI. L'estimació de la contribució genètica en la DI pot veure's influenciada per diferents paràmetres, com els criteris clínics d'inclusió i la sensibilitat diagnòstica de la tecnologia utilitzada. En les formes de DI més severes es considera que existeix una causa genètica única, mentre que en les formes més lleus es presenta una major diversitat de factors implicats, tot i que encara són pocs els estudis en població amb DI lleu.

Defectes monogènics

Una mutació en un únic gen pot provocar una alteració en la seva expressió donant lloc a una proteïna anòmala i ser la causa de la DI. Els defectes monogènics poden presentar tres tipus d'herència: autosòmica dominant (per exemple, la mutació del gen *CREBBP* en la síndrome Rubinstein-Teybi), autosòmica recessiva (per exemple, el gen *PKU*, responsable de la fenilcetonúria) o lligada al cromosoma X (per exemple, mutacions al gen *MECP2* en la síndrome de Rett). En total, les alteracions monogèniques s'estima que són la causa genètica d'un 4,7% dels casos amb DI (Willemsen et al. 2014), però amb l'aparició de la tecnologia de

INTRODUCCIÓ

seqüenciació massiva aquesta xifra es creu que pot incrementar considerablement en els propers anys.

DI lligada al cromosoma X

El cromosoma X ha estat una de les regions del genoma més estudiades a l'hora d'investigar la causa genètica de la DI. Dues observacions apuntaven a aquest cromosoma com a bon candidat. Primer, el fet que la DI en homes és molt més freqüent que en dones amb una proporció de 3:1, i segon, la identificació d'un patró d'herència lligada al cromosoma X en un gran nombre de famílies. La DI lligada al cromosoma X (XLMR) representa entre el 10% i el 12% de casos de DI en homes (Chiurazzi et al. 2008) i una quarta part dels gens associats a DI es localitzen en aquest cromosoma. La síndrome del X Fràgil (SXF) està causada per una mutació dinàmica per amplificació dels triplets CGG de la regió 5' del gen *FMR1*. Aquesta síndrome és responsable de l'1% dels casos amb DI i té una incidència de 1/2.000 homes i 1/6.000 dones, essent la segona causa genètica més prevalent en els pacients amb DI.

Alteracions cromosòmiques

Les alteracions cromosòmiques són responsables d'un 25% dels casos amb DI (van Karnebeek et al. 2005; Ropers 2010; Cooper et al. 2011). S'observen en un 40% dels individus amb DI greu i en un 10% dels pacients amb DI lleu (Guitart-Feliubadalo et al. 2006) i generalment es mostren acompanyades d'anomalies congènites. Les alteracions numèriques més freqüents són les trisomies 13, 18 i 21 i les alteracions en els cromosomes sexuals, però la seva incidència és cada vegada més baixa gràcies al diagnòstic prenatal. Entre les alteracions estructurals, s'han identificat translocacions recíproques aparentment equilibrades, translocacions desequilibrades, cromosomes marcadors extres i CNVs terminals i intersticials que podrien tenir una relació causal amb la DI.

Alteracions submicroscòpiques

El desenvolupament de noves tecnologies cada vegada més sensibles es tradueix en un augment en la detecció de CNVs submicroscòpiques recurrents i no recurrents, que actualment s'estima que són la causa del ~15% dels pacients amb DI (Miller et al. 2010; Cooper et al. 2011).

Les regions subtelomèriques s'han vist implicades en el 5-10% dels casos amb DI sindròmica (Stegmann et al. 2008; Pohovski et al. 2013). Aquestes regions són riques en gens funcionals i estan organitzades en dominis de famílies d'ADN repetitiu, l'elevada homologia entre aquestes seqüències promou un elevat grau de reorganització en aquestes regions.

Els LCR localitzats al llarg de tot el genoma promouen reorganitzacions intersticials que resulten en CNVs recurrents, ja siguin delecions, duplicacions o insercions. El conjunt de síndromes de microdeleció contribueixen en l'1,7-7% dels casos amb DI (taula 1.1) (Hunter 2000; Kirchoff et al. 2007; Shaffer et al. 2007; Nowakowska et al. 2008; Cooper et al. 2011; Kaminsky et al. 2011; Ahn et al. 2013; Halder et al. 2013; Boggula et al. 2014). En aquest grup s'inclouen síndromes clínicament ben reconegudes, com per exemple la SVCF causada per la microdeleció 22q11 o la síndrome de Williams (SW) originada per la microdeleció 7q11. Però també s'inclouen altres microdelecions que s'han descrit més recentment, com la microdeleció 1p36 i la microdeleció 15q13.3 identificades gràcies a l'ús de noves tecnologies moleculars com els *arrays*.

La majoria d'estudis genètics en pacients amb DI es centren en població pediàtrica i existeix un gran nombre d'individus adults que no disposen de diagnòstic genètic. Aquest grup inclou pacients que no han rebut mai un assessorament genètic i pacients en els que l'assessorament genètic no ha pogut determinar-ne la causa. Els pocs estudis en població adulta amb DI idiopàtica suggereixen que la tecnologia d'*arrays* podria permetre identificar la causa genètica en el 8-12% d'aquests individus (Baker et al. 2012). De fet, l'aplicació dels *arrays* en una població adulta amb DI va permetre identificar CNVs en el 12,4% dels casos (Willemsen et al. 2014).

INTRODUCCIÓ

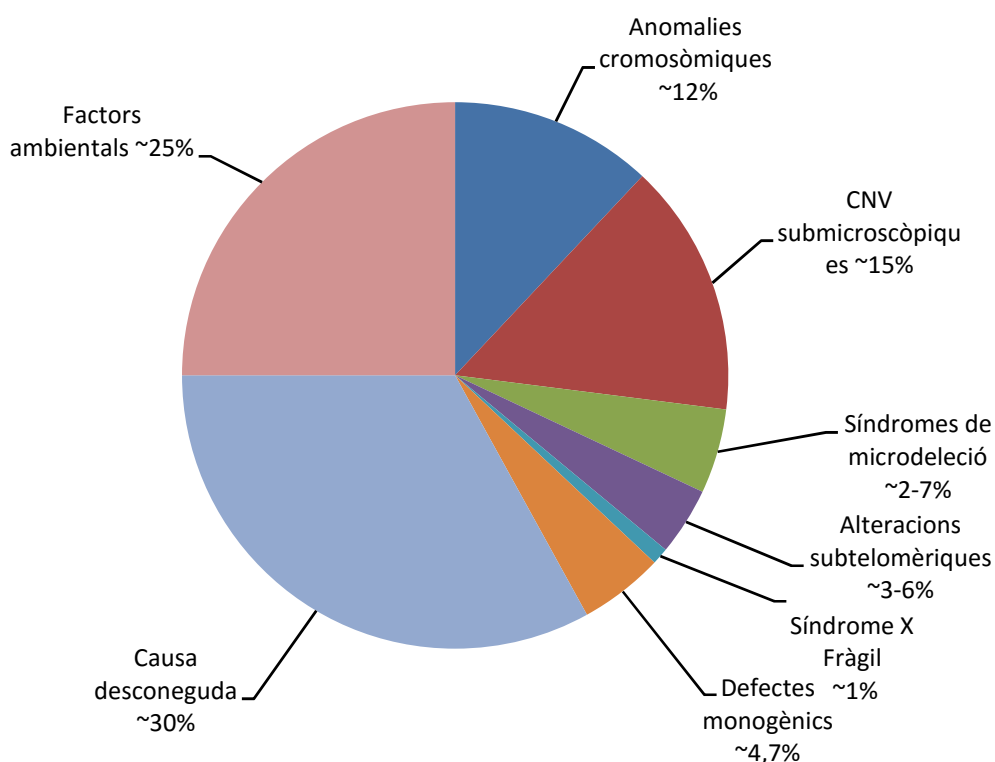


Figura 1.7: Relació de les causes de la discapacitat intel·lectual

Taula 1.1: Freqüència i penetrància estimada de les variants en nombre de còpies en síndromes de discapacitat intel·lectual

	casos	%	controls	%	PE
Deleció 1p36	79	0,00501	0	0,00000	1,00
Duplicació 1p36	16	0,00101	1	0,00012	0,94
Deleció 3q29	6	0,00038	0	0,00000	1,00
Sd. Wolf-Hirschorn	21	0,00133	0	0,00000	1,00
Sd. Williams	42	0,00266	0	0,00000	1,00
Deleció 15q11q13	16	0,00101	0	0,00000	1,00
Duplicació 15q11q13	27	0,00171	0	0,00000	1,00
Deleció 15q13.3	42	0,00266	0	0,00000	1,00
Duplicació 15q13.3	20	0,00127	3	0,00036	0,87
Sd. Rubinstein-Taybi	7	0,00044	0	0,00000	1,00
Sd. Smith Magenis	16	0,00101	0	0,00000	1,00
Sd. Velocardiofacial	96	0,00609	0	0,00000	1,00
Sd. Phelan-McDermid	45	0,00285	0	0,00000	1,00

(PE) Penetrància estimada; (Sd) Síndrome. Dades extretes del primer mapa de CNVs en DI (Cooper et al. 2011)

1.2.2. Trastorns psiquiàtrics i trastorns de la conducta

Els TP inclouen una àmplia gamma de problemes amb diferents símptomes però tots ells caracteritzats per la combinació de pensaments, emocions, comportaments i relacions anòmales amb els altres. Són altament freqüents a la població i poden comportar greus conseqüències i sofriment tant a les persones que les pateixen com a l'entorn social i familiar. La OMS indica que el 27% de la població adulta ha experimentat almenys un trastorn mental en el darrer any, incloent problemes derivats per abús de substàncies, psicosis, depressió, ansietat i trastorns alimentaris.

El diagnòstic d'un TP determinat es basa en els símptomes que presenta el pacient i existeix una gran heterogeneïtat i un solapament entre els símptomes inclosos en les diferents categories diagnòstiques (Figura 1.8) (Burmeister et al. 2008). Per exemple, la presència de psicosis s'inclou a dins de tres categories diagnòstiques: esquizofrènia (SQZ), trastorn bipolar (TB) i depressió psicòtica. En algunes ocasions es poden diagnosticar "interformes", com el trastorn esquizoefectiu, o es pot observar una co-morbiditat, és a dir, la presència de dos trastorns en un mateix pacient. Per exemple, s'ha descrit que el TDAH coexisteix amb depressió, ansietat, TB, abús de drogues i trastorn de personalitat (Haavik et al. 2010). Així mateix, el TB coexisteix amb trastorns d'ansietat, abús de substàncies, dependència a l'alcohol i TDAH (Kerner 2014). L'avaluació dels problemes coexistents és important per comprendre els trastorns relacionats amb la vida quotidiana de l'adult i per la planificació del tractament. Però en algunes ocasions és complicat distingir entre els trastorns co-mòrbids i els trastorns que han de ser avaluats com a diagnòstic diferencial. És important diferenciar cadascun dels TP que puguin presentar-se en un mateix individu i és per aquest motiu que els clínics utilitzen diferents tests per arribar a un diagnòstic clínic adequat.

El solapament entre diferents TP i la presència de co-morbiditat suggereix que les categories diagnòstiques són extrems dels trets de la personalitat. En algunes ocasions es presenten TC, descrits com a comportaments inadequats d'elevada intensitat, freqüència o duració que posen en risc la integritat física de la persona o de la gent que l'envolta. Aquestes conductes poden limitar seriosament o denegar l'accés a l'ús d'instal·lacions comunitàries ordinàries, però no es troben directament associades a un TP en concret.

INTRODUCCIÓ

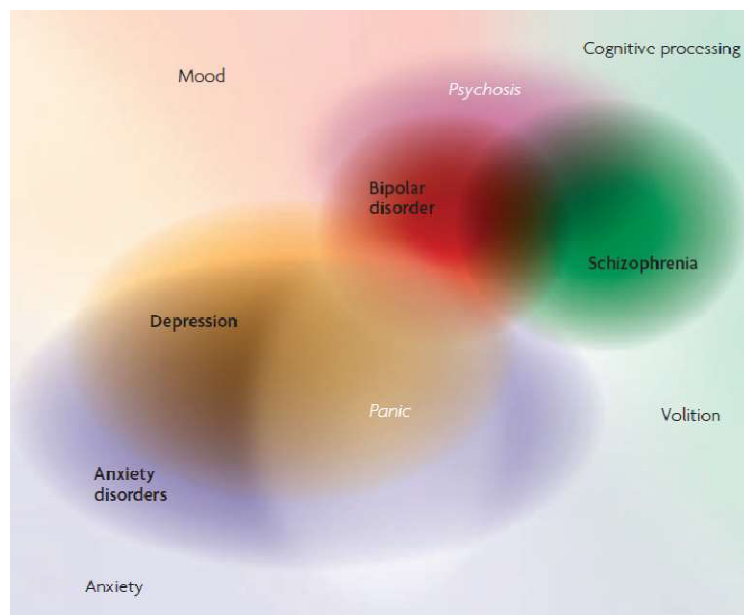


Figura 1.8: Representació del solapament entre trastorns psiquiàtrics(Burmeister et al. 2008).

1.2.2.1 . Prevalença dels trastorns psiquiàtrics i dels trastorns de la conducta

Entre el 17,6% i el 38,2% dels individus pateixen algun TP o TC, sent l'ansietat, l'insomni, la depressió major, la somatització, l'abús de substàncies, el TDAH i la demència els més freqüents (Wittchen et al. 2011; Steel et al. 2014). El TB té una prevalença baixa en la població general (1,1-1,2%) (Bebbington et al. 1995; Ferrari et al. 2011) mentre que el TDAH és un dels trastorns amb major prevalença en edat infantil i juvenil, afectant al 5,29% dels infants (Polanczyk et al. 2007). Tot i que la proporció de la persistència dels símptomes i la prevalença en edat adulta encara es desconeix, alguns estudis suggereixen que el 66% dels infants amb TDAH presenten símptomes del trastorn en l'edat adulta (Haavik et al. 2010) amb una prevalença del TDAH d'entre el 3% i el 6% en adults (Jeste 2015). Tant l'autisme com el TDAH són trastorns que apareixen en etapes inicials del desenvolupament, però la majoria dels TP es manifesten en l'adolescència i en l'edat adulta (taula 1.2).

Taula 1.2: Epidemiologia genètica dels trastorns psiquiàtrics

Prevalença	Concordança en bessons	Her.	Edat d'aparició
		Esquizofrènia	
1%	MZ: 40-50% DZ:14%	70-85%	Adolescència i primeres etapes de l'adult
		Trastorn bipolar	
2%	MZ: 70% DZ:19%	60-85%	Adolescència i primeres etapes de l'adult, amb algunes formes pediàtriques
		Trastorn depressiu major	
~17%	MZ: 46%; DZ: 20%	90%	Dues onades d'aparició: 20 anys i 40 anys
		Autisme i trastorn de l'espectre autista (TEA)	
Autisme: 0,04% TEA: 0,8%	MZ: 36-82% DZ: 6%	90%	18-36 mesos
		Trastorns de l'alimentació: anorèxia nerviosa (AN) i bulímia nerviosa (BN)	
AN: 0,6% (1) BN: 1% (1)	MZ: 55%(AN); 25%(BN) DZ: 7%(AN); 9%(BN)	AN: 55% BN: 60%	A principis i mitjans de l'adolescència
		Trastorn de l'ús d'alcohol: abús (A) i dependència (D)	
A: 13% D: 5%	MZ: 40% (D) DZ: 10% (D)	50-60% (D)	Mitjans dels vint anys
		Trastorn d'ansietat: pànic, fòbies, trastorn obsessiu-compulsiu(2) i trastorn generalitzat de l'ansietat	
Tots: 29%	MZ: 23-73% (pànic) DZ: 0-17% (pànic)	40-50% (pànic)	Variable
		Trastorn obsessiu-compulsiu (2)	
1,6%	MZ: 50-80% DZ: 20-40%	60-70%	~19 anys
		Trastorn d'atenció i hiperactivitat	
8%	MZ: 60% DZ: 21%	60-90%	<7anys

(MZ) Bessons monozigòtics; (DZ) Bessons dizigòtics; (1) 10 vegades més comú en dones; (2) Subtipus de trastorn de l'ansietat que ha estat genèticament estudiat. Dades obtingudes de (Burmeister et al. 2008)

1.2.2.2. Etiologia dels trastorns psiquiàtrics

L'elevat percentatge d'heretabilitat dels TP (taula 1.2) suggereix una contribució genètica. Per altra banda, la gran heterogeneïtat entre les categories diagnòstiques i el solapament entre els diferents trastorns (Figura 1.8) en dificulta l'estudi. Fins ara s'han confirmat patrons d'herència complexes que no segueixen una herència mendeliana. S'han identificat regions i gens candidats que poden ser causals o factors de predisposició amb una variabilitat en l'expressió fenotípica (Burmeister et al. 2008).

Els primers estudis genètics realitzats en població amb TP es van centrar en pacients amb autisme i SQZ, pel seu elevat grau d'heretabilitat. Actualment, entre el 10% i el 20% dels individus amb TEA presenten una causa genètica associada, on s'inclouen alteracions cromosòmiques (5%), trastorns monogènics (essent el SXF responsable del 2% dels casos de

INTRODUCCIÓ

TEA) i síndromes originats per microdelecions o microduplicacions, com la deleció 22q11 o la duplicació 15q11q13. En total, s'han aportat evidències d'alteracions associades a TEA en més de 100 regions diferents (Betancur 2011). Pel que fa als estudis en població amb SQZ, s'ha posat de manifest una càrrega superior de CNVs en població afectada respecte a la població control i s'han descrit 13 regions com a potencials factors de risc (Rees et al. 2014). En els darrers anys, la recerca de les causes genètiques en TP ha augmentat i cada vegada són més els trastorns estudiats. Els avenços més significatius s'han produït en el camp de l'SQZ, on s'han identificat 50 gens com a candidats, mentre que en el trastorn de l'ansietat només se'n coneixen 3 (Gatt et al. 2015). En el TDAH, s'han identificat 18 gens de susceptibilitat, entre els quals s'inclouen gens que codifiquen per receptors i transportadors de la dopamina i receptors de la serotonina (Faraone et al. 2010), però també s'han definit factors ambientals com ara fumar durant l'embaràs, exposicions a productes químics o els naixements prematurs com a factors de risc. En el cas del TB, malgrat la seva alta heretabilitat, estimada pels estudis de bessons (taula 1.1), només s'han descrit associacions de baix efecte entre el TB i diferents factors genètics (Kerner 2014) i es considera, en canvi, una possible implicació de factors no genètics com l'abús d'alcohol i drogues o els abusos sexuals.

Cada vegada són més els gens i regions associats a TP. En moltes ocasions un mateix gen o regió s'ha descrit associat a diferents TP (Zhu et al. 2014) i aquest fet posa de manifest l'enorme complexitat dels TP, que va més enllà de l'heterogeneïtat fenotípica (taula 1.3).

Taula 1.3: Pleiotropia de variants en nombre de còpies i gens candidats pels trastorns psiquiàtics

Psychiatric disorder	Sample	Gene	Probe position	Change	Previous relationships of the gene with psychiatric disorders or related phenotypes
Mood disorders	MD 1	CORT	chr1: 10,432,653 – 10,432,701	Gain	Feeding behavior (Tachibana et al., 2009)
		NTSR1	chr20: 60,816,543 – 60,816,601	Gain	Sleep/wakefulness rhythms (de Lecea, 2008)
	MD 2	GNRHR2	chr1: 144,226,590 – 144,226,642	Loss	Feeding behaviour and body weight (Kim and Mizuno, 2010)
		GRM7	chr3: 7,528,228 – 7,528,287	Loss	Schizophrenia (Shibata et al., 2009)
	MD 3				Bipolar Disorder (WTCCC, 2007)
MD 4	DLG1	chr3: 198,447,901 – 198,447,961	Gain	Major Depression Disorder (Muglia et al., 2008)	
	PPP3CC	chr8: 22,374,763 – 22,374,821	Gain	Schizophrenia (Sato et al., 2008)	
Eating disorders	ED 1	GDF2	chr10: 48,036,331 – 48,036,390	Loss	Schizophrenia (Gerber et al., 2003; Liu et al., 2007)
	ED 2	NRG3	chr10: 84,038,601 – 84,038,656	Loss	–
		NOS2A	chr17: 23,138,807 – 23,138,868	Gain	Schizophrenia (Chen et al., 2009; Wang et al., 2008)
Anxiety disorders	AD 1	SLC6A13	chr12: 207,489 – 207,548	Loss	–
Schizophrenia	SZ 1	S100B	chr21: 46,847,809 – 46,847,868	Gain	–
		GLO1	chr6: 38,763,590 – 38,763,647	Loss	Schizophrenia (Liu et al., 2005; Schroeter et al., 2009)
	SZ 2 ^a				Bipolar Disorder (Roche et al., 2007)
		SSTR5	chr16: 1,069,623 – 1,069,682	Gain	Mood Disorders (Fujimoto et al., 2008)
	SZ 3	S100B	chr21: 46,847,809 – 46,847,868	Gain	Anxiety Disorder (Politi et al., 2006) and anxiety-like behaviour (Williams et al., 2009)
					Schizophrenia (Rodriguez-Santiago et al., 2009)
	SZ 4	S100B	chr21: 46,847,809 – 46,847,868	Loss	Schizophrenia (Liu et al., 2005; Schroeter et al., 2009)
					Bipolar Disorder (Roche et al., 2007)
SZ 5	COMT	chr22: 18,335,516 – 18,335,575	Loss	Schizophrenia (Liu et al., 2005; Schroeter et al., 2009), Bipolar Disorder (Roche et al., 2007)	
				Schizophrenia (Allen et al., 2008)	
				Eating Disorder (Mikolajczyk et al., 2010)	
				Bipolar Disorder (Zhang et al., 2009a)	
				Anxiety Disorder (Kang et al., 2009; Katerberg et al., 2010)	

Taula obtinguda de (Saus et al. 2010)

1.2.3. Comorbiditat fenotípica

Els TP tenen una elevada comorbiditat amb la DI. Entre el 10% i el 40% dels individus amb DI presenten algun tipus de TP (Cooper et al. 2007; Lowe et al. 2007; Morgan et al. 2008). Aproximadament el 28% dels individus amb DI presenten criteris d'autisme (Bryson et al. 2008) mentre que la proporció d'individus amb autisme que presenten DI és superior (~70%) (Yeargin-Allsopp et al. 2003). Els TP en població amb DI poden estar infradiagnosticats, ja que les manifestacions clíniques poden passar desapercebudes atribuïnt-se a la pròpia DI. La majoria dels símptomes de TP es troben en individus amb formes lleu i moderada de DI. S'han desenvolupat tests específics adaptats per la població afectada de DI, que ajuden al diagnòstic de TP en aquests individus.

A més a més de la comorbiditat entre la DI i els TP, s'ha descrit també una forta associació dels TP amb els TC en els individus amb DI, on s'observa que el TC és diferent en funció del grau de DI (Myrbakk et al. 2008). Per exemple, la depressió s'associa a conductes d'agressió, rebequeries i crits en el grup de DI greu, mentre que en el grup de DI lleu i moderada la

INTRODUCCIÓ

depressió s'associa a rebequeries i auto-lesions. Parlarem de diagnòstic dual en cas de presentar DI i TP/TC en un mateix individu.

El diagnòstic dual s'ha observat en moltes de les síndromes de DI clínicament reconegudes caracteritzades per un fenotip dismòrfic específic i anomalies congènites associades, on els TP/TC formen part de les característiques clíniques associades. Un exemple és la SVCF, que co-existeix amb TP com l'SQZ, el TB, l'ansietat o la depressió, suggerint una co-morbiditat amb TP en un 60% dels pacients en edat adulta. O la SXF, la duplicació 15q11q13 i la microdeleció 22q13.3, en les que la DI sovint es manifesta juntament amb TEA. Amb la ràpida evolució tecnològica cada vegada són més les regions i els gens associats a DI que també predisposen a TP o problemes cognitius lleus (Figura 1.9), reforçant la hipòtesi que el diagnòstic dual pot tenir una base genètica.

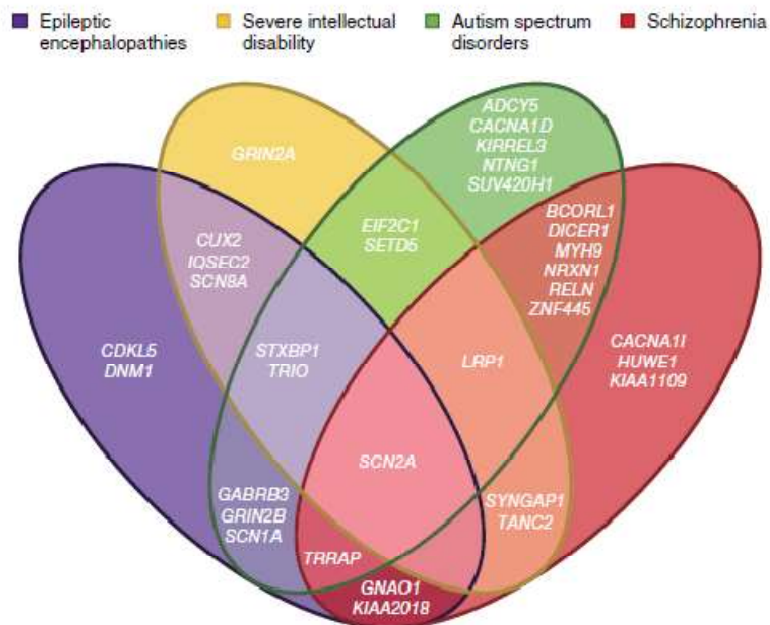


Figura 1.9: Representació de l'efecte pleiotròpic d'alguns gens associats a discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics.

Imatge obtinguda de (Zhu et al. 2014)

1.2.4. Aproximacions en l'estudi genètic de la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics

L'estudi del genoma en el context mèdic ha de permetre explicar, anticipar, mitigar i fins i tot eliminar els efectes del fenotip. Per aconseguir-ho, és necessari establir una clara correlació entre el genotip i el fenotip. Moltes síndromes s'han definit a partir de la observació de característiques clíniques compartides entre els diferents individus i, posteriorment, s'ha identificat la variant genètica comuna entre ells. Així s'han descrit les síndromes de Down (Lejeune et al. 1959), SPW, SA i SXF (inicialment descrita com a síndrome Martin-Bel), entre d'altres. Per altra banda, els estudis familiars i els estudis de bessons permeten identificar variants que segreguen amb el fenotip. La duplicació 1q22 es va reportar per primer cop en una família amb set individus afectats per diversos graus de TC (Fichera et al. 2014) i l'estudi de famílies afectades d'autisme, en les que s'inclouen aparellaments consanguinis, van permetre identificar alteracions autosòmiques recessives associades amb el trastorn (Morrow et al. 2008).

Aquestes estratègies són de gran utilitat per identificar alteracions que tenen una herència mendeliana, però cal anar amb compte alhora de la interpretació, doncs existeixen alteracions amb una penetrància incompleta o una expressivitat variable. Gràcies als avenços tecnològics s'ha modificat l'abordatge de la correlació genotip-fenotip i actualment s'està descrivint un gran nombre d'alteracions cromosòmiques submicroscòpiques associades a patologia incrementant el coneixement de les causes genètiques de la DI i els TP. Els estudis d'associació del genoma complet (GWAS) tenen com a base l'anàlisi de grans cohorts d'individus amb un fenotip comú juntament amb individus control. Aquesta aproximació permet comparar el "pes" d'una alteració genètica en una població respecte a l'altra. D'aquesta manera, es poden identificar alteracions genètiques associades a un fenotip, així com determinar i estimar la seva freqüència (Sharp et al. 2008). El consorci *Wellcome Trust Case Control Consortium* (WTCCC) es va formar l'any 2005 amb l'objectiu d'explotar els avenços en el coneixement dels patrons de variació en la seqüència del genoma humà, juntament amb els avenços en les noves tecnologies d'alt rendiment de genotipat, i explorar la seva utilitat en el disseny i anàlisi dels GWAS. El WTCCC ha contribuït a augmentar considerablement el nombre de gens coneguts

INTRODUCCIÓ

amb una funció en el desenvolupament d'algunes de les malalties més comunes i ha identificat aproximadament 90 noves variants en el conjunt de les patologies analitzades.

L'any 2007 es van publicar les dades de l'estudi cas-control realitzat en casos afectats de set patologies complexes d'elevada importància, entre elles el TB, mitjançant *arrays* d'SNPs (Burton et al. 2007). Posteriorment, el mateix consorci va publicar els resultats del primer estudi cas-control en 19.050 individus mitjançant *arrays* d'hibridació genòmica comparada (aCGH) per l'anàlisi de CNVs (Craddock et al. 2010). A més a més de desenvolupar estratègies per l'anàlisi bioinformàtic de les dades obtingudes, els resultats van suggerir que les CNVs polimòrfiques tenen poca implicació en patologia. Cada vegada són més els estudis GWAS realitzats en població amb TP, gràcies als quals s'han identificat noves regions, gens candidats, factors de risc i gens de susceptibilitat, i s'ha posat de manifest la rellevància de les CNVs *de novo* (Sebat et al. 2007) i les rares en els individus afectes de TP (Sklar 2008).

El primer gran GWAS en individus amb DI es va publicar l'any 2011. A partir de l'estudi en 15.767 nens amb TGD/DI i 8.329 adults control mitjançant aCGH, es va construir el primer mapa de CNVs en DI (Cooper et al. 2011). Es van identificar 14 noves regions de susceptibilitat i es va fer evident la contribució de les CNVs en la DI. El desenvolupament de nous mètodes d'anàlisi bioinformàtics va permetre l'anàlisi a partir de dades de NGS i realitzar un meta-anàlisi de les dades publicades. Més endavant, el mateix grup va ampliar la cohort analitzada fins a 29.085 individus amb DI i/o TEA i 19.584 controls utilitzant NGS. A partir de l'anàlisi conjunt de les CNVs identificades en aquest estudi juntament amb les dades publicades en individus amb TEA, DI, defectes congènits i SQZ, es va publicar un nou mapa que inclou un total de 2.184 CNVs en 55 regions associades a TND (Coe et al. 2014).

1.2.5. Vies i xarxes moleculars implicades en la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics

Les funcions biològiques que s'han descrit alterades amb més recurrència en la DI són la formació i la transmissió sinàptica, però també s'han vist implicades diverses funcions cel·lulars, incloent el control de la transcripció i la translació, la remodelació de la cromatina, la diferenciació de cèl·lules de suport neural i del sistema nerviós i funcions del centrosoma (Ellison et al. 2013). En els pacients amb SQZ també s'han identificat defectes en gens que codifiquen per proteïnes sinàptiques (Kirov et al. 2012) i en el conjunt de les CNVs associades a la malaltia s'ha observat un enriquiment de gens que codifiquen per proteïnes implicades en el desenvolupament cerebral. Entre elles, proteïnes de senyalització neuregulina, proteïnes quinasa reguladores de senyal extracel·lular, així com proteïnes implicades en la potenciació de la sinapsi de llarga durada, la senyalització per la orientació axonal i la senyalització dels receptors glutamatèrgics (Walsh et al. 2008). Els gens associats a TDAH, que s'han descrit a partir de GWAS, estan implicats en sistemes de comunicació cèl·lula-cèl·lula i relacionats en la neurotransmissió, processos de divisió cel·lular, adhesió i polaritat, migració neuronal i plasticitat, regulació de la matriu extracel·lular i remodelació del citoesquelet (Poelmans et al. 2011). En el TB, existeixen evidències de l'associació de gens implicats en la formació d'unions adherents i un enriquiment de gens que codifiquen per subunitats de canals de calci (Sklar et al. 2011). Finalment, en l'autisme, s'han associat CNVs que inclouen múltiples gens implicats en vies d'ubiquitinació i gens que codifiquen per proteïnes d'adhesió cel·lular essencials pel desenvolupament neuronal, suggerint la implicació d'aquestes vies en l'autisme (Glessner et al. 2010).

El solapament fenotípic i genètic entre les diferents categories diagnòstiques i la identificació de factors de risc pleiotròpics suggereixen l'existència de vies comunes en la DI i els TP (Sullivan et al. 2012; Larsson et al. 2013; Smoller et al. 2013).

L'any 2007 es va crear el *Psychiatric Genomics Consortium* (PGC) amb l'objectiu principal de determinar vies i xarxes moleculars compartides entre diferents TP. Per assolir-ho, en la primera fase (2007- 2011) es van centrar en cinc patologies concretes: autisme, TDAH, TB, trastorn depressiu major i SQZ. Mitjançant la realització d'un metanàlisi a partir de les dades d'SNPs, es va identificar un enriquiment de l'activitat dels canals de calci en el conjunt de les

INTRODUCCIÓ

diferents patologies. A més a més, es va determinar una associació estadísticament significativa de les vies de metilació d'histones, vies sinàptiques i les vies de senyalització immunològica i neuronal amb els TB, trastorn depressiu major i SQZ (O'Dushlaine et al. 2015). Actualment, aquest consorci està treballant en la segona fase de l'estudi per aprofundir en la identificació de xarxes moleculars comunes en els TP, augmentant les dades incloses i analitzant també les variants tipus CNVs.

L'anàlisi de la interacció entre els gens implicats i la identificació de vies moleculars comunes pot aportar millores en el diagnòstic, pronòstic i tractament de la DI i els TP, tal i com suggereix un estudi en una cohort heterogènia d'individus fenotípicament caracteritzats i agrupats seguint les categories de HPO (*Human Phenotype Ontology*) (Andrews et al. 2015). Van seleccionar les CNVs *de novo* de menys de 5Mb per identificar els gens inclosos i determinar en quines xarxes moleculars estaven implicades. La posterior correlació entre les xarxes moleculars identificades i les característiques fenotípiques registrades va determinar una convergència fenotípica entre els individus que presentaven alteracions en una mateixa via funcional, aportant evidències que els pacients amb alteracions en diferents gens poden agrupar-se en un mateix grup etiològic segons la xarxa molecular afectada.

1.2.6. Correlació genotip-fenotip

El coneixement de la implicació de les CNVs en la DI i els TP ha anat augmentat al llarg dels darrers anys. No obstant, determinar la patogenicitat d'una CNV en concret no és una tasca senzilla degut a la gran heterogeneïtat genètica i la complexitat d'aquestes malalties. El contingut genètic, la dosi de la CNV (deleció/duplicació), l'herència i la longitud són factors a tenir en compte segons els consens de classificació de les CNVs. La patogenicitat correlaciona amb les delecions, les CNVs *de novo* i les CNVs de major longitud (Miller et al. 2010; Kaminsky et al. 2011; Kearney et al. 2011).

En algunes ocasions, delecions i duplicacions d'una mateixa regió poden ser patogèniques suggerint una regió amb sensibilitat de dosi, com per exemple la regió 2q23.1 en la que delecions, duplicacions i mutacions en el gen *MBD5* el suggereixen com a candidat pels TND (Talkowski et al. 2011; Mullegama et al. 2014). La regió 7q11.23, que inclou gens amb funcions

en la regulació epigenètica (Strong et al. 2015), també es considera una regió amb dosi-sensibilitat. Les delecions són responsables de la SW mentre que les duplicacions s'han associat a TEA, dèficit greu del llenguatge i dismòrfia (Somerville et al. 2005; Van der Aa et al. 2009).

La majoria d'estudis publicats en el camp de la DI es centren en individus amb formes de DI moderada o greu, en les que es descriu una correlació clara genotip-fenotip, amb un patró d'herència autosòmica dominant que s'explicaria per una única causa genètica amb alta penetrància. Però cal recordar que la DI greu es presenta en menor prevalença. La majoria d'individus presenten una DI lleu, en la que es descriu generalment amb una segregació no-mendeliana. Algunes CNVs s'han associat a una gran variabilitat fenotípica, no només en el nivell de QI sinó també respecte a altres manifestacions neurològiques i de conducta. Existeixen factors de susceptibilitat a patologia amb penetrància incompleta o amb expressivitat variable. A partir del model del doble *hit* s'explicaria l'associació d'una CNV a diversos fenotips. Aquest model va ser proposat per la síndrome de la microdeleció 16p11.2, la qual està associada a un ampli ventall fenotípic. El 95% dels casos presenta la deleció heretada d'un dels progenitors aparentment sans. La revisió clínica dels progenitors va identificar manifestacions subclíniques de TND lleus, incloent depressió, TB, trastorns lleus d'aprenentatge i convulsions, i van determinar que el 25% dels *probandus* presentaven una segona CNV. Així doncs, segons el model del doble *hit*, la deleció predisposa a un fenotip determinat però necessita una segona alteració (segon *hit*) per posar-se de manifest (Girirajan et al. 2010). En l'actualitat, s'ha identificat un augment de dobles *hits* en CNVs amb fenotip variable respecte a CNVs sindròmiques i s'ha observat una correlació entre la proporció del primer *hit* heretat i la freqüència d'un segon *hit*.

1.3 . Tècniques d'anàlisi genètica

El desenvolupament de les tècniques de citogenètica, i particularment la tècnica de bandeig, va establir que el cariotip s'havia de realitzar de forma sistemàtica en els pacients amb defectes congènits i DI. Però quan les reorganitzacions escapen a la resolució de la citogenètica convencional, és necessari l'ús de tècniques amb un major nivell de resolució o tècniques que permeten detectar puntualment la presència o absència de fragments d'ADN. A mesura que s'han introduït noves tecnologies, s'ha anat variant l'estratègia diagnòstica.

1.3.1. Cariotip convencional

El cariotip convencional amb tinció de bandes G va ser, durant més de 30 anys, la primera anàlisi genètica a realitzar en els casos amb DI i defectes congènits. Permet identificar aneuploidies, trisomies, monosomies i poliploidies gràcies a la visualització dels cromosomes. A més a més, el patró de bandes característic per cada cromosoma permet identificar translocacions, inversions, delecions, duplicacions i insercions. L'anomenada citogenètica convencional va permetre descriure fenotips associats a alteracions de cromosomes sencers, com la síndrome de Patau i la trisomia 13, síndrome d'Edwards i la trisomia 18 i la síndrome de Turner i la monosomia X, i identificar alteracions estructurals associades a síndromes clínicament reconegudes, com la SPW i la SA.

La resolució del cariotip convencional és igual o superior a 5-10Mb i permet determinar el diagnòstic genètic en un 5% dels casos, sent necessari l'ús de tecnologies més sensibles per identificar anomalies de menor longitud.

1.3.2. Hibridació *in situ* fluorescent

La tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH), desenvolupada als anys 80, va suposar un gran avenç en la detecció d'alteracions cromosòmiques. A partir de sondes marcades amb

fluorescència que hibriden específicament en regions diana del genoma, es pot determinar el número i localització d'aquesta regió tant en cromosomes metafàsics com en nucli interfàsic.

Els vectors BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), PAC (*P1-derived Artificial Chromosome*) i YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) han estat utilitzats per clonar fragments d'ADN de 100-300Kb, que un cop marcats amb fluorescència, s'han usat com a sondes. Aquesta tècnica es va introduir als laboratoris pel diagnòstic de síndromes associades a microdeleccions o microduplicacions i va permetre també la identificació d'alteracions en regions subtelomèriques en el 3-6% dels casos amb DI idiopàtica. A nivell comercial s'han desenvolupat sondes de seqüència única, de centròmer, de telòmer i de cromosoma complet (pintat cromosòmic).

Malgrat la major sensibilitat de la tècnica de FISH respecte el cariotip, presenta una limitació important: només es poden analitzar regions específiques del genoma i cal conèixer la regió o regions diana que es volen analitzar. Són estudis dirigits a la confirmació d'una sospita clínica o bé a confirmar els resultats obtinguts prèviament amb altres tècniques.

1.3.3. *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*

La *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification* (MLPA) també permet l'anàlisi de seqüències diana a partir de sondes específiques. La base de la tècnica és l'amplificació de múltiples sondes en una única PCR (*polymerase chain reaction*). Cadascuna de les sondes està constituïda per dos oligonucleòtids (L i R) (Figura 1.10) que inclouen una seqüència d'hibridació específica a la regió a analitzar i una seqüència de reconeixement als encebadors (*Forward* en l'oligonucleòtid L i *Reverse* en l'oligonucleòtid R), les quals seran igual en totes les sondes de MLPA. A més a més, l'oligonucleòtid R conté una seqüència de longitud variable (elongadora) que fa possible diferenciar el producte final de la amplificació en funció de la seva longitud. Perquè es pugui produir la lligació i la conseqüent amplificació, els dos oligonucleòtids (L i R) han d'hibridar en posicions adjacents.

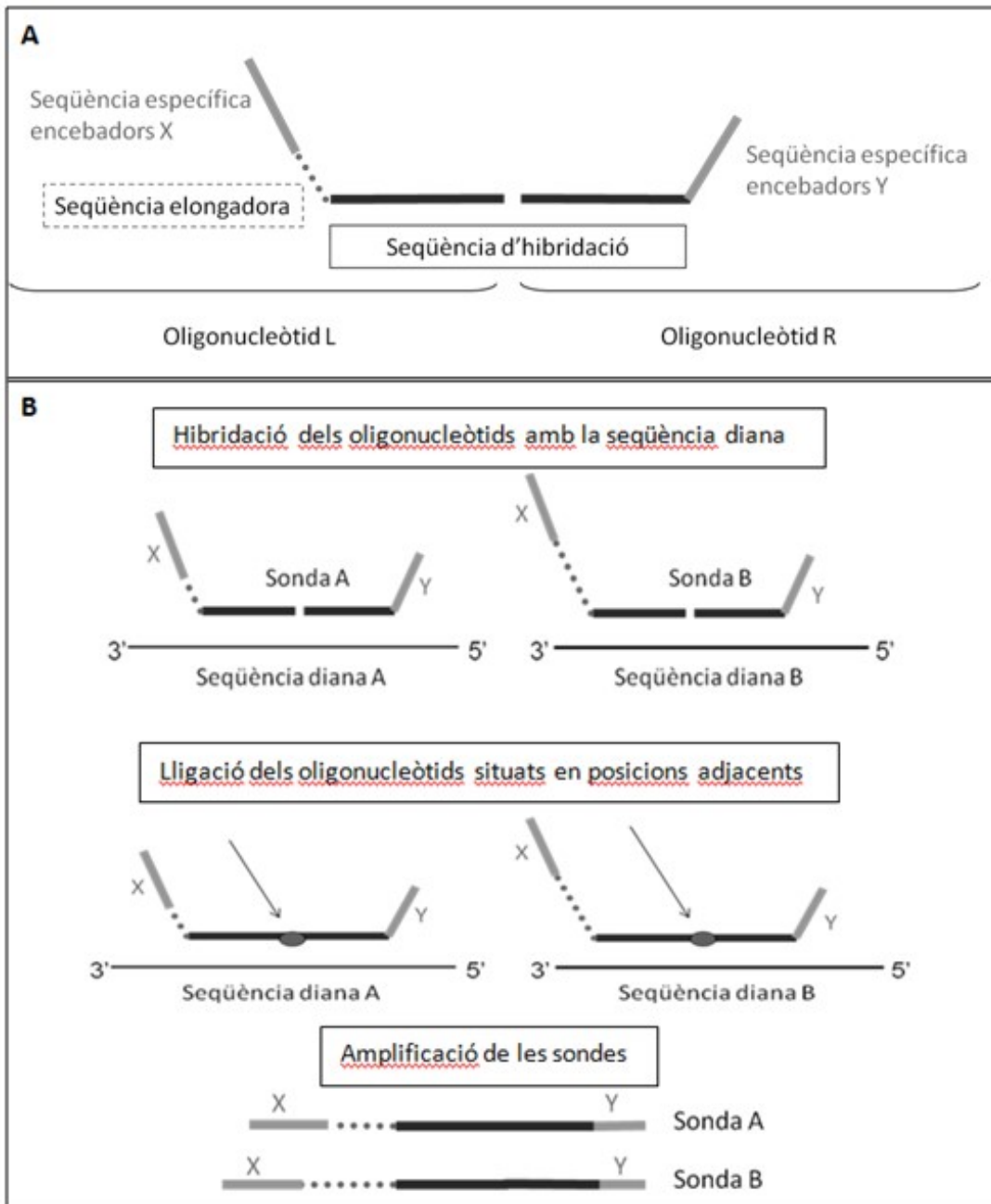


Figura 1.10: Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)

(A) Representació d'una sonda de MLPA; (B) Esquema de la tècnica.

A partir de la hibridació, lligació i amplificació de les diverses sondes (Figura 1.10), la MLPA permet el cribatge de CNVs en múltiples regions del genoma en únic anàlisi, millorant l'estudi de les alteracions en regions subtelomèriques i d'altres regions conegudes com a responsables de síndromes de microdeleció/microduplicació.

Les limitacions d'aquesta tècnica són la incapacitat de detectar alteracions cromosòmiques equilibrades i que es tracta d'un estudi limitat a un màxim de 60 regions per anàlisi.

1.3.4. Cariotip molecular

La tecnologia dels *arrays* ha revolucionat l'estudi genètic de les CNVs. Mitjançant un cribatge de tot el genoma es poden identificar guanys i pèrdues de material amb un poder de resolució molt elevat. La introducció d'aquesta tècnica en l'estudi de la DI ha significat un gran avenç respecte a les tècniques citogenètiques convencionals i moleculars utilitzades en el diagnòstic.

El cariotip molecular (CMA) consisteix en múltiples fragments d'ADN que es localitzen en un suport sòlid o vidre (*microarray*). La base de la tècnica és la hibridació genòmica comparada, motiu pel qual també és anomenada aCGH. S'utilitzen dos ADNs, l'ADN a analitzar (problema) i l'ADN de referència (control), cadascun d'ells marcats amb un fluorocrom diferent. Aquests ADNs han de competir per poder hibridar amb els fragments que es localitzen en el suport sòlid (Figura 1.11).

El protocol de la tècnica del CMA inclou la digestió de l'ADN, el marcatge amb fluorescència i la hibridació amb els fragments d'ADN localitzats al suport. El nivell de cobertura es reflecteix en la "resolució" i va associat al tipus i la densitat de les sondes utilitzades, les regions cobertes, l'espai que hi ha entre les sondes, la sensibilitat i l'especificitat (Miller et al. 2010).

El diagnòstic genètic de la DI mitjançant el CMA és d'aproximadament el 15% (Kaminsky et al. 2011; Gillentine et al. 2015), però el rendiment de la tècnica varia en funció de la plataforma utilitzada, que es diferencia pel material fixat en el suport. Les primeres sondes utilitzades eren BACs, amb una longitud d'entre 75 i 200 pb (Solinas-Toldo et al. 1997; Snijders et al. 2001). La incorporació d'oligonucleòtids sintètics, segments més curts que poden variar entre 25pb i 85pb, va permetre incrementar la densitat de les sondes fixades en el suport i així augmentar

INTRODUCCIÓ

el poder de resolució en l'anàlisi (Lucito et al. 2003; Ylstra et al. 2006). Tot i aquesta diferència en la resolució, estudis d'aCGH utilitzant plataformes que tenen una distribució de sondes BAC separades a 1Mb de distància i plataformes amb oligonucleòtids distribuïts entre 30-70Kb presenten un rendiment comparable (12,4 i 13,7%, respectivament) (Hochstenbach et al. 2011). Aquesta similitud és deguda a que mentre una variant d'un únic BAC (amb una longitud de 100-150Kb) és altament fiable, en el cas dels oligonucleòtids es precisa que el guany o pèrdua sigui identificat per múltiples clons consecutius, limitant la resolució dels aCGH d'oligonucleòtids a 3-5 vegades la distància mitjana entre les sondes.

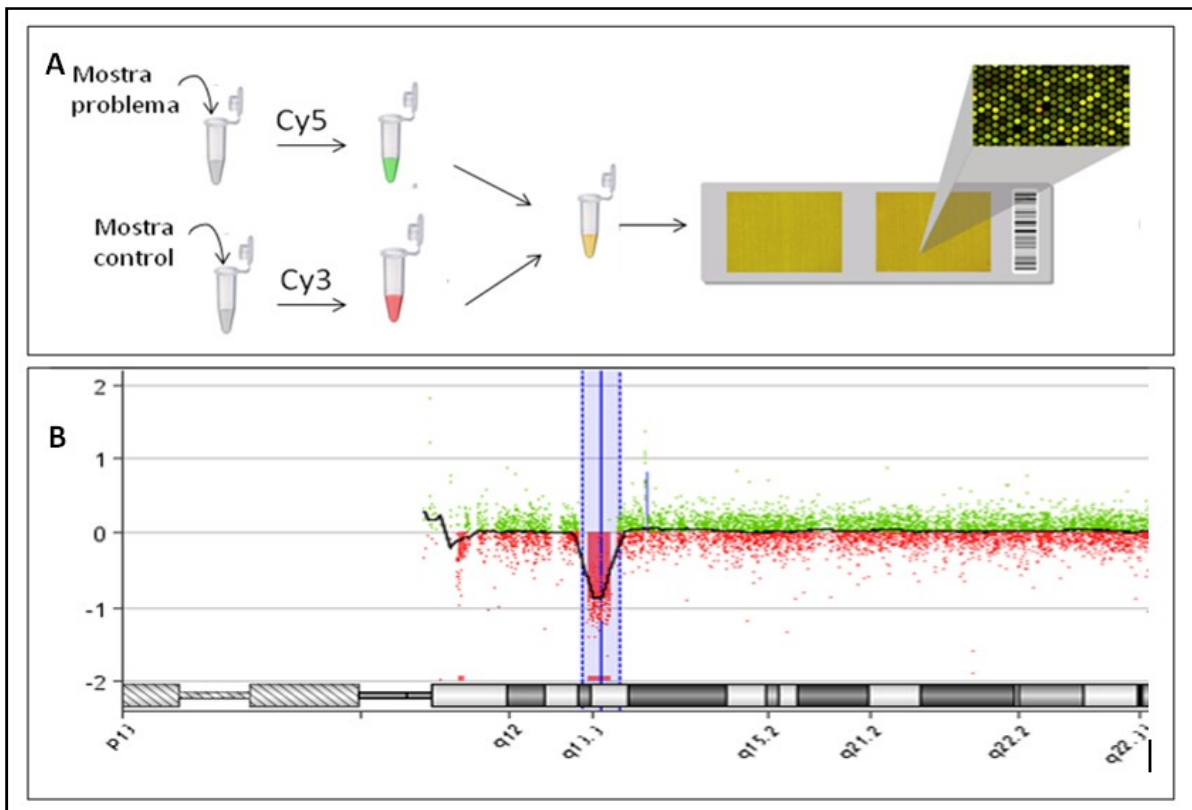


Figura 1.11: Esquema del cariotip molecular

(A) La hibridació de les mostres referència i control marcades amb diferents fluorocroms hibriden en segments d'ADN fixats en un suport sòlid. (B) Perfil obtingut a partir del CMA. Cada punt representa la mitjana transformada i normalitzada de la proporció de la intensitat de la mostra problema respecte la control ($\log_2 \text{ratio}$). La $\log_2 \text{ratio}$ s'obté a partir d'un número de punts independents replicats al llarg del suport. Els desequilibris genòmics es determinen en base a la $\log_2 \text{ratio}$ Cy5/Cy3 de cada clon.

1.3.5. Tecnologia de seqüenciació de segona generació

La seqüenciació *Sanger*, que s'està utilitzant des de fa més de 30 anys, va permetre obtenir la seqüència del primer genoma humà complet a finals del segle passat. *Sanger* permet la identificació de mutacions puntuals i és la tècnica més freqüentment utilitzada per l'estudi de les malalties monogèniques. La seva principal limitació és que s'obté la seqüència d'un únic fragment del genoma en cada anàlisi, constituïda per pocs centenars de bases.

La NGS, apareguda comercialment al 2005, permet la seqüenciació en paral·lel de milions de fragments d'ADN, de manera que es pot obtenir un genoma humà complet en dies. A la NGS, l'ADN genòmic es fragmenta mecànicament, es lliguen els adaptadors de seqüenciació i s'obtenen llibreries de longitud entre 200-400pb. Un cop es disposa de les llibreries d'ADN, cada molècula és seqüenciada per síntesi individualment. Posteriorment, aquestes lectures són alineades al genoma de referència o acoblades *de novo*, identificant així mutacions puntuals i Indels, així com els diferents tipus de VE. Es tracta d'una tecnologia que ha pres un gran protagonisme en la recerca genètica durant el desenvolupament d'aquesta tesi. No obstant, la interpretació dels resultats és, de moment, massa complexa com perquè sigui incorporada la pràctica clínica. En aquest sentit, s'han desenvolupat estratègies alternatives en les que es seleccionen les regions d'interès que es volen analitzar a partir de la captura de la seqüència. Aquestes estratègies poden ser utilitzades per seleccionar les regions codificants del genoma (seqüenciació de l'exoma) o bé per regions diana d'interès mitjançant panells dirigits a gens coneguts implicats en la patologia que s'està estudiant. Actualment, ambdues estratègies comencen a introduir-se en el diagnòstic clínic tant de la DI com d'altres patologies. No obstant, aquestes estratègies limiten la detecció de VE, podent identificar únicament aquelles que presentin punts de trencament a regions analitzades.

INTRODUCCIÓ

Hipòtesi

Les alteracions genètiques són responsables de la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics. La tecnologia dels *arrays* ha posat de manifest un elevat nombre de variants en el nombre de còpies causals d'ambdues patologies.

L'aplicació d'aquesta tecnologia en el diagnòstic dual de discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics i/o de la conducta incrementa la taxa de diagnòstics genètics.

Objectius

L'objectiu general d'aquesta tesi és establir l'origen genètic del diagnòstic dual de discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics i/o conductuals en població adulta i identificar variants en nombre de còpies i gens de susceptibilitat per aquesta patologia.

S'han plantejat els objectius concrets següents:

- 1.- Establir la freqüència de diagnòstics genètics en la població d'estudi.
- 2.- Determinar el rendiment diagnòstic de la tecnologia d'array d'hibridació genòmica comparada d'alta resolució (400k) i caracteritzar les variants en nombre de còpies identificades.
- 3.- Establir una correlació entre les variants en nombre de còpies i el fenotip, valorant el grau de discapacitat intel·lectual, els trastorns psiquiàtrics i la dismorfologia.
- 4.- Identificar noves regions o gens candidats involucrats en la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics.

2 .MATERIAL I MÈTODES

2.1 . Subjectes d'estudi

Per assolir els objectius plantejats, s'ha seleccionat una cohort de 100 individus adults amb diagnòstic dual (DI lleu/moderada i TP/TC) per la identificació de variants estructurals associades a aquesta patologia. Els resultats obtinguts es complementen amb:

- Un estudi cas-control en 184 individus amb DI i 189 controls per la caracterització de set regions genètiques seleccionades a partir de regions on s'hagi identificat una CNV d'interès.
- Anàlisi de segregació de la deleció 2p16.3 en tres famílies, en el que s'inclouen dos dels individus adults, que presenten una deleció 2p16.3, i un individu pediàtric provinent de la Unitat de Genètica Clínica de la Corporació Sanitària Parc Taulí (CSPT) amb la mateixa alteració.

2.1.1. Cohort d'adults amb diagnòstic dual

S'han reclutat 100 individus adults amb diagnòstic dual de forma prospectiva provinents del Servei Especialitzat de Salut Mental i Discapacitat Intel·lectual (Parc Hospitalari Martí i Julià, Salt) on s'han mesurat les habilitats cognitives, psicològiques i psiquiàtriques mitjançant diferents tests (Taula 2.1).

Els criteris d'inclusió dels pacients eren:

- Edat superior a 18 anys.
- DI lleu o moderada.
- TP i/o TC.

Taula 2.1: Tests per l'avaluació cognitiva, psicològica i psiquiàtrica

Avaluació	Test
Quocient intel·lectual	Test d'intel·ligència <i>Kauffman Brief II</i>
Trastorn psiquiàtric	PAS-ADD (Psychiatric Assessment for Adults with Developmental Disabilities) Compulsive behavior checklist Y-BOCS (Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale) RBQ (Repetitive Behavior Questionnaire) NPI (Neuropsychiatric Inventory)
Trastorn conductual	Escala ABC-ECA (Aberrant Behaviour Checklist) ABS-RC2 segona part (Adaptative Behavior Scale Residence Community-2)

Es va utilitzar el criteri de classificació DSM-IV-TR per determinar el grau de DI en funció del QI: DI lleu amb QI entre 55 i 70, i DI moderada amb QI entre 35 i 54. Tant el diagnòstic psiquiàtric com el conductual es classifiquen segons els manuals ICD-10 i DC-LD (*Diagnostic Criteria-Learning Disabilities*). Les dades obtingudes es registren en un full Excel.

Els criteris d'exclusió van ser:

- DI greu.
- Problemes sensorials que impedeixin o dificultin l'avaluació clínica.
- Alteracions a sistema nerviós central que no estiguin relacionades amb la DI (lesions cerebrals, tumors cerebrals, etc).
- Malalties no tractades associades a dèficits cognitius (hipotiroidisme, dèficit de vitamina B12, diabetis mellitus, etc).
- Abús de drogues.

Es van estudiar 100 individus adults, 50 homes i 50 dones, amb una mitjana d'edat de 31,28 (18-56) anys. El 60% dels individus presenta una DI lleu i el 40% presenta DI moderada. La valoració neuropsiquiàtrica va diagnosticar un total de 116 TP (

Taula 2.2), i es va identificar un TC en 63 dels individus.

Taula 2.2: Trastorns psiquiàtrics

Trastorns psiquiàtrics*	Individus
Trastorn mental orgànic (F01-F09)	2
Esquizofrènia (F20-F29)	12
Trastorn depressiu (F30-F39)	11
Ansietat (F40-F48)	43
Trastorn no-orgànic de son-vigília (F51.2)	1
Trastorn de personalitat (F60-F69)	11
Trastorn del desenvolupament psicopatològic (F80-F89)	9
Infantilisme i trastorn de les emocions (F90-F98)	14
Sense diagnòstic de trastorn psiquiàtric	13

(*) 116 diagnòstics psiquiàtrics en la població de 100 individus (16 individus amb dos diagnòstics).

Dels 100 pacients, 50 presenten tant TP com TC, 37 individus presenten TP i 13 individus TC (Taula 2.3). S'ha identificat una co-morbiditat psiquiàtrica (dos TP en el mateix individu) en 16 pacients, 9 dels quals també presenten co-morbiditat de TC.

Taula 2.3: Individus amb trastorns psiquiàtrics i/o de la conducta

	Individus
Trastorn psiquiàtric	37
Trastorn de conducta	13
Trastorn psiquiàtric + trastorn de conducta	50

Tot els individus van ser derivats a la Unitat de Genètica Clínica de la CSPT on es va obtenir el consentiment informat i es van registrar els antecedents personals i familiars, els defectes congènits i els trets dismòrfics. Es va realitzar una exploració clínica exhaustiva per la descripció de les característiques dismorfològiques (Taula 2.4) que es van classificar en cinc categories de dismòrfia: craniofacial, corporal, extremitats, cutània i genital. Les dades clíniques es van introduir en una base de dades Acces.

Taula 2.4: Dismorfologia enregistrada

Categoria dismòrfica	Exploració			
Craneofacial	Neurocrani	Forma neurocrani		
		Sutures neurocraneals		
		Mida neurocrani		
		Cara		
		Front		
		Regió periorbitària		
		Ulls	General	
			Parpelles	
			Iris	
			Pupila	
			Conjuntiva	
			Còrnia	
			Cristal·lí	
			Esclera	
			Distància intercantal	
			Fissures palpebrals	
			Celles	
			Nas	General
				Ales
		Base		
		Narines		
		Punta		
		Pont nasal		
		Orelles	General	
			Apèndix	
			Fossetes	
			Hèlix	
			Lòbuls	
			Meats	
		Boca	Tragus	
			Filtrum	
	Boca			
	Llavi superior			
		Llavi inferior		
	Barbeta			
	Mandíbula			
	Coll			
Corporal	Constitució			
	Estatuta			
	Tòrax			
	Pectorals			
	Mames			
	Mamiles			
	Abdomen			
	Clavícules			
	Escàpules			
	Espatlles			
	Sacre			
	Pelvis			
	Columna			
Extremitats	Articulacions			
	Músculs			
	Extremitats superiors	General		

		Húmer
		Avantbraç
		Mans General
		Solc palmar
		Dits mans
		Polzes
	Extremitats inferiors	General
		Fèmur
		Genolls
		Ròtules
		Tíbies
		Peus
		Dits peus
		Dit polze
Cutània	Pell	General
		Pell vascular
		Pigmentació
		Localització
	Pèl	Pèl corporal
	Ungles	
	Cabell	Creixement
		Pigmentació cabell
	Boca	Genives
		Dents
		Llengua
		Paladar
Genitals	Masculins	
	Femenins	

2.1.1.1. Estratègia d'anàlisi genètica

S'han aplicat tècniques de cribatge de forma seqüencial de menys a més resolució (Figura 2.1). En primer lloc, es realitza el cariotip amb bandes G i l'anàlisi del triplet CGG de la regió 5' del gen *FMR1* per l'estudi de la SXF a tots els individus. Paral·lelament, es processen tècniques específiques moleculars per confirmar la sospita clínica de síndromes conegudes en aquells casos derivats per la genetista clínica. Les mostres dels individus amb resultat normal del cariotip, SXF i en les que no es confirmi una síndrome clínicament reconeguda, s'analitzen mitjançant la tècnica de MLPA pel cribatge de les regions subtelomèriques. Posteriorment, en cas de no identificar cap alteració, es realitza un cribatge del genoma mitjançant l'anàlisi del CMA amb un aCGH. Tant les alteracions identificades en el cribatge de regions subtelomèriques com les CNVp i VOUSprobablement patogèniques (VOUSpp) identificades en l'estudi de CMA són validades amb les tècniques de MLPA o FISH. Les mostres dels progenitors dels individus amb CNVp i VOUSpp s'analitzen mitjançant MLPA o FISH per determinar l'herència de les alteracions. Es caracteritzen els punts de trencament de CNVs localitzades a la mateixa regió en individus no emparentats mitjançant seqüenciació *Sanger*.

L'anàlisi mitjançant el CMA es va realitzar en dues tandes. En una primera tanda, les mostres de 41 pacients van ser derivades al laboratori de qGenomics (Barcelona), on es va fer una estada per aprofundir en la pràctica de la tècnica d'aCGH. Posteriorment, es va posar a punt la tecnologia d'aCGH al laboratori de la CSPT i es va realitzar una segona tanda d'aCGH en la que es van analitzar les mostres de 45 pacients.

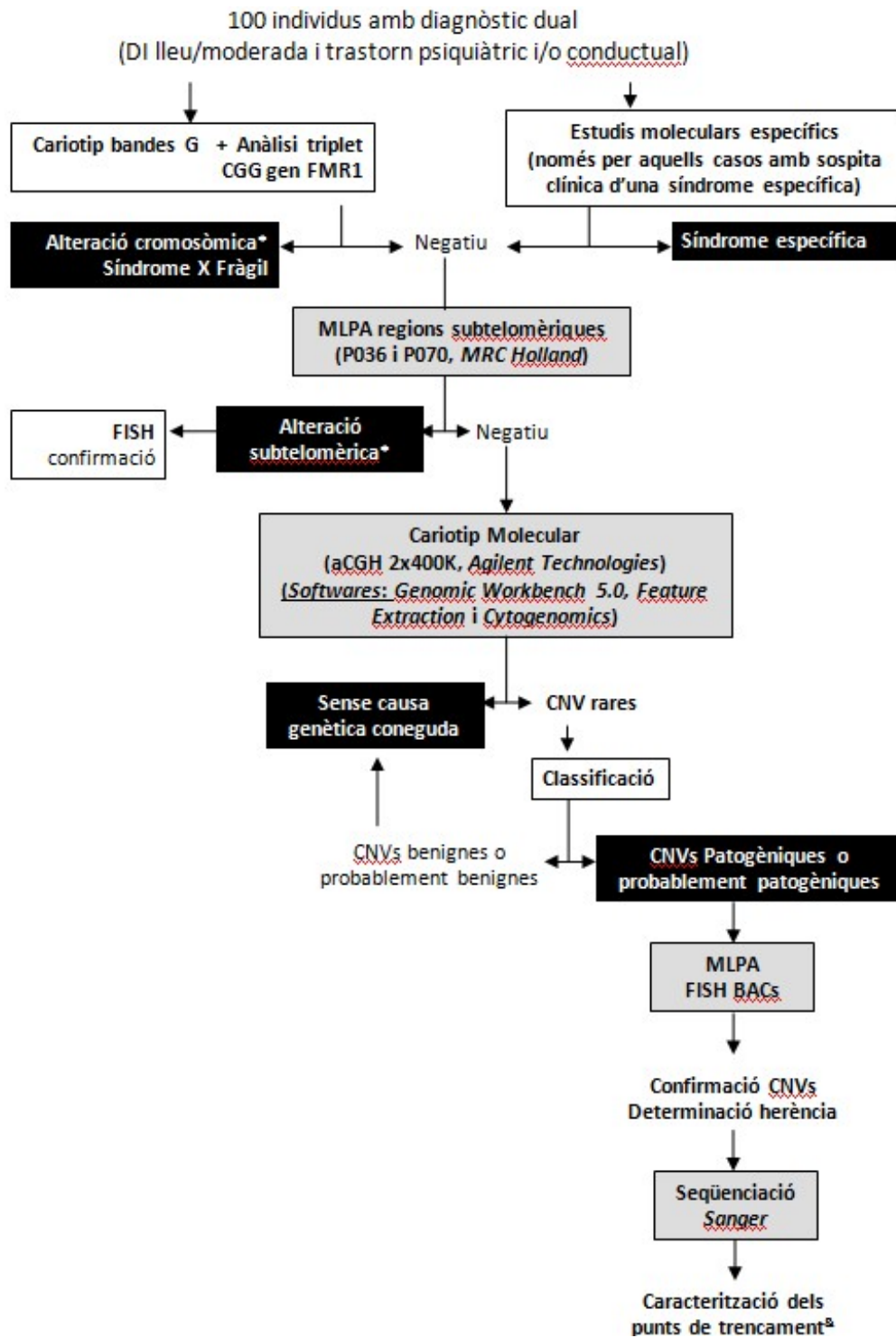


Figura 2.1: Estratègia d'anàlisi genètica

(*)Les reorganitzacions cromosòmiques i les alteracions subtelomèriques s'analitzen mitjançant CMA per determinar desequilibris i els punts de trencament. (&) La caracterització dels punts de trencament mitjançant seqüenciació *Sanger* es realitza a tres individus no emparentats amb CNV a la mateixa regió.

2.1.2. Estudi cas-control

A partir dels resultats obtinguts en l'estudi de 100 adults es seleccionen set regions cromosòmiques en les que s'ha identificat una CNV, per procedir a la seva caracterització en un estudi cas-control: dues CNVp (del2q16.3 i del12p12), quatre VOUSpp (dup3q29, dup15q14q15, del15q26.2 i dup17q24.1q24.2) i una VOUSpb (del2p12).

Casos problema:

S'han seleccionat 184 individus procedents de la Unitat de Genètica Clínica de la CSPT, derivats per presentar DI. Els criteris d'inclusió eren:

- Edat superior a 18 anys.
- Presentar DI lleu/moderada .

S'han estudiat 73 dones i 111 homes, amb una mitjana d'edat de 31 (18-70) anys, que presentaven un cariotip normal, s'havia descartat el SXF i dels quals es disposava de mostra d'ADN. Es descriu un TP en 91 pacients i un TC en 18. El 42% dels pacients (78 individus) només presenta DI.

Població control:

Es van obtenir mostres d'ADN de 189 individus control cedides pel biobanc de l'Institut Universitari de Psiquiatria Pere Mata de Reus. Els criteris d'inclusió eren:

- Edat superior a 18 anys.
- Presentar un QI>70.
- Sense diagnòstic de TP ni TC.

2.1.3. Estudi de segregació de la deleció 2p16.3 en tres famílies

L'estudi en la cohort de 100 adults ha identificat dues deleccions 2p16.3 en individus no emparentats. Es realitza un estudi familiar de segregació de la deleció 2p16.3 en aquests dos pacients adults conjuntament amb un cas pediàtric amb deleció a la mateixa regió provinent de la Unitat de Genètica Clínica de la CSPT. Es va obtenir mostra biològica dels familiars de primer, segon i tercer grau dels tres portadors de la deleció 2p16.3 i es va realitzar una valoració clínica, psicològica i cognitiva al cas pediàtric i als familiars portadors (adults portadors) mitjançant tests específics en funció de l'edat (Taula 2.5).

Taula 2.5: Tests per la valoració cognitiva i psicològica en funció de l'edat

Avaluació	Nen (pacient)	Adults (familiars portadors)
Cognitiva	WISC-IV (Escala d'intel·ligència Wechsler per nens) Bayley II (Avaluació desenvolupament funcional) Reyne II (Avaluació desenvolupament del llenguatge)	K-BIT (Test d'intel·ligència Kaufman Brief)
		Rey-Osterrieth Complex Figure (Avaluació de funcions executives)
		Color Trails Test1 and 2 (Avaluació de l'atenció)
		Escala de memòria WMS-III (Avaluació de memòria immediata, retardada i de treball)
		Boston Naming Test (Avaluació de dificultats del llenguatge)
		FAS (Avaluació de la fluïdesa verbal)
		Stroop (Avaluació de problemes neuropsicològics, dany cerebral i interferència).
		BADS (Behavioral Assessment of Disexecutive Syndrome)
		Rey Auditive Verbal Learning Test (Avaluació de diverses funcions)
		Tower of London (Avaluació de funcions executives)
Psicològica		TCI-R (Temperament and Character Inventory)
		PAI 4 (Personality Assessment Inventory)

2.2 Mètodes

2.2.1. Obtenció de mostres biològiques

Als 100 individus adults es va realitzar una extracció de sang en un tub d'heparina sòdica (3mL) i dos tubs d'EDTA (6mL) per processar un cultiu de limfòcits i una extracció d'ADN respectivament (d'acord amb els protocols que es descriuen a continuació). Es va realitzar la mateixa extracció de sang als progenitors dels pacients i als familiars de primer, segon i tercer grau dels individus portadors de la deleció 2p16.3 per obtenir ADN i pel·let cel·lular (seguint els mateixos protocols). Les mostres d'ADN i pel·let cel·lular van ser emmagatzemades a -20°C.

Protocol de cultiu de limfòcits sincronitzats i obtenció d'extensions cromosòmiques

<p>PREPARACIÓ DE REACTIUS</p> <p><u>Solució hipotònica:</u> 24mL de KCl 2,48M en 1L d'aigua destil·lada.</p> <p><u>Fixador Carnoy:</u> Metanol + àcid acètic en proporció 3:1.</p>
<p>SEMBRA DEL CULTIU (cromosomes d'alta resolució)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar un flascó amb 5mL de medi de cultiu (<i>Euroclone Chromosome Medium P</i>) prèviament atemperat. 2. Incorporar 0,5mL de mostra de sang (recollida en un tub d'heparina sòdica). 3. Incubar a 37°C i 5% CO₂ durant 72 hores.
<p>SINCRONITZACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. A les 50 hores de cultiu afegir 0,1mL de solució <i>Synchroset A</i> i incubar a 37°C i 5% de CO₂ durant 13 hores. 5. Afegir 0,1mL de solució <i>Synchroset Bi</i> incubar 5 hores a 37°C i 5% de CO₂. 6. Afegir 0,1mL de <i>Colcemid</i> i incubar 10 minuts a 37°C i 5% de CO₂.
<p>SACRIFICI CEL·LULAR</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. Abocar el tub de cada flascó a un tub de 10mL i centrifugar 10 minuts a 650xg. 8. Aspirar el sobrenadant. 9. Agitar el tub al vòrtex i afegir gota a gota 7mL de solució hipotònica prèviament escalfada a 37°C. 10. Posar al bany de 37°C durant 10 minuts. 11. Afegir 1mL del fixador <i>Carnoy</i> i deixar 10 minuts a temperatura ambient. 12. Centrifugar 10 minuts a 650xg i aspirar el sobrenadant. 13. Afegir 8mL de <i>Carnoy</i> gota a gota i homogeneïtzar. 14. Centrifugar 10 minuts a 650xg i aspirar el sobrenadant. 15. Repetir el rentat amb <i>Carnoy</i> dues vegades.
<p>PREPARACIÓ D'EXTENSIONS CROMOSÒMIQUES</p> <ol style="list-style-type: none"> 16. Treure els portaobjectes del congelador 30 minuts abans d'utilitzar-los. 17. Aspirar el sobrenadant de la darrera centrifugació i afegir entre 0,5-2mL de <i>Carnoy</i> (en funció del volum del pellet) i agitar al vòrtex. 18. Dispensar 2-3 gotes de pellet al portaobjectes i deixar assecar. 19. Guardar el pellet de cèl·lules fixades -20°C.

Protocol d'extracció d'ADN (mètode de precipitació salina)

<p>REACTIUS</p> <p>Reactius de Gentra (<i>Qiagen</i>)</p>
<p>LISI D'HEMATIES</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dispensar 18mL de <i>RBC lysis solution</i> i 6mL de sang total (recollida en dos tubs EDTA) en un tub de 50mL i incubar 10 minuts a temperatura ambient. 2. Centrifugar a 4°C durant 5 minuts a 2000xg i extreure el sobrenadant. 3. Agitar el líquid residual (200-400µL) al vòrtex per ressuspèndre el pellet cel·lular.
<p>LISI CEL·LULAR</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. Afegir 6mL de <i>Cell lysis solution</i> i homogeneïtzar.
<p>PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. Afegir 2mL de <i>Protein precipitation solution</i> i agitar al vòrtex per barrejar la solució amb les cèl·lules lisades. 6. Centrifugar a 4°C durant 5 minuts a 2000xg.
<p>PRECIPITACIÓ d'ADN</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. A un nou tub de 50mL dispensar 6mL d'isopropanol fred i afegir el sobrenadant obtingut de la precipitació de proteïnes. 8. Invertir el tub varies vegades fins obtenir una medusa. 9. Centrifugar a 4°C durant 3 minuts a 2000xg. 10. Decantar el sobrenadant, invertir el tub i deixar assecar durant 5 minuts a temperatura ambient. Afegir 6mL d'etanol 70% fred, agitar manualment i centrifugar a 4°C durant 1 minut a 2000xg. Decantar el sobrenadant i invertir el tub. Deixar assecar el pellet. <p>Un cop sec, dispensar 500µL de <i>DNA hydration solution</i>, agitar suaument al vòrtex i deixar amb agitació suau a temperatura ambient tota la nit.</p>
<p>QUANTIFICACIÓ</p> <ol style="list-style-type: none"> 11. Mesurar al nanodrop (<i>Nucleic Acid</i>). 12. La concentració obtinguda oscil·la entre 100-800ng/µL. Els valors de puresa recomanats dels índex 260/230 i 260/280 oscil·len entre 1,8-2. 13. Guardar les mostres a 4°C o -20°C.

2.2.2 Cariotip de bandes G

La tinció de bandes G es realitza en extensions cromosòmiques obtingudes a partir del cultiu de limfòcits sincronitzat. S'obtenen cromosomes d'alta resolució al voltant de 600 bandes. El cariotip permet detectar reorganitzacions desequilibrades i equilibrades amb una resolució superior a 5-10Mb.

Protocol detinció de bandes G

PREPARACIÓ DE REACTIUS

Solució SSC2x: 17,53g NaCl + 8,82g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ en 1L d'aigua estèril. Homogeneïtzar i guardar a temperatura ambient.

Tampó *Sörensen*:

- Solució A: 9,1g KH_2PO_4 + 1000mL d'aigua destil·lada. Homogeneïtzar i guardar a temperatura ambient.
- Solució B: 11,9g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ + 1000mL d'aigua destil·lada. Homogeneïtzar i guardar a temperatura ambient.
- Solució de treball: barrejar solució A i B en la mateixa proporció, al mateix moment d'aplicar les bandes.

Colorant Wright: 1,3g de colorant *Wright* en pols + 500mL de metanol *Scharlou*. Dissoldre a l'agitador magnètic durant 30-120 minuts. Filtrar per eliminar impureses del colorant preparat, tapar i mantenir una setmana a l'estufa a $37 \pm 1^\circ C$. Un cop passat el temps d'incubació es conserva l'ampolla a temperatura ambient.

Solució Wright: tampó *Sörensen* i colorant *Wright* en una proporció 3:1.

TINCIÓ DE BANDES G

1. Envellir les extensions cromosòmiques entre 1 i 3 dies a l'estufa de $65^\circ C$.
2. Dipositar els portes en una cubeta de SSC2x entre 1segon fins a 3 minuts.
3. Rentar el porta amb aigua de l'aixeta i assecar amb paper de filtre.
4. Posar l'extensió cromosòmica sobre un suport d'alumini i dispensar la solució de *Wright*. Deixar des de 15 segons a 3 minuts.
5. Rentar amb aigua corrent i assecar amb paper de filtre.
6. Comprovar la qualitat de les bandes al microscopi òptic.

2.2.3. Cribatge de la síndrome X Fràgil

La tècnica de diagnòstic de la SXF mitjançant PCR de cribatge consisteix en amplificar els triplets CGG de la regió 5' del gen *FMR1*, localitzat al cromosoma X, mitjançant encebadors específics que flanquegen l'illa CpG de la regió promotora del gen (Saluto et al. 2005).

Protocol de PCR de cribatge de la regió 5' del gen *FMR1*

<p>REACTIUS</p> <p>Kit Expand Long template PCR system</p> <p>Encebadors a concentració 10pmols/μL:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Encebador C: 5'-GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT-3' - Encebador F: 5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' 																	
<p>AMPLIFICACIÓ DEL TRIPLET CGG</p> <p>1. Diluir la mostra d'ADN a 200ng/μL.</p> <p>2. Fer una barreja seguint els volums indicats a la taula següent:</p> <table border="1" data-bbox="517 736 1075 983"> <thead> <tr> <th>Reactiu</th> <th>Volum</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tampó 3</td> <td>3μL</td> </tr> <tr> <td>dNTPs 250μM</td> <td>1,2μL</td> </tr> <tr> <td>Encebador C (0.33μM)</td> <td>1μL</td> </tr> <tr> <td>Encebador F (0.33μM)</td> <td>1μL</td> </tr> <tr> <td>Betaïna</td> <td>12μL</td> </tr> <tr> <td>Taq Polimerasa</td> <td>0,45μL</td> </tr> <tr> <td>H₂O</td> <td>10,5μL</td> </tr> </tbody> </table> <p>3. Dispensar 28,5μL de la barreja + 1μL de la dilució de la mostra corresponent (o aigua en el cas del blanc) i posar al termociclador:</p> <p>98°C 2 minuts + 10 cicles(97°C 10 segons, 64°C 35 segons i 68°C 4 minuts) + 25 cicles (97°C 15 segons, 64°C 35 segons i 68°C 4 minuts, augmentant 20 segons d'elongació a cada cicle) + 68°C 10 minuts.</p>		Reactiu	Volum	Tampó 3	3 μ L	dNTPs 250 μ M	1,2 μ L	Encebador C (0.33 μ M)	1 μ L	Encebador F (0.33 μ M)	1 μ L	Betaïna	12 μ L	Taq Polimerasa	0,45 μ L	H ₂ O	10,5 μ L
Reactiu	Volum																
Tampó 3	3 μ L																
dNTPs 250 μ M	1,2 μ L																
Encebador C (0.33 μ M)	1 μ L																
Encebador F (0.33 μ M)	1 μ L																
Betaïna	12 μ L																
Taq Polimerasa	0,45 μ L																
H ₂ O	10,5 μ L																

El producte de PCR s'analitza mitjançant anàlisi de fragments per electroforesi capil·lar utilitzant l'analitzador genètic ABI 3130 (*Applied Biosystems*). Les dades s'obtenen amb el *software* d'anàlisi de fragments *GeneMapper*. El càlcul del nombre de triplets es realitza a partir del valor del pes molecular de la regió repetitiva obtingut per l'analitzador genètic.

Aquesta tècnica de cribatge permet la identificació de triplets fins a 50 repeticions. Però la tècnica té una limitació important: el resultat de la PCR no és fiable a partir de 50 repeticions. Al tractar-se d'una zona altament repetitiva, es poden produir unions inespecífiques de la *Taq Polimerasa* amb l'ADN i produir bandes de pes molecular inespecífiques no extrapolables a la quantitat de triplets. Les mostres que precisaven una confirmació (en dones, amplificació d'un únic al·lel inferior a 50 repeticions; en homes, no s'observava amplificació) es van derivar al Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic on es van processar mitjançant tècniques de més resolució.

Interpretació dels resultats:

- Al·lel normal: ≤55 repeticions. Individu normal
- Premutació: 56-200 repeticions. Portador adult amb possible manifestació de tremolor, atàxia associada prematura i menopausa.
- Mutació complerta: >200 repeticions. SXF.

2.2.4. Hibridació *in situ* fluorescent

El mètode de FISH mitjançant dos tipus de sondes diferents, comercial i no comercial, s'ha utilitzat per la confirmació de la sospita clínica de síndromes específiques i per la confirmació de les alteracions identificades mitjançant MLPA de regions subtelomèriques i CMA.

2.2.4.1. Hibridació *in situ* fluorescent amb sondes comercials

Per la confirmació de la sospita clínica de síndromes genètiques específiques s'han utilitzat diferents sondes comercials (Taula 2.6).

Taula 2.6: Sondes utilitzades per l'estudi de les síndromes conegudes

Síndrome	Sonda problema	Sonda control	Casa comercial
Velocardiofacial	22q11.2 (<i>TUPLE1</i> ; vermell)	22q13 (<i>ARSA</i> ; verd)	Vysis
Williams	7q11.23 (<i>ELN</i> ; vermell)	7q31 (<i>D7S482, D7S522</i> ; verd)	Vysis
Smith-Magenis	17p11.2 (<i>RAI1</i> ; verd)	17p13.2 (<i>PAFAH1B1</i> ; vermell)	Poseidon
	17p11.2 (<i>SMS</i> ; vermell)	17q21.1 (<i>RARA</i> ; verd)	Vysis

Per la confirmació de les alteracions detectades a les regions subtelomèriques es va utilitzar el kit comercial *Totalvision* de Vysis (Taula 2.7) que inclou 62 sondes de FISH homòlogues a les seqüències telomèriques dels braços curt (p) i llarg (q) combinades de tres en tres o de dos en dos, marcades amb els fluorocroms *SpectrumGreen* i *SpectrumOrange*. A més a més, algunes de les barreges inclouen seqüències úniques (LSI) o alfa satèl·lit centromèriques (CEP) marcades amb el fluorocrom *SpectrumAqua* per la identificació d'alguns cromosomes.

Taula 2.7: Conjunt de barreges incloses al Kit Totelvision (Vysis)

Barreja	Verd1	Vermell2	Groc3	Blau4
1	1p	1q	Xp/Yp	CEPX
2	2p	2q	Xq/Yq	CEPX
3	3p	3q	22q	LSI bcr (22q11)
4	4p	4q	21q	LSI AML (21q22)
5	5p	5q	-	-
6	6p	6q	13q	LSI 13 (13q14)
7	7p	7q	14q	LSI TCR (14q11.2)
8	8p	8q	17p	CEP17
9	9p	9q	17q	CEP17
10	10p	10q	15q	LSI PML (15q22)
11	11p	11q	18p	CEP18
12	12p	12q	18q	CEP18
13	16p	16q	-	-
14	19p	19q	-	LSI 17p13
15	20p	20q	-	-

(1) SpectrumGreen; (2) SpectrumOrange; (3) Sonda marcada amb dos fluorocroms SpectrumGreen i SpectrumOrange; (4) SpectrumAqua.

Protocol de FISH amb sondes comercials

<p>PREPARACIÓ DE REACTIUS</p> <p><u>SSC2x</u>: 15,84g de SSC20x en 600mL d'aigua destil·lada</p> <p><u>Solució 1 (SSC0,4x /NP-400,3%)</u>: 100mL de SSC2x + 400mL d'aigua destil·lada i 1,5mL NP40 (aquesta solució ha d'estar a 73°C)</p> <p><u>Solució 2 (SSC2x /NP-400,1%)</u>: 500mL de SSC2x i 0,5mL de NP40.</p>
<p>ENVELLIMENT</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Valorar al microscopi una regió rica amb metafases i marcar amb llapis de diamant. 2. Envellir les extensions cromosòmiques tota la nit a 65°C.
<p>DESHIDRATACIÓ</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Rentar els portaobjectes amb etanols 70%, 85% i 100%, un minut en cadascun, i deixar evaporar les restes d'etanol. 4. Posar el porta a 42°C a la càmera d'incubació amb humitat (<i>HYBrite</i>).
<p>PREPARACIÓ DE LES SONDES</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. Agitar el tampó SSC2x i les sondes al vòrtex i fer una barreja amb 3,5µL de tampó, 1µL d'aigua destil·lada i 0,5µL de sonda (lesbarreges de sondes subtelomèriques ja estan preparades per l'ús).
<p>HIBRIDACIÓ</p> <ol style="list-style-type: none"> 6. Treure el portaobjectes de la càmera d'incubació amb humitat. 7. Agitar al vòrtex les sondes (o la barreja preparada prèviament) i dispensar 5µL a l'àrea marcada prèviament. 8. Cobrir amb el cobreobjectes i segellar. 9. Posar el portaobjectes a la càmera d'incubació amb humitat 4 minuts a 75°C i 24 hores a 37°C.
<p>RENTATS I CONTRATINCIÓ</p> <ol style="list-style-type: none"> 10. Preparar una cubeta <i>Coplin</i> amb solució 1 de rentat i posar-la al bany a 74°C (per treballar amb una solució a temperatura 73°C) 11. Preparar una segona cubeta <i>Coplin</i> amb solució 2 de rentat. 12. Transcorregut un mínim de 16 hores d'hibridació, treure el portaobjectes de l'aparell, retirar la cola i el cobreobjectes i introduir el portaobjectes a la solució 1 de rentat durant 2 minuts a 73°C (mesurar la temperatura de la solució). 13. Rentar 1 minut amb la solució 2 de rentat en agitació i deixar assecar a les fosques. 14. Dispensar 9µL de la preparació de <i>DAPI</i> (dilució <i>DAPI</i> amb <i>Mcllvane</i> a proporció 1:1) i segellar.

2.2.4.2. Hibridació *in situ* fluorescent amb sondes no comercials

Les sondes no comercials s'utilitzen per la confirmació de CNVs identificades mitjançant CMA i per determinar la seva herència a partir de l'anàlisi en els progenitors. Les sondes s'obtenen a partir de clons BACs de la llibreria de l'Institut d'Investigació del Hospital de nens d'Okland "Children's Hospital Oakland Research Institute" seleccionats de la base dades NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Els BACs seleccionats es recullen a l'Annex 1. A partir del vial amb els bacteris transfectats es procedeix al cultiu del BAC, extracció de l'ADN, marcatge (fluorocroms *SpectrumGreen* i *SpectrumOrange* per les sondes control i problema respectivament) i hibridació sobre l'extensió cromosòmica.

Protocol d'obtenció de sondes no comercials

<p>RECONSTITUCIÓ I PREPARACIÓ DE REACTIUS</p> <p><u>Medi de cultiu 2YT</u>(Tryptona, clorur de sodi, extracte de llevat i agar): 31g medi 2YT en 1L d'aigua destil·lada, autoclavar i conservar a 4°C.</p> <p><u>Cloranfenicol 20mg/mL</u>: reconstituir cloranfenicol en etanol 70%.</p> <p>Fenol-cloroform-isoamilic a proporció 25:24:1.</p> <p>Kit <i>NickTranslation</i> pel marcatge: preparar els reactius segons protocol del kit.</p>
<p>PROTOCOL PEL CULTIU DE BACs</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar medi de cultiu YT2x. 2. Barrejar 5mL del medi TY2x amb 5µLde cloranfenicol (20mg/mL). 3. Treure els BACs del congelador -80°C (es treuen màxim de 4 en 4, i es conserven en neu carbònica), punxar amb una punta de pipeta i tirar la punta dins el cultiu. 4. Tapar i posar al bany en agitació a 37°C tota la nit (recomanable 16 hores).
<p>EXTRACCIÓ D'ADN</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. Per l'extracció del BAC s'utilitzen els tampons proporcionats en elKit <i>QIAprep Spin Miniprep</i> de <i>Qiagen</i> emprant el mètode de fenol:cloroform per la precipitació de proteïnes. 6. Col·locar els tampons P1 i N3 del Kit <i>Qiagen</i> en gel. 7. Treure les puntes grogues del tub, centrifugar a 1500xg durant 17 minuts a 15°C (el medi ha d'estar tèrbol) i descartar el sobrenadant. 8. Ressuspendre el pellet al vòrtex, afegir 0,3mL de solució P1 freda (<i>Qiagen</i>), agitar al vòrtex i traspasar tot el volum en un tub eppendorf. 9. Afegir 0,3mL de solució P2 (<i>Qiagen</i>) i invertir el tub per agitar suaument. Deixar un màxim de 5 minuts a temperatura ambient (ha de quedar viscos-llafiscós). 10. Afegir 0,3mL de solució N3 fred (<i>Qiagen</i>), agitant suaument mentre s'incorpora. Invertir el tub 4-6 cops i deixar en gel un mínim de 5 minuts (invertint el tub de tant en tant. S'ha de formar un precipitat blanc.)

11. Centrifugar 7 minuts a 15000xg4°C, recuperar el sobrenadant en un nou tub eppendorf i tornar a centrifugar 7 minuts a 15000xg4°C.
12. Recuperar el sobrenadant en un nou eppendorf i dividir el volum total en dos tubs.
13. Afegir fenol-cloroform-isoamílic a proporció 1:1 (normalment queda un volum de 450µL a cada tub).
14. Agitar suaument, deixar 5 minuts a temperatura ambient, centrifugar 2 minuts a 15000xg 4°C i recuperar la fase aquosa sense agafar fase proteica.
15. Afegir 2,5 volums d'etanol absolut fred (habitualment 1mL) i deixar un mínim de 20 minuts en gel (o a nevera 4°C). En aquest punt es pot deixar aturada la tècnica i continuar més endavant.
16. Centrifugar 15 minuts a 15000xgi a 4°C. Eliminar el sobrenadant.
17. Afegir 500µL d'etanol 70%, agitar per rentar el pellet i centrifugar 5 minuts a 15000xga 4°C.
18. Eliminar el sobrenadant i deixar assecar mínim 10 minuts a 37°C.
19. Afegir 10µL d'aigua a cada eppendorf (es divideix cada BAC en dos), deixar ressuspènere el pellet a temperatura ambient i unificar els dos tubs de cada BAC en un.
20. Córrer l'ADN obtingut en un gel d'agarosa 1,5% a 100 volts durant 15 minuts juntament amb un ADN control (200ng/µL) per determinar la concentració.

DIGESTIÓ I MARCATGE DEL BAC

21. Per la digestió i marcatge s'utiliza el kit *Nick Translation* (Abbott).
22. Preparar una barreja per la digestió del BAC: 600µL dNTPs + 300µL dTTPS + 300µL tampó.
23. Barrejar 20µL de la barreja, 2,5µL fluorocrom (*SpectrumGreen* en sonda control, *SpectrumOrangeen* sonda problema), 5µL d'enzim, 16µL d'ADN (100ng/µL aproximadament) i 6,5µL d'aigua, per obtenir un volum total de 50µL.
23. Digerir durant 2hores i 30 minuts a 15°C i 10 minuts a 70°C.
24. Fer un nou gel d'agarosa per comprovar que l'ADN s'hagi digerit correctament carregant 5µL de cadascun dels BACs amb tampó de càrrega juntament amb un marcador de pes molecular. S'ha de veure un degradat de fragments entre 300pb i 600pb. Si es veuen fragments més petits és que s'ha digerit massa. Si es veuen fragments més grans és que manca digestió. Es poden afegir 5µL més d'enzim i tornar a digerir més estona al termociclador.
25. Barrejar 45µL d'ADN digerit, 5µL de COT-1, 5µLSS-DNA, 0,1 volums d'acetat sòdic 3M i 2,5 volums d'etanol 100% i deixar al congelador -20°C durant 48 hores protegit de la llum.
26. Centrifugar 30 minuts a 4°C 15000xg, descartar el sobrenadant i ressuspènere el pellet en 500µL d'etanol 70% fred.
27. Centrifugar 10 minuts a 100xg4°C, descartar el sobrenadant, assecar les parets del tub amb un paper i posar a l'estufa de 65°C durant 10 minuts.
28. Ressuspènere el pellet en 10µL d'aigua destil·lada escalfada a 70°C .
29. Guardar la sonda al congelador -20°C protegida de la llum.

El protocol de la tècnica de FISH amb sondes no comercials té una modificació respecte al protocol amb sondes comercials: es realitza un rentat post-fixació de les extensions cromosòmiques abans de la hibridació.

Protocol de FISH amb sondes BAC

<p>ENVELLIMENT DE LES EXTENSIONS CROMOSÒMIQUES</p> <p>Passos 1-2 del protocol de FISH amb sondes comercials.</p>
<p>POST-FIXACIÓ</p> <p>3. Rentar els portaobjectes en PBS1x durant 5 minuts i fer una sèrie de rentats amb etanols 70%, 85% i 100%, un minut en cadascun. Deixar assecar.</p> <p>4. Introduir els portaobjectes a una cubeta amb CIH 0,01M i pepsina a 37°C durant 5 minuts.</p> <p>5. Rentar amb SSC2x durant 5 minuts i fixar el material amb formaldehid1% durant 2 minuts.</p> <p>6. Rentar amb PBS1x durant 5 minuts i etanols al 70%, 85% i 100% (un minut cadascun).</p>
<p>PREPARACIÓ DE LES SONDES</p> <p>7. Diluir la sonda BAC marcada en solució d'hibridació: 7µL de solució d'hibridació (inclosa als kits de sondes comercials) + 2µL sonda control + 2µL sonda problema.</p>
<p>HIBRIDACIÓ</p> <p>8. Dispensar 10µL de la barreja de sondes a cada porta, tapar amb el cobreobjectes, segellar i hibridar mínim 56 hores al Hybrite (4 minuts a 74°C i 37°C tres dies).</p>
<p>RENTATS I CONTRATINCIÓ</p> <p>Passos 10-14 del protocol de FISH amb sondes comercials.</p>

2.2.5. Multiplex ligation dependent probe amplification

La tècnica de MLPA (Figura 1.10, pàgina 34) permet analitzar de manera semiquantitativa la dosi de 60 seqüències genètiques diferents simultàniament. S'ha utilitzat pel cribatge de les regions subtelomèriques, per la confirmació de la sospita clínica de la SPW, per la confirmació de CNVs identificades mitjançant CMA i pel cribatge de regions amb CNVs candidates en l'estudi cas-control. En cada anàlisi de MLPA s'inclouen controls positius i negatius.

2.2.5.1. Multiplex ligation dependent probe amplification amb sondes comercials

Pel cribatge de les regions subtelomèriques es van utilitzar dos kits comercials (P036 i P070, *MRC-Holland*) que contenen 47 sondes d'oligonucleòtids (dues sondes específiques per cada cromosoma i una sonda pel cromosoma Y), 41 de les quals es localitzen en regions subtelomèriques (Taula 2.8). El kit inclou una sonda extra al braç llarg (q) propera al centròmer pels cinc cromosomes acrocèntrics (13, 14, 15, 21 i 22). Les sondes subtelomèriques pels

cromosomes X i Y són idèntiques ja que hibriden en les regions pseudoautosòmiques PAR1 i PAR2.

Taula 2.8: Sondes incloses als kits de MLPA pel cribatge de regions subtelomèriques

Cromosoma	P036		P070	
	Braç p	Braç q	Braç p	Braç q
1	TNFRSF4	SH3BP5L	TNFRSF18	SH3BP5
2	ACP1	CAPN10	ACP1	ATG4B
3	CHL1	BDH1	CHL1	KIAA0226
4	PIGG	TRIML2	PIGG	FRG1
5	PDCD6	GNB2L1	CCDC127	GNB2L1
6	IRF4	PSMB1	IRF4	TBP
7	ADAP1	VIPR2	SUN1	VIPR2
8	FBXO25	ZC3H3	FBXO25	RECQL4
9	DMRT1	EHMT1	DOCK8	EHMT1
10	DIP2C	PAOX	ZMYND11	ECHS1
11	RIC8A	NCAPD3	BET1L	IGSF9B
12	SLC6A12	ZNF10	KDM5A	ZNF10
13	-	PSPC1 F7	-	CDC16 PSPC1
14	-	CCNB1IP1 MTA1	-	MTA1 PARP2
15	-	MKRN3 ALDH1A3	-	TM2D3 NDN
16	POLR3K	GAS8	DECR2	GAS8
17	RPH3AL	TBCD	RPH3AL	SECTM1
18	USP14	RBFA	THOC1	CTDP1
19	CDC34	CHMP2A	PPAP2C	CHMP2A
20	SOX12	OPRL1	ZCCHC3	UCKL1
21	-	RBM11 PRMT2	-	S100B HSPA13
22	-	BID RABL2B	-	ARSA IL17RA
X	SHOX	VAMP7	SHOX	VAMP7
Y	ZFY	-	ZFY	-

Protocol de MLPA pel cribatge de regions subtelomèriques (Kits P036 i P070, MRC-Holland)**PREPARACIÓ DE LES MOSTRES**

1. Mesurar la concentració d'ADN i diluir en aigua per obtenir un volum de treball de 5µL en funció de la taula següent:

[ADN] de la DNAteca	Volum ADN	Volum H ₂ O estèril
50-100µg/mL	3µL	2µL
100-200µg/mL	2µL	3µL
200-300µg/mL	1,7µL	3,3µL
300-500µg/mL	1,5µL	3,5µL
500-600µg/mL	1,4µL	3,6µL
700-900µg/mL	1,1µL	3,9µL
>900µg/mL	0,9µL	4,1µL

2. Dispensar les mostres preparades en una microplaca i col·locar al termociclador per desnaturalitzar 10 minuts a 98°C.

HIBRIDACIÓ

3. Preparar la barreja d'hibridació: 1,5µL de *Salsa Probe Mix*+ 1,5µL de *MLPA Buffer*.
 4. Quan la temperatura del termociclador disminueix a 25°C, dispensar 3µL de la barreja d'hibridació.
 5. Desnaturalitzar 1 minut a 98°C i hibridar 16 hores a 60°C.

LLIGACIÓ

6. Preparar la barreja de lligació: 25µL d'aigua + 3µL de *Ligase 65 buffer A* + 3µL de *Ligase 65 buffer B*+ 1µL de *Ligase 65*.
 7. Quan la temperatura del termociclador disminueix a 54°C, afegir a cada mostra 32µL de la barreja de lligació.
 8. Deixar al termociclador 15 minuts a 60°C i 6 minuts a 98°C.

PCR

9. Preparar la barreja d'amplificació: 3,75µL d'aigua + 1µL de *Primer Mix*+ 0,25µL de *Taq Polimerasa*.
 10. A una nova microplaca dispensar 5µL de barreja d'amplificació i 20µL del producte de lligació.
 11. Introduir la placa al termociclador amb el programa següent:
 35 cicles de desnaturalització (30 segons 95°C) + hibridació (30 segons 60°C) + elongació (1 minut 72°C) i una elongació final a 72°C durant 20 minuts.

ANÀLISI DE FRAGMENTS

12. Preparar una barreja amb 9µL de formamida i 0,2µL de marcador de pes molecular (*LIZ*).
 13. Carregar 9,2µL de barreja i 1µL de producte de PCR a una placa de seqüenciació i desnaturalitzar 2 minuts a 80°C.
 14. Introduir la placa a l'analitzador genètic ABI3130 (*Applied Biosystems*) i associar al programa d'anàlisi que inclou els següents paràmetres:
- Voltatge d'injecció: 1,6kV
 - Temps d'injecció: 15 segons
 - Voltatge de carrera: 15kV
 - Temps de carrera: 1800 segons
 - Temperatura del forn: 60°C

Els resultats s'analitzen amb el *software GeneMapper* proporcionant uns gràfics (Figura 2.2) on cada pic correspon al producte amplificat de cada sonda (identificable pel seu pes molecular). El càlcul per la normalització global dels valors de l'alçada de cada pic permet determinar la dosi del fragment analitzat. Es crea un full de càlcul excel per la normalització dels valors.

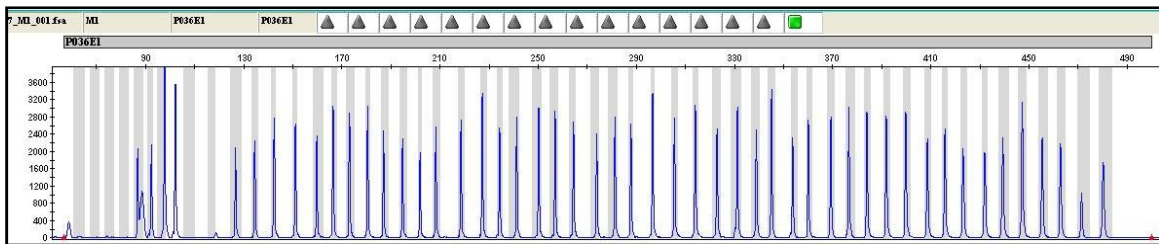


Figura 2.2: Gràfic obtingut a partir del software *GeneMapper*

- Normalització global per l'anàlisi de dosi
 - Per cada mostra, es calcula la suma de totes les alçades dels diferents pics i es divideix l'alçada de cada pic individual per la suma combinada de totes les alçades presents en la mostra, obtenint el valor X.
 - Es calcula la mitjana del valor X en les diferents mostres, obtenint el valor Y. Les alçades normalitzades dels pics es divideixen per aquesta mitjana obtinguda per cada sonda (X/Y).
 - El producte resultant dels càlculs s'anomena quocient de dosi (QD).
 - Les mostres que presenten moltes alteracions són valorades i si es considera oportú són eliminades dels càlculs per evitar falsos positius. Les mostres que presenten pics molt baixos (< 500) també són eliminades.

Interpretació dels resultats:

- Un QD <0,7: deleció
- Un QD entre 0,7-1,27: normal
- Un QD >1,27: duplicació

2.2.5.2. Multiplex ligation dependent probe amplification específic de metilació

Per la confirmació de la sospita clínica de la SPW s'utilitza el kit comercial ME028 (*MRC-Holland*) de MLPA específic de metilació (MS-MLPA) (Taula 2.9). El MS-MLPA no només permet la detecció de delecions i duplicacions sinó també determinar el patró de metilació de la regió estudiada gràcies a la incorporació de sondes que són específiques per regions diana d'un enzim de restricció específic per grups metil (*HhaI*) (Taula 2.9i Figura 2.3). Amb aquesta tècnica s'obté informació de la dosi (normal, deleció i duplicació) i informació del percentatge de metilació. Per la realització del MS-MLPA és necessari processar un mínim de tres mostres control (sense canvi de dosi de la regió 15q11q13) per la normalització de les dades.

Taula 2.9: Sondes incloses al kit de MLPA específic de metilació

Nom sonda	Gen	Exó	Banda citogenètica	Longitud sonda (pb)	Sonda control dosi	Diana HhaI
05330-L04717	DPYD	14	1p21.3	427	+	
02260-L01747	MLH1	1	3p22.2	463	+	+
08051-L07832	DNAH5	59	5p15.2	244	+	
09533-L09943	CYP3A5	2c	7q22.1	264	+	
09824-L10234	DPYSL4	11	10q26.3	136	+	
08947-L09042	SLC6A5	16	11p15.1	454	+	
03896-L00020	CTTN	16	11q13.3	130	+	
08018-L07799	CHEK1	2	11q24.2	319	+	
08020-L07801	CHEK1	4	11q24.2	166	+	
07404-L07051	COL2A1	46	12q13.11	208	+	
01590-L01162	DLEU1	down	13q14.3	337	+	
02018-L00865	TUBGCP5	8	15q11.2	154		
06249-L05755	NIPA1	4	15q11.2	434		
02020-L12922	MKRN3	1	15q11.2	172		
11155-L11839	MAGEL2	1	15q11.2	409		
11149-L11833	NDN	1	15q11.2	445		
04027-L13937	NDN	1	15q11.2	419		+
11178-L11862	SNRPN	u1b	15q11.2	287		
12178-L13090	SNRPN	u1b	15q11.2	238		
12179-L13383	SNRPN	Intr.u2	15q11.2	278		
12182-L13094	SNRPN	Intr.u2	15q11.2	270		
02027-L12881	SNRPN	u5	15q11.2	256		
12477-L13519	SNRPN	u5	15q11.2	391		
11181-L13997	SNRPN	CpG isl	15q11.2	250		+
04106-L13905	SNRPN	CpG isl	15q11.2	178		+
04104-L04294	SNRPN	CpG isl	15q11.2	190		+
04103-L02951	SNRPN	CpG isl	15q11.2	142		+
01318-L13088	SNRPN	3	15q11.2	294		

11177-L11861	SNRPN	7	15q11.2	400	
12719-L13907	SNRPN-HB2-85	SNO	15q11.2	214	
12721-L13796	SNRPN-HB2-85	SNO	15q11.2	472	
12723-L13798	SNRPN-HB2-85	SNO	15q11.2	328	+
02034-L12925	UBE3A	13	15q11.2	355	
12082-L13474	UBE3A	8	15q11.2	301	
04620-L00863	UBE3A	7	15q11.2	160	
10880-L11550	UBE3A	6	15q11.2	197	
10878-L11548	UBE3A	5	15q11.2	373	
04641-L04293	UBE3A	1	15q11.2	184	+
11162-L11846	ATP10A	5	15q12	366	
11159-L11843	ATP10A	1	15q12	226	
01315-L09339	GABRB3	12	15q12	220	
10874-L11544	GABRB3	10	15q12	382	
01314-L00867	APBA2	14	15q13.1	202	
01709-L12924	BLM	1	15q26.1	346	+
08372-L08226	AATF	11	17q12	148	+
08335-L08267	VAT1	6	17q21.31	232	+
08586-L13087	BRIP1	20	17q23.2	480	+
01576-L01148	NF2	13	22q12.2	309	+

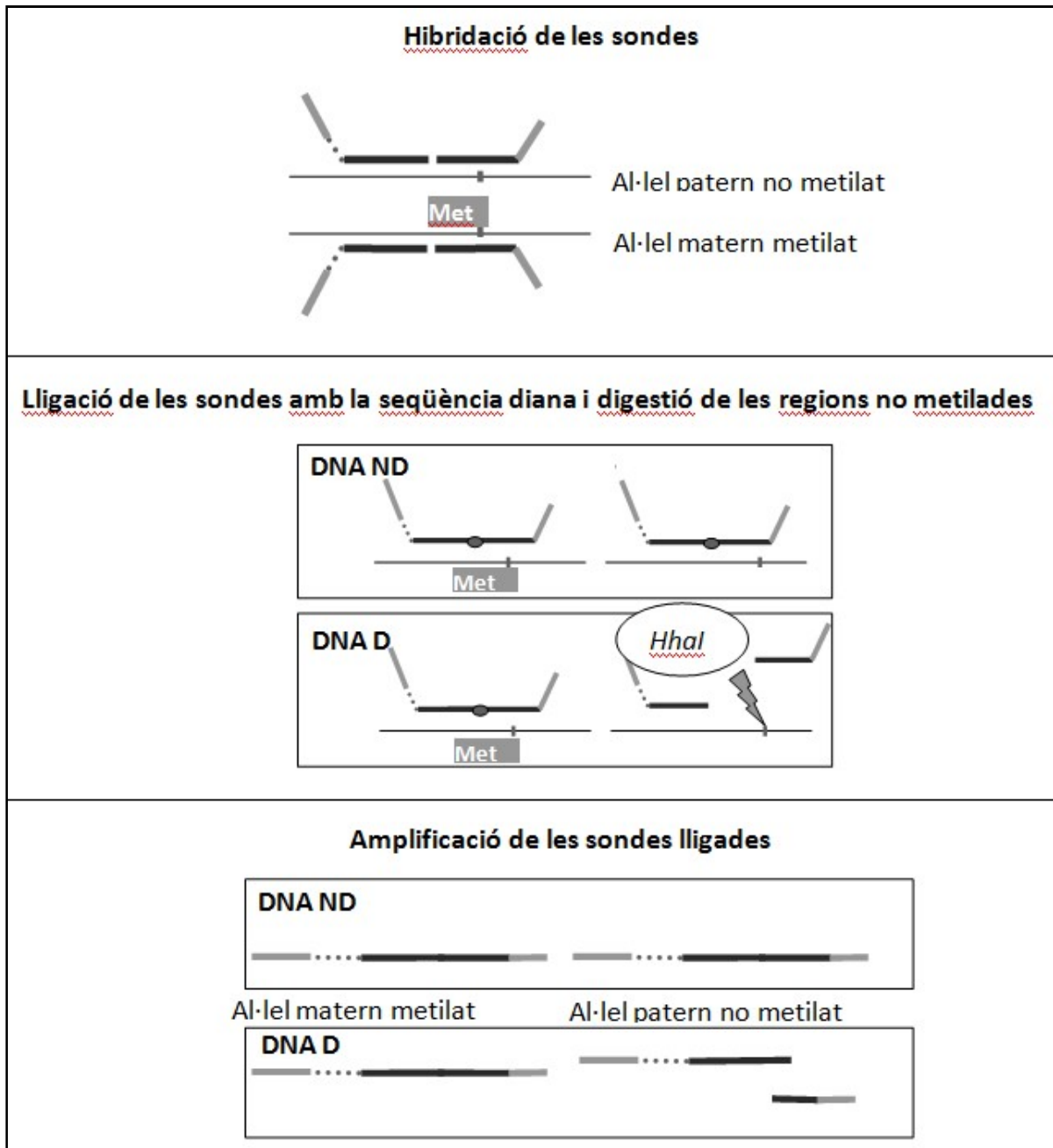


Figura 2.3: Esquema de la tècnica de MLPA específic de metilació (MS-MLPA)

L'enzim *HhaI* actua en les illes CpG no metilades provocant-ne la digestió. Els oligonucleòtids que hibriden amb l'al·lel patern (no metilat) no es poden lligar i per tant no s'amplificaran. (ND) No digerit; (D) Digerit.

Protocol de MS-MLPA (Kit ME028, MRC-Holland)

<p>PREPARACIÓ DE LES MOSTRES</p> <p>Passos 1-2 del protocol de MLPA (pàgina 63)</p>
<p>HIBRIDACIÓ</p> <p>Passos 3-5 del protocol de MLPA (pàgina 63).</p>
<p>LLIGACIÓ</p> <p>6. Preparar tres barreges:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Barreja 1: 10µL d'aigua i 3µL de <i>Ligase 65 buffer A</i> - Barreja de lligació: 8,5µL d'aigua, 1,5µL de <i>Ligase 65 buffer B</i> i 0,25µL de <i>Ligase 65</i>. - Barreja de lligació i digestió: 7,75µL d'aigua, 1,5µL de <i>Ligase 65 buffer B</i>, 0,5µL de <i>HhaI enzyme</i> i 0,25µL de <i>Ligase 65</i>. <p>7. Quan finalitza la hibridació, treure la microplaca del termociclador i posar en gel.</p> <p>8. Dispensar 10µL de la barreja 1 al producte d'hibridació i dividir el volum en dos tubs: 10µL al tub no digerit (ND) i 10µL al tub digerit (D).</p> <p>9. Posar les mostres al termociclador 1 minut a 49°C.</p> <p>10. Amb el termociclador a 49°C, incorporar 10µL de barreja de lligació a un tub ND i 10µL de barreja de lligació i digestió al tub D.</p> <p>11. Deixar al termociclador 30 minuts a 49°C i 5 minuts a 98°C.</p>
<p>PCR</p> <p>12. Preparar la barreja d'amplificació barrejant 3,75µL d'aigua, 1µL de <i>Primer Mix</i> i 0,25µL de <i>Taq Polimerasa</i>.</p> <p>13. A cada tub (D i ND) dispensar 5µL de la barreja d'amplificació.</p> <p>14. Introduir les mostres al termociclador amb el programa següent: desnaturalització 30 segons a 72°C, 35 cicles de desnaturalització (30 segons 95°C) + hibridació (30 segons 60°C) + elongació (1 minut 72°C) i elongació final a 72°C durant 20 minuts.</p>

Per l'anàlisi de fragments es segueix el protocol de MLPA (passos 12-14, pàgina 64) i es processen les dades mitjançant el *software GeneMapper*.

S'obtenen dos perfils de pics per a cada individu analitzat, mostra D i mostra ND (Figura 2.4) la qual cosa permet fer dos tipus d'anàlisis: anàlisi de dosi i anàlisi del patró de metilació.

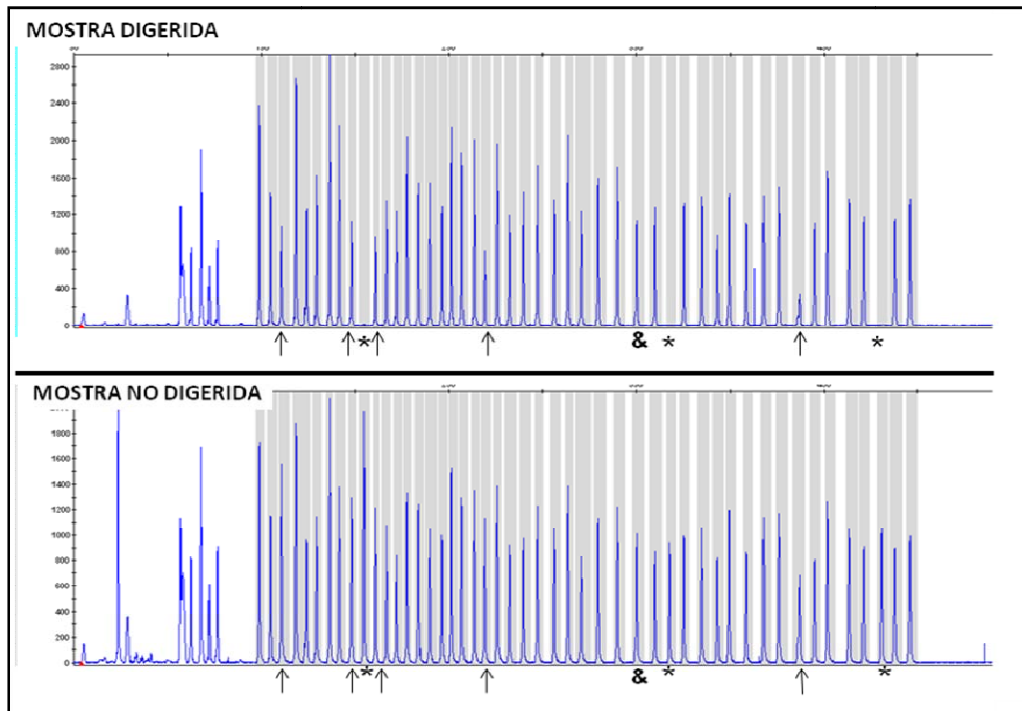


Figura 2.4: Gràfics obtinguts a partir del software *GeneMapper* per cada mostra analitzada per MS-MLPA

Es senyalen les sondes específiques per regions amb diana HhaI: (↑) Sondes localitzades a SNRPN; (*) Sondes localitzades en regions amb 0% de metilació; (&) Sondes localitzades a regions amb 100% de metilació.

– Normalització global per l’anàlisi de dosi

Per aquest anàlisi es consideren les dades de la mostra ND de cada individu i es realitza una normalització de les dades entre els diferents individus.

- Per a cada individu, es calcula la suma de les alçades de les sondes control en cada mostra. Es divideix l’alçada de cada pic individual entre la suma combinada de les alçades de les sondes control presents a la mostra, obtenint el valor X.
- Per a cada sonda, es calcula la mitjana de les alçades de les mostres control negatiu, obtenint el valor Y. Les alçades normalitzades dels pics es divideixen per aquesta mitjana obtinguda per a cada sonda (X/Y).
- El producte resultant dels càlculs és el QD.

– Anàlisi del patró de metilació

Aquesta anàlisi es realitza només per les 9 sondes localitzades a regions diana de l'enzim de restricció *HhaI*: 5 sondes problema (4 *SNRPN* i 1 *NDN*) i 4 sondes control (3p22, *SNORD116*, *UBE3A*, i 15q26).

- Per a cada individu, es calcula la suma de les alçades de les sondes control en cada mostra (ND i D). Es divideix l'alçada de cada pic individual entre la suma combinada de les alçades de les sondes control presents a la mostra, obtenint el valor X.
- Es calcula el quocient entre la X de la mostra D i la X de la mostra ND, obtenint el quocient Y.
- Es multiplica el quocient Y per 100 per obtenir el percentatge de metilació de la sonda en la mostra.

Interpretació dels resultats:

Anàlisi de dosi	DQ <0,7: deleció DQ entre 0,7-1,27: normal DQ >1,27: duplicació
Anàlisi metilació	100% metilació: Síndrome de Prader Willi 50% metilació: normal 0% metilació: Síndrome d'Angelman

2.2.5.3. Multiplex ligation dependent probe amplification amb sondes no comercials

Pel disseny de les sondes no comercials es segueixen les recomanacions de *MRC-Holland* (www.mlpa.com) (Taula 2.10). S'utilitza el *software* de UCSC (<https://genome.ucsc.edu>) per la obtenció de la seqüència de nucleòtids de la regió diana i el *software online Proseek* (http://davinci.crg.es/estivill_lab/mlpa/) com a suport pel disseny de la sonda adequada.

Taula 2.10: Recomanacions pel disseny de les sondes de MLPA

	Oligo L	Oligo R
Contingut GC	45-60%	35-60%
Temperatura de fusió	>70°C	>70°C
Longitud mínima	20 nucleòtids	20 nucleòtids
Nucleòtid extrem 5'	G/C	A/T
Modificació extrem 5'	No	Fosforil·lació
Nucleòtid extrem 3'	A/T	G/C

MATERIAL I MÈTODES

Cada sonda està formada per dues seqüències d'hibridació específiques per regions adjacents (oligo L i oligo R), les seqüències de reconeixement a encebadors i la seqüència d'elongació que permet identificar la sonda pel seu pes molecular (Figura 1.10, pàgina 34).

Es van dissenyar grups de sondes (*Probemix*) amb 12-14 sondes cadascun (Annex 2) aplicades tant per la confirmació de CNVs identificades mitjançant CMA com pel cribatge de CNVs en l'estudi cas-control.

Protocol de preparació de les *Probemix*

1. Ressuspendre els oligonucleòtids liofilitzats en aigua per obtenir una concentració de 100 μ M (solució stock 1).
2. Diluir 2 μ L de solució stock 1 en 198 μ L d'aigua (solució stock 2).
3. Dispensar 1,6 μ L de solució stock 2 de cada oligonucleòtid i afegir aigua destil·lada fins obtenir un volum de 400 μ L.

El protocol utilitzat per aquest MLPA és el mateix que el de la tècnica MLPA amb sondes comercials (pàgines 64 i 64) amb una petita modificació en l'anàlisi de fragments: es dilueix el producte de PCR (dilució 1/10 en aigua) abans de carregar al seqüenciador.

2.2.6. Cariotip molecular

Pel CMA es va utilitzar l'aCGH 2x400K d'*Agilent Technologies* (disseny 021850 d'*Agilent Technologies*). Aquest *array* conté 411.056 oligonucleòtids amb una resolució mitjana d'una sonda cada 5,3Kb i un enriquiment de sondes als gens RefSeq (una sonda cada 4,6Kb). A més a més, l'aCGH utilitzat inclou 1.000 oligonucleòtids replicats i 5.126 sondes pel control de qualitat intern. La mostra problema s'hibrida juntament amb una mostra control del mateix sexe, partint d'1 μ g de cada mostra prèviament digerida i marcada amb els fluorocroms *Cyanine-5* (Cy5-dUTP) per la mostra problema i *Cyanine-3* (Cy3-dUTP) per la mostra control. En el procés d'hibridació s'incorpora una solució de bloqueig que inclou la *Human Cot* (la qual s'uneix a les regions inespecífiques). Els *arrays* es mantenen en un forn d'hibridació giratori a 65°C durant 40 hores, posteriorment es renten per eliminar possibles restes de reactius i

s'escanegen amb l'escàner MS2000 (*NimbleGen*) en un espai específic lliure d'ozó per evitar la degradació del marcatge.

Protocol de cariotip molecular

<p>REACTIUS</p> <p>Kit de marcatge <i>SureTag DNA (Agilent Technolgies)</i>: inclou els reactius per la digestió i el marcatge.</p> <p>Array 2x400K 021850 (<i>Agilent Technolgies</i>).</p> <p>Kit hibridació (<i>Agilent Technolgies</i>).</p> <p>Suretag DNA labeling kit Purification Columns: columnes <i>KREApure</i> per a la purificació d'ADN marcat (<i>Agilent Technolgies</i>).</p> <p>Human Cot-1 DNA (<i>Agilent Technolgies</i>).</p> <p>Solucions de rentat post-hibridació (<i>Agilent Technolgies</i>).</p>
<p>PREPARACIÓ DE LES MOSTRES</p> <p>1. Diluir les mostres d'ADN en aigua destil·lada per obtenir una concentració de 100ng/μL.</p>
<p>DIGESTIÓ</p> <p>2. Preparar la barreja de digestió: 2μL d'aigua, 2,6μL de <i>Restriction Enzyme Buffer10x</i>, 0,2μL de <i>BSA</i>, 0,5μL de <i>AluI</i> i 0,5μL de <i>RsaI</i>.</p> <p>3. Barrejar 10μL d'ADN diluït, 10,2μL d'aigua i 5,8μL de barreja de digestió.</p> <p>4. Posar al termociclador 2 hores a 37°C i 20 minuts a 65°C.</p>
<p>MARCATGE</p> <p>5. Afegir 5μL de <i>Random Primeral</i> producte de la digestió i posar al termociclador durant 3 minuts a 95°C.</p> <p>6. Preparar la barreja de marcatge: 10μL de tampó 5x, 5μL de dNPTs 10x, 3μL de fluorocrom (Cy5 mostres problema, Cy3 mostres control) i 1μL d'<i>Exoklenow</i>.</p> <p>7. Dispensar 19μL de la barreja de marcatge a l'ADN digerit i posar al termociclador 2 hores a 37°C i 10 minuts a 65°C.</p>
<p>PURIFICACIÓ</p> <p>8. Dispensar 430μL de tampó TE 1x a una columna de <i>KREApure</i> i afegir el producte del marcatge.</p> <p>9. Centrifugar 10 minuts a 15000xg i descartar l'eluent.</p> <p>10. Afegir 480μL de tampó TE 1x a la columna, centrifugar 10 minuts a 15000xg i descartar l'eluent.</p> <p>11. Traspasar la columna a un nou tub col·lector, col·locant-la invertida, deixar en repòs durant 1 minut i centrifugar 1 minut a 100xg.</p> <p>12. Enrasar el volum obtingut (entre 20 i 30μL) amb tampó TE 1x fins obtenir un total de 43μL.</p>
<p>VALORACIÓ DEL MARCATGE</p> <p>13. Mesurar l'ADN marcat amb l'equip nanodrop (<i>DNA-50</i>).</p>

14. Calcular l'activitat específica i el rendiment del marcatge segons les fórmules següents:

$$\text{Activitat específica} = \frac{\text{quantitat fluorocrom (pmol)} \times \text{volum fluorocrom } (\mu\text{L})}{\text{pmol fluorocrom}/\mu\text{g DNA} \times \text{quantitat d'ADN marcat } (\mu\text{g}) \times \text{volum d'ADN marcat } (\mu\text{L})}$$

$$\text{Rendiment } (\mu\text{g}) = \frac{\text{concentració d'ADN (ng}/\mu\text{L}) \times \text{Volum de mostra } (\mu\text{L})}{1000}$$

Els valors obtinguts han d'estar dins el rangs indicats a la taula següent:

Fluorocrom	Activitat Específica	Rendiment
Cy5	20-35	9-12
Cy3	25-40	9-12

HIBRIDACIÓ

15. Preparar la barreja d'hibridació: 25µL de Human Cot-1 DNA, 26µL de Blocking Agent10x i 130µL de HI-PRM Hybridization Buffer2x.
16. Barrejar 41µL de mostra problema (Cy5), 41µL de mostra control (Cy3) i 181µL de labarreja d'hibridació.
17. Desnaturalitzar les mostres a 95°C durant 3 minuts i incubar a 37°C durant 30 minuts.
18. Preparar el cobreobjectes al damunt d'una càmera d'hibridació.
19. Dispensar 255µL de la barreja anterior al cobreobjectes, posar el porta (array) al damunt i tancar la càmera d'hibridació.
20. Posar l'array al forn d'hibridació a 65°Cdurant 40 hores.

RENTATS POST-HIBRIDACIÓ

21. Treure l'arraydel forn i obrir la càmera d'hibridació. Submergir l'array en la solució 1 de rentat per separar el cobreobjectes del porta.
22. Posar el porta en una cistella i submergir en una cubeta amb solució 1 de rentat. Rentar 5 minuts en agitació a temperatura ambient.
23. Traspasar la cistella a una segona cubeta amb solució 2 de rentat temperada a 37°C. Rentar 1 minut a 37°Cen agitació.
24. Traspasar la cistella a una tercera cubeta amb acetonitril. Rentar 10 segons en agitació.
25. Traspasar a una cubeta amb *Stabilization and Drying Solution*. Rentar 30 segons a temperatura ambient en agitació.
26. Introduir l'array a l'escàner MS2000 i iniciar el programa amb els següents paràmetres d'escaneig:
 - Resolució: 2µm.
 - Gain 1: 40%.
 - Gain 2: 70%.
 - Intensitat del làser 1: 25%.
 - Intensitat del làser 2: 25%.
 - No Autogain.
 - Control de configuració de l'arxiu: apply to all slides with parameter A.
 - Control de configuració de l'arxiu: seleccionar *Multi-Tiff*.
 - Àrea de l'array: *Single Scan Area* i fer més gran l'àrea d'escaneig.

2.2.6.1. Anàlisi de les dades

Les dades obtingudes es processen amb el programa *Feature Extraction*, el qual proporciona els valors per establir la qualitat relativa de les dades de l'*array* (Taula 2.11).

Taula 2.11: Valors dels controls de qualitat del cariotip molecular

Control de marcatge	Excel·lent	Correcte	Pobre
DLRS*	<0,20	0,20-0,30	>0,30
Reproductibilitat	0-0,05	0,05-0,20	<0 o >0,20
Soroll de Fons	<5	5-10	>10
Soroll de la senyal	>100	30-100	<30
Intensitat de la senyal	>150	50-150	<50

(*) Derivative Log Ratio Standard Deviation.

El *derivative log ratio spread* (DLRS) és una mesura de consistència o soroll en les dades de *log ratio* entre dues sondes. Les mostres amb valors més alts de DLRS tendeixen a tenir una proporció senyals/soroll pobre que dificulta la detecció acurada de CNVs, pel que s'aconsella excloure aquells resultats provinents d'*arrays* amb valors alts de DLRS.

En la primera tanda d'aCGH, els *arrays* que presentaven tots els valors de control de qualitat dins els rangs d'excel·lent o correcte es van processar i analitzar mitjançant el *software Genomic Workbench 5.0* (Agilent Technologies) utilitzant l'algoritme de detecció d'aberració 2 (ADM-2) amb un llindar d'alteració de 6,5. Les alteracions es van considerar vertaderes quan s'identificava un mínim de 4 sondes consecutives amb una *log2 ratio* mínima de $\pm 0,25$.

En la segona tanda, els *arrays* amb un valor de DLRS < 0,18 i amb la resta de valors dins els rangs d'excel·lent o correcte es van processar mitjançant el *software Cytogenomics* (Agilent Technologies) utilitzant l'algoritme de detecció d'aberració 2 (ADM-2) amb un llindar d'alteració de 6,0. Les alteracions es van considerar vertaderes quan s'identificava un mínim de 5 sondes consecutives amb una *log2 ratio* mínima de $\pm 0,25$.

2.2.7. Classificació de les variants en nombre de còpies

Les variants identificades mitjançant CMA van ser contrastades amb les variants publicades a DGV identificades a població general. Aquelles que presenten una freqüència >1% es classifiquen com a polimòrfiques i les rares (freqüència <1% en població general) es classifiquen en quatre grups seguint els criteris següents:

- **Patogènica (CNVp):** solapa amb variants descrites prèviament a la literatura associades a patologia i/o inclou gens coneguts amb funcions rellevants a sistema nerviós associats a DI i/o TP.
- **VOUS probablement patogènica (VOUSpp):** solapa amb gens i/o regions descrites prèviament com a possibles candidats per DI i/o TP o inclou gens amb funció a sistema nerviós no associats a patologia.
- **VOUS probablement benigna (VOUSpb):** inclou només regió intrònica de gens amb funció a sistema nerviós no associats a patologia o gens amb funcions desconegudes o no relacionades amb sistema nerviós.
- **Benigna (CNVb):** no inclou gens ni elements reguladors coneguts.

2.2.8. Interpretació dels resultats

S'han utilitzat diverses bases de dades *online* (Taula 2.12) per identificar les CNVs polimòrfiques i les CNVs rares, analitzar el contingut genètic de les alteracions observades, identificar la funció dels gens implicats, buscar altres casos descrits prèviament a la literatura, determinar la patogenicitat de les alteracions i establir associacions amb el fenotip.

Taula 2.12: Bases de dades utilitzades

Base de dades	Informació
<i>Database of Genomic Variants</i> (http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home)	Identificar CNVs polimòrfiques.
DECIPHER (https://decipher.sanger.ac.uk/) <i>Clinical Genome Resource</i> (ClinVar) (https://www.clinicalgenome.org/data-sharing/clinvar/)	Identificar CNVs descrites en individus amb patologia, longitud, punts de trencament, classificació i descripció clínica de l'individu.
Navegador de la Universitat de Califòrnia, Santa Cruz (UCSC) (https://genome.ucsc.edu)	Contingut genètic de la CNV i integració d'informació de diverses bases de dades.
<i>GeneCards</i> (www.genecards.org)	Informació genòmica, transcryptòmica, proteòmica, clínica i funcional dels gens.
<i>GeneReview</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/)	Informació clínica i mèdica rellevant (descripció clínica, diagnòstic i consell genètic) de síndromes específiques.
NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Funcions dels gens, expressió, literatura disponible, etc.

2.2.9. Caracterització de punts de trencament

En la cohort de 100 adults s'han identificat tres individus amb una deleció solapant a la regió 7q31. S'han dissenyat diversos encebadors *forward* entre la última sonda amb dosi normal i la primera sonda delecionada a l'extrem 5' de l'alteració i diversos encebadors *reverse* localitzats entre la última sonda delecionada i la primera sonda amb dosi normal a l'extrem 3' de l'alteració, segons resultats de CMA (Figura 2.5). Es realitza una PCR per cada combinació d'encebadors *forward* i *reverse* i es realitza la seqüenciació Sanger al producte amplificat, el qual serà analitzat a través de l'analitzador genètic.

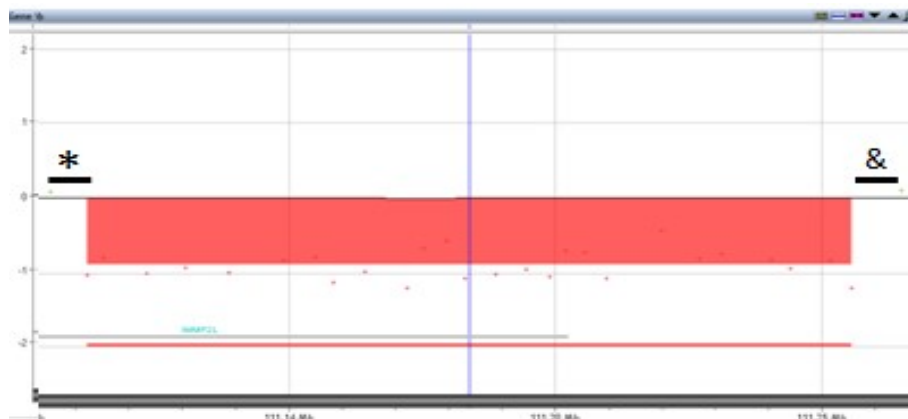


Figura 2.5: Localització dels encebadors dissenyats per la caracterització dels punts de trencament
(*Forward; (&) Reverse

Protocol d’amplificació i seqüenciació per la caracterització dels punts de trencament

REACTIUS:

Takara Ex Taq

Encebadors *forward* i *reverse* (dissenyats específicament per cada cas):

Ressuspendre els encebadors liofilitzats en aigua per obtenir una concentració de 100µM (solució stock 1).

Diluir 10µL de solució stock 1 en 90µL d’aigua (solució stock 2).

Diluir 10µL de solució stock 2 en 90µL d’aigua (solució stock 3).

BigDye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems)

AMPLIFICACIÓ

Cada mostra s’amplificarà juntament amb una mostra control (individu sense deleció a la regió d’estudi).

Mesurar la concentració de les mostres d’ADN i diluir a una concentració de treball de 200ng/µL.

Fer una barreja seguint els volums indicats a la taula següent:

Reactiu	Volum
10x Ex Taq buffer	2,5µL
dNTP mixture	2µL
Encebador <i>forward</i> (stock 2)	1,5µL
Encebador <i>reverse</i> (stock 2)	1,5µL
Aigua	16,375µL
Takara Ex Taq	0,125µL

Dispensar 24µL de barreja i 1µL de mostra i posar al termociclador:

98°C 2 minuts + 30 cicles (98°C 10 segons, 54°C 30 segons i 72°C 5 minuts) + 72°C 10 minuts

Córrer el producte de PCR en un gel d’agarosa 1,5% a 100 volts durant 15 minuts per identificar si hi ha hagut amplificació.

SEQÜENCIACIÓ

Barrejar 8µL de producte de PCR amb 2µL d'ExoSap per eliminar restes de nucleòtids. Posar al termociclador: 37°C 15 minuts i 80°C 15 minuts.

Fer dues barreges (una amb encebador *forward* i una amb encebador *reverse*) seguint els volums indicats a la taula següent:

Reactiu	Volum
BigDye	0,5µL
Tampó 1x	2µL
Encebador(stock 3)*	3,2µL
Aigua	3,5µL

*forward o reverse

Dispensar 9µL de barreja de seqüenciació i 3µL de producte de PCR netejat i posar al termociclador: 25 cicles (96°C 10 segons, 50°C 5 segons i 60°C 4 minuts).

PRECIPITACIÓ

Dispensar en un tub eppendorf 12µL de producte de seqüenciació, 62µL d'aigua i 24µL d'etanol absolut.

Deixar en repòs a temperatura ambient 20 minuts i centrifugar 20 minuts a 15000xg.

Eliminar el sobrenadant i dispensar 250µL d'etanol 70%. Fer un petit vòrtex i centrifugar 15 minuts a 15000xg.

Eliminar el sobrenadant i deixar assecar l'ADN.

ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES

Ressuspendre l'ADN en 10µL de Formamida, fer un vòrtex i traspasar a la placa de seqüenciació.

Posar la placa al termociclador per desnaturalitzar a 95°C 5 minuts.

Introduir la placa a l'analitzador genètic ABI3130 (*Applied Biosystems*) i associar al programa d'anàlisi que inclou els següents paràmetres:

- Voltatge d'injecció: 1,2kV
- Temps d'injecció: 12s
- Voltatge de carrera: 8,5kV
- Temps de carrera: 3780s
- Temperatura del forn: 60°C

Els resultats s'analitzen amb el *software SequencingMapper* proporcionant la seqüència de nucleòtids i es fa un ensemblatge utilitzant el BLAT del *software online* de UCSC (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) per identificar la regió delecionada de la mostra.

2.2.10. Anàlisi estadístic

S'ha realitzat una anàlisi estadística de la longitud dels diferents grups de CNVs i de les diferents variables categòriques (TP, TC, co-morbiditat i dismorfologia) (Taula 2.13) en funció de la presència o absència de CNVp i VOUSpp.

Les possibles associacions entre variables s'han analitzat mitjançant proves de χ^2 . Quan un o més dels valors esperats utilitzats per als càlculs χ^2 són inferiors a 5, es calcula el valor de p mitjançant la prova exacta de Fisher. Quan el resultat és estadísticament significatiu, l'*odds ratio* és indicada com a una mesura de la mida de l'efecte. Per a les variables contínues dependents, i atès que es mostren distribucions no normals (segons el que determina les proves de *Shapiro-Wilk* i la inspecció visual), s'han utilitzat els tests de *Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney*. Per indicar la significació estadística s'estableix un llindar de $p < 0,05$. Les anàlisis estadístiques s'han realitzat amb el paquet estadístic per a ciències socials (SPSS, IBM, EUA) versió 16.0.

2.2.10.1 . Anàlisi de les característiques de les variants en nombre de còpies

Segons els criteris establerts (apartat 2.2.7, pàgina 76) les CNVs rares es classifiquen en quatre categories. No obstant, tant les VOUSpb i les CNVb no contribueixen a la clínica del pacient, pel que són agrupades en un únic grup anomenat CNVs no patogèniques. S'han comparat les mitjanes de la longitud de les CNVs entre els tres grups de CNVs (CNVp, VOUSpp i no patogèniques) per identificar una possible associació entre la longitud i la patogenicitat de l'alteració. Tenint en compte que la longitud no segueix una distribució normal, s'ha realitzat el test *Kruskal-Wallis* i posteriorment s'han comparat les mitjanes per parells mitjançant el test *Mann-Whitney*.

2.2.10.2 . Anàlisi de les variables categòriques

S'ha comparat la distribució dels TP en funció del sexe, el nivell de DI i la presència o absència de TC mitjançant taules de contingència i avaluant l'associació mitjançant la prova χ^2 de *Pearson*.

L'associació de les diferents variables categòriques enregistrades s'ha realitzat entre dos grups d'individus en funció de la presència o absència de CNVp i VOUSpp mitjançant diferents proves estadístiques per determinar si la presència d'aquestes CNVs incrementa el risc d'alguna de les variables (Taula 2.13).

S'ha realitzat l'anàlisi d'*odd ratio* per aquelles variables amb significació estadística per calcular la magnitud de l'efecte.

Taula 2.13: Variables categòriques analitzades en funció de la presència o absència de variants en nombre de còpies patogèniques i variants de significació clínica incerta probablement patogèniques

Variable categòrica	Prova estadística
Edat	Kruskal-Wallis
Sexe	χ^2 de Pearson
Grau de DI	χ^2 de Pearson
Presència/Absència de trastorn psiquiàtric	χ^2 de Pearson
Distribució de trastorn psiquiàtric	χ^2 de Pearson
Presència/Absència de trastorn de conducta	χ^2 de Pearson
Co-morbiditat trastorn psiquiàtric + trastorn de conducta	χ^2 de Pearson
Co-morbiditat de dos trastorns psiquiàtrics en un únic individu	χ^2 de Pearson
Presència/Absència de dismòrfia	χ^2 de Pearson
Número de trets dismòrfics	Mann-Whitney

3 .RESULTATS

3.1. Valoració global del rendiment de les tècniques emprades en l'estratègia diagnòstica

L'estratègia d'anàlisi genètica aplicada a la cohort de 100 pacients adults amb diagnòstic dual (Figura 2.1 pàgina 49) ha permès identificar una alteració genètica en 38 individus amb un rendiment diagnòstic del 4% amb bandes G, del 3% amb el criatge del SXF, del 3,6% amb MLPA de regions subtelomèriques i del 26,7% amb CMA (Taula 3.1). Les tècniques moleculars específiques, que inclouen FISH, seqüenciació *Sanger* i MLPA amb sondes comercials, s'han realitzat únicament en aquells casos amb sospita clínica per una síndrome específica, facilitant el diagnòstic en 9 casos. Els individus amb alteracions cromosòmiques identificades per cariotip amb bandes G i els individus amb CNVs identificades per MLPA de regions subtelomèriques, han estat posteriorment analitzats per CMA per identificar la presència d'altres CNVs i identificar els punts de trencament de les alteracions prèviament identificades.

Taula 3.1: Estratègia d'anàlisi genètica i rendiment diagnòstic

Tècnica utilitzada	N	Anàlisi genètica	Alteració	n	RD
Cariotip bandes G	100	Cribatge de reorganitzacions cromosòmiques	Alteració cromosòmica	3	4%
			Translocació equilibrada	1	
Amplificació regió 5' <i>FMR1</i>	100	Cribatge SXF	SXF confirmats	5*	3%
Estudis moleculars específics ¹	SC	Confirmació sospita clínica de síndromes específiques	SVCF	4	-
			SPW	2	
			SSM	2	
			SW	1	
MLPA (P036/P070)	82	Cribatge regions subtelomèriques	CNVp subtelomèrica	2	3,6%
			CNVp proximal ²	1	
CMA	86	Cribatge CNVs submicroscòpiques	CNVp	11	26,7%
			VOUSpp	12	

(N) Subjectes analitzats; (n) Pacients amb alteració identificada; (RD) Rendiment diagnòstic; (*) Tres individus són germans; (SC) Individus amb sospita clínica; (SXF) Síndrome X fràgil; (SVCF) Síndrome Velocardiofacial; (SPW) Síndrome de Prader Willi; (SSM) Síndrome de Smith Magenis; (SW) Síndrome de Williams; (MLPA) *Multiplex ligation dependent probe amplification*; (CMA) Cariotip molecular; (CNVp) Variant en nombre de còpies patogènica; (VOUSpp) Variant de significació clínica incerta probablement patogènica; (1) Per l'estudi de síndromes clínicament reconegudes s'han utilitzat les tècniques de FISH, seqüenciació *Sanger* i MLPA comercial; (2) Els dos kits de MLPA inclouen sondes intersticials pels cromosomes acrocèntrics, pel que s'ha pogut identificar una duplicació 15q11q13.

RESULTATS

MLPA de regions subtelo mèriques

Eficiència analítica

Els resultats obtinguts amb els dos kits emprats són concordants a excepció d'un cas. El kit de MLPA P036 ha identificat una deleció amb la sonda *RABL2B* (22q13.33) mentre que el kit MLPA P070 mostra una dosi normal amb la sonda *ARSA* (22q13.33). Per determinar la dosi d'aquesta regió s'ha realitzat una anàlisi mitjançant FISH comercial que confirma l'haploinsuficiència de la regió. El posterior anàlisi amb CMA localitza el punt de trencament entre els introns 3 i 9 del gen *SHANK3* (NM_033517.1) (Figura 3.1), mentre que la sonda específica per la regió subtelo mèrica del braç llarg del cromosoma 22 inclosa al kit P070 té una localització més proximal respecte a la regió delecionada.

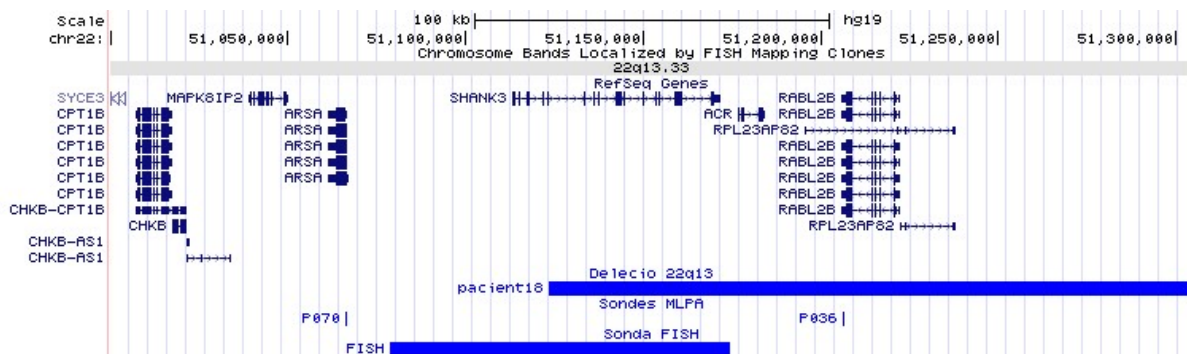


Figura 3.1: Regió subtelo mèrica del cromosoma 22

Localització de la deleció 22q13.1 i de les sondes de MLPA i de FISH utilitzades. La deleció 22q13 identificada mitjançant la sonda *RABL2B* del kit P036 no inclou el gen *ARSA*, on es localitza la sonda 22qter del kit P070. La sonda de FISH utilitzada solapa parcialment amb la regió delecionada.

Per calcular l'especificitat i la sensibilitat analítica definim:

- Individus amb CNVp:
 - Vertaders positius: CNVs identificades amb els dos kits.
 - Falsos negatius: CNVs identificades amb un únic kit.

- Individus sense CNVp:
 - Falsos positius: CNVp no confirmades.
 - Vertaders negatius: sense CNVp.

Especificitat = $VN/(VN+FP)$; Sensibilitat = $VP/(VP+FN)$

La tècnica de MLPA de regions subtelomèriques té una especificitat analítica del 100% i una sensibilitat analítica del 66,6% (Taula 3.2).

Taula 3.2: Taula pel càlcul de la sensibilitat i especificitat analítica de la MLPA

MLPA	CNVp o VOUSpp	CNVp o VOUSpp	Total
Positiu	2	0	2
Negatiu	1	79	80
Total	3	79	82

Eficiència diagnòstica

L'eficiència diagnòstica és un paràmetre útil per determinar el rendiment diagnòstic en la detecció de CNVs. La tècnica de MLPA de regions subtelomèriques realitzada en 82 individus ha identificat CNVp en 3 dels casos. Els posteriors estudis per CMA han identificat CNVp o VOUSpp intersticials en 17 dels individus amb resultat negatiu per MLPA.

Per calcular l'especificitat i la sensibilitat diagnòstica definim:

- Individus amb CNVp/VOUSpp:
 - Vertaders positius (VP): CNVp/VOUSpp identificades amb MLPA.
 - Falsos negatius (FN): CNVp/VOUSpp no identificades amb MLPA.
- Individus sense CNVp/VOUSpp:
 - Falsos positius (FP): CNVp/VOUSpp no confirmades.
 - Vertaders negatius (VN): sense CNVp/VOUSpp.

Especificitat = $VN/(VN+FP)$; Sensibilitat = $VP/(VP+FN)$

RESULTATS

L'especificitat diagnòstica mitjançant MLPA és del 100% i la sensibilitat diagnòstica és del 20%(Taula 3.3).

Taula 3.3: Taula pel càlcul de la sensibilitat i especificitat diagnòstica de la tècnica MLPA

MLPA	Casos amb CNVp o VOUSpp	Casos sense CNVp o VOUSpp	Total
Positiu	3	0	3
Negatiu	17	62	79
Total	20	62	82

aCGH

L'anàlisi mitjançant CMA s'ha realitzat en dues tandes. En la primera tanda, s'analitzen 41 pacients tenint en compte els següents criteris tècnics d'acceptació dels resultats dels *arrays*:

- Valors de qualitat dins els rangs d'excel·lent ($DLRS < 0,20$) i correcte ($0,20 < DLRS < 0,30$).
- Es considera que una CNV és vertadera quan s'inclouen quatre o més sondes consecutives amb una \log_2 *ratio* mínima de $\pm 0,25$.

S'han identificat un total de 85 CNVs rares, 63 de les quals han estat analitzades mitjançant una tècnica molecular alternativa per la seva confirmació: 53 s'han analitzat amb MLPA no comercial, quatre amb MLPA comercial, una amb FISH no comercial i cinc CNVs identificades en un mateix pacient s'han analitzat amb un segon CMA. Els estudis de confirmació han validat el 88,8% de les CNVs identificades (56/63). Les set CNVs no confirmades corresponen a cinc *arrays* diferents (tres falsos positius són producte d'un mateix *array*). Els falsos positius es caracteritzen per:

- Localitzar-se en regions altament repetitives i riques en variants estructurals, quatre de les quals no inclouen gens ni elements reguladors coneguts.
- Presentar valors de qualitat en el rang correcte ($DLRS: 0,2-0,30$) en dos *arrays* i valor al límit alt del rang excel·lent (0,189) en un *array*.
- Incloure només quatre sondes consecutives amb valors de \log_2 *ratio* mínima de $\pm 0,25$ en dues de les CNVs no confirmades.

Aquesta anàlisi ha comportat redefinir els paràmetres de qualitat per l'acceptació dels resultats dels *arrays* :

- Valors de qualitat (DLRS) <0,18.
- Es considera que una CNV és vertadera quan s'inclouen cinc o més sondes consecutives amb una \log_2 *ratio* mínima de $\pm 0,25$.

En la segona tanda, s'han analitzat 45 pacients obtenint un valor promig de DLRS de 0,15 (0,126-0,21), tres dels quals presentaven anomalies observades per cariotip amb bandes G. Es repeteix el CMA en quatre casos amb DLRS>0,18 obtenint valors òptims (<0,18) per la seva acceptació. L'anàlisi dels resultats identifica 138 CNVs rares, de les quals 27 s'han analitzat mitjançant una segona tècnica (seleccionant aquelles CNVs classificades com CNVp o VOUSpp i algunes CNVs amb significació clínica incerta): 15 s'han analitzat amb MLPA no comercial, quatre amb MLPA comercial, set amb FISH no comercial i una amb cariotip. Les 27 CNVs han estat confirmades. A més a més, el CMA ha detectat les quatre anomalies identificades pel cariotip convencional en tres individus.

La tècnica de CMA realitzada en dues tandes ha identificat un total de 223 CNVs (annex 2), 94 de les quals han estat confirmades mitjançant una tècnica alternativa. S'han identificat set falsos positius (Taula 3.4).

Taula 3.4: Confirmació de variants en nombre de còpies identificades mitjançant cariotip molecular

Tècnica	Nº CNVs analitzats			Nº CNVs confirmats	Falsos positius
	1ª tanda	2ª tanda	TOTAL		
Cariotip	0	5*	5	5	0
MLPA comercial	4	4	8	8	0
MLPA amb sondes no comercials	53	15	68	62	6
FISH amb sondes no comercials	1	7	8	7	1
CMA	5	0	5	5	0
Total	63	31	94	87	7

(*) Quatre CNVs havien estat identificades amb el cariotip amb bandes G.

3.2 . Tècniques de confirmació de les variants en nombre de còpies

Per la confirmació de les CNVs es van posar a punts les tècniques de MLPA i FISH amb sondes no comercials.

Amb els suport del *softwareonline Proseek* (http://davinci.crg.es/estivill_lab/mlpa/) pel disseny adequat de les sondes i seguint les recomanacions de *MRC-Holland*, es van dissenyar 68 sondes (Taula 3.4). Per cada panell utilitzat, es va incloure una mostra control positiva per determinar la qualitat dels resultats. Del total de 68 sondes utilitzades, el valor del control positiu va ser incorrecte en tres d'elles, pel que van ser redissenyades.

Per la confirmació de CNVs mitjançant FISH, cada sonda problema s'ha preparat juntament amb una sonda control. Es van confirmar set de les vuit CNVs analitzades mitjançant aquesta tècnica (taula 3.4), sense identificar cap reorganització (translocació desequilibrada o inserció). La CNV que no va ser confirmada es va analitzar amb una tercera tècnica (MLPA no comercial) que va mostrar un resultat concordant amb la tècnica de FISH, confirmant que es tractava d'un artefacte del CMA.

3.3 . Anomalies genètiques identificades

El 38% dels individus adults amb diagnòstic dual presenta una alteració genètica associada al fenotip (Taula 3.5). S'han identificat canvis de dosi en 31 individus (vuit dels quals corresponen a síndromes clínicament reconegudes), una translocació equilibrada en un individu, una mutació puntual en un individu i una mutació dinàmica (expansió del triplet CGG del gen FMR1) en cinc individus (Figura 3.2).

Taula 3.5: Alteracions genètiques identificades en la cohort d'adults amb diagnòstic dual

Alteració	Id Pacient
Cromosòmiques	
Translocació equilibrada t(6;9)(p21;q13)	96
del9q31q32	90
dupXp11.4p21.3	71
Cromosoma X derivatiu d'una inversió: delXp11.2p22.33 i dupXq25q28	10 ⁽¹⁾
Síndromes clínicament reconegudes	
del7q11.23 (SW)	5
del15q11q13 (SPW)	7, 31
del17p11.2 (SSM)	62
Mutació <i>RAI1</i> (SSM)	46
del22q11.2 (SVCF)	1, 2, 3, 4
SXF	6, 51 ⁽²⁾ , 52 ⁽²⁾ , 53 ⁽²⁾ , 118
CNVs submicroscòpiques	
del2p16.3 (NRXN1)	55, 94
dup3q29	34
del7q31	32, 151
del8p23.1	85
del8q21.13	66
dup9p24.2p24.1	122 ⁽²⁾ , 123 ⁽²⁾
del10q21.3	82
Reorganització subtelomèrica deleció 10q26.12q26.3 i duplicació 15q26.3	26 ⁽¹⁾
del12p12.1	63
dup15q11q13	98
del15q13.2q13.3	14
dup15q14q15.1	59 ⁽²⁾ , 60 ⁽²⁾
del15q26.2	92
del16p11.2p12	9
dup17q24.1q24.2	79
del22q13.33	18

(1) Individu amb dues CNVs; (2) Germans amb la mateixa alteració.

RESULTATS

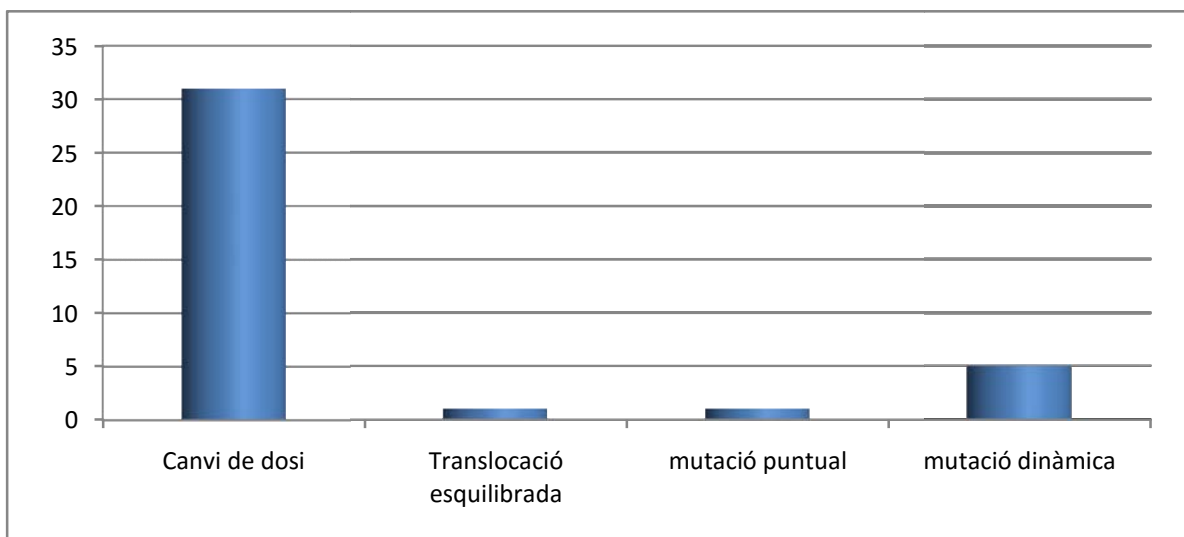


Figura 3.2: Freqüència de les diferents alteracions genètiques identificades

Els resultats obtinguts s'han agrupat en tres categories:

- Síndromes clínicament reconegudes: individus amb sospita clínica d'una síndrome específica confirmada (pacients 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 31, 46, 51, 52, 53, 62, 118 Taula 3.5).
- Translocació cromosòmica equilibrada: alteració cromosòmica visualitzada pel cariotip en què l'array ha posat de manifest que no hi ha un canvi de dosi (pacient 96 Taula 3.5).
- CNVs: s'inclouen tots els individus amb alteracions amb canvi de dosi a excepció d'aquells que presenten una síndrome clínicament reconeguda (pacients 9, 10, 14, 18, 26, 32, 34, 55, 59, 60, 63, 66, 71, 79, 82, 85, 90, 92, 94, 98, 122, 123, 151 Taula 3.5).

3.3.1. Síndromes específiques clínicament conegudes

L'anàlisi del triplet CGG de la regió 5' del gen *FMR1* ha permès identificar una mutació completa en cinc individus (6, 51, 52, 53 i 118), corresponent a la SXF, tres dels quals són germans (51, 52 i 53). La sospita clínica d'una síndrome coneguda ha estat confirmada en nou individus, identificant-ne quatre (1, 2, 3 i 4) amb SVCF per deleció 22q11, dos (7 i 31) amb SPW per deleció 15q11q13, un (46) amb SSM per mutació puntual del gen *RAI1* (c.367dupG, NM_030665.3) que provoca un codó stop, un (62) amb SSM per deleció 17p11.2 i un (5) amb SW per deleció 7q11.23. En total, 14 individus (14% de la cohort) presenten síndromes clínicament reconegudes (Taula 3.6), vuit de les quals estan causades per CNVs.

Taula 3.6: Pacients amb síndromes clínicament reconegudes

Id	Sd	Anomalia	Sexe	Edat	DI	Trastorn psiquiàtric	Trastorn de conducta	Història familiar
1	SVCF ²	del22q11.2	H	19	L	Fòbia social	-	-
2	SVCF ²	del22q11.2	H	34	L	SQZ	-	Àvia materna amb demència
3	SVCF ²	del22q11.2	D	24	L	Trastorn esquizoefectiu depressiu	Agressivitat verbal i física	Mare SVCF + trastorn psicòtic + Parkinson. Família materna antecedents d'epilèpsia
4	SVCF ²	del22q11.2	D	46	L	SQZ Trastorn delirant	-	Filla SVCF + trastorn psicòtic
5	SW ²	del7q11.23	D	50	M	Trastorn bipolar	-	-
6	SXF	CGG>200	H	35	M	TDAH	Agressivitat verbal i física, conducta sexual inapropiada i demandant	Mare QI límit Pare SQZ
7	SPW ²	del15q11q13 <i>denovo</i>	H	40	L	SQZ	-	-
31	SPW ²	del15q11q13 <i>denovo</i>	D	27	M	Episodi depressiu greu sense símptomes psicòtics Trastorn explosiu intermitent	Agressivitat física i conducta autoagressiva	-
46	SSM	c.367dupG <i>RAI1</i> (NM_030665.3)	D	29	L	Trastorn explosiu intermitent	Agressivitat verbal i física, conducta autoagressiva i oposicionista	Pare trastorn dependència alcohol Germana seguiment psicològic
51 ¹	SXF	CGG>200	H	45	L	TDAH	-	Cosí SXF (DI lleu + TEA)
52 ¹	SXF	CGG>200	H	39	M	Autisme infantil	-	Àvia materna amb possible trastorn salut mental
53 ¹	SXF	CGG>200	H	20	M	TDAH	Agressivitat verbal i física, conducta demandant i errant	
62	SSM ²	del17p11.2	H	26	M	Trastorn explosiu intermitent	Agressivitat verbal i física, conducta autoagressiva i demandant	Oncle matern SQZ Oncle patern abús alcohol
118	SXF	CGG>200	H	50	M	Autisme infantil Trastorn hiper-cinètic disocial	Agressivitat verbal i física, conducta destructiva, autoagressiva, oposicionista, demandant, entre altres problemes de conducta	-

(Id) Identificador pacient; (Sd) Síndrome; (DI) Grau de discapacitat intel·lectual; (SXF) Síndrome X Fràgil, (SVCF) Síndrome Velocardiofacial; (SPW) Síndrome Prader Willi; (SSM) Síndrome Smith Magenis; (SW) Síndrome de Williams; (CGG>200) Expansió de més 200 repeticions del triplet de nucleòtids CGG del gen *FMR1* provocant la mutació completa; (Del) Deleció; (H) Home; (D) Dona; (L) Lleu; (M) Moderada; (TDAH) Trastorn de dèficit d'atenció i hiperactivitat; (SQZ) Esquizofrènia; (QI) Quocient intel·lectual; (TEA) Trastorn d'espectre autista; (1) Germans; (2) Síndrome causada per CNV.

3.3.2. Translocació cromosòmica equilibrada

El cariotip amb bandes G ha identificat una translocació recíproca *de novo* aparentment equilibrada entre el braç curt del cromosoma 6 i el braç llarg del cromosoma 9 (Figura 3.3). L'estudi mitjançant CMA ha confirmat que es tracta d'una translocació equilibrada i no s'han identificat CNVs de rellevància. La pacient presenta una DI lleu, trastorns de l'humor (afectius) persistents i una dismorfologia caracteritzada per una cara asimètrica, macrostòmia, mandíbula prominent i base nasal ampla.

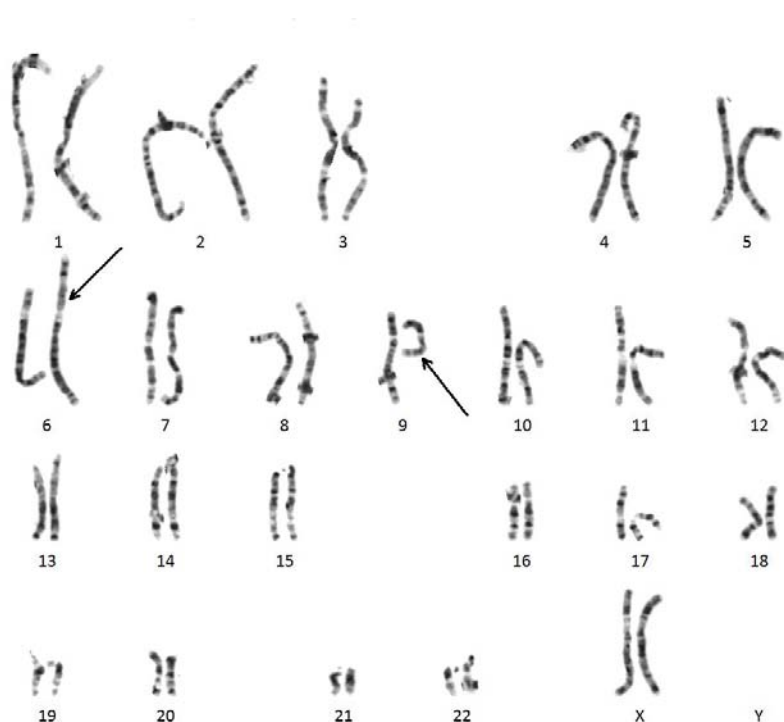


Figura 3.3: Cariotip amb bandes G de la translocació equilibrada t(6;9)(p27;q13)

Les fletxes indiquen els cromosomes 6 i 9 reorganitzats.

3.3.3. Variants en nombre de còpies

L'estudi de CMA s'ha realitzat a tots els pacients, a excepció dels 14 casos amb síndromes clínicament reconegudes. En els casos que presentaven alteracions en el cariotip i en el MLPA subtelomèric, s'ha aplicat el CMA per determinar la longitud de les CNVs, els punts de trencament i detectar la presència d'altres CNVs.

El CMA aplicat a 86 individus ha identificat un total de 1.650 CNVs amb una mitjana de 19,2 CNVs/individu. El 86,5% (1.427) corresponen a CNVs polimòrfiques, 921 delecions i 506 duplicacions, amb una mitjana de 16,5 CNVs polimòrfiques/pacient. El 13,5% (223) restant correspon a CNVs rares, set de les quals han resultat ser artefactes de la tècnica. En total s'han identificat 216 CNVs rares en 81 individus (cinc pacients no presenten CNVs rares), 104 delecions (48,1%) i 112 duplicacions (51,9%), amb una mitjana de 2,5 CNVs rares/pacient. Segons els criteris descrits a material i mètodes, es classifiquen en quatre grups: 13 CNVp, 12 VOUSpp, 138 VOUSpb i 53 CNVb (Figura 3.4i Taula 3.7).

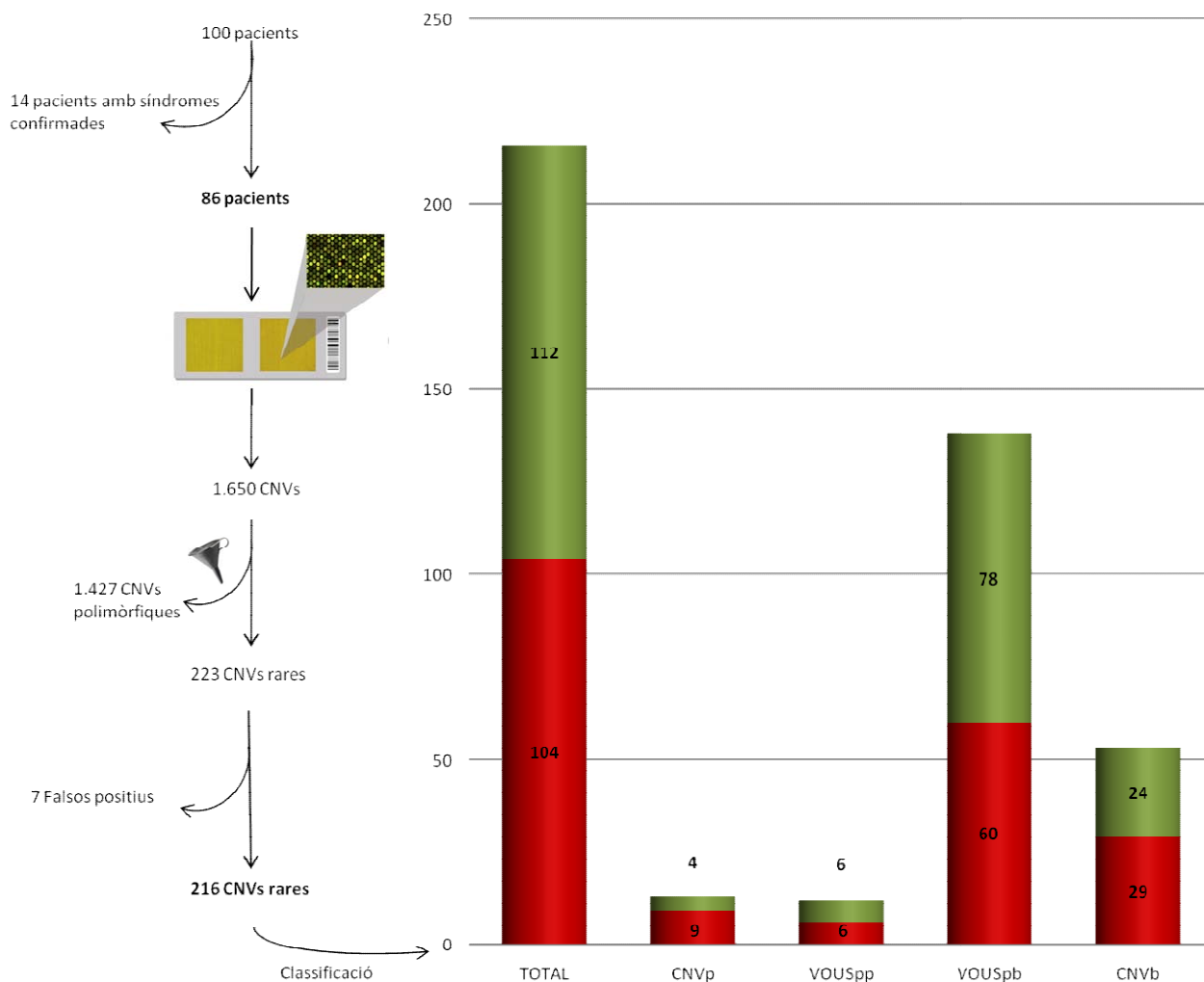


Figura 3.4: Representació de l'anàlisi mitjançant CMA i de la classificació de CNVs rares

(CNVp) Variant en nombre de còpies patològica; (VOUSpp) Variant de significació clínica incerta probablement patològica; (VOUSpb) Variant de significació clínica incerta probablement benigne; (CNVb) Variant en nombre de còpies benigne; (Vermell) deletions; (Verd) duplicacions.

Taula 3.7: CNVs identificades en els 86 individus analitzats mitjançant CMA

	CNVp	VOUSpp	VOUSpb	CNVb
Nº CNVs	13	12	138	53
Longitud mitjana (Kb)	10.031,650	717,724	213,042	131,054
Rang longitud	28,101-51.008,178	24,496-2.738,947	9,747-3.706,574	22,752-616,227

(CNVp) Variant en nombre de còpies patològica; (VOUSpp) variants de significació clínica incerta probablement patològiques; (VOUSpb) Variants de significació clínica incerta probablement benignes; (CNVb) Variant en nombre de còpies benigne.

RESULTATS

El grup de CNVp presenta una longitud mitjana d'aproximadament 10Mb, on el 76,9% (10/13) presenta una longitud superior a 1Mb, i amb una proporció 2,25:1 (9:4) de delecions respecte duplicacions. LesVOUSpp presenten una longitud mitjana de 717,7Kb, amb una longitud inferior a 500Kb en el 50% (6/12), i una proporció 1:1 (6:6) de delecions respecte duplicacions. Les VOUSpb i CNVb tenen una longitud mitjana de 213pb i 131pb respectivament, amb el 93% (129/138) de les VOUSpb i el 96% (51/53) de les CNVb amb una longitud inferior a 500Kb (sent inferiors a 100Kb en el 65% de les VOUSpb i el 58% de les CNVb), i una proporció de delecions respecte duplicacions de 0,8:1 (60:78) i 1,2:1 (29:24) respectivament. Considerant que les VOUSpb i les CNVb no contribueixen en el fenotip, s'han unit en un únic grup anomenat CNVs no patogèniques (Figura 3.5).

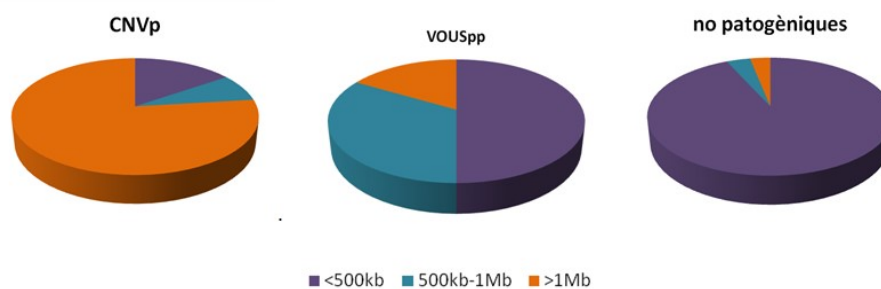


Figura 3.5: Representació de la longitud de les CNVs en les tres categories

(CNVp) Variants en nombre de còpies patogèniques; (VOUSpp) Variants de significació clínica incerta proablement patogèniques; (no patogèniques) Inclou les VOUS probablement benignes i les CNVs benignes.

Per identificar una possible diferència en la longitud de les CNVs entre els grups de CNVp, VOUSpp i no patogèniques, al no presentar una distribució normal s'ha utilitzat el test Kruskal-Wallis i una comparació per parells mitjançant el test Mann-Whitney. Els resultats indiquen una diferència estadísticament significativa en la longitud de les CNVs entre els tres grups ($p < 0,001$), amb una longitud significativament superior en el grup de CNVp respecte als altres dos grups ($p < 0,01$) i una tendència a la significació en el grup VOUSpp respecte al grup no patogènic ($p = 0,018$). La diferència en la longitud de les delecions respecte les duplicacions no és estadísticament significativa.

3.3.3.1. Variants en nombre de còpies patogèniques

Les 13 CNVp s'han considerat causants del fenotip en 11 individus (Taula 3.8), dos dels quals presenten dues CNVp (pacients 10 i 26), i tots presenten altres CNVs rares no patogèniques. S'ha realitzat l'estudi dels progenitors per determinar l'herència de 12 de les 13 CNVp: vuit *de novo*, dues heretades i dues derivende la mateixa inversió materna (Figura 3.6).

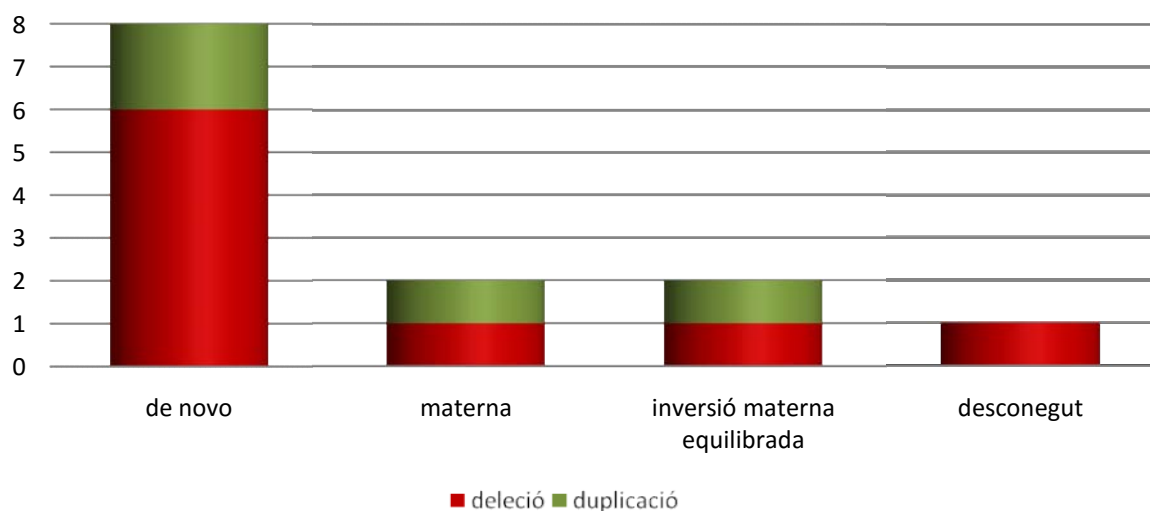


Figura 3.6: Herència de les variants en nombre de còpies patogèniques

Els 11 individus amb CNVp s'agrupen en cinc categories:

- **Alteracions cromosòmiques:** tres pacients amb alteracions identificades mitjançant cariotip convencional.
- **CNVs recurrents:** tres pacients amb alteracions descrites com a síndromes recurrents.
- **CNV a la mateixa regió cromosòmica en individus no emparentats:** dos pacients no emparentats presenten una CNVp a la mateixa regió.
- Múltiples CNVs en un únic individu: un individu amb dues CNVp.
- **Altres CNVp:** dos pacients amb deleccions responsables de la clínica.

Taula 3.8: Fenotip cognitiu i psiquiàtric i genotip dels individus amb variants en nombre de còpiess classificades com a patogèniques

Id	CNVp (hg19)	Longitud (Kb)	Herència	Nº Gens RefSeq	DI	Trastorn psiquiàtric	Trastorn de conducta	Dism.	HF	Altres CNVs (hg19)
55	2p16.3(50660882-51078593)x1	417	De novo	1	L	TB	-	+	+	2q21.3(135832699-135865414)x1 ¹ 5q12.1(059715912-059771517)x3 ¹
94	2p16.3(50510602-51137271)x1	626	Materna	1	L	Trastorn delirant persistent	Conducta destructiva i d'agressivitat física i verbal	+	+	15q22.31(065329938-065362884)x1 ¹
90	9q31.1q32(107056010-115867141)x1	8.811	NA	67	M	Fòbies específiques (aïllades) Trastorn d'adaptació	Conducta d'agressivitat verbal, oposicionista, demandant i altres problemes de conducta	+	+	8q11.21(48166013-48224194)x3 ¹
26	10q26.12q26.3(122259702-135434178) x1	13.174	De novo	113	M	TOC Trastorn de conducta hipercinètic	Conducta d'agressivitat física	+	-	1q42.2(231715133-231813980)x3 ¹ 2p22.3(32626512-33332063)x3 ¹ 2q31.1(169907405-169934898)x3 ¹ 3q13.32(118731995-118817506)x3 ¹ 4q28.3(134921321-135180169)x1 ¹ 6p21.32(32450699-32637117)x1 ¹
	15q26.3(99168589-10248088)x3	3.312	De novo	32						
63	12p12.1(23432294-26233996)x1	2.801	De novo	14	L	-	Criteria diagnòstic general per problemes del comportament	+	-	16q22.3(72612701-72667608)x1 ²
98	15q11q13(23699701-29006852)x3	5.306	De novo	126	L	Fòbies específiques (aïllades)	Conducta d'agressivitat física	+	-	3q13.33(120458780-120477254)x1 ¹ 12q24.12q24.13(112184121-112315182)x3 ¹ 17p11.2(19143173-19235773)x3 ¹
14	15q13.2q13.3(30943703-32439084)x1	1.495	De novo	10	L	Trastorn generalitzat d'ansietat	-	+	+	8p23.2(2349676-2611645)x3 ² 17q25.3(75922616-76006562)x3 ¹
9	16p12.3p11.2(18901309-29182196)x1	10.280	De novo	131	M	Trastorn psicòtic polimorf agut sense símptomes de SQZ	-	+	-	NP
18	22q13.33(51123291-51224402)x1	101	De novo	4	M	Autisme infantil	Conducta d'agressivitat física, destructiva, oposicionista i altres problemes de conducta	+	-	1p33(50251279-50398578)x1 ¹ 15q26.3(100241987-100455105)x3 ¹ 17q25.1(73928952-73955405)x3 ¹
71	Xp21.3p11.4(25816432-38085678)x3	12.244	Materna	38	L	Altres trastorns de personalitat i comportament orgànics degut a malaltia mental, dany i disfunció	Conducta d'agressivitat verbal i física, oposicionista i altres problemes de conducta	+	+	2p13.3(071645495-071791549)x3 ¹ 8p12(035339203-035395724)x3 ¹
10	Xp11.2p22.33(169901-51101339)x3	51.008	Inversió materna	360	M	-	Conducta d'agressivitat física i oposicionista	+	+	1p21.1(105477393-105542371)x1 ² 2p16.3(50894904-50923005)x1 ¹ 12q12(40610402-40786005)x3 ¹ 14q31.3(85851168-85897804)x1 ¹ 16p13.12(12791776-12807266)x1 ¹ 17q24.3(70815557-70825304)x1 ¹
	Xq25q28(124642297-155227312)x1	30.410	Inversió materna	335						

(Id) Identificador pacient; (CNVp) Variant en nombre de còpies patogènica; (Gens RefSeq) Gens humans coneguts codificants i no codificants de proteïnes segons la col·lecció de seqüències de referència NCBI; (DI) Grau de discapacitat intel·lectual; (Dism.) Dismòrfia; (HF) Història familiar; (NA) No analitzat; (L) Lleu; (M) Moderada; (TB) Trastorn bipolar; (TOC) Trastorn obsessiu-compulsiu; (SQZ) Esquizofrènia; (NP) No en presenta; (1) Variant de significació clínica incerta probablement benigne; (2) Variant en nombre de còpies benigne.

RESULTATS

Duplicació Xp21.3p11.4

La duplicació al braç curt del cromosoma X, 46,Y,dup(X)(p21.3p11.4) (Figura 3.8) identificada al pacient 71 (Taula 3.8) té una longitud de 12,2Mb segons determina el CMA. Entre els gens inclosos destaquen el *DMD*, associat a la Distròfia Muscular de Duchenne, i *IL1RAPL1*, associat a DI lligada al cromosoma X. El CMA ha identificat dues CNVs rares addicionals no patogèniques. L'estudi mitjançant cariotip convencional de la mare ha determinat que és portadora de la duplicació. El fenotip del pacient, baró de 27 anys, es caracteritza per una DI lleu, trastorn de la personalitat i comportament orgànic, problemes de conducta (entre ells agressivitat i conducta oposicionista) i dismòrfia (obesitat generalitzada, llavi inferior gruixut, malaoclusió dental, cara rodona i peus plans).

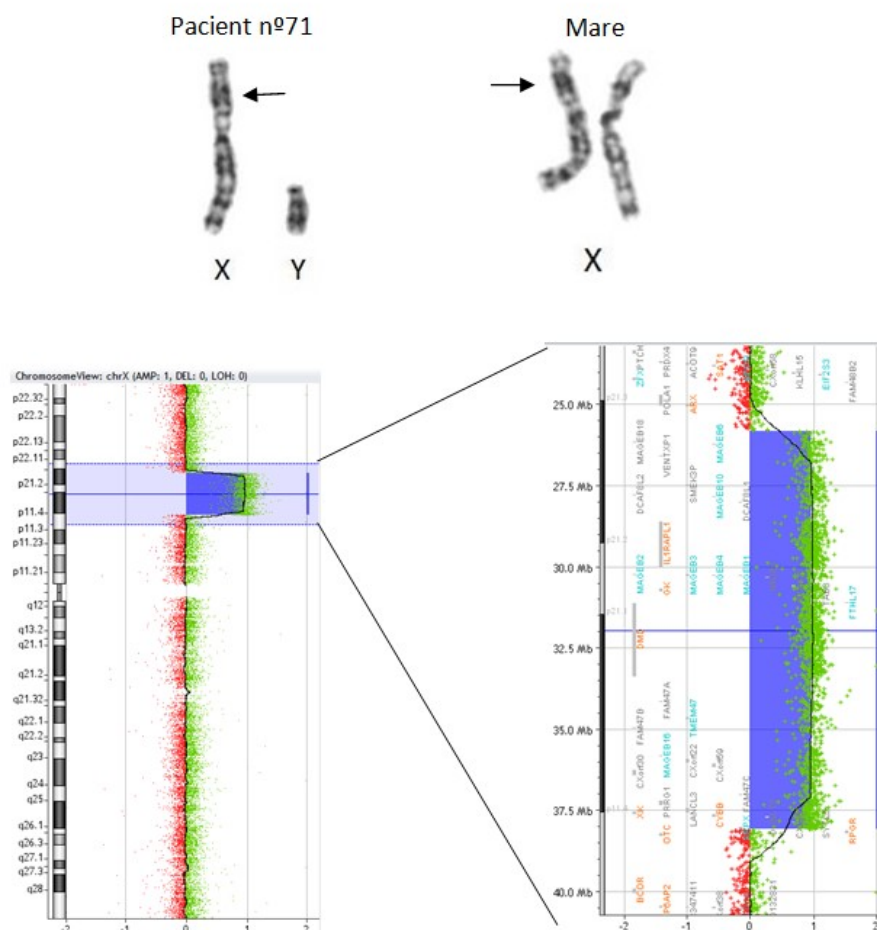


Figura 3.8: Duplicació Xp21.3p11.4

Part superior: Cariotip amb bandes G. (Fletxa) Cromosoma X amb duplicació. Part inferior: Imatge de CMA amb la duplicació..

Cromosoma X derivatiu amb duplicació del braç curt i deleció del braç llarg

El cromosoma X derivatiu identificat en la pacient 10 mitjançant cariotip amb bandes G prové d'una inversió materna, que resulta en una duplicació en el braç curt i una deleció en el braç llarg: 46,X,der(X)inv(X)(p11.2q25),dup(X)(p22.33p11.2),del(X)(q25q28) (Figura 3.9). El CMA ha determinat els punts de trencament i la longitud de la duplicació i la deleció de 51Mb i 30Mb respectivament (Taula 3.8). Addicionalment, s'han identificat sis CNVs rares considerades no patogèniques, entre elles una deleció 2p16.3 que inclou una regió intrònica del gen *NRXN1*. La pacient és una dona de 38 anys amb DI moderada, conducta agressiva i oposicionista i trets dismòrfics, incloent macrocefàlia, cara llarga, macrostòmia, paladar alt i estret, hipertròfia de genives, filtrum llarg, solc de Sidney, camptodactílicia, hipoplàsia de llavis majors, base nasal ampla i hemangioma. La mare és portadora d'una inversió pericèntrica: 46,X,inv(X)(p11.22q25). La història familiar indica que la pacient té tres familiars amb DI (IV.2, III.7 i III.8 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). L'estudi del cariotip realitzat a alguns familiars mostra la inversió pericèntrica en una germana i neboda sanes (II.2 i III.1 respectivament) i un cariotip normal en una neboda sana (III.2) i en un familiar afectat de DI (IV.2) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). L'estudi mitjançant CMA de la germana portadora de la inversió (II.2) amb un nét afectat de DI, identifica la deleció intrònica a 2p16.3, una deleció de 15Kb a 16p13.12 que altera l'estructura del gen *CPED1* i dues duplicacions al cromosoma X corresponents als punts de trencament de la inversió: duplicació Xp11.2 de 146Kb que altera la dosi del gen *NUDT10* i duplicació Xq25 que no altera la dosi de cap gen conegut. L'estudi de CMA del familiar afectat de DI i amb cariotip normal (IV.2) no ha identificat cap canvi de dosi.

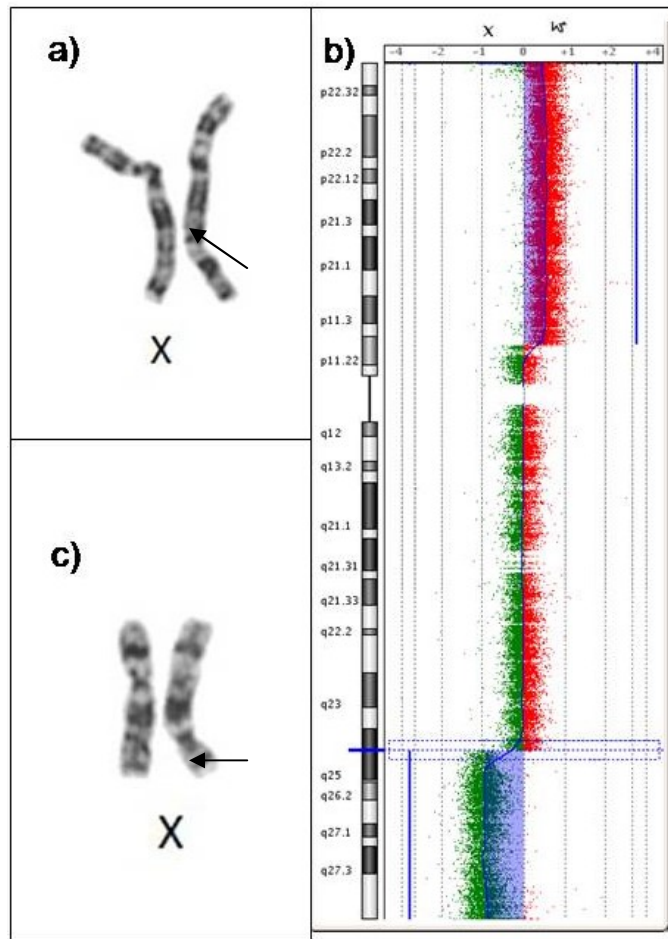


Figura 3.9: Cromosoma X derivatiu

(a) La fletxa senyala la deleció identificada amb bandes G; (b) CMA de la pacient 10 on s'observa la duplicació Xp i la deleció Xq. (c) Inversió pericèntrica identificada a la mare (fletxa).

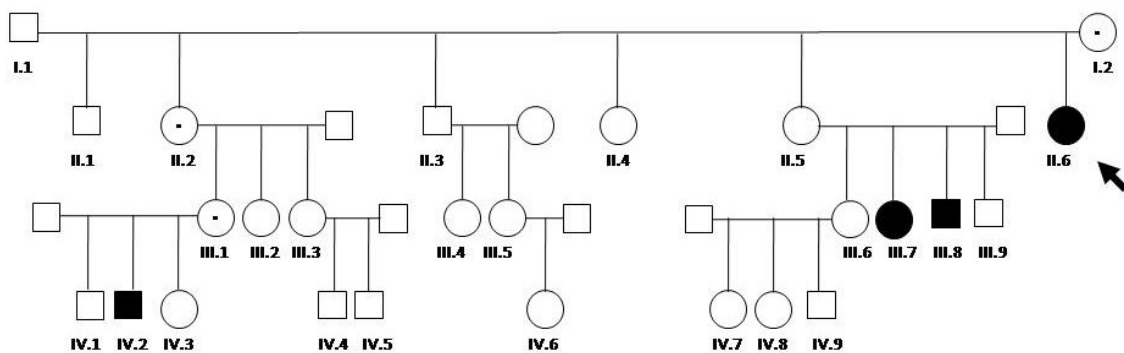


Figura 3.10: Arbre genealògic de la pacient amb duplicació Xp i deleció Xq

(Fletxa) Pacient 10 amb dupXp i delXq. (·) Portador de la inversió pericèntrica del cromosoma X.
(■/●) Discapacitat intel·lectual.

3.3.3.1.2 . Variants en nombre de còpies recurrents

Es presenten tres pacients amb CNVs recurrents: microduplicació 15q11q13, microdeleció 15q13.3 i microdeleció 22q13 (Taula 3.8).

Duplicació 15q11q13 d'origen matern

S'ha identificat una duplicació 15q11q13 (Figura 3.11) ambles sondes localitzades a la regió pericentromèrica del braç llarg del cromosoma 15 dels kits de MLPA P036 i P070, que ha estat confirmada mitjançant l'anàlisi de dosi de MS-MLPA i ha permès identificar els punts de trencament corresponents a BP2 i BP3 de la regió crítica PW/SA. L'estudi dels progenitors ha mostrat que no en són portadors. El CMA ha determinat una longitud de 5,3Mb incloent els gens *MRKN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNURF-SNRPN*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABRB3*, *OCA* i *HERC2*. L'estudi de microsatèl·lits del cromosoma 15 a pacient i progenitors (Figura 3.12) i el resultat del patró de metilació del MS-MLPA mostren l'origen matern de l'al·lel duplicat.

El pacient (98Taula 3.8), un baró de 18 anys, presenta DI moderada, TOC, trastorn de conducta hipercinètica i agressivitat. El fenotip dismòrfic inclou macrocefàlia, paladar alt i estret, orelles grans, dits de les mans llargs, estrabisme i escoliosi.

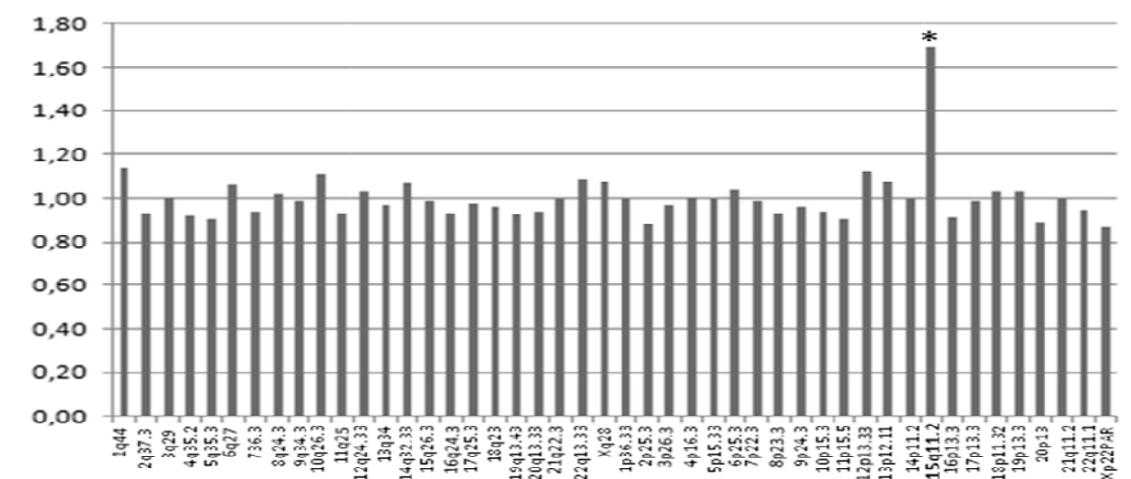


Figura 3.11: Representació gràfica del resultat de MLPA amb el kit P070 al pacient 98

(*) Duplicació 15q11q13.

RESULTATS

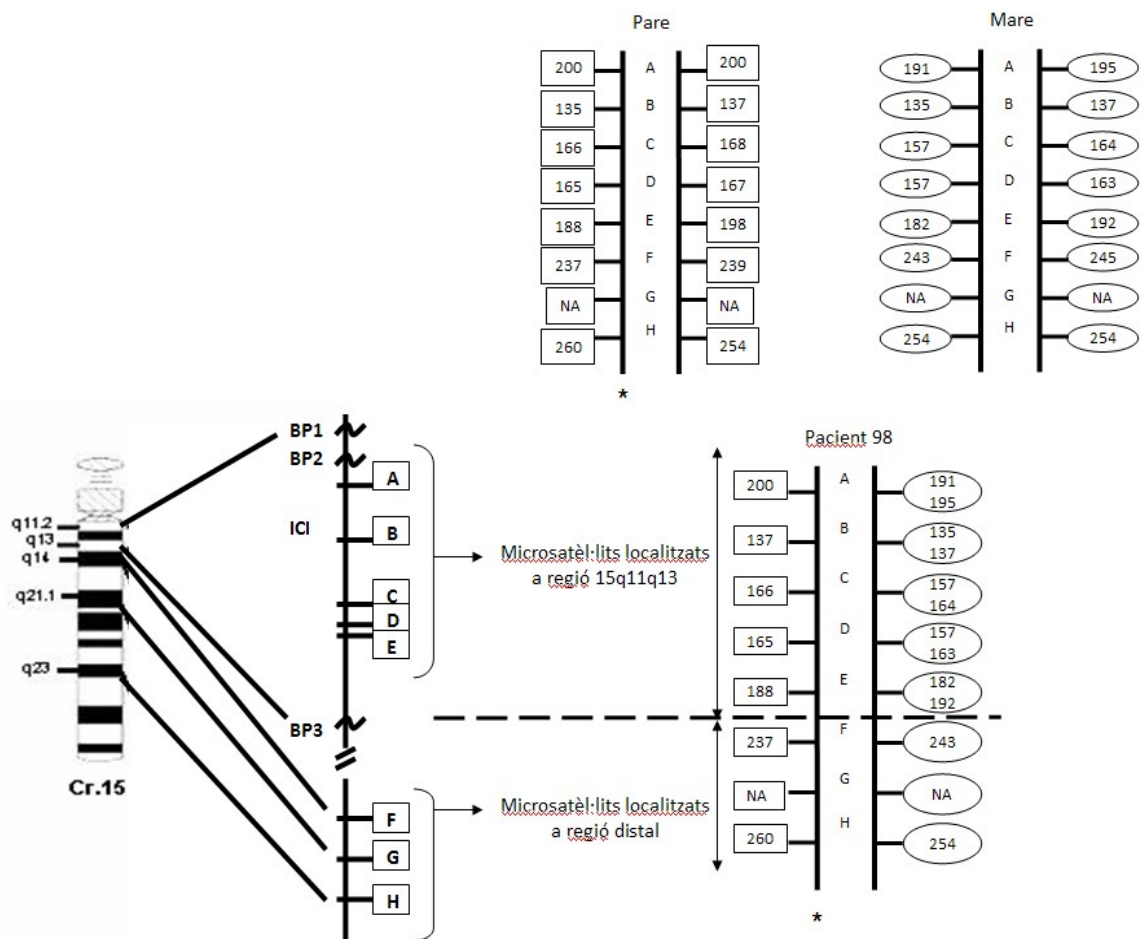


Figura 3.12: Representació gràfica de l'estudi de microsatèl·lits del cromosoma 15

S'analitzen cinc microsatèl·lits localitzats a la regió 15q11q13 (A:D15S11, B:D15S128, C:D15S113, D:D15S97, E:GABRB3) i tres microsatèl·lits a regió distal (F:D15S194, G:D15S123 i H:D15S131). El pacient presenta un al·lel provinent del pare (*) i un al·lel amb dues còpies dels microsatèl·lits de la regió 15q11q13 (A, B, C, D i E) provinents dels dos cromosomes 15 de la mare (&).

Deleció 15q13.3

El resultat de CMA ha identificat una microdeleció 15q13.2q13.3 de 1,5Mb (Figura 3.13) localitzada entre les duplicacions segmentàries BP4 i BP5 distals a la regió PW/SA. La deleció inclou els gens *TRPM1*, *KLF13*, *OTUD7A* i *LOC283710*, els pseudogens *LOC100288637* i *HERC2P10*, i l'extrem 5' del gen *CHRNA7* (NM_000746.5) provocant la pèrdua dels 4 primers exons que impedeix la traducció de la proteïna (Figura 3.14). El posterior anàlisi mitjançant MLPA amb el kit comercial P343 que

inclou tres sondes específiques per la regió alterada (*TRPM1*, *KLF13* i *CHRNA7*) ha determinat que els progenitors no són portadors de la deleció i per tant és una deleció *de novo*.

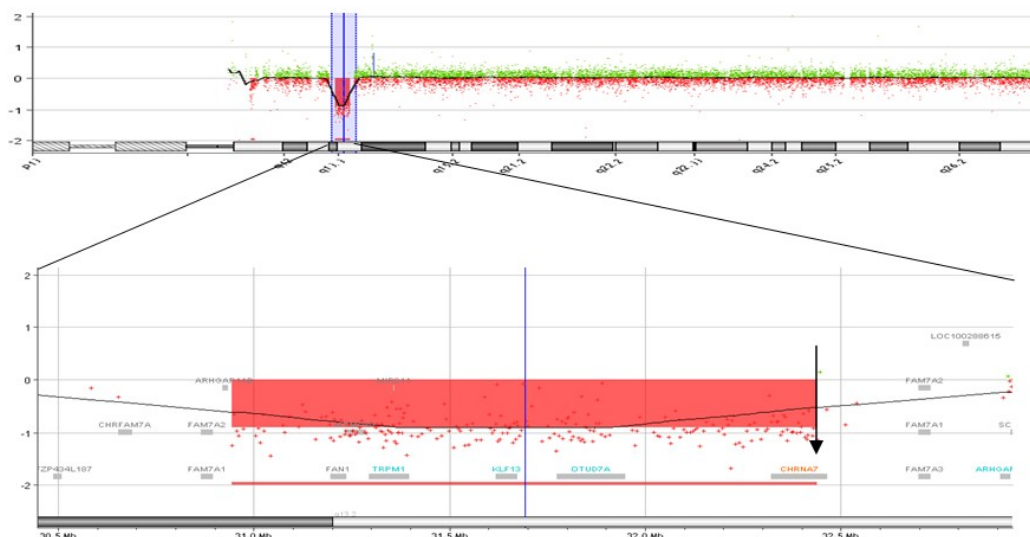


Figura 3.13: Imatge de cariotip molecular de la deleció 15q13.2q13.3

A la part inferior s’observa el contingut genètic de la CNV. Es produeix una disrupció del gen *CHRNA7* (fletxa).

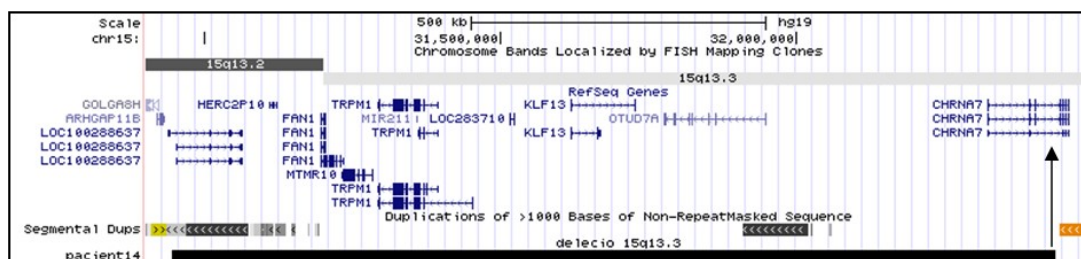


Figura 3.14: Representació de UCSC de la regió 15q13.2q13.3

S’observen els gens RefSeq inclosos a la deleció (línia negra de la part inferior) flanquejada per duplicacions segmentàries (Segmental Dups). El punt de trencament distal (fletxa) altera l’estructura del gen *CHRNA7*.

El pacient (14 Taula 3.8) és un baró de 27 anys que presenta DI lleu, trastorn generalitzat d’ansietat, irritabilitat, desordres del son, tremolors i inquietud. Altres trets identificats són la obesitat generalitzada, pèl corporal generalitzat, mala oclusió dental, paladar alt i estret, ginecomàstia i macroorquidisme. La història familiar indica una mare amb trastorn d’ansietat, pare amb consum d’alcohol, àvia materna amb QI límit i dos germans (un home i una dona) amb atacs epilèptics en edat pediàtrica. Els pares no són portadors però donat que no es pot descartar

RESULTATS

la presència de la deleció a la línia germinal es va analitzar la germana amb antecedents d'epilèpsia en edat infantil, descartant la presència de la deleció i d'altres CNVs.

Microdeleció 22q13

S'ha identificat una microdeleció 22q13 mitjançant el kit de MLPA P036 (Figura 3.15) que posteriorment ha estat confirmada amb l'estudi de FISH i caracteritzada per CMA (Figura 3.16). La deleció s'estén des de l'intró 9 del gen *SHANK3* (NM_033517.1) fins al telòmer.

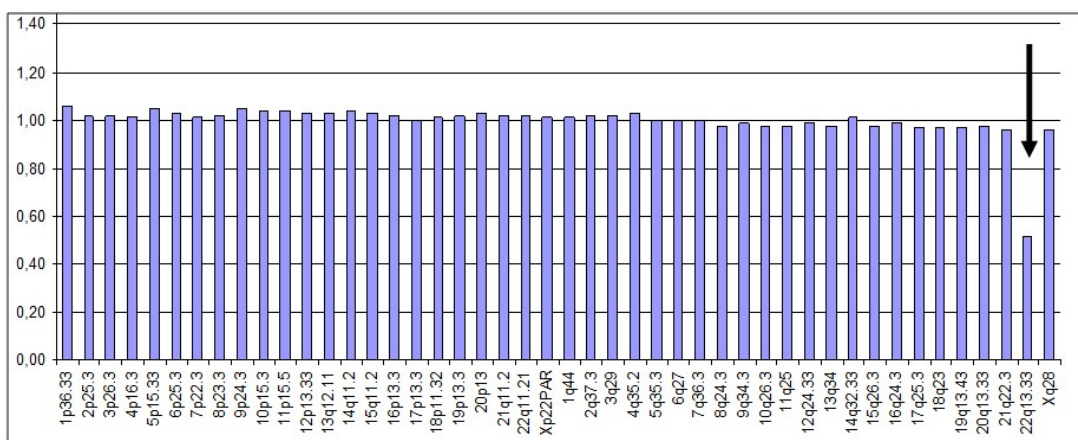


Figura 3.15: Representació gràfica del resultat deMLPAamb el kit P036
(Fletxa) Deleció 22q13.

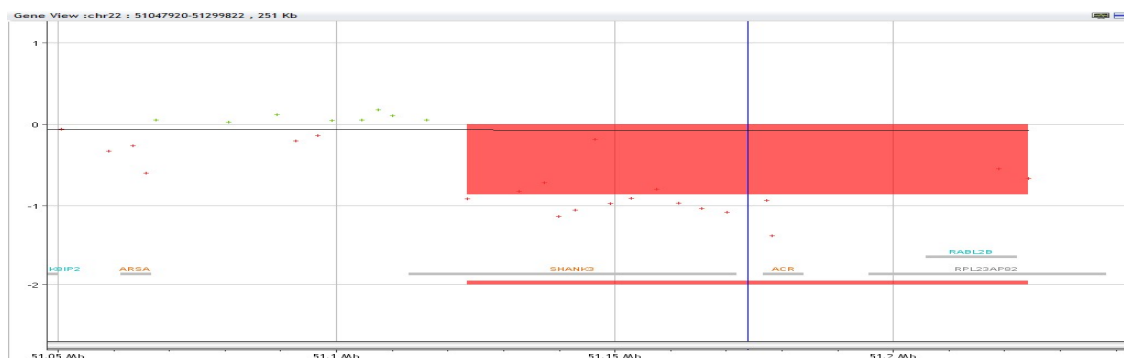


Figura 3.16: Imatge de CMA de la deleció 22q13

La caracterització de la deleció mitjançant CMA determina que inclou parcialment al gen *SHANK3*.

La pacient (18 Taula 3.8) és una dona de 25 anys amb un fenotip cognitiu i psiquiàtric que inclou DI moderada, autisme infantil, conducta d'agressivitat física, destructiva i oposicionista entre altres problemes de comportament. Presenta paladar alt i estret, plenitud periorbitària, fissures palpebrals obliquades cap avall, base nasal ampla, hipercifosis toràcica i taques cafè en llet.

3.3.3.1.3 . Variants en nombre de còpies a la mateixa regió cromosòmica en individus no emparentats

S'ha identificat una deleció 2p16.3 en dos individus no emparentats, totes dues afectant al gen de la *NRXN1*. S'ha realitzat l'estudi de segregació de la deleció 2p16.3 i una avaluació cognitiva dels familiars portadors dels dos adults de la cohort juntament amb un tercer cas pediàtric que presenta una deleció implicant la mateixa regió.

La pacient 55 (Taula 3.8 pàgina100i Taula 3.9) és una dona de 21 anys amb DI lleu, TB i una conducta caracteritzada per reaccions a la frustració inapropiades. L'avaluació del perfil cognitiu mostra una síndrome disexecutiva amb una conducta incontrolada, baixa tolerància a la frustració i dificultats en la integració de noves informacions, tant verbals com visuals. Presenta un fenotip dismòrfic caracteritzat per una cara llarga, implantació baixa de les orelles, hipotelorisme, ulls enfonsats, prominència maxilar, paladar alt i malposició dentària. Els resultats del CMA indiquen una deleció de 417Kb que inclou els exons 6-18 del gen alfa *NRXN1* (NM_001135656.1) (Figura 3.17). L'estudi dels progenitors mitjançant MLPA ha determinat una deleció *de novo* (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

El pacient 94 (Taula 3.8 pàgina100i Taula 3.9) és un baró de 20 anys amb DI lleu, trastorn psicòtic no especificat amb deliris hipocondríacs, autisme atípic, TOC i conducta violenta, destructiva i agressiva amb rebequeries explosives. El perfil neurocognitiu inclou concretisme i deteriorament sever de la funció executiva, principalment en relació a la memòria de treball, la dificultat per classificar la informació correctament i dèficit de raonament abstracte. El fenotip dismòrfic inclou cara llarga, ulls enfonsats, hipotelorisme, implantació baixa de les orelles, prominència maxilar i paladar alt. La deleció identificada mitjançant CMA té una longitud de 626Kb i inclou els exons 6-18 del transcrit alfa *NRXN1* (NM_001135656.1) i l'inici del transcrit beta *NRXN1* (NM_138735.2) (Figura 3.17). L'estudi dels progenitors mitjançant MLPA ha determinat una herència materna (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). L'avaluació cognitiva de la mare portadora

RESULTATS

ndica un QI límit (QI=69) amb un comportament caracteritzat per gelosia, dèficit en l'auto-control, fluctuacions en l'estat d'ànim i inestabilitat emocional, amb impulsivitat i ansietat. L'avaluació psicològica revela una baixa memòria de treball i un patró disexecutiu.

El tercer pacient és un nen d'11 anys amb DI lleu, trets autistes, hiperactivitat i conducta desafiant. El perfil neurocognitiu es caracteritza per trastorn del llenguatge, mala memòria de treball i atenció. Presenta una dismòrfia facial amb cara llarga, ulls enfonsats, prominència maxilar i filtrum llarg (Taula 3.9). S'ha identificat una deleció a 2p16.3 de 516Kb que inclou els exons 1-5 del gen *NRXN1* (NM_001135656.1) (Figura 3.17). L'estudi mitjançant MLPA dels progenitors ha determinat una herència materna. La mare, de 36 anys, és la quarta de cinc germans aparentment normals (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). L'avaluació neurocognitiva realitzada en la mare identifica un QI límit (QI=75) amb un deteriorament cognitiu i trastorn d'ansietat generalitzat, una síndrome disexecutiva caracteritzada per dificultats en la memòria de treball, en la commutació de l'atenció, en la flexibilitat mental i en la fluïdesa verbal. S'ha realitzat l'estudi mitjançant MLPA a familiars de segon i tercer grau, identificant dues tietes portadores de la deleció (II.1 i II.5). La tieta II.1 presenta un QI dins els rangs de la normalitat però amb una tendència a respondre de forma agressiva a petites provocacions. S'ha diagnosticat un trastorn histriònic de la personalitat amb poca flexibilitat mental i bloqueig cognitiu. La tieta II.5 ha tingut problemes escolars i presenta un QI baix (QI=86) i s'identifiquen nivells elevats d'ansietat i estrés, amb pors i pensaments perseverants de catàstrofe. Es diagnostica un trastorn generalitzat d'ansietat. Presenta problemes cognitius incloent dificultats en la memòria de treball, fluïdesa verbal i semàntica i d'organització. El fenotip cognitiu de les portadores juntament amb el del *probandus* es recullen a la Taula 3.9. Els oncles no portadors de la deleció (II.2 i II.3) presenten un nivell d'intel·ligència dins els rangs de la normalitat.

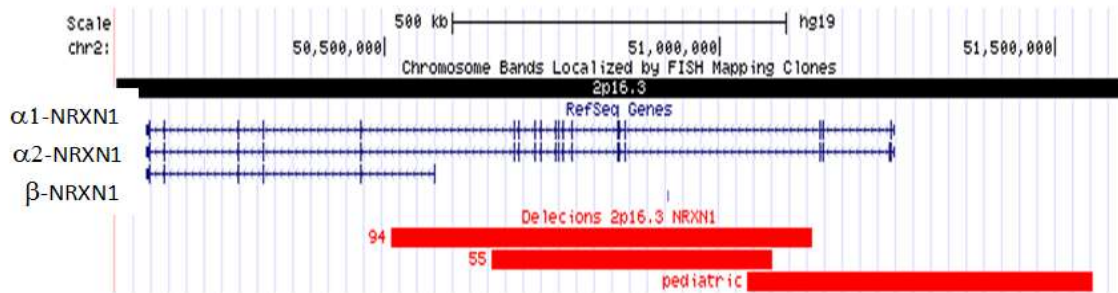


Figura 3.17: Representació de la localització molecular de les tres delecions 2q16.3

(Línies vermelles) Delecions 2p16.3; ($\alpha 1$ -NRXN1) Isoforma NM_001135656.1; ($\alpha 2$ -NRXN1) Isoforma NM_001135659.1; (β -NRXN1) Isoforma NM_138735.2.

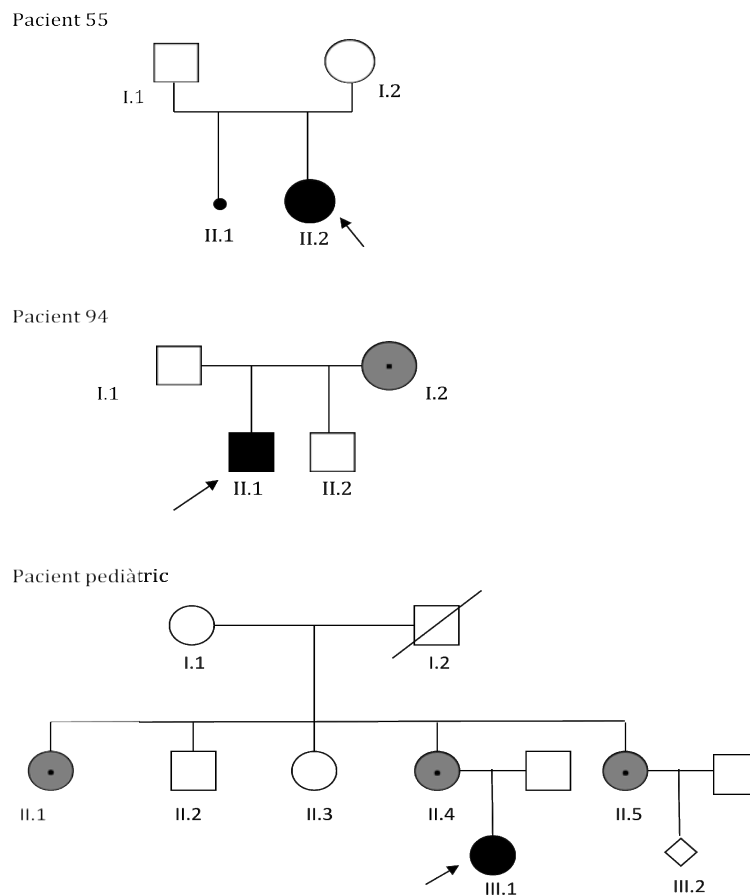


Figura 3.18: Arbres genealògics de les tres famílies amb delecició 2q16.3

La fletxa senyala als *probandus*. (·) Portador de la delecició; (■/●) Discapacitat intel·lectual; (□/○) Indivíduus aparentment sans amb problemes cognitius

Taula 3.9: Fenotip dels pacients i familiars portadors de la deleció 2p16.3

	Pacient 55 (II.2)	Pacient 94 (II.1)	Mare (I.2)	Pacient pediàtric (III.1)	Mare (II.4)	Tieta (II.1)	Tieta (II.5)
Grau de DI	Lleu	Lleu	QI límit	Lleu	QI límit	Normal	QI baix
Trastorn psiquiàtric	TB	Trastorn psicòtic, autisme atípic i TOC	TGA	Trets autistes	TGA	Trastorn histriònic de la personalitat	TGA
Trastorn conductual	+	+	+	+	-	+	+
Perfil cognitiu	SD	SD	SD	Trastorn de llenguatge, mala memòria de treball i atenció	SD	Poca flexibilitat mental i bloqueig cognitiu. SD	SD
Cara llarga	+	+	NA	+	NA	NA	NA
Implantació baixa orelles	+	+	NA	-	NA	NA	NA
Hipotelorisme	+	+	NA	-	NA	NA	NA
Ulls enfonsats	+	+	NA	+	NA	NA	NA
Prominència maxilar	+	+	NA	+	NA	NA	NA
Paladar alt	+	+	NA	-	NA	NA	NA
Malposició dentària	+	-	NA	-	NA	NA	NA
Filtrum llarg	-	-	NA	+	NA	NA	NA

(QI) Quocient intel·lectual; (TB) Trastorn bipolar; (TOC) Trastorn obsessiu-compulsiu; (TGA) Trastorn generalitzat d'ansietat; (SD) Síndrome disexecutiva; (NA) No avaluat.

3.3.3.1.4 . Múltiples variants en nombre de còpies en un únic individu

La tècnica de MLPA pel cribatge de regions subtelo mèriques ha identificat una deleció en el braç llarg del cromosoma 10 i una duplicació en el braç llarg del cromosoma 15 en un únic individu (26 Taula 3.8 pàgina 100), validades mitjançant FISH amb sondes comercials (Figura 3.19). S'observa una reorganització subtelo mèrica amb la duplicació de 15q translocada a regió telomèrica de 10q. L'estudi dels progenitors no ha identificat cap reorganització en els pares. El CMA ha permès caracteritzar els punts de trencament i la longitud de la deleció 10q26.12q26.3 (3Mb) i de la duplicació 15q26.3 (13Mb) i ha identificat sis CNVs rares addicionals. El pacient, un baró de 44 anys, presenta DI moderada, TOC, trastorn de conducta hipercinètic, conducta agressiva i fenotip dismòrfic amb orelles displàsiques, paladar alt i estret, estrabisme, espai intermamilar incrementat, cara llarga i base nasal ampla. No es coneixen antecedents familiars.

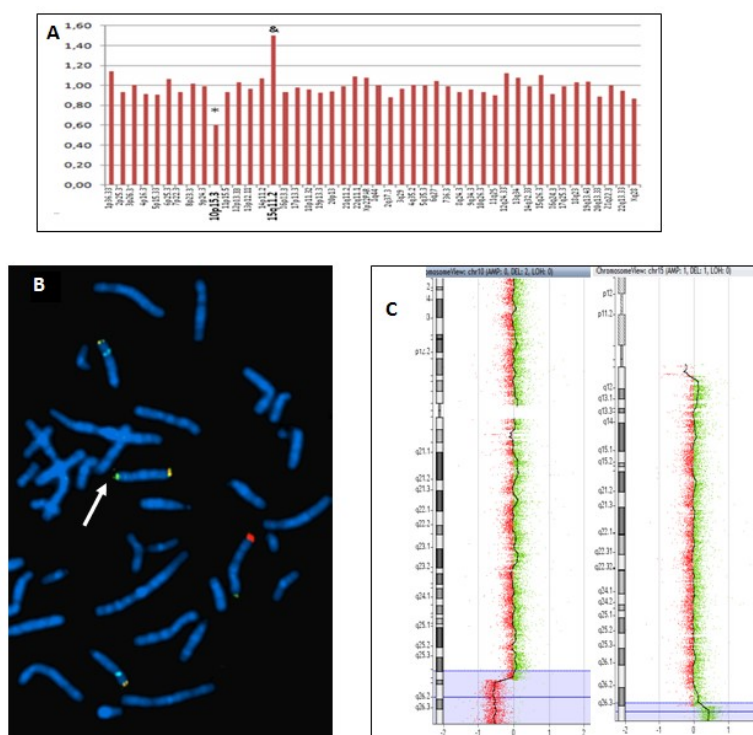


Figura 3.19: Reorganització subtelo mèrica identificada al pacient 26

A) Representació gràfica del resultat de MLPA amb el kit P036 que identifica una deleció 10q (*) i una duplicació 15q (&). B) La imatge de FISH permet identificar la reorganització subtelo mèrica. S'ha utilitzat la barreja de *ToteVision* que inclou: sonda específica pel braç curt del cromosoma 10 (verda), sonda específica pel braç llarg del cromosoma 10 (vermella), sonda específica pel braç llarg del cromosoma 15 (groga) i una sonda de seqüència única de la regió 15q22 (blava). La fletxa blanca senyala el cromosoma 10 amb deleció subtelo mèrica del braç llarg i amb material de la regió subtelo mèrica del cromosoma 15. C) Imatge de CMA de la deleció 10q (esquerra) i la duplicació 15q (dreta).

RESULTATS

3.3.3.1.5 Altres variants en nombre de còpies patològiques

Deleció 9q31.1q32

El CMA ha identificat una deleció 9q31.1q32 de 8,8Mb de longitud que ha estat confirmada mitjançant la re-avaluació a *posteriori* del cariotip amb bandes G (Figura 3.20). No s'ha pogut realitzar l'estudi dels progenitors per determinar l'herència de l'alteració. El pacient (90 Taula 3.8 pàgina 100) és un baró de 24 anys que presenta una DI moderada, fòbies específiques aïllades, trastorn d'adaptació i conductes d'agressivitat, oposicionista i demandant. L'avaluació dismorfològica identifica una cifosis dorsal, blefarofimosis, absència de plec distal interfalàngic bilateral, hipoplàsia de les orelles, pèl corporal generalitzat, braquicefàlia, cara llarga, mandíbula prominent, sinofrídia i fissures palpebrals oblíquies. En la història familiar consta un cosí amb depressió.

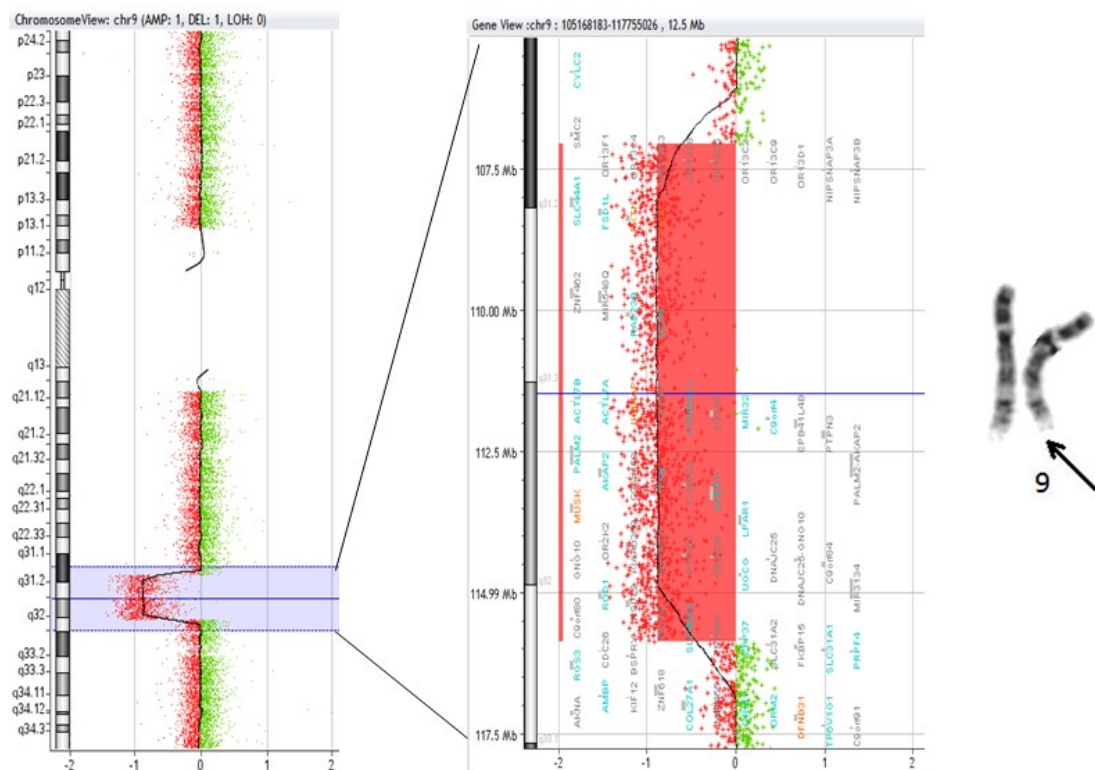


Figura 3.20: Deleció 9q31.1q32

CMA (esquerra) i bandes G (dreta) de la deleció 9q31.1q32 (fletxa) identificada al pacient 90.

3.3.3.2. Variants de significació clínica incerta probablement patogèniques

S'han identificat 12 CNVs que podrien ser la causa genètica del fenotip de 12 individus (Taula 3.10), sis delecions i sis duplicacions. L'estudi dels progenitors s'ha pogut realitzar en set casos, sent totes les CNVs heretades (Figura 3.22). A la Taula 3.11 es resumeixen els gens candidats inclosos a les CNVs classificades com a VOUSpp, l'efecte de la CNV, la funció de la proteïna codificada i les evidències existents a la literatura i bases de dades que han permès classificar-les en aquest grup.

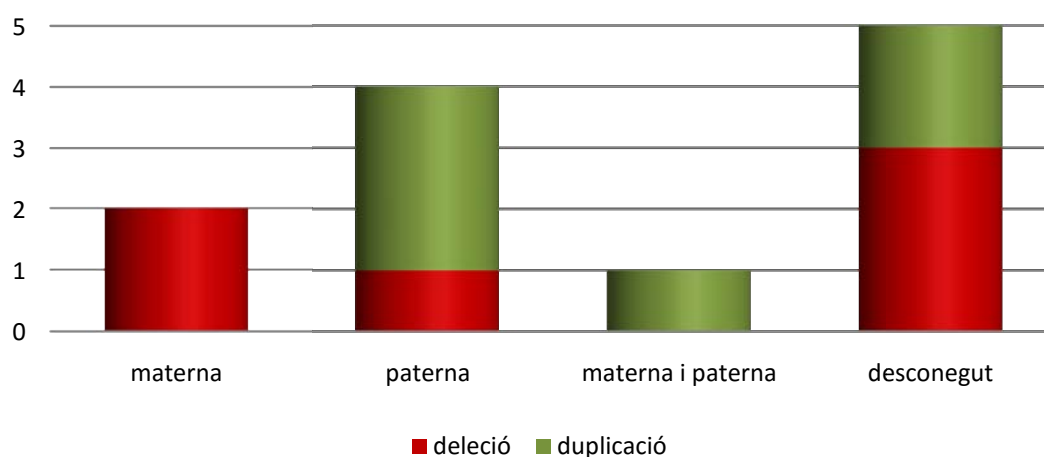


Figura 3.22: Herència de les variants de significació clínica incerta probablement patogèniques

Els 12 casos es presenten agrupats en:

- **CNV en germans:** tres parelles de germans amb genotip compartit (59-60, 122-123 i 79-germà) i una parella de germans amb genotip no compartit (82-81).
- **CNV a la mateixa regió cromosòmica en tres individus no emparentats:** dos pacients no emparentats amb delecio a la mateixa regió (32 i 151) alterant el gen *IMMP2L* i un pacient amb una VOUSpb (115) que afecta a regió intrònica del mateix gen.
- **Altres CNVs VOUSpp:** un pacient amb duplicació en homozigosi (34), un pacient amb una única CNV rara (92) i dos pacients que presenten VOUSpb addicionals que poden contribuir en el fenotip (66 i 85).

Taula 3.10: Fenotip psiquiàtric i cognitiu i genotip dels individus amb CNVs classificades com a VOUSpp

Id	VOUSpp (hg19)	longitud (Kb)	Herència	Nº Gens RefSeq	DI	Trastorn psiquiàtric	Trastorn de conducta	Dismòrfia	HF	Altres CNVs (hg19)
34	3q29(196022728-196515371)x3	492	Mat-Pat	14	L	Trastorn d'estrés post-traumàtic	Agressivitat verbal i física, conducta demandant	+	+	10q23.33(96625510-96751004)x3 ¹ 10q25.1(107984130-108014302)x1 ² 11q22.3(102938672-103205118)x3 ¹ 20q12(41184930-41287946)x1 ¹
32	7q31.1(111195151-111283170)x1	82	Materna	1	M	Trastorn d'estrés post-traumàtic	-	+	+	12q23.1(96881237-96934971)x1 ² 14q11.2(22513004-22968425)x1 ² 2p23.1(30814684-30848349)x1 ¹ 2p25.3(2571139-3596661)x3 ¹ 6p22.1(27632341-27659350) x3 ² 14q11.1q11.2(22395084-23011311)x1 ²
151	7q31.1(111112186-111255558)x1	143	Materna	1	M	TOC Autisme infantil	Agressivitat verbal i física	+	+	1q31.2(191935045-191992138)x1 ² 12q24.13(112183921-112315323)x3 ¹
85	8p23.1(10254051-10449952)x1	195	NA	3	L	Transvestisme	Agressivitat verbal, conducta destructiva, sexual inapropiada, oposicionista i demandant, amb altres problemes de conducta	+	-	2p12(79767455-79807301)x1 ¹ 7p22.1(5857029-5882229)x1 ¹
66	8q21.13(80288192-81019201)x1	731	Paterna	6	L	Fòbies específiques Trastorn generalitzat d'ansietat	-	+	+	1p34.2(40183006-40309338)x3 ¹ 14q11.2(22935084-22968425)x1 ² 20q13.13(48152656-48178810)x1 ¹ 2q13(110852960-110983703)x3 ¹ 10p13(14986974-015059703)x1 ¹ 14q11.2(22513004-22992672)x1 ²
122	9p24.2p24.1(4094627-4671089)x3	576	NA	4	M	-	Agressivitat verbal	+	+	1p21.1(104306630-104731539)x3 ² 14q11.2(22431667-23016598)x1 ²
123	9p24.2p24.1(4094627-4671089)x3	576	NA	4	M	Trastorn generalitzat d'ansietat	Agressivitat verbal i física	+	+	6q25.2(152936285-152959146)x1 ¹ 7q33(133469590-133492814)x1 ¹
82	10q21.3(67963693-68265572)x1	301	NA	1	M	-	Agressivitat verbal i física, conducta destructiva	+	+	6q25.2(152936285-152959146)x1 ¹ 7q33(133469590-133492814)x1 ¹
59	15q14q15.1(37882913-40621860)x3	2.738	Paterna	20	M	Trastorn de conducta hipercinètic	Agressivitat verbal i física, conducta destructiva, oposicionista, demandant i errant	+	+	6q25.2(152936285-152959146)x1 ¹ 7q33(133469590-133492814)x1 ¹
60	15q14q15.1(37882913-40621860)x3	2.738	Paterna	20	M	TOC Trastorn de conducta hipercinètic	Conducta sexual inapropiada, demandant i errant	+	+	6q25.2(152936285-152959146)x1 ¹ 7q33(133469590-133492814)x1 ¹
92	15q26.2(94959126-94983622)x1	24	NA	1	L	Síndrome d'Asperger Episodi depressiu amb síndrome somàtica	-	+	+	-
79	17q24.1q24.2(64129644-64759936)x3	630	Paterna	4	L	Reacció d'estrés agut Altres trastorns dels hàbits i impulsos	Agressivitat física	+	+	10q24.2(100705378-100909995)x1 ¹

(Id) Identificador pacient; (VOUSpp) Variant de significació clínica incerta probablement patogènica; (Gens RefSeq) Gens humans coneguts codificants i no codificants de proteïnes segons la col·lecció de seqüències de referència NCBI; (DI) Grau de discapacitat intel·lectual; (HF) Història familiar; (CNV) Variant en nombre de còpies; (Mat-Pat) Herència d'ambos progenitors; (NA) No analitzada; (L) Lleu; (M) Moderada; (TOC) Trastorn obsessiu.-compulsiu; (1) VOUS probablement benigne; (2) VOUS benigne.

Taula 3.11: Gens candidats inclosos dins de les CNVs classificades com a VOUSpp

CNV	Gen candidat	Efecte	Funció del producte gènic	Evidències a literatura i bases de dades
dup3q29	PAK2	D	Activitat serina/treonina quinasa que intervé en el desenvolupament dendrític de les neurones corticals embrionàries. Regula remodelacions al citoesquelet, proliferació cel·lular, migració i unió amb altres components cel·lulars	Síndrome de microduplicació 3q29 de longitud superior (FERNANDEZ-JAEN <i>et al.</i> 2014)
	FBXO45	T	Localització a membrana pre- i post-sinàptica implicada en migració neuronal, resposta cel·lular a dany d'ADN, ubiquitinització proteica i migració cel·lular de còrtex cerebral	Gen candidat per SQZ (WANG <i>et al.</i> 2014)
del7q31.1 ¹	IMMP2L	D	Proteïna necessària per l'activitat catalítica del complex peptidasa de membrana mitocondrial interna implicada en processar senyals per dirigir les proteïnes a mitocondris	Associació de la regió 7q31 a TEA, TDAH i TB (Elia <i>et al.</i> 2010; Girirajan <i>et al.</i> 2011; Casey <i>et al.</i> 2012)
del8p23.1	MSRA	D	Gen conservat amb alts nivells d'expressió a sistema nerviós, codifica per proteïna amb activitat pèptid-metionina sulfòxid reductasa implicada en la reparació de dany oxidatiu	Síndrome de microdeleció 8p23.1 de longitud superior Gen candidat per SQZ (WALLS-BASS <i>et al.</i> 2009)
del8q21.13	STMN2	T	Regulació de l'estabilitat dels microtúbuls en neurones corticals i del creixement neuronal	CNVs de longitud superior descrites com a patogèniques (PALOMARES <i>et al.</i> 2011)
dup9p24.2p24.1 ²	SLC1A1	T	Transportador de glutamat implicat en la secreció de neurotransmissors	Individus amb DI i trastorn cognitiu descrits a DECIPHER Delecions associades a SQZ i TB (MYLES-WORSLEY <i>et al.</i> 2013) Expressió diferencial entre individus amb TOC i controls (PORTON <i>et al.</i> 2013)
del10q21.3	CTNNA3	D	Implicada en funcions d'adhesió cel·lula-cèl·lula amb expressió a cerebel i còrtex cerebral	Possible gen associat a autisme (BACCHELLI <i>et al.</i> 2014)
dup15q14q15.1 ²	SPRED1	T	Activitat serina/treonina quinasa implicada en la inhibició de la via MAPK	Tres CNVs classificades com a VOUS i una patogènica a ClinVar Associació de <i>SPRED1</i> amb plasticitat neuronal i de conducta (BREMS <i>et al.</i> 2007; DENAYER <i>et al.</i> 2008)
	RASGRP1	T	Regulador de calci implicat en la transducció de senyal	<i>RASGRP1</i> com a biomarcador candidat pel TB (KATO <i>et al.</i> 2011)
	PAK6	T	Activitat serina/treonina quinasa implicada en la regulació de la transcripció, fosforil·lació i processos d'apoptosi i organització del citoesquelet	Implicació de <i>PAK6</i> en el funcionament cognitiu (FURNARI <i>et al.</i> 2013)
del15q26.2	MCTP2	D	Proteïna d'unió a calci amb possible implicació en la funció sinàptica	Regió susceptible per autisme i TB (CHAGNON 2005; MCAULEY <i>et al.</i> 2009) Gen candidat per SQZ (DJUROVIC <i>et al.</i> 2009)
dup17q24.1q24.2	PRKCA	D	Activitat serina/treonina quinasa i tirosina quinasa implicada en transmissió sinàptica, creixement de neurites, desenvolupament neuronal i memòria de treball	Pacient amb conducta agressiva, autisme, DI i dèficit de llenguatge (DECIPHER: 248978)

(CNV) Variant en nombre de còpies; (VOUSpp) Variant de significació clínica incerta probablement patogènica; (D) Disrupció del gen; (T) Gen totalment inclòs; (SQZ) Esquizofrènia; (TEA) Trastorn d'espectre autista; (TDAH) Trastorn d'atenció i hiperactivitat; (TB) Trastorn bipolar; (DI) Discapacitat intel·lectual; (TOC) Trastorn obsessiu-compulsiu; (DECIPHER) Base de dades de variants genòmiques i fenotips en humans; (ClinVar) Bases de dades de variants genòmiques; (1) CNV identificada en tres individus no relacionats; (2) CNVs identificades en parelles de germans.

3.3.3.2.1 . Germans amb discapacitat intel·lectual

S'han identificat tres CNVs compartides entre germans i una parella de germans amb genotip no compartit.

Duplicació 9p24.2p24.1

S'ha identificat una duplicació 9p24.2p24.1 de 576Kb (Figura 3.23), confirmada mitjançant MLPA, en dos barons de 50 i 45 anys (122 i 123 Taula 3.10 respectivament) que presenten DI moderada i trastorn de conducta agressiva, i trastorn d'ansietat generalitzat en un d'ells. Ambdós individus presenten dismòrfia, caracteritzada per orelles grans, llengua llarga, pectus excavatum, ptosis, macrostòmia i nas gros amb punta bulbosa al pacient 122 (II.1 Figura 3.24) i implantació baixa de les orelles, filtrum curt, llavi inferior prim, paladar alt i estret, macrocefàlia, cara llarga i front alt al pacient 123 (II.2 Figura 3.24). No es disposa de mostra dels progenitors per l'estudi de l'herència.

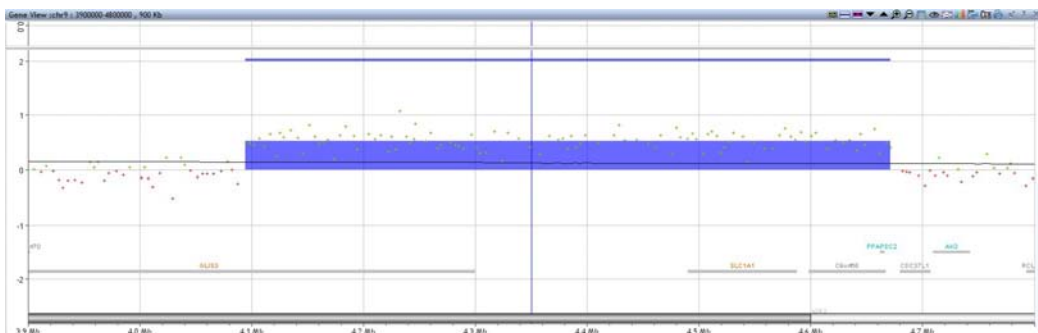


Figura 3.23: Duplicació 9p24.2p24.1 identificada mitjançant CMA

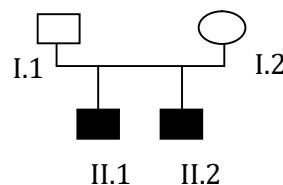


Figura 3.24: Arbre geneològic dels pacients 122 (II.1) i 123 (II.2)

(■) Discapacitat intel·lectual

RESULTATS

La duplicació solapa amb CNVs identificades en individus amb trastorn cognitiu (Figura 3.25) i CNVs de longitud superior associades a DI i autisme i inclou el gen *SLC1A1*, altament conservat, que codifica pel transportador de glutamat EAAC1.

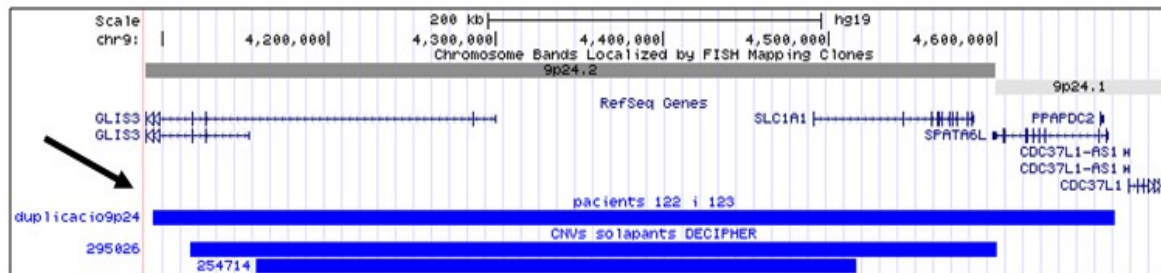


Figura 3.25: Representació de UCSC dels gens RefSeq inclosos a la regió 9p24.2p24.1

A la part inferior de la figura es representa la duplicació identificada a la parella de germans (fletxa) i les dues CNVs solapants descrites a DECIPHER.

Duplicació 15q14q15.1

En una altra parella de germans (59 i 60 Taula 3.10) s'ha identificat una duplicació 15q14q15.1 d'origen patern de 2,7Mb que ha estat validada mitjançant FISH amb sondes BAC (Figura 3.26). Els pacients, una dona de 26 anys (II.1) i un baró de 24 (II.2), presenten DI moderada i TC, i en el noi es diagnostica un TOC. La valoració dismorfològica constata una microcefàlia, hipotelorisme i dits llargs en ambdós individus. La noia presenta una mandíbula prominent i regió periorbitària amb epicantus i el noi té una cara llarga, ulls enfonsats i *pectus excavatum*. La història familiar registrada indica una mare amb QI límit i un pare amb dificultats a l'etapa de la infància.

La CNV identificada en ambdós germans solapa completament amb dues duplicacions de longitud inferior descrites a *ClinVar* com a VOUS i parcialment amb dues altres duplicacions, una d'elles de longitud superior descrita com a patogènica (Figura 3.27). La regió duplicada inclou el gen *SPRED1*, associat a plasticitat neuronal i de conducta (BREMS *et al.* 2007; DENAYER *et al.* 2008), el gen *RASGRP1*, biomarcador candidat pel TB (KATO *et al.* 2011), i el gen *PAK6*, implicat en funcions cognitives (FURNARI *et al.* 2013).

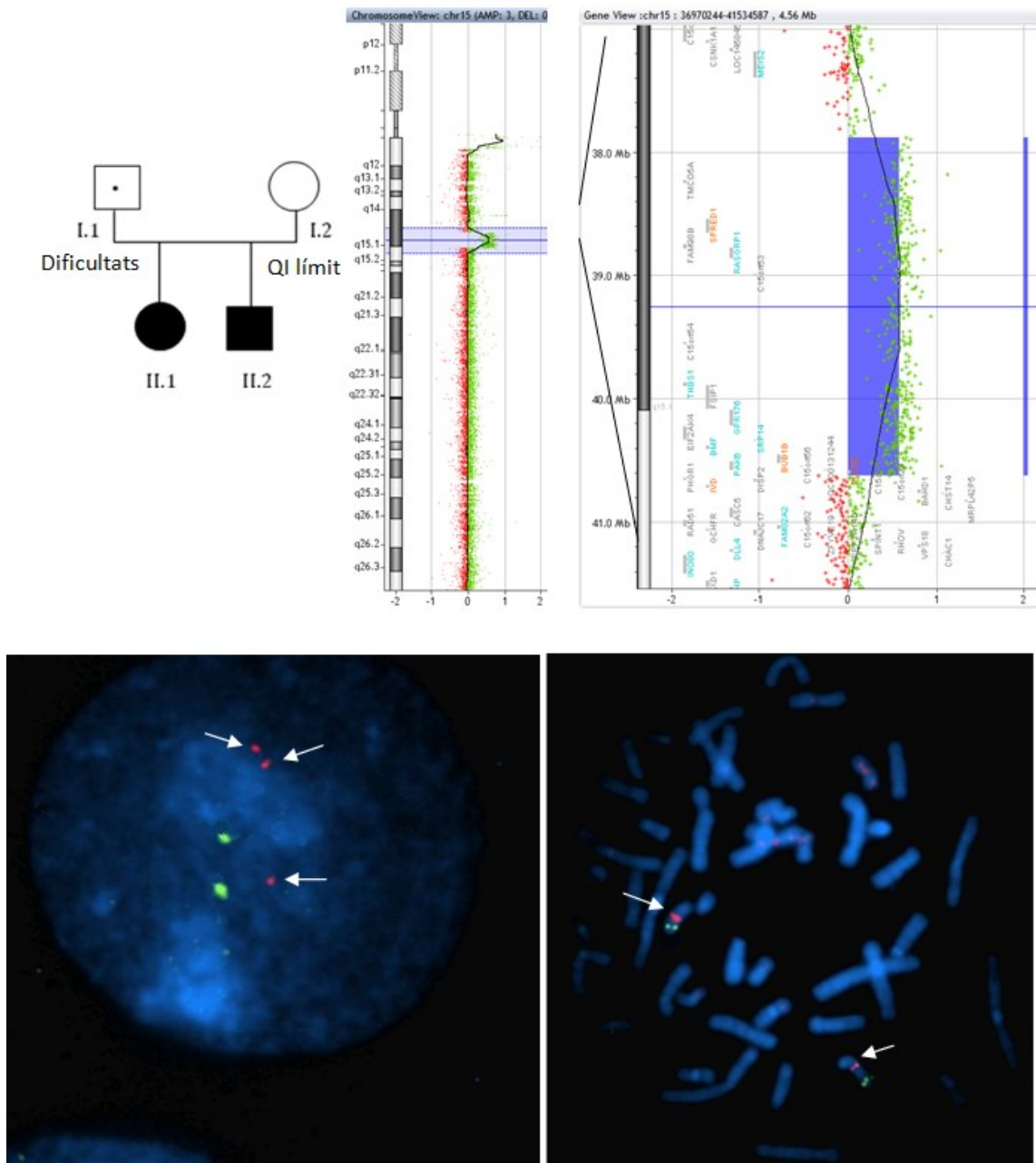


Figura 3.26: Duplicació 15q14q15.1

Part superior esquerra: arbre genològic dels pacients 59 (II.1) i 60 (II.2). (·) Portador de la duplicació; (■/●) Discapacitat intel·lectual. Part superior dreta: duplicació 15q14q15.1 identificada mitjançant CMA. Part inferior: imatges de FISH no comercial, utilitzada per la confirmació de la duplicació. El BAC RP11-127C4 específic per la regió 15q14 es marca amb fluorocrom *SpectrumOrange* (sonda vermella, problema) i el BAC RP11-81L17 específic per 15q25.2 es marca amb fluorocrom *SpectrumGreen* (sonda verda, control). La imatge inferior esquerra mostra un nucli interfàsic amb tres senyals vermelles corresponents a la sonda problema (senyalades amb una fletxa). La imatge inferior dreta correspon a una metafase en el que s'observen els dos cromosomes 15 (senyalats amb una fletxa). La senyal vermella més intensa en un dels cromosomes correspon a la duplicació.

RESULTATS

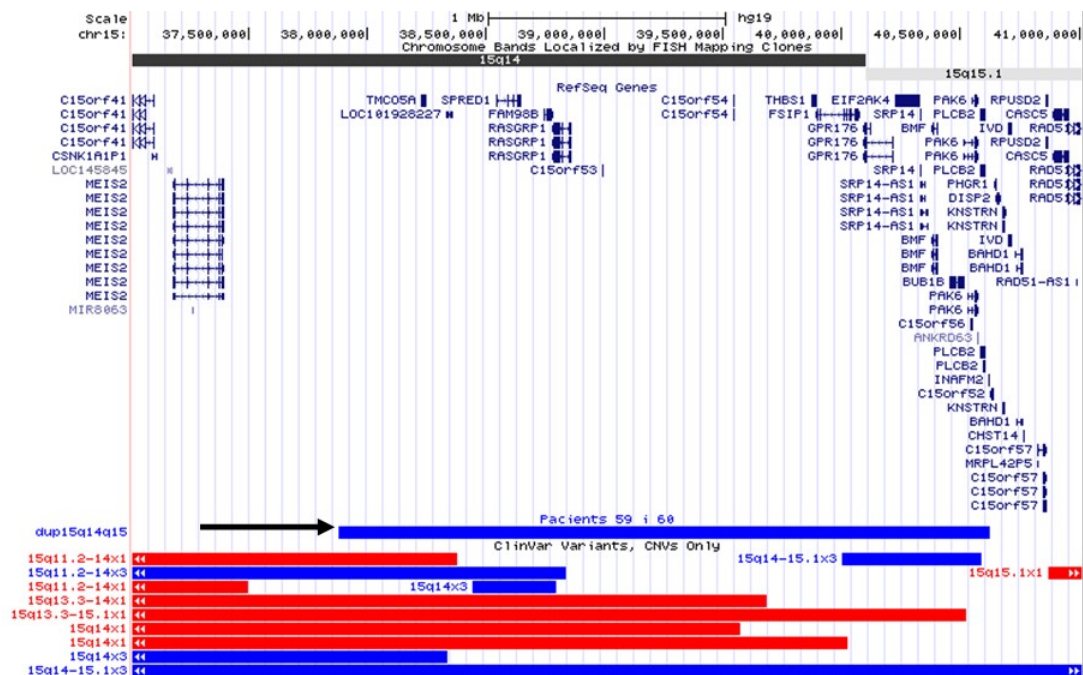


Figura 3.27: Representació de UCSC dels gens RefSeq inclosos a la regió 15q14q15.1

La duplicació (línea blava marcada amb una fletxa) present als pacients 59 i 60 solapa amb delecions (línees vermelles) i duplicacions (línees blaves) descrites a *ClinVar*. Les duplicacions de longitud inferior es classifiquen com a variants de significació clínica incerta i les duplicacions de longitud superior es classifiquen com a patògeniques.

Duplicació 17q24.1q24.2

La duplicació 17q24.1q24.2 de 630Kb de longitud (Figura 3.28) s'ha identificat en un baró de 26 anys que presenta DI lleu, reacció d'estrés agut, trastorn dels hàbits i impulsos, agressivitat física i una dismòrfia facial caracteritzada per orelles llargues, lòbuls oculars marcats, llavi superior en arc de cupido, paladar alt i estret i cara llarga (pacient 79 Taula 3.10). La història familiar recopilada indica antecedents familiars (Figura 3.28), amb una mare diagnosticada d'SQZ, un pare amb un QI límit i un germà amb DI lleu, tot i que no s'ha obtingut més informació clínica del germà. L'estudi dels familiars ha revelat que el pare i el germà són portadors de la duplicació.

La CNV solapa amb una duplicació de longitud inferior identificada en un individu que presenta conducta agressiva, autisme i dèficit de llenguatge segons *DECIPHER* i inclou el gen *PRKCA* suggerit com a responsable de la DI, obesitat, canvis d'humor i al·lucinacions descrites en la síndrome de la microdelecció 17q24.2 (VERGULT *et al.* 2012).

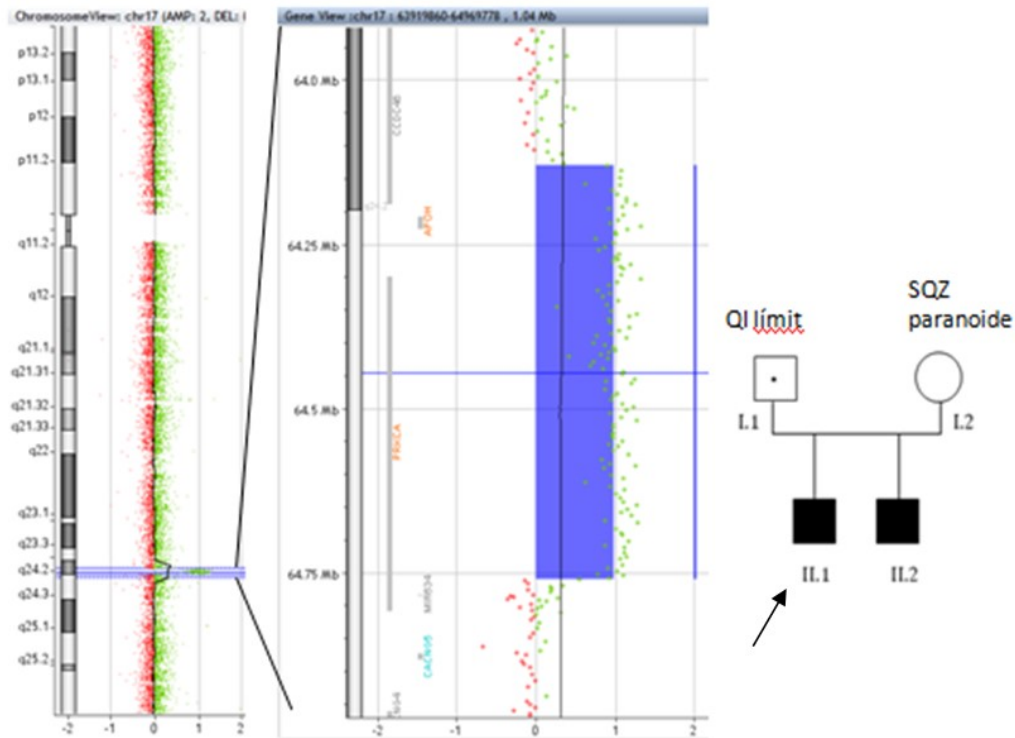


Figura 3.28: Duplicació 17q24.1q24.2

Esquerra: imatge del CMA de la duplicació. Dreta: arbre geneològic del pacient 79 (fletxa).

(·) Portador de la duplicació (■) Discapacitat intel·lectual.

Deleció 10q21.3

Mitjançant CMA s'ha identificat una deleció 10q21.3 de 301,8Kb (Figura 3.29) en un pacient (82 Taula 3.10) amb DI moderada, conducta agressiva i destructiva i dismòrfia facial, mentre que el seu germà, amb DI lleu i trastorn depressiu recurrent, no presenta la deleció.

La CNV identificada al cromosoma 10 provoca la disrupció del gen *CTNNA3*, que codifica per una proteïna d'adhesió cel·lular amb expressió a cervell que es creu implicada en les etapes inicials del desenvolupament, amb alts nivells d'expressió en individus amb Alzheimer i descrita com a possible candidat per autisme amb model d'herència recessiva (BACCHELLI *et al.* 2014).

RESULTATS

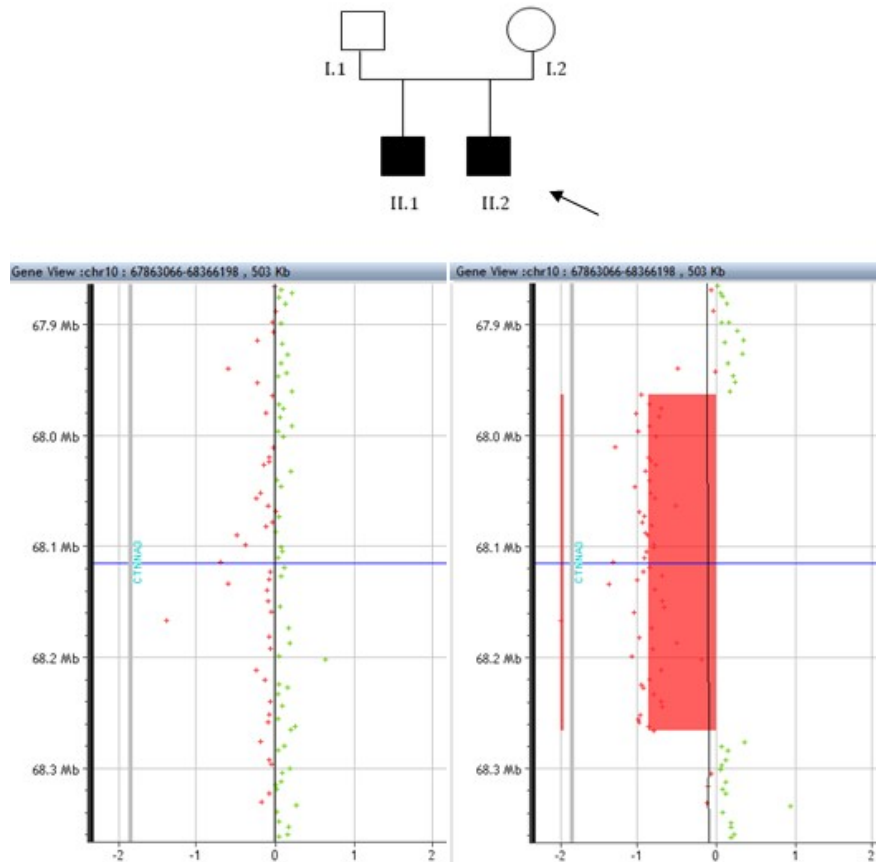


Figura 3.29: Deleció 10q21.3

Part superior: arbre genològic del pacient 82 (fletxa). (■) Discapacitat intel·lectual. Part inferior dreta, imatge de la deleció 10q21 afectant regió intrònica del gen *CTNNA3* al pacient 82. Part inferior esquerra, imatge de CMA de la mateixa regió en el germà II.1 amb una dosi normal.

3.3.3.2.2 . Variants en nombre de còpies a la mateixa regió cromosòmica en tres individus no emparentats

S'ha observat una deleció a 7q31 afectant parcialment al gen *IMMP2L* (NM_001244606) identificada mitjançant CMA en tres individus no emparentats (Figura 3.30). L'estudi mitjançant MLPA ha permès confirmar les tres deleccions i l'estudi dels progenitors en dos dels tres individus determina una herència materna en ambdós casos. El disseny d'encebedors específics ha permès establir els punts de trencament.

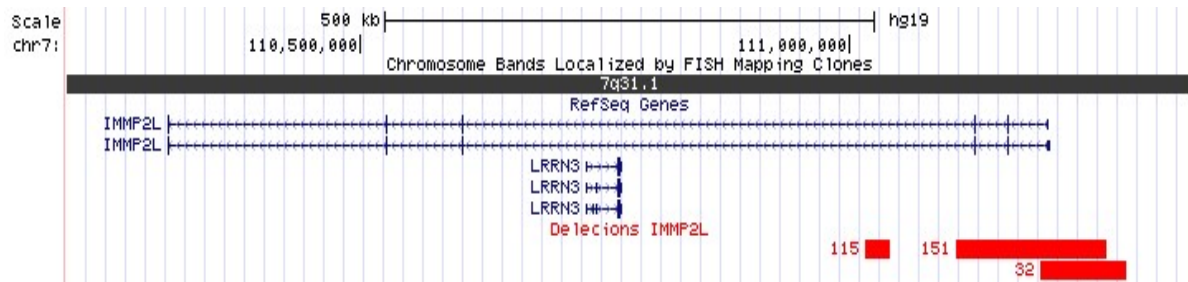


Figura 3.30: Representació de UCSC del contingut genètic de les tres delecions identificades a 7q31
(Línies vermelles) Delecions en tres individus no emparentats.

El pacient 32 (Taula 3.10) presenta una delecíó de 81,5Kb que inclou els primers dos exons del gen *IMMP2L*. Mitjançant seqüenciació *Sanger* s'han establert els punts de trencament (Figura 3.31) definint una longitud total de 88,019Kb. El pacient és un baró de 23 anys amb DI moderada, trastorn d'estrés posttraumàtic, cara llarga, turricefàlia i mamiles supernumeràries. La mare, portadora de la delecíó, té diagnòstic d'Alzheimer.

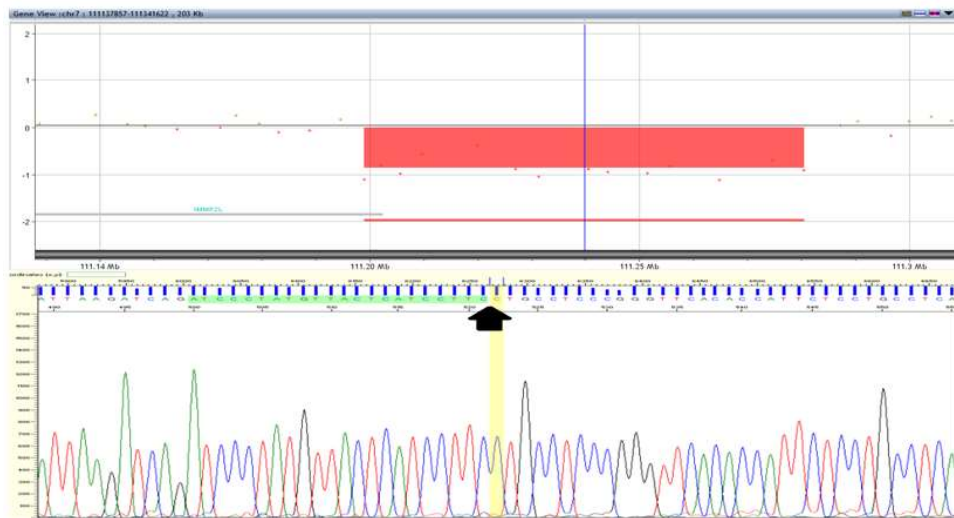


Figura 3.31: Delecíó 7q31 del pacient 32

Part superior:CMA. Part inferior: seqüència de l'al·lel delecionat que permet determinar la localització de la CNV (fletxa) i identificar els punts de trencament.

El pacient 151 (Taula 3.10) presenta una delecíó de 143,3Kb afectant als quatre primers exons del gen *IMMP2L*. L'amplificació i seqüenciació dels punts de trencament (Figura 3.32) ha

RESULTATS

permès acotar la longitud de la deleció a 152,634Kb. El pacient és un baró de 18 anys amb DI moderada, TOC, autisme infantil i agressivitat. L'avaluació dismorfològica identifica fossetes auriculars bilaterals, llavi inferior invertit, dents separades, cap petit (-1DS), front amb glabella prominent, estrabisme, plenitud periorbitària, criptorquídia i base nasal ampla. La mare, portadora de la deleció, és normal.

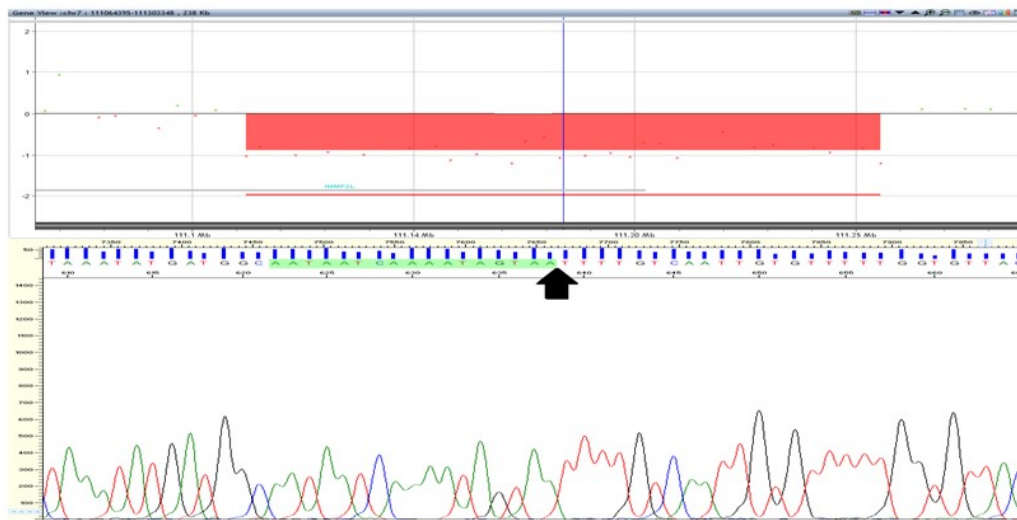


Figura 3.32: Deleció 7q31 del pacient 151

Part superior: CMA. Part inferior: seqüència de l'al·lel delecionat que permet determinar la localització de la CNV (fletxa) i identificar els punts de trencament.

La deleció en la pacient 115 (annex 2) s'ha classificat com a VOUSpb per afectar únicament a una regió intrònica del gen. Es tracta d'una deleció de 24,843Kb (chr7:111015303-111040146) (Figura 3.33) que inclou part de l'intró 4 (Figura 3.30). La pacient és una dona de 39 anys amb DI lleu i síndrome Gilles de la Tourette. No s'ha pogut realitzar l'estudi dels progenitors per establir l'herència de la deleció.

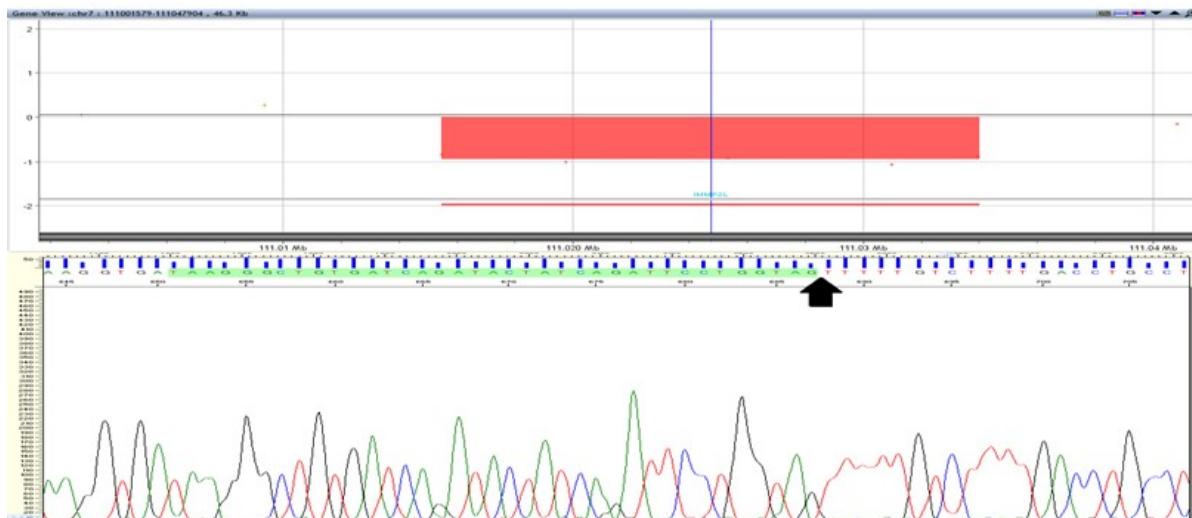


Figura 3.33: Deleció 7q31 de la pacient 115

Part superior: CMA. Part inferior: seqüència de l'al·lel delecionat que permet determinar la localització de la CNV (fletxa) i identificar els punts de trencament.

3.3.3.2.3 . Altres variants en nombre de còpies de signficació clínica incerta

Duplicació 3q29 en homozigosi

Els valors de \log_2 ratio de la duplicació a 3q29 identificada al pacient 34 indica la presència de quatre dosis del segment de 492,6Kb de longitud (Figura 3.34). L'individu presenta quatre CNVs rares addicionals (Taula 3.10). L'estudi dels pares i dos germans s'ha realitzat mitjançant CMA identificant que ambdós progenitors i una germana són portadors de la duplicació i que un germà també és portador de quatre còpies (Figura 3.35).

El pacient és un baró de 26 anys amb DI lleu, trastorn d'estrés posttraumàtic, agressivitat i conducta demandant. El fenotip dismòrfic es caracteritza per una obesitat generalitzada, llavi superior prim, paladar alt i estret, epicantus, estrabisme, ginecomàstia i hipoplàsia nasal. Els progenitors són cosins germans, ambdós amb un QI límit, i el germà portador de quatre còpies de la regió 3q29 presenta una DI greu. L'alteració solapa amb la regió crítica per la síndrome de microduplicació descrita per Lisi et al. (LISI *et al.* 2008).

RESULTATS

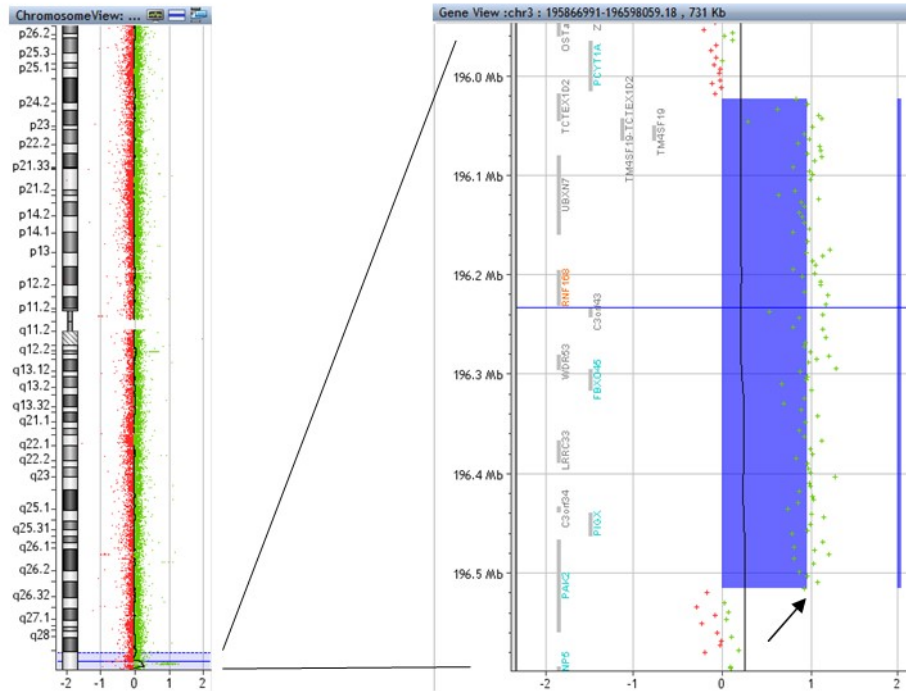


Figura 3.34: Duplicació 3q29 en homozigosi

A la part dreta s'observa que el valor de les \log_2 *ratios* tendeixen a superar l'1 (fletxa), suggerint la presència de quatre dosis dels segment duplicat.

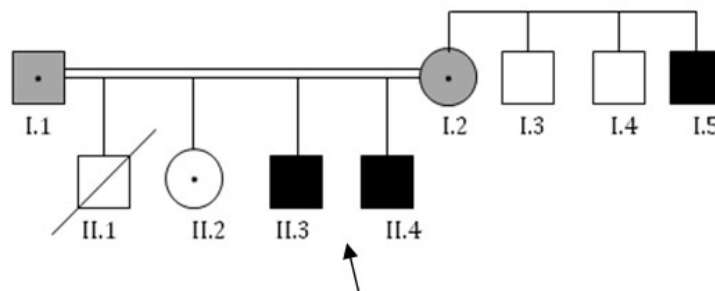


Figura 3.35: Arbre genealògic del pacient 34

Els pares són cosins germans, tots dos portadors de la duplicació 3q29 (·) amb un QI límit (■/●). No es coneix el fenotip de la germana portadora (II.2). El pacient 34 (fletxa), un germà (II.4) i un tiet (I.5) presenten DI (■/●). El germà II.4 també és portador de quatre còpies de la regió 3q29. No s'ha pogut accedir a les mostres biològiques dels tiets materns.

Deleció 15q26.2

La deleció 15q26.2 és la única CNV rara descrita en la pacient 92 (Taula 3.10). Dona de 30 anys que presenta DI lleu, síndrome d'Asperger i episodi depressiu amb síndrome somàtica. Existeixen antecedents familiars de problemes psiquiàtrics, amb un oncle patern amb diagnòstic de SQZ i altres oncles paterns sota tractament psiquiàtric. La variant ha estat validada per MLPA no comercial i l'estudi de la germana indica que és portadora de la deleció. La mare no n'és portadora. No s'ha pogut accedir a la mostra del pare. La deleció té una longitud de 24,5Kb i altera parcialment el gen *MCTP2* eliminant l'exó 17 de la isoforma 1 (NM_018349.3) (Figura 3.36). S'ha descrit una possible contribució del gen *MCTP2* en el fenotip esquizofrènic (DJUROVIC *et al.* 2009) i la regió 15q26.1q26.2 s'ha associat a autisme i TB (CHAGNON 2005; MCAULEY *et al.* 2009).

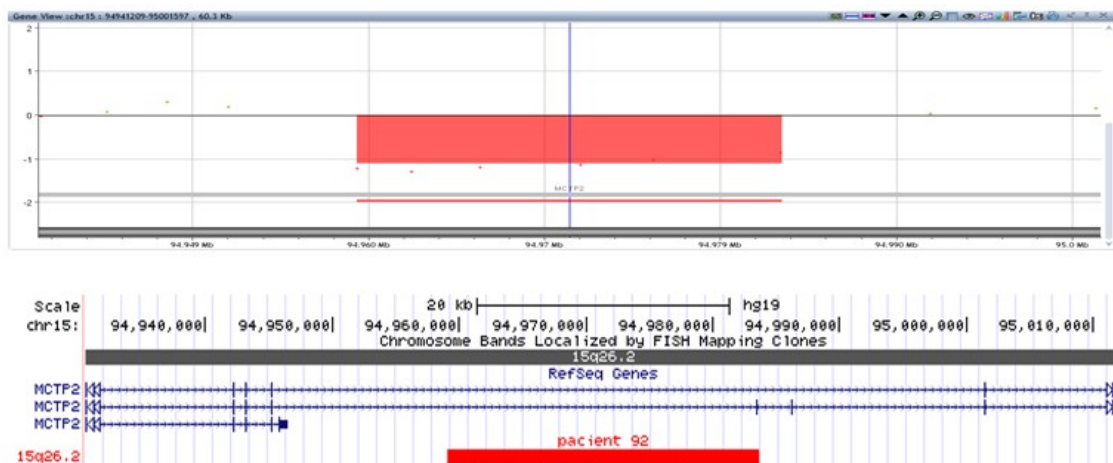


Figura 3.36: Deleció 15q26.2

Part superior: imatge de la deleció identificada mitjançant CMA a la pacient 92. Part inferior: representació de la localització molecular de la CNV (línia vermella) que inclou l'exó 17 de la isoforma 1 del gen *MCTP2* (NM_018349.3).

Deleció 8p21.3 i duplicació 12q24.13

El pacient 85 (Taula 3.10), baró de 22 anys, presenta DI lleu, transvestisme, agressivitat verbal, conducta destructiva, oposicionista, demandant i sexual inapropiada. El fenotip dismòrfic es caracteritza per presentar un front petit, cara llarga, microcefàlia, perfil nasal convex, punta nasal prominent, macrostòmia, mala oclusió dental i testes petits. No es coneixen els

RESULTATS

antecedents familiars. L'estudi mitjançant CMA ha identificat una deleció de 196Kb a la regió 8p23.1 que inclou l'extrem 3' del gen altament conservat *MSRA* (Figura 3.37), amb alts nivells d'expressió a teixit nerviós que actua com a mecanisme de defensa pel dany oxidatiu descrit com a candidat per SQZ (WALSS-BASS *et al.* 2009). Addicionalment, el CMA ha identificat dues CNVs rares no patogèniques, de les quals cal destacar la duplicació 12q24.13 (Figura 3.38) que inclou totalment el gen *ALDH2*, aldehid deshidrogenasa mitocondrial amb elevada expressió a cervell associat a problemes de dependència a substàncies (Agrawal *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013), i altera l'estructura dels gens *ACAD10*, amb elevada expressió a cervell fetal, i *MAPKAPK5*, amb funció proteïna quinasa. A *DECIPHER* s'han descrit duplicacions similars en individus amb DI que presenten altres CNVs amb possible contribució a la clínica.

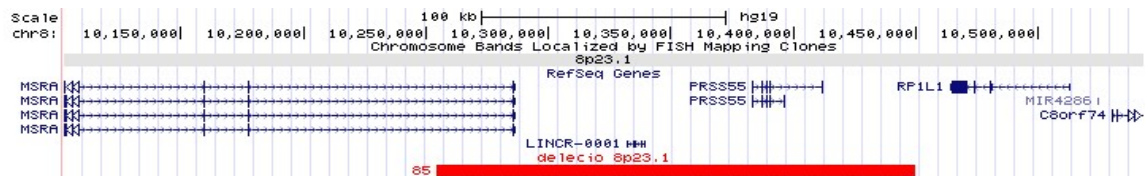


Figura 3.37: Representació de la localització molecular de la deleció 8p23.1

La deleció (línia vermella) identificada al pacient 85 inclou el gen *PRSS5* i altera l'estructura del gen *MSRA* eliminant l'extrem 3'.

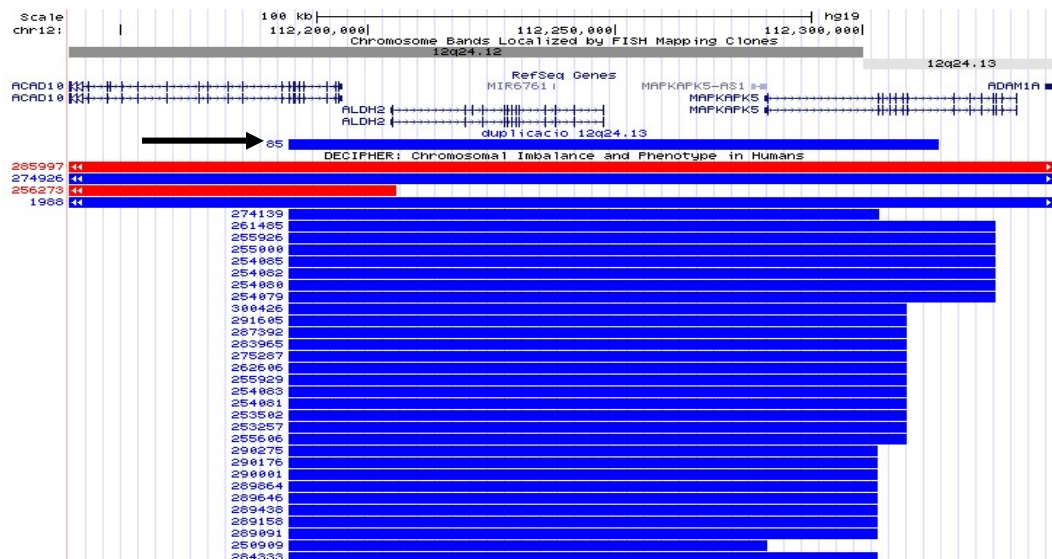


Figura 3.38: Representació de la localització molecular de la duplicació 12q24.13

La duplicació (línia blava senyalada amb una fletxa) inclou el gen *ALDH2* i altera l'estructura dels gens *ACAD10* i *MAPKAPK5*. La CNV solapa amb duplicacions (línies blaves) de longitud similar descrites a *DECIPHER*.

Deleció 8q21.13 i deleció 2p12

El pacient 66 (Taula 3.10) presenta una DI lleu, fòbies específiques, trastorn generalitzat d'ansietat i dismòrfia caracteritzada per un llavi superior prim, paladar en forma d'U, mandíbula prominent, cara llarga, front petit, sinofrídia i base nasal ampla. La història familiar indica un oncle matern amb DI. El resultat de CMA ha identificat una deleció 8q21.13 de 731Kb, amb herència paterna segons MLPA realitzat als progenitors. Solapa amb delecions de longitud superior descrites en individus amb DI (PALOMARES *et al.* 2011) i inclou el gen *STMN2* (o *SCG10*) (Figura 3.39) implicat en el creixement neuronal. Addicionalment, s'ha identificat una deleció 2p12 de 39,8Kb en el mateix pacient, en aquest cas heretada de la mare. La CNV es classifica com a VOUSpb per afectar a regió intrònica del gen *CTNNA2* (Figura 3.40), però cal destacar que es tracta d'un gen que codifica per una proteïna sinàptica d'associació a cadherines amb nivells elevats d'expressió en la diferenciació neuronal.

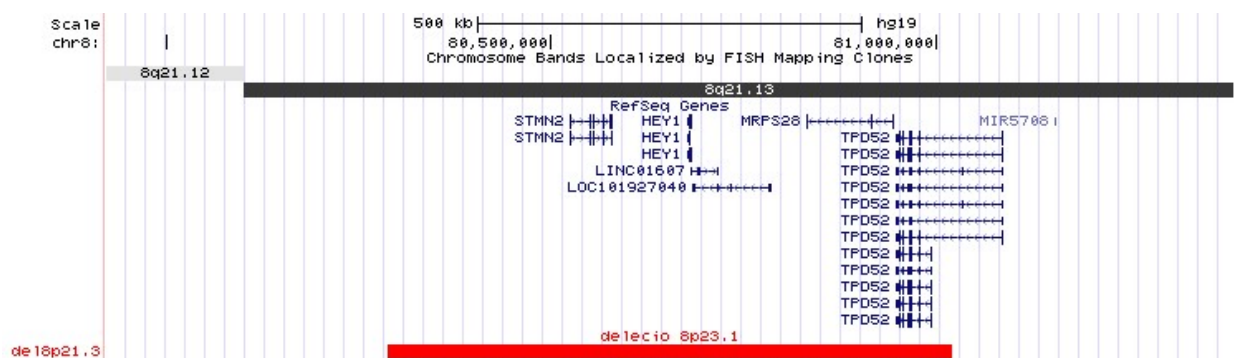


Figura 3.39: Representació de la localització molecular de la deleció 8q21.13

La deleció (línia vermella) identificada al pacient 66 inclou els gens *STMN2*, *HEY1*, *LINC01607*, *LOC101927040*, *MRPS28* i *TPD52*.

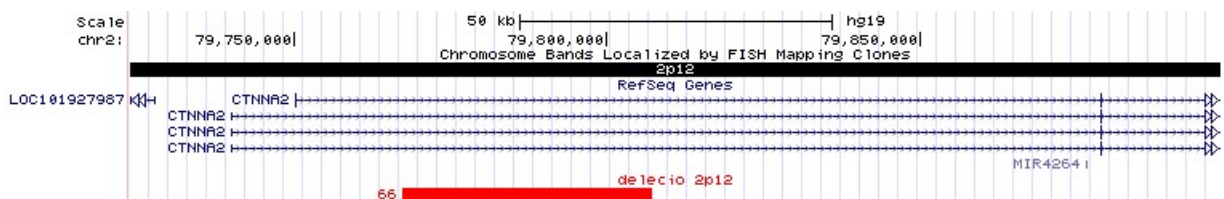


Figura 3.40: Representació de la localització molecular de la deleció 2p12

La deleció (línia vermella) identificada al pacient 66 inclou regió intrònica del gen *CTNNA2*.

3.3.4. Efecte de les variants en nombre de còpies en el fenotip

S'ha realitzat una anàlisi de les variables categòriques als 86 individus analitzats mitjançant CMA comparant els 23 individus que presenten CNVp o VOUSpp amb els 63 individus que no presenten una causa genètica coneguda. El grau de DI, la presència de TP, la presència de TC i la co-morbiditat de TPambTC no mostra diferències estadísticament significatives (Taula 3.12) segons la presència o absència de CNVp i VOUSpp.

S'ha identificat una diferència estadísticament significativa en la presència de co-morbiditat psiquiàtrica (dos trastorns diagnosticats en un individu) segons el grups de CNVs. Els individus amb CNVp o VOUSpp tenen un risc incrementat de 4,22 (95% CI=1,21-14,74, p=0.035) de presentar co-morbiditat psiquiàtrica.

Taula 3.12: Anàlisi comparatiu de variables categòriques

	CNVp +VOUSpp (n=23)	CNVnp (n=63)	Significació
Grau de DI			
DI lleu	11	42	p=0,140
DI moderada	12	21	
Trastorn psiquiàtric			
Si	19	54	p=0,833
No	4	9	
Trastorn conductual			
Si	16	40	p=0,213
No	7	23	
Trastorn psiquiàtric + Trastorn Conductual			
Si	12	31	p=0,370
No	11	32	
Co-morbiditat psiquiàtrica			
Si	7	6	OR=4,22 (95%CI=1,21-14,74, p=0.035)
No	12	48	
Nº trets dismòrfics	6,67	7,38	p>0,05

(CNVp+VOUSpp) Individus que presenten variants en nombre de còpies patogèniques o variants de significació clínica incerta probablement patogèniques; (CNVnp) Individus sense causa genètica coneguda; (OR) *Oddratio*.

Tots els individus de la població presenten dismòrfia, amb una mitjana de sis trets dismòrfics per individu. El número mig de trets dismòrfics segons la presència o absència de CNVp o VOUSpp no presenta una diferència estadísticament significativa (Taula 3.12). Les característiques dismòrfiques més freqüents es mostren a la Taula 3.13.

Taula 3.13: Característiques dismòrfiques freqüents a la població

	N=86 (%)	% Individus amb CNVp (n=11)	% Individus amb VOUSpp (n=12)	% Individus sense CNVp/VOUSpp (n=63)
Dismòrfia del paladar	66,3	72,73	50	55,56
Dismòrfia facial	40,7	45,45	58,3	36,5
Microcefàlia	16,2	9	16,7	14,46
Macrocefàlia	10,5	18,18	8,3	11,11
Dismòrfia dits de les mans	24,4	18,18	41,67	22,22

(%) Percentatge; (n) Individus; (CNVp) Variants en nombre de còpies patogènica; (VOUSpp) Variants de significació clínica incerta probablement patogènica.

3.4. Estudi cas control de variants en nombre de còpies en set regions específiques

S'han seleccionat set regions amb CNVs identificades en la cohort: dues regions amb CNVp (2p16.3, 12p12), quatre regions amb CNVs VOUSpp (3q29, 15q14q15, 15q26.2 i 17q24) i una regió amb VOUSpb afectant a regió intrònica d'un gen de rellevància (2p12). S'ha dissenyat un panell de MLPA amb sondes no comercials per determinar la seva presència en una població de 184 pacients amb DI (73 dones i 111 homes, amb una mitjana d'edat de 31 anys) i en 189 mostres control. No s'han identificat alteracions en cap de les dues poblacions.

4 . DISCUSSIÓ

4.1 . Avaluació de les tècniques de cribatge i de confirmació

Amb l'objectiu d'establir l'origen genètic del diagnòstic dual de DI lleu-moderada i TP/TC en una població de 100 adults, s'ha aplicat una estratègia d'anàlisi genètica seqüencial. S'ha realitzat l'estudi del cariotip, cribatge del SXF i estudis moleculars dirigits a la confirmació d'una sospita clínica d'una síndrome específica i posteriorment s'han aplicat les tècniques de MLPA i CMA per la detecció de CNVs submicroscòpiques a aquells individus sense alteracions genètiques.

4.1.1. *Multiplex ligation dependent probe amplification* pel cribatge de regions subtelomèriques

La tècnica de MLPA pel cribatge de regions subtelomèriques emprada en 82 individus ha identificat un total de quatre CNVp en tres pacients, amb una discordança en un resultat. La baixa sensibilitat de la tècnica és deguda a que els kits P036 i P070 inclouen una única sonda per cada regió, localitzades en *loci* diferents, i una de les sondes de la regió 22q13 no va detectar la deleció. S'aconsella l'ús conjunt dels dos kits en el cribatge de les regions subtelomèriques (Monfort et al. 2006) i es precisa una tercera tècnica (FISH, MLPA no comercial o CMA) per a la seva confirmació en cas de resultats discordants (Santa Maria et al. 2015).

La sensibilitat diagnòstica d'aquesta tècnica per a la detecció de CNVs en el genoma és baixa (20%) ja que les sondes incloses en els dos kits emprats majoritàriament detecten anomalies a les regions subtelomèriques. En canvi, la càrrega de CNVs intersticials associades a patologia és més elevada (Vissers et al. 2003; Shaw-Smith et al. 2004; Schoumans et al. 2005), doncs el CMA ha identificat alteracions patogèniques en 17 dels 82 individus amb resultat negatiu per MLPA.

4.1.2. Cariotip molecular pel cribatge del genoma

La tècnica de CMA realitzada a 86 individus (80 sense alteracions genètiques, 3 amb alteracions detectades amb MLPA i 3 amb alteracions cromosòmiques) s'ha dut a terme en dues tandes. En la primera tanda, es confirma el 89% de les CNVs analitzades mitjançant una segona tècnica. Les set CNVs no confirmades corresponen a artefactes de la tècnica. En aquestes regions hi ha un elevat contingut d'elements repetitius que suposen un obstacle per la hibridació correcta de l'ADN i poden escapar a la supressió per la *Human Cot* incorporada a la barreja d'hibridació, propiciant problemes artefactuals. L'avaluació d'aquests falsos positius ha permès redefinir els paràmetres de qualitat i processat per la segona tanda d'*arrays*, confirmant el 100% de les CNVs analitzades mitjançant una segona tècnica.

Les 94 CNVs confirmades en les dues tandes de CMA presenten una longitud promig d'1,7Mb (14Kb-50Mb), de les quals el 34% tenen una longitud inferior a 50Kb. La identificació d'alteracions de longitud petita és conseqüència de l'elevada densitat de sondes de la plataforma utilitzada (resolució mitjana de 5,3Kb amb un enriquiment de 4,6Kb en els gens RefSeq). La longitud de l'alteració identificada no és un paràmetre que afecti a l'especificitat, però sí el nombre de sondes. La primera tanda de CMA va detectar sis CNVs amb solament 4 sondes consecutives, dues de les quals van resultar ser falsos positius. Aquests dos falsos positius corresponien a *arrays* amb un valor de DLRS superior a 0,2. L'increment de quatre a cinc sondes consecutives a l'hora de considerar que una alteració és vertadera, va disminuir l'efecte que pot tenir el soroll de fons en la determinació de la proporció de la intensitat del senyal. Però no és l'únic requisit, doncs una CNV amb 182 sondes consecutives va resultar ser un artefacte de la tècnica en un *array* amb el valor de DLRS (0,26) més elevat de tota la sèrie, pel que es va reduir el valor de DLRS acceptable de 0,3 a 0,18. D'aquesta manera, i d'acord amb els valors obtinguts en els *arrays* corresponents als falsos positius, la mesura de la proporció en la intensitat entre dues sondes (DLRS) esdevé el paràmetre de control de qualitat més important a l'hora de determinar la fiabilitat dels resultats.

La variabilitat en el DLRS es va veure associada a la degradació del marcatge durant els rentats post-hibridació, degut a l'elevada sensibilitat a l'ozó atmosfèric en presència d'humitat relativa. El laboratori no disposa d'un espai lliure d'ozó per reduir aquesta degradació, però la

utilització de la solució *Stabilization and Drying* específica per la preservació del marcatge i d'acetonitril després dels rentats post-hibridació van aportar millores en els valors del DLRS.

Tot i la optimització del protocol tècnic per obtenir uns resultats fiables, s'aconsella utilitzar tècniques alternatives (MLPA o FISH) per la confirmació de les CNVs de rellevància clínica i minimitzar possibles diagnòstics erronis.

El CMA s'ha convertit en una eina de gran utilitat per a la detecció de CNVs al llarg de tot el genoma. L'avantatge davant les tècniques de citogenètica convencional és l'elevada cobertura, l'elevada resolució i la seva rapidesa. La incorporació d'aquesta tecnologia ha revolucionat l'estudi de les CNVs i en especial en el camp de la DI, identificant un gran nombre d'alteracions associades a patologia en individus amb resultats normals pel cariotip i MLPA de regions subtelomèriques. Però a més a més, ha permès caracteritzar els punts de trencament de les anomalies identificades pel cariotip convencional i MLPA, ja que la densitat de sondes de l'aCGH de 400K permet definir el punt de trencament amb un marge de 4,6Kb-5,3Kb d'error (distància promig entre la última sonda amb dosi normal i primera sonda alterada).

Una de les limitacions que presenta la tècnica de CMA, igual que la MLPA, és la incapacitat de detectar variants equilibrades (translocacions i inversions). Aquestes alteracions, només una detectada en la cohort d'adults (translocació recíproca equilibrada), s'identifiquen en població amb DI i TP amb una baixa freqüència (Jacobs et al. 1992; Sultana et al. 2002; Castermans et al. 2003; Hochstenbach et al. 2009; Malli et al. 2014; Schneider et al. 2015).

4.2 . Tècniques de confirmació

Les tècniques de FISH i MLPA es consideren de gran utilitzat per a la confirmació de les CNVs. No només són cost-efectives respecte a un segon array amb marcatge invers (Dye-Swap), sinó que a més a més permeten l'estudi dirigit a una CNV determinada en progenitors i familiars, evitant problemes en la identificació de possibles CNVs associades amb altres patologies no relacionades (Hills et al. 2010).

DISCUSSIÓ

L'avantatge de la tècnica de FISH és que identifica el nombre de còpies de la regió diana, però també la seva localització en el cromosoma. En el cas de la reorganització subtelomèrica, va permetre observar una regió terminal de 15q translocada a 10q. La tècnica de FISH amb sondes no comercials posada a punt per la confirmació de CNVs ha confirmat set de les vuit CNVs analitzades, però no ha identificat cap reorganització. La limitació més important d'aquesta tècnica és la longitud de les sondes utilitzades (~150pb), pel que el seu ús es limita únicament a aquelles CNVs superiors a 200Kb. No obstant, actualment existeixen sondes d'oligonucleòtids sintetitzades *in silico* marcades amb fluorescència, que identifiquen alteracions a partir de 50Kb. D'aquesta manera, es poden confirmar les CNVs de longitud petita a la vegada que es pot identificar la seva localització. S'agilitza el procés de la tècnica de FISH ja que no s'ha de realitzar el cultiu, la digestió i el marcatge de la sonda. És de gran importància determinar la presència de reorganitzacions (translocacions i inversions) pel correcte consell genètic als familiars, doncs els portadors tenen un risc elevat de recurrència.

La tècnica de MLPA té l'avantatge que utilitza sondes d'oligonucleòtids amb una seqüència d'hibridació de mínim 20pb i a més a més permet la confirmació de diverses CNVs en una única anàlisi. Malgrat que s'han hagut de redissenyar el 4% de les sondes, la tècnica de MLPA ha permès confirmar els resultats de CMA de manera més ràpida que la tècnica de FISH.

4.3 . Avaluació de l'estratègia d'anàlisi genètica

La DI i els TP són trastorns complexos amb una forta base genètica. El coneixement d'aquestes patologies ha avançat ràpidament al llarg dels darrers anys amb l'aparició de noves tecnologies d'alta resolució que posen de manifest la contribució d'alteracions genètiques associades, entre elles les CNVs. La cohort de 100 pacients adults amb diagnòstic dual de DI lleu-moderada i TP/TC presenta anomalies genètiques amb una possible contribució en el fenotip en el 38% dels casos (Hochstenbach et al. 2009; Taylor et al. 2010), freqüència elevada que pot explicar-se per dues raons. En primer lloc tracta d'una cohort de pacients afectats de dues patologies amb una elevada co-morbiditat solapament genètic (Cooper et al. 2007; Lowe et al. 2007; Morgan et al. 2008; Zhu et al. 2014) suggerint que el criteri d'inclusió de diagnòstic dual

incrementa la probabilitat d'identificar CNVs. I en segon lloc, el fet que la longitud de les CNVs no s'hagi considerat com a factor limitant per la seva classificació ha permès considerar CNVs de longitud inferior a 500Kb com a probable causa genètica en el 21% (8/38) dels individus. Malgrat que encara no hi ha suficients dades sobre la seva contribució en el context clínic, s'ha determinat un increment en la càrrega de les CNVs <500Kb en els TND respecte a la població control (Pinto et al. 2010; Mannik et al. 2015).

L'aplicació de l'estratègia d'anàlisi genètica seqüencial ha permès determinar el rendiment diagnòstic de cadascuna de les tècniques utilitzades, essent similar al descrit a la literatura pel cariotip convencional (4%) i pel cribatge de regions subtelomèriques amb MLPA (3,6%)(Sutherland et al. 1976; Jacobs et al. 1978; Shevell et al. 2003; Guitart-Feliubadalo et al. 2006; Boggula et al. 2014; Santa Maria et al. 2015). En canvi, el rendiment diagnòstic de la tècnica de CMA (26,7%) en la població d'adults és superior a la freqüència diagnòstica mitjana establerta en estudis per la identificació de la base genètica de la DI (13,6%) (Taylor et al. 2010; Baker et al. 2012; Willemsen et al. 2014). Tot i que s'excloquin els tres individus amb alteracions cromosòmiques identificades amb bandes G, la taxa de detecció es manté superior a la descrita, sent del 24,1%. Existeix, però, una gran variabilitat que oscil·la des del 9% fins al 50% en les dades publicades(Hochstenbach et al. 2011). Si ens centrem en dues de les sèries més grans publicades en DI fins a l'actualitat, el mapa de morbiditat de CNVs descrit per un grup americà l'any 2011 determina una freqüència del 14,2% (Cooper et al. 2011) mentre que l'estudi d'una població del Regne Unit determina una freqüència del 25%(Ahn et al. 2013).

Aquesta gran variabilitat és conseqüència de les diferències en la resolució del CMA utilitzat, del nombre d'individus inclosos dels criteris de selecció dels pacients. En poblacions pediàtriques, la valoració del funcionament cognitiu es veu condicionat per la pròpia edat. En els infants ambdèficit del desenvolupament no es poden aplicar qüestionaris específics per establir el QI i en alguns casos el funcionament cognitiu podrà resultar normal en l'adolescència i en edat adulta (Taylor et al. 2010). La variabilitat en la freqüència diagnòstica també pot explicar-se per la realització prèvia d'estudis cromosòmics i moleculars específics. En aquest estudi s'han emprat tècniques moleculars dirigides a la confirmació de la sospita clínica d'una síndrome específica. D'aquesta manera, s'han identificat 14 síndromes clínicament reconegudes, vuit de les quals estan causades per CNVs. Si el CMA s'hagués aplicat com a primera tècnica en l'estudi de la cohort, tal i com es proposa en la DI inespecífica, el TEA

DISCUSSIÓ

i els defectes congènits no sindròmics (Kearney et al. 2011), la taxa de detecció de CNVs amb possible contribució en el fenotip augmentaria del 24,1% al 31% dels casos. D'aquests, el 61,3% (19/31) presenten CNVp i el 38,7% (12/31) presenten VOUSpp, pel que els criteris de classificació són un factor que també intervé en el rendiment diagnòstic.

Al llarg del desenvolupament d'aquesta tesi han millorat els protocols i les eines bioinformàtiques facilitant la implementació del CMA al laboratori i actualment s'utilitza com a tècnica diagnòstica de primera línia per l'abordatge de la DI (Manning et al. 2010). En la pràctica clínica, s'aconsella emprar aCGH amb un enriquiment de sondes en regions conegudes associades a clínica i amb una menor resolució en regions sense significació clínica coneguda, que poden conduir a confusió.

Així doncs, al laboratori s'ha implementat una nova estratègia per l'abordatge de la DI i els TP. La primera eina del cribatge del genoma en la DI inespecífica és el CMA (Figura 4.1), tot i que en cas d'una sospita clínica d'una síndrome específica es procedeix a realitzar tècniques moleculars dirigides a la seva confirmació. Posteriorment al CMA, i en cas de no identificar una causa genètica, el criatge de la SXF permet descartar la segona causa més comuna de DI.

La tecnologia de NGS emergent està revolucionant el camp de la recerca de la DI i els TP, ja que incrementa un 10% el diagnòstic genètic gràcies a la identificació de mutacions puntuals (2015; Grozeva et al. 2015), i esdevé una nova eina en l'estratègia diagnòstica. En els casos sense un diagnòstic genètic, es procedeix a la seqüenciació de les regions codificants del genoma (exoma) i s'aplica un filtratge per l'anàlisi dels gens candidats per DI o bé directament es realitza la seqüenciació dirigida als gens que es volen analitzar (panells).

La seqüenciació del genoma complet permet la detecció de VE juntament amb l'anàlisi de mutacions puntuals (Yoon et al. 2009; Abecasis et al. 2010; Sudmant et al. 2010; Hormozdiari et al. 2011; Mills et al. 2011; Talkowski et al. 2011; Xi et al. 2011; Zhu et al. 2012) i podria arribar a substituir al CMA, però encara no es disposa de les eines i el coneixement suficient per l'anàlisi i la interpretació de la gran magnitud de dades que proporciona aquesta tècnica a la pràctica clínica.

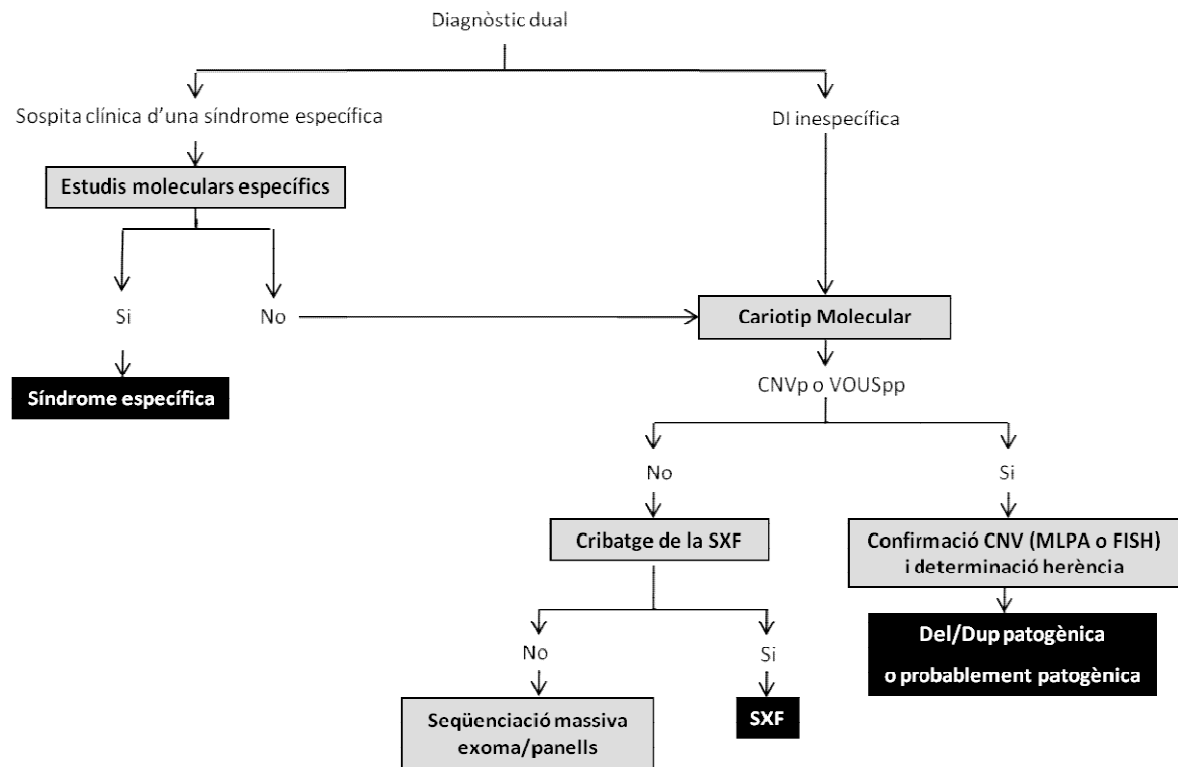


Figura 4.1: Nou algoritme proposat per l'estudi genètic de la discapacitat intel·lectual i/o diagnòstic dual

4.3.1. Contribució de les variants en nombre de còpies a la discapacitat intel·lectual i als trastorns psiquiàtrics/conductuals

En la cohort de 100 pacients, 12 casos presenten una CNV recurrent (síndromes de microdeleció, dup15q11q13, del15q13.3, del16p12.2p12.1 i del 22q13) i 19 casos presenten CNVs no recurrents, on s'inclouen des d'alteracions cromosòmiques amb més de 100 gens fins a CNVs de 24,5Kb amb alteracions intragèniques. La distribució d'aquestes CNVs no és uniforme al llarg del genoma (Figura 4.2), d'acord amb el que s'ha descrit en població amb DI (Coe et al. 2014) i en població sense fenotip advers (Zarrei et al. 2015). Hi ha agrupacions en determinades regions de seqüència repetitiva. Els LCR participen en el mecanisme de NAHR responsable de deleccions i duplicacions recurrents, mentre que la resta de CNVp i VOUSpp presenten elements repetitius (SINE, LINE, Alu, etc.) implicats en la formació dels guanys i pèrdues de material mitjançant mecanismes de microhomologia (Conrad et al. 2010).

DISCUSSIÓ

Els vuit individus amb síndrome de microdeleció clínicament reconeguda presenten una dismòrfia i TC característics de cadascuna de les síndromes i també un TP. En els quatre individus amb SVCF, una de les síndromes de microdeleció més comunes (Tezenas Du Montcel et al. 1996; Oskarsdottir et al. 2004), es presenta una elevada freqüència d'SQZ o trastorn esquizoefectiu. En dos casos, la deleció 22q11.2 és heretada i els portadors manifesten un trastorn psicòtic (Shprintzen et al. 1992). Els dos individus de la cohort afectats amb SPW per microdeleció de la regió 15q11q13 presenten un comportament compulsiu per la ingesta d'aliments, característic d'aquesta síndrome, i el diagnòstic d'un TP co-mòrbid en ambdós pacients és habitual. Tant l'SQZ com el trastorn depressiu major sense símptomes psicòtics han estat prèviament descrits (Sinnema et al. 2011). En el cas del SSM, el comportament autoagressiu, les rebequeries i la impulsivitat són conductes associades a la síndrome (Elsea et al. 2008). I, finalment, el diagnòstic de TB en la pacient amb SW és poc freqüent (Salgado et al. 2014) sent el TDAH i el trastorn d'ansietat els TP habitualment descrits (Green et al. 2012; Salgado et al. 2014). Cada vegada és més coneguda la co-existència de TP en les síndromes clínicament reconegudes.

Per identificar noves regions candidates en la DI i/o TP, ens centrem en els 86 individus amb DI inespecífica, 23 dels quals presenten CNVp o VOUSpp.

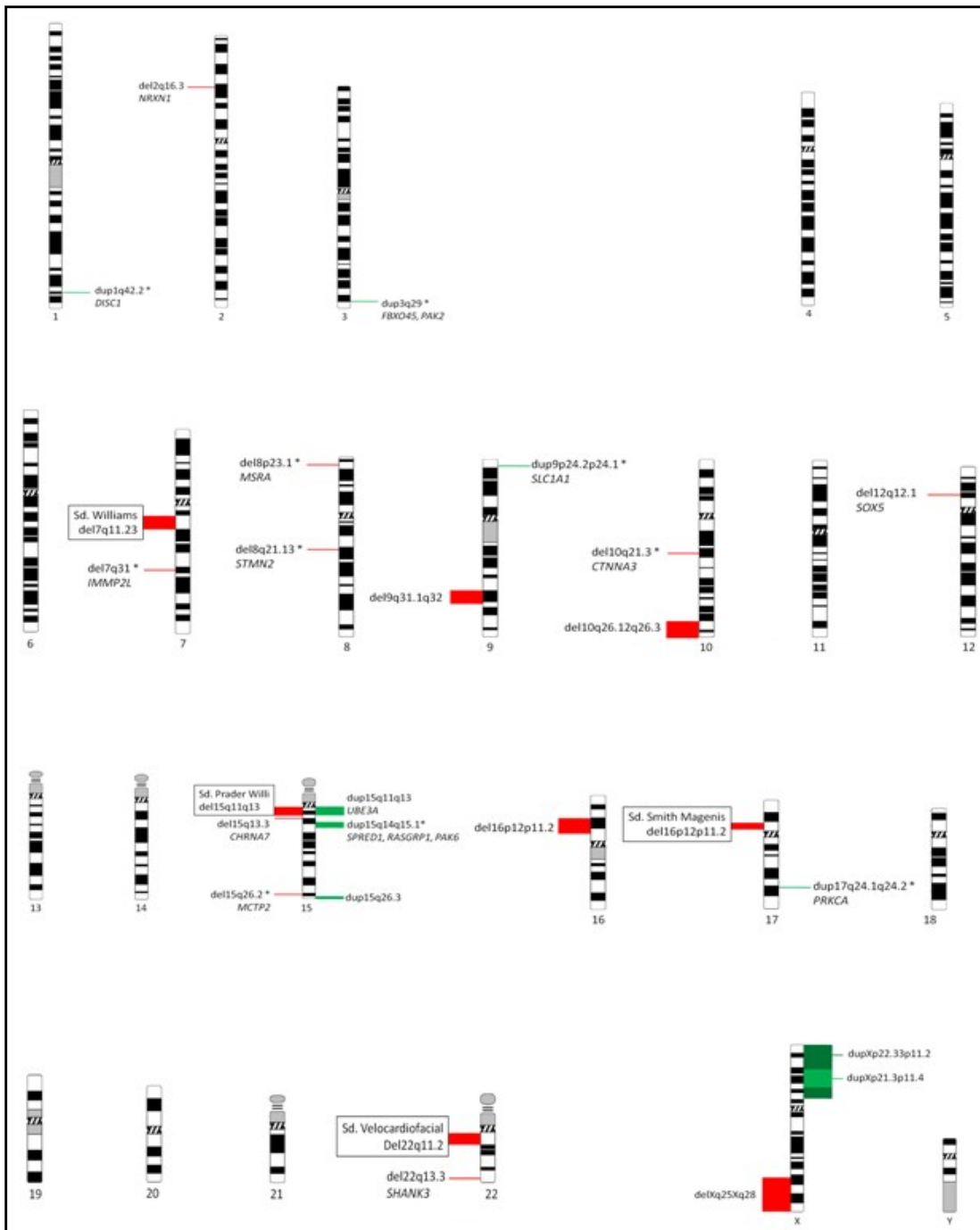


Figura 4.2: Mapa de CNVs en la cohort d'adults amb diagnòstic dual

Es representen les deleccions (vermell) i les duplicacions (verd) de les síndromes clínicament reconegudes (requadres), de les CNVs i de les VOUSpp (*), indicant la banda citogenètica afectada i el gen candidat.

4.3.1.1. Variants en nombre de còpies recurrents

Cromosoma 15: dup15q11q13 i del 15q13.2q13.3 (Taula 3.8 pàgina 100)

La regió proximal del cromosoma 15 és una de les més inestables del genoma degut a la presència de sis seqüències LCR amb tendència a aparellar-se mitjançant el mecanisme de NAHR i produint delecions i duplicacions (Figura 4.3). Entre els punts de trencament BP2 i BP3 es localitzen gens sotmesos a impronta genòmica, *MKRNA3*, *MAGEL2*, *NDN*, *PWRN2*, *c15orf12* i *SNURF-SNPRN* amb una expressió paterna i els gens *UBE3A* i *ATP10A* amb una expressió materna. Les delecions d'origen patern són responsables de la SPW mentre que les delecions d'origen matern donen lloc a la SA. Les duplicacions també tenen una manifestació clínica diferent en funció de l'origen parental. La duplicació 15q11q13 entre BP2 i BP3 d'origen matern identificada en el pacient 98 s'ha associat a un fenotip caracteritzat per DI, autisme, convulsions i hipotonia però també s'ha identificat en individus amb SQZ i TB determinant una expressió variable (Cook et al. 1997; Schroer et al. 1998; Bolton et al. 2001; Thomas et al. 2003; Sahoo et al. 2005; Piard et al. 2010; Ingason et al. 2011). La seva freqüència estimada és del 0,3% dels individus amb autisme (Depienne et al. 2009). El segment duplicat inclou el gen *GABRB3* que codifica per una subunitat d'un canal de clor complex amb acció inhibidora en la neurotransmissió del sistema nerviós. Existeixen evidències de la implicació de les vies GABAèrgiques en l'autisme (Fatemi et al. 2009; Pizzarelli et al. 2011; Chen et al. 2014). No obstant, l'expressió bial·lèlica de *GABRB3* contrasta amb el fet que el fenotip característic de la duplicació 15q11q13 s'ha identificat generalment en casos d'origen matern, mentre que les duplicacions paternes habitualment presenten un fenotip normal. Recentment s'ha reportat una duplicació que inclou únicament al gen *UBE3A* que segrega en tots els individus afectes de DI i TP en una família de quatre generacions heretada per via materna. La sobreexpressió d'*UBE3A* suggereix aquest gen com a candidat pels problemes del neurodesenvolupament i fenotip psiquiàtric en la duplicació intersticial materna 15q11q13 (Noor et al. 2015).

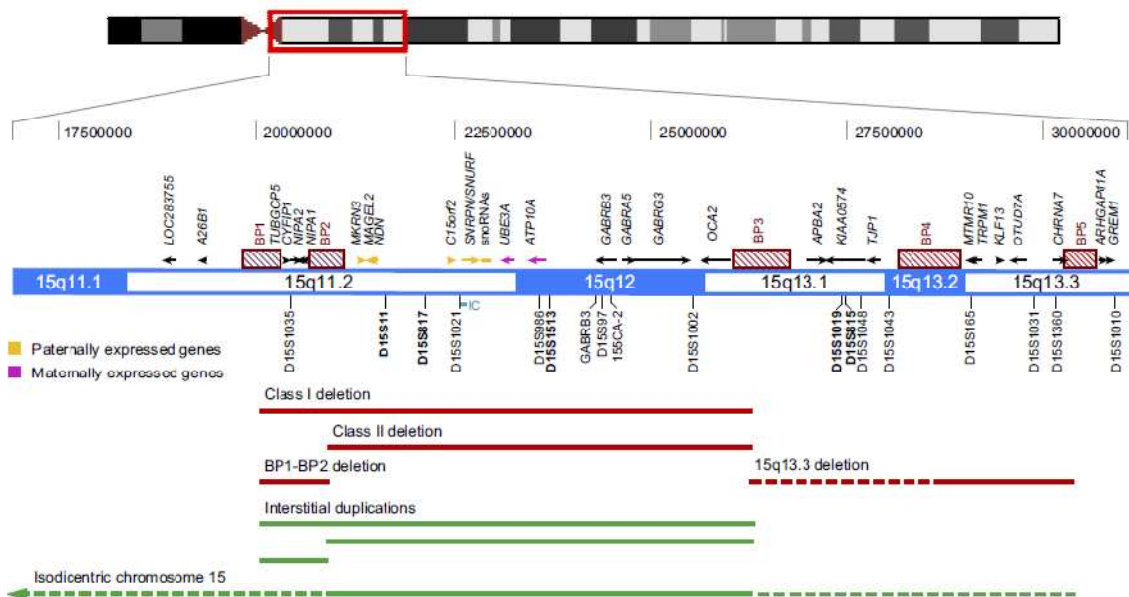


Figura 4.3: Representació de la regió 15q11q13

(BP) Punts de trencament. Delecions de classe I (BP1-BP3) i de classe II (BP2-BP3) associades a síndrome de Prader Willi (origen patern) i Angelman (origen matern). Duplicacions BP1-BP3/BP2-BP3 d'origen matern associades a autisme i trastorns del neurodesenvolupament. Deleció 15q13.3 (generalment BP4-B5, però també amb algunes delecions que presenten BP3 com a punt proximal de trencament) amb fenotip variable. Imatge obtinguda de (Depienne et al. 2009).

La deleció a 15q13.3 descrita per primera vegada l'any 2008 està associada a DI i convulsions (Sharp et al. 2008) i s'ha relacionat amb diferents trastorns, incloent defectes congènits, SQZ, epilèpsia, TC, TDAH i TEA. Un 75% dels casos presenta un patró d'herència dominant amb penetrància incompleta i expressivitat variable (Gillentine et al. 2015). La deleció 15q13.2q13.3 present en el pacient 14 localitzada entre els punts de trencament BP4 i BP5 és la més comuna de les variants (Figura 4.3). Inclou el gen *CHRNA7* que codifica per una subunitat de receptors nicotínics transmembrana $\alpha 7$ amb elevats nivells d'expressió a cervell, implicat en la transmissió i transducció de senyal sinàptica i regula la inhibició i excitació de neurotransmissors. Està implicat en la plasticitat sinàptica associada a l'aprenentatge, memòria i atenció (Schaaf 2014). Alteracions en aquest gen (delecions, duplicacions i mutacions puntuals) s'han associat a un ventall de TP suggerint que és un gen dosi sensible pel desenvolupament normal del cervell. El pacient presenta DI, dismòrfia lleu, TC i trastorn de l'estat d'ànim. En canvi, no presenta convulsions, epilèpsia ni electroencefalograma anòmal, característiques descrites en el 37,2% (Gillentine et al. 2015). Aquesta gran variabilitat en les

DISCUSSIÓ

manifestacions clíniques pot explicar que el seu reconeixement clínic sigui difícil, malgrat ser una alteració amb una prevalença del 0,3% (similar a altres síndromes clínicament reconegudes).

Deleció 16p12.3p12.1 (Taula 3.8 pàgina 100)

La regió pericentromèrica del cromosoma 16 també té una estructura complexa enriquida amb elements repetitius tipus LCR, que indueixen a reorganitzacions mediate per NAHR produint CNVs de diferent longitud amb una elevada freqüència (Figura 4.4), com la deleció 16p12.3p12.1 identificada en la pacient 9 de 10,3Mb que inclou més de 100 gens coneguts. L'any 2007 es van descriure quatre individus amb DI i dismòrfia en els que s'identifica una deleció 16p11.2p12.2 (OMIM:313604) amb una regió mínima de solapament de 7,1Mb (Ballif et al. 2007). Posteriorment, es va descriure la deleció 16p12.1 (OMIM:136570) associada a trastorns del desenvolupament i aprenentatge en nens amb un fenotip variable que inclou defectes cardíacs, convulsions i anomalies del creixement, mentre que en adults s'identifica en individus amb SQZ, problemes d'aprenentatge, depressió, TB i convulsions (Girirajan et al. 2010). Per altra banda, microdeleccions i microduplicacions (OMIM:611913 i OMIM:614671 respectivament) més petites d'aproximadament 555Kb a 16p11.2 confereixen susceptibilitat per TEA en l'1% dels pacients (Fernandez et al. 2010) tot i que també es troben presents en població general. La DI moderada, la talla baixa, la presència de defectes congènits i d'una dismòrfia lleu en la pacient són característiques descrites prèviament, encara que no existeix un patró dismorfològic específic. La variabilitat en l'expressió, juntament amb la penetrància incompleta, en dificulten el reconeixement clínic.

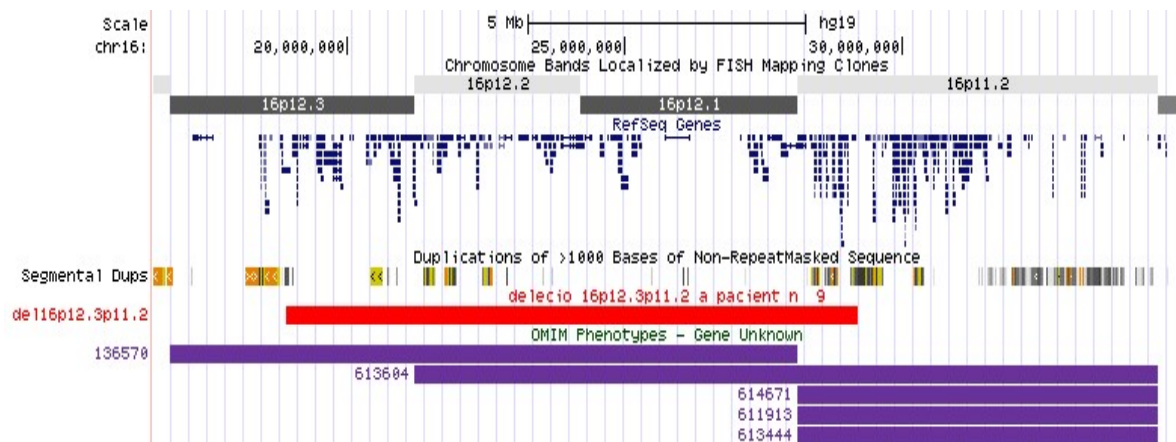


Figura 4.4: Regió pericentromèrica del cromosoma 16

La deleció present en la pacient 9 (línia vermella) estar flanquejada per duplicacions segmentàries i solapa amb alteracions descrites a OMIM (línies liles) associades a trastorns del neurodesenvolupament.

Deleció 22q13.33 (Taula 3.8 pàgina 100)

La deleció 22q13 és responsable de la síndrome Phelan McDermid (PhMcD) i és la segona alteració subtelmèrica més comuna en individus amb DI després de la deleció 1p36 (Ravnan et al. 2006). La dismòrfia lleu, la DI moderada, l'autisme i les conductes agressives observades en la pacient 18 són trastorns associats a aquesta síndrome. El CMA de la deleció determina que la última sonda amb dosi normal es localitza entre els exons 3 i 4 del gen *SHANK3* i la primera sonda amb una \log_2 ratio inferior a -0,25 es localitza entre els exons 9 i 10 (Figura 4.5). Entre aquestes dues sondes es localitzen dos segments de DNA repetitiu que podrien veure's implicats en recombinacions amb els nucleòtids repetitius de la seqüència terminal. La caracterització molecular dels punts de trencament en tres individus no emparentats identifica que el segment localitzat entre els exons 8 i 9 està implicat en les tres alteracions, suggerint-lo com a *hotspot* (Wong et al. 1997; Bonaglia et al. 2006).

Les delecions descrites en el SPhMcD tenen una longitud des de 95Kb fins a 9Mb, amb una regió mínima de solapament de 100Kb amb el gen *SHANK3* com a candidat pels defectes neurològics. Delecions intersticials d'aquest gen s'han associat a un fenotip amb DI i dèficit de llenguatge (Bonaglia et al. 2011) i mutacions puntuals s'han identificat en el 0,5% de pacients amb TEA en els quals s'observa una variabilitat fenotípica (Moessner et al. 2007; Waga et al. 2011) i en individus amb SQZ i DI (Gauthier et al. 2010). Forma part d'una família de proteïnes

DISCUSSIÓ

localitzades a densitat postsinàptica, formades per cinc dominis conservats que permeten la interacció amb receptors de glutamat. *SHANK3* presenta múltiples promotors intragènics i *splicings* alternatius produint una gran diversitat d'isoformes amb expressió cerebral específica al llarg del desenvolupament del sistema nerviós central, distribució subcel·lular específica i regulades a través de l'activitat neuronal suggerint una funció sinàptica diferent per cada isoforma que explicaria la diversitat fenotípica (Wang et al. 2014).

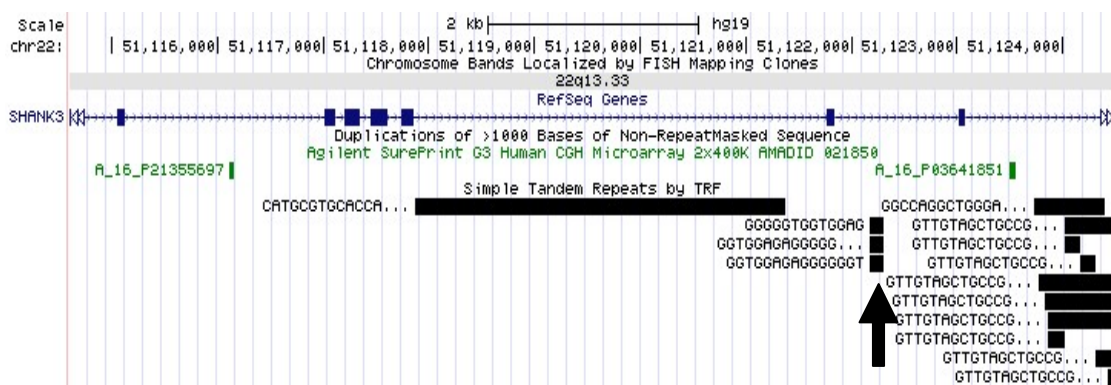


Figura 4.5: Regió 22q13.33

Representació de la localització del punt de trencament de la deleció identificada a la pacient 18. En verd es senyalen els oligonucleòtids inclosos al panell de CMA: A_16_P21355697, la última sonda de CMA amb dosi normal; A_16_P03641851, la primera sonda delecionada. En negre es representen els segments de DNA repetitiu i la fletxa senyala la regió *hotspot* proposada per Bonaglia et al. 2006.

4.3.1.2. Variants en nombre de còpies no recurrents

La deleció 9q31.1q32 (8,8Mb), la deleció 10q26.1q26.3 (13Mb), la duplicació 15q26.3 (3Mb), la duplicació Xp i la deleció Xq són alteracions cromosòmiques clarament associades al fenotip (Roggenbuck et al. 2004; Kulharya et al. 2008; Piccione et al. 2008; Mucciolo et al. 2014). La seva longitud i el gran contingut genètic impedeix identificar un gen candidat. La presència de dues CNVs amb una possible contribució en el fenotip, la deleció 10q26.12q26.3 i la duplicació 15q derivades d'una translocació recíproca (10;15) equilibrada a línia germinal, és un exemple de l'efecte de diferents alteracions en un mateix individu que en modulen el fenotip i participen en la seva heterogeneïtat (Quintela et al. 2015). Un altre exemple és la deleció Xp i la duplicació Xq, provinents d'una inversió pericèntrica. El cromosoma X derivatiu es presenta en una pacient amb una elevada càrrega familiar de DI, suggerint que la inversió s'ha transmès al llarg de les generacions de forma desequilibrada en els individus afectats. Però l'anàlisi genètic descarta aquesta hipòtesi, pel que en una mateixa família poden haver-hi diferents factors genètics implicats (Bonnet-Brilhault et al. 2015).

La deleció de 2,8Mb a 12p12.1 solapa amb deleccions de longitud superior descrites en individus amb retràs psicomotor, microcefàlia i dismòrfia facial (Hoppe et al. 2014). Inclou un total de 14 gens, però en aquest cas es destaca el gen *SOX5* ja que s'han descrit deleccions d'entre 72KB i 466KB que inclouen únicament aquest gen en individus amb DI, TP i TC (Lamb et al. 2012). És un factor de transcripció amb tres trànscrips principals implicats en el desenvolupament embrionari i determinació del destí cel·lular. S'ha suggerit com a possible candidat per TEA (Rosenfeld et al. 2010) i la identificació d'una mutació en un individu amb DI moderada, ansietat i dismòrfia dona suport a que *SOX5* pugui ser candidat per aquests trastorns (Nesbitt et al. 2015). La retrognàtia, la base nasal ampla i la conducta agressiva present en la pacient de la cohort d'adults són característiques comunes a les descrites prèviament, mentre que per primera vegada s'observa una co-morbiditat amb TOC.

4.3.1.2.1 . Variants en nombre de còpies a la mateixa regió cromosòmica en individus no emparentats: del2p16.3 i del7q31

En una població de 100 individus amb heterogeneïtat fenotípica es considera una troballa rellevant la identificació de CNVs compartides en individus no emparentats de les quals encara es desconeix la seva freqüència. Tot i que els punts de trencament en cada cas són diferents, en ambdues regions s'altera l'estructura d'un únic gen, el qual es considera responsable del fenotip dels pacients. Probablement, l'elevat contingut de seqüències repetitives intercalades tipus LINE, SINE i Alu en ambdues regions cromosòmiques participen en la formació de les CNVs.

Deleció 2q16.3: *NRXN1* (Taula 3.8 pàgina 100)

La regió 2p16.3 inclou el gen *NRXN1* que codifica per receptors de superfície cel·lular localitzats a regió presinàptica i que interaccionen amb elements extracel·lulars (neuroligines, proteïnes neuronals transmembrana riques en leucina, cerebelines i distroglicans) per a formar complexes dependents de calci en les sinapsis del sistema nerviós central. Aquests complexes són essencials per a la formació dels contactes pre-sinàptics i la neurotransmissió (Reissner et al. 2008; Missler et al. 2012). La seqüència del gen conté dos promotors de localització molecular diferent que donen lloc a dues isoformes principals, una isoforma llarga (α -*NRXN1*) i una isoforma curta (β -*NRXN1*), amb *splicings* que donen lloc a una heterogeneïtat proteica estimada de 292 possibles trànscripats amb una variabilitat d'expressió en el cervell (Rowen et al. 2002). Les delecions identificades en dos individus adults no emparentats presenten punts de trencament diferents (Figura 3.17 pàgina 111) afectant les dues isoformes principals en el pacient 94, mentre que en la pacient 55 només afecta la isoforma llarga. Les manifestacions clíniques en la isoforma curta apareixen en menys freqüència en comparació als problemes que apareixen en la isoforma llarga (Duong et al. 2012; Dabell et al. 2013), però no hi ha una correlació amb una clínica específica. De fet, delecions d'ambdues isoformes s'han descrit en individus amb DI, dèficit de llenguatge, dèficit del desenvolupament i hipotonia (Bena et al. 2013) amb una variabilitat en la descripció dismorfològica. En els dos individus de la cohort es descriu per primera vegada unes característiques dismòrfiques comunes: cara llarga, ulls enfonsats, prominència premaxilar, hipertelorisme, implantació baixa de les orelles, paladar alt i estret i cifosi dorsal (Vinas-Jornet et al. 2014). Ambdós casos presenten un diagnòstic dual de

DI lleu i TP, malgrat que el diagnòstic psiquiàtric és diferent, però està d'acord amb la gran diversitat dels TP associats a l'haploinsuficiència de *NRXN1*: TEA, ansietat, depressió, TB, TDAH i SQZ(Wisniewiecka-Kowalnik et al. 2010; Schaaf et al. 2012; Noor et al. 2014).

Tot i que la prevalença de delecions a *NRXN1* en pacients és superior respecte població control (Schaaf et al. 2012), s'han identificat alteracions freqüents en població control (Redon et al. 2006) i s'ha identificat un elevat percentatge de casos heretats de progenitors sans (Bena et al. 2013) suggerint una penetrància incompleta que s'ha estimat del 33%(Duong et al. 2012; Kirov 2015). En els casos previs reportats no s'ha realitzat una avaluació psicològica i psiquiàtrica dels portadors. L'avaluació dels familiars portadors de la delecio d'un cas pediàtric juntament amb la mare portadora del pacient 94 revela un QI entre 69 i 91 (normal-límit), trastorns de personalitat i de conducta, en particular ansietat i impulsivitat, i un patró cognitiu caracteritzat per una síndrome disexecutiva amb símptomes similars als presents en els dos pacients adults (Taula 3.9pàgina112). Els elevats nivells d'ansietat concorden amb l'elevada freqüència de conducta ansiosa observada en models animals (Grayton et al. 2013). Així doncs, queda palès que l'haploinsuficiència d'aquest gen afecta a tots els portadors amb diferents nivells d'expressió, suggerint una variabilitat en l'expressió fenotípica enlloc d'una penetrància incompleta(Vinas-Jornet et al. 2014). Aquest fet posa de manifest la necessitat d'avaluar clínicament als portadors de les alteracions per confirmar la seva condició de sa abans de determinar la patogenicitat d'una CNV.

Delecions 7q31: *IMMP2L* (Taula 3.10 pàgina 117)

Delecions a 7q31 afectant al gen *IMMP2L* s'han identificat en tres individus no relacionats en la cohort d'adults. El gen *IMMP2L* amb expressió a cervell fetal i de l'adult, entre altres teixits, codifica per subunitats de la membrana interna del complex peptidasa, que catalitza l'eliminació de senyals peptídiques necessàries pel transport de proteïnes des de la matriu mitocondrial fins a l'espai intermembrana, i està implicat en el metabolisme energètic i oxidatiu del mitocondri. El dèficit de proteïna dona lloc a una hiperactivitat mitocondrial amb una producció incrementada de superòxid que promou l'activació de les vies de mort cel·lular. La regió 7q22q31 i concretament el gen *IMMP2L* s'ha identificat en estudis de lligament del genoma complet com a factor de risc pel TEA (Maestrini et al. 2010; Pagnamenta et al. 2010; Girirajan et al. 2011; Casey et al. 2012), TDAH (Elia et al. 2010) i desordres del llenguatge (Lai et

DISCUSSIÓ

al. 2001) i un estudi recent ha identificat tres delecions i una duplicació del gen en individus amb TND amb una variabilitat en l'expressió (Gimelli et al. 2014). La delecio identificada en tres individus no emparentats té una localització molecular diferent en cada pacient (Figura 4.6, Taula 4.1). En els pacients 32 i 151, amb DI moderada i TP (trastorn d'estrés post-traumàtic i TOC respectivament), s'ha classificat com a VOUSpp ja que inclou regió codificant; exons exons 1-2 en el pacient 32 i exons 1-4 en el pacient 151. En canvi, la delecio en la pacient 115 es classifica com a VOUSpb seguint els criteris de classificació establerts ja que afecta a regió intrònica, però cal tenir en compte el diagnòstic de síndrome Gilles de la Tourette (SGT) en aquesta pacient. El gen *IMMP2L* s'ha descrit com a possible candidat per aquesta patologia i un estudi recent ha identificat una delecio a *IMMP2L* en set pacients amb SGT, dues dels quals tenen una localització molecular similar a la que presenta la pacient afectant únicament a la mateixa regió intrònica (Bertelsen et al. 2014). Aquests autors descriuen un transcrit alternatiu amb dos exons alternatius localitzats a la regió intrònica delecionada (Figura 4.6) amb una expressió específica de cervell, mentre que l'expressió pel transcrit NM_001244606 és ubíqua. Aquests resultats posen de manifest que les alteracions en regions intròniques han de ser avaluades més exhaustivament per identificar la possible presència de transcrits alternatius no descrits, factors d'inici de la transcripció i seqüències reguladores que puguin intervenir en la patogenicitat de la CNV (Qiao et al. 2014).

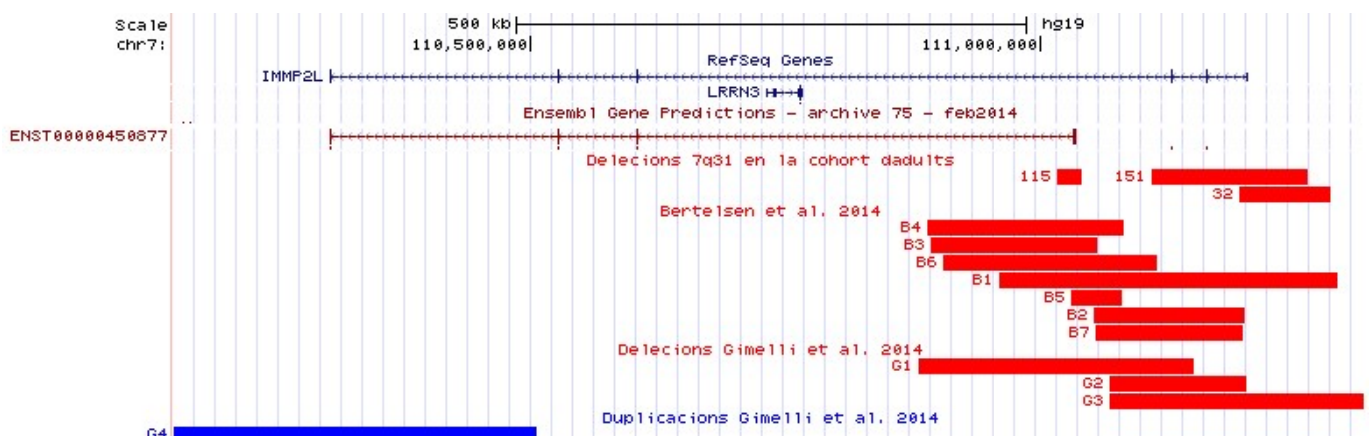


Figura 4.6: Regió 7q31

Es mostren la isoforma NM_001244606 (RefSeq Genes) i la isoforma descrita per Bertelsen et al 2014 (Ensembl Gene Prediction) del gen *IMMP2L*. Representació de les CNVs (línies vermelles: delecions; línia blava: duplicació) identificades a la cohort d'adults, juntament amb les descrites per Bertelsen et al.2014 i Gimelli et al. 2014

Taula 4.1: Informació general de les tres deleccions 7q31 i recull d'onze CNVs descrites a la literatura

Id	S	Síntomes	CNV	Punts de trencament [hg19]	Longitud (Kb)	Exons NM_0012606	Exons transcrit alternatiu*	H
32	H	DI moderada, TEPT, dismòrfia	del	111195151-111283170	88	1, 2	-	M
B1 ¹	H	SGT i TDAH	del	110959798-111290945	331	1, 2, 3, 4	1, 2	P
G2 ²	H	DP, DL, TC, epilèpsia, hipotonia, TEA	del	111066736-111201968	152	3, 4	-	P
G3 ²	H	DP, DL, epilèpsia, hipotonia	del	111066736-111316651	249	1, 2, 3, 4	-	P
151	H	DI moderada, TOC, autisme, agressivitat i dismòrfia	del	111108961-111261634	152	1, 2, 3, 4	-	M
G1 ²	D	Nistagmus i dismòrfia	del	110879586-111149166	269	4	1, 2	P
B4 ¹	H	SGT i TOC	del	110889476-111080538	191	-	1, 2	P
B3 ¹	H	SGT, TDAH i Asperger	del	110892600-111055300	163	-	1, 2	M
B6 ¹	H	SGT, TDAH i TOC	del	110904173-111113977	210	-	1, 2	P
115	D	DI lleu, SGT, dismòrfia	del	111015303-111040146	25	-	1, 2	NA
B5 ¹	H	SGT	del	111029575-111079376	49	-	1, 2	NA
B2 ¹	H	SGT i TDAH	del	111051907-111199868	148	3, 4	-	M
B7 ¹	H	SGT i TDAH	del	111054100-111197400	143	3, 4	-	P
G4 ²	H	DP, DL, hipotonia	dup	110135083-110505806	370	7	4	P

(Id) Identificador pacient; (S) Sexe; (H) Home; (D) Dona; (CNV) Tipus de variant en nombre de còpies; (del) Delecció; (dup) Duplicació; (Kb) Quilobases; (H) Herència; (M) Materna; (P) Paterna; (NA) No analitzada; (DI) Discapacitat intel·lectual; (TEPT) Trastorn d'estrés post-traumàtic; (SGT) Síndrome Gilles de la Tourette; (TDAH) Trastorn de dèficit d'atenció i hiperactivitat; (DP) Dèficit psicomotor; (DL) Dèficit del llenguatge; (TC) Trastorn de conducta; (TEA) Trastorn d'espectre autista; (TOC) Trastorn obsessiu-compulsiu; (*) ENST00000450877(1) (Bertelsen et al. 2014); (2) (Gimelli et al. 2014)

4.3.1.2.2 . Variants de significació clínica incerta probablement patogèniques

Seguint els criteris de classificació descrits a material i mètodes, s'han classificat com a VOUSpp aquelles CNVs que inclouen gens i/o regions prèviament descrits com a candidats per DI i/o TP, o bé inclouen gens amb funció a sistema nerviós malgrat que no s'hagin associat a patologia, identificant un total de 12 VOUSpp en 12 individus que corresponen a 8 regions. La identificació de deleccions a 7q31 en dos individus suggereix una forta implicació del gen inclòs en el fenotip, com ja s'ha comentat prèviament. La resta de VOUSpp es presenten en dos grups segons hi ha més o menys evidències de l'associació de la regió o del gen amb el fenotip: VOUSpp amb forta susceptibilitat i VOUSpp amb susceptibilitat dèbil.

VOUSpp amb forta susceptibilitat

Duplicació 3q29: *PAK2* i *FBXO45*(Taula 3.10 pàgina 117)

La duplicació 3q29 en homozigosisolapa parcialment amb la regió crítica de 1,6-1,7Mb responsable de les síndromes de microdeleció i microduplicació 3q29, amb punts de trencament flanquejats per LCR(Rossi et al. 2001; Lisi et al. 2008; Quintero-Rivera et al. 2010). S'han descrit 12 duplicacions a 3q29 amb una extensió des de 200Kb fins a 2,4Mb en les que els punts de trencament no concorden amb els LCR, pel que es suggereix que, a més a més de la NAHR, altres mecanismes participen en la formació de CNVs en aquesta regió (Ballif et al. 2008). No s'han identificat gens candidats en el segment duplicat de 492Kb, però s'inclouen dos gens amb funcions rellevants que podrien estar implicats en el fenotip. Per una banda, el gen *PAK2*, homòleg al gen *PAK3* associat a DI lligada al cromosoma X, que codifica per una proteïna amb activitat serina/treonina quinasa reguladora de reordenaments al citoesquelet, proliferació cel·lular, migració i unió amb altres components cel·lulars que intervé en el desenvolupament dendrític de les neurones corticals embrionàries (Demyanenko et al. 2010). Té una expressió majoritària en cèl·lules endotelials i, a nivell cerebral, s'expressa únicament a substància blanca (regió amb funcions en el desenvolupament de la memòria de treball i l'habilitat en la lectura) (Mills et al. 2013). Per altra banda, el gen *FBXO45* altament conservat i d'elevada expressió a sistema nerviós central en les diferents etapes del desenvolupament, amb localització a regió pre- i post-sinàptica. La proteïna codificada regula la proteòlisi de N-caderina sota la regulació del calci promovent la diferenciació neuronal (Chung et al. 2014) i interacciona amb altres proteïnes permetent la formació d'un complex E3-ligasa fonamental pel desenvolupament de les neurones de sistema nerviós central i perifèric (Saiga et al. 2009). En ratolins, la sobreexpressió de *Fbxo45* dóna lloc a una disminució de la corrent post-sinàptica excitadora (Tada et al. 2010).

Existeixen pocs casos reportats per determinar la rellevància clínica d'aquestes duplicacions, les quals en moltes ocasions s'han heretat de pares aparentment sans o s'han observat juntament amb altres variants que poden contribuir en el fenotip. La història familiar del pacient 34 revela una elevada càrrega de DI. La severitat fenotípica es correlaciona amb el nombre de còpies de 3q29 en el *probandus* homozigot, afectat per DI lleu, trastorn d'estrés post-traumàtic i trastorns de conducta, i els progenitors i la germana heterozigots, els quals

presenten QI límit, suggerint que la regió 3q29 és un factor de risc per la DI amb sensibilitat de dosi. El germà amb duplicació en homozigosi mostra un fenotip de DI i TEA molt més greu que el del *probandus*. L'estudi de CMA en tots els individus revela la presència d'altres CNVs en els quatre membres de la família estudiats, cap de les quals amb rellevància clínica per si mateixa, però no es pot descartar la possible interacció entre les diferents CNVs. Pel germà petit amb fenotip més sever no es pot descartar la presència d'alguna mutació puntual en algun gen clau per la DI.

Duplicació 9q24.2q24.1: SLC1A1 (Taula 3.10 pàgina 117)

La duplicació 9p24.2p24.1 de 576Kb identificada en una parella de germans (pacients 122 i 123) amb DI moderada i TC inclou el gen *SLC1A1* que codifica per un transportador de glutamat dependent de sodi expressat a sistema nerviós central en el soma i en dendrites neuronals. Està implicat en la potenciació sinàptica mitjançant la regulació de la transmissió glutamatèrgica i la seva expressió en les primeres etapes del desenvolupament suggereix una funció important en el desenvolupament de les xarxes neuronals glutamatèrgiques, les quals estan fortament associades a SQZ i altres TP relacionats. S'ha descrit una possible implicació de *SLC1A1* en diverses patologies, incloent isquèmies, Alzheimer, SQZ, epilèpsia i TB esquizoefectiu (Myles-Worsley et al. 2013; Bianchi et al. 2014) i nivells alterats de la proteïna s'han associat a TP, identificant una disminució de l'expressió en individus amb TOC (Porton et al. 2013) i un increment de l'expressió en individus amb SQZ (Bauer et al. 2008). Aquestes dades suggereixen que és un gen dosi sensible implicat en una via important pel desenvolupament cognitiu. Duplicacions similars s'han descrit a *DECIPHER* en tres individus amb trastorns cognitius i conductuals.

Duplicació 15q14q15.1: SPRED1, RASGRP1 i PAK6(Taula 3.10 pàgina 117)

La duplicació 15q14q15.1 (pacients 59 i 60) de 2,7Mb és la VOUSpp de longitud més gran identificada a la cohort d'adults. De la vintena de gens inclosos en la variant, destaca el gen altament conservat *SPRED1*, que codifica per una proteïna que regula la via Ras/quinasa (MAPK) implicada en la plasticitat sinàptica i formació de la memòria. Mutacions en proteïnes de la via MAPK s'han associat a diferents síndromes amb fenotips solapants, anomenades

DISCUSSIÓ

rasopaties, entre les quals s'inclou la neurofibromatosi 1 (NF1). L'any 2007 es van identificar mutacions en el gen *SPRED1* en individus amb un fenotip similar a la NF1 caracteritzat per taques cafè en llet, pigues axil·lars, macrocefàlia i dismòrfia però sense presentar neurofibromes ni tumors a sistema nerviós central (Brems et al. 2007). Mutacions puntuals i algunes delecions d'aquest gen són responsables de la síndrome de Legius (SL) caracteritzada per taques cafè en llet i pigues, amb coexistència de problemes d'aprenentatge, DI, TDAH i autisme (Pasmant et al. 2009; Spencer et al. 2011). Les dades en ratolins *knockout* mostren que la pèrdua de funció d'aquest gen està implicada en defectes de l'aprenentatge i funció cognitiva (Denayer et al. 2008) però fins a l'actualitat no s'ha identificat cap guany de funció associat a patologia. La identificació de la duplicació en dos germans afectats de diagnòstic dual heretada d'un progenitor amb problemes cognitius suggereix una possible implicació de l'alteració en la clínica. El *pectus excavatum* present en ambdós germans i les pigues a tot el cos observades en un d'ells són característiques descrites en la SL. El segment 15q14q14.1, i en concret el gen *SPRED1*, podria tractar-se d'una regió dosi sensible.

Dins de la duplicació identificada, destaquen uns altres dos gens que poden influir en el fenotip: el gen *RASGRP1*, regulador del calci amb expressió a sistema nerviós descrit com a possible biomarcador pel TB (Kato et al. 2011), i el gen *PAK6*, amb una elevada expressió a córtex cerebral i hipocamp que s'associa a problemes d'aprenentatge i comportament en ratolins *knockout* (Furnari et al. 2013).

VOUSpp amb susceptibilitat dèbilDeleció 8p23.1: MSRA (Taula 3.10 pàgina 117)

La deleció 8p23.1 de 196Kb identificada al pacient 85 solapa amb la síndrome microdeleccional 8p23.1 de 3,4Mb que cursa amb una DI lleu i moderada, microcefàlia, anomalies cardíques congènites i trastorns del conductuals (Hutchinson et al. 1992; Claeys et al. 1997; Ballarati et al. 2011). Malgrat són pocs els individus reportats amb una caracterització molecular, s'ha descrit una regió de solapament de 2,3Mb i es suggereixen els gens *MSRA*, *SOX3* i *SOX7* com a responsables de la microcefàlia i la dismòrfia (Paez et al. 2008). La presència de microcefàlia i dismòrfia lleu en el pacient aporta noves evidències de la possible implicació del gen *MSRA* en aquestes característiques típiques de la síndrome de la microdelecció. Es tracta d'un gen altament conservat que codifica per un enzim antioxidant amb elevats nivells d'expressió a hipocamp i cerebel que actua com a mecanisme de defensa i reparació dels efectes de dany oxidatiu mitjançant la reducció de metionina sulfòxid a metionina. S'ha descrit com a candidat per SQZ (Walss-Bass et al. 2009; Ma et al. 2011) i TB (Ophoff et al. 2002) i alguns estudis en suggereixen una implicació en trastorns neurodegeneratius, observant una disminució de l'expressió en cervell de pacients amb Alzheimer (Gabbita et al. 1999) i identificant-lo com a possible diana terapèutica pels defectes locomotors en la malaltia del Parkinson (Wassef et al. 2007). El pacient presenta una CNV addicional, la duplicació 12q24.13, classificada com a VOUSpb segons els criteris establerts. Solapa amb CNVs similars descrites a DECIPHER com a VOUS en més de 20 individus en els que es reporten problemes globals del desenvolupament. S'inclouen tres gens: *ACAD10*, *ALDH2* i *MAPKAPK5*. *ACAD10* té elevats nivells d'expressió a cervell fetal i una localització mitocondrial, participant en el metabolisme d'àcids grassos, i *MAPKAPK5* és supressor de tumor amb activitat serina treonina quinasa implicat en la transducció de senyal. La disrupció de l'extrem 5' de *MAPKAPK5* i de l'extrem 3' d'*ACAD10* produiria una proteïna de fusió *ACAD10-MAKAPK5*. Una duplicació similar ha estat identificada en dues famílies amb TEA descartant la seva contribució en el fenotip ja que la caracterització del transcrit de fusió va mostrar un codó stop prematur que provoca la degradació de la proteïna (Holt et al. 2012), però seria necessari caracteritzar els punts de trencament de la duplicació identificada i realitzar estudis funcionals per determinar l'impacte d'aquesta duplicació en l'expressió gènica. No existeixen evidències suficients perquè la duplicació pugui

DISCUSSIÓ

ser classificada com a VOUSpp, però podria contribuir de manera additiva en el fenotip del pacient.

Deleció 8q21.13: STMN2 (Taula 3.10 pàgina 117)

La deleció 8q21.13 d'herència paterna (pacient 66) té una longitud de 731Kb i inclou 6 gens coneguts, destacant el gen *STMN2*, també anomenat *SCG10*. Codifica per una proteïna essencial pel procés de creixement implicada en la regulació de l'estabilitat dels microtúbuls en neurones corticals, promovent l'elongació de neurites, amb elevats nivells d'expressió neuronal durant el desenvolupament i en neurones sensorials de l'adult (Bondallaz et al. 2006). L'augment de la seva expressió observat en axons proximals post-lesió en ratolins el suggereix com a marcador per la regeneració d'axons (Shin et al. 2014). Les funcions descrites apunten a una possible implicació del gen en els TND, tot i que les haploinsuficiències descrites a la literatura són de longitud superior i suggereixen una regió candidata de localització proximal respecte a la identificada (Palomares et al. 2011). En aquest pacient és de destacar la presència d'una CNV addicional, la deleció 2p12 d'herència materna que afecta al gen *CTNNA2* amb elevats nivells d'expressió neuronal. Codifica una proteïna sinàptica reguladora de la morfologia, estabilitat i plasticitat sinàptica mitjançant l'associació a cadherines i implicada en la patogènesis del TDAH (Lesch et al. 2008) i SQZ (Mexal et al. 2008). Seguint els criteris establerts de classificació, aquesta CNV es considera VOUSpb ja que afecta únicament a regió intrònica. No obstant, cal tenir en compte que les alteracions en regions intròniques poden afectar l'expressió d'isoformes alternatives, com s'ha suggerit prèviament en el cas de la deleció 7q31, i per tant convindria caracteritzar els punts de trencament i definir l'efecte de la CNV en l'expressió del gen per determinar una possible contribució en el fenotip.

Deleció 10q23: CTNNA3 (Taula 3.10 pàgina 117)

La deleció 10q23 present en el pacient 82, amb DI moderada i TC, solapa amb una deleció descrita a *DECIPHER* en un individu afectat per problemes cognitius i conductuals. El germà del pacient, amb DI lleu, no és portador de la deleció. La CNV identificada només en un dels dos

germans amb DI té una longitud de 301Kb i inclou els exons 12-13 del gen *CTNNA3*, amb elevada expressió a hipocamp i córtex durant les primeres etapes del desenvolupament i implicat en la formació d'adhesions cèl·lula-cèl·lula. S'han descrit SNPs i CNVs associats a TEA (Wang et al. 2009; Weiss et al. 2009; Levy et al. 2011; Girirajan et al. 2012; O'Roak et al. 2012; Prasad et al. 2012) i s'ha identificat una associació amb Alzheimer (Miyashita et al. 2007). Un estudi genòmic en famílies amb TEA ha identificat un pacient amb deleció en heterozigosi composta heretada de dos progenitors sans portadors de la deleció, suggerint un model d'herència recessiva (Bacchelli et al. 2014). Tenint en compte que en l'actualitat s'està veient que els portadors d'algunes malalties recessives tenen algun tipus de manifestació clínica (Gianetti et al. 2012), es proposa l'existència d'una mutació puntual a l'al·lel homòleg que reduiria l'expressió del gen, esdevenint un factor de risc pel fenotip lleu. La presència d'una deleció suposaria una pèrdua completa de l'expressió i provocaria un fenotip agreujat. Per poder determinar la correlació genotip-fenotip seria necessari la seqüenciació de tots els membres de la família, però això no és factible per la manca de disponibilitat dels progenitors.

Deleció 15q26.2: *MCTP2* (Taula 3.10 pàgina 117)

La deleció 15q26.2 de 24,5Kb és la única CNV rara identificada en la pacient 92, afectada de DI lleu, síndrome d'Asperger i episodi depressiu. Aquesta CNV solapa amb delecions de longitud superior associades a TB i autisme (Chagnon 2005; McAuley et al. 2009) i inclou parcialment el gen *MCTP2* afectant a un exó de la isoforma llarga del gen. La funció exacta de la proteïna és encara poc coneguda però es creu que pot participar en la via de transducció de senyal intracel·lular i funció sinàptica, amb una localització a membrana plasmàtica i un domini citosòlic d'unió a calci (Shin et al. 2005). Disrupcions del gen poden causar defectes cardíacs (Lalani et al. 2013) i s'ha suggerit com a possible gen candidat per SQZ en un estudi d'associació (Djurovic et al. 2009) que estaria d'acord amb la història familiar d'SQZ en la línia paterna d'aquesta pacient. Malauradament no s'ha pogut accedir al pare per realitzar l'estudi genètic però probablement en sigui portador ja que la germana de la pacient és portadora de la deleció i la mare no n'és portadora.

Duplicació 17q24.1q24.2: PRKCA (Taula 3.10 pàgina 117)

La duplicació 17q24.1q24.2 (pacient n79) de 630Kb altera l'estructura del gen *PRKCA* que codifica per una proteïna quinasa implicada en transmissió sinàptica, creixement de neurites, desenvolupament neuronal i memòria de treball. S'ha descrit com a gen candidat per la síndrome de la microdeleció 17q24.1q24.2 al localitzar-se en la regió mínima de solapament en diferents delecions 17q24.2 identificades en individus amb DI, retràs del llenguatge i obesitat (Vergult et al. 2012) i es suggereix com a candidat per TB (Hahn et al. 1999) i SQZ (Carroll et al. 2010). Tot i que no s'han descrit duplicacions similars a la literatura, a *DECIPHER* es descriu una duplicació de longitud inferior que també altera l'estructura de *PRKCA* en un individu amb DI, problemes de comportament i autisme. A més a més, la CNV s'ha identificat en el germà i en el pare del pacient, afectes de DI lleu i QI límit.

4.4 . Re-avaluació dels criteris de patogenicitat

La presència de CNVp en el 19% dels casos i de VOUSpp en el 12% dels casos aporta noves evidències de l'impacte de les CNVs en la DI i els TP, però determinar la seva patogenicitat és un repte difícil. Els estudis d'associació són de gran utilitat per determinar la correlació genotip-fenotip de regions candidates, però cal tenir en compte que fins i tot les CNVs més freqüents tenen una prevalença individual molt baixa, des de 0,061% per la del3q29 fins a 0,54% per la del22q11.2 (Kirov 2015). Això justifica que l'estudi de cribatge de les set regions específiques (2p12, 2p16.3, 3q29, 12p12, 15q14q15, 15q26.2 i 17q24) no hagi aportat dades per la interpretació dels resultats. Encara que s'hagués identificat alguna alteració, els resultats tindrien poca potència per detectar associacions degut al baix nombre d'individus analitzats.

Els consens de classificació de les CNVs tenen en compte la longitud, la dosi, l'herència, el contingut genètic i les dades existents a la literatura (Miller et al. 2010; Kearney et al. 2011; Hanemaaijer et al. 2012) establint que la patogenicitat correlaciona amb les CNVs rares, *de novo* (o heretades de progenitors afectes), riques en gens coneguts i quan s'han descrit

prèviament associades a patologia, habitualment amb predomini de delecions. L'avaluació de les CNVp i VOUSpp identificades per CMA suggereix una revisió d'aquests criteris.

1) Longitud

Tot i que s'ha identificat una correlació entre la longitud de les CNVs i la patogenicitat, determinant que les CNVs de longitud superior tenen una major probabilitat de ser patogèniques (Taula 3.7 pàgina 97), sis CNVs >1Mb s'han classificat com a variants no patogèniques per incloure gens sense funcions a sistema nerviós i no solapar amb alteracions descrites en individus amb fenotip similar (annex 2). Per altra banda, si bé és cert que la càrrega de CNVs >500Kb en població amb DI (25%) és significativament superior que en la població general (8%) (Itsara et al. 2010; Cooper et al. 2011), delecions de longitud <500Kb (una delecio a 2p16.3 i la delecio a 22q13.33) i dues delecions 2p16.3 de longitud <1Mb (516Kb i 626Kb) tenen una correlació clara amb el fenotip. L'augment de la resolució de les tècniques de cribatge posa de manifest una elevada càrrega de CNVs de longitud petita (<500Kb), essent el 32% de les CNVp/VOUSpp, i d'acord amb Coe i col·laboradors és una via prometedora d'estudi en la DI i el TEA (Coe et al. 2012; Asadollahi et al. 2014). L'impacte de les CNVs en el fenotip no recau en la seva longitud sinó en el contingut genètic i en l'efecte de determinats gens en l'expressió de proteïnes rellevants en el neurodesenvolupament.

2) Dosi: delecio/duplicacio

Les síndromes de microdelecio són més freqüents en la DI en comparació a les síndromes de microduplicacio d'acord amb els resultats obtinguts (Figura 4.2 pàgina 145). Tot i això, la freqüència de delecions en les CNVp i VOUSpp no presenta una diferència estadísticament significativa en comparació a la freqüència de duplicacions. Malgrat que les haploinsuficiències tendeixen a ser més deletèries que els guanys de dosi, cada vegada es reporten més duplicacions en regions on inicialment s'havien descrit delecions associades a DI i/o TP (Sanders et al. 2011). Les CNVs *al locus* 16p11.2 s'han associat a TEA i SQZ (Weiss et al. 2008; McCarthy et al. 2009) i s'ha confirmat que tant les delecions com les duplicacions en aquesta regió tenen

DISCUSSIÓ

un fort efecte en l'expressió dels gens inclosos a la CNV i de gens colindants, produint alteracions en vies implicades en el neurodesenvolupament i l'autisme (Blumenthal et al. 2014). Existeixen moltes regions dosi sensibles en les que s'han identificat guanys, pèrdues i mutacions puntuals associades a patologia (Zoghbi et al. 2012), com per exemple les regions 15q11q13 i 15q13.3.

Però el canvi de dosi no és l'únic mecanisme pel qual les CNVs poden contribuir en la clínica. La localització dels punts de trencament pot alterar el marc de lectura d'un gen determinat i tenir efectes en la seva expressió. Els estudis funcionals permeten valorar l'expressió gènica i determinar l'efecte d'una CNV tant en el producte del gen directament afectat com dels gens amb els que interacciona (Scoles et al. 2011). A més a més, es poden produir gens de fusió que alterin processos biològics importants pel desenvolupament (Rippey et al. 2013). La majoria de duplicacions intersticials són en tàndem i amb una orientació directa, però també es poden produir reordenaments complexos que presentin tres o més punts de trencament (Weckselblatt et al. 2015). La caracterització molecular de les duplicacions mitjançant seqüenciació és essencial per determinar la influència de les duplicacions en el fenotip (Newman et al. 2015).

3) Herència

La transmissió de les CNVp i VOUSpp indica que la seva heretabilitat no és un paràmetre que es pugui tenir en consideració per descartar la seva implicació en el fenotip (Vulto-van Silfhout et al. 2013). El 15,4% de les CNVp són heretades (una d'elles lligada al cromosoma X) i l'estudi dels progenitors en 7 dels 12 pacients amb VOUSpp revela que totes són heretades, pel que es podria considerar una penetrància incompleta, tal i com s'ha descrit per diverses CNVs (Kirov 2015). Però les dades clíniques registrades dels familiars portadors i la inclusió de parelles de germans afectats aporta evidències sobre la variabilitat en l'expressió de les CNVs heretades. S'han identificat quatre CNVs en parelles de germans amb DI i TP, dues de les quals són heretades de progenitors amb QI límit (dup3q29 i dup17q24.1q24.2), una heretada d'un progenitor amb dificultats en l'aprenentatge (dup15q14q15.1) i una duplicació 9p24 d'origen desconegut. Els familiars portadors han de ser avaluats clínicament per confirmar la seva condició de sans (Stefansson et al. 2014), tal i com revela l'estudi de segregació de la deleció

2p16.3 en el que l'avaluació cognitiva i psiquiàtrica dels portadors de la CNV ha identificat un QI entre 69 i 91, T, ansietat, síndrome disexecutiva i trastorns de personalitat en totes les portadores (Vinas-Jornet et al. 2014).

4.5 . Variabilitat genètica i heterogeneïtat fenotípica

La presència de CNVp i VOUSpp en 11 individus amb DI lleu i 12 individus amb DI moderada no es correlacionada amb la severitat de la DI (Taula 4.2) i en el 30,7% dels casos la mateixa CNV s'associa a diferents graus de DI. El fenotip dels progenitors portadors de CNVp/VOUSpp presenta una variabilitat en l'expressió, des de la normalitat (del7q31 i del8q21.13) fins a problemes cognitius lleus (dup3q29, del 2p16.3, dup15q14q15.1 i dup17q24.1q24.2). Aquesta gran heterogeneïtat podria explicar-se pel model del doble *hit* que proposa que algunes variants són factors de risc però no són els únics determinants del fenotip, una segona alteració pot actuar com a factor additiu o modulador (Girirajan et al. 2010). Tenint en compte que el CMA ha detectat un total de 216 CNVs rars en 81 individus, amb una mitjana de 2,5CNVs rars/pacient, no es pot descartar que les CNVs considerades no patogèniques (que representen el 90,4% de les CNVs rars) puguin contribuir en el fenotip, d'acord amb l'increment de CNVs rars observat en població afectada respecte la control (Coe et al. 2012). La presència concomitant de dues CNVp en individus amb DI moderada (pacients 10 i 26) i la diferència en la manifestació clínica de la regió 3q29 en funció de la dosi (quatre còpies de la regió en el pacient 34 amb DI lleu i tres còpies en els progenitors amb QI límit) dóna suport al model del doble *hit*. Aquest efecte modulador del fenotip també pot ser conseqüència de l'efecte de mutacions puntuals en gens de susceptibilitat per Dli/o TP (O'Roak et al. 2011; Qiao et al. 2014).

Existeixen altres mecanismes que intervenen en la variabilitat en l'expressió, com la inactivació del cromosoma X, la impronta genòmica i l'epigenètica modulada per factors ambientals (Rzhetsky et al. 2014).

Taula 4.2: Distribució de les variants patogèniques (CNVp i VOUSpp) segons el grau de DI

DI lleu					DI moderada				
Id	Sexe	CNV	kb	Classificació	Id	Sexe	CNV	Kb	Classificació
71	H	dupXp21.3p11.4	12.244	CNVp	10	D	delXq25q28	30.410	CNVp
							dupXp11.2p22.33	51.008	CNVp
98	H	dup15q11q13	5.306	CNVp	26	H	del10q26.12q26.3	13.174	CNVp
							dup15q26.3	3.312	CNVp
							dup1q42.2	98	VOUSpp
63	D	del12p12.1	2.801	CNVp	9	D	del16p12.3p11.2	10.280	CNVp
14	H	del15q13.2q13.3	1.495	CNVp	90	H	del9q31.1q32	8.811	CNVp
66	H	del8q21.13	731	VOUSpp	59	D	dup15q14q15.1	2.738	VOUSpp
79	H	dup17q24.1q24.2	630	VOUSpp	60	H	dup15q14q15.1	2.738	VOUSpp
94	H	del2p16.3	626	CNVp	122	H	dup9p24.2p24.1	576	VOUSpp
34	H	dup3q29	492	VOUSpp	123	H	dup9p24.2p24.1	576	VOUSpp
55	D	del2p16.3	417	CNVp	82	H	del10q21.3	301	VOUSpp
85	H	del8p23.1	195	VOUSpp	151	H	del7q31.1	152	VOUSpp
92	D	del15q26.2	24	VOUSpp	18	D	del22q13.33	101	CNVp
					32	H	del7q31.1	88	VOUSpp

(Id) Identificador del pacient; (DI) Discapacitat intel·lectual; (CNV) Variant en nombre de còpies; (Kb) Quilobases; (H) Home; (D) Dona; (CNVp) CNV patogènica; (VOUSpp) Variant de significació clínica incerta probablement patogènica

S'ha posat de manifest una gran variabilitat en el fenotip psiquiàtric associat a regions i gens candidats per DI i TP. La valoració del contingut genètic de les CNVp i VOUSpp ha identificat la presència de 13 gens candidats per TP i aporta noves evidències de l'existència d'un solapament genètic en els diferents TP (Taula 4.3) (Burnside et al. 2011; Dabell et al. 2013; Kirov et al. 2014). Tant és així, que la presència de CNVp i VOUSpp suposa un risc 4,22 vegades superior de presentar dos TP en un mateix individu respecte els pacients sense causa genètica coneguda, suggerint que la coexistència de diferents TP podria ser un indicador de factors genètics associats.

A més a més dels gens candidats per TP identificats, tres gens inclosos en VOUSpp (*FBXO45*, *PAK6* i *STMN2*) tenen funcions rellevants pel neurodesenvolupament. Tot i que actualment no existeixen evidències suficients d'una correlació amb patologia, es considera que són tres gens amb una possible susceptibilitat per la DI i els TP, sent necessari la identificació de nous casos per determinar la seva associació amb el fenotip.

Taula 4.3: Regions i gens candidats a trastorns psiquiàtrics

Regió	CNV	Gen candidat	TP en el present estudi	Referències consultades (*)						
				TEA	TDAH	SQZ	TB	TOC	A	SGT
TB										
2p16.3	Del	NRXN1	T. delirant Síndrome disexecutiu	+	+	+	+	-	+	+
Ansietat										
SGT										
7q31	Del	IMMP2L	T. d'estrés post-traumàtic	+	+	-	+	+	-	+
TOC + autisme										
8p23.1	Del	MSRA	Transvestisme, conductes agressives i destructives	-	-	+	+	-	-	-
9p24.2p24.1	Dup	SLC1A1	T. generalitzat d'ansietat	-	-	+	+	+	-	-
10q21.3	Del	CTNNA3	Agressivitat i conducta destructiva	+	+	-	-	-	-	-
12p12	Del	SOX5	T. conducta	+	+	-	-	-	+	-
15q11q13	Dup	UBE3A	Fòbies específiques	+	+	+	-	+	+	-
15q13.3	Del/Dup	CHRNA7	T. generalitzat d'ansietat	+	+	+	+	-	-	-
TOC										
15q14q15	Dup/Del	SPRED1	T. conducta hiperpècnica	+	+	-	-	-	-	-
TOC										
15q14q15	Dup	RASGRP1	T. conducta hiperpècnica	-	-	-	+	-	-	-
Síndrome d'Asperger										
15q26.2	Del	MCTP2	Episodi depressiu amb síndrome somàtica	-	-	+	-	-	-	-
Reacció d'estrés agut										
17q24.1q24.2	Dup	PRKCA	Altres t. dels hàbits i impulsos	-	-	+	+	-	-	-
22q13.33	Del	SHANK3	Autisme	+	-	+	+	-	-	-

(TP) Trastorn psiquiàtric; (T) Trastorn; (TEA) T. de l'espectre autista; (TDAH) T. d'atenció i hiperactivitat; (SQZ) Esquizofrènia; (TB) T. bipolar; (TOC) T. obsessiu-compulsiu; (A) Ansietat; (SGT) Síndrome Gilles de la Tourette

(*) (Hahn et al. 1999; Lai et al. 2001; Ophoff et al. 2002; Moessner et al. 2007; Bauer et al. 2008; Djurovic et al. 2009; Pasmant et al. 2009; Wals-Bass et al. 2009; Wang et al. 2009; Weiss et al. 2009; Carroll et al. 2010; Elia et al. 2010; Gauthier et al. 2010; Maestrini et al. 2010; Pagnamenta et al. 2010; Rosenfeld et al. 2010; Wisniewicka-Kowalik et al. 2010; Girirajan et al. 2011; Kato et al. 2011; Levy et al. 2011; Ma et al. 2011; Spencer et al. 2011; Waga et al. 2011; Casey et al. 2012; Girirajan et al. 2012; Lamb et al. 2012; O'Roak et al. 2012; Prasad et al. 2012; Schaaf et al. 2012; Grayton et al. 2013; Myles-Worsley et al. 2013; Porton et al. 2013; Bacchelli et al. 2014; Bertelsen et al. 2014; Bianchi et al. 2014; Gimelli et al. 2014; Noor et al. 2014; Schaaf 2014; Gillentine et al. 2015; Nesbitt et al. 2015; Noor et al. 2015)

L'elevada co-morbiditat i l'existència de gens amb efectes pleiotròpics aporta noves evidències de vies comunes entre els TP i la DI, tals i com la via glutamatèrgica (*SHANK3* i *SLC1A1*) (Javitt 2007; Tebartz van Elst et al. 2014) i la via de les ubiquitines (*UBE3A* i *FBXO45*) (Javitt 2007; Glessner et al. 2009), així com processos biològics comuns. Els gens implicats en les primeres

etapes del desenvolupament (*SOX5*, *FBXO45*, *STMN2* i *CTNNA3*), els gens amb expressió a sistema nerviós i de localització sinàptica tenen una elevada implicació en aquestes patologies, destacant diverses funcions: formació de la sinapsis (*NRXN1*), plasticitat (*CHRNA7*), transducció de senyal (*CHRNA7*, *NRXN1*, *PRKCA*) i potenciació (*SLC1A1*) (Kaufman et al. 2010; Gatt et al. 2015). Així mateix, alteracions en els mecanismes oxidatius estan implicats en els TP (*IMMP2L* i *MSRA*) (Salim 2014).

4.6. Perspectives en l'estudi de la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics

Actualment, els esforços en la investigació de la DI i els TP es dirigeixen a la creació de consorcis col·laboratius, que estan dirigits a l'estudi de grans cohorts mitjançant seqüenciació del genoma complet i a dur a terme meta-anàlisi de les dades obtingudes, que permeten realitzar estudis d'associació amb un millor potencial estadístic. No obstant, els estudis familiars amb una caracterització clínica exhaustiva aporten una informació molt valuosa que completa la informació dels estudis de grans cohort, contribuint en la descripció completa del fenotip dels pacients i dels portadors.

L'estudi en població adulta aporta nombrosos avantatges (Taylor et al. 2010). En primer lloc, determinar l'etiologia genètica és essencial pel pronòstic i tractament adequat al pacient, així com un millor seguiment de les patologies associades derivant el pacient als professionals especialitzats. En segon lloc, conèixer la causa genètica i realitzar un anàlisi dels familiars per determinar la condició de portador permet oferir un consell genètic, determinar el risc de recurrència i, en el cas de ser un factor de susceptibilitat que el pacient pugui desenvolupar alguna manifestació subclínica, es pot oferir una avaluació, un seguiment i un tractament específics. En tercer lloc, la informació de les bases genètiques dels TP obtinguda de pacients adults pot ser de gran utilitat pels casos pediàtrics. El diagnòstic precoç dels TP n'afavoreix la seva prevenció a partir d'un seguiment i tractaments específics per mitigar o fins i tot impedir-ne la manifestació clínica.

Els grups multidisciplinars composts per professionals de les àrees de la psiquiatria, la psicologia, la neurologia, la bioinformàtica i la genètica permeten integrar els nous coneixements per oferir una millor atenció al pacient. La ressonància magnètica funcional permet una avaluació de les anomalies cognitives mentre que la ressonància magnètica estructural permet caracteritzar l'estructura cerebral. L'aplicació d'aquestes tecnologies són cada vegada més freqüents en els estudis de la DI i els TP per correlacionar l'impacte de les anomalies genètiques amb el funcionament cognitiu i l'estructura i permet identificar anomalies en els portadors (Stefansson et al. 2014).

5 . CONCLUSIONS

1. En la població adulta amb diagnòstic dual de discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics i/o de la conducta s'ha identificat una freqüència elevada (38%) d'alteracions genètiques que majoritàriament corresponen a variants en nombre de còpies. La presència d'un segon trastorn psiquiàtric augmenta la probabilitat que la causa sigui genètica.
2. Es proposa el cariotip molecular com a primera tècnica d'anàlisi genètica del diagnòstic dual de discapacitat intel·lectual i trastorns psiquiàtrics i/o de la conducta. Les variants en nombre de còpies són factors que predisposen tant a la discapacitat intel·lectual lleu com moderada.
3. Els criteris de longitud, dosi i herència per la classificació de les variants en nombre de còpies són poc determinants per definir la patogenicitat de les variants de significació clínica incerta. L'avaluació del fenotip dels familiars portadors i no portadors és de gran utilitat per facilitar la seva interpretació i establir una correlació genotip-fenotip.
4. La deleció 2p16.3 és un factor de risc per la discapacitat intel·lectual i els trastorns psiquiàtrics i té una expressivitat variable. Es descriu per primera vegada un fenotip dismòrfic comú entre els adults afectes i una síndrome disexecutiva i ansietat en tots els portadors.
5. La deleció 7q31 identificada en tres individus no emparentats amb una heterogeneïtat fenotípica suggereix que *IMMP2L* és un gen candidat pels trastorns psiquiàtrics.
6. L'efecte patogènic de les delecions en les regions 3q29 i 15q14q15.1 (*SPRED1*) està demostrat. Els nostres resultats apunten que les duplicacions recíproques també tenen un efecte en l'expressió fenotípica, encara que de menor gravetat.
7. S'aporten noves evidències d'una gran heterogeneïtat de trastorns psiquiàtrics associats a cadascuna de les variants en nombre de còpies.

6 . BIBLIOGRAFIA

- Abecasis G.R., D. Altshuler, A. Auton, L.D. Brooks, R.M. Durbin, R.A. Gibbs, M.E. Hurles and G.A. McVean (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing." *Nature* **467**(7319): 1061-1073.
- Agrawal A. and L.J. Bierut (2012). "Identifying genetic variation for alcohol dependence." *Alcohol Res* **34**(3): 274-281.
- Ahn J.W., S. Bint, A. Bergbaum, K. Mann, R.P. Hall and C.M. Ogilvie (2013). "Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients." *Mol Cytogenet* **6**(1): 16.
- Andrews T., S. Meader, A. Vulto-van Silfhout, A. Taylor, J. Steinberg, J. Hehir-Kwa, R. Pfundt, N. de Leeuw, B.B. de Vries and C. Webber (2015). "Gene networks underlying convergent and pleiotropic phenotypes in a large and systematically-phenotyped cohort with heterogeneous developmental disorders." *PLoS Genet* **11**(3): e1005012.
- Asadollahi R., B. Oneda, P. Joset, S. Azzarello-Burri, D. Bartholdi, K. Steindl, M. Vincent, J. Cobilanschi, H. Sticht, R. Baldinger, R. Reissmann, I. Sudholt, C.T. Thiel, A.B. Ekici, A. Reis, E.K. Bijlsma, J. Andrieux, A. Dieux, D. FitzPatrick, S. Ritter, et al. (2014). "The clinical significance of small copy number variants in neurodevelopmental disorders." *J Med Genet* **51**(10): 677-688.
- Auton A., L.D. Brooks, R.M. Durbin, E.P. Garrison, H.M. Kang, J.O. Korb, J.L. Marchini, S. McCarthy, G.A. McVean and G.R. Abecasis (2015). "A global reference for human genetic variation." *Nature* **526**(7571): 68-74.
- Bacchelli E., F. Ceroni, D. Pinto, S. Lomartire, M. Giannandrea, P. D'Adamo, E. Bonora, P. Parchi, R. Tancredi, A. Battaglia and E. Maestrini (2014). "A CTNNA3 compound heterozygous deletion implicates a role for alphaT-catenin in susceptibility to autism spectrum disorder." *J Neurodev Disord* **6**(1): 17.
- Baker K., F.L. Raymond and N. Bass (2012). "Genetic investigation for adults with intellectual disability: opportunities and challenges." *Curr Opin Neurol* **25**(2): 150-158.
- Ballarati L., A. Cereda, R. Caselli, A. Selicorni, M.P. Recalcati, S. Maitz, P. Finelli, L. Larizza and D. Giardino (2011). "Genotype-phenotype correlations in a new case of 8p23.1 deletion and review of the literature." *Eur J Med Genet* **54**(1): 55-59.
- Ballif B.C., S.A. Hornor, E. Jenkins, S. Madan-Khetarpal, U. Surti, K.E. Jackson, A. Asamoah, P.L. Brock, G.C. Gowans, R.L. Conway, J.M. Graham, Jr., L. Medne, E.H. Zackai, T.H. Shaikh, J. Geoghegan, R.R. Selzer, P.S. Eis, B.A. Bejjani and L.G. Shaffer (2007). "Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2." *Nat Genet* **39**(9): 1071-1073.
- Ballif B.C., A. Theisen, J. Coppinger, G.C. Gowans, J.H. Hersh, S. Madan-Khetarpal, K.R. Schmidt, R. Tervo, L.F. Escobar, C.A. Friedrich, M. McDonald, L. Campbell, J.E. Ming, E.H. Zackai, B.A. Bejjani and L.G. Shaffer (2008). "Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication." *Mol Cytogenet* **1**: 8.
- Bauer D., D. Gupta, V. Haroutunian, J.H. Meador-Woodruff and R.E. McCullumsmith (2008). "Abnormal expression of glutamate transporter and transporter interacting molecules

BIBLIOGRAFIA

- in prefrontal cortex in elderly patients with schizophrenia." *Schizophr Res* **104**(1-3): 108-120.
- Bebbington P. and R. Ramana (1995). "The epidemiology of bipolar affective disorder." *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* **30**(6): 279-292.
- Bena F., D.L. Bruno, M. Eriksson, C. van Ravenswaaij-Arts, Z. Stark, T. Dijkhuizen, E. Gerkes, S. Gimelli, D. Ganesamoorthy, A.C. Thuresson, A. Labalme, M. Till, F. Bilan, L. Pasquier, A. Kitzis, C. Dubourg, M. Rossi, A. Bottani, M. Gagnebin, D. Sanlaville, et al. (2013). "Molecular and clinical characterization of 25 individuals with exonic deletions of NRXN1 and comprehensive review of the literature." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **162B**(4): 388-403.
- Bertelsen B., L. Melchior, L.R. Jensen, C. Groth, B. Glenthøj, R. Rizzo, N.M. Debes, L. Skov, K. Brøndum-Nielsen, P. Paschou, A. Silahatoglu and Z. Tümer (2014). "Intragenic deletions affecting two alternative transcripts of the IMMP2L gene in patients with Tourette syndrome." *Eur J Hum Genet* **22**(11): 1283-1289.
- Betancur C. (2011). "Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting." *Brain Res* **1380**: 42-77.
- Bianchi M.G., D. Bardelli, M. Chiu and O. Bussolati (2014). "Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease." *Cell Mol Life Sci* **71**(11): 2001-2015.
- Blumenthal I., A. Ragavendran, S. Erdin, L. Klei, A. Sugathan, J.R. Guide, P. Manavalan, J.Q. Zhou, V.C. Wheeler, J.Z. Levin, C. Ernst, K. Roeder, B. Devlin, J.F. Gusella and M.E. Talkowski (2014). "Transcriptional consequences of 16p11.2 deletion and duplication in mouse cortex and multiplex autism families." *Am J Hum Genet* **94**(6): 870-883.
- Boggula V.R., A. Shukla, S. Danda, S.V. Hariharan, S. Nampoothiri, R. Kumar and S.R. Phadke (2014). "Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients." *Indian J Med Res* **139**(1): 66-75.
- Bolton P.F., N.R. Dennis, C.E. Browne, N.S. Thomas, M.W. Veltman, R.J. Thompson and P. Jacobs (2001). "The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders." *Am J Med Genet* **105**(8): 675-685.
- Bonaglia M.C., R. Giorda, E. Mani, G. Aceti, B.M. Anderlid, A. Baroncini, T. Pramparo and O. Zuffardi (2006). "Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome." *J Med Genet* **43**(10): 822-828.
- Bonaglia M.C., R. Giorda, S. Beri, C. De Agostini, F. Novara, M. Fichera, L. Grillo, O. Galesi, A. Vetro, R. Ciccone, M.T. Bonati, S. Giglio, R. Guerrini, S. Osimani, S. Marelli, C. Zucca, R. Grasso, R. Borgatti, E. Mani, C. Motta, et al. (2011). "Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid syndrome." *PLoS Genet* **7**(7): e1002173.

- Bondallaz P., A. Barbier, S. Soehrman, G. Grenningloh and B.M. Riederer (2006). "The control of microtubule stability in vitro and in transfected cells by MAP1B and SCG10." *Cell Motil Cytoskeleton* **63**(11): 681-695.
- Bonnet-Brilhault F., S. Alirol, R. Blanc, S. Bazaud, S. Marouillat, R.A. Thepault, C.R. Andres, E. Lemonnier, C. Barthelemy, M. Raynaud, A. Toutain, M. Gomot and F. Laumonier (2015). "GABA/Glutamate synaptic pathways targeted by integrative genomic and electrophysiological explorations distinguish autism from intellectual disability." *Mol Psychiatry*.
- Brems H., M. Chmara, M. Sahbatou, E. Denayer, K. Taniguchi, R. Kato, R. Somers, L. Messiaen, S. De Schepper, J.P. Fryns, J. Cools, P. Marynen, G. Thomas, A. Yoshimura and E. Legius (2007). "Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype." *Nat Genet* **39**(9): 1120-1126.
- Bryson S.E., E.A. Bradley, A. Thompson and A. Wainwright (2008). "Prevalence of autism among adolescents with intellectual disabilities." *Can J Psychiatry* **53**(7): 449-459.
- Burmeister M., M.G. McInnis and S. Zollner (2008). "Psychiatric genetics: progress amid controversy." *Nat Rev Genet* **9**(7): 527-540.
- Burnside R.D., R. Pasion, F.M. Mikhail, A.J. Carroll, N.H. Robin, E.L. Youngs, I.K. Gadi, E. Keitges, V.L. Jaswaney, P.R. Papenhausen, V.R. Potluri, H. Rishog, B. Rush, J.L. Smith, S. Schwartz, J.H. Tepperberg and M.G. Butler (2011). "Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay." *Hum Genet* **130**(4): 517-528.
- Burton P., D. Clayton, L. Cardon, N. Craddock, P. Deloukas, A. Duncanson, D. Kwiatkowski, M. McCarthy, W. Ouwehand, N. Samani, J. Todd, P. Donnelly, J. Barrett, P. Burton, D. Davison, P. Donnelly, D. Easton, D. Evans, H. Leung, J. Marchini, et al. (2007). "Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls." *Nature* **447**(7145): 661-678.
- Carroll L.S., N.M. Williams, V. Moskvina, E. Russell, N. Norton, H.J. Williams, T. Peirce, L. Georgieva, S. Dwyer, D. Grozeva, E. Greene, A. Farmer, P. McGuffin, D.W. Morris, A. Corvin, M. Gill, D. Rujescu, P. Sham, P. Holmans, I. Jones, et al. (2010). "Evidence for rare and common genetic risk variants for schizophrenia at protein kinase C, alpha." *Mol Psychiatry* **15**(11): 1101-1111.
- Casey J.P., T. Magalhaes, J.M. Conroy, R. Regan, N. Shah, R. Anney, D.C. Shields, B.S. Abrahams, J. Almeida, E. Bacchelli, A.J. Bailey, G. Baird, A. Battaglia, T. Berney, N. Bolshakova, P.F. Bolton, T. Bourgeron, S. Brennan, P. Cali, C. Correia, et al. (2012). "A novel approach of homozygous haplotype sharing identifies candidate genes in autism spectrum disorder." *Hum Genet* **131**(4): 565-579.
- Castermans D., V. Wilquet, E. Parthoens, C. Huysmans, J. Steyaert, L. Swinnen, J.P. Fryns, W. Van de Ven and K. Devriendt (2003). "The neurobeachin gene is disrupted by a translocation in a patient with idiopathic autism." *J Med Genet* **40**(5): 352-356.

BIBLIOGRAFIA

- Chagnon Y.C. (2005). "Shared chromosomal susceptibility regions between autism and other mental disorders." *Int Rev Neurobiol* **71**: 419-443.
- Chen C.H., C.C. Huang, M.C. Cheng, Y.N. Chiu, W.C. Tsai, Y.Y. Wu, S.K. Liu and S.S. Gau (2014). "Genetic analysis of GABRB3 as a candidate gene of autism spectrum disorders." *Mol Autism* **5**: 36.
- Chiurazzi P., C.E. Schwartz, J. Gecz and G. Neri (2008). "XLMR genes: update 2007." *Eur J Hum Genet* **16**(4): 422-434.
- Chung F.Z., A.A. Sahasrabudhe, K. Ma, X. Chen, V. Basrur, M.S. Lim and K.S. Elenitoba-Johnson (2014). "Fbxo45 inhibits calcium-sensitive proteolysis of N-cadherin and promotes neuronal differentiation." *J Biol Chem* **289**(41): 28448-28459.
- Claeys I., M. Holvoet, B. Eyskens, P. Adriaensens, M. Gewillig, J.P. Fryns and K. Devriendt (1997). "A recognisable behavioural phenotype associated with terminal deletions of the short arm of chromosome 8." *Am J Med Genet* **74**(5): 515-520.
- Coe B.P., S. Girirajan and E.E. Eichler (2012). "The genetic variability and commonality of neurodevelopmental disease." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **160C**(2): 118-129.
- Coe B.P., K. Witherspoon, J.A. Rosenfeld, B.W. van Bon, A.T. Vulto-van Silfhout, P. Bosco, K.L. Friend, C. Baker, S. Buono, L.E. Vissers, J.H. Schuurs-Hoeijmakers, A. Hoischen, R. Pfundt, N. Krumm, G.L. Carvill, D. Li, D. Amaral, N. Brown, P.J. Lockhart, I.E. Scheffer, et al. (2014). "Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay." *Nat Genet* **46**(10): 1063-1071.
- Conrad D.F., C. Bird, B. Blackburne, S. Lindsay, L. Mamanova, C. Lee, D.J. Turner and M.E. Hurles (2010). "Mutation spectrum revealed by breakpoint sequencing of human germline CNVs." *Nat Genet* **42**(5): 385-391.
- Consortium T.I.H. (2003). "The International HapMap Project." *Nature* **426**(6968): 789-796.
- Cook E.H., Jr., V. Lindgren, B.L. Leventhal, R. Courchesne, A. Lincoln, C. Shulman, C. Lord and E. Courchesne (1997). "Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication." *Am J Hum Genet* **60**(4): 928-934.
- Cooper G.M., B.P. Coe, S. Girirajan, J.A. Rosenfeld, T.H. Vu, C. Baker, C. Williams, H. Stalker, R. Hamid, V. Hannig, H. Abdel-Hamid, P. Bader, E. McCracken, D. Niyazov, K. Leppig, H. Thiese, M. Hummel, N. Alexander, J. Gorski, J. Kussmann, et al. (2011). "A copy number variation morbidity map of developmental delay." *Nat Genet* **43**(9): 838-846.
- Cooper S.A., E. Smiley, J. Morrison, A. Williamson and L. Allan (2007). "Mental ill-health in adults with intellectual disabilities: prevalence and associated factors." *Br J Psychiatry* **190**: 27-35.
- Craddock N., M.E. Hurles, N. Cardin, R.D. Pearson, V. Plagnol, S. Robson, D. Vukcevic, C. Barnes, D.F. Conrad, E. Giannoulatou, C. Holmes, J.L. Marchini, K. Stirrups, M.D. Tobin, L.V. Wain, C. Yau, J. Aerts, T. Ahmad, T.D. Andrews, H. Arbury, et al. (2010). "Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls." *Nature* **464**(7289): 713-720.

- Dabell M.P., J.A. Rosenfeld, P. Bader, L.F. Escobar, D. El-Khechen, S.E. Vallee, M.B. Dinulos, C. Curry, J. Fisher, R. Tervo, M.C. Hannibal, K. Siefkas, P.R. Wyatt, L. Hughes, R. Smith, S. Ellingwood, Y. Lacassie, T. Stroud, S.A. Farrell, P.A. Sanchez-Lara, et al. (2013). "Investigation of NRXN1 deletions: clinical and molecular characterization." *Am J Med Genet A* **161A**(4): 717-731.
- Demyanenko G.P., A.I. Halberstadt, R.S. Rao and P.F. Maness (2010). "CHL1 cooperates with PAK1-3 to regulate morphological differentiation of embryonic cortical neurons." *Neuroscience* **165**(1): 107-115.
- Denayer E., T. Ahmed, H. Brems, G. Van Woerden, N.Z. Borgesius, Z. Callaerts-Vegh, A. Yoshimura, D. Hartmann, Y. Elgersma, R. D'Hooge, E. Legius and D. Balschun (2008). "Spred1 is required for synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning." *J Neurosci* **28**(53): 14443-14449.
- Depienne C., D. Moreno-De-Luca, D. Heron, D. Bouteiller, A. Gennetier, R. Delorme, P. Chaste, J.P. Siffroi, S. Chantot-Bastarud, B. Benyahia, O. Trouillard, G. Nygren, S. Kopp, M. Johansson, M. Rastam, L. Burglen, E. Leguern, A. Verloes, M. Leboyer, A. Brice, et al. (2009). "Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders." *Biol Psychiatry* **66**(4): 349-359.
- Djurovic S., S. Le Hellard, A.K. Kahler, E.G. Jonsson, I. Agartz, V.M. Steen, H. Hall, A.G. Wang, H.B. Rasmussen, I. Melle, T. Werge and O.A. Andreassen (2009). "Association of MCTP2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE)." *Psychiatry Res* **168**(3): 256-258.
- Duong L., L.L. Klitten, R.S. Moller, A. Ingason, K.D. Jakobsen, C. Skjodt, M. Didriksen, H. Hjalgrim, T. Werge and N. Tommerup (2012). "Mutations in NRXN1 in a family multiply affected with brain disorders: NRXN1 mutations and brain disorders." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **159B**(3): 354-358.
- Elia J., X. Gai, H.M. Xie, J.C. Perin, E. Geiger, J.T. Glessner, M. D'Arcy, R. deBerardinis, E. Frackelton, C. Kim, F. Lantieri, B.M. Muganga, L. Wang, T. Takeda, E.F. Rappaport, S.F. Grant, W. Berrettini, M. Devoto, T.H. Shaikh, H. Hakonarson, et al. (2010). "Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes." *Mol Psychiatry* **15**(6): 637-646.
- Ellison J.W., J.A. Rosenfeld and L.G. Shaffer (2013). "Genetic basis of intellectual disability." *Annu Rev Med* **64**: 441-450.
- Elesa S.H. and S. Girirajan (2008). "Smith-Magenis syndrome." *Eur J Hum Genet* **16**(4): 412-421.
- Faraone S.V. and E. Mick (2010). "Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder." *Psychiatr Clin North Am* **33**(1): 159-180.
- Fatemi S.H., T.J. Reutiman, T.D. Folsom and P.D. Thuras (2009). "GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism." *J Autism Dev Disord* **39**(2): 223-230.
- Fernandez B.A., W. Roberts, B. Chung, R. Weksberg, S. Meyn, P. Szatmari, A.M. Joseph-George, S. Mackay, K. Whitten, B. Noble, C. Vardy, V. Crosbie, S. Luscombe, E. Tucker, L. Turner, C.R. Marshall and S.W. Scherer (2010). "Phenotypic spectrum associated with de novo

BIBLIOGRAFIA

- and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder." *J Med Genet* **47**(3): 195-203.
- Ferrari A.J., A.J. Baxter and H.A. Whiteford (2011). "A systematic review of the global distribution and availability of prevalence data for bipolar disorder." *J Affect Disord* **134**(1-3): 1-13.
- Fichera M., R. Barone, L. Grillo, M. De Grandi, V. Fiore, I. Morana, T. Maniscalchi, M. Vinci, S. Amata, A. Spalletta, G. Sorge and S.S. Signorelli (2014). "Familial 1q22 microduplication associated with psychiatric disorders, intellectual disability and late-onset autoimmune inflammatory response." *Mol Cytogenet* **7**(1): 90.
- Fitzgerald T., S. Gerety, W. Jones, K. van, M, D. King, J. McRae, K. Morley, V. Parthiban, S. Al-Turki, K. Ambridge, D. Barrett, T. Bayzatinova, S. Clayton, E. Coomber, S. Gribble, P. Jones, N. Krishnappa, L. Mason, A. Middleton, R. Miller, et al. (2015). "Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders." *Nature* **519**(7542): 223-228.
- Furnari M.A., M.L. Jobes, T. Nekrasova, A. Minden and G.C. Wagner (2013). "Functional deficits in PAK5, PAK6 and PAK5/PAK6 knockout mice." *PLoS One* **8**(4): e61321.
- Gabbita S.P., M.Y. Aksenov, M.A. Lovell and W.R. Markesbery (1999). "Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain." *J Neurochem* **73**(4): 1660-1666.
- Gatt J.M., K.L. Burton, L.M. Williams and P.R. Schofield (2015). "Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies." *J Psychiatr Res* **60**: 1-13.
- Gauthier J., N. Champagne, R.G. Lafreniere, L. Xiong, D. Spiegelman, E. Brustein, M. Lapointe, H. Peng, M. Cote, A. Noreau, F.F. Hamdan, A.M. Addington, J.L. Rapoport, L.E. Delisi, M.O. Krebs, R. Joober, F. Fathalli, F. Mouaffak, A.P. Haghighi, C. Neri, et al. (2010). "De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17): 7863-7868.
- Gianetti E., J.E. Hall, M.G. Au, U.B. Kaiser, R. Quinton, J.A. Stewart, D.L. Metzger, N. Pitteloud, V. Mericq, P.M. Merino, L.L. Levitsky, L. Izatt, M. Lang-Muritano, V.Y. Fujimoto, R.G. Dluhy, M.L. Chase, W.F. Crowley, Jr., L. Plummer and S.B. Seminara (2012). "When genetic load does not correlate with phenotypic spectrum: lessons from the GnRH receptor (GNRHR)." *J Clin Endocrinol Metab* **97**(9): E1798-1807.
- Gillentine M.A. and C.P. Schaaf (2015). "The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number." *Biochem Pharmacol*.
- Gimelli S., V. Capra, M. Di Rocco, M. Leoni, M. Mirabelli-Badenier, M.C. Schiaffino, P. Fiorio, C. Cuoco, G. Gimelli and E. Tassano (2014). "Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting IMMP2L gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders." *Mol Cytogenet* **7**: 54.
- Girirajan S. and E.E. Eichler (2010). "Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders." *Hum Mol Genet* **19**(R2): R176-187.

- Girirajan S., J.A. Rosenfeld, G.M. Cooper, F. Antonacci, P. Siswara, A. Itsara, L. Vives, T. Walsh, S.E. McCarthy, C. Baker, H.C. Mefford, J.M. Kidd, S.R. Browning, B.L. Browning, D.E. Dickel, D.L. Levy, B.C. Ballif, K. Platky, D.M. Farber, G.C. Gowans, et al. (2010). "A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay." *Nat Genet* **42**(3): 203-209.
- Girirajan S., Z. Brkanac, B.P. Coe, C. Baker, L. Vives, T.H. Vu, N. Shafer, R. Bernier, G.B. Ferrero, M. Silengo, S.T. Warren, C.S. Moreno, M. Fichera, C. Romano, W.H. Raskind and E.E. Eichler (2011). "Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes." *PLoS Genet* **7**(11): e1002334.
- Girirajan S., J.A. Rosenfeld, B.P. Coe, S. Parikh, N. Friedman, A. Goldstein, R.A. Filipink, J.S. McConnell, B. Angle, W.S. Meschino, M.M. Nezarati, A. Asamoah, K.E. Jackson, G.C. Gowans, J.A. Martin, E.P. Carmany, D.W. Stockton, R.E. Schnur, L.S. Penney, D.M. Martin, et al. (2012). "Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants." *N Engl J Med* **367**(14): 1321-1331.
- Glessner J.T., K. Wang, G. Cai, O. Korvatska, C.E. Kim, S. Wood, H. Zhang, A. Estes, C.W. Brune, J.P. Bradfield, M. Imielinski, E.C. Frackelton, J. Reichert, E.L. Crawford, J. Munson, P.M. Sleiman, R. Chiavacci, K. Annaiah, K. Thomas, C. Hou, et al. (2009). "Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes." *Nature* **459**(7246): 569-573.
- Glessner J.T., M.P. Reilly, C.E. Kim, N. Takahashi, A. Albano, C. Hou, J.P. Bradfield, H. Zhang, P.M. Sleiman, J.H. Flory, M. Imielinski, E.C. Frackelton, R. Chiavacci, K.A. Thomas, M. Garris, F.G. Otieno, M. Davidson, M. Weiser, A. Reichenberg, K.L. Davis, et al. (2010). "Strong synaptic transmission impact by copy number variations in schizophrenia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(23): 10584-10589.
- Grayton H.M., M. Missler, D.A. Collier and C. Fernandes (2013). "Altered social behaviours in neurexin 1alpha knockout mice resemble core symptoms in neurodevelopmental disorders." *PLoS One* **8**(6): e67114.
- Green T., S. Avda, I. Dotan, O. Zarchi, L. Basel-Vanagaite, G. Zalsman, A. Weizman and D. Gothelf (2012). "Phenotypic psychiatric characterization of children with Williams syndrome and response of those with ADHD to methylphenidate treatment." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **159B**(1): 13-20.
- Grozeva D., K. Carss, O. Spasic-Boskovic, M.I. Tejada, J. Gecz, M. Shaw, M. Corbett, E. Haan, E. Thompson, K. Friend, Z. Hussain, A. Hackett, M. Field, A. Renieri, R. Stevenson, C. Schwartz, J.A. Floyd, J. Bentham, C. Cosgrove, B. Keavney, et al. (2015). "Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability." *Hum Mutat* **36**(12): 1197-1204.
- Gu W., F. Zhang and J.R. Lupski (2008). "Mechanisms for human genomic rearrangements." *Pathogenetics* **1**(1): 4.
- Guitart-Feliubadalo M., A. Brunet-Vega, S. Villatoro-Gomez, N. Baena-Diez and E. Gabau-Vila (2006). "[Chromosomal causes that produce mental retardation: chromosome disorders that can be diagnosed in the patient]." *Rev Neurol* **42 Suppl 1**: S21-26.

BIBLIOGRAFIA

- Haavik J., A. Halmoy, A.J. Lundervold and O.B. Fasmer (2010). "Clinical assessment and diagnosis of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder." *Expert Rev Neurother* **10**(10): 1569-1580.
- Hahn C.G. and E. Friedman (1999). "Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder." *Bipolar Disord* **1**(2): 81-86.
- Halder A., M. Jain, I. Chaudhary, N. Gupta and M. Kabra (2013). "Fluorescence in situ hybridization (FISH) using non-commercial probes in the diagnosis of clinically suspected microdeletion syndromes." *Indian J Med Res* **138**: 135-142.
- Hanemaaijer N.M., B. Sikkema-Raddatz, G. van der Vries, T. Dijkhuizen, R. Hordijk, A.J. van Essen, H.E. Veenstra-Knol, W.S. Kerstjens-Frederikse, J.C. Herkert, E.H. Gerkes, L.K. Leegte, K. Kok, R.J. Sinke and C.M. van Ravenswaaij-Arts (2012). "Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics." *Eur J Hum Genet* **20**(2): 161-165.
- Hastings P.J., J.R. Lupski, S.M. Rosenberg and G. Ira (2009). "Mechanisms of change in gene copy number." *Nat Rev Genet* **10**(8): 551-564.
- Hills A., J.W. Ahn, C. Donaghue, H. Thomas, K. Mann and C.M. Ogilvie (2010). "MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance." *Mol Cytogenet* **3**: 19.
- Hochstenbach R., E. van Binsbergen, J. Engelen, A. Nieuwint, A. Polstra, P. Poddighe, C. Ruivenkamp, B. Sikkema-Raddatz, D. Smeets and M. Poot (2009). "Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands." *Eur J Med Genet* **52**(4): 161-169.
- Hochstenbach R., J.E. Buizer-Voskamp, J.A. Vorstman and R.A. Ophoff (2011). "Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research." *Cytogenet Genome Res* **135**(3-4): 174-202.
- Holt R., N.H. Sykes, I.C. Conceicao, J.B. Cazier, R.J. Anney, G. Oliveira, L. Gallagher, A. Vicente, A.P. Monaco and A.T. Pagnamenta (2012). "CNVs leading to fusion transcripts in individuals with autism spectrum disorder." *Eur J Hum Genet* **20**(11): 1141-1147.
- Hoppe A., J. Heinemeyer, E. Klopocki, L.M. Graul-Neumann, B. Spors, P. Bittigau and A.M. Kaindl (2014). "Interstitial 12p deletion involving more than 40 genes in a patient with postnatal microcephaly, psychomotor delay, optic nerve atrophy, and facial dysmorphism." *Meta Gene* **2**: 72-82.
- Hormozdiari F., I. Hajirasouliha, A. McPherson, E.E. Eichler and S.C. Sahinalp (2011). "Simultaneous structural variation discovery among multiple paired-end sequenced genomes." *Genome Res* **21**(12): 2203-2212.
- Hunter A.G. (2000). "Outcome of the routine assessment of patients with mental retardation in a genetics clinic." *Am J Med Genet* **90**(1): 60-68.

- Hutchinson R., M. Wilson and L. Voullaire (1992). "Distal 8p deletion (8p23.1----8pter): a common deletion?" *J Med Genet* **29**(6): 407-411.
- lafrate A.J., L. Feuk, M.N. Rivera, M.L. Listewnik, P.K. Donahoe, Y. Qi, S.W. Scherer and C. Lee (2004). "Detection of large-scale variation in the human genome." *Nat Genet* **36**(9): 949-951.
- Ingason A., G. Kirov, I. Giegling, T. Hansen, A.R. Isles, K.D. Jakobsen, K.T. Kristinsson, L. le Roux, O. Gustafsson, N. Craddock, H.J. Moller, A. McQuillin, P. Muglia, S. Cichon, M. Rietschel, R.A. Ophoff, S. Djurovic, O.A. Andreassen, O.P. Pietilainen, L. Peltonen, et al. (2011). "Maternally derived microduplications at 15q11-q13: implication of imprinted genes in psychotic illness." *Am J Psychiatry* **168**(4): 408-417.
- Itsara A., H. Wu, J.D. Smith, D.A. Nickerson, I. Romieu, S.J. London and E.E. Eichler (2010). "De novo rates and selection of large copy number variation." *Genome Res* **20**(11): 1469-1481.
- Jacobs P.A., J.S. Matsuura, M. Mayer and I.M. Newlands (1978). "A cytogenetic survey of an institution for the mentally retarded: I. Chromosome abnormalities." *Clin Genet* **13**(1): 37-60.
- Jacobs P.A., C. Browne, N. Gregson, C. Joyce and H. White (1992). "Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding." *J Med Genet* **29**(2): 103-108.
- Javitt D.C. (2007). "Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions." *Int Rev Neurobiol* **78**: 69-108.
- Jeste S.S. (2015). "Neurodevelopmental behavioral and cognitive disorders." *Continuum (Minneapolis)* **21**(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry): 690-714.
- Kaminsky E.B., V. Kaul, J. Paschall, D.M. Church, B. Bunke, D. Kunig, D. Moreno-De-Luca, A. Moreno-De-Luca, J.G. Mulle, S.T. Warren, G. Richard, J.G. Compton, A.E. Fuller, T.J. Gliem, S. Huang, M.N. Collinson, S.J. Beal, T. Ackley, D.L. Pickering, D.M. Golden, et al. (2011). "An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities." *Genet Med* **13**(9): 777-784.
- Kato T., A. Hayashi-Takagi, T. Toyota, T. Yoshikawa and K. Iwamoto (2011). "Gene expression analysis in lymphoblastoid cells as a potential biomarker of bipolar disorder." *J Hum Genet* **56**(11): 779-783.
- Kaufman L., M. Ayub and J.B. Vincent (2010). "The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review." *J Neurodev Disord* **2**(4): 182-209.
- Kearney H.M., E.C. Thorland, K.K. Brown, F. Quintero-Rivera and S.T. South (2011). "American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants." *Genet Med* **13**(7): 680-685.
- Kerner B. (2014). "Genetics of bipolar disorder." *Appl Clin Genet* **7**: 33-42.

BIBLIOGRAFIA

- Kirchhoff M., A.M. Bisgaard, T. Bryndorf and T. Gerdes (2007). "MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions." *Eur J Med Genet* **50**(1): 33-42.
- Kirov G., A.J. Pocklington, P. Holmans, D. Ivanov, M. Ikeda, D. Ruderfer, J. Moran, K. Chambert, D. Toncheva, L. Georgieva, D. Grozeva, M. Fjodorova, R. Wollerton, E. Rees, I. Nikolov, L.N. van de Lagemaat, A. Bayes, E. Fernandez, P.I. Olason, Y. Bottcher, et al. (2012). "De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia." *Mol Psychiatry* **17**(2): 142-153.
- Kirov G., E. Rees, J.T. Walters, V. Escott-Price, L. Georgieva, A.L. Richards, K.D. Chambert, G. Davies, S.E. Legge, J.L. Moran, S.A. McCarroll, M.C. O'Donovan and M.J. Owen (2014). "The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay." *Biol Psychiatry* **75**(5): 378-385.
- Kirov G. (2015). "CNVs in neuropsychiatric disorders." *Hum Mol Genet* **24**(R1): R45-49.
- Kraemer H.C. (2007). "DSM categories and dimensions in clinical and research contexts." *Int J Methods Psychiatr Res* **16 Suppl 1**: S8-S15.
- Kulharya A.S., D.B. Flannery, K. Norris, C. Lovell, B. Levy and G.V. Velagaleti (2008). "Fine mapping of breakpoints in two unrelated patients with rare overlapping interstitial deletions of 9q with mild dysmorphic features." *Am J Med Genet A* **146A**(17): 2234-2241.
- Lai C.S., S.E. Fisher, J.A. Hurst, F. Vargha-Khadem and A.P. Monaco (2001). "A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder." *Nature* **413**(6855): 519-523.
- Lalani S.R., S.M. Ware, X. Wang, G. Zapata, Q. Tian, L.M. Franco, Z. Jiang, K. Bucasas, D.A. Scott, P.M. Campeau, N. Hanchard, L. Umana, A. Cast, A. Patel, S.W. Cheung, K.L. McBride, M. Bray, A. Craig Chinault, B.A. Boggs, M. Huang, et al. (2013). "MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development." *Hum Mol Genet* **22**(21): 4339-4348.
- Lam K.W. and A.J. Jeffreys (2006). "Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 8921-8927.
- Lam K.W. and A.J. Jeffreys (2007). "Processes of de novo duplication of human alpha-globin genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(26): 10950-10955.
- Lamb A.N., J.A. Rosenfeld, N.J. Neill, M.E. Talkowski, I. Blumenthal, S. Girirajan, D. Keelean-Fuller, Z. Fan, J. Pouncey, C. Stevens, L. Mackay-Loder, D. Terespolsky, P.I. Bader, K. Rosenbaum, S.E. Vallee, J.B. Moeschler, R. Ladda, S. Sell, J. Martin, S. Ryan, et al. (2012). "Haploinsufficiency of SOX5 at 12p12.1 is associated with developmental delays with prominent language delay, behavior problems, and mild dysmorphic features." *Hum Mutat* **33**(4): 728-740.

- Larsson H., E. Ryden, M. Boman, N. Langstrom, P. Lichtenstein and M. Landen (2013). "Risk of bipolar disorder and schizophrenia in relatives of people with attention-deficit hyperactivity disorder." *Br J Psychiatry* **203**(2): 103-106.
- Lejeune J., R. Turpin and M. Gautier (1959). "[Chromosomal diagnosis of mongolism]." *Arch Fr Pediatr* **16**: 962-963.
- Lesch K.P., N. Timmesfeld, T.J. Renner, R. Halperin, C. Roser, T.T. Nguyen, D.W. Craig, J. Romanos, M. Heine, J. Meyer, C. Freitag, A. Warnke, M. Romanos, H. Schafer, S. Walitza, A. Reif, D.A. Stephan and C. Jacob (2008). "Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies." *J Neural Transm* **115**(11): 1573-1585.
- Levy D., M. Ronemus, B. Yamrom, Y.H. Lee, A. Leotta, J. Kendall, S. Marks, B. Lakshmi, D. Pai, K. Ye, A. Buja, A. Krieger, S. Yoon, J. Troge, L. Rodgers, I. Iossifov and M. Wigler (2011). "Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders." *Neuron* **70**(5): 886-897.
- Lisi E.C., A. Hamosh, K.F. Doheny, E. Squibb, B. Jackson, R. Galczynski, G.H. Thomas and D.A. Batista (2008). "3q29 interstitial microduplication: a new syndrome in a three-generation family." *Am J Med Genet A* **146A**(5): 601-609.
- Lowe K., D. Allen, E. Jones, S. Brophy, K. Moore and W. James (2007). "Challenging behaviours: prevalence and topographies." *J Intellect Disabil Res* **51**(Pt 8): 625-636.
- Lucito R., J. Healy, J. Alexander, A. Reiner, D. Esposito, M. Chi, L. Rodgers, A. Brady, J. Sebat, J. Troge, J.A. West, S. Rostan, K.C. Nguyen, S. Powers, K.Q. Ye, A. Olshen, E. Venkatraman, L. Norton and M. Wigler (2003). "Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation." *Genome Res* **13**(10): 2291-2305.
- Luckasson R. and A. Reeve (2001). "Naming, defining, and classifying in mental retardation." *Ment Retard* **39**(1): 47-52.
- Ma X., W. Deng, X. Liu, M. Li, Z. Chen, Z. He, Y. Wang, Q. Wang, X. Hu, D.A. Collier and T. Li (2011). "A genome-wide association study for quantitative traits in schizophrenia in China." *Genes Brain Behav* **10**(7): 734-739.
- Maestrini E., A.T. Pagnamenta, J.A. Lamb, E. Bacchelli, N.H. Sykes, I. Sousa, C. Toma, G. Barnby, H. Butler, L. Winchester, T.S. Scerri, F. Minopoli, J. Reichert, G. Cai, J.D. Buxbaum, O. Korvatska, G.D. Schellenberg, G. Dawson, A. de Bildt, R.B. Minderaa, et al. (2010). "High-density SNP association study and copy number variation analysis of the AUTS1 and AUTS5 loci implicate the IMMP2L-DOCK4 gene region in autism susceptibility." *Mol Psychiatry* **15**(9): 954-968.
- Malhotra D. and J. Sebat (2012). "CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics." *Cell* **148**(6): 1223-1241.
- Malli T., H.C. Duba, M. Erdel, R. Marschon, W. Kranewitter, S. Deutschbauer, J. Kralik, E. Diel, B. Guenther, D. Mueller and G. Webersinke (2014). "Disruption of the ARID1B and ADAMTS6 loci due to a t(5;6)(q12.3;q25.3) in a patient with developmental delay." *Am J Med Genet A* **164A**(12): 3126-3131.

BIBLIOGRAFIA

- Mannik K., R. Magi, A. Mace, B. Cole, A.L. Guyatt, H.A. Shihab, A.M. Maillard, H. Alavere, A. Kolk, A. Reigo, E. Mihailov, L. Leitsalu, A.M. Ferreira, M. Noukas, A. Teumer, E. Salvi, D. Cusi, M. McGue, W.G. Iacono, T.R. Gaunt, et al. (2015). "Copy number variations and cognitive phenotypes in unselected populations." *JAMA* **313**(20): 2044-2054.
- Manning M. and L. Hudgins (2010). "Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities." *Genet Med* **12**(11): 742-745.
- Maulik P.K., M.N. Mascarenhas, C.D. Mathers, T. Dua and S. Saxena (2011). "Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies." *Res Dev Disabil* **32**(2): 419-436.
- McAuley E.Z., I.P. Blair, Z. Liu, J.M. Fullerton, A. Scimone, M. Van Herten, M.R. Evans, K.C. Kirkby, J.A. Donald, P.B. Mitchell and P.R. Schofield (2009). "A genome screen of 35 bipolar affective disorder pedigrees provides significant evidence for a susceptibility locus on chromosome 15q25-26." *Mol Psychiatry* **14**(5): 492-500.
- McCarthy S.E., V. Makarov, G. Kirov, A.M. Addington, J. McClellan, S. Yoon, D.O. Perkins, D.E. Dickel, M. Kusenda, O. Krastoshevsky, V. Krause, R.A. Kumar, D. Grozeva, D. Malhotra, T. Walsh, E.H. Zackai, P. Kaplan, J. Ganesh, I.D. Krantz, N.B. Spinner, et al. (2009). "Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia." *Nat Genet* **41**(11): 1223-1227.
- Mexal S., R. Berger, L. Pearce, A. Barton, J. Logel, C.E. Adams, R.G. Ross, R. Freedman and S. Leonard (2008). "Regulation of a novel alphaN-catenin splice variant in schizophrenic smokers." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**(6): 759-768.
- Miller D.T., M.P. Adam, S. Aradhya, L.G. Biesecker, A.R. Brothman, N.P. Carter, D.M. Church, J.A. Crolla, E.E. Eichler, C.J. Epstein, W.A. Faucett, L. Feuk, J.M. Friedman, A. Hamosh, L. Jackson, E.B. Kaminsky, K. Kok, I.D. Krantz, R.M. Kuhn, C. Lee, et al. (2010). "Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies." *Am J Hum Genet* **86**(5): 749-764.
- Mills J.D., T. Kavanagh, W.S. Kim, B.J. Chen, Y. Kawahara, G.M. Halliday and M. Janitz (2013). "Unique transcriptome patterns of the white and grey matter corroborate structural and functional heterogeneity in the human frontal lobe." *PLoS One* **8**(10): e78480.
- Mills R.E., K. Walter, C. Stewart, R.E. Handsaker, K. Chen, C. Alkan, A. Abyzov, S.C. Yoon, K. Ye, R.K. Cheetham, A. Chinwalla, D.F. Conrad, Y. Fu, F. Grubert, I. Hajirasouliha, F. Hormozdiari, L.M. Iakoucheva, Z. Iqbal, S. Kang, J.M. Kidd, et al. (2011). "Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing." *Nature* **470**(7332): 59-65.
- Missler M., T.C. Sudhof and T. Biederer (2012). "Synaptic cell adhesion." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(4): a005694.
- Miyashita A., H. Arai, T. Asada, M. Imagawa, E. Matsubara, M. Shoji, S. Higuchi, K. Urakami, A. Kakita, H. Takahashi, S. Toyabe, K. Akazawa, I. Kanazawa, Y. Ihara and R. Kuwano (2007). "Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females." *Hum Mol Genet* **16**(23): 2854-2869.

- Moessner R., C.R. Marshall, J.S. Sutcliffe, J. Skaug, D. Pinto, J. Vincent, L. Zwaigenbaum, B. Fernandez, W. Roberts, P. Szatmari and S.W. Scherer (2007). "Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder." *Am J Hum Genet* **81**(6): 1289-1297.
- Monfort S., C. Orellana, S. Oltra, M. Rosello, M. Guitart and F. Martinez (2006). "Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements." *J Lab Clin Med* **147**(6): 295-300.
- Morgan V.A., H. Leonard, J. Bourke and A. Jablensky (2008). "Intellectual disability co-occurring with schizophrenia and other psychiatric illness: population-based study." *Br J Psychiatry* **193**(5): 364-372.
- Morrow E.M., S.Y. Yoo, S.W. Flavell, T.K. Kim, Y. Lin, R.S. Hill, N.M. Mukaddes, S. Balkhy, G. Gascon, A. Hashmi, S. Al-Saad, J. Ware, R.M. Joseph, R. Greenblatt, D. Gleason, J.A. Ertelt, K.A. Apse, A. Bodell, J.N. Partlow, B. Barry, et al. (2008). "Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry." *Science* **321**(5886): 218-223.
- Mucciolo M., P. Magini, A. Marozza, P. Mongelli, M.A. Mencarelli, G. Hayek, F. Tavalazzi, F. Mari, M. Seri, A. Renieri and C. Graziano (2014). "9q31.1q31.3 deletion in two patients with similar clinical features: a newly recognized microdeletion syndrome?" *Am J Med Genet A* **164A**(3): 685-690.
- Mullegama S.V., J.A. Rosenfeld, C. Orellana, B.W. van Bon, S. Halbach, E.A. Repnikova, L. Brick, C. Li, L. Dupuis, M. Rosello, S. Aradhya, D.J. Stavropoulos, K. Manickam, E. Mitchell, J.C. Hodge, M.E. Talkowski, J.F. Gusella, K. Keller, J. Zonana, S. Schwartz, et al. (2014). "Reciprocal deletion and duplication at 2q23.1 indicates a role for MBD5 in autism spectrum disorder." *Eur J Hum Genet* **22**(1): 57-63.
- Myles-Worsley M., J. Tiobech, S.R. Browning, J. Korn, S. Goodman, K. Gentile, N. Melhem, W. Byerley, S.V. Faraone and F.A. Middleton (2013). "Deletion at the SLC1A1 glutamate transporter gene co-segregates with schizophrenia and bipolar schizoaffective disorder in a 5-generation family." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **162B**(2): 87-95.
- Myrbakk E. and S. von Tetzchner (2008). "Psychiatric disorders and behavior problems in people with intellectual disability." *Res Dev Disabil* **29**(4): 316-332.
- Nesbitt A., E.J. Bhoj, K. McDonald Gibson, Z. Yu, E. Denenberg, M. Sarmady, T. Tischler, K. Cao, H. Dubbs, E.H. Zackai and A. Santani (2015). "Exome sequencing expands the mechanism of SOX5-associated intellectual disability: A case presentation with review of sox-related disorders." *Am J Med Genet A*.
- Newman S., K.E. Hermetz, B. Weckselblatt and M.K. Rudd (2015). "Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints." *Am J Hum Genet* **96**(2): 208-220.
- Noor A., A.C. Lionel, S. Cohen-Woods, N. Moghimi, J. Rucker, A. Fennell, B. Thiruvahindrapuram, L. Kaufman, B. Degagne, J. Wei, S.V. Parikh, P. Muglia, J. Forte, S.W. Scherer, J.L. Kennedy, W. Xu, P. McGuffin, A. Farmer, J. Strauss and J.B. Vincent (2014). "Copy number variant study of bipolar disorder in Canadian and UK populations implicates synaptic genes." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **165B**(4): 303-313.

BIBLIOGRAFIA

- Noor A., L. Dupuis, K. Mittal, A.C. Lionel, C.R. Marshall, S.W. Scherer, T. Stockley, J.B. Vincent, R. Mendoza-Londono and D.J. Stavropoulos (2015). "15q11.2 Duplication Encompassing Only the UBE3A Gene Is Associated with Developmental Delay and Neuropsychiatric Phenotypes." *Hum Mutat* **36**(7): 689-693.
- Nowakowska B., P. Stankiewicz, E. Obersztyn, Z. Ou, J. Li, A.C. Chinault, M. Smyk, K. Borg, T. Mazurczak, S.W. Cheung and E. Bocian (2008). "Application of metaphase HR-CGH and targeted Chromosomal Microarray Analyses to genomic characterization of 116 patients with mental retardation and dysmorphic features." *Am J Med Genet A* **146A**(18): 2361-2369.
- O'Dushlaine C., L. Rossin, P. Lee, L. Duncan, N. Parikshak, S. Newhouse, S. Ripke, B. Neale, S. Purcell, D. Posthuma, J. Nurnberger, S. Lee, S. Faraone, R. Perlis, B. Mowry, A. Thapar, M. Goddard, J. Witte, D. Absher, I. Agartz, et al. (2015). "Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways." *Nat Neurosci* **18**(2): 199-209.
- O'Roak B.J., P. Deriziotis, C. Lee, L. Vives, J.J. Schwartz, S. Girirajan, E. Karakoc, A.P. Mackenzie, S.B. Ng, C. Baker, M.J. Rieder, D.A. Nickerson, R. Bernier, S.E. Fisher, J. Shendure and E.E. Eichler (2011). "Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations." *Nat Genet* **43**(6): 585-589.
- O'Roak B.J., L. Vives, S. Girirajan, E. Karakoc, N. Krumm, B.P. Coe, R. Levy, A. Ko, C. Lee, J.D. Smith, E.H. Turner, I.B. Stanaway, B. Vernot, M. Malig, C. Baker, B. Reilly, J.M. Akey, E. Borenstein, M.J. Rieder, D.A. Nickerson, et al. (2012). "Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations." *Nature* **485**(7397): 246-250.
- Ophoff R.A., M.A. Escamilla, S.K. Service, M. Spesny, D.B. Meshi, W. Poon, J. Molina, E. Fournier, A. Gallegos, C. Mathews, T. Neylan, S.L. Batki, E. Roche, M. Ramirez, S. Silva, M.C. De Mille, P. Dong, P.E. Leon, V.I. Reus, L.A. Sandkuijl, et al. (2002). "Genomewide linkage disequilibrium mapping of severe bipolar disorder in a population isolate." *Am J Hum Genet* **71**(3): 565-574.
- Oskarsdottir S., M. Vujic and A. Fasth (2004). "Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden." *Arch Dis Child* **89**(2): 148-151.
- Paez M.T., T. Yamamoto, K. Hayashi, T. Yasuda, N. Harada, N. Matsumoto, K. Kurosawa, Y. Furutani, S. Asakawa, N. Shimizu and R. Matsuoka (2008). "Two patients with atypical interstitial deletions of 8p23.1: mapping of phenotypical traits." *Am J Med Genet A* **146A**(9): 1158-1165.
- Pagnamenta A.T., E. Bacchelli, M.V. de Jonge, G. Mirza, T.S. Scerri, F. Minopoli, A. Chiocchetti, K.U. Ludwig, P. Hoffmann, S. Paracchini, E. Lowy, D.H. Harold, J.A. Chapman, S.M. Klauck, F. Poustka, R.H. Houben, W.G. Staal, R.A. Ophoff, M.C. O'Donovan, J. Williams, et al. (2010). "Characterization of a family with rare deletions in CNTNAP5 and DOCK4 suggests novel risk loci for autism and dyslexia." *Biol Psychiatry* **68**(4): 320-328.
- Palomares M., A. Delicado, E. Mansilla, M.L. de Torres, E. Vallespin, L. Fernandez, V. Martinez-Glez, S. Garcia-Minaur, J. Nevado, F.S. Simarro, V.L. Ruiz-Perez, S.A. Lynch, F.H.

- Sharkey, A.C. Thuresson, G. Anneren, E.F. Belligni, M.L. Martinez-Fernandez, E. Bermejo, B. Nowakowska, A. Kutkowska-Kazmierczak, et al. (2011). "Characterization of a 8q21.11 microdeletion syndrome associated with intellectual disability and a recognizable phenotype." *Am J Hum Genet* **89**(2): 295-301.
- Pasmant E., A. Sabbagh, N. Hanna, J. Masliah-Planchon, E. Jolly, P. Goussard, P. Ballerini, F. Cartault, S. Barbarot, J. Landman-Parker, N. Soufir, B. Parfait, M. Vidaud, P. Wolkenstein, D. Vidaud and R.N. France (2009). "SPRED1 germline mutations caused a neurofibromatosis type 1 overlapping phenotype." *J Med Genet* **46**(7): 425-430.
- Piard J., C. Philippe, M. Marvier, C. Beneteau, V. Roth, M. Valduga, M. Beri, C. Bonnet, M.J. Gregoire, P. Jonveaux and B. Leheup (2010). "Clinical and molecular characterization of a large family with an interstitial 15q11q13 duplication." *Am J Med Genet A* **152A**(8): 1933-1941.
- Piccione M., V. Antona, E. Piro, S. Cavani, M. Malacarne, M. Pierluigi and G. Corsello (2008). "10qter deletion: a new case." *Am J Med Genet A* **146A**(18): 2435-2438.
- Pinto D., A.T. Pagnamenta, L. Klei, R. Anney, D. Merico, R. Regan, J. Conroy, T.R. Magalhaes, C. Correia, B.S. Abrahams, J. Almeida, E. Bacchelli, G.D. Bader, A.J. Bailey, G. Baird, A. Battaglia, T. Berney, N. Bolshakova, S. Bolte, P.F. Bolton, et al. (2010). "Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders." *Nature* **466**(7304): 368-372.
- Pizzarelli R. and E. Cherubini (2011). "Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders." *Neural Plast* **2011**: 297153.
- Poelmans G., D.L. Pauls, J.K. Buitelaar and B. Franke (2011). "Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder." *Am J Psychiatry* **168**(4): 365-377.
- Pohovski L.M., K.K. Domic, L. Odak and I. Barisic (2013). "Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability." *Mol Cytogenet* **6**(1): 7.
- Polanczyk G., M.S. de Lima, B.L. Horta, J. Biederman and L.A. Rohde (2007). "The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis." *Am J Psychiatry* **164**(6): 942-948.
- Porton B., B.D. Greenberg, K. Askland, L.M. Serra, J. Gesmonde, G. Rudnick, S.A. Rasmussen and H.T. Kao (2013). "Isoforms of the neuronal glutamate transporter gene, SLC1A1/EAAC1, negatively modulate glutamate uptake: relevance to obsessive-compulsive disorder." *Transl Psychiatry* **3**: e259.
- Prasad A., D. Merico, B. Thiruvahindrapuram, J. Wei, A.C. Lionel, D. Sato, J. Rickaby, C. Lu, P. Szatmari, W. Roberts, B.A. Fernandez, C.R. Marshall, E. Hatchwell, P.S. Eis and S.W. Scherer (2012). "A discovery resource of rare copy number variations in individuals with autism spectrum disorder." *G3 (Bethesda)* **2**(12): 1665-1685.
- Qiao Y., K. Mondal, V. Trapani, J. Wen, G. Carpenter, R. Wildin, E.M. Price, R.J. Gibbons, J. Eichmeyer, R. Jiang, B. DuPont, S. Martell, S.M. Lewis, W.P. Robinson, M. O'Driscoll, F.I.

BIBLIOGRAFIA

- Wolf, M.E. Zwick and E. Rajcan-Separovic (2014). "Variant ATRX syndrome with dysfunction of ATRX and MAGT1 genes." *Hum Mutat* **35**(1): 58-62.
- Quintela I., F. Barros, R. Lago-Leston, M. Castro-Gago, A. Carracedo and J. Eiris (2015). "A maternally inherited 16p13.11-p12.3 duplication concomitant with a de novo SOX5 deletion in a male patient with global developmental delay, disruptive and obsessive behaviors and minor dysmorphic features." *Am J Med Genet A* **167**(6): 1315-1322.
- Quintero-Rivera F., P. Sharifi-Hannauer and J.A. Martinez-Agosto (2010). "Autistic and psychiatric findings associated with the 3q29 microdeletion syndrome: case report and review." *Am J Med Genet A* **152A**(10): 2459-2467.
- Ravnan J.B., J.H. Tepperberg, P. Papenhausen, A.N. Lamb, J. Hedrick, D. Eash, D.H. Ledbetter and C.L. Martin (2006). "Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities." *J Med Genet* **43**(6): 478-489.
- Redon R., S. Ishikawa, K.R. Fitch, L. Feuk, G.H. Perry, T.D. Andrews, H. Fiegler, M.H. Shapero, A.R. Carson, W. Chen, E.K. Cho, S. Dallaire, J.L. Freeman, J.R. Gonzalez, M. Gratacos, J. Huang, D. Kalaitzopoulos, D. Komura, J.R. MacDonald, C.R. Marshall, et al. (2006). "Global variation in copy number in the human genome." *Nature* **444**(7118): 444-454.
- Rees E., J.T. Walters, L. Georgieva, A.R. Isles, K.D. Chambert, A.L. Richards, G. Mahoney-Davies, S.E. Legge, J.L. Moran, S.A. McCarroll, M.C. O'Donovan, M.J. Owen and G. Kirov (2014). "Analysis of copy number variations at 15 schizophrenia-associated loci." *Br J Psychiatry* **204**(2): 108-114.
- Reissner C., M. Klose, R. Fairless and M. Missler (2008). "Mutational analysis of the neurexin/neurologin complex reveals essential and regulatory components." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 15124-15129.
- Ripsey C., T. Walsh, S. Gulsuner, M. Brodsky, A.S. Nord, M. Gasperini, S. Pierce, C. Spurrell, B.P. Coe, N. Krumm, M.K. Lee, J. Sebat, J.M. McClellan and M.C. King (2013). "Formation of chimeric genes by copy-number variation as a mutational mechanism in schizophrenia." *Am J Hum Genet* **93**(4): 697-710.
- Roggenbuck J.A., N.J. Mendelsohn, B. Tenenholz, R.L. Ladda and J.M. Fink (2004). "Duplication of the distal long arm of chromosome 15: report of three new patients and review of the literature." *Am J Med Genet A* **126A**(4): 398-402.
- Ropers H.H. (2010). "Genetics of early onset cognitive impairment." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**: 161-187.
- Rosenfeld J.A., B.C. Ballif, B.S. Torchia, T. Sahoo, J.B. Ravnan, R. Schultz, A. Lamb, B.A. Bejjani and L.G. Shaffer (2010). "Copy number variations associated with autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders." *Genet Med* **12**(11): 694-702.
- Rossi E., F. Piccini, M. Zollino, G. Neri, D. Caselli, R. Tenconi, C. Castellan, R. Carrozzo, C. Danesino, O. Zuffardi, A. Ragusa, L. Castiglia, O. Galesi, D. Greco, C. Romano, M. Pierluigi, C. Perfumo, M. Di Rocco, F. Faravelli, F. Dagna Bricarelli, et al. (2001). "Cryptic

- telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations." *J Med Genet* **38**(6): 417-420.
- Rowen L., J. Young, B. Birditt, A. Kaur, A. Madan, D.L. Philipps, S. Qin, P. Minx, R.K. Wilson, L. Hood and B.R. Graveley (2002). "Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity." *Genomics* **79**(4): 587-597.
- Rzhetsky A., S.C. Bagley, K. Wang, C.S. Lyttle, E.H. Cook, Jr., R.B. Altman and R.D. Gibbons (2014). "Environmental and state-level regulatory factors affect the incidence of autism and intellectual disability." *PLoS Comput Biol* **10**(3): e1003518.
- Sahoo T., C.A. Shaw, A.S. Young, N.L. Whitehouse, R.J. Schroer, R.E. Stevenson and A.L. Beaudet (2005). "Array-based comparative genomic hybridization analysis of recurrent chromosome 15q rearrangements." *Am J Med Genet A* **139A**(2): 106-113.
- Saiga T., T. Fukuda, M. Matsumoto, H. Tada, H.J. Okano, H. Okano and K.I. Nakayama (2009). "Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development." *Mol Cell Biol* **29**(13): 3529-3543.
- Salgado H. and L. Martins-Correia (2014). "Williams syndrome and psychosis: a case report." *J Med Case Rep* **8**: 49.
- Salim S. (2014). "Oxidative stress and psychological disorders." *Curr Neuropharmacol* **12**(2): 140-147.
- Saluto A., A. Brussino, F. Tassone, C. Arduino, C. Cagnoli, P. Pappi, P. Hagerman, N. Migone and A. Brusco (2005). "An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene." *J Mol Diagn* **7**(5): 605-612.
- Sanders S.J., A.G. Ercan-Sencicek, V. Hus, R. Luo, M.T. Murtha, D. Moreno-De-Luca, S.H. Chu, M.P. Moreau, A.R. Gupta, S.A. Thomson, C.E. Mason, K. Bilguvar, P.B. Celestino-Soper, M. Choi, E.L. Crawford, L. Davis, N.R. Wright, R.M. Dhodapkar, M. DiCola, N.M. DiLullo, et al. (2011). "Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism." *Neuron* **70**(5): 863-885.
- Santa Maria L., V. Faundes, B. Curotto, P. Morales, K. Morales, S. Aliaga, A. Pugin and M.A. Allende (2015). "Comparison of two subtelomeric assays for the screening of chromosomal rearrangements: analysis of 383 patients, literature review and further recommendations." *J Appl Genet*.
- Saus E., A. Brunet, L. Armengol, P. Alonso, J.M. Crespo, F. Fernandez-Aranda, M. Guitart, R. Martin-Santos, J.M. Menchon, R. Navines, V. Soria, M. Torrens, M. Urretavizcaya, V. Valles, M. Gratacos and X. Estivill (2010). "Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients." *J Psychiatr Res* **44**(14): 971-978.
- Schaaf C.P., P.M. Boone, S. Sampath, C. Williams, P.I. Bader, J.M. Mueller, O.A. Shchelochkov, C.W. Brown, H.P. Crawford, J.A. Phalen, N.R. Tartaglia, P. Evans, W.M. Campbell, A.C. Tsai, L. Parsley, S.W. Grayson, A. Scheuerle, C.D. Luzzi, S.K. Thomas, P.A. Eng, et al. (2012). "Phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations of NRXN1 exon deletions." *Eur J Hum Genet* **20**(12): 1240-1247.

BIBLIOGRAFIA

- Schaaf C.P. (2014). "Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease." *Genet Med* **16**(9): 649-656.
- Schneider A., J. Puechberty, B.L. Ng, C. Coubes, V. Gatinois, M. Tournaire, M. Girard, B. Dumont, P. Bouret, J. Magnosto, A. Baghdadli, F. Pellestor and D. Genevieve (2015). "Identification of disrupted AUTS2 and EPHA6 genes by array painting in a patient carrying a de novo balanced translocation t(3;7) with intellectual disability and neurodevelopment disorder." *Am J Med Genet A*.
- Schoumans J., C. Ruivenkamp, E. Holmberg, M. Kyllerman, B.M. Anderlid and M. Nordenskjold (2005). "Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH)." *J Med Genet* **42**(9): 699-705.
- Schroer R.J., M.C. Phelan, R.C. Michaelis, E.C. Crawford, S.A. Skinner, M. Cuccaro, R.J. Simensen, J. Bishop, C. Skinner, D. Fender and R.E. Stevenson (1998). "Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q." *Am J Med Genet* **76**(4): 327-336.
- Scoles H.A., N. Urraca, S.W. Chadwick, L.T. Reiter and J.M. Lasalle (2011). "Increased copy number for methylated maternal 15q duplications leads to changes in gene and protein expression in human cortical samples." *Mol Autism* **2**(1): 19.
- Sebat J., B. Lakshmi, J. Troge, J. Alexander, J. Young, P. Lundin, S. Maner, H. Massa, M. Walker, M. Chi, N. Navin, R. Lucito, J. Healy, J. Hicks, K. Ye, A. Reiner, T.C. Gilliam, B. Trask, N. Patterson, A. Zetterberg, et al. (2004). "Large-scale copy number polymorphism in the human genome." *Science* **305**(5683): 525-528.
- Sebat J., B. Lakshmi, D. Malhotra, J. Troge, C. Lese-Martin, T. Walsh, B. Yamrom, S. Yoon, A. Krasnitz, J. Kendall, A. Leotta, D. Pai, R. Zhang, Y.H. Lee, J. Hicks, S.J. Spence, A.T. Lee, K. Puura, T. Lehtimaki, D. Ledbetter, et al. (2007). "Strong association of de novo copy number mutations with autism." *Science* **316**(5823): 445-449.
- Shaffer L.G., B.A. Bejjani, B. Torchia, S. Kirkpatrick, J. Coppinger and B.C. Ballif (2007). "The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **145C**(4): 335-345.
- Sharp A.J., H.C. Mefford, K. Li, C. Baker, C. Skinner, R.E. Stevenson, R.J. Schroer, F. Novara, M. De Gregori, R. Ciccone, A. Broomer, I. Casuga, Y. Wang, C. Xiao, C. Barbacioru, G. Gimelli, B.D. Bernardina, C. Torniero, R. Giorda, R. Regan, et al. (2008). "A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures." *Nat Genet* **40**(3): 322-328.
- Shaw-Smith C., R. Redon, L. Rickman, M. Rio, L. Willatt, H. Fiegler, H. Firth, D. Sanlaville, R. Winter, L. Colleaux, M. Bobrow and N.P. Carter (2004). "Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features." *J Med Genet* **41**(4): 241-248.
- Shevell M., S. Ashwal, D. Donley, J. Flint, M. Gingold, D. Hirtz, A. Majnemer, M. Noetzel and R.D. Sheth (2003). "Practice parameter: evaluation of the child with global

- developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society." *Neurology* **60**(3): 367-380.
- Shin J.E., S. Geisler and A. DiAntonio (2014). "Dynamic regulation of SCG10 in regenerating axons after injury." *Exp Neurol* **252**: 1-11.
- Shin O.H., W. Han, Y. Wang and T.C. Sudhof (2005). "Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca²⁺ binding properties." *J Biol Chem* **280**(2): 1641-1651.
- Shprintzen R.J., R. Goldberg, K.J. Golding-Kushner and R.W. Marion (1992). "Late-onset psychosis in the velo-cardio-facial syndrome." *Am J Med Genet* **42**(1): 141-142.
- Sinnema M., H. Boer, P. Collin, M.A. Maaskant, K.E. van Roozendaal, C.T. Schrandt-Stumpel and L.M. Curfs (2011). "Psychiatric illness in a cohort of adults with Prader-Willi syndrome." *Res Dev Disabil* **32**(5): 1729-1735.
- Sklar (2008). "Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia." *Nature* **455**(7210): 237-241.
- Sklar P., S. Ripke, L. Scott, O. Andreassen, S. Cichon, N. Craddock, H.J. Edenberg, J. Nurnberger, M. Rietschel, D. Blackwood, A. Corvin, M. Flickinger and M.M. Guan W, McQuillen A, Kwan P, Wienker TF, Daly M, Dudbridge F, Holmans PA, Lin D, Burmeister M, Greenwood TA, Hamshire ML, Muglia P, Smith EN, Zandi PP, Nievergelt CM, McKinney R, Shilling PD, Schork NJ, Bloss CS, Foroud T, Koller DL, Gershon ES, Liu C, Badner JA, Scheftner WA, Lawson WB, Nwulia EA, Hipolito M, Coryell W, Rice J, Byerley W, McMahon FJ, Schulze TG, Berrettini W, Lohoff FW, Potash JB, Mahon PB, McInnis MG, Zöllner S, Zhang P, Craig DW, Szlinger S, Barrett TB, Breuer R, Meier S, Strohmaier J, Witt SH, Tozzi F, Farmer A, McGuffin P, Strauss J, Xu W, Kennedy JL, Vincent JB, Matthews K, Day R, Ferreira MA, O'Dushlaine C, Perlis R, Raychaudhuri S, Ruderfer D, Lee PH, Smoller JW, Li J, Absher D, Bunney WE, Barchas JD, Schatzberg AF, Jones EG, Meng F, Thompson RC, Watson SJ, Myers RM, Akil H, Boehnke M, Chambert K, Moran J, Scolnick E, Djurovic S, Melle I, Morken G, Gill M, Morris D, Quinn E, Mühleisen TW, Degenhardt FA, Mattheisen M, Schumacher J, Maier W, Steffans M, Propping P, Nöthen MM, Anjorin A, Bass N, Gurling H, Kandaswamy R, Lawrence J, McGhee K, McIntosh A, McLean AW, Muir WJ, Pickard BS, Breen G, St Clair D, Caesar S, Gordon-Smith K, Jones L, Fraser C, Green EK, Frozeva D, Jones IR, Kirov G, Moskvina V, Nikolov I, O'Donovan MC, Owen MJ, Collier DA, Elkin A, Williamson R, Young AH, Ferrier IN, Stefansson K, Stefansson H, Porgeirsson P, Steinberg S, Gustafsson Ó, Bergen SE, Nimgaonkar V, Hultman C, Landén M, Lichtenstein P, Sullivan P, Schalling M, Osby U, Backlund L, Frisén L, Langstrom N, Jamain S, Leboyer M, Etain B, Bellivier F, Petursson H, Sigurdsson E, Müller-Mysok B, Lucae S, Schwarz M, Fullerton JM, Schofield PR, Martin N, Montgomery GW, Lathrop M, Óskarsson H, Bauer M, Wright A, Mitchell PB, Hautzinger M, Reif A, Kelsoe JR, Purcell SM. (2011). "Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4." *Nat Genet* **43**(10): 977-983.
- Smoller J., S. Ripke, P. Lee, B. Neale, J. Nurnberger, S. Santangelo, P. Sullivan, R. Perlis, S. Purcell, A. Fanous, M. Neale, M. Rietschel, T. Schulze, A. Thapar, R. Anney, J. Buitelaar, S. Farone, W. Hoogendijk, D. Levinson, K. Lesch, et al. (2013). "Identification of risk loci

BIBLIOGRAFIA

- with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis." *Lancet* **381**(9875): 1371-1379.
- Snijders A.M., N. Nowak, R. Seagraves, S. Blackwood, N. Brown, J. Conroy, G. Hamilton, A.K. Hindle, B. Huey, K. Kimura, S. Law, K. Myambo, J. Palmer, B. Ylstra, J.P. Yue, J.W. Gray, A.N. Jain, D. Pinkel and D.G. Albertson (2001). "Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number." *Nat Genet* **29**(3): 263-264.
- Solinas-Toldo S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Dohner, T. Cremer and P. Lichter (1997). "Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances." *Genes Chromosomes Cancer* **20**(4): 399-407.
- Somerville M.J., C.B. Mervis, E.J. Young, E.J. Seo, M. del Campo, S. Bamforth, E. Peregrine, W. Loo, M. Lilley, L.A. Perez-Jurado, C.A. Morris, S.W. Scherer and L.R. Osborne (2005). "Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus." *N Engl J Med* **353**(16): 1694-1701.
- Spencer E., J. Davis, F. Mikhail, C. Fu, R. Vijzelaar, E.H. Zackai, H. Feret, M.S. Meyn, A. Shugar, G. Bellus, K. Kocsis, S. Kivirikko, M. Poyhonen and L. Messiaen (2011). "Identification of SPRED1 deletions using RT-PCR, multiplex ligation-dependent probe amplification and quantitative PCR." *Am J Med Genet A* **155A**(6): 1352-1359.
- Steel Z., C. Marnane, C. Iranpour, T. Chey, J.W. Jackson, V. Patel and D. Silove (2014). "The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013." *Int J Epidemiol* **43**(2): 476-493.
- Stefansson H., A. Meyer-Lindenberg, S. Steinberg, B. Magnusdottir, K. Morgen, S. Arnarsdottir, G. Bjornsdottir, G.B. Walters, G.A. Jonsdottir, O.M. Doyle, H. Tost, O. Grimm, S. Kristjansdottir, H. Snorrason, S.R. Davidsdottir, L.J. Gudmundsson, G.F. Jonsson, B. Stefansdottir, I. Helgadottir, M. Haraldsson, et al. (2014). "CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls." *Nature* **505**(7483): 361-366.
- Stegmann A.P., L.M. Jonker and J.J. Engelen (2008). "Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements." *Eur J Med Genet* **51**(2): 93-105.
- Strong E., D.T. Butcher, R. Singhanian, C.B. Mervis, C.A. Morris, D. De Carvalho, R. Weksberg and L.R. Osborne (2015). "Symmetrical Dose-Dependent DNA-Methylation Profiles in Children with Deletion or Duplication of 7q11.23." *Am J Hum Genet* **97**(2): 216-227.
- Sudmant P.H., J.O. Kitzman, F. Antonacci, C. Alkan, M. Malig, A. Tsalenko, N. Sampas, L. Bruhn, J. Shendure and E.E. Eichler (2010). "Diversity of human copy number variation and multicopy genes." *Science* **330**(6004): 641-646.
- Sudmant P.H., T. Rausch, E.J. Gardner, R.E. Handsaker, A. Abyzov, J. Huddleston, Y. Zhang, K. Ye, G. Jun, M. Hsi-Yang Fritz, M.K. Konkel, A. Malhotra, A.M. Stutz, X. Shi, F. Paolo Casale, J. Chen, F. Hormozdiari, G. Dayama, K. Chen, M. Malig, et al. (2015). "An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes." *Nature* **526**(7571): 75-81.

- Sullivan P.F., C. Magnusson, A. Reichenberg, M. Boman, C. Dalman, M. Davidson, E. Fruchter, C.M. Hultman, M. Lundberg, N. Langstrom, M. Weiser, A.C. Svensson and P. Lichtenstein (2012). "Family history of schizophrenia and bipolar disorder as risk factors for autism." *Arch Gen Psychiatry* **69**(11): 1099-1103.
- Sultana R., C.E. Yu, J. Yu, J. Munson, D. Chen, W. Hua, A. Estes, F. Cortes, F. de la Barra, D. Yu, S.T. Haider, B.J. Trask, E.D. Green, W.H. Raskind, C.M. Disteché, E. Wijsman, G. Dawson, D.R. Storm, G.D. Schellenberg and E.C. Villacres (2002). "Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins." *Genomics* **80**(2): 129-134.
- Sutherland G.R., A.R. Murch, A.J. Gardiner, R.F. Carter and C. Wiseman (1976). "Cytogenetic survey of a hospital for the mentally retarded." *Hum Genet* **34**(3): 231-245.
- Tada H., H.J. Okano, H. Takagi, S. Shibata, I. Yao, M. Matsumoto, T. Saiga, K.I. Nakayama, H. Kashima, T. Takahashi, M. Setou and H. Okano (2010). "Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity." *J Biol Chem* **285**(6): 3840-3849.
- Talkowski M.E., C. Ernst, A. Heilbut, C. Chiang, C. Hanscom, A. Lindgren, A. Kirby, S. Liu, B. Muddukrishna, T.K. Ohsumi, Y. Shen, M. Borowsky, M.J. Daly, C.C. Morton and J.F. Gusella (2011). "Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research." *Am J Hum Genet* **88**(4): 469-481.
- Talkowski M.E., S.V. Mullegama, J.A. Rosenfeld, B.W. van Bon, Y. Shen, E.A. Repnikova, J. Gastier-Foster, D.L. Thrush, S. Kathiresan, D.M. Ruderfer, C. Chiang, C. Hanscom, C. Ernst, A.M. Lindgren, C.C. Morton, Y. An, C. Astbury, L.A. Brueton, K.D. Lichtenbelt, L.C. Ades, et al. (2011). "Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder." *Am J Hum Genet* **89**(4): 551-563.
- Taylor M.R., J. Jirikowic, C. Wells, M. Springer, L. McGavran, B. Lunt and K. Swisshelm (2010). "High prevalence of array comparative genomic hybridization abnormalities in adults with unexplained intellectual disability." *Genet Med* **12**(1): 32-38.
- Tebartz van Elst L., S. Maier, T. Fangmeier, D. Endres, G.T. Mueller, K. Nickel, D. Ebert, T. Lange, J. Hennig, M. Biscaldi, A. Riedel and E. Perlov (2014). "Disturbed cingulate glutamate metabolism in adults with high-functioning autism spectrum disorder: evidence in support of the excitatory/inhibitory imbalance hypothesis." *Mol Psychiatry* **19**(12): 1314-1325.
- Tezenas Du Montcel S., H. Mendizabai, S. Ayme, A. Levy and N. Philip (1996). "Prevalence of 22q11 microdeletion." *J Med Genet* **33**(8): 719.
- Thomas J.A., J. Johnson, T.L. Peterson Kraai, R. Wilson, N. Tartaglia, J. LeRoux, L. Beischel, L. McGavran and R.J. Hagerman (2003). "Genetic and clinical characterization of patients with an interstitial duplication 15q11-q13, emphasizing behavioral phenotype and response to treatment." *Am J Med Genet A* **119A**(2): 111-120.

BIBLIOGRAFIA

- Turner D.J., M. Miretti, D. Rajan, H. Fiegler, N.P. Carter, M.L. Blayney, S. Beck and M.E. Hurler (2008). "Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders." *Nat Genet* **40**(1): 90-95.
- Van der Aa N., L. Rooms, G. Vandeweyer, J. van den Ende, E. Reyniers, M. Fichera, C. Romano, B. Delle Chiaie, G. Mortier, B. Menten, A. Destree, I. Maystadt, K. Mannik, A. Kurg, T. Reimand, D. McMullan, C. Oley, L. Brueton, E.M. Bongers, B.W. van Bon, et al. (2009). "Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome." *Eur J Med Genet* **52**(2-3): 94-100.
- van Karnebeek C.D., F.Y. Scheper, N.G. Abeling, M. Alders, P.G. Barth, J.M. Hoovers, C. Koevoets, R.J. Wanders and R.C. Hennekam (2005). "Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study." *Am J Ment Retard* **110**(4): 253-267.
- Vergult S., A. Dauber, B. Delle Chiaie, E. Van Oudenhove, M. Simon, A. Rihani, B. Loeys, J. Hirschhorn, J. Pfothner, J.A. Phillips, 3rd, S. Mohammed, C. Ogilvie, J. Crolla, G. Mortier and B. Menten (2012). "17q24.2 microdeletions: a new syndromal entity with intellectual disability, truncal obesity, mood swings and hallucinations." *Eur J Hum Genet* **20**(5): 534-539.
- Vinas-Jornet M., S. Esteba-Castillo, E. Gabau, N. Ribas-Vidal, N. Baena, J. San, A. Ruiz, M.D. Coll, R. Novell and M. Guitart (2014). "A common cognitive, psychiatric, and dysmorphic phenotype in carriers of NRXN1 deletion." *Mol Genet Genomic Med* **2**(6): 512-521.
- Vissers L.E., B.B. de Vries, K. Osoegawa, I.M. Janssen, T. Feuth, C.O. Choy, H. Straatman, W. van der Vliet, E.H. Huys, A. van Rijk, D. Smeets, C.M. van Ravenswaaij-Arts, N.V. Knoers, I. van der Burgt, P.J. de Jong, H.G. Brunner, A.G. van Kessel, E.F. Schoenmakers and J.A. Veltman (2003). "Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities." *Am J Hum Genet* **73**(6): 1261-1270.
- Vulto-van Silfhout A.T., J.Y. Hehir-Kwa, B.W. van Bon, J.H. Schuurs-Hoeijmakers, S. Meader, C.J. Hellebrekers, I.J. Thoonen, A.P. de Brouwer, H.G. Brunner, C. Webber, R. Pfundt, N. de Leeuw and B.B. de Vries (2013). "Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation." *Hum Mutat* **34**(12): 1679-1687.
- Waga C., N. Okamoto, Y. Ondo, R. Fukumura-Kato, Y. Goto, S. Kohsaka and S. Uchino (2011). "Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development." *Psychiatr Genet* **21**(4): 208-211.
- Walsh T., J.M. McClellan, S.E. McCarthy, A.M. Addington, S.B. Pierce, G.M. Cooper, A.S. Nord, M. Kusenda, D. Malhotra, A. Bhandari, S.M. Stray, C.F. Rippey, P. Rocanova, V. Makarov, B. Lakshmi, R.L. Findling, L. Sikich, T. Stromberg, B. Merriman, N. Gogtay, et al. (2008). "Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia." *Science* **320**(5875): 539-543.
- Walss-Bass C., M.C. Soto-Bernardini, T. Johnson-Pais, R.J. Leach, A. Ontiveros, H. Nicolini, R. Mendoza, A. Jerez, A. Dassori, I. Chavarria-Siles, M.A. Escamilla and H. Raventos (2009). "Methionine sulfoxide reductase: a novel schizophrenia candidate gene." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **150B**(2): 219-225.

- Wang K., H. Zhang, D. Ma, M. Bucan, J.T. Glessner, B.S. Abrahams, D. Salyakina, M. Imielinski, J.P. Bradfield, P.M. Sleiman, C.E. Kim, C. Hou, E. Frackelton, R. Chiavacci, N. Takahashi, T. Sakurai, E. Rappaport, C.M. Lajonchere, J. Munson, A. Estes, et al. (2009). "Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders." *Nature* **459**(7246): 528-533.
- Wang T.Y., S.Y. Lee, S.L. Chen, S.Y. Huang, Y.H. Chang, N.S. Tzeng, C.L. Wang, I. Hui Lee, T.L. Yeh, Y.K. Yang and R.B. Lu (2013). "Association between DRD2, 5-HTTLPR, and ALDH2 genes and specific personality traits in alcohol- and opiate-dependent patients." *Behav Brain Res* **250**: 285-292.
- Wang X., Q. Xu, A.L. Bey, Y. Lee and Y.H. Jiang (2014). "Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice." *Mol Autism* **5**: 30.
- Wassef R., R. Haenold, A. Hansel, N. Brot, S.H. Heinemann and T. Hoshi (2007). "Methionine sulfoxide reductase A and a dietary supplement S-methyl-L-cysteine prevent Parkinson's-like symptoms." *J Neurosci* **27**(47): 12808-12816.
- Weckselblatt B. and M.K. Rudd (2015). "Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements." *Trends Genet* **31**(10): 587-599.
- Weischenfeldt J., O. Symmons, F. Spitz and J.O. Korbel (2013). "Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease." *Nat Rev Genet* **14**(2): 125-138.
- Weiss L.A., Y. Shen, J.M. Korn, D.E. Arking, D.T. Miller, R. Fossdal, E. Saemundsen, H. Stefansson, M.A. Ferreira, T. Green, O.S. Platt, D.M. Ruderfer, C.A. Walsh, D. Altshuler, A. Chakravarti, R.E. Tanzi, K. Stefansson, S.L. Santangelo, J.F. Gusella, P. Sklar, et al. (2008). "Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism." *N Engl J Med* **358**(7): 667-675.
- Weiss L.A., D.E. Arking, M.J. Daly and A. Chakravarti (2009). "A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism." *Nature* **461**(7265): 802-808.
- Willemsen M.H. and T. Kleefstra (2014). "Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities." *Clin Genet* **85**(2): 101-110.
- Wisniowiecka-Kowalnik B., M. Nesteruk, S.U. Peters, Z. Xia, M.L. Cooper, S. Savage, R.S. Amato, P. Bader, M.F. Browning, C.L. Haun, A.W. Duda, 3rd, S.W. Cheung and P. Stankiewicz (2010). "Intragenic rearrangements in NRXN1 in three families with autism spectrum disorder, developmental delay, and speech delay." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**(5): 983-993.
- Wittchen H.U., F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jonsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon and H.C. Steinhausen (2011). "The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010." *Eur Neuropsychopharmacol* **21**(9): 655-679.

BIBLIOGRAFIA

- Wong A.C., Y. Ning, J. Flint, K. Clark, J.P. Dumanski, D.H. Ledbetter and H.E. McDermid (1997). "Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation." *Am J Hum Genet* **60**(1): 113-120.
- Xi R., A.G. Hadjipanayis, L.J. Luquette, T.M. Kim, E. Lee, J. Zhang, M.D. Johnson, D.M. Muzny, D.A. Wheeler, R.A. Gibbs, R. Kucherlapati and P.J. Park (2011). "Copy number variation detection in whole-genome sequencing data using the Bayesian information criterion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(46): E1128-1136.
- Yeargin-Allsopp M., C. Rice, T. Karapurkar, N. Doernberg, C. Boyle and C. Murphy (2003). "Prevalence of autism in a US metropolitan area." *JAMA* **289**(1): 49-55.
- Ylstra B., P. van den Ijssel, B. Carvalho, R.H. Brakenhoff and G.A. Meijer (2006). "BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH)." *Nucleic Acids Res* **34**(2): 445-450.
- Yoon S., Z. Xuan, V. Makarov, K. Ye and J. Sebat (2009). "Sensitive and accurate detection of copy number variants using read depth of coverage." *Genome Res* **19**(9): 1586-1592.
- Zarrei M., J.R. MacDonald, D. Merico and S.W. Scherer (2015). "A copy number variation map of the human genome." *Nat Rev Genet* **16**(3): 172-183.
- Zhu M., A.C. Need, Y. Han, D. Ge, J.M. Maia, Q. Zhu, E.L. Heinzen, E.T. Cirulli, K. Pelak, M. He, E.K. Ruzzo, C. Gumbs, A. Singh, S. Feng, K.V. Shianna and D.B. Goldstein (2012). "Using ERDS to infer copy-number variants in high-coverage genomes." *Am J Hum Genet* **91**(3): 408-421.
- Zhu X., A.C. Need, S. Petrovski and D.B. Goldstein (2014). "One gene, many neuropsychiatric disorders: lessons from Mendelian diseases." *Nat Neurosci* **17**(6): 773-781.
- Zigler E. (1967). "Familial mental retardation: a continuing dilemma." *Science* **155**(3760): 292-298.
- Zoghbi H.Y. and M.F. Bear (2012). "Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(3).

7 . ANNEX 1

BACs utilitzats per la confirmació de variants en nombre de còpies mitjançant FISH

Regió	Blat (Hg18)	sonda problema	sonda control	Regió sonda control
11q14.1	81,283,204-81,529,758	RP11-268M13	RP11-118A14	11p15.1
Xp22.33/Yp112	796,171-1,176,808	RP11-309M23	RP11-496N21	Xq22.1
15q14	35,670,205-38,409,152	RP11-127C4	RP11-81L17	15q25.2
12p12.1	23,323,561-26,125,263	RP11-707G18	RP11-317E02	12q
8q21.13	80,450,747-81,181,756	RP11-97F17	RP11-222M11	8p21.3
1p21.1	104,012,320-104,555,156	RP11-151P07	RP11-644J10	1p36.13
Xq22.1	100,695,536-101,036,403	RP11-496N21	RP11-309M23	Xp22.33

Sondes de MLPA dissenyades per la confirmació de variants en nombre de còpies

Barreja 1					
Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R	
-	2q14.3	85	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACAAGACCCAGGGTCCGGGAT - 3'	5'P - TCAGAAGAGGGTCTGATGCTGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
ACAT1	11q22.3	89	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACTCATGACGGCAGATGCAGCGA - 3'	5'P - AGAGGCTCAATGTTACACCACTGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
THSD7A.II	7p21.3	93	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttGCCCGTCCTTGAATAACCACA - 3'	5'P - TGCACTGGGATTCTCCCTTAAGTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
-	12p11.22	97	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgGATGTGTATCATGCCAAGCCAAACCATT - 3'	5'P - TATTACTGTGCCAGACCCTCCAACCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
NRXN1	2p16.3	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaGAGCATCGGAGATGAGGTCCGGA - 3'	5'P - AGCCGTCCATTTAAATCAACTGATGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
EXOC4	7q33	105	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACCAATCTGATATACAGTTGTGGGGGA - 3'	5'P - AAGGCTCTGGTGGAAATAGGGCCAGAGAACCACTCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
MSX1a	4p16.2	109	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCCATGATGGTCTGCGTCTGCCA - 3'	5'P - TCTCTGGTCTGCGGGAACCTACTCCTAGAATCCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
PDE4D	5q12.1	113	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaGAGGACAGTGGGCACTATCTGAGA - 3'	5'P - ATGGAGTGAAGTACCCTTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
MCTP2	15q26.2	117	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaGCATAGGTGCATGTGCGTGAAGAGT - 3'	5'P - TCATATTGGCGGCTGCCAATGGTAGTGGCTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
SYNE1.II	6q25.2	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgcgtattctactgactaGCTGATATTTCCCTCTGGGCTGGACCTGACTCTAT - 3'	5'P - TTACGGAAGGGGGCAGAAGTCCAGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
RAS3GAP1	2q21.3	125	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaGCTTTTAGTGGGATGATCTTGATCCAGGCTGA - 3'	5'P - AGGCCAGCCAGGCCACCTGTATAGAGTGAATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	
RASL12a	15q22.31	129	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAAcAGATGGTTAGCCAGGTGACACAGTGCCTTGGGTGTAAGT - 3'	5'P - TTGAGCTTCCCTCTGTGCTAGACCCTGTGTGGCCTGGGGGACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'	

Barreja 2				
Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
-	12p11.22	83	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAGCATTCTGCCCTCTAACCT - 3'	5' P - TGACTGACTGACCCACAGGTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
COL6A1	21q22.3	87	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAGAGGATGCTGTGAACGAGGCCA - 3'	5' P - AGCACCTGGGCGTCAAAGTCTTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
THSD7A	7p21.3	91	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAGCATGTCAAGCAATTGGGTGTACCT - 3'	5' P - TGTTGCCAGGCCTCAACTCTGACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
RASA3	13q34	95	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGACGGCTTCCCCAGAGAAAGACTT - 3'	5' P - TGAACGCTTCACTCTCTGTAGCCCTGAGGATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
BC047112	5p15.2	100	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGACATGGGAAGCTCACACCCACACAGCTGA - 3'	5' P - TCTTTAGCGCCACCACCATCTGGAAGATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	4q35.2	104	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGACCAGTTTCTTAACCACACCCGGGCACTGCTGA - 3'	5' P - TTCATCCACCTGGTGGATGAGAACGACTTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
APOH	17q24.2	108	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAGTTGATGGCCACAGTCTGTGAGAGGGCAGATA - 3'	5' P - AACTTTTCTCATCCCTCTCGGGACACATAGCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
DISC1FP1	11q14.3	112	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaGATTGGTCCAACCCAGCAGGAGACAGGGGA - 3'	5' P - AGCATGCAACCCGATGAACACATAGGTACGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
HPSE2	10q24.2	116	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggaCATGTGTGATACGTGGAGCCTCTGCACT - 3'	5' P - AGATGTTCTTCAAGGAAGTGTCCCTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
NSDHL	Xq28	120	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggacgGTTTGATAATCCCCAGGTGCGGTTCT - 3'	5' P - TTCTGGGTGACCTCTGCAGCCGACAGGTAATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FKSG52	3p21.31	124	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacGCCAAAGTCATGCTGTACTGGGTTCCAGTCA - 3'	5' P - TGGTTCCTTCACTGATGAGCTGCAAGGCCTTCAGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
PPIE	1p34.2	128	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggaGATGTCAGGTGATGTATCTTACACCCAGGCATCGA - 3'	5' P - TGTCAGGGCAACGGAAATTAAGACTGGAAAGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
PCNT	21q22.3	132	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggacggcgctattcgtGGAACCTGGAGAGTCATCATCAAGCAGCCA - 3'	5' P - TTGAGAAGTTACGTGAAGACCTGCAGTCCGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
Barreja 3 v2				
Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
KLRAP1	12p13.2	92	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAGAACAATGGACGGAGCATGGT - 3'	5' P - TAATATCTGCACAATCAGTGGTTACTGCTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
RASA3	13q34	95	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGACGGCTTCCCCAGAGAAAGACTT - 3'	5' P - TGAACGCTTCACTCTCTGTAGCCCTGAGGATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CACNA1A	19p13.2	98	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgCCTGGCAGAGGATATTGACAACATGAAGA - 3'	5' P - ACAACAAGCTGGCCACC GCGGAGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
ATP1A2	01q23.3	104	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgCGGATGAGCTGAACTTCCCACGGAG - 3'	5' P - AAGCTTTGCTTTGTGGGGCTCATGTCTATGATTGATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
GHRHR	07p14.3	110	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgCCATAGCATCTCTATTGTAGCCCTTCTCGTGGCCA - 3'	5' P - TCACCATCTGGTTGCTCTCAGGTTTGTCTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
PDE4D	5q12.1	113	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggacggcgtaGCAGGACAGTGGCACTATCTGAGA - 3'	5' P - ATGGAGTGAAGTGACCCTTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
MAPT	17q21.31	116	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttCTAAGGTGGATCTCGGTGTTTCTAGA - 3'	5' P - TGTGACAGCACCTTCTAGTGGATGAGGGAGCacggTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
GRXCR1	4p13	122	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggacggCAATCTGAAGAGTATGCTGGCCCT - 3'	5' P - TTCTGTATTTGGACTTAAACCTAACTGTTGTGGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
RAS3GAP1	2q21.3	125	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggaGCTTTTAGTGGGATGATCTTGATCCAGGCTGA - 3'	5' P - AGGCCAGCCAGCCACCTGTATAGAGTGAATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggGGTACCCTCCACCTACCCAGCTTCTTGCCCT - 3'	5' P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCAATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
MSRA	8p23.1	134	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggactactCCGGGAGGGACAGACTTCTACTATGCGGAAGACT - 3'	5' P - ACCACCAGCAGTACCTGAGCAAGAACCCAATGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

Barreja 3 v3

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
SLC4A1	17q21.31	89	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGGAGGGATCAAGGGCGAACA - 3'	5'P - TCAAGGGACTGGGGTAGACATCAAGGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
MRPS15.opció2	1p34.3	95	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGAATCGGCGGTGGGCTCTTCGGTAA - 3'	5'P - TACAGAGGGGGGAAGGTGTAATCAATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	10p12.33	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcGCCAAAGAGCAATCAGGAGCTGTTA - 3'	5'P - TCTGCTCAGAGAGTGAACACGGTACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CCDC148	2q24.1	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCGTCAGCCACCGATTCCCCAGAAA - 3'	5'P - AGAGGATAGTGTTCCTTTGCAACTCCCTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
ALDH2	12q24.12	113	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagGTTTCATCTCCTTCCCTCCGAAATGATCTCGCT - 3'	5'P - TTTGGGTTTACGGCCGGTCTCTgacttagTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
BC042094	1q31.2	125	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacCCTTGAAAATAATAACCCGAGTTTGGTGAGAGGA - 3'	5'P - TGTCTAATATAGAGGGCACTCCAGGAGTGGCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggGTTACCCTCCACTCTACCCAGCTTTCTGGGCCT - 3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
MSRA	8p23.1	134	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggactactCCGGGAGGGACAGACTTTCTACTATGCGGAAGACT - 3'	5'P - ACCACCAGCAGTACTGAGCAAGAACCCTAATGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

Barreja 4

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
-	22q13.22	84	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACCACATCTCCAGCATCCAGCA - 3'	5'P - ATCTTGTTGGATCCCGCTGTGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
ACAT1	11q22.3	89	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACTCATGACGGCAGATGCAGCGA - 3'	5'P - AGAGGCTCAATGTTACACCCTGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	6q14.1	93	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGTATCTCCTGCTGTGGGGGATGAGATT - 3'	5'P - AACCCAGCGCTGTAGTTGTCTTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CSF2RA	Xp22.33	97	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACAGTCTCCACGAACCCTACAGTCTTGTT - 3'	5'P - TATGGGACTCTTAGTCCAGTGTGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SUPT3H	6p12.3	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGGAAGTACCATTACTGTAAAGGCCACTGTACA - 3'	5'P - TGAAGTCAGAGCTCCTTGAAGGCATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	6p12.1	105	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttaACAGAGACATGTGCCGTGAAGACA - 3'	5'P - TCAGTAACACTGCTGGGCTCCCTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
GYG2	Xp22.33	109	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcactCCGTGCATTCTAGCCTGTATCATCTCAT - 3'	5'P - TTGGACAAATGCTGGCACGTTgacttagTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
IGSF11	3q13.32	113	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcactCAATGGAATGAGCTCTGACCCAA - 3'	5'P - ACACACTACCATGGAGAATCCCGTctgtgactgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CLSTN2	3q23	117	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggCCAGGGATGTGAAAGCATCAGGA - 3'	5'P - AGGGTTAATAAGGCTATATTGACACGCACcaggcgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q22	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtagcacttacggacggcgtaCTCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGGCCACTTCTCATTACTctgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
B3GALT1	2q24.3	125	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtctgtgatctactgtaCCAGGAAGCAGCAGCGTGTGGTGTGCTA - 3'	5'P - AGAGAAGTGGCTGAATATCAGGGCAGCGacttagcTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
GTF2H3	12q24.31	129	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcaggcggtattcCTCATCATAGGCTTTCTAACCTACTCCCTGA - 3'	5'P - ATCCGGTCTCATTGTGAAATGCATGCacttagcTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FGD6	12q22	133	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAagcacttagcggacggcggtattcgtCAGGAAAAATTTCGAGGTTGCATCACTT - 3'	5'P - TCCGAGACAGCTTCATCAGAATTCCTTCTTgacttTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	5p13.1	137	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggacggcggtattcgtactCCCTTCTTGCAGGGTGGTGTGGTA - 3'	5'P - atccacacatatctgagttcacacacttcagcTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

Barreja 3-4

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
MRPS15.opció2	1p34.3	95	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGAATCGGCCGGTGGGCTCTTCGGTAA - 3'	5'P - TACAGAGGGGGGAAGGTGTACTCAATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CSF2RA	Xp22.33	97	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACAGTCTCCACGAACCCTACAGTCTTGGTT - 3'	5'P - TATGGGACTCTTAGTGCCAGTGTGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	10p12.33	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcGCCAAGAGCAATCAGGAGCTGTTA - 3'	5'P - TCTGCTCAGAGAGTGAACACGGTACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	6p12.1	105	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCTACAGAGCATGTGCCGTGAAGACA - 3'	5'P - TCAGTAACACTGTGGGCTCCCTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CCDC148	2q24.1	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCGTCAGCCACCGATTCCCCAGAAA - 3'	5'P - AGAGGATAGTGTTCCTTTCGCAACTCCCTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
ALDH2	12q24.12	113	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagGTTTCATCTCCTCCACTCCGAAATGATCTCGCT - 3'	5'P - TTTGGGTTTACGGCCGGTCTCTgacttagTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q22	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtagcacttagcggacggcgtaCTCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGCCACTTTCCTCATTactgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
BC042094	1q31.2	125	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttagcCCTTGGAAAATAAACCAGTGGTGAGAGGA - 3'	5'P - TGTCTAATATAGAGGGCACTCCAGGAGTGGGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttagcGGTACCCTCCACTTACCCAGCTTCTTGGGCT - 3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

Barreja 5

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
FRYL	4p12	89	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACCTCCTCTCTGACTGAACACA - 3'	5'P - ACAACTGCCAGACACGGAAGACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CTNNA2	2p12	93	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcCTCTGTTTCATCATGTACCCAACTCCCA - 3'	5'P - ATCCAGGCACTTGTAGCTGACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
UPRT	Xq13.3	97	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcGTTAGATGTTCTGAGGAGCGGGAGCA - 3'	5'P - ACCGAGAGAGCAGCTGAGCATCTGTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SUPT3H	6p12.3	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGGAAGTACCATTACTGCTAAAGGCCACTGTACA - 3'	5'P - TGAAGTCAGAGCTCCTTGAAGGCATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	2q32.3	105	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACCAATGCATCATGGAAAGGGTCATGCCTAA - 3'	5'P - TCACTGCAGCATGTTCTTGCCCACTTATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CCDC148	2q24.1	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCGTCAGCCACCGATTCCCCAGAAA - 3'	5'P - AGAGGATAGTGTTCCTTTCGCAACTCCCTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
PPP1R13L	19q13.32	112	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttagcCAGACTGTGGCTAGCCATTACTCTA - 3'	5'P - TGTACCTTTATGCCACTTAGGTAACACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
LINC01572	16q22.3	116	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCTCCACCTTGCTCTCCATACCTCTACA - 3'	5'P - ATGGATGCAAAGGTCAGTGACTCCCTCcttaggaTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q22	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtagcacttagcggacggcgtaCTCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGCCACTTTCCTCATTactgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
XKR9	8q13.3	124	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttagcGGTATTGGTTTGCCTAAAAAGGGT - 3'	5'P - TACCATGCAGCTTTTAAATATGACAGCAATAcgactTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttagcGGTACCCTCCACTTACCCAGCTTCTTGGGCT-3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'

Barreja 6

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
ZNF815P	7p22.1	90	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACTGCACCCGGCTAGTCCTAAT - 3'	5'P - ACATATGTTAAATACAAGGAGTGAAACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
Xq27.3	Xq27.3	95	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGActtaGAACAATGCACACGGGCCCTTCT - 3'	5'P - AGTCCCTGGCATGAATCCAATGCATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SUPT3H	6p12.3	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGGAAGTACCATTACTGCTAAAGGCCACTGTACA - 3'	5'P - TGAAGTCAGAGCTCCTTGAAGGCATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
PTPRP2	20q12	105	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagCACTATCCCTCAGTGGGTTGAGCCAGT - 3'	5'P - TCAGAGGGAGGGACATCTTTTGAATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CCDC148	2q24.1	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcgaCGTCAGCCACCGATTCCCAGAAA - 3'	5'P - AGAGGATAGTGTCTTTCTTGAACCTCCCTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
-	18q23	112	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttaCTGCCTGAGCATTCTTTACCTATGTCCTGATCCAT - 3'	5'P - TCGTGAATGAGCCTCTGGGGTTAAATACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q22	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtagcacttagcgacggcgtaCTCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGGCCACTTTCCTCATTactgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FAM135B	8q24.23	125	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAaGAACCTACTTAGAAGTAGAGGGGAAGCAGCAAGCTCCGCT - 3'	5'P - AGGCTGGAACCCACTTAGAGGACAGTATCAAGGAGGCTCCgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcacttagggGTACCCTCCACCTTACCCAGCTTTCTGGCCT - 3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

Barreja 7

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
COL6A1	21q22.3	87	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGAGGATGCTGTGAACGAGGCCA - 3'	5'P - AGCACCTGGGCGTCAAAGTCTTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
KANSL1	17q21	94	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACAGCAACAGTGTCTTGTCTGAGT - 3'	5'P - TACAAGATTGGCTACACCATCTGACAGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
NRXN1 assist	2p16.3	97	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgttgcctgacagaccaatttcaa - 3'	5'P - TTACTGACTTACTATGCCCCCAACAGCTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
GRXCR1	4p13	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACAATCTGAAGAGTATGCTGGCCCT - 3'	5'P - TTCTGTATTTGGACTTAAACCTAACTGTTGTGGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	Xq21.3	105	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcCCTGTGAAGTGAATGCAAGCCCA - 3'	5'P - TCCTGCTGGGAGATGAAGTTGATCAGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CCDC148	2q24.1	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcgaCGTCAGCCACCGATTCCCAGAAA	5'P - AGAGGATAGTGTCTTTCTTGAACCTCCCTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'
-	14q31.1	112	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcgacGAGGAGAAACCAGGGCTGAACCATT - 3'	5'P - TCAGAGTCATTCCATGAGGACTGATGATAAGTGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
ADAMTSL3	15q25.2	116	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgaCAATGCCAAGGAGGACAAGTGTGGAGTCTGTGCCGGCGA - 3'	5'P - TGGCTCCACCTGCAGGCTGTACGGGGACAATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q22	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtagcacttagcgacggcgtaCTCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGGCCACTTTCCTCATTactgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	2q14.3	124	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcCCTGATGAGCTTAGGGGAAGACAGCAGTGGGCCTGCTTA - 3'	5'P - ATTATCAATGGGCTGGCAAGCTAGCCCCGAGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAacttagcacttagggGTACCCTCCACCTTACCCAGCTTTCTGGCCT-3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'
RIMKLB	12p13.31	132	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgtGGTATGTGTGGCTTTTGCCTAAATGCACTGTTCTGATTCCAGCTCTGAA - 3'	5'P - AGTTTAGTGAAGTCTGGCAGATTAAGCCAAGACACAACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

Barreja 8

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
-	14q32.31	90	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACTGTGGCCAGTTTCTGACTCCCA - 3'	5'P - TCTAGTGATTGGCACCCAGAGCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
DOPEY2	21q22.12	97	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGTTTGGCTGAGATATTGCATCAGAAGT - 3'	5'P - TCATAGATGCTGACGTGGAGGAACGCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SHOX	Xp22.33PAR	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGTCACATCAAGCTGTTCCACCGTAA - 3'	5'P - AACTCACTCCTGACGTCCACCTCTCTGGGATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
BRCA2ex3	BRCA2ex3	105	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACAGCTGGCTTCAACTCCAATAATATTCAA - 3'	5'P - AGAGCAAGGGCTGACTCTGCCGCTGTACCAATCTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CCDC148	2q24.1	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCGTCAGCCACCGATTCCCAAGAAA	5'P - AGAGGATAGTGTTCCTTTGCAACTCCCTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'
ARMCX2	Xq22.1	112	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgAATTTTCTCTCTCTCTCGCTGGGTTA - 3'	5'P - AACGCACGGCAGCGAGCTGCGCAATAGAGTTGGTACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
LINC01492	9q31.1	116	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCTTCTGCTTCTGTTGTAATTTGCTTAGT - 3'	5'P - AATCACATTTTATTGACTTCTTTCTGGCCTTGCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
LINC01572	16q22.3	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaCTCCACCTTGCTCTCCCATACCTCTACA - 3'	5'P - ATGGATGCAAAGGTCAGTGACTCCCTCcttagcgaTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	Xp22.33/Yp11.32	124	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttGATAATCATGTCCATTTGGGCACTGACTTCTCTAGATGGC - 3'	5'P - ATCTCACCAGAGACTAAGTACTGGGTGCTGACAATTTGCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
XKR9	8q13.3	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaacttagcggGATTGGTTGCCTAAAAAGGGGT - 3'	5'P - TACCATGCAGCTTTTAAATATGACAGCAATACgacttTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

Barreja 9

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
PDZD4	Xq28	94	5' - gggttccctaagggttgactcagggaatgatgttgactcgggct - 3'	5'P - tgctgtgccattctgctgctcccttagattggatcttgctggcac - 3'
IMMP2L-intro	7q31.1	100	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGCCTAAGATTGAAGAAGTGCATATCTGAGGTCA - 3'	5'P - AGGACAAGGCGGGCAGTGCTCAATGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SLC1A1	9p24	104	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGTGGATGCCATGTTAGATCTCATCAGtgagtggtt - 3'	5'P - ttgcacaaggttgctcaaggcatgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
IMMP2L-exo	7q31.1	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtctgtgatcgtagtctccacctgacat - 3'	5'P - tccttacttacCCTTCTCCCGCTTCTCactgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
RBF3X	17q25.3	112	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtctgtgatcggaacaggcacttggtgtgtaata - 3'	5'P - aactgaccacctgtacgacttctgattgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
PTPRD	9p23	116	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtctgtgatcgGAAGTTACCAGAAGTCAAGGAGTCCA - 3'	5'P - AGCctgataaaaagcaaacagaggaaagtagctgaTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q22	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtagcacttagcggcgtaCTCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGGCCACTTCTCATTACTctgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaacttagcggGATCCCTCCACTTACCCAGCTTTCTTGGGCT-3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'

Barreja 10

Gen	REGIO	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
CTNNA3 INTRO	10q21.3	86	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAtctccaggctactcaccctatgca - 3'	5'P - tgctgacagccaaggtgtggTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
NRXN1 assist	2p16.3	96	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgcttgctgacagaccaatttcaa - 3'	5'P - TTACGTACTIONACTATGCCCTCAACAGCTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
NRXN1	2p16.3	101	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcgaGAGCATCGAGATGAGGTCCGGA - 3'	5'P - AGCCGTCCATTTAAATCAACTGATGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CHL1	3p16.3	105	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGACAGTGCAACTCGAGCTCCATCCTCCTCCGA - 3'	5'P - TTTCTAAGGTTCCAGTTTTCTGGAGGGACAGTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q11	109	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGACTACACATGTGGCCTCATGCCAAGGGTTTGTT - 3'	5'P - AGATGGCCTCTGACTCTGTGGGATTCAACTTGACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	Xp22.31	113	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAGGCAGTTCTGTCTGAGGTGGAGTCTGACTGGAT - 3'	5'P - TGCCACCCTTGCTCTGGCAGGTGATCTATCTGCTCTGCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
ACOXL	2q13	117	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGACACCGTGCCTTGAAGTTGACTGAAGTTACAGTAGCCTT - 3'	5'P - ATTTTGTTCCCTGAACTCTGGACACAGCTGTCTGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
-	17q22	121	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAtagcacttacggacggcgtactCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGGCCACTTCTCATTACTctgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
XKR9	8q13.3	128	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggacGGTATTGGTTTGCCTAAAAAGGGGT - 3'	5'P - TACCATGCAGCTTTTAAATATGACAGCAATACgacttTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTCCCTAAGGGTTGGAgacttagcacttacggacGGTACCTCCACCTTACCCAGCTTTCTTGGGCCT-3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'

Barreja utilitzada pel cribatge de regions específiques en l'estudi cas-control

Gen	Regió	(pb)	Seqüència d'hibridació L	Seqüència d'hibridació R
PRKCA	17q24	82	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACGTTACAAGCAATGCGTCA - 3'	5'P - TCAATGTCCCAGCCTCTGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
CTNNA2	2p12	91	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACTCTGTTTCATCATGTACCCAACTCCCA - 3'	5'P - ATCCCAGGCACCTTGAGCTGACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXO45	3q29	94	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGAAACCCATTGCTCAGAGCACTGA - 3'	5'P - TGGTGCAAGGACCAAGATTGGTTTCgaTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
NRXN1..assist	2p16.3	97	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgttgctgacagaccaatttcaa - 3'	5'P - TTACGTACTTACTATGCCCTCAACAGCTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
NRXN1	2p16.3	101	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgttagcgaGAGCATCGGAGATGAGGTCCGGA - 3'	5'P - AGCCGTCCATTTAAATCAACTGATGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SOX5	12p12.1	104	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACAAAACCTCTGAGGATCCTCCTGAAGTA - 3'	5'P - TGGCTCTACACCTTGACCGTTTAAAAAGCctgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
APOH	17q24	108	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAGTTGATGGCCACAGTCTGTGAGAGGGCAGATA - 3'	5'P - AACTTTCTCATCCCTCCTCGGGACACATAGCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SOX5.II	12p12.1	114	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgtcCACAGCAGCCACCTATGATCGTCTCCAAGTGA - 3'	5'P - ACCTGTCAAGTGAGTCCAAACCTTCTAAACCAATTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
MCTP2	15q26.2	117	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgttagcacttagcgaGCATAGGTGCATGTGCGTGAAGAGT - 3'	5'P - TCATATTGGCGGCTGCCAATGGTAGTGGCTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
17q22	17q22	121	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAtagcacttagcggacggcgtactCTGCTTATGTGCCAGCGT - 3'	5'P - TGGTCTGCTGTCTCAGGCCACTTTCTCATTactgtTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
XKR9	8q13.3	124	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgttagcacttagcggacGGTATTGGTTTGCCTAAAAAGGGGT - 3'	5'P - TACCATGCAGCTTTTAAATATGACAGCAATACgacttTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
FBXW4	10q24.32	128	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgttagcacttagcggGTACCTCCACCTTACCCAGCTTTCTTGGGCT-3'	5'P - AGAGTGGCTGAGGGGAGCGTTAAGGAGCCATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'
MCTP2.II	15q26.2	131	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGACACTGTCTGGAATTTGAACTATATATGATCCCTTGGCATTGTTGCTGA- 3'	5'P - TCTTTGTCTACAATTTTCATCAGACCTGTGAAAGGCAAGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'
SPRED1	15q14	134	5' - GGGTTCCTAAGGGTTGGAgttagcacttagcgttTGTCTTACGTTTCAAAGTCTGCTGA - 3'	5'P - TGCTAGGGCTTTTGATAGAGGTATCCGAAGAGCTATAGAGGATATTCTCgTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC - 3'

8 . ANNEX 2

Sondes de MLPA dissenyades per la confirmació de variants en nombre de còpies

nomencature array,ISCN2013 (hg19)	DLRS array	Tipologia	longitud CNV (bp)	nº sondes	Herència	Confirmació	classificació	Id pacient
1p21.1(104212797-104753633)x3	0,184	dup	540836	43	MAT	FISH BACs	VOUSpb	81
1p21.1(104306630-104731539)x3	0,142	dup	424909	41	MAT	FISH BACs	CNVb	82
1p21.1(105477393-105542371)x1	0,196	del	64978	11	D	NA	CNVb	10
1p33(50251279-50398578)x1	0,169	del	147299	26	D	NA	VOUSpb	18
1p34.2(40183006-40309338)x3	0,150	dup	126332	24	D	MLPA *	VOUSpb	122
1p34.3(36902760 -36926536)x3	0,160	dup	24000	7	D	MLPA *	fals positiu	152
1p36.21(12846934-12917461)x1	0,154	del	70527	6	D	NA	VOUSpb	96
1q23.1(158480395-158833302)x3	0,165	dup	352907	10	D	NA	VOUSpb	121
1q24.3(234857734-234918636)x3	0,150	dup	60902	7	D	NA	CNVb	88
1q31.2(191935045-191992138)x1	0,122	del	57093	6	D	MLPA *	CNVb	85
1q32.1(204363657-204697698)x3	0,213	dup	334041	69	D	NA	VOUSpb	158
1q42.2(231715133-231813980)x3	0,155	dup	98847	18	D	NA	VOUSpp	26
1q44(248601802-248646776)x3	0,149	dup	44974	7	D	NA	VOUSpb	97
2p12(79767455-79807301)x1	0,226	del	39846	9	MAT	MLPA *	VOUSpb	66
2p13.3(71645495-71791549)x3	0,112	dup	146054	31	D	NA	VOUSpb	71
2p16.3(50510602-51137271)x1	0,128	del	626669	124	MAT	MLPA *	CNVp	94
2p16.3(50660882-51078593)x1	0,170	del	417711	81	de novo	MLPA *	CNVp	55
2p16.3(50894904-50923005)x1	0,196	del	28101	18	D	NA	VOUSpb	10

2p22.3(32626512-33332063)x3	0,155	dup	705551	151	D	NA	VOUSpb	26
2p22.3(32632139-33314352)x3	0,143	dup	682213	147	D	NA	VOUSpb	87
2p22.3(34697718-34743849)x3	0,199	dup	46131	9	D	NA	CNVb	120
2p23.1(30814684-30848349)x1	0,131	del	33665	8	D	NA	VOUSpb	151
2p24.3(13222618-13278834)x3	0,172	dup	56216	7	D	NA	CNVb	136
2p24.3(13234300-13278834)x3	0,147	dup	44534	6	D	NA	CNVb	89
2p25.3(2571139-3596661)x3	0,131	dup	1025522	144	D	NA	VOUSpb	151
2q13(110852960-110983703)x3	0,141	dup	130743	25	D	NA	VOUSpb	123
2q14.3(127465793-127772900)x1	0,269	del	307107	21	MAT	MLPA *	CNVb	117
2q21.3(135832699-135865414)x1	0,170	del	32715	8	MAT	MLPA *	VOUSpb	55
2q24.1(159116206-159130730)x1	0,133	del	14524	5	MAT	MLPA *	VOUSpb	41
2q24.3(168678696-168700727)x1	0,139	del	22031	5	PAT	MLPA *	VOUSpb	75
2q31.1(169907405-169934898)x3	0,155	dup	27493	7	D	NA	VOUSpb	26
2q32.1(185933203-186075664)x1	0,145	del	142461	10	D	NA	CNVb	159
2q32.3(194917685-194977196)x1	0,173	del	59511	4	D	NA	CNVb	22
2q34(209034588-209054976)x1	0,131	del	20388	6	D	NA	VOUSpb	151
2q34(214598504-214615736)x1	0,149	del	17232	6	D	NA	VOUSpb	147
2q37.3(242753511-242785464)x3	0,165	dup	31953	5	D	NA	VOUSpb	121
3p24.3(17149197-17188340)x1	0,135	del	39143	5	D	NA	CNVb	142
3p26.1(162514534-162619141)x3	0,139	dup	104607	10	D	NA	CNVb	113
3p26.1(4222750-4250985)x1	0,139	del	28235	6	D	NA	CNVb	113

3q13.31(113573685-113614453)x1	0,213	del	40768	9	D	NA	VOUSpb	158
3q13.32(118726184-118817647)x3	0,117	dup	91463	17	de novo	MLPA *	VOUSpb	58
3q13.32(118726184-118817647)x3	0,205	dup	91463	17	MAT	MLPA *	VOUSpb	109
3q13.32(118731995-118817506)x3	0,155	dup	85511	16	D	NA	VOUSpb	26
3q13.33(120458780-120477254)x1	0,199	del	25496	6	D	NA	VOUSpb	98
3q23(139915414-139945637)x1	0,212	del	30223	6	PAT	MLPA *	VOUSpb	80
3q26.1(162971164-163583877)x1	0,149	del	612713	58	D	NA	CNVb	147
3q26.31(173248780-173284606)x3	0,145	dup	35826	8	D	NA	VOUSpb	159
3q29(196022728-196515371)x3	0,121	dup	492643	99	MAT/PAT	aCGH	VOUSpp	34
4p12(48744010-48765232)x1	0,172	del	21222	7	PAT	MLPA *	VOUSpb	124
4p13(43016423-43107036)x3	0,160	dup	90613	10	PAT	MLPA *	VOUSpb	152
4p16.2(4860802 -4874857)x3	0,269	dup	14055	4	D	MLPA *	fals positiu	117
4p16.3(45882-68244)x3	0,172	dup	22362	5	D	NA	VOUSpb	136
4q28.2(130702317-130774852)x3	0,180	dup	72535	10	D	NA	CNVb	108
4q28.3(131949297-132352577)x3	0,143	dup	403280	32	D	NA	CNVb	87
4q28.3(134921321-135180169)x1	0,155	del	258848	20	D	NA	VOUSpb	26
4q31.21(144805113-144898447)x3	0,126	dup	93334	6	D	NA	VOUSpb	84
5p13.1(39077434-39100186)x1	0,165	del	22752	6	MAT	MLPA *	CNVb	43
5p15.2(9762427 -9927805)x1	0,123	del	165378	20	D	MLPA *	VOUSpb	24
5q11.1(49559920-49727613)x1	0,147	del	167693	14	D	NA	VOUSpb	89
5q12.1(59715912-59771517)x3	0,170	dup	55605	10	PAT	MLPA *	VOUSpb	55

5q13.3(76086349-76134632)x3	0,154	del	48283	10	D	NA	VOUSpb	100
6p12.1(56917408-56953743)x3	0,115	dup	36335	8	PAT	MLPA *	VOUSpb	30
6p12.3(45116671-45131653)x1	0,212	del	14982	4	MAT	MLPA *	VOUSpb	80
6p12.3(45116671-45131653)x1	0,172	del	14982	4	MAT	MLPA *	VOUSpb	45
6p21.2(37748620-37988120)x3	0,141	dup	239500	47	D	NA	VOUSpb	38
6p21.32(32441050-32505619)x3	0,140	dup	64569	9	D	NA	VOUSpb	106
6p21.32(32450699-32637117)x1	0,155	del	186418	31	D	NA	VOUSpb	26
6p22.1(27632341-27659350)x3	0,131	dup	27009	5	D	NA	CNVb	151
6p22.1(29093912-29155540)x1	0,145	del	61628	13	D	NA	VOUSpb	99
6p22.1(29977952-30087387)x3	0,141	dup	109435	22	D	NA	VOUSpb	38
6p25.3(1288867-1325976)x3	0,180	dup	37109	7	D	NA	VOUSpb	91
6p25.3(354363-433956)x1	0,158	del	79593	18	D	NA	VOUSpb	17
6q14.1(81269892 -81382095)x1	0,118	del	112203	9	PAT	MLPA *	CNVb	12
6q21(109656354-109683297)x1	0,179	del	26943	5	D	NA	CNVb	115
6q25.2(152936085-152959287)x1	0,113	del	23202	6	MAT	MLPA *	VOUSpb	60
6q25.2(152936285-152959146)x1	0,164	del	22862	6	MAT	MLPA *	VOUSpb	59
6q25.3(158317798-158376354)x3	0,150	dup	58556	12	D	NA	VOUSpb	128
7p14.1(38260953-38356859)x1	0,147	del	95906	19	D	NA	VOUSpb	89
7p15.2(26888579-26936715)x3	0,126	dup	48136	9	D	NA	VOUSpb	84
7p21.3(11725806-11774234)x1	0,123	del	48428	11	D	MLPA *	VOUSpb	24
7p21.3(12369503-12432297)x3	0,140	dup	62794	15	D	NA	VOUSpb	106

7p22.1(5857029-5882229)x1	0,226	del	25200	4	PAT	MLPA * + FISH BACs	VOUSpb	66
7q11.21(65414795-65446736)x3	0,141	dup	31941	8	D	NA	VOUSpb	38
7q11.21(65934154-65990251)x3	0,162	dup	56097	8	D	NA	CNVb	21
7q31.1(108826771-108932077)x3	0,133	dup	105306	22	de novo	NA	CNVb	41
7q31.1(111015477-111034007)x1	0,179	del	18530	5	D	MLPA *	Polimòrfica ^{&}	115
7q31.1(111112186-111255558)x1	0,131	del	143372	26	MAT	MLPA *	VOUSpp	151
7q31.1(111198987-111280493)x1	0,148	del	81506	14	MAT	MLPA *	VOUSpp	32
7q31.1(112320660-112361854)x3	0,130	dup	41194	6	D	NA	CNVb	153
7q33(133469590-133492814)x1	0,113	del	23224	6	PAT	MLPA *	VOUSpb	60
7q33(133469790-13349267)x1	0,164	del	22884	6	PAT	MLPA *	VOUSpb	59
8p12(35339203-35395724)x3	0,112	dup	56521	12	D	NA	VOUSpb	71
8p23.1(10254051-10449952)x1	0,122	del	195901	33	D	MLPA *	VOUSpp	85
8p23.2(2349676-2611645)x3	0,144	dup	261969	33	D	NA	CNVb	14
8q11.21(48166013-48224194)x3	0,146	dup	58181	6	D	NA	VOUSpb	90
8q11.21(48166213-48224053)x3	0,130	dup	57840	6	D	NA	VOUSpb	153
8q11.21(48166213-48224053)x3	0,180	dup	57840	6	D	NA	VOUSpb	108
8q13.3(71613553-71627512)x1	0,166	del	13959	4	MAT	MLPA *	VOUSpb	63
8q13.3(72491793-72702599)x3	0,145	dup	210806	11	D	NA	CNVb	99
8q21.11(76028849-76360992)x3	0,145	dup	332143	36	D	NA	CNVb	99
8q21.13(80288192-81019201)x1	0,226	del	731009	93	PAT	MLPA *	VOUSpp	66
8q24.23(139224546-139239663)x1	0,173	del	15117	4	D	MLPA *	VOUSpb	22

9p12p11.2(43565847-47317679)x1	0,132	del	3706574	9	D	NA	VOUSpb	131
9p24.1(5304864-5335103)x1	0,154	del	30239	6	D	NA	VOUSpb	100
9p24.2(2248366-2375193)x1	0,158	del	126827	16	D	NA	CNVb	17
9p24.2p24.1(4094627-4671089)x3	0,150	dup	576462	106	D	NA	VOUSpp	122
9p24.2p24.1(4094627-4671089)x3	0,141	dup	576462	106	D	MLPA *	VOUSpp	123
9q31.1(105922704-106091785)x3	0,205	dup	169081	20	D	MLPA *	fals positiu	109
9q31.1q32(107056010-115867141)x1	0,146	del	8811131	1357	D	cariotip	CNVp	90
9q34.3(138130912-138309258)x3	0,135	dup	178346	28	D	NA	CNVb	142
10p12.33(19002293-19054802)x1	0,128	del	52509	7	MAT	MLPA *	CNVb	73
10p13(14986974-15059703)x1	0,141	del	72729	7	D	NA	VOUSpb	123
10q11.21(43859761-43902582)x3	0,174	dup	42821	8	D	NA	VOUSpb	102
10q11.21(45218780-45359091)x1	0,139	del	140311	16	D	NA	VOUSpb	113
10q11.22(46158156-47695889)x1	0,154	del	1537733	56	D	NA	VOUSpb	100
10q21.3(67963693068265572)x1	0,142	del	301880	57	D	MLPA *	VOUSpp	82
10q23.33(96625510-96751004)x3	0,121	dup	125494	17	MAT	aCGH	VOUSpb	34
10q24.2(100705378-100909995)x1	0,149	del	204617	37	PAT	MLPA *	VOUSpb	79
10q24.32(103347353-103390023)x3	0,133	dup	42670	10	PAT	MLPA *	VOUSpb	41
10q25.1(107109062-107306628)x3	0,162	dup	197566	16	D	NA	CNVb	21
10q25.1(107984130-108014302)x1	0,121	del	30172	5	de novo	aCGH	CNVb	34
10q26.12q26.3(122259702-135434178)x1	0,155	del	13174476	1964	de novo	MLPA	CNVp	26
10q26.3(133437820-133671695)x3	0,180	dup	233875	33	D	NA	CNVb	91

11q13.2(66420415-66449505)x1	0,145	del	29090	7	D	NA	VOUSpb	99
11q14.1(81605556-81852110)x1	0,172	del	246554	29	PAT	FISH BACs	CNVb	45
11q14.1(83903383-83940170)x1	0,180	del	36787	8	D	NA	VOUSpb	108
11q14.3(89998047-90090588)x1	0,115	del	92541	13	MAT	MLPA *	CNVb	64
11q14.3(89998047-90090588)x1	0,168	del	92541	13	MAT	MLPA *	CNVb	65
11q22.3(102938672-103205118)x3	0,121	dup	266446	54	MAT	aCGH	VOUSpb	34
11q22.3(107954818-108053758)x3	0,269	dup	98940	21	MAT	MLPA *	VOUSpb	117
11q23.1(112046290-112081313)x1	0,174	del	35023	5	D	NA	VOUSpb	102
12p11.21(31241495-31357004)x1	0,199	del	115509	13	D	NA	VOUSpb	120
12p11.21(31277996-31357004)x1	0,150	del	79008	12	D	NA	CNVb	128
12p11.22(28697446-28743495)x3	0,146	dup	46049	9	D	MLPA *	VOUSpb	47
12p12.1(23432294-26233996)x1	0,166	del	2801702	456	de novo	MLPA * + FISH BACs	CNVp	63
12p13.2(10683079-10789936)x3	0,128	dup	106857	18	D	MLPA *	VOUSpb	73
12p13.2(11218244-11249210)x3	0,172	dup	30966	6	D	NA	VOUSpb	136
12p13.31(8819866-8862019)x3	0,150	dup	42153	8	PAT	MLPA *	VOUSpb	88
12q12(40610402-40786005)x3	0,196	dup	175603	79	D	NA	VOUSpb	10
12q22(95444520-95507610)x3	0,167	dup	63090	13	MAT	MLPA *	VOUSpb	67
12q23.1(96881237-96934971)x1	0,148	del	53734	10	D	NA	CNVb	32
12q24.12q24q13(112184121-112315182)x3	0,199	dup	131062	27	D	NA	VOUSpb	98
12q24.13(112183921-112315323)x3	0,122	dup	131402	27	D	NA	VOUSpb	85
12q24.31(124114535-124199277)x3	0,167	dup	84742	17	PAT	MLPA *	VOUSpb	67

13q14.3(52581214-52697505)x1	0,196	del	116291	27	D	NA	VOUSpb	125
13q21.32(67295888-67345573)x1	0,154	del	49685	11	D	NA	VOUSpb	96
13q31.3(90321338-90421731)x3	0,174	dup	100393	6	D	NA	CNVb	102
14q11.1q11.2(22395084-23011311)x1	0,131	del	616227	134	D	NA	CNVb	151
14q21.2(44826108-44923320)x3	0,181	dup	97212	9	D	NA	CNVb	140
14q22.1(51156334-51433946)x3	0,128	dup	277612	62	D	NA	VOUSpb	143
14q31.1(82200740 -82230838)x1	0,269	del	30098	4	D	MLPA *	fals positiu	117
14q31.3(85851168-85897804)x1	0,196	del	46636	14	D	NA	VOUSpb	10
14q32.31(101504838 -101872332)x3	0,189	dup	367494	49	D	MLPA *	fals positiu	11
14q32.33(104768861-104969321)x3	0,189	dup	200460	28	D	NA	CNVb	11
15q11.2(20489681-23209042)x3	0,250	dup	2010788	153	PAT	MLPA	VOUSpb	48
15q11.2q13.1(23699701-29006852)x3	0,199	dup	5730658	713	de novo	MLPA	CNVp	98
15q12(25755756-25854912)x3	0,126	del	99157	15	D	NA	CNVb	84
15q13.2q13.3(30943703-32439084)x1	0,144	del	1495381	231	de novo	MLPA	CNVp	14
15q13.3(31620534-31647643)x1	0,181	del	27109	7	D	NA	VOUSpb	140
15q14(38164787-38240786)x3	0,130	dup	75999	10	D	NA	VOUSpb	153
15q14q15.1(37882913-40621860)x3	0,113	dup	2738947	406	PAT	FISH BACs	VOUSpp	60
15q14q15.2(37883113-40621719)x3	0,164	dup	2738607	61	PAT	FISH BACs	VOUSpp	59
15q21.2(52257937-52314983)x3	0,143	dup	57046	11	D	NA	VOUSpb	87
15q22.31(65329938-65362884)x1	0,128	del	32946	8	MAT	MLPA *	VOUSpb	94
15q25.3(83912816-84714815)x3	0,150	dup	801999	151	PAT	MLPA *	VOUSpb	88

15q26.2(94959126-94983622)x1	0,166	del	24496	6	D	MLPA *	VOUSpp	92
15q26.3(100241987-100455105)x3	0,169	dup	213118	35	D	NA	VOUSpb	18
15q26.3(99168589-102480888)x3	0,155	dup	3312299	626	de novo	MLPA	CNVp	26
16p11.2p11.1(31955076-34784380)x3	0,141	dup	2829304	106	D	NA	VOUSpb	38
16p11.2p11.1(32573808-35045499)x3	0,145	dup	2471691	120	D	NA	VOUSpb	99
16p12.3p11.2(18901309-29182196)x1	0,122	del	10280888	157	de novo	cariotip	CNVp	9
16p13.12(12791776-12807266)x1	0,196	del	15490	9	D	NA	VOUSpb	10
16q22.3(72612701-72667608)x1	0,166	del	54907	7	PAT	MLPA *	CNVb	63
16q23.1(74372285-74472587)x3	0,154	dup	100302	6	D	NA	VOUSpb	96
16q23.1(75505879-75538457)x1	0,146	del	32578	9	D	NA	VOUSpb	105
16q23.1(75542203-75577557)x3	0,126	dup	35354	8	D	NA	VOUSpb	84
16q23.1(75558516-75577557)x3	0,146	dup	19041	5	D	NA	VOUSpb	105
16q23.1(76398562-76427860)x3	0,139	dup	29298	6	D	NA	VOUSpb	113
17p11.2(19143173-19235773)x3	0,199	dup	92601	22	D	NA	VOUSpb	98
17p11.2(21281052-22032763)x3	0,147	dup	751711	55	D	NA	VOUSpb	89
17q22(50479802-50530000)x1	0,115	del	50198	5	MAT	MLPA *	CNVb	30
17q24.1q24.2(64129644-64759936)x3	0,149	dup	630292	120	PAT	MLPA *	VOUSpp	79
17q24.3(70815557-70825304)x1	0,196	del	9747	5	D	NA	VOUSpb	10
17q25.1(73928952-73955405)x3	0,169	dup	26453	7	D	NA	VOUSpb	18
17q25.3(75922616-76006562)x3	0,144	dup	83946	9	D	NA	VOUSpb	14
17q25.3(77368930-77392578)x3	0,199	dup	23648	6	D	MLPA *	VOUSpb	120

17q25.3(77368930-77397474)x3	0,166	dup	28544	7	D	MLPA *	VOUSpb	86
18p11.32(1735225 -1848941)x1	0,132	del	113716	27	D	NA	CNVb	131
18p11.32(1906337-1980846)x1	0,141	del	74509	10	D	NA	CNVb	38
18q23(77520762-77546945)x1	0,172	del	26183	5	MAT	MLPA *	CNVb	45
19p13.2(6958753-7018231)x1	0,141	del	59478	12	D	NA	VOUSpb	38
19p13.3(5739332-5766602)x1	0,141	del	27270	7	D	NA	VOUSpb	38
19q13.2q13.31(43261778-43746147)x3	0,162	dup	484369	9	D	NA	VOUSpb	21
19q13.32(45837364-45900705)x3	0,172	dup	63341	14	MAT/PAT	MLPA *	VOUSpb	124
19q13.42(53681333-53707206)x3	0,196	dup	25873	5	D	NA	VOUSpb	125
20q12(41180350-41241944)x1	0,133	del	61594	13	MAT	MLPA *	VOUSpb	139
20q12(41184930-41287946)x1	0,121	del	103016	21	PAT	aCGH	VOUSpb	34
20q13.13(48152656-48178810)x1	0,150	del	26154	5	D	NA	VOUSpb	122
21q21.2(24493619-24622173)x1	0,146	del	128554	10	D	NA	CNVb	105
21q22.3(47400883-47482410)x1	0,114	del	81527	16	D	MLPA *	VOUSpb	57
21q22.3(48031456-48073002)x3	0,149	dup	41546	9	D	NA	VOUSpb	97
22q11.21(18894835-19010562)x3	0,172	dup	115727	19	D	NA	VOUSpb	136
22q13.32(49354696-49406044)x3	0,212	dup	51348	7	PAT	MLPA *	CNVb	80
22q13.33(51123291-51224402)x1	0,169	del	101111	17	de novo	MLPA	CNVp	18
Xp21.3p11.4(25816432-38085678)x2	0,112	dup	12244269	1738	MAT	cariotip	CNVp	71
Xp22.33(1561019-1612474)x3	0,172	dup	51455	22	D	NA	VOUSpb	136
Xp22.33(1850752-2052995)x3	0,213	dup	202243	57	D	NA	CNVb	158

Xp22.33(2250134-2276051)x1	0,172	del	25917	12	D	NA	VOUSpb	136
Xp22.33(2695174-2804530)x1	0,167	del	109356	25	MAT	MLPA *	VOUSpb	67
Xp22.33(302004-329692)x3	0,165	dup	27688	14	D	NA	VOUSpb	121
Xp22.33/Yp11.32(1414686-1418039)x1	0,167	del	3353	4	D	NA	VOUSpb	67
Xp22.33/Yp11.32(363986 -822935)x3	0,132	dup	458949	157	MAT	MLPA	VOUSpb	131
Xp22.33/Yp11.32(449,073-632,978)x3	0,176	dup	183905	64	MAT	MLPA	VOUSpb	130
Xp22.33/Yp11.32(876171 -1256808)x3	0,117	dup	380637	74	D	MLPA * + FISH BACs	fals positiu	58
Xp22.33p11.22(169901-51101339)x3	0,196	dup	51008178	19384	IME	cariotip	CNVp	10
Xq13.1(71030284-71179227)x2	0,154	dup	148943	12	D	NA	VOUSpb	100
Xq22.1(100808880-101149747)x3	0,150	dup	340867	62	PAT	MLPA *	VOUSpb	88
Xq25(126015950-126241770)x1	0,158	del	225820	22	D	NA	VOUSpb	17
Xq25q28(124642297-155227312)x1	0,196	del	30410528	9556	IME	cariotip	CNVp	10
Xq27.3(145118666-145153097)x1	0,172	del	34431	7	MAT	MLPA *	CNVb	124
Xq28(154391683-154425825)x1	0,150	del	34142	5	D	NA	CNVb	88
Yp11.2(7944948 -9841727)x2	0,269	dup	2446779	182	D	MLPA *	fals positiu	117
Yq11.223(23020112-23050059)x2	0,126	dup	29947	7	D	NA	CNVb	84
Yq11.223(23196033-23634706)x2	0,126	dup	438673	53	D	NA	VOUSpb	84

(Id) Identificador; (del) Deleció; (dup) duplicació; (MAT) Materna; (PAT) Paterna; (MAT/PAT) Heretat d'ambdós progenitors; (D) Desconeguda; (IME) Inverisó materna equilibrada; (*) MLPA amb sondes no comercials; (CNVp) Variant en nombre de còpies patogènica; (VOUSpp) Variant de sgnificació clínica incerta probablement patogènica; (VOUSpb) Variant de significació clínica incerta probablement benigne; (CNVb) Variant en nombre de còpies benigne; (&) Variant que malgrat estigui descrita en >1% de la població general ha estat validada per incloure un gen candidat.