



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

PROGRAMA INSTITUCIONAL EN BIOMEDICINA
MOLECULAR

ANÁLISIS GENÓMICO MEDIANTE MICROARREGLOS EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TRASTORNOS DEL
ESPECTRO AUTISTA Y RETRASO MENTAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

LUIS MANUEL ZEPEDA INCLÁN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SUSANA KOFMAN EPSTEIN
CO-DIRECTORA: DRA. IRENE MENDOZA LUJAMBIO

ASESORES: DR. FERNANDO FERNÁNDEZ RAMÍREZ
DR. CÉSAR AUGUSTO SANDINO REYES LÓPEZ
DRA. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO



MÉXICO, DF

2010

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	
IV	
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	Pagina
1.1. RETRASO MENTAL	1
1.1.1. RETRASO MENTAL DE ORIGEN GENÉTICO	4
1.1.1.1. Etiología del Retraso Mental de Origen Genético	4
1.1.1.2. Causas Cromosómicas que originan el Retraso Mental	4
1.1.1.3. Retraso Mental Ligado al Cromosoma X	5
1.1.1.4. Causas Autosómicas Monogénicas que originan el Retraso Mental	6
1.2. TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA	9
1.2.1. Causas genéticas del autismo	10
1.2.2. Análisis de ligamiento y asociación	11
1.2.3. Alteraciones genómicas	14
1.3. DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL RETRASO MENTAL	16
1.3.1. RM sindrómico	16

1.3.2. RM inespecífico	17
1.3.3. Técnicas de Estudio del RM	18
1.3.4. Técnicas Convencionales	18
1.3.4.1. Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente	19
1.3.5. Hibridación Genómica Comparada (CGH)	20
1.3.6. Nuevas tecnologías en la detección de rearrreglos crípticos	21
1.3.6.1. Polimorfismos de un solo Nucleótido (SNPs)	21
1.3.6.2. Microarreglos de Alta Densidad	22
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GENERAL	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL Y MÉTODOS	31
4.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
4.2. PACIENTES	32
4.3. MUESTRAS	33
4.4. PLATAFORMA GENECHIP 500K	33
4.5. PROCEDIMIENTO	35
4.5.1. Preparación del DNA	35
4.5.2. Digestión	36
4.5.3. Ligamiento	37
4.5.4. PCR	38
4.5.5. Purificación de Productos de PCR	39
4.5.6. Fragmentación	39
4.5.7. Marcaje	40
4.5.8. Hibridación	41

4.5.9.Lavado, Teñido y Escaneo	42
4.6. ANÁLISIS DE MICROARREGLOS	43
5. RESULTADOS	45
6. DISCUSION	63
7. CONCLUSIONES	65
8. PERSPECTIVAS	68
9. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de copias del X de acuerdo a la dosis génica	26
Figura 2. Estrategia experimental	31
Figura 3. Arreglo Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array	34
Figura 4. Esquema del procesamiento de los Microarreglos	35
Figura 5. Horno de hibridación	42
Figura 6. Estación de flúidos Affymetrix	44
Figura 7. Scanner 3000 7G Affymetrix	44
Figura 8. Deleciones <i>de novo</i> en 3q23, 4p16.3, y 18q21.33	46
Figura 9. Delección intersticial <i>de novo</i> en 3q23. CNAT	55
Figura 10. Delección intersticial <i>de novo</i> en 3q23. CNAT	56
Figura 11. Delección intersticial <i>de novo</i> en 3q23. IGB	57
Figura 12. Delección intersticial <i>de novo</i> en 3q23. IGB	57
Figura 13. Delección intersticial <i>de novo</i> en 3q23. UCSC	58
Figura 14. Delección intersticial <i>de novo</i> en 3q23. UCSC	59
Figura 15. Delección intersticial <i>de novo</i> en 3q23. GenotypeColour™	60
Figura 16. Delección <i>de novo</i> en 4p16.3, CNAT	61
Figura 17. Delección terminal <i>de novo</i> en 18q21.33. CNAT	61
Figura 18. Delección terminal <i>de novo</i> en 18q21.33. CNAT	62
Figura 19. Delección terminal <i>de novo</i> en 18q21.33. CNAT	62
Figura 20. Delección <i>de novo</i> en 18q21.33. GenotypeColour™	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del retraso mental según el ICD-10	2
Tabla 2. Genes implicados en formas sindrómicas e inespecíficas de RMLX	7
Tabla 3. Genes autosómicos responsables de RM monogénico	8
Tabla 4. Código de identificación de casos y controles	32
Tabla 5. Total de casos y controles divididos	33
Tabla 6. Reactivos necesarios Affymetrix Mapping 250K Assay Nsp I	34
Tabla 7. Reactivos utilizados en la mezcla de digestión	36
Tabla 8. Condiciones de temperatura y tiempo de Digestión	36
Tabla 9. Reactivos para la mezcla de ligamiento	37
Tabla 10. Condiciones de temperatura y tiempo de Ligamiento	37
Tabla 11. Reactivos utilizados en la mezcla de PCR	38
Tabla 12. Programa de Amplificación (PCR)	38
Tabla 13. Reactivos utilizados en la mezcla de Fragmentación	40
Tabla 14. Programa para la Fragmentación	40
Tabla 15. Reactivos utilizados en la mezcla de marcaje	41
Tabla 16. Programa para el Marcaje	41
Tabla 17. Reactivos utilizados en la mezcla de hibridación	42
Tabla 18. Reactivos utilizados en la mezcla de buffer de mantenimiento	43
Tabla 19. Regiones clasificadas por longitud	47
Tabla 20. Regiones clasificadas por status actual	48
Tabla 21. Regiones con pérdidas y ganancias <200Kb divididas en CNVs normales y CNVs no reportados	48
Tabla 22. CNVs previamente reportadas	49

Tabla 23. CNVs no reportadas previamente	49
Tabla 24. Información General de Pérdidas y Ganancias <200Kb reportadas y no reportadas previamente	50
Tabla 25. Información General de Pérdidas y Ganancias <200Kb	50
Tabla 26. Información de las Pérdidas y Ganancias Genómicas por su longitud	51
Tabla 27. Información General de Pérdidas y Ganancias >200Kb reportadas y no reportadas previamente	51
Tabla 28. Pérdidas y Ganancias >200 Kb Reportadas previamente	52
Tabla 29. Pérdidas y Ganancias >200 Kb No Reportadas previamente	52
Tabla 30. Ganancias Y Pérdidas >200Kb que son CNVs no reportadas	53
Tabla 31. Regiones >200Kb con incremento en el número de copias	53

RESUMEN

El TEA o Autismo se define como un trastorno complejo del comportamiento, caracterizado clínicamente por una tríada sintomática asociada a cambios cualitativos en la interacción social, defectos en las habilidades de comunicación y patrones de comportamiento restrictivo o estereotipado, que se manifiestan en los primeros 36 meses de vida extrauterina. Aunque el autismo se considera como una entidad definida, se subestima que los fenotipos conductuales relacionados con el autismo que forman parte de un espectro continuo en lugar de categorías claramente definidas. El autismo se asocia hasta en un 30% a epilepsia y 80% con retraso mental, además algunos de los loci implicados en autismo son comunes a los de retraso mental. Sin embargo, las causas biológicas de ambas enfermedades aún están por definirse. Se sabe que los cambios en el número de copias de segmentos de DNA mayores de 1000 pares de bases pueden dar lugar a TEA y retraso mental (RM). En el presente estudio se utilizaron microarreglos de DNA Affymetrix GeneChip 500K mapping array para detectar cambios en el número de copias. Se encontraron 14 cambios relevantes de los cuales 10 fueron heredados y 4 *de novo* por lo que se consideran patogénicos. Las deleciones en 3q23, 18q21.33, y 4p16.3 fueron encontradas en 4 pacientes diferentes, siendo la región de 4p16.3 la única repetida en 2 casos.

ABSTRACT

Autism spectrum disorders are defined as a complex behavioral disease characterized by social interaction, speech delay or no speech at all and stereotyped behavior that is evident in the first 3 years of life. Even though autism is considered a mental disease by itself, autism spectrum disorders and related phenotypes form a continuous spectrum instead of clearly defined entities. Autism is associated with epilepsy in 30% of cases, as well as 80% with mental retardation. In addition, some of the loci implicated in autism are also related to mental retardation. In spite of such associations, not all biological causes are clear for both disorders and much is still to be defined. It is well known that changes in copy number in DNA regions longer than 1Kb can give place to autism spectrum disorders and mental retardation. In the present study Affymetrix GeneChip 500K arrays were used to look for changes in copy number in DNA from patients affected by both disorders. We found 14 relevant changes in copy number, 10 of them were inherited and 4 of them were not present in their parents. The latter are considered to be pathogenic changes. These deletions located at 3q23, 18q21.33, and 4p16.3 were found on four different patients. The region at 4p16.3 was found twice in different individuals, being the only region found more than once.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. RETRASO MENTAL

Los trastornos del desarrollo ocurren en 5-10% de la población pediátrica. Dentro del espectro de trastornos del desarrollo se incluyen: El retraso generalizado del desarrollo, retraso en habla y lenguaje, retraso motor, parálisis cerebral y los impedimentos neurosensoriales profundos como sordera o ceguera. El retraso mental (RM) es la discapacidad más frecuente, y se pone en evidencia desde la infancia. La Asociación Americana de Retraso Mental (AAMR), el ICD-10, y la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV) definen retraso mental como una función intelectual significativamente limitada con defectos adaptativos. Estos últimos incluyen: Comunicación, auto cuidado, habilidades sociales e interpersonales, salud, precaución, habilidades funcionales académicas, uso de recursos comunitarios, trabajo y diversión. Se determina el RM cuando el coeficiente de inteligencia (CI) es inferior a 70, tras medirse éste de forma segura y válida, según la Asociación Americana de Retraso Mental (American Association of Mental Retardation)¹. En niños menores de 5 años se considera el retraso global del desarrollo (RGD)². La prevalencia del RM y/o del RGD no se conoce exactamente, pero la OMS calcula que en las poblaciones industrializadas afecta aproximadamente al 3% de la población³. El RM se puede clasificar en leve (entre 50 y 70 de CI) y grave (inferior a 50).

Según los criterios del ICD-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades/International Classification of Diseases)³, el retraso mental (RM) puede clasificarse de la siguiente forma según su gravedad (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del retraso mental según el ICD-10.

GRADO DE RM	IQ	EQUIVALENTE EN EDAD (EN AÑOS)	CARACTERÍSTICAS
Leve	50 - 69	9 - < 12	Algunas dificultades de aprendizaje en la escuela. Muchos adultos son capaces de trabajar, mantener buenas relaciones sociales y contribuir a la sociedad
Moderado	35 - 49	6-< 9	Retraso marcado del desarrollo en la infancia, pero la mayoría pueden aprender a desarrollar un cierto grado de independencia en el cuidado personal, así como habilidades académicas y de comunicación. Los adultos necesitarán distintos niveles de ayuda para vivir y trabajar en la comunidad.
Grave	20-34	3-<6	Necesidad continua de ayuda.
Profundo	< 20	< 3	Limitaciones severas en el cuidado personal, continencia, comunicación y movilidad. Necesidad continua de ayuda.

La prevalencia del RM grave es muy inferior a la leve (0.4% frente al 2.5-3%), pero sus causas parecen estar mucho mejor definidas. En el RM leve, los condicionantes familiares, socioculturales y biomédicas son frecuentes. Entre las causas que originan el RM, 30% parece ser de origen genético (cromosómico, monogénico y multifactorial) y 15% de origen ambiental (como la asfixia neonatal y las infecciones). El resto de casos (más del 50%) presenta una etiología desconocida⁴. Aunque el proyecto Genoma Humano aporta información con extrema rapidez sobre nuevas mutaciones en genes responsables de la aparición de esta discapacidad. La formación, maduración y funcionamiento del cerebro son procesos largos y de enorme complejidad, por lo que son muchos los factores que interfieren en ese desarrollo.

El RM puede o no acompañarse de anomalías morfológicas en el paciente. Se informa que un recién nacido con defectos morfológicos tiene 27 veces más

riesgo de retraso mental comparado con recién nacidos sin estos defectos^{5,6}. Se estima que entre el 40 al 80 % de los pacientes con RM tienen al menos dos malformaciones congénitas asociadas, sin embargo en pocas ocasiones orientan al diagnóstico⁷.

Aparte de esta clasificación según la gravedad, dentro del RM pueden diferenciarse, además, formas sindrómicas o inespecíficas, en función de otras características clínicas. Las formas sindrómicas son aquellas en las que el RM aparece siempre asociado a manifestaciones somáticas, neurológicas, metabólicas o conductuales. En estos casos, el RM podría ser una característica secundaria que aparece como consecuencia de un problema anatómico o bioquímico primario. En el caso de las formas inespecíficas, el RM es el único síntoma que muestran los pacientes, no estando asociado, por tanto, a manifestaciones de cualquier otro tipo. Durante los últimos 50 años ha habido progreso en entender la etiología de formas sindrómicas de RM, pero los clínicos están intentando entender la etiología de las formas no sindrómicas de RM como un reto actual. Estos análisis se han facilitado un poco por la disponibilidad de casi toda la secuencia del genoma humano.

El RM no sindrómico puede representar una enfermedad genética compleja en la que el fenotipo es debido a la interacción de varios genes diferentes. Está surgiendo un patrón con genes importantes en el RM a través del análisis de genes que mapean en la región de anomalías cromosómicas estructurales. La caracterización precisa de deleciones, duplicaciones, translocaciones y sitios

frágiles a través de estudios de genética molecular permitirá determinar qué genes están involucrados en RM.

1.1.1. RETRASO MENTAL DE ORIGEN GENÉTICO.

1.1.1.1. Etiología del Retraso Mental de Origen Genético

El estudio del retraso mental es altamente complejo en la genética clínica debido a la alta heterogeneidad que presenta. A pesar de numerosos estudios que existen, más de 50% de los casos tiene una etiología desconocida. Alrededor de 15% están causados por factores ambientales tales como malnutrición durante el embarazo, infecciones, trauma pre o postnatal, asfixia neonatal, intoxicación materna o el síndrome alcohólico fetal, mientras que 30% son de origen genético. Las causas genéticas del RM abarcan anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, los reordenamientos crípticos subteloméricos o intersticiales, los factores monogénicos y multifactoriales⁸.

1.1.1.2. Causas Cromosómicas que originan Retraso Mental

Las anomalías cromosómicas numéricas o estructurales que se detecta por citogenética convencional son aproximadamente 10% de los casos de RM leve y 40% del RM grave⁹. Aquí se incluye el síndrome de Down (SD) o trisomía 21, que es la causa más frecuente. Otras anomalías cromosómicas que se consideran responsables del RM en aproximadamente 12% de los casos son: Cromosopatías desbalanceadas, trisomías 18 y 13, anomalías en los

cromosomas sexuales, etc. En los últimos años, y gracias a los avances de la citogenética molecular, como los análisis de FISH (hibridación *in situ* fluorescente), se ha visto que hay cuadros clínicos con pequeñas deleciones y más raramente duplicaciones submicroscópicas que conllevan RM, como los síndromes de Prader-Willi y de Angelman, originados en parte por una pequeña microdelección en el cromosoma 15q11-q13¹⁰ y el síndrome de Williams con microdelección en el cromosoma 7q11.23¹¹. Recientemente, pequeñas anomalías subteloméricas por reordenamientos anormales en los cromosomas pueden explicar el 7% más de los casos con RM grave¹². Esto es interesante, ya que cada vez hay mayor conocimiento sobre la inestabilidad del genoma humano y existe una elevada concentración de genes muy propensos a sufrir recombinación, precisamente en las regiones subteloméricas debido a la gran similitud de secuencias. Además, las investigaciones se centran no sólo en las anomalías en sí mismas, sino también en la práctica de técnicas moleculares más precisas que las citogenéticas convencionales o la propia FISH y ya se estudian las anomalías crípticas en pacientes con RM por métodos moleculares mediante las técnicas MAPH (*multiplex amplifiable probe hybridization*), MLPA (*multiplex ligation- dependent probe amplification*)¹³ y el estudio de las variaciones en número de copia del genoma.

1.1.1.3. Retraso Mental Ligado al Cromosoma X

Aproximadamente 2.6% de los casos con RM presentan el Síndrome de X Frágil. Ésta es la discapacidad mental más frecuente en varones, después del

Síndrome Down (Prevalencia entre 1/4.500 y 1/8.000 varones)¹⁴, el cual pertenece al grupo de enfermedades con RM ligado al cromosoma X (RMLX), que contribuyen al RM de causa genética en una proporción que oscila entre el 25 y el 50% del total de los casos. El grupo de las causas RMLX se ha hecho tan grande que, a fecha de hoy¹⁵, se han descrito 140 trastornos de esta naturaleza, de los cuales se han clonado 66 genes y se ha efectuado la localización cromosómica de 50 familias. Entre los genes identificados se encuentra el *MECP2*, responsable del síndrome de Rett¹⁶, que origina la discapacidad mental más frecuente después del Síndrome Down. Asimismo, se han encontrado mutaciones en el gen *MECP2* en pacientes con RM de etiología desconocida. Últimamente, se han identificado 20 nuevos genes dentro de esta categoría, entre ellos, el gen *FMR2*, en el locus FRAXE¹⁷.

Varios genes han sido asociados a formas tanto sindrómicas como inespecíficas. De hecho, 11 de los genes de MRLX están también mutados en algún síndrome y formas de retraso inicialmente calificadas de no sindrómico o inespecífico. En la Tabla 2 se muestran algunos de estos genes.

1.1.1.4. Causas Autosómicas Monogénicas que originan Retraso Mental

Se calcula que sólo 6% del RM se debe a una causa autosómica monogénica. Entre muchas de las dominantes, el RM se encuentra como secundario al proceso fisiopatológico que conlleva el síndrome, como es el caso de la neurofibromatosis y de la esclerosis tuberosa, entidades clínicas

Tabla 2. Genes implicados en formas sindrómicas e inespecíficas de RMLX¹⁵.

GEN	LOCUS	SÍNDROME
<i>RPS6KA3</i>	X p22.12	Síndrome de Coffin-Lowry
<i>ARX</i>	Xp22.11	Síndromes de Partington, West, Proud y XLAG
<i>PQBP-1</i>	Xp11.23	Síndromes de Renpenning, Sutherland-Haan, Hamel, Golabi-Ito-Hall y Porteous
<i>FGD1</i>	Xp11.22	Síndrome de Aarskog
<i>OPHN1</i>	Xq12	Síndrome de RMLX-disgénesis cerebelar
<i>ATRX/XNP</i>	Xq21.1	Síndromes de RMLX-facies hipotónica y Smith-Fineman- Myers
<i>AGTR2</i>	Xq23	Síndrome de RMLX-atrofia óptica
<i>MECP2</i>	Xq28	Síndromes de Rett y PPM-X
<i>SLC6A8</i>	Xq28	Síndrome de RMLX-convulsiones
<i>SCMX/JARID1C</i>	Xp11.22	
<i>NLG4N</i>	Xp22.31	RMLX con autismo y/o desorden del desarrollo

producidas por mutaciones en genes supresores de tumores, o el caso de la distrofia miotónica de Steinert. Sin embargo, en otros síndromes considerados hasta ahora como esporádicos se ha visto que se trata de mutaciones en genes recientemente descritos y que, si se transmitieran, lo harían en dominancia. Es el caso del síndrome de Sotos¹⁸ y del de Cornelia de Lange¹⁹.

Tabla 3. Genes autosómicos responsables de RM monogénico²⁰.

GEN	LOCUS	SÍNDROME
Procesos de Neurogénesis		
<i>ASPM</i>	1q31	Microcefalia vera
<i>CENPJ</i>	13q12.2	Microcefalia vera
<i>MCPH1</i>	8p22-pter	Microcefalia vera
Factores de transcripción y cascadas de señales		
<i>CBP</i>	16p13.3	Síndrome de Rubinstein-Taybi
<i>DNMT3B</i>	20q11.2	Síndrome de Inmunodeficiencia
<i>EP300</i>	22q13.1	Síndrome de Rubinstein-Taybi
<i>GTF211</i>	7q11.23	Síndrome de Williams
<i>NF1</i>	17q11	Neurofibromatosis Tipo I
Migración neuronal		
<i>FCMD</i>	9p31	Distrofia muscular de Fukayama
<i>LIS1</i>	17p13.3	Síndrome de Miller Dieker
<i>POMT1</i>	9q34	Síndrome de Walker-Warburg
<i>POMT2</i>	14q24.3	Síndrome de Walker-Warburg
<i>POMGnT1</i>	1p34	Trastorno ojo-músculo-cerebro
<i>RELN</i>	7q22	Lisencefalia
<i>VLDLR</i>	9p24	Lisencefalia
Diferenciación neuronal		
<i>UBE3A</i>	15q11	Angelman

Entre las enfermedades genéticas autosómicas recesivas que producen RM se encuentran mayoritariamente los errores innatos del metabolismo (EIM). Los EIM o metabolopatías son alteraciones bioquímicas de origen genético, ocasionados por un defecto específico en la estructura o en la función de las moléculas proteicas (enzimas) producto del gen. Entre ellas, la fenilcetonuria y la galactosemia han sido las más estudiadas no sólo por su alta prevalencia sino por el hecho de que su detección neonatal con posterior tratamiento y seguimiento evita el RM²¹. En la Tabla 3 se muestran algunos genes responsables de RM monogénico.

1.2. TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es una incapacidad relativa al desarrollo mental que típicamente aparece durante los tres primeros años de vida. El término autista fue utilizado por primera vez en 1943 para describir un trastorno infantil caracterizado por la ausencia de interacción social. Actualmente, autismo se describe como un trastorno del desarrollo, que da lugar a diferentes grados de alteración del lenguaje, la comunicación, las competencias sociales y la imaginación. Con frecuencia, estos síntomas se acompañan de comportamientos anormales, tales como actividades e intereses de carácter repetitivo y estereotipado, movimientos de balanceo, y obsesiones insólitas hacia ciertos objetos o acontecimientos²²⁻²⁵.

El autismo se incluye en el grupo de Trastornos Generalizados del Desarrollo (TGD) junto con los síndromes de Asperger, Rett, trastorno desintegrativo de la niñez y Trastorno Generalizado del Desarrollo No Especificado, conocido por las siglas PDDNOS^{25,26}. Por otro lado, el autismo se asocia hasta en 80% con retraso mental²⁷, y algunos de los loci implicados en autismo son comunes a retraso mental. Una de las características del trastorno autista es su difícil diagnóstico, debido a que existen gran variedad de fenotipos, niveles de afectación, diferentes síntomas durante el desarrollo, incluso en el mismo individuo y a la ausencia de un marcador biológico específico. Hoy se diagnostica mediante la entrevista diagnóstica de autismo revisada (ADI-R) y la escala de observación del autismo (ADOS), antes de los tres años^{24,28}. Los estudios epidemiológicos estiman que actualmente el trastorno autista afecta a 15-20/10.000 nacimientos y los TGD a 60/10.000, siendo más frecuente en el sexo masculino que en el femenino, en una proporción de 4 a 1²⁹. Diferentes estudios relacionan factores ambientales con el autismo. Entre ellos se mencionan la exposición a drogas, alcohol o ciertas medicinas durante el periodo intrauterino, infecciones pre y postnatales con organismos como *Haemophilus influenzae*, virus de la rubéola y la exposición al mercurio. En cualquier caso, estos estudios se refieren a un número pequeño de pacientes y no se han hallado suficientes evidencias para llegar a una conclusión clara sobre el papel de estos agentes^{26,28}.

1.2.1. Causas genéticas del autismo

Se han encontrado evidencias sobre las bases genéticas del autismo: a) La probabilidad de que una familia tenga algún miembro autista, es de 2-8% y superior en familias que ya tienen un individuo afectado; b) Los estudios de gemelos para el autismo son más concordantes entre gemelos monocigóticos (60%-91% dependiendo del grado de afectación considerado) que entre los dicigóticos (0%-10%); y c) Algunos síntomas del autismo como fobias sociales, preferencias por la rutina y dificultades en la comunicación y adaptación, son más frecuentes en familiares de autistas que en la población general^{23-26,30-33}. Las bases genéticas del autismo son complejas, su transmisión no sigue la herencia mendeliana simple, ni está asociada a un gen, sino que son varios genes y la interacción entre ellos conducen a su desarrollo. Para identificar las bases genéticas del trastorno autista se han realizado estudios citogenéticos³⁴⁻³⁶, de asociación³⁷⁻⁴¹, de desequilibrio de ligamiento^{30,33,42-46}, de expresión⁴³⁻⁴⁹ y con modelos animales⁵⁰.

1.2.2. Análisis de ligamiento y asociación

Estudios de análisis de ligamiento han revelado regiones implicadas en la etiología del autismo en casi todos los cromosomas. La asociación de algunas regiones ha sido apoyada por más de un estudio e incluye genes asociados al trastorno autista; genes que participan en sistemas alterados en el autismo (GABAérgico, glutamatérgico o de la serotonina); y/o genes cuyas alteraciones causan características del fenotipo autista. Por ejemplo, varios estudios

describen la asociación entre el autismo y las regiones 2q, 3q25-q27, 3p25, 6q14-q21, 7q31-q36, 13q, 16p y 17q11-q21^{24,26}. Las regiones 3p25- p26, 6p21, 17q11-q12, 15q11-q13 y varias zonas de los cromosomas 7 y X. La región 3p25-p26 resulta relevante porque en ella está codificado el receptor de la oxitocina (OT), asociado con el trastorno autista. En algunos pacientes se han detectado niveles de OT más bajos que en controles⁵¹ y estudios en ratas y ratones demuestran que los niveles de OT afectan a la capacidad de relacionarse, explicando cómo este gen participa en el fenotipo autista^{52,53}. Mutaciones del receptor de glutamato 6 (*GluR6*), codificado en 6q21, también se han observado en autistas³⁹. Sólo algunas podrían afectar a la función de la proteína pero debido a la importancia del glutamato en el desarrollo del cerebro, el aprendizaje y la memoria y a las alteraciones del sistema glutamatérgico observadas en pacientes, este gen resulta relevante en la patogénesis de dicho trastorno^{23,26}. El cromosoma 7 es uno de los que más se repite en los análisis de ligamiento y la mayor parte de los genes asociados al autismo están codificados en este cromosoma²⁶. Entre ellos destacan *FOXP2*, *LAMB1*, *EN2*, *HOXA1*, *GRM8*, *NPTX2*, *WNT2*, *RELN* y *CAPS2*^{23,40,54-58}. Mutaciones de *FOXP2* están relacionadas con alteraciones del lenguaje, *LAMB1* promueve la migración neuronal y el crecimiento de las neuritas durante el desarrollo del SNC, *EN2* es un factor de transcripción homeobox que actúa durante la formación del cerebro y el cerebelo, *HOXA1* participa en el desarrollo del cerebro posterior, *GMR8* es otro receptor de glutamato y *NPTX2* es importante para la sinaptogénesis^{26,26}. Experimentos con ratones muestran que mutaciones de *Wnt2* afectan a la

capacidad de relacionarse⁵⁹. *RELN* participa en la migración neural, en la formación de la corteza cerebral y en la sinaptogénesis. Niveles más bajos de esta proteína se han identificado en pacientes⁶⁰ y se ha observado que en familias autistas existe una tendencia a la transmisión de un alelo de *RELN* que contiene una expansión de trinucleótidos en su extremo 5'⁴¹. Alteraciones de este gen afectan al desarrollo del cerebelo y la corteza, unas de las anomalías encontradas en autistas²³. Ratones *knockout* para *Caps2* muestran que la adecuada liberación de neurotrofinas (NT-3 y BDNF) mediada por CAPS2 es indispensable para el desarrollo y funcionamiento normal del cerebelo, incluyendo la diferenciación neuronal, morfogénesis, sinapsis y el aprendizaje y control motor⁶¹. La región 17q11-q12 es relevante porque en ella se localiza el transportador de serotonina (*SLC6A4*), y además de haberse identificado mutaciones de este gen en autistas, se ha comprobado que los niveles de serotonina en plasma son más altos en pacientes que en la población control⁶². Mutaciones en *MECP2*, *NLGN3* y *NLGN4* codificados en el cromosoma X también se han identificado en individuos afectados^{48,63,64}. Las neuroliginas 3 y 4 (*NLGN3*, *NLGN4*) funcionan como moléculas de adhesión celular localizadas postsinápticamente en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas y son esenciales para la sinaptogénesis. *MECP2* participa en la impronta genómica, ya que es un represor transcripcional que se une a dinucleótidos CpG metilados en promotores y recluta a *HDAC1* y otras proteínas de la heterocromatina²⁷. El gen *SHANK3* que también es una proteína postsináptica en las sinapsis excitatorias donde se une directamente a las neuroliginas. Un estudio reciente soporta la

asociación del gen de la adenosina desaminasa (ADA) (20q13.12) con el autismo. Alteraciones en el metabolismo de las purinas y actividad reducida de ADA se han observado en autistas^{65,66}. El gen *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) es un gen tumor supresor que tiene la habilidad de bloquear la progresión del ciclo celular en la fase G1. Actúa en la división nuclear tardía y es importante en la preparación para la replicación del DNA durante el subsecuente ciclo celular^{67,68}. Alteraciones en este gen se han relacionado con síndrome de Cowden, macrocefalia, diversas neoplasias malignas y autismo²⁷.

Todos estos genes por las funciones que desempeñan y los sistemas en los que actúan son buenos candidatos para participar en el desarrollo del autismo pero algunos estudios de asociación aún son contradictorios, posiblemente por la heterogeneidad de fenotipos de la enfermedad²⁶. En este sentido se ha comprobado que determinadas regiones podrían estar más relacionadas con el desarrollo del autismo dependiendo del sexo del paciente o de su origen ancestral. Las regiones 5p15.33, 9p24.1 y 11p13-p12 parecen estar asociadas al desarrollo del autismo en mujeres, 5q12.3 y 9q33.3 en hombres y 2q y 7q en familias de origen europeo, reflejando la complejidad de los factores genéticos que afectan al autismo³. Se cree que la heterogeneidad clínica del autismo refleja la complejidad de sus bases genéticas, involucrando a múltiples loci, heterogeneidad genética, fenómenos epistáticos e interacciones entre factores genéticos y medio-ambientales.

1.2.3. Alteraciones genómicas

Diferentes estudios muestran que 3-5% de los autistas presentan alteraciones citogenéticas^{34,35}. La más frecuente es una duplicación de la región 15q11-q13⁶⁹⁻⁷², pero también se han observado deleciones de 2q37^{73,74}, 7q31 [164, 165], 22q11⁷⁵ y 22q13.3⁷⁶. Las deleciones de 2q37 están a menudo asociadas a rasgos dismórficos, hipotonía, disfunción renal y braquidactilia. En la región 7q31 están codificados los genes *FOXP2*, *WNT2* y *GMR8*, asociados también al autismo. Deleciones de 22q11 también se han observado en casos de síndromes velocardiofacial, de DiGeorge y anomalías conotruncales, síndromes con características clínicas comunes con el autismo²⁶. Szatmari et al.⁷⁷ han identificado CNVs asociados al autismo. El reordenamiento más frecuente relacionado con dicho trastorno son duplicaciones de la región 15q11-q13, como demostraban los estudios anteriores. Observaron además 4 deleciones de 2p16 que afectan al gen de la neurexina 1 *NRXN1*. Esta proteína es interesante para el origen del trastorno autista, ya que está localizada presinápticamente y participa en las sinaptogénesis glutamatérgicas y posiblemente GABérgicas, además indica diferenciación en dendritas mediante su interacción con neuroliginas y es requerida para la liberación normal de neurotransmisores, también asociadas al autismo. Así estas alteraciones refuerzan la asociación del sistema glutamatérgico con el trastorno autista. Se han identificado 1 duplicación y 3 deleciones de la región 17p12 y una duplicación de 22q11.2. Duplicaciones de 17p12 se han detectado en pacientes con CMT1A, deleciones de la misma región en neuropatías, microduplicaciones en pacientes con retraso mental y

déficit del lenguaje y microdeleciones en el síndrome de Smith-Magenis⁷⁶. Utilizando microarreglos de alta densidad Marshall⁸, encontró 277 CNVs en 189 (44%) de 427 familias estudiadas. Estos CNVs no estaban presentes en 1600 controles, aunque estos presentan numerosos CNVs. Aunque la mayoría eran heredadas, 27 casos eran *de novo*. El CNV en 16p11.2 estaba en 4 de 427 familias y en ninguno de 1652 controles. Algunos de los loci de autismo también son comunes en retraso mental.

1.3. DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL RETRASO MENTAL

El Diagnóstico del RM no es fácil debido a su elevada heterogeneidad. Los desarrollos en citogenética y bioquímica humana durante los últimos 50 años dieron lugar a la formación de guías para la evaluación de individuos con RM y pruebas de laboratorio recomendadas como análisis de cariotipo entre otras más recientemente incluidas. El primer paso es la exploración clínica minuciosa enfocada a la detección de anomalías mayores y menores, y la obtención de datos sobre antecedentes personales y familiares. En función de los datos clínicos obtenidos, el protocolo de estudio dependerá de si existe sospecha diagnóstica clara de un síndrome que curse con RM o si por el contrario nos encontramos frente a un caso de RM inespecífico⁷⁸.

1.3.1. RM sindrómico

Ante la sospecha de una cromosomopatía, se realizará:

- Cariotipo con una resolución mínima de 550 bandas.

- Estudios de metilación cuando se sospeche de un síndrome causado por genes sometidos a impronta genómica, (Síndrome de Angelman), lo que permitirá conocer qué genes están activos o inactivos.
- Estudios de disomía uniparental con marcadores microsatélites distribuidos a lo largo del cromosoma implicado.

En caso de sospecha de un síndrome monogénico (Síndrome de Rett: gen MECP2 o síndrome de Coffin-Lowry: gen RPS6KA3) se realiza:

- Estudio mutacional del gen correspondiente mediante diferentes técnicas de búsqueda de mutaciones como polimorfismos conformacionales de una sola cadena (SSCPs), electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGEs) o secuenciación directa de todo el gen⁷⁸.

1.3.2. RM inespecífico

En los casos en los que la evaluación clínica no permita un diagnóstico claro, el protocolo establecido incluye el estudio de:

- Cariotipo (>550 bandas): El estudio del cariotipo es un paso rutinario, a pesar de que en los casos de RM no sindrómico prácticamente no hay cromosopatías detectables mediante citogenética convencional.
- Estudio molecular de la expansión CGG del gen FMR1 (Síndrome X Frágil): Este estudio está establecido en el protocolo de estudio de RM debido no solo a que constituye la cause de RM hereditario más común

- entre los varones (30% de los casos de RMLX), sino también a que es un estudio directo, fácil y no tan costoso.
- Estudio de las regiones subteloméricas: Aproximadamente 6-10% de los casos de RM inespecífico son debidos a reordenamientos en regiones subteloméricas. En los últimos años se han descrito nuevos síndromes de reordenamientos subteloméricos que cursan con RM y facies dismórficas (Knight 2000, De Vries 2003). Aunque las sondas de FISH subteloméricas han sido hasta ahora el método más usado para la detección de reordenamientos subteloméricos, la técnica de Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) se presenta actualmente como el método más eficiente para la detección de este tipo de reordenamientos⁷⁸.

1.3.3. Técnicas de Estudio del RM

Desde el descubrimiento de las bandas G en los años 70, el análisis del cariotipo ha sido la principal herramienta para el diagnóstico de alteraciones cromosómicas en RM tanto de aneuploidías totales o parciales como de reordenamientos (translocaciones, microduplicaciones y microdeleciones). La citogenética convencional tiene una resolución de 6-10 Mb, por lo que la identificación de alteraciones submicroscópicas requiere de técnicas más sensibles. La aplicación de nuevas tecnologías de citogenética molecular como el FISH o el CGH ha permitido superar en parte esta limitación⁷⁸.

1.3.4. Técnicas Convencionales

La citogenética molecular inicio en 1977 con la hibridación *in situ* de sondas de DNA a cromosomas humanos. En 1991, Oberlé y colaboradores hicieron un descubrimiento molecular en casos de retraso mental sindrómico caracterizado por fragilidad en el cromosoma X. El síndrome de X frágil es una forma común de RM hereditario. Oberlé descubrió que la fragilidad es debida a un repetido inestable de DNA⁷⁹. La disponibilidad de información de secuencia y mapeo continuara impactando los estudios designados a determinar la etiología de trastornos del desarrollo y retraso mental. Esta información es de fácil acceso a través de varias bases de datos en internet.

1.3.6.1. Hibridación *in situ* Fluorescente

La técnica de FISH, desarrollada en los años 80⁸⁰ supuso un gran avance para la detección y confirmación de rearrreglos cromosómicos que son más finos que el poder de resolución de la citogenética convencional. Esta técnica se basa en el marcaje de sondas de DNA con fluorescencia que posteriormente se hibridarán al DNA de la muestra en un sitio blanco. La sensibilidad de la técnica (80-100Kb) es muy superior a la citogenética convencional, por lo que un gran número de síndromes por microdelección son directamente diagnosticados por FISH. Las BAC (Bacterial Artificial Chromosome); PAC (P1-derived Artificial Chromosome) y YAC (Yeast Artificial Chromosome), son un tipo de “vectores“ de alta capacidad usados para clonar fragmentos de DNA de alrededor de 100-300 Kb. El marcaje de clones, ya sean BACs, PACs o YACs se ha convertido en una

valiosa herramienta tanto para la caracterización detallada de puntos de rotura a lo largo del genoma humano y la identificación de genes responsables de desórdenes genéticos en base a su localización cromosómica, como por la construcción de bibliotecas genómicas, en el Proyecto del Genoma Humano.

Una de las desventajas que tiene la hibridación in situ es que es necesario conocer la región que se quiere estudiar. Son estudios dirigidos a la confirmación de una sospecha diagnóstica de síndromes con microdeleciones o microduplicaciones o confirmación de resultados obtenidos mediante otras técnicas como el MLPA o los arreglos de hibridación genómica comparada (CGH).

1.3.7. Hibridación Genómica Comparada (CGH)

Esta técnica surgió en los años 90 y permite la detección de desequilibrios cromosómicos abordando todos los cromosomas en un solo experimento⁸¹, lo que fue un gran avance sobre las técnicas citogenéticas y moleculares utilizadas para el diagnóstico hasta entonces. La CGH se basa en un proceso de hibridación competitiva. El DNA en estudio se marca con un fluorocromo específico (verde) y el DNA control marcado con otro fluorocromo diferente (rojo). Estos DNAs se combinan y son hibridados en cromosoma humano sin anomalías. El análisis posterior se lleva a cabo con un programa informático que cuantifica la fluorescencia roja y verde a lo largo de los cromosomas, estableciendo un perfil de la tasa de fluorescencia verde/roja para cada cromosoma. Tasas entre 0.75 y 1.25 indican una cantidad relativa de DNA igual

entre el DNA en estudio y el control, tasas superiores a 1.25 o inferiores a 0.75, indican una ganancia o pérdida en el DNA problema, respectivamente⁸¹. Las principales limitaciones de la CGH son la resolución, ya que no detecta reordenamientos cromosómicos inferiores a 5-10 Mb y tampoco permite detectar alteraciones cromosómicas equilibradas. Además, es una técnica laboriosa con la que no se obtienen resultados inmediatamente, sino hasta después de 72 horas.

1.3.8. Nuevas tecnologías en la detección de rearrreglos crípticos

El desarrollo de nuevas tecnologías más sensibles cada vez apoya la detección de rearrreglos crípticos que muchas veces no pueden ser detectados con las técnicas de citogenética convencional. En el área del RM, la aplicación de estas nuevas tecnologías como los arreglos de CGH o los microarreglos de SNPs (polimorfismos de una sola base), están permitiendo la identificación y caracterización de alteraciones cromosómicas desequilibradas que resultan en variaciones en número de copias en el genoma.

1.3.6.1. Polimorfismos de un solo Nucleótido (SNPs)

Los SNPs (del inglés single nucleotide polymorphisms) o polimorfismos de un sólo nucleótido son cambios en la secuencia de DNA que ocurren en por lo menos 1% de la población y cada SNP se considera como un polimorfismo bialélico en donde se cambia un solo nucleótido por otro. Se estima que existe

un SNP por cada 1000 pares de bases en el genoma humano y hay por lo menos 10 millones de SNPs en común en la población general, lo que constituye 90% de la variación genética en la población humana. Los SNPs pueden ser sinónimos, lo que significa que aún cuando un nucleótido cambia, no da lugar a una modificación en el aminoácido codificado. Por el contrario, los SNPs no sinónimos sí originan un cambio de aminoácido en la proteína resultante cuando el SNP se encuentra en una región codificante. Ejemplo: El codón CAU codifica para histidina, que es un aminoácido polar cargado, al igual que el codón CAC, sin embargo CAA codifica para glutamina, que es un aminoácido polar sin carga, el cambio de CAU a CAA daría lugar a una mutación no conservativa por cambiar un aminoácido por otro con propiedades diferentes. Existen polimorfismos funcionales que pueden afectar genes de manera adversa cambiando aminoácidos (SNPs no sinónimos), introduciendo codones de paro prematuros, o generando cambios en sitios de splicing o regiones reguladoras. Sin embargo, el significado biológico de estos polimorfismos aún está en estudio. Debido a su abundancia, estabilidad y distribución homogénea a lo largo del genoma, los SNPs ofrecen gran potencial para diagnosticar enfermedades humanas mediante análisis automatizado de microarreglos⁸².

1.3.6.2. Microarreglos de Alta Densidad

En la actualidad, se está llevando a cabo una segunda revolución en la biología y la medicina. Esto se debe a la capacidad cada vez mayor de analizar los ácidos nucleicos en forma global, tanto a nivel del DNA como del RNA

(Genómica). Los estudios masivos de ácidos nucleicos han desencadenado cambios en la medicina que conducen a un enfoque más global y menos reduccionista. Con el advenimiento de la tecnología de los microarreglos se lograrán analizar múltiples anomalías y/o variaciones submicroscópicas en el genoma humano en un solo experimento. Un arreglo (*del inglés array*) está conformado por una serie de elementos microscópicos ordenados específicamente en una superficie plana. Los arreglos están estructurados por una superficie sólida (vidrio, plástico o silicio), a la cual se unen una serie de fragmentos de DNA o RNA y constituyen una de las herramientas más importantes en la genómica porque permiten analizar varios segmentos del genoma al mismo tiempo.

Existen diferentes tipos de arreglos de RNA y DNA. Los primeros se utilizan para análisis cuantitativo de un transcrito. Los arreglos de RNA son utilizados para conocer los niveles de expresión de genes y monitorear miles de transcritos de forma simultánea. Con esta tecnología se puede observar de forma casi instantánea la expresión de todos los genes del genoma de un organismo y por esta razón pueden ser utilizados para identificar genes que producen enfermedades. Los diferentes niveles de expresión entre células sanas y células patológicas pueden ser responsables del fenotipo en los individuos afectados. Los estudios con microarreglos de expresión han tenido una gran utilidad en el estudio de diferentes tipos de cáncer, ya que al analizar patrones de expresión se puede predecir metástasis y contribuir a la clasificación de los tumores.

También se pueden utilizar arreglos para observar genotipos, o para cuantificar el número de copias de un SNP determinado en una posición física conocida dentro del genoma humano, esto último se puede hacer de manera comparativa simple (casos y controles), o pareada, con muestras del tumor y muestras de sangre periférica u otro tejido libre de tumor del mismo paciente. Los microarreglos de DNA para valorar número de copias son un método para detectar pérdidas o ganancias con gran resolución a lo largo del genoma. Los arreglos de DNA para análisis de número de copia son muy prometedores para el uso clínico, ya que el DNA puede extraerse de tejidos preservados en parafina y es biológicamente más estable que el RNA. Se cree que los arreglos para el análisis de número de copias comenzarán a desplazar a los de expresión como herramienta clínica en el manejo del paciente con enfermedades multifactoriales, defectos congénitos o cáncer.

Recientemente, se han descrito segmentos de DNA con variación en número de copias (CNVs) en individuos fenotípicamente normales, éstas pueden ser deleciones, o duplicaciones. El estudio de CNVs ha tenido un impacto profundo en el conocimiento de las enfermedades, relacionando a diversas patologías con el efecto directo de dosis génica (microdeleciones y microduplicaciones) o bien, en forma indirecta a través de efecto de posición. En el último caso, el defecto puede estar distante al gen que causa la enfermedad, sin embargo, puede tener un efecto sobre la expresión génica. También se puede alterar la estructura del genoma haciéndolo más susceptible a cambios que pueden ocurrir en las mitosis o meiosis subsecuentes. Estas regiones también se han asociado con riesgo a

enfermedades complejas y a diferentes locus relacionados con el desarrollo. Las CNVs pueden predisponer a cambios genéticos funcionales o pueden servir como sustrato para cambios evolutivos. Hace unos años, las herramientas metodológicas para poder detectar pequeñas ganancias o pérdidas en el genoma de menos de 50kb no eran accesibles y su costo era elevado. Las CNVs son posibles causas de susceptibilidad a enfermedades complejas. También pueden influenciar mediante efectos de posición, o ser blanco de cambios en la evolución de los cromosomas. Las regiones de número de copia variable tienen un promedio de 250Kb y cerca del 12% del genoma humano son CNVs. Estas regiones variables contienen más de 3000 genes que pueden estar relacionados con enfermedades⁸³. Se cree que estos cambios en el número de copias son causados por eventos de recombinación. Para una muestra en particular, mientras más grande sea la distancia genética entre dos marcadores, es más probable que ocurran cambios en el número de copia dentro de esta región⁸⁴.

Para validar la técnica de los microarreglos, Zhao X. et al en un estudio clásico analizaron líneas celulares con número de copias bien definidos. El DNA genómico aislado de células con 1 a 5 copias del cromosoma X, fue digerido, amplificado e hibridado a los microarreglos. Después de normalizar las señales de cada muestra, se digitalizaron las señales que representaban a cada SNP. La relación de la hibridación de cada SNP fue computarizada para las líneas celulares con 45,X, 46,XX, 47,XXX, 48,XXXX, 49,XXXXX con respecto al promedio de muestras normales 46,XX (Figura1).

Los números de copia observados en todos los SNPs del cromosoma X correlacionaron con el número conocido de X. Este estudio motivó a muchos investigadores a valorar el análisis de número de copias en DNA de individuos con rasgos fenotípicos de interés.

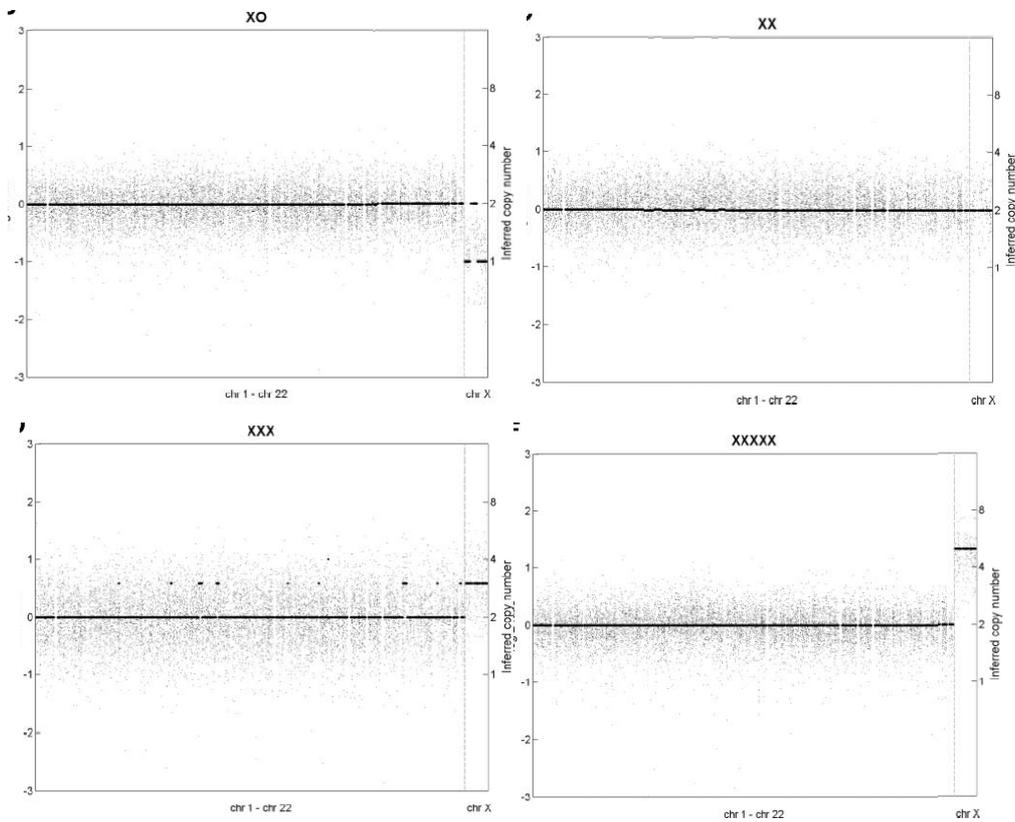


Figura 1. Número de copias del X de acuerdo a la dosis génica.

Otros tipos de arreglos, como los de re-secuenciación, están surgiendo como una estrategia que podría reemplazar los métodos de rutina actuales para conocer secuencias de DNA dentro del genoma humano y facilitar la detección

de mutaciones. Recientemente, se han comercializado arreglos que facilitan el análisis de los patrones de metilación en patologías relacionadas con impronta genómica. Aunque los arreglos se han utilizado principalmente en cáncer, esta tecnología se usa también en estudios neurológicos, de autoinmunidad, trasplantes, endocrinología de la reproducción, trauma, sépsis y enfermedades cardiovasculares⁸⁵. Entre otras aplicaciones, los arreglos de SNPs pueden ser utilizados para identificar variaciones entre individuos o diferentes poblaciones. Estos SNPs podrían ser los responsables de la mayoría de la variación genotípica dentro de una población, y la fuente de susceptibilidad a distintas enfermedades. En general, la aplicación de estas técnicas de genotipificación es usada para conocer la predisposición a enfermedades. Los arreglos de SNPs también son utilizados para identificar mutaciones somáticas, como la pérdida de heterocigidad, la amplificación o ganancia de regiones de DNA en el genoma individual de pacientes afectados.

La re-secuenciación, o secuenciación por hibridación se convertirá en el método de rutina para diagnóstico molecular de algunas enfermedades en las que ya se conoce el gen responsable de la enfermedad⁸⁵. Por ejemplo, los arreglos son la herramienta ideal para el estudio de neoplasias, ya que permiten evaluar número de copias y pérdida de heterocigidad simultáneamente en todo el genoma⁸⁶. Las regiones variantes en el número de copias que son demasiado pequeñas para verse por citogenética convencional o molecular, pueden detectarse fácilmente y con mayor resolución utilizando microarreglos de ácidos nucleicos. Los tamizajes genéticos son una herramienta poderosa cuando se tienen

enfermedades monogénicas en las que hay relaciones genotipo-fenotipo directas, pero en el caso de enfermedades complejas como el autismo esto resulta muy lento y poco costeable. Sin embargo, las pruebas moleculares pueden evaluar la susceptibilidad genética para el autismo o identificar formas monogénicas raras de la enfermedad. Esto es muy relevante para las buenas prácticas clínicas por 2 razones: I.- La identificación de variantes de susceptibilidad pueden permitir la implementación de programas de prevención o identificar causas genéticas exactas y II.- Así disminuir los niveles de ansiedad de los padres de los afectados, lo que incrementa el cumplimiento de intervenciones médicas y de programas de rehabilitación.

2. JUSTIFICACIÓN

Existen muchas enfermedades para las cuales se desconoce gran parte, o se ignora por completo las bases moleculares de su fisiopatología. Los pacientes con patologías representativas de dichas enfermedades pueden ser utilizados como modelos biológicos para estudiar y entender las diferentes vías de señalización implicadas en el desarrollo normal.

Los microarreglos son una herramienta ideal cuando se cuenta con escasa, o no se tiene información biológica suficiente, ya que la simple cuantificación y análisis de los datos obtenidos, puede convertirse en nuevas propuestas o en diseños de experimentos más dirigidos o enfocados a un área en particular. Llevando a cabo la búsqueda de genes de enfermedades por medio de análisis de ligamiento y estudios de asociación se contribuye a la disección de la variación en el genoma humano y el desarrollo de métodos para analizar su variación en muestras grandes.

Pretendemos realizar el análisis genómico mediante microarreglos de alta densidad de SNPs en pacientes pediátricos con el TEA y RM para identificar regiones con pérdidas o ganancias en el genoma. Además de la relevancia clínica del diagnóstico a través de microarreglos; esta técnica en un futuro puede ayudar a la identificación de marcadores moleculares relacionados con el autismo y el retraso mental.

- Este es el primer estudio en nuestro país en el que se aborda el análisis genómico de pérdidas y ganancias asociadas al Retraso mental y al Trastorno del espectro autista.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar regiones candidatas en el genoma relacionadas con el Trastorno del Espectro Autista y el Retraso Mental mediante microarreglos de alta densidad.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análisis de regiones variables en número de copias (CNVs) de un grupo de pacientes con el Trastorno del Espectro Autista (TEA) y Retraso Mental (RM)
- Comparación de los datos de los pacientes con sus padres para identificar diferencias en el número de copias contra individuos normales. Y poder determinar si los CNVs presentes en los casos son heredados o *de novo*.
- Identificación de regiones candidatas en el genoma ligadas al TEA o RM donde se encuentren los CNVs *de novo*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se muestra la estrategia experimental general de la presente investigación (Figura 2).

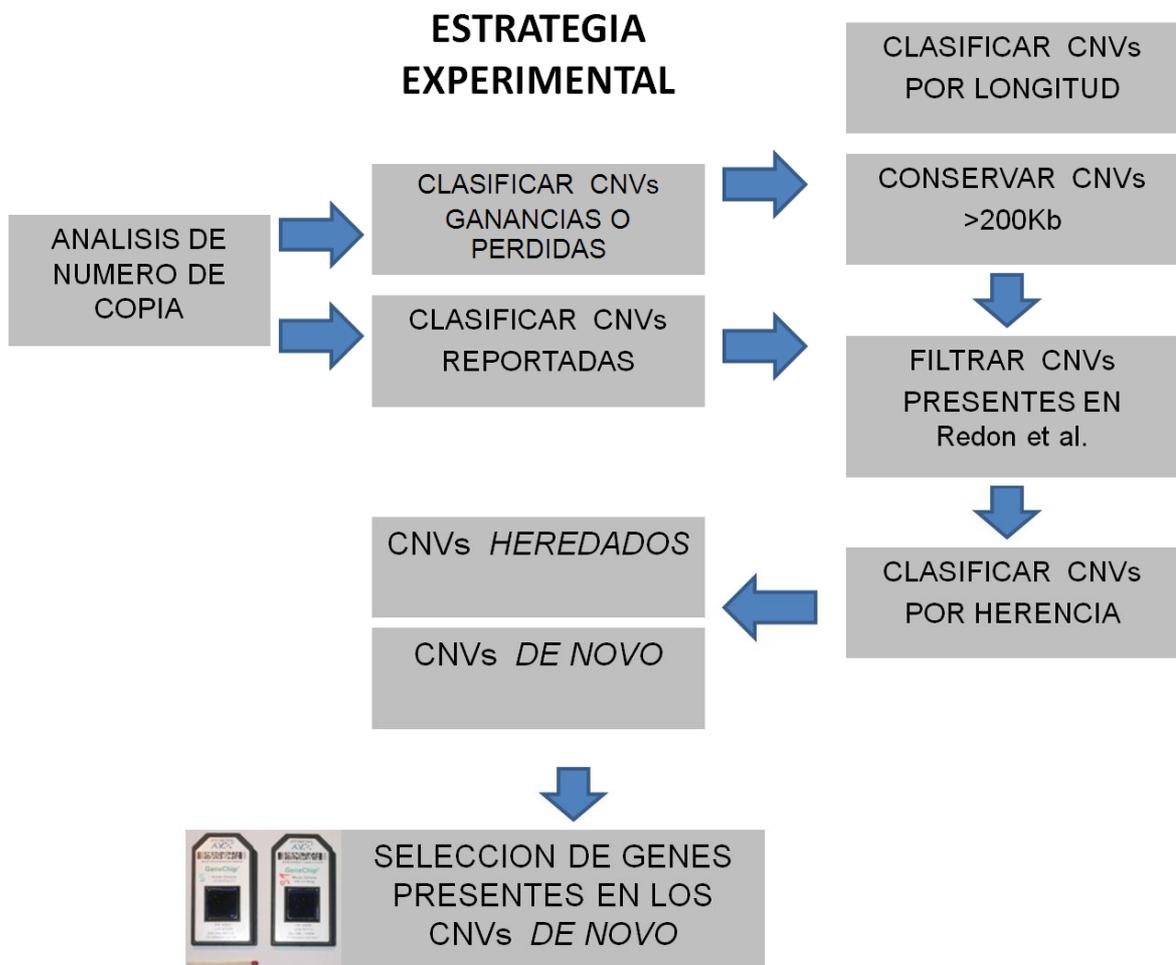


Figura 2. Estrategia experimental.

4.2. PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 12 casos de pacientes con Trastorno del espectro Autista y Retraso mental que provienen del Servicio de Genética del Hospital General de México.

Como controles fueron utilizados los padres de los pacientes, quienes son clínicamente sanos. A los casos y controles se les asignó un código que a continuación se muestra (Tabla 4).

Tabla 4. Código de identificación de casos y controles.

CASO	SEXO	CONTROL	CONTROL
		PADRE	MADRE
6.01	M	6.11	6.12
9.01	M		9.12
19.01	M	19.11	19.12
25.01	F		25.12
45A	M		45.12
45B	F		45.12
49.01	F	49.11	49.12
58A	M	58.11	58.12
58B	F	58.11	58.12
61.01	M		61.12
64.01	M	64.11	64.12
77.01	M	77.11	77.12

Tabla 5. Total de casos y controles divididos

SEXO	#	CONTROLES	CONTROLES	INDIVIDUOS
FEMENINO	4		MADRES	
MASCULINO	8	PADRES		
CASOS	12	6	10	28

4.3. MUESTRAS

Se extrajo DNA a partir de sangre periférica de pacientes de la clínica de retraso mental del Hospital General de México, con el kit de extracción de DNA Versagene DNA Purification Kit (Gentra, MN, USA). El DNA genómico inicial debe ser de doble hebra, libre de inhibidores, sin contaminantes y no degradado. La calidad del DNA se analizó por electroforesis y espectrofotometría Biophotometer (Eppendorf). Lecturas a 260 y 280 nm..

4.4. PLATAFORMA GeneChip 500K

El DNA obtenido de los pacientes se analizó mediante el uso de microarreglos de alta densidad Gene Chip 500K de Affymetrix (Figura 3), que contiene oligonucleótidos específicos que permite identificar SNPs distribuidos en el genoma a una distancia promedio inter-marcadores de 5.8 Kb, lo que representa el sondeo de más del 80% del genoma humano.



Figura 3. Arreglo Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array.

Para el procesamiento de la muestra se utilizó el kit GeneChip Affymetrix Mapping 250K Assay (Tabla 6).

Tabla 6. Reactivos necesarios Affymetrix Mapping 250K Assay Nsp I.

GeneChip Affymetrix Mapping 250K Assay

Adaptador	Dos oligonucleótidos específicos que se unen a los extremos cohesivos
Primer 002	Oligonucleótidos que reconocen el adaptador ligado a cada fragmento de DNA durante la PCR
DNA genómico de referencia 103	Control positivo de DNA humano
Reactivo de fragmentación	DNasa I para fragmentar los productos de PCR
Buffer de fragmentación 10x	Buffer utilizado en la reacción de fragmentación
Reactivo de marcaje de DNA	Marcaje de biotina para los amplicones.
Deoxinucleotidil transferasa terminal	Enzima utilizada para el marcaje
Buffer para la transferasa	Buffer para el marcaje
Reactivo Oligo control, 0100	Mezcla de 5 oligonucleótidos marcados que se hibridan a las regiones control de los arreglos

Cada arreglo utiliza una enzima de restricción diferente; un arreglo utiliza la enzima de restricción *NspI* con 262 000 SNPs, mientras que el de la enzima *StyI* solamente contiene 238 000 SNPs. En breve, se digieren 250ng de DNA genómico total con una de las enzimas y se liga a un adaptador que reconoce las 4 pares de bases de los extremos cohesivos. Para amplificar los fragmentos

de DNA, se uso un primer genérico que reconoce el adaptador. Mediante una PCR se amplificaron fragmentos de 250 a 1100pb, los cuales se cortaron con DNAsal para obtener fragmentos menores a 180pb. Posteriormente se marcaron e hibridaron en el chip. Por último se realizo una contratinción y se escanearon con un Scanner 3000 7G Affymetrix (Figura 4).

Posteriormente, se procedió al análisis de los resultados mediante el uso del Software especializado GCOS 1.4 (GeneChip Operating Software).

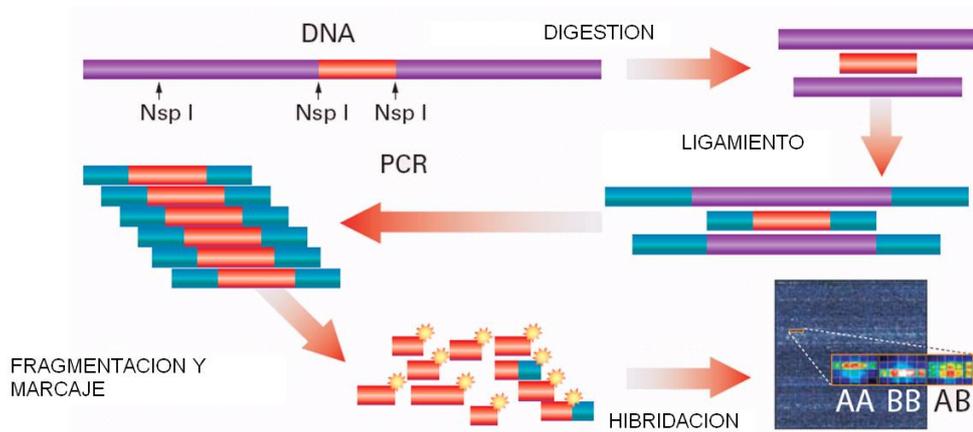


Figura 4. Esquema del procesamiento de los Microarreglos.

4.5. Procedimiento

4.5.1. Preparación del DNA

Se determino la concentración del DNA genómico y se diluyó con amortiguador (EDTA 0.1mM, Tris HCl 10 mM): a una concentración de 50ng/ μ l. En total se prepararon 15 μ l de DNA genómico (total 750ng).

4.5.2. Digestión

En el área de pre-PCR se digirieron 500ng de DNA genómico con una de las enzimas. Las concentraciones y condiciones utilizadas en la reacción se muestran a continuación (Tablas 7 y 8):

Tabla 7. Reactivos utilizados en la mezcla de digestión.

MEZCLA DE REACCIÓN	
Reactivo (stock)	Volumen (μ l)
Agua	19.5
NE Buffer2 (10x)	4
BSA(10x)	4
<i>NspI</i> (10U/ μ l)	2
DNA	10
Volumen final	39.5

Tabla 8. Condiciones de temperatura y tiempo de Digestión.

PROGRAMA DE DIGESTIÓN	
Temperatura	Tiempo
37°C	120min
65°C	20min
4°C	hold

Para verificar que el DNA fue digerido, se corrió en un gel de agarosa al 1%, 2.0 μ l de DNA sin digerir (100ng) y 7.9 μ l de DNA digerido (100ng).

4.5.3. Ligamiento

Los extremos cohesivos de cada fragmento de DNA se ligaron a una secuencia corta que funciono como adaptador para el primer. Las concentraciones y condiciones de la reacción se muestran a continuación (Tablas 9 y 10):

Tabla 9. Reactivos para la mezcla de ligamiento.

MEZCLA DE REACCIÓN	
Reactivo (stock)	Volumen (μ l)
Adaptador NspI (50 mM)	0.75
Buffer T4 DNA ligasa (10X)	2.5
T4 DNA ligasa (400U/ml)	2.0
DNA digerido	19.75
Volumen final	25.00

Tabla 10. Condiciones de temperatura y tiempo de Ligamiento.

PROGRAMA DE LIGAMIENTO	
Temperatura	Tiempo
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	hold

Al terminar la reacción de ligamiento se diluyeron 25 μ l de DNA ligado con 75 μ l de agua fría ultradestilada.

4.5.4. PCR

Durante la reacción de PCR se utilizó un oligonucleótido común que se une al adaptador ligado a cada fragmento de DNA del paso anterior. Se realizaron 3 reacciones de 100µl cada una por cada muestra con el fin de obtener la cantidad necesaria de producto de PCR para la fragmentación (90µg) e hibridación. Se agregó una mezcla de PCR sin DNA, como control blanco con el fin de identificar posibles contaminaciones. Se preparó la mezcla en hielo con 90µl de mezcla de PCR y 10µl de DNA ligado (Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Reactivos utilizados en la mezcla de PCR.

MEZCLA DE REACCIÓN	VOLUMEN	
	(µl)	3X+bco (µl)
Reactivo (stock)	(µl)	3X+bco (µl)
Agua	39.5	158.0
TITANIUM Taq PCR Buffer (10X)	10	40.0
G-C melt (5M)	20	80.0
dNTP (2.5mM) mix	14	56.0
Primer 002 (100uM)	4.5	18.0
TITANIUM Taq DNA polimerasa (50X)	2	8.0
Reacción de ligamiento	10	-
Volumen final	100	360

Tabla 12. Programa de Amplificación (PCR).

PROGRAMA		
Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3 min
30	94°C	30 seg
	60°C	45 seg
	68°C	15 seg

1	68°C	7 min
	4°C	hold

Se realizó el programa de amplificación en las condiciones indicadas y posteriormente se corren 3µl de cada PCR en un gel de agarosa para observar productos de PCR de 250 a 1100pb.

4.5.5. Purificación de Productos de PCR

La purificación se realizó mediante el Clean-up Kit. Brevemente, se agregaron 8µl de EDTA 0.1M a cada reacción de PCR, se mezclaron las 3 reacciones y se colocaron en un solo pozo. A este pozo se le aplicó vacío a 600mbar hasta quedar completamente seco. Se llevaron a cabo 3 lavados con 50µl de agua grado biología molecular, aplicando 600mbar de vacío hasta secar. Se eluyó con 45µl de amortiguador RB y se agitó la placa durante 10 minutos a 1000 revoluciones por minuto para asegurar la elución y finalmente se transfirió la muestra a un tubo estéril para cuantificarla por espectrofotometría.

4.5.6. Fragmentación

Para lograr una hibridación más eficiente, esta reacción se realizó para obtener fragmentos menores a 180 pares de bases. El producto de PCR purificado se diluyó a una concentración de 90µg/45µl y se agregaron 5µl de amortiguador de fragmentación y 5µl de la siguiente mezcla de fragmentación conservada en hielo (Tablas 13 y 14):

Tabla 13. Reactivos utilizados en la mezcla de Fragmentación.

Mezcla de fragmentación	Volumen
Reactivo (stock)	2U/ μ l
Agua	52.5
Buffer de fragmentación 10X	6
Reactivo de fragmentación	1.5

Tabla 14. Programa para la Fragmentación.

PROGRAMA PARA FRAGMENTACIÓN	
Temperatura	Tiempo
37°C	35 min
95°C	15 min
4°C	Hold

Se incubó en las condiciones adecuadas, y como control de calidad se corrieron 3 μ l de la muestra fragmentada en un gel de agarosa al 2% para observar fragmentos menores a 180 pares de bases. Inmediatamente después se procedió al marcaje.

4.5.7. Marcaje

Los fragmentos obtenidos en la reacción anterior se marcaron agregando 19.5 μ l de la siguiente mezcla (Tablas 15 y 16).

Tabla 15. Reactivos utilizados en la mezcla de Marcaje.

Mezcla de reacción	Volumen
Reactivo stock	(μ l)
Buffer 5X TdT	14
Gene Chip DNA labeling reagent	2
TdT enzyme (30U/ μ l)	3.5
Volumen final	19.5

Tabla 16. Programa para el Marcaje.

PROGRAMA DE MARCAJE	
Temperatura	Tiempo
37°C	4 horas
95°C	15 min
4°C	hold

4.5.8. Hibridación

Se agregaron 190 μ l de la mezcla de hibridación a 70 μ l de la muestra marcada (Tabla 17).

Se incubaron a 95°C durante 10 min, se mantuvo a 49°C, luego se inyectaron 200 μ l al GeneChip 500K Affymetrix de la enzima correspondiente. Este último se incubo 18 horas a 40°C agitando a 60 rpm en el horno de hibridación (Figura 5).

Tabla 17. Reactivos utilizados en la mezcla de hibridación.

MEZCLA DE HIBRIDACIÓN	
Reactivo	1x (μ l)
MES (12X, 1.22M)	12
Denhart's sol (50X)	13
EDTA (0.5M)	3
HSDNA (10mg/ml)	3
OCR. 0100	2
Human Cot-1 DNA (1mg/ml)	3
Tween-20 (3%)	1
DMSO (100%)	13
TMACL	140
Volumen total	190



Figura 5. Horno de hibridación.

4.5.9. Lavado, Teñido y Escaneo

Al terminar el tiempo de hibridación se eliminó la mezcla de hibridación y se llenó el Gene Chip con 260 μ l de amortiguador de mantenimiento (Tabla 18).

Tabla 18. Reactivos utilizados en la mezcla de amortiguador de mantenimiento.

AMORTIGUADOR DE MANTENIMIENTO	
Reactivo	Volumen (ml)
Agua	73.1
Buffer MES 12X	8.3
NaCl 5M	18.5
Tween-20 10%	0.1
Volumen final	100ml

Se colocó el chip en la estación de fluidos GeneChip Fluidics Station 450 de Affymetrix, donde se llevaron a cabo lavados con las siguientes soluciones:

- Solución SAPE en la posición 1 de la estación de fluidos. 594 μ l de amortiguador de tinción + 6 μ l de estraptavidina-ficoeritrina (SAPE) = 600 μ l,
- Solución de anticuerpo biotinilado en la posición 2 de la estación de fluidos, 594 μ l de amortiguador de tinción + 6 μ l de anticuerpo biotinilado (0.5mg/ml), y por último,
- Amortiguador de mantenimiento 800 μ l en la posición 3 de la estación de fluidos (Figura 6). Por último se generaron las imágenes en el escáner (Figura 7).



Figura 6. Estación de fluidos Affymetrix.



Figura 7. Scanner 3000 7G Affymetrix.

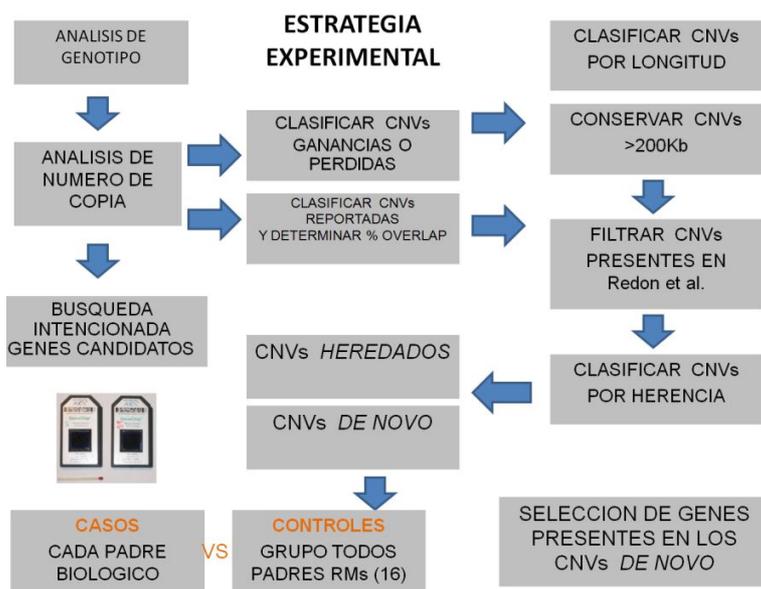
4.6. ANÁLISIS DE MICROARREGLOS

Se analizaron 12 casos y 18 controles con la plataforma Affymetrix y se exportaron los datos a una computadora con 24Gb de memoria RAM y se analizaron las pérdidas y ganancias genómicas con los programas p GCOS 1.4, GTYPE 4.1.0.26 y CNAT 4.0.

Para obtener el número de copia en los casos se utilizó a uno o dos padres biológicos dependiendo de la disponibilidad de muestra. En 5 de los 12 casos se utilizó solo la madre del caso como control y en los otros 7 casos se utilizaron a ambos padres como grupo control. Para obtener el número de copias de los 18 padres biológicos que fueron usados como controles previamente, fueron considerados como casos y analizados uno por uno usando a un grupo control específico formado por todos los otros padres biológicos, es decir 18-1 controles. Este batch de controles mexicanos sanos fue diferente para cada uno de los análisis, pero siempre usando 15 individuos tomados de los 6 padres y 10 madres disponibles (Tabla 5).

Una vez que se tuvo los datos de números de copias de los casos y los controles por separado, se procedió a clasificar los CNVs por longitud (<200Kb, >200Kb) y se eliminaron los <200Kb para reducir los falsos positivos, ya que la mayoría de estas son variantes polimórficas y consideradas benignas. En una segunda fase se retomaron las ganancias y pérdidas <200Kb y se subdividieron en regiones confirmadas por ambos microarreglos del set y aquellas detectadas por solo uno del par. Los cambios en el número de copia >200Kb se clasificaron en >500Kb y

>de 999Kb. Estos últimos se filtraron en reportados previamente y los no reportados en la literatura o bases de datos. Para ello se utilizó como criterio para ser eliminado >95% de solapamiento con un CNV ya reportado previamente y conservando los que no mapean dentro de estas regiones reportadas. Las alteraciones >200Kb fueron comparadas con la misma región en su madre o en ambos padres biológicos para considerarlas heredadas o *de novo*. Por último se mapeó las regiones *de novo* y los genes dentro de estas. Lo mismo se llevó a cabo utilizando 3 programas de análisis de número de copias para tomar en cuenta solo lo presente en 2 o más programas.





5. RESULTADOS

Se analizaron 12 casos y 18 controles con la plataforma Affymetrix y se exportaron los datos a una computadora con 24Gb de memoria RAM y procesador intel destinada al análisis con el programa GCOS 1.4. El genotipo se obtuvo usando GTYPE 4.1.0.26 y el análisis de número de copia con el programa CNAT 4.0 integrado en el GTYPE 4.1.0.26; además se utilizó GenotypeColour para visualizar los SNPs y CNVs ⁹⁶.

Se clasificaron las lesiones genómicas en ganancias y pérdidas obtenidas de acuerdo a su longitud basada en la posición física de el primer y último SNP para inicio y fin de la alteración genómica respectivamente.

Las diferentes clasificaciones incluyeron lesiones >200 de Kb, lesiones >500Kb y >999Kb. Todos los subgrupos por longitud de alteración genómica fueron subdivididos en CNVs previamente reportados en Redon et al.⁸³, y en CNVs no reportados. De los 163 CNVs encontrados, 117 (71%) fueron menores de 200Kb y se eliminaron para el posterior análisis. Solamente las regiones con ganancias o pérdidas >200Kb se tomaron en cuenta para su análisis detallado.

Se verificó la presencia de estas ganancias y pérdidas en los padres biológicos para confirmar o descartar la posibilidad de ser heredados. Todas las ganancias se encontraron presentes en los padres, lo que indica que no eran ganancias *de novo*. Cuatro de las pérdidas encontradas en pacientes no estuvieron presentes en los padres biológicos de esos 4 casos. Estas pérdidas se localizaron en 4p16.3, 3q23 y 18q21.33 indicando que no fueron heredadas.

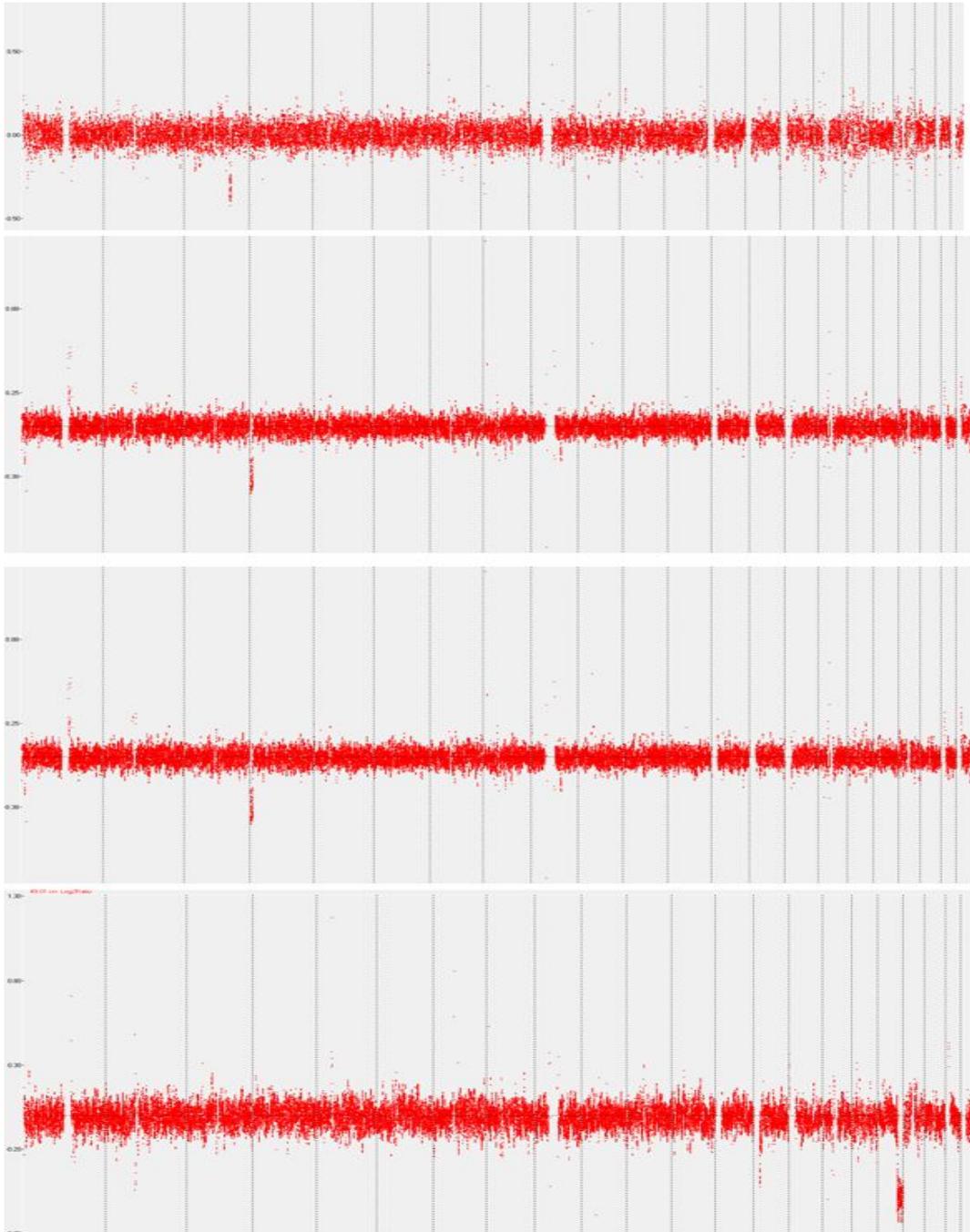


Figura 8. Deleciones *de novo* en 3q23, 4p16.3, y 18q21.33. En el eje de las Y se muestra el número de copias para 4 casos y en el eje de las X se muestra cada uno de los cromosomas iniciando por el 1 la izquierda y terminando por el 22 a la derecha.

A continuación se presentan los datos de pérdidas y ganancias encontrados en el genoma de pacientes con RM y TEA. Se encontraron 163 pérdidas y ganancias en total, siendo 46 las que fueron >200Kb, que corresponde a un 29%. Las pérdidas y ganancias <200Kb son 117, que corresponde a un 71% (Tabla 19).

Tabla 19. Regiones clasificadas por longitud. La mayoría de las regiones son de >1Kb y <200Kb.

EVENTO GENÓMICO	TAMAÑO	NO.	FRECUENCIA	%
PERDIDAS Y GANANCIAS	>200Kb	46	0.2822	29%
PERDIDAS Y GANANCIAS	<200Kb	117	0.7177	71%
PERDIDAS Y GANANCIAS	TOTAL	163	1	100%

Al analizarse las CNVs encontradas de acuerdo a la información sobre ellas, se observó que la mayoría de las CNVs >200Kb no estaban previamente reportadas como regiones que normalmente se encuentran con repeticiones o pérdidas en población general (Tabla 20).

Se encontraron regiones clasificadas por su status actual con respecto a si pertenecen a CNVs ya reportados y por lo tanto sin relevancia clínica o CNVs no reportados, los cuales son los que se considerarían como regiones candidatas

para patologías. La mayoría de las regiones <200Kb son reportadas como CNVs presentes normalmente en individuos sanos del HapMap este set de datos formado por 4 poblaciones de diferentes continentes Redon et al⁸³.

Tabla 20. Regiones clasificadas por status actual. La mayoría de las regiones >200Kb son no reportadas (NO CNVs).

PERDIDAS Y GANANCIAS		
>200Kb		
CNVs	CNVs NO	TOTAL
REPORTADAS	REPORTADAS	
30%	70%	100%

Por el contrario, con respecto a las CNVs encontradas correspondientes al tamaño de <200Kb, se observó que la mayoría ya están reportadas como regiones naturales de CNVs en población normal (Tabla 21).

Tabla 21. Regiones con pérdidas y ganancias <200Kb divididas en CNVs normales y CNVs no reportados.

PERDIDAS Y GANANCIAS		
<200Kb		
CNV	NO CNV	TOTAL
66%	34%	100%
77	40	117

Asimismo, las regiones pueden ser clasificadas de acuerdo a su longitud. La mayoría de las regiones reportadas como CNVs previamente reportadas de <200Kb fueron detectadas por ambos microarreglos del set de 500K de Affymetrix, mientras que 19 de las regiones fueron detectadas por un solo SNP en uno de los dos microarreglos del set (Tabla 22).

Tabla 22. CNVs previamente reportadas. La mayoría de las regiones < 200Kb son reportadas como CNVs en individuos sanos.

CNVs PREVIAMENTE REPORTADAS <200Kb		
PERDIDAS Y GANANCIAS		
CNV 1SNP	CNV<200	TOTAL
19	58	77

Con respecto a las regiones no reportadas como CNVs con anterioridad de <200Kb, la mayoría fueron detectadas por ambos microarreglos del set de 500K de Affymetrix, mientras que 7 de las regiones fueron detectadas por un solo SNP en uno de los dos microarreglos del set (Tabla 23).

Tabla 23. CNVs no reportadas previamente.

CNVs NO REPORTADAS <200Kb		
PERDIDAS Y GANANCIAS		
NO CNV 1SNP	NO CNV<200	TOTAL
7	33	40

El porcentaje de pérdidas y ganancias <200Kb es muy similar con 49.57% de ganancias. La mayoría de las regiones son previamente reportadas (77) (Tabla 24). En la Tabla 25 se puede observar un resumen de las pérdidas y ganancias genómicas totales y CNVs reportadas o no previamente.

Tabla 24. Información General de Pérdidas y Ganancias <200Kb reportadas y no reportadas previamente.

PERDIDAS Y GANANCIAS <200Kb			
	<u>NO CNVs</u>	<u>CNVs</u>	<u>TOTAL</u>
PÉRDIDAS	25	34	59
GANANCIAS	15	43	58
PÉRDIDAS Y GANANCIAS	40	77	117

Tabla 25. Información General de Pérdidas y Ganancias <200Kb.

EVENTO GENÓMICO	NÚMERO
PÉRDIDAS TOTALES	14
GANANCIAS TOTALES	32
PÉRDIDAS Y GANANCIAS TOTALES	46
PÉRDIDAS CNV	8
GANANCIAS CNV	24
PÉRDIDAS Y GANANCIAS CNV	32
PÉRDIDAS NO CNV	6
GANANCIAS NO CNV	8
PÉRDIDAS Y GANANCIAS NO CNV	14

Las regiones >200Kb obtenidas se clasificaron en ganancias o pérdidas de acuerdo a su longitud (Tabla 26) y en regiones por status actual, ya sea reportadas previamente (CNVs) o no reportadas (NO CNVs) (Tabla 27).

Tabla 26. Información de las Pérdidas y Ganancias Genómicas por su longitud.

PERDIDAS Y GANANCIAS >200Kb			
>999Kb.	>500Kb.	>200Kb.	TOTAL
12	9	25	46
>999Kb.NO CNV	>500Kb.NO CNV	>200Kb.NO CNV	NO CNVs
4	3	7	14
>999Kb CNV	>500Kb CNV	>200Kb CNV	CNVs
8	6	18	32

Tabla 27. Información General de Pérdidas y Ganancias >200Kb reportadas y no reportadas previamente.

PERDIDAS Y GANANCIAS >200Kb		
NO CNVs	CNVs	TOTAL
14	32	46
0.3043	0.6956	1.00
30%	70%	100%

Se decidió que el análisis se enfocaría en el estudio de las pérdidas y ganancias >200 Kb, debido a que este tipo de eventos genómicos son los que se han encontrado con una mayor significancia clínica. A continuación se expone la

organización de las regiones >200Kb que se encontraron reportadas en la literatura clasificadas por deleciones o duplicaciones. La mayoría de las regiones de esta longitud son duplicaciones (75%) (Tabla 28).

Tabla 28. Pérdidas y Ganancias >200 Kb Reportadas previamente.

PERDIDAS Y GANANCIAS REPORTADAS		
>200Kb		
PIERDE	GANANCIAS	TOTAL
8	24	32
0.25	0.75	1.00
25%	75%	100%

Las regiones >200Kb no reportadas previamente en la literatura se muestran en la Tabla 29 y se clasifican en deleciones o duplicaciones. También la mayoría de las estas regiones de esta longitud son duplicaciones (57%).

Tabla 29. Pérdidas y Ganancias >200 Kb No Reportadas previamente.

PERDIDAS Y GANANCIAS NO REPORTADAS		
>200Kb		
PIERDE	GANANCIAS	TOTAL
6	8	14
.4285	.5714	1.00
43%	57%	100%

A continuación se representan las regiones ganadas y perdidas no reportadas previamente >200Kb clasificadas por longitud de la región. El 50% de las regiones son mayores a 1Mb (Tabla 30).

Tabla 30. Ganancias Y Pérdidas >200Kb no reportadas.

EVENTO	LONGITUD			
	>999Kb	>500Kb	>200Kb	TOTAL
GANANCIAS >200Kb	1	2	5	8
PERDIDAS >200Kb	3	1	2	6

En las siguientes tablas se presenta la información general de algunas ganancias (Tabla 31) o pérdidas (Tabla 32) >200 Kb como: El código del paciente afectado, longitud, locus, posición de inicio y término y número de copias.

Tabla 31. Regiones >200Kb con incremento en el número de copias.

GANANCIAS>200Kb							
CASO	CROMOSOMA	LONGITUD	CATEGORIA	POSICIÓN DE INICIO	POSICION DE TÉRMINO	COPIAS	CITOBANDA
25.01	2	312 775	>200Kb.NCNV	61 742 206	62 054 981	3	p15
25.01	7	217 335	>200Kb.NCNV	91 545 857	91 763 192	3	q21.2
58.01B.	5	977 951	>500Kb.NCNV	44 797 873	45 775 824	3	p12
58.01A.	5	262 902	>200Kb.NCNV	44 872 313	45 135 215	3	p12
9.01	5	208 471	>200Kb.NCNV	46 210 621	46 419 092	3	p11
9.01	21	281 648	>200Kb.NCNV	22 615 409	22 897 057	3	q21.1
9.01	11	502 021	>500Kb.NCNV	46 421 970	46 923 991	3	p11.2
9.01	19	1 226 343	>999Kb.NCNV	41 212 605	42 438 948	3	q13.12

Tabla 32. Regiones >200Kb con disminución en el número de copias.

PERDIDAS >200Kb							
CASO	CROMOSOMA	LONGITUD	CATEGORIA	POSICION DE INICIO	POSICION DE TÉRMINO	COPIAS	CITOBANDA
49.01	18	18 026 905	>999Kb.NCNV	58 088 649	76 115 554	1	q21-q23
58B	4	6 411 745	>999Kb.NCNV	190 631	6 602 376	1	p16.3-p16.1
58A	4	6 411 745	>999Kb.NCNV	190 631	6 602 376	1	p16.3-p16.1
58A	11	381 440	>200Kb.NCNV	64 379 445	64 760 885	1	q13.1
6.01	1	711 617	>500Kb.NCNV	141 510 591	142 222 208	1	q12
9.01	17	321 388	>200Kb.NCNV	7 032 374	7 353 762	1	p13.1
64.01	3	4 455 419	>999Kb. CNV	137 744 434	142 199 853	1	q22.3-q23

Después del análisis de las diferencias en las CNVs obtenidas en los casos en comparación con los padres y los controles, se encontraron 3 deleciones *de novo* claras en los pacientes. Estas son deleciones en 3q23, 4p16.3 y 18q21.33. Estas pérdidas genómicas son presentadas en las siguientes figuras obtenidas en los diferentes programas de procesamiento de la información como CNAT, IGB, USCS y GenotypeColour™.

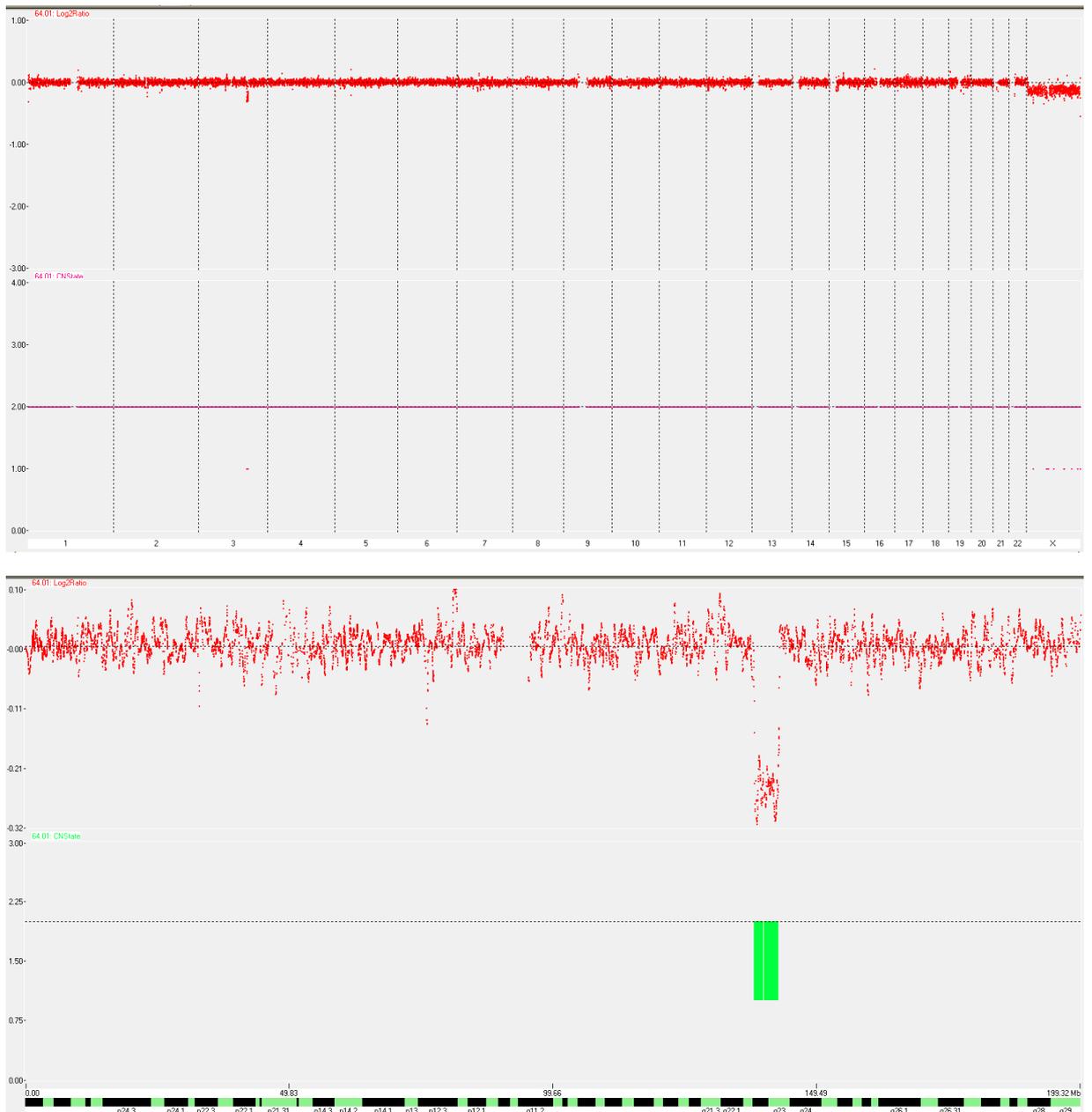


Figura 9. Delección intersticial *de novo* en 3q23. El programa CNAT muestra una visión global de todo el genoma (imagen superior), así como una vista detallada del cromosoma 3 (imagen inferior).

En el eje de las Y se muestra el número de copias y en el eje de las X se muestra cada uno de los cromosomas iniciando por el 1 la derecha y terminando por el X a la izquierda en la visión de todo el genoma y las citobandas del brazo corto y brazo largo del cromosoma 3 en la vista detallada.

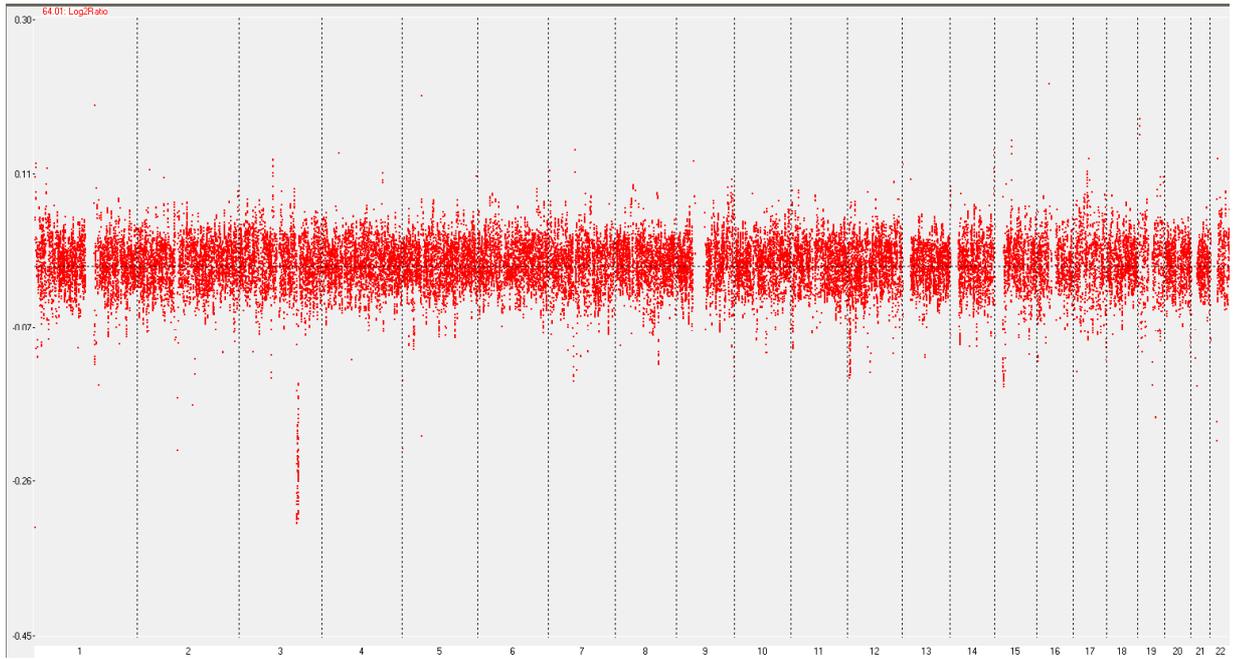


Figura 10. Delección intersticial *de novo* en 3q23. CNAT. Vista de todos los autosomas.

En el eje de las Y se muestra el número de copias y en el eje de las X se muestra cada uno de los cromosomas iniciando por el 1 la izquierda y terminando por el 22 a la derecha.

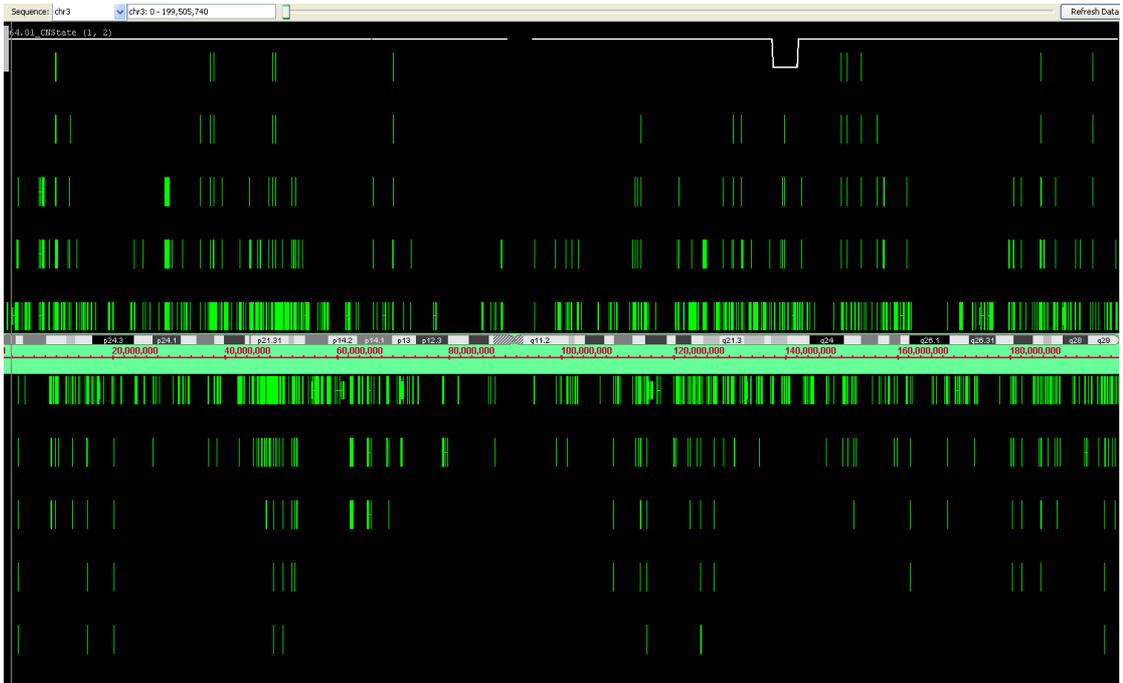


Figura 11. Delección intersticial *de novo* en 3q23. IGB. Mapa físico de todo el cromosoma 3 con número de copias en el eje de las X (línea blanca), citobandas en blanco, gris y negro con sus respectivos genes en verde.

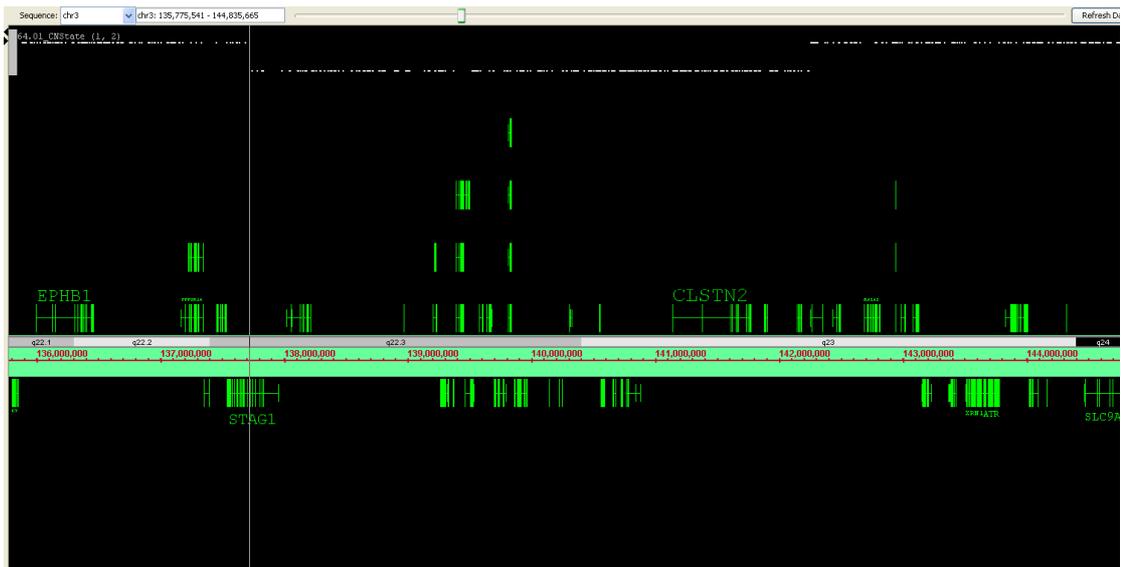


Figura 12. Delección intersticial *de novo* en 3q23. IGB. Mapa físico de la región deletada con número de copias en el eje de las X (línea blanca), citobandas en blanco, gris y negro con sus respectivos genes en verde.

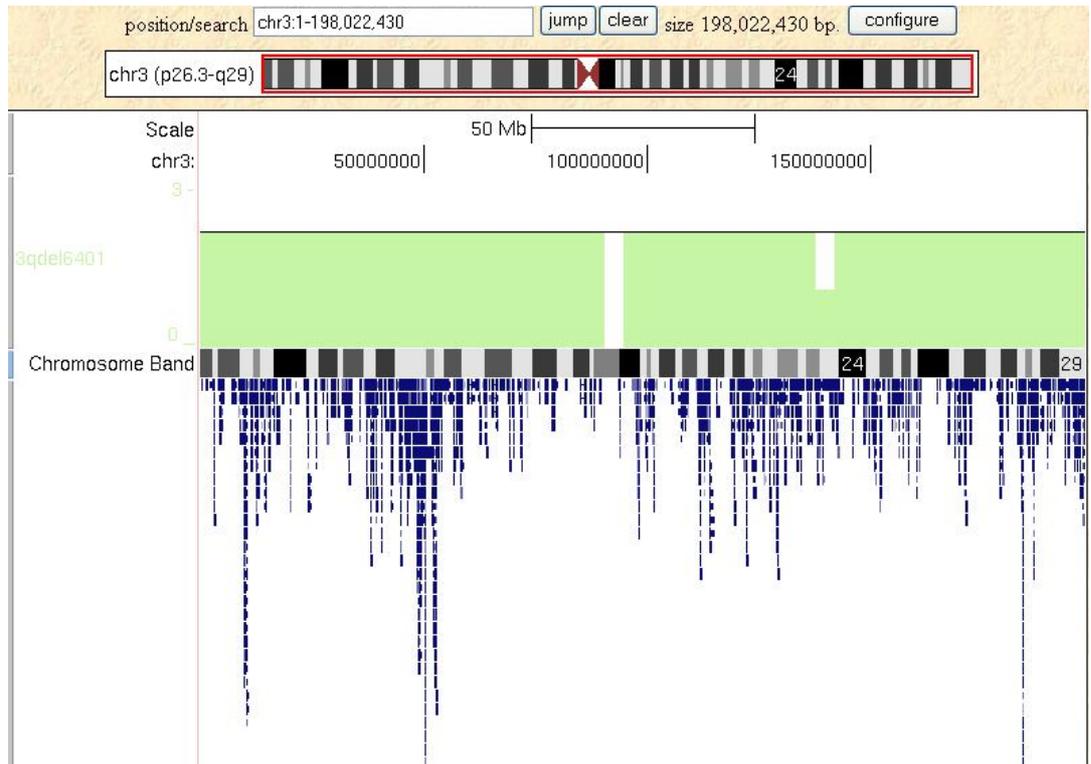


Figura 13. Deleción intersticial *de novo* en 3q23. UCSC. Mapa físico que muestra en verde a todo el cromosoma 3 con su brazo p a la izquierda y el brazo q a la derecha donde se puede ver claramente la deleción. En la parte inferior de la imagen se encuentran los genes en azul. Se puede ver que la región deletada tiene una alta densidad génica. En la parte superior se aprecia un cariograma del cromosoma 3 y la barra de escala es 50Mb.

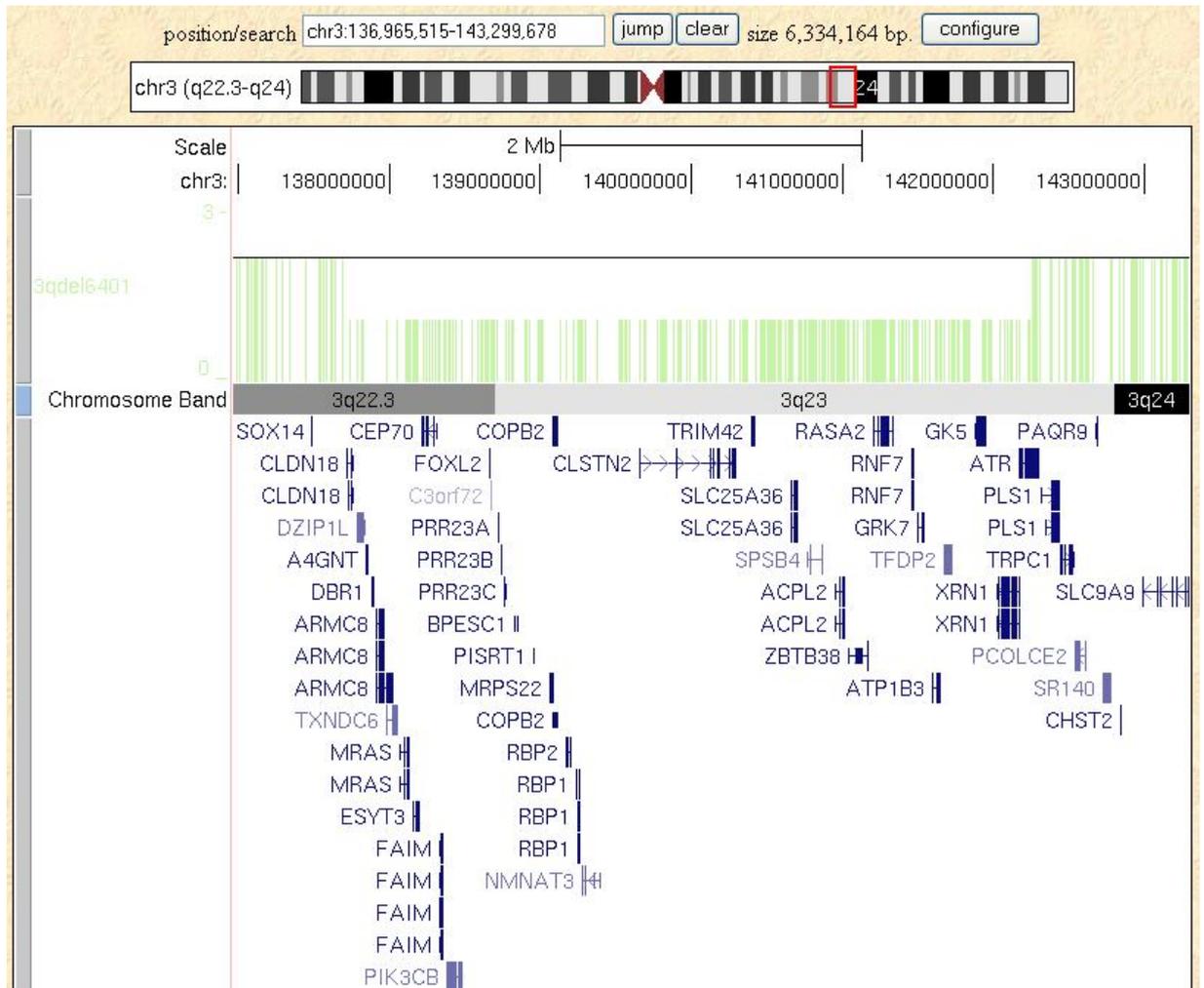


Figura 14. Deleción intersticial *de novo* en 3q23. UCSC. Mapa físico de parte del brazo largo que muestra en verde a una región de aproximadamente 6Mb. Se puede ver claramente la deleción de 4.45Mb. En la parte inferior de la imagen se encuentran 36 genes en azul. En la parte superior se aprecia un cariograma del cromosoma 3 y un rectángulo rojo que delimita la región vista en detalle. La barra de escala es 2Mb.



Figura 15. Delección *de novo* en 3q23. GenotypeColour™. La imagen superior muestra el genotipo del cromosoma 3 por colores y al mismo tiempo la altura de los rectángulos indica número de copias, siendo las líneas delgadas 1 copia y las gruesas 2 copias. La imagen de abajo elimina lo que corresponde a 2 copias y deja en color solo lo correspondiente a una copia.

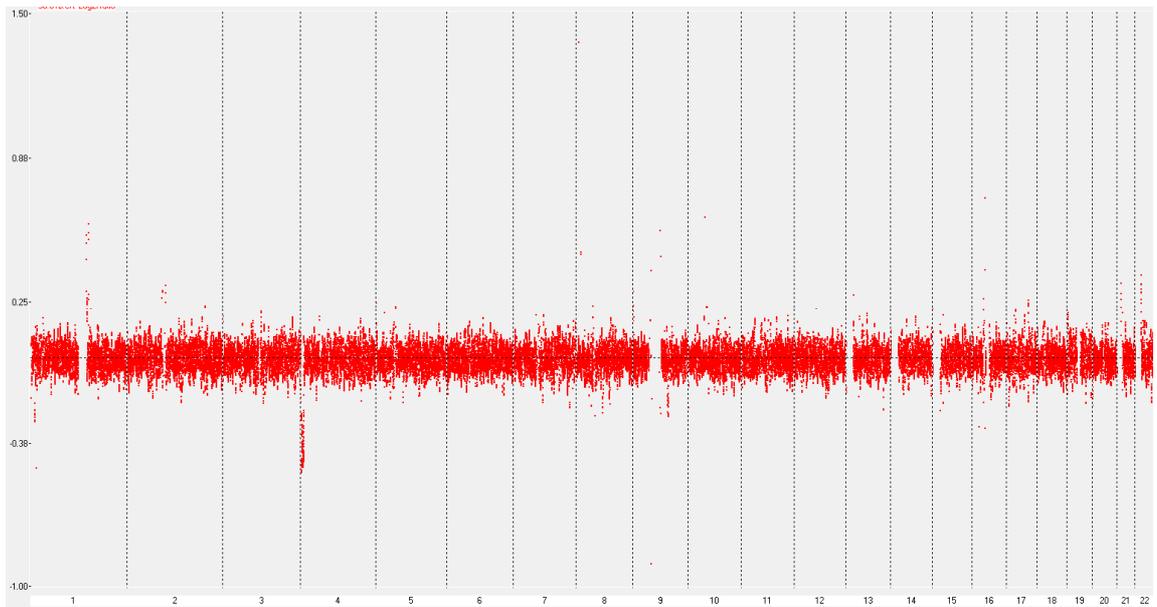


Figura 16. Delección *de novo* en 4p16.3, CNAT. Visión de todo el genoma con número de copias en el eje de las Y, mientras que cada uno de los cromosomas en el eje de las X.

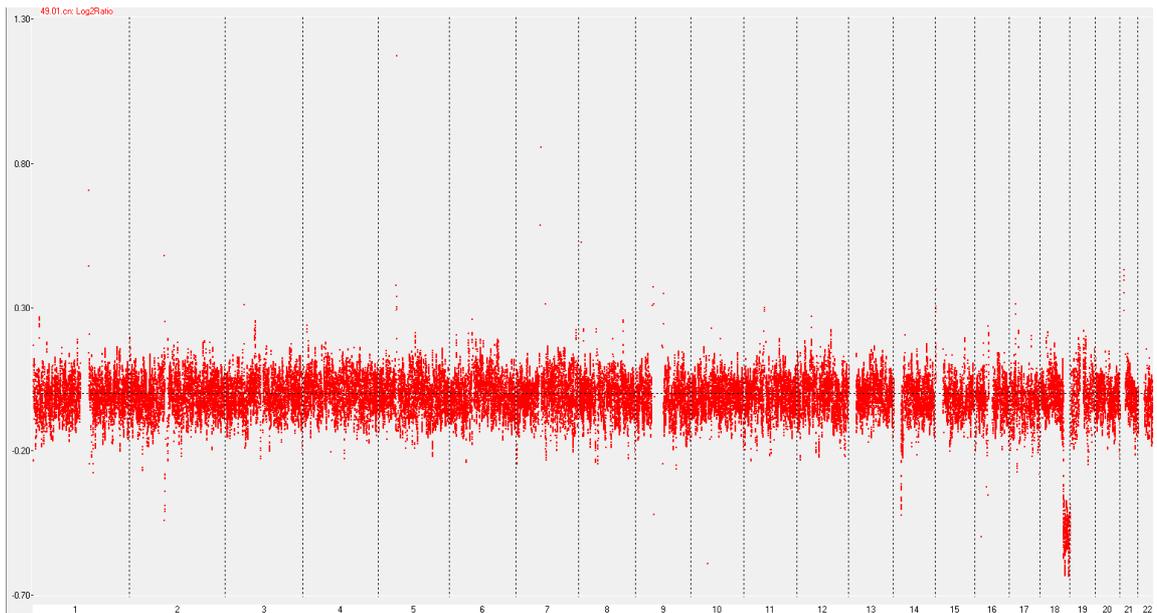


Figura 17. Delección terminal *de novo* en 18q21.33, CNAT. Visión de todo el genoma con número de copias en el eje de las Y, mientras que cada uno de los cromosomas en el eje de las X.

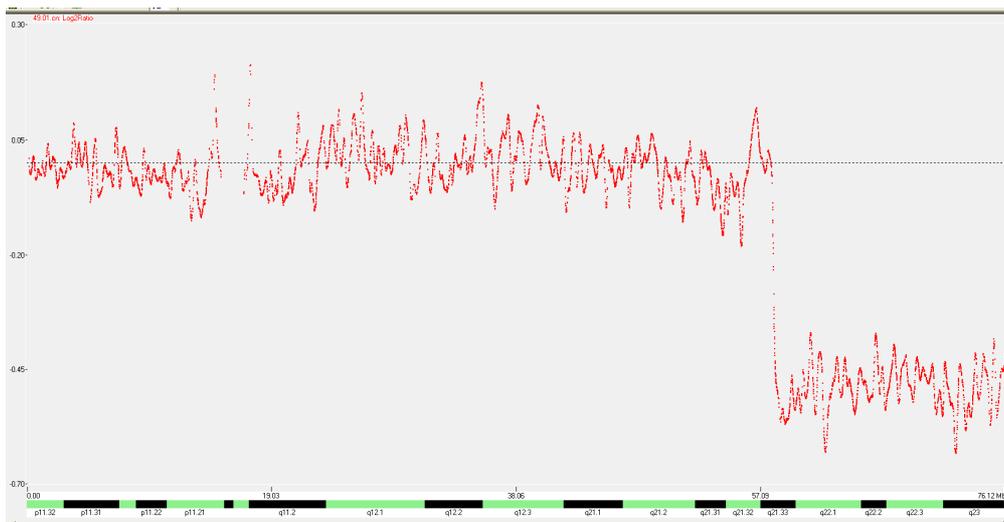


Figura 18. Delección terminal *de novo* en 18q21.33. CNAT. Visión detallada del cromosoma 3 con número de copias en el eje de las Y, mientras que las citobandas del brazo corto y brazo largo se muestran en el eje de las X. A la izquierda se observa una disminución en el número de copias en el extremo terminal del brazo largo.

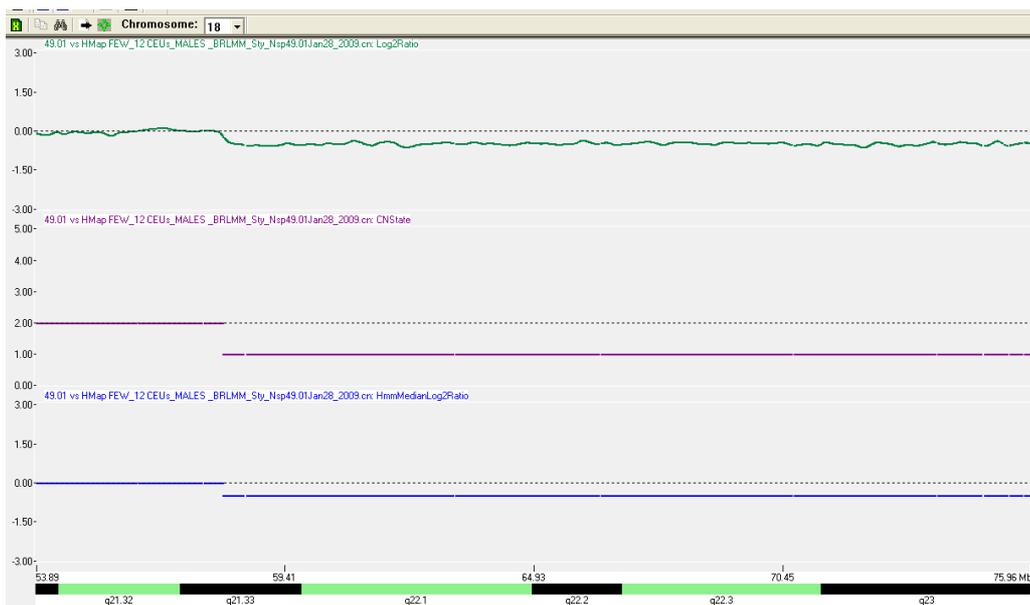


Figura 19. Delección terminal *de novo* en 18q21.33. CNAT. El mapeo físico permitió establecer el punto de ruptura y la longitud de la delección de 18Mb.

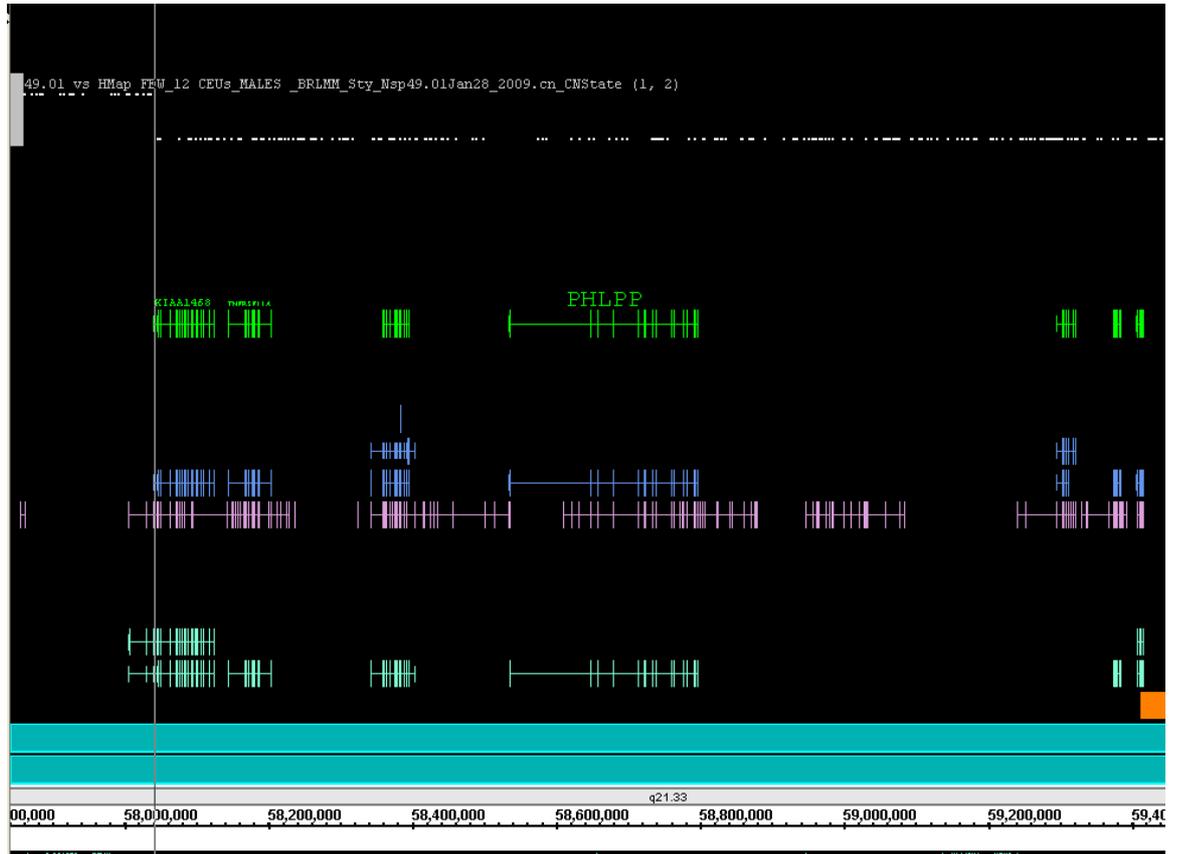


Figura 20. Delección terminal *de novo* en 18q21.33. IGB. Mapa físico de la región deletada con número de copias en el eje de las Y (línea blanca), citobandas en blanco, gris y negro en el eje de las X con sus respectivos genes en verde.

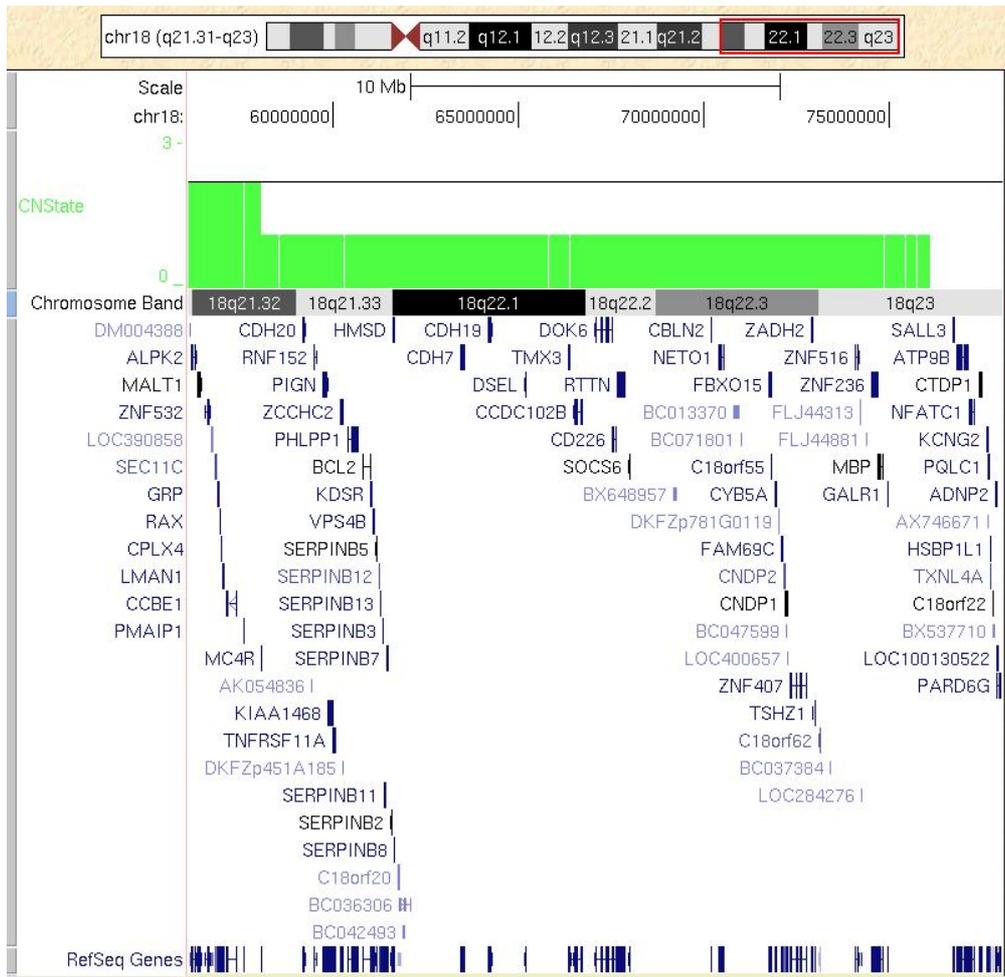


Figura 21. Delección terminal *de novo* en 18q21.33.UCSC. Mapa físico de parte del brazo largo que muestra en verde a una región de aproximadamente 20Mb. Se puede ver claramente la delección de 18Mb. En la parte inferior de la imagen se encuentran 116 genes en azul. En la parte superior se aprecia un cariograma del cromosoma 18 y un rectángulo rojo que delimita la región vista en detalle. La barra de escala es 10Mb.

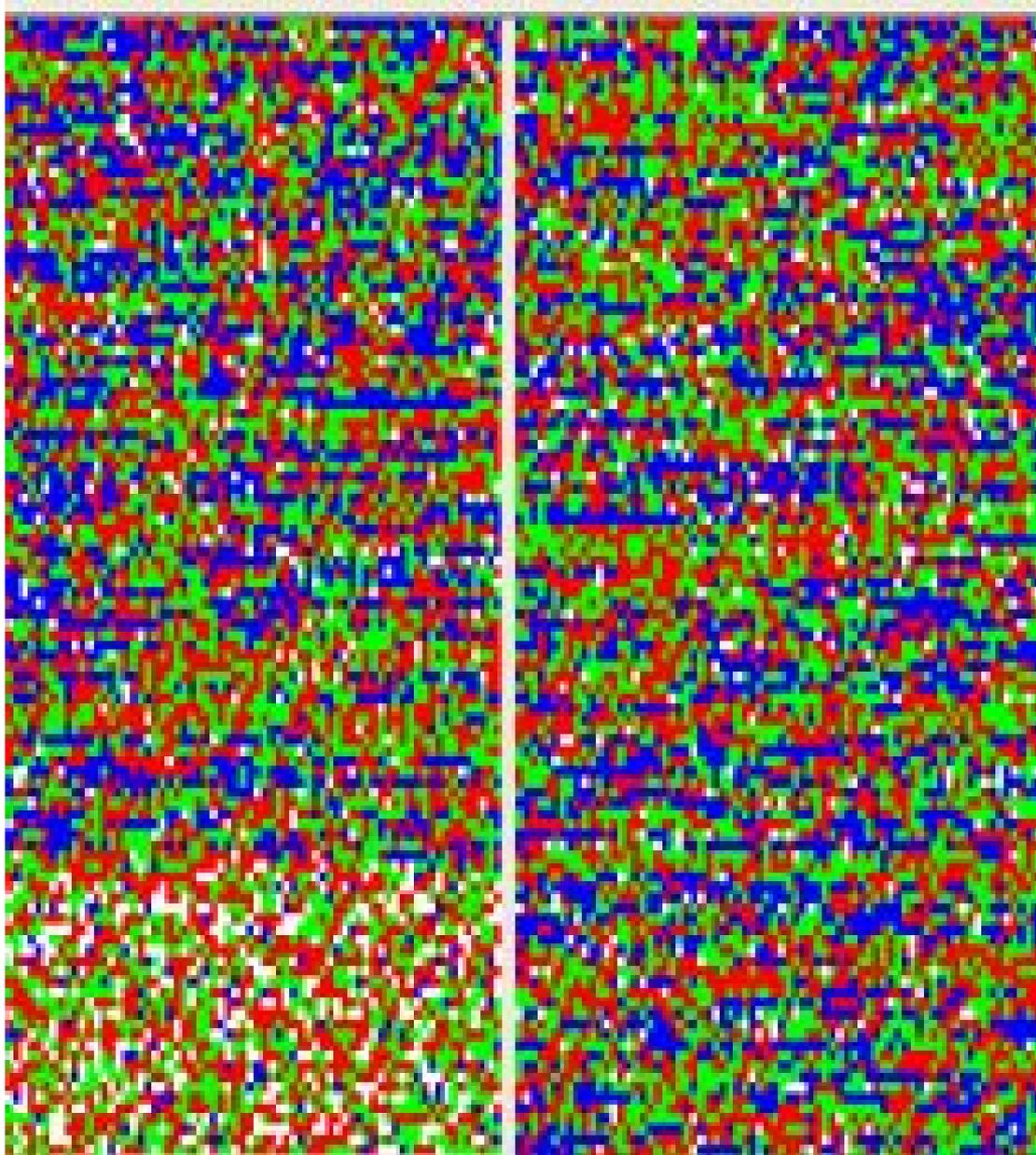


Figura 22. Deleción terminal *de novo* en 18q21.33. GenotypeColour™. A la derecha se muestra el genotipo y número de copias de un control y a la izquierda un caso con la parte inferior deletada.

6. DISCUSIÓN

La literatura reporta cambios submicroscópicos en el número de copias en pacientes con TEA, que por lo general son muy heterogéneos en su distribución. Esto último hace difícil predecir el tamaño o localización de los cambios en el número de copias causales de RM y TEA. Los diferentes estudios llevan a cabo su análisis de diferente manera, siendo el análisis de tríos solo una de las alternativas. Este análisis ofrece la ventaja de eliminar mucha de la variabilidad observada en análisis de casos y controles realizados con controles procesados en otros laboratorios o en otras poblaciones. Al intentar obtener el número de copias usando datos del HapMap se obtuvo demasiada variabilidad atribuible a la diversidad de este set de datos formado por 4 poblaciones de diferentes continentes, procesados en diferentes laboratorios y muestras provenientes de líneas celulares con alteraciones *in vitro* reportadas.

En el presente estudio se analizaron 12 casos y 18 controles con la plataforma Affymetrix y se realizó el análisis de la información obtenida por este procedimiento utilizando los programas GCOS 1.4, GTYPE 4.1.0.26 y CNAT 4.0. Se clasificaron las lesiones genómicas en ganancias y pérdidas obtenidas de acuerdo a su longitud basada en la posición física de el primer y último SNP para inicio y fin de la lesión genómica respectivamente. Las diferentes clasificaciones incluyeron lesiones >200 de Kb, lesiones >500Kb y >999Kb. Todos los subgrupos por longitud de lesión genómica fueron subdivididos en CNVs previamente reportados en Redon et al⁸³., y en CNVs no reportados. De los 163

CNVs encontrados, 117 (71%) fueron menores de 200Kb y se eliminaron para el posterior análisis. Solamente las regiones con ganancias o pérdidas >200Kb se tomaron en cuenta para análisis detallado. Se verificó la presencia de estas ganancias y pérdidas en los padres biológicos para confirmar o descartar la posibilidad de ser heredados. Todas las ganancias se encontraron presentes en los padres, lo que indica que no eran ganancias *de novo*. Cuatro de las pérdidas encontradas en pacientes no estuvieron presentes en los padres biológicos de esos 4 casos. Estas pérdidas se localizaron en 4p16.3, 3q23 y 18q21.33 indicando que no fueron heredadas. La región 4p16.3 ha sido reportada anteriormente en asociación al RM. El Síndrome de Wolf-Hirschhorn es causado por una deleción en 4p16. De hecho, la longitud de la deleción 4p se ha asociado a la severidad de las manifestaciones clínicas en los individuos. El fenotipo de este síndrome es extremadamente variable al igual que el tamaño de la deleción y los puntos de ruptura. El síndrome se caracteriza por microcefalia, puente nasal ancho, hipertelorismo y glabella prominente⁸⁷. Los casos afectados en este estudio muestran datos clínicos compatibles con el síndrome.

El síndrome De Grouchy se asocia a deleciones terminales o intersticiales de 18q con puntos de ruptura variables, aunque la banda 18q21.3 es la citobanda más frecuentemente involucrada. La frecuencia del síndrome se estima en 1/40000 recién nacidos vivos⁸⁸. El síndrome se caracteriza por anomalías en genitales, retraso en el crecimiento y dismorfismo facial. El síndrome se asocia frecuentemente a cardiopatías congénitas y trastornos neurológicos como trastornos del movimiento y del tono muscular (MIM # 601808)⁸⁹. El caso

afectado en este estudio muestra una delección de 18q con punto de ruptura en q21.33 y tiene datos clínicos compatibles con el síndrome.

El caso con delección intersticial de 3q23 perdió 4.55Mb y su punto de ruptura proximal se encuentra en 3q22.3 y el distal en 3q23. Esta región contiene al gen *FOXL2* y se ha asociado a malformaciones oculares^{90,91}.

El caso en este estudio muestra disminución de la apertura palpebral y el fenotipo es compatible con la pérdida de este gen. Cabe destacar que hay una región variable en número de copia documentada por Redon et al⁸³, en 3q23 que va de la posición física 141 408 454 hasta 142 007 420. Lo anterior indica que hay un solapamiento de 192 433 pares de bases entre la región deletada en nuestro paciente 64.01 y el CNV registrado por Redon et al.⁸³ en población caucásica. Pronto se contara en México con datos genómicos del INMEGEN acerca de las CNVs en Mestizos y Amerindios lo que permitirá discriminar con mayor precisión los CNVs benignos de los patológicos⁹². En China, Korea y África se están llevando a cabo estudios acerca de la variación poblacional en regiones variables en número de copia para poder completar un mapa global de CNVs^{93, 94, 95}.

Este es el primer estudio de CNVs realizado en México y por primera vez en nuestro país se reportan delecciones con un tamaño menor al límite de resolución del microscopio óptico con puntos de ruptura caracterizadas por microarreglos de alta densidad y se contribuye a contar con un catalogo completo de CNVs en nuestra población.

7. CONCLUSIONES

- Se encontraron 163 regiones con variación en el número de copias subclasificaron las lesiones genómicas en ganancias y pérdidas obtenidas de acuerdo a su longitud en: >200 de Kb, lesiones >500Kb y >999Kb.
- Todos los subgrupos por longitud de alteración genómica fueron subdivididos en CNVs previamente reportados por Redon et al., y en CNVs no reportados.
- De los 163 CNVs encontrados, 117 (71%) fueron menores de 200Kb y se eliminaron para el posterior análisis.
- Las regiones con ganancias o pérdidas >200Kb se tomaron en cuenta para análisis detallado.
- Todas las ganancias encontradas estuvieron presentes también en los padres, lo que indica que no eran ganancias *de novo*.
- La mayoría de los cambios en el número de copia encontrados en este estudio fueron de una longitud menor a 200Kb (71%)
- Se analizaron las alteraciones genómicas >200Kb no reportadas, ya que éstas tienen mayor probabilidad de ser patológicas
- Se identificaron 14 alteraciones >200Kb de las cuales 10 fueron heredadas de los padres biológicos, y solo 4 de ellas fueron *de novo*.
- Las 4 pérdidas *de novo* se localizaron en 4p16.3 (6.4 Mb), 3q23 (4.45 Mb) y 18q21.33 (18.026 Mb).

- Es novedosa la descripción de la delección 3q23 asociada con RM y TEA, ya que ésta no ha sido reportada previamente en relación a estas patologías.
- Este es el primer estudio en nuestro país en el que se aborda el análisis genómico de pérdidas y ganancias asociadas al Retraso mental y al Trastorno del espectro autista.

8. PERSPECTIVAS.

- Continuar con el análisis de las alteraciones genómicas encontradas para determinar los genes perdidos con las delecciones.
- Determinar si los genes que se puedan haber perdido están involucrados con el fenotipo de RM y TEA.
- Se necesita ampliar el tamaño de la muestra para obtener datos acerca de la frecuencia de los CNVs patológicos y sobre todo contar con bases de datos actualizadas con datos de variación en número de copia en población sana en México. Esto facilitaría la discriminación de CNVs que solo son variantes polimórficas en población Mexicana de los CNVs patológicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntix WHE, Coulter DL, Craig EM, Reeve A, et al. Mental retardation: definition, classification and systems of supports. Washington: American Association of Mental Retardation, 1992.
2. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, et al. 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* 2003; 60: 367-80.
3. Organización Mundial de la Salud. ICD-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades/International Classification of Diseases, 10th revision) (<http://www3.who.int/icd/vol1htm2003/fr-irc.htm>)
4. Yeargin-Allsopp M, Murphy CC, Cordero J, Decoufle P, Hollowell JG. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10 years old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. *Dev Med Child Neurol* 1997; 39: 142-9.
5. Jelliffe-Pawlowski II, Shaw GM, Nelson V, Harris JA. (2003) Risk of mental retardation among children born with birth defects. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157:545-550.

6. Ulovec Z, Sosic Z, Skrinjaric I, Catovic A, Civljak M, Szirovicza I. (2004) Prevalence and significance of minor anomalies in children with impaired development. *Acta Paediatr* 93:836-840.
7. Magnemer A. (1995) Diagnostic yield of the Neurologic assessment of the developmentally delayed child. *J Pediatr* 127:193-199.
8. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Sherer W. (2008). Structural Variation of chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet* 82, 477-88.
9. Chelly J, Mandel JL. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 669-80.
10. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy Society. *Neurology.* 2003; 60: 367-80.
11. Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM Jr, Lalande M, Latt SA. Angelman and Prader-Will syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 1989; 32: 285-905.
12. Meng X, Lu X, Li Z, Green ED, Massa H, Trask BJ, et al. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and

identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet* 1998; 103: 590-9.

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

14. Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat* 2005; 25: 513-24.

15. Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet* 2002; 62: 423-32.

16. Ropers HH, Hamel BCJ. X-linked mental retardation. *Nat Rev* 2005; 6: 46-57.

17. Xiang F, Zhang Z, Clarke A, Joseluiz P, Sakkubai N, Sarojini B, et al. Chromosome mapping of Rett syndrome: a likely candidate region on the telomere of Xq. *J Med Genet* 1998; 35: 297-300.

18. Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, et al. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation. *Nat Genet* 2002; 30: 127-34.

19. Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, et al. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet* 2002; 30: 365-6

20. Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet* 2004; 36: 636-41.
21. Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14: 701-13.
22. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. New York: McGraw-Hill; 1995.
23. Coon H: Current perspectives on the genetic analysis of autism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006, 142(1):24-32.
24. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I: The genetics of autism. *Pediatrics* 2004, 113(5):e472-486.
25. Veenstra-Vanderweele J, Christian SL, Cook EH, Jr.: Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004, 5:379-405.
26. Folstein SE, Rosen-Sheidley B: Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2001, 2(12):943-955.
27. Lintas C, Persico M. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J. Med. Genet.* 2008, Jan;46(1):1-8.
28. Freitag CM: The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry* 2007, 12(1):2-22.

29. Medical Council Research: Review of autism research. 2001.
30. Chakrabarti S, Fombonne E: Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry* 2005, 162(6):1133-1141.
31. Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J *et al*: A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2003, 73(4):886-897.
32. Turner M, Barnby G, Bailey A: Genetic clues to the biological basis of autism. *Mol Med Today* 2000, 6(6):238-244.
33. Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L: Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 2006, 11(1):1, 18-28.
34. Gutknecht L: Full-genome scans with autistic disorder: a review. *Behav Genet* 2001, 31(1):113- 123.
35. Lauritsen M, Mors O, Mortensen PB, Ewald H: Infantile autism and associated autosomal chromosome abnormalities: a register-based study and a literature survey. *J Child Psychol Psychiatry* 1999, 40(3):335-345.
36. Gillberg C: Chromosomal disorders and autism. *J Autism Dev Disord* 1998, 28(5):415-425.

37. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC *et al*: Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* 2006, 43(11):843-849.
38. Rabionet R, Jaworski JM, Ashley-Koch AE, Martin ER, Sutcliffe JS, Haines JL, DeLong GR, Abramson RK, Wright HH, Cuccaro ML *et al*: Analysis of the autism chromosome 2 linkage region: GAD1 and other candidate genes. *Neurosci Lett* 2004, 372(3):209-214.
39. Hamilton SP, Woo JM, Carlson EJ, Ghanem N, Ekker M, Rubenstein JL: Analysis of four DLX homeobox genes in autistic probands. *BMC Genet* 2005, 6:52.
40. Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T: Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry* 2002, 7(3):302-310.
41. Conciatori M, Stodgell CJ, Hyman SL, O'Bara M, Militeri R, Bravaccio C, Trillo S, Montecchi F, Schneider C, Melmed R *et al*: Association between the HOXA1 A218G polymorphism and increased head circumference in patients with autism. *Biol Psychiatry* 2004, 55(4):413-419.

42. Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militerni R, Bravaccio C, Wassink TH, Schneider C, Melmed R, Trillo S *et al*: Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Mol Psychiatry* 2001, 6(2):150-159.
43. Bartlett CW, Goedken R, Vieland VJ: Effects of updating linkage evidence across subsets of data: reanalysis of the autism genetic resource exchange data set. *Am J Hum Genet* 2005, 76(4):688- 695.
44. McCauley JL, Li C, Jiang L, Olson LM, Crockett G, Gainer K, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS: Genome-wide and Ordered-Subset linkage analyses provide support for autism loci on 17q and 19p with evidence of phenotypic and interlocus genetic correlates. *BMC Med Genet* 2005, 6:1.
45. A genomewide screen for autism: strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q, and 16p. *Am J Hum Genet* 2001, 69(3):570-581.
46. Further characterization of the autism susceptibility locus AUTS1 on chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 2001, 10(9):973-982.
47. Philippe A, Martinez M, Guilloud-Bataille M, Gillberg C, Rastam M, Sponheim E, Coleman M, Zappella M, Aschauer H, Van Maldergem L *et al*: Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study. *Hum Mol Genet* 1999, 8(5):805-812.

48. Hogart A, Nagarajan RP, Patzel KA, Yasui DH, Lasalle JM: 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 2007
49. Talebizadeh Z, Lam DY, Theodoro MF, Bittel DC, Lushington GH, Butler MG: Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism. *J Med Genet* 2006, 43(5):e21.
50. Samaco RC, Nagarajan RP, Braunschweig D, LaSalle JM: Multiple pathways regulate MeCP2 expression in normal brain development and exhibit defects in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 2004, 13(6):629-639.
51. Tordjman S, Drapier D, Bonnot O, Gaignic R, Fortes S, Cohen D, Millet B, Laurent C, Roubertoux PL: Animal Models Relevant to Schizophrenia and Autism: Validity and Limitations. *Behav Genet* 2007, 37(1):61-78.
52. Modahl C, Green L, Fein D, Morris M, Waterhouse L, Feinstein C, Levin H: Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry* 1998, 43(4):270-277.
53. Insel TR, O'Brien DJ, Leckman JF: Oxytocin, vasopressin, and autism: is there a connection? *Biol Psychiatry* 1999, 45(2):145-157.
54. Winslow JT, Insel TR: The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides* 2002, 36(2-3):221-229.

55. Li H, Yamagata T, Mori M, Momoi MY: Absence of causative mutations and presence of autism-related allele in FOXP2 in Japanese autistic patients. *Brain Dev* 2005, 27(3):207-210.
56. Gong X, Jia M, Ruan Y, Shuang M, Liu J, Wu S, Guo Y, Yang J, Ling Y, Yang X *et al*: Association between the FOXP2 gene and autistic disorder in Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004, 127(1):113-116.
57. Bonora E, Bacchelli E, Levy ER, Blasi F, Marlow A, Monaco AP, Maestrini E: Mutation screening and imprinting analysis of four candidate genes for autism in the 7q32 region. *Mol Psychiatry* 2002, 7(3):289-301.
58. Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH: Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 2004, 9(5):474-484.
59. Wassink TH, Piven J, Vieland VJ, Huang J, Swiderski RE, Pietila J, Braun T, Beck G, Folstein SE, Haines JL *et al*: Evidence supporting WNT2 as an autism susceptibility gene. *Am J Med Genet* 2001, 105(5):406-413.
60. Lijam N, Paylor R, McDonald MP, Crawley JN, Deng CX, Herrup K, Stevens KE, Maccaferri G, McBain CJ, Sussman DJ *et al*: Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell* 1997, 90(5):895-905.

61. Fatemi SH, Stary JM, Halt AR, Realmuto GR: Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *J Autism Dev Disord* 2001, 31(6):529-535.
62. Sadakata T, Kakegawa W, Mizoguchi A, Washida M, Katoh-Semba R, Shutoh F, Okamoto T, Nakashima H, Kimura K, Tanaka M *et al*: Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci* 2007, 27(10):2472-2482.
63. Anderson GM, Freedman DX, Cohen DJ, Volkmar FR, Hoder EL, McPhedran P, Minderaa RB, Hansen CR, Young JG: Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. *J Child Psychol Psychiatry* 1987, 28(6):885-900.
64. Beyer KS, Blasi F, Bacchelli E, Klauck SM, Maestrini E, Poustka A: Mutation analysis of the coding sequence of the MECP2 gene in infantile autism. *Hum Genet* 2002, 111(4-5):305-309.
65. Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA: Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 2003, 28(3):205-211.
66. Hettinger JA, Liu X, Holden JJ: The G22A Polymorphism of the ADA Gene and Susceptibility to Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord* 2007.

67. Li L, Ernstring B, Lohse D. (1997) A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J. Biol. Chem.* 272: 29403-29406.
68. Li D, Sun H. (1998) PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 15406-15411.
69. Bottini N, De Luca D, Saccucci P, Fiumara A, Elia M, Porfirio MC, Lucarelli P, Curatolo P: Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics* 2001, 3(2):111-113.
70. Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L *et al*: Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 2007, 39(3):319-328.
71. Bolton PF, Dennis NR, Browne CE, Thomas NS, Veltman MW, Thompson RJ, Jacobs P: The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet* 2001, 105(8):675-685.
72. Bolton PF, Veltman MW, Weisblatt E, Holmes JR, Thomas NS, Youngs SA, Thompson RJ, Roberts SE, Dennis NR, Browne CE *et al*: Chromosome 15q11-13 abnormalities and other medical conditions in individuals with autism spectrum disorders. *Psychiatr Genet* 2004, 14(3):131-137.

73. Cook EH, Jr., Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E: Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* 1997, 60(4):928-934.
74. Schroer RJ, Phelan MC, Michaelis RC, Crawford EC, Skinner SA, Cuccaro M, Simensen RJ, Bishop J, Skinner C, Fender D *et al*: Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *Am J Med Genet* 1998, 76(4):327-336.
75. Lukusa T, Vermeesch JR, Holvoet M, Fryns JP, Devriendt K: Deletion 2q37.3 and autism: molecular cytogenetic mapping of the candidate region for autistic disorder. *Genet Couns* 2004, 15(3):293-301.
76. Ghaziuddin M, Burmeister M: Deletion of chromosome 2q37 and autism: a distinct subtype? *J Autism Dev Disord* 1999, 29(3):259-263.
77. Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, Zaeem L, Basu S, Donnelly SL, Ravan SA, Powell CM, Qumsiyeh MB, Aylsworth AS *et al*: Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics* 1999, 61(3):227-236.
78. Milá-Racasens M, Rodríguez-Reventa Bodi L, Madrigal-Bajo I. Diagnosis of genetic mental retardation. Protocol of study. *Rev Neurol*. 2006; 42 Suppl1: S103-7.

79. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.
80. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(9): 2934-8.
81. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gry JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;(5083): 8818-21.
82. Jobling M.A., Hurles M.E, Tyler-Smith C. HUMAN EVOLUTIONARY GENETICS: Origins, Peoples & Disease. *Garland Science*. 2004.
83. Redon R, Ishikawa S, Fitch K.R. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006; 444:23 444-53.
84. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007. 316: 445-449.
85. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kretz C, Martens UM, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood*. 2007;109(3):1202-10.
86. Watson J.D, Caudy A.A, Myers R.M, Witkowski J.A. Recombinant DNA: GENES AND GENOMES. 3 Edition. *CSHL Press*. 2007.

87. Zollino M et al. On the nosology and pathogenesis of Wolf-Hirschhorn syndrome: genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2008
88. Online Mendelian Inheritance In Man, OMIM (TM). John Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number 601808. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
89. Nuijten I, Admiraal R, Van Buggenhout G, Cremers C, Frijns JP, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts C. Congenital aural atresia in 18q deletion or de Grouchy syndrome. *Otol Neurotol*. 2003; 24(6):900-6.
90. De Baere E. Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2004.
91. D'haene B, Nevado J, Pugeat M, Pierquin G, Lowry RB, Reardon W, et al. FOXL2 copy number changes in the molecular pathogenesis of BPES: unique cohort of 17 deletions. *Hum Mutat*. 2010 May;31(5):E1332-47.
92. Jimenez-Sanchez G, Zolezzi IS, Hidalgo A. Genomic medicine in Mexico: Initial steps and the road ahead. *Genome Res*. 2008 18:1191-1198.
93. Lin CH, Li LH, Ho SF, Chuang TP, Wu JY, Chen YT, Fann C. A large-scale survey of genetic copy number variations among Han Chinese residing in Taiwan. *BMC Genetics*. 2008 9; 92.

94. Kang TW, Jeon YJ, Jang E, Kim HJ, Kim JH, Park JL, Lee S, Kim YS, Kim SY. Copy number variations (CNVs) identified in Korean individuals. *BMC Genomics*. 2008, 9: 492.
95. McElroy JP, Nelson MR, Caillier SJ, Oksenberg JR. Copy number variation in African Americans. *BMC Genetics*. 2009, 10: 15.
96. Barlati S, Chiesa S, Magri C. GenotypeColour™ : colour visualization of SNPs and CNVs. *BMC Bioinformatics* 2009, 10: 49.