

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



Revisión sistemática y meta-análisis de la región cromosómica 22q13 y la implicación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B en el Síndrome Phelan-McDermid, el Trastorno del Espectro Autista y la epilepsia

Trabajo fin de grado en biotecnología

AUTOR: Pascual Villalba Bermell

TUTOR ACADÉMICO: Dra. M^a Adelaida García Gimeno

TUTOR: Dra. Bárbara Gómez-Taylor Corominas

Curso académico: 2016/2017

Valencia, 28 de julio de 2017



Título

Revisión sistemática y meta-análisis de la región cromosómica 22q13 y la implicación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B en el Síndrome Phelan-McDermid, el Trastorno del Espectro Autista y la epilepsia.

Resumen

Revisión sistemática y meta-análisis para valorar la evidencia científica publicada hasta la actualidad, reuniendo todos aquellos estudios de investigación científica sobre la implicación de una serie de genes (ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B) que se encuentran en la región terminal del brazo largo del cromosoma 22 (región cromosómica 22q13), en el Síndrome Phelan-McDermid (SPM), el Trastorno del Espectro Autista (TEA) y la epilepsia; y combinándolo con un análisis estadístico. El objetivo de este trabajo es identificar aquellos genes más relevantes de los aquí estudiados que pudieran justificar su incorporación en la implementación de nuevas estrategias terapéuticas de medicina personalizada como es la terapia génica. Con el propósito de minimizar la clínica y la sintomatología del SPM, TEA y epilepsia; así como, mejorar la calidad de vida de los pacientes y de forma indirecta también de sus familias y de la sociedad.

Palabras clave

Síndrome Phelan-McDermid, Trastorno del espectro Autista, epilepsia, ARSA, SHANK3, ACR, RABL2B, meta-análisis.

Autor: Pascual Villalba Bermell

Tutor Académico: Dra. M^a Adelaida García Gimeno

Tutor: Dra. Bárbara Gómez-Taylor Corominas

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2017

Title

Systematic review and meta-analysis of the chromosome region 22q13 and the implication of the genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B in the Phelan-McDermid Syndrome, Autism Spectrum Disorder and epilepsy.

Abstract

Systematic review and meta-analysis to estimate the scientific evidence published until nowadays, collecting all the scientific studies about the implication of several genes (ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B) which are found in the terminal end of the long arm of chromosome 22 (chromosome region 22q13), in the Phelan-McDermid Syndrome (PMS), Autism Spectrum Disorder (ASD) and epilepsy; and it is combined with a statistical analysis. The objective of this work is to identify those genes more relevant, here studied, which could justify their incorporation in the implementation of new therapeutic strategies of personalized medicine technologies as the gene therapy, with the purpose of reducing the clinic and symptomatology of PMS, ASD and epilepsy, as well as, improving on the patient quality of life and, indirectly the family and society quality of life.

Keywords

Phelan-McDermid Syndrome, Autism Spectrum Disorder, epilepsy, ARSA, SHANK3, ACR, RABL2B, meta-analysis.

Autor: Pascual Villalba Bermell

Academic tutor: Dra. M^a Adelaida García Gimeno

Tutor: Dra. Bárbara Gómez-Taylor Corominas

Date: Valencia, July 2017

Agradecimientos

A continuación, me gustaría agradecer el apoyo recibido durante estos años de carrera y/o durante la realización de este trabajo.

- En primer lugar, quiero dar las gracias a Rosa Valenzuela por darme la oportunidad de hacer el TFG en Innomedix, así como, a todo su equipo con el que me he sentido muy a gusto durante el tiempo que he estado con ellos.
- En especial, me gustaría agradecer a Bárbara su interés y su implicación en mi trabajo. Además me he sentido muy cómodo durante todos estos meses y he aprendido mucho.
- Creo que es muy importante resaltar la figura de la familia ya que ellos son los que ven todo el esfuerzo que hay detrás. Por tanto, agradezco a mis padres y a mi hermana la confianza depositada en mí y la paciencia que han tenido conmigo no solo estos 4 años sino desde que nací.
- No quiero olvidarme tampoco de mis compañeros de la universidad. De todos ellos me quedo con los buenos momentos que hemos pasado juntos tanto en la universidad como fuera.
- Aprovecho también para agradecer a mis amigos que no insistieran en que dejase el trabajo para salir.
- Por último, quiero recalcar la importancia de tener amigos como Alejandro. Para él solo tengo palabras de agradecimiento. Son más de 4 los años que hemos estado juntos y en ningún momento me ha fallado. Siempre ha confiado en mí, como yo en él y así va a continuar siendo siempre.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Enfermedades.....	2
1.1.1. Trastorno del Espectro Autista.....	2
1.1.2. Síndrome de Phelan-McDermid.....	4
1.1.3. Epilepsia.....	4
1.2. Genes.....	6
1.2.1. ARSA.....	6
1.2.2. SHANK3.....	7
1.2.3. ACR.....	7
1.2.4. RABL2B.....	8
1.3. Epigenética.....	8
1.4. Evolución de las tecnologías.....	9
1.5. Evolución de los tratamientos.....	10
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1. Criterios de inclusión.....	12
3.2. Criterios de exclusión.....	12
3.3. Términos de búsqueda.....	12
3.4. Frases de búsqueda.....	13
3.4.1. Búsqueda en <i>PubMed</i>	13
3.4.2. Búsqueda en <i>ScienceDirect</i>	14
3.5. Selección de estudios.....	14
3.6. Evaluación de la evidencia científica.....	15
3.7. Estadístico (prevalencia).....	17
3.8. Análisis de la relación del tamaño de la deleción del 22q13 con el fenotipo.....	17
3.9. Codificación de los estudios.....	17
4. Resultados	18
4.1. Resultados de la búsqueda.....	18
4.2. Evaluación de la evidencia científica.....	19
4.3. Prevalencia de las enfermedades asociadas a la deleción de genes concretos de la región 22q13.....	20
4.4. Análisis de la relación del tamaño de la deleción del 22q13 con el fenotipo.....	22
5. Discusión	25
5.1. Evaluación de la evidencia científica.....	25
5.2. Implicación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B, y otras posibilidades génicas de la región 22q13.....	27
6. Conclusiones	33
7. Bibliografía	34

Índice de tablas

Tabla 1. Posiciones cromosómicas que han sido identificadas en casos de TEA.....	3
Tabla 2. Esquema de los niveles de la evidencia científica propuesto por la AATM.....	16
Tabla 3. Porcentaje de artículos por nivel de evidencia científica.....	19

Índice de figuras

Figura 1. Cromosoma 22.....	6
Figura 2. Algoritmo de clasificación de los estudios analíticos.....	15
Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de selección de artículos.....	18
Figura 4. Porcentaje de artículos por nivel de evidencia científica.....	20
Figura 5. Número de publicaciones aceptadas en el cuarto cribado por año de publicación.....	26

Índice de abreviaturas

AATM:	Agència d'Avaluació de Tecnologia Mèdica
ACV:	Accidente Cerebrovascular
ADDM:	<i>Autism and Developmental Disabilities Monitoring</i>
ADI-R:	<i>Autism Diagnostic Interview-Revised</i>
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADOS-G:	<i>Autism Diagnostic Observation Schedule-G</i>
AMPAr:	Receptor del Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ARN:	Ácido Ribonucleico
ASD:	Autism Spectrum Disorder
ASDEU:	Trastornos del Espectro del Autismo en la Unión Europea
Bayley-III-NL:	<i>Bayley Scales of Infant and Toddler Development, third edition</i>
CIE-10:	Clasificación Internacional de Enfermedades
CIMA:	Centro de Investigación Médica Aplicada
DI:	Discapacidad Intelectual
DPII	<i>Developmental Profile II</i>
DSM-V:	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-fifth edition</i>
EAE:	Epilepsy Alliance Europe
ECA:	Ensayo Controlado Aleatorizado
Et al.:	y otros o y los demás (Abreviatura latina)
GKAP:	Proteína Asociada a la Guanilato-Quinasa
GTP:	Guanosín Trifosfato
HFIS:	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>
HGC:	Hibridación Genómica Comparada
IBE:	Buró Internacional para la Epilepsia

IGF-1:	Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1
ILAE:	Liga Internacional contra la Epilepsia
LDM:	Leucodistrofia Metacromática
LME:	Lesión de la Médula Espinal
mGluR5:	Receptor Metabotrópico de Glutamato tipo 5
miARNs:	microARNs
MLPA:	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS:	Secuenciación de Nueva Generación
NIH:	<i>National Institutes of Health</i>
NMDAr:	Receptores N-metil-D-aspartato
OMIM:	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PMS:	<i>Phelan-McDermid Syndrome</i>
PMSF:	<i>Phelan-McDermid Syndrome Foundation</i>
SEC:	Secuenciación del Exoma Completo
SGC:	Secuenciación de Genoma Completo
SIB-R:	<i>Scales of Independent Behaviour-R</i>
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Sistema Nervioso Periférico
TCE:	Traumatismo Craneoencefálico
TDAH:	Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad
TEA:	Trastorno del Espectro Autista

1. Introducción

Los trastornos neurológicos son un grupo muy variado de enfermedades que afectan al sistema nervioso tanto central (SNC; cerebro y medula espinal) como periférico (SNP; nervios que conectan el SNC a otras partes del cuerpo) (Said y Krarup, 2013; Han et al., 2014). El SNP a su vez está subdividido en dos partes: sistema nervioso somático y autónomo (sistema nervioso simpático, parasimpático y entérico) (Rao y Gershon, 2016). Los trastornos neurológicos se pueden clasificar en enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurotraumáticas, enfermedades neuropsiquiátricas, trastornos del neurodesarrollo... (Farooqui, 2012; Han et al., 2014; Farooqui y Farooqui, 2016). Aunque las enfermedades también pueden ser clasificadas en varias de las anteriores categorías, como por ejemplo el trastorno del espectro autista (TEA) considerado tanto una enfermedad neuropsiquiátrica como un trastorno del neurodesarrollo (Kleijer et al., 2014).

Las enfermedades neurodegenerativas afectan a la función neurológica y al comportamiento. Su mecanismo molecular no es totalmente conocido, pero es cada vez más evidente la asociación entre la acumulación de proteínas mal plegadas o defectuosas, la disfunción de los mecanismos de degradación de proteínas como es el proteasoma y la muerte progresiva de determinadas células nerviosas que provoca la pérdida neuronal característica de estos trastornos crónicos progresivos (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998; Gupta y Kulhara, 2010; Farooqui, 2010). En 2003, los trastornos neurodegenerativos se estimaban en unos pocos cientos, pero actualmente puede haber aumentado el número. Aun así, los más importantes siguen siendo el Alzheimer, el Parkinson y Huntington (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998; Przedborski et al., 2003).

Se consideran enfermedades neurotraumáticas comunes a los derrames cerebrales o accidentes cerebrovasculares (ACV), al traumatismo craneoencefálico (TCE) y a la lesión de la médula espinal (LME) (Farooqui, 2010). Hay dos subtipos de ACV: isquémico, provocado por una disminución del flujo de sangre hacia el cerebro lo que se traduce en una falta de oxígeno que provoca la muerte celular (infarto); y hemorrágico, provocado por alguna hemorragia intracerebral hipertensiva, ruptura de fístula arteriovenosa, ruptura de aneurisma... (Donnan et al., 2008; Farooqui, 2012; Longo et al., 2012). Según el *National Institutes of Health* (NIH), los síntomas de los ACV pueden ser problemas del habla o de su entendimiento, problemas de visión en un ojo, problemas de respiración, problemas al andar tanto de equilibrio como de coordinación, incapacidad de mover uno de los lados del cuerpo... Entre los jóvenes, la discapacidad es debida en muchas ocasiones a TCE y LME provocados por accidentes de vehículos como la moto o el coche. (Farooqui, 2012).

Según el *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edition* (DSM-V), los trastornos del neurodesarrollo son un grupo de alteraciones que tienen su origen en el periodo de desarrollo, lo que los diferencia a nivel temporal de las enfermedades neurodegenerativas que se inician en un periodo más tardío de la vida del individuo (Jongkamonwiwat y Noisa, 2013). Estos se caracterizan por presentar ciertos déficits, consecuencia de un desarrollo anormal del cerebro, como podrían ser discapacidad intelectual (DI), trastorno de la comunicación, TEA, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), trastorno específico del aprendizaje, trastornos motores y otros trastornos del neurodesarrollo que provocan limitaciones y dificultades en el ámbito personal, académico, social o en el funcionamiento ocupacional.

Además, cabe destacar la genética como una parte predominante de su etiología y en muchas ocasiones los han clasificado en dos grupos en función del conocimiento de esa causa. Por una parte, se encuentran los trastornos del neurodesarrollo asociados a determinados síndromes (Por ejemplo, Síndrome de Rett [MIM: 312750], Síndrome de Angelman [MIM: 105830] y Síndrome X frágil [MIM: 300624]) con una causa genética conocida como pueden ser mutaciones en un gen o anomalías citogenéticas afectando a una sección de cromosoma o al cromosoma entero (Veenstra-Vanderweele et al., 2004). A estos trastornos del neurodesarrollo se les denomina sindrómicos siempre que haya una relación etiológica entre el síndrome y el trastorno del neurodesarrollo, ya que puede no ser posible la determinación de un nexo causal entre ambos problemas y; siempre que la prevalencia estimada del trastorno del neurodesarrollo entre los pacientes que poseen el síndrome sea bastante superior a la prevalencia del mismo trastorno en la población general (Artigas et al., 2005). Por otra parte, hay casos que no están asociados a ningún síndrome y, no presentan una causa genética específica o concreta que pueda servir como marcador y que sea explicativa de su patología. A estos se les denomina trastornos del neurodesarrollo no sindrómicos o idiopáticos (Caglayan, 2010; Mitchell, 2015). Lo primero que se busca siempre es una etiología específica. Al ser idiopático, el trastorno del neurodesarrollo es el primero en ser diagnosticado y no de forma secundaria, como ocurre cuando está asociado a un síndrome con una causa concreta bien conocida.

1.1. Enfermedades

En este meta-análisis y revisión sistemática, se estudiaron tres enfermedades las cuales son consideradas trastornos del neurodesarrollo: el TEA, el Síndrome de Phelan-McDermid (SPM) y la Epilepsia.

1.1.1. Trastorno del Espectro Autista

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el TEA presenta una prevalencia de 1 cada 160 niños y empieza en la niñez con tendencia a continuar en la adolescencia y edad adulta. Parece ser que la prevalencia está aumentando a nivel mundial en parte debido a la aparición de nuevos criterios de diagnóstico como los propuestos por el DSM-V y herramientas de diagnóstico genético como la tecnología de microarray o las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS); además de, la mejor concienciación e información proporcionada. El DSM-V incluye como características principales del TEA: (a) los déficits en interacción y comunicación social y (b) la presencia de patrones repetitivos y restrictivos de comportamiento, intereses y actividades. Estos síntomas pueden variar en función de la edad o del nivel de desarrollo neurológico experimentado por el individuo.

La causa exacta de este trastorno no es conocida todavía aunque sí que se sabe de la importancia de la genética. Han sido identificados alrededor de 100 genes y desequilibrios genómicos asociados con el TEA; sin embargo, con la evolución experimentada en las tecnologías de detección durante los últimos años, se estima que ahora podrían haber alrededor

de 1000 genes contribuyendo al riesgo del TEA aunque muy pocos contribuirán a más del 1% de los casos (Durand et al., 2007; Betancur, 2011).

En la Tabla 1, se muestran una serie de posiciones cromosómicas de riesgo en la etiología genética del TEA. Esta tabla demuestra la gran cantidad y variedad de posiciones cromosómicas que pueden afectar a este trastorno; aunque puede haber aumentado el número de posiciones de riesgo, como ya se ha mencionado en el párrafo anterior.

Tabla 1. Posiciones cromosómicas que han sido identificadas en casos de TEA. Las posiciones se han extraído del estudio de Kumar y Christian (2009) que recopilaron la información de estudios genéticos de asociación y ligamiento, análisis de mutaciones de genes candidatos (re-secuenciación) y análisis citogenéticos.

Posición cromosómica				
1p36	5p13-p14	7q32	12q14.2	17q11
1p34.3	5p15	7q36	13q12.3	17q21
1p13.2	5q12	7q36.1	13q14	19p13
1q21-q44	6p21.32	8p23	14q23	19q12
1q42	6q14.3	9p24	15q11-q13	19q13.32
2p16	6q16.3	9q12	15q12	20p13
2q24	6q22.1	9q33-q34	15q22-q26	20q13.12
2q32.2	6q23	9q34.13	16p13.3	21q11
2q37	7p21	10p14-p15	16p13.3	22q11.2
3p25	7q11	10q11-q21	16p13.2	22q13.3
3p14	7q21.2-q36.2	10q23	16p13.13	Xp22.3
3q22	7q22	10q23.3-q26.3	16p12.1	Xq12
3q25-q27	7q22.3	11p12-p13	16p11.2	Xq13
3q27-q28	7q31	11q13.4	16q21	Xq21-q25
4q22-q25	7q31.1	11q13-q14	17p11.2	Xq27.2
4q35	7q31.2	12p13.33	17p12	Xq28

De todas las posiciones es importante recalcar la región 22q13.3, responsable del SPM (apartado 1.1.2).

Se ha demostrado que el medio ambiente influye en el TEA, como es el caso de la exposición prenatal al ácido valproico, el cual parece estar asociado a defectos de nacimiento, déficits cognitivos y mayor riesgo de autismo, interviniendo por tanto en el neurodesarrollo del individuo (Roullet et al., 2013). Todo ello corrobora que existen varias causas que pueden provocar la enfermedad, lo que hace que la gran mayoría de los casos de TEA sean idiopáticos al no poder identificar la causa exacta que está provocando la patología.

En un meta-análisis realizado con estudios de gemelos, se ha estimado que la heredabilidad del TEA oscila entre el 65-90% (Tick et al., 2015).

1.1.2. Síndrome de Phelan-McDermid

El SPM es conocido por varios nombres como síndrome de delección 22q13.3 o síndrome 22qter, entre otros. Se trata de un síndrome de genes contiguos que tiene lugar como consecuencia de la pérdida del extremo distal o región terminal del brazo largo del cromosoma 22 (Phelan y McDermid, 2012). Según la base de datos *Orphanet* (<http://www.orpha.net>), destinada a mejorar el conocimiento de las enfermedades raras, el SPM no presenta datos de prevalencia conocidos. Sin embargo, según la *Phelan-McDermid Syndrome Foundation* (PMSF) se han descrito alrededor de unos 1400 casos en todo el mundo; pero podría haber más ya que se trata de una enfermedad infra-diagnosticada (Phelan y McDermid, 2012).

Entre las manifestaciones que presentan los casos que padecen el SPM se encuentran: ataques, hipotonía neonatal, retraso global de desarrollo, ausencia o severo retraso del habla, comportamiento autístico, estrabismo además de otros problemas de la visión y la audición, disminución de la percepción del dolor, rasgos dismórficos leves sobretodo faciales, crecimiento normal o avanzado para su edad, pubertad precoz, movimientos bucales frecuentes, vómitos cíclicos, problemas gastrointestinales, reflujo gastroesofágico, problemas de hígado, problemas renales, disfagia de líquidos, linfedema, erupciones en la piel, TDAH y DI, entre otros (Wong et al., 1997; Bonaglia et al., 2001; Cusmano-Ozog et al., 2007; Phelan, 2008; Phelan y McDermid., 2012; Kolevzon et al., 2014a; Sarasua et al., 2014). Pero el que hayan sido descritos todos estos síntomas no quiere decir que un mismo individuo los vaya a padecer, existen otros factores que van a condicionar la expresión de su fenotipo como se comentará más adelante en el trabajo. Los que se enumeran en este estudio son una recopilación de manifestaciones que han sido descritas en varios casos y en la literatura científica publicada hasta la fecha.

Cabe destacar que la región crítica para esta enfermedad es la constituida por los genes SHANK3, ACR y RABL2B. En la mayoría de los casos (80-85%), la pérdida génica resulta de delecciones *de novo*, pero también existe una forma hereditaria. Además, aproximadamente en el 75% de los casos el cromosoma paterno es el que se encuentra afectado (Luciani et al., 2003).

Por lo que respecta a los trastornos del neurodesarrollo como puede ser la DI, entre los individuos diagnosticados con esta manifestación, se ha identificado la presencia de alteraciones subteloméricas donde la más común es la delección 1p36 seguida de la delección 22q13.3 (Ravnan et al., 2006). Esto demuestra la asociación de la DI con el SPM. Por otra parte, son varios los estudios que demuestran una asociación entre el SPM y el TEA. Sin embargo, los porcentajes de asociación varían mucho: 44%, 60% y 94% (Phelan et al., 2001; Jeffries et al., 2005; Dhar et al., 2010).

1.1.3. Epilepsia

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta tanto a hombres como mujeres independientemente de la edad y que no entiende de fronteras geográficas, sociales o raciales. En varios estudios, ha sido demostrada la contribución de ciertos factores del desarrollo, como los defectos postnatales en la maduración de los mecanismos neuronales y las malformaciones congénitas del cerebro, en la epileptogénesis dando lugar al concepto de la epilepsia como un trastorno del neurodesarrollo (Bozzi et al., 2012). Según la OMS, presenta una

prevalencia estimada de entre 4-10 cada 1000 individuos y una incidencia estimada de entre 30-50 cada 100000 individuos en la población general aunque estos ratios pueden aumentar en países menos desarrollados. Es padecida actualmente por alrededor de 50 millones de individuos en todo el mundo situándose como uno de los trastornos neurológicos más comunes a nivel mundial. La causa de la epilepsia puede ser adquirida (tumores cerebrales, traumas cerebrales, infecciones cerebrales...) o puede ser genética (conocida o desconocida) (Shorvon, 2011).

En 2005, la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) y el Buró Internacional para la Epilepsia (IBE) definieron los ataques epilépticos como *“la aparición transitoria de signos y/o síntomas debido a una anormal, excesiva y simultanea actividad neuronal en el cerebro”* y epilepsia como *“un trastorno cerebral caracterizado por una duradera predisposición a generar ataques epilépticos y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, fisiológicas y sociales de esta condición”* (Fisher et al., 2005). La aplicación a la práctica de esta definición es tener dos ataques no provocados con un tiempo de separación mayor de 24 horas. Sin embargo, hay circunstancias clínicas especiales que no reúnen el criterio de los dos ataques no provocados, así que la ILAE modificó la definición. En la nueva definición, se propuso que la epilepsia fuese considerada una enfermedad cerebral siempre que se cumpliera cualquiera de las siguientes situaciones: a) aparición de al menos dos ataques no provocados (o reflejos) con un tiempo de separación mayor de 24 horas, b) aparición de un ataque no provocado (o reflejo) y una probabilidad de tener nuevos ataques similar al riesgo de recurrencia general (al menos el 60%) tras tener dos ataques no provocados, el siguiente ataque tendrá que tener lugar alrededor de los próximos 10 años y c) cuando se diagnostica un síndrome epiléptico (Fisher et al., 2005; Fisher et al., 2014).

Durante los años son varias las clasificaciones de la epilepsia que se han establecido. En 1970, Gastaut (1970) dividió la epilepsia en dos categorías dependiendo del área cerebral afectada: ataques parciales (un hemisferio afectado) y ataques generalizados (ambos hemisferios afectados). En 1981, la ILAE añadió dos puntos dentro de los ataques parciales en función de la preservación de la conciencia: ataques parciales simples (preservan la conciencia) y ataques parciales complejos (no preservan la conciencia). Por último, en 1989 la ILAE dividió la epilepsia en tres categorías en función de la etiología: sintomática, idiopática y criptogénica. Además, actualmente la décima versión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) agrupa a la epilepsia en el capítulo VI correspondiente a enfermedades del sistema nervioso y dentro de este, en trastornos episódicos y paroxísticos incluyendo hasta 9 categorías distintas de la epilepsia.

Existe una relación etiológica entre la epilepsia y el TEA donde se han señalado genes involucrados en procesos biológicos como la regulación transcripcional (FOXG1, MECP2 y MEF2C); la proliferación y crecimiento celular (PTEN, TSC1 y TSC2); y el desarrollo, estabilidad y función sináptica (CASK, CDKL5, FMR1 y SHANK3) (Lee et al., 2015). Sin embargo, la prevalencia de la epilepsia entre niños que padecen alguno de estos trastornos del neurodesarrollo no está clara debido a la variación existente entre los datos publicados. Según datos recogidos por el *Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network* aproximadamente existe un 16% de coocurrencia entre epilepsia y TEA en niños (Levy et al., 2010). Pero en otros casos se ha descrito un mayor porcentaje, siendo el 20-25% de niños con TEA los diagnosticados de

epilepsia o incluso el 44% como se vio en el estudio de Jokiranta et al. (2013) (Woolfenden et al., 2012). Además, como es tres veces mayor el ratio de epilepsia en individuos con TEA y DI, que en aquellos que solo están diagnosticados de TEA, la presencia de DI en el diagnóstico constituye un factor de riesgo para epilepsia en el TEA (Amiet et al., 2008).

Existen varios síndromes genéticos en los cuales coocurren el TEA y la epilepsia. Algunos de ellos son: Síndrome de la duplicación 15q11q13, Síndrome de Down, SPM, Síndrome de Rett, Síndrome X frágil, complejo esclerosis tuberosa... (Lee et al., 2015). Entre estos, es importante recalcar la presencia del SPM con el que también se está trabajando en este meta-análisis.

1.2. Genes

Los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B están incluidos en la región 22q13.3 (más específicamente 22q13.33) localizada en la región 22q13 (Figura 1). Como ya se ha visto en el apartado 1.1, esta región cromosómica está de alguna manera relacionada con las enfermedades aquí estudiadas.

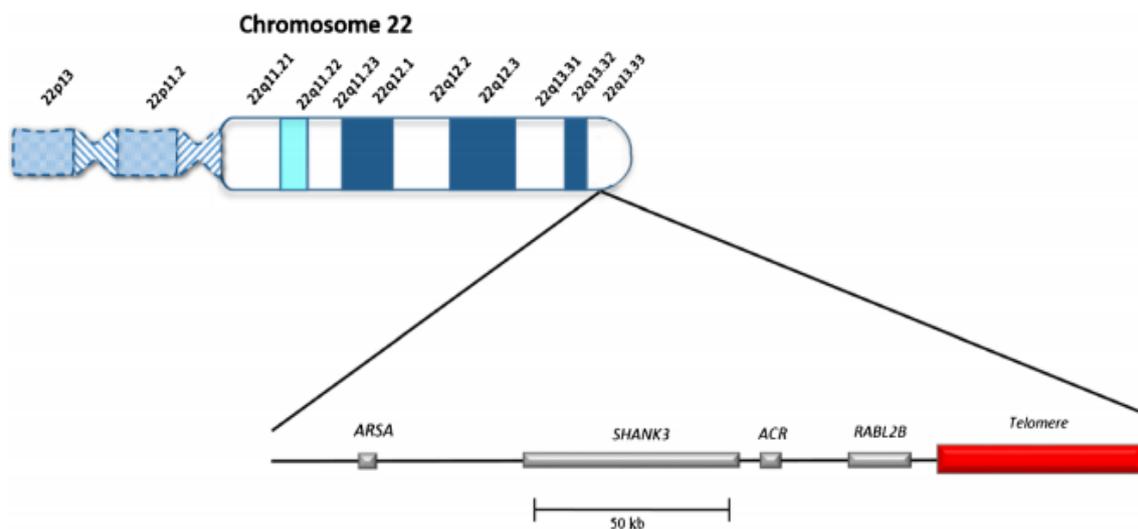


Figura 1: Cromosoma 22. En la parte superior de la figura, se muestra un esquema representativo del cromosoma 22, con determinadas regiones señaladas que van desde el 22p13 (p, brazo corto) hasta el 22q13.33 (q, brazo largo). En la parte inferior de la figura se muestra una ampliación de la región cromosómica 22q13.33 donde se localizan los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B, entre otros. Además, los genes nombrados aparecen representados sobre un eje horizontal con sus respectivos tamaños (Costales y Kolevzon, 2015).

1.2.1. ARSA

Según la base de datos *Entrez Gene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), ARSA (*Arylsulfatase A*) codifica para la enzima lisosomal arilsulfatasa A, la cual se encarga de hidrolizar el cerebrocido-3-sulfato (sulfátido) a

cerebrósido y sulfato inorgánico. La deficiencia completa o parcial de la actividad de esta enzima da lugar a una enfermedad de desmielinización progresiva tanto del SNC como del SNP, denominada Leucodistrofia Metacromática (LDM), al producirse una acumulación intralisosomal de sulfátidos que afecta especialmente a las células gliales y las neuronas (Stein et al., 1989). Aunque la deficiencia enzimática es sistémica, los síntomas de la enfermedad son predominantemente neurológicos al ser el sistema nervioso el principal afectado (Biffi et al., 2006).

A nivel genético, según la base de datos *Entrez Gene*, el gen ARSA presenta una longitud en el genoma de alrededor de 5.4 Kb y se organiza en 9 exones.

1.2.2. SHANK3

SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) o ProSAP2 (*Proline-rich synapse-associated protein 2*) codifica para una proteína de andamiaje multidominio localizada en las espinas dendríticas de las sinapsis excitatorias; donde es pensado que juega un papel importante en la organización de la densidad postsináptica, permitiendo la conexión de los receptores de la superficie de la membrana postsináptica con el citoesqueleto de actina y proteínas de señalización (Baron et al., 2006; Kreienkamp, 2008). Recientemente, Reim et al. (2017) han llevado a cabo un análisis proteómico de fracciones de la densidad postsináptica de dos regiones específicas del cerebro de ratones *wild type* y mutantes *Shank3 Δ 11^{-/-} Knockout* obteniendo unos resultados que demuestran la importancia de SHANK3 en la organización de la anatomía molecular de la densidad postsináptica y apuntando a una función de SHANK3 específica de la región cerebral.

Entre las funciones que se han demostrado de SHANK3, se encuentran: a) la regulación del reciclaje y la potenciación a largo plazo de los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Raynaud et al., 2013), b) la interacción con el canal de potasio dependiente de voltaje Kv β 2 en la densidad postsináptica (Proepper et al., 2014) y c) la regulación de la expresión del receptor metabotrópico de glutamato tipo 5 (mGluR5) (Verpelli et al., 2011). Por lo tanto, este gen está involucrado en la maduración de las extensiones especializadas de las neuronas, esenciales en la transmisión del impulso nervioso, llamadas espinas dendríticas; además de, en la formación de la sinapsis (Boeckers et al., 2002).

A nivel genético, según la base de datos *Entrez Gene*, el gen SHANK3 presenta una longitud de 58.6 Kb aproximadamente y está constituido por 22 exones. Mutaciones puntuales y deleciones de SHANK3 han sido identificadas en pacientes con TEA (Soorya et al., 2013). Y, deleciones y mutaciones puntuales de otros miembros de la familia SHANK como son SHANK1 y SHANK2, también han sido descritas en pacientes con TEA (Sato et al., 2012; Berkel et al., 2010).

1.2.3. ACR

ACR (*Acrosin*) codifica para una serin proteinasa (endoproteasa) con una especificidad de sustrato similar a la tripsina. Se localiza en la matriz acrosomal de espermatozoides maduros, en forma inactiva llamándose proacrosina (Baba et al., 1989; Klemm et al., 1991). El acrosoma

es un orgánulo situado en el extremo apical del espermatozoide, en la parte anterior del núcleo y almacena distintas enzimas hidrolíticas incluida la proacrosina (Adham et al., 1997). Cuando se produce la reacción acrosómica, la proacrosina se convierte en su forma activa acrosina y junto al resto de enzimas lisan la zona pelúcida del ovocito, proceso que es necesario para que se produzca la fertilización (Yamagata et al., 1998).

A nivel genético, según la base de datos *Entrez Gene*, el gen ACR presenta una longitud de 7.1Kb aproximadamente y se organiza en 5 exones.

1.2.4. RABL2B

RABL2B (*RAB-LIKE 2B*) forma parte de la familia de genes RAB, los cuales codifican para pequeñas proteínas de unión a guanósín trifosfato (GTP) involucradas en el control del transporte vesicular a través de la regulación de las rutas exocíticas y endocíticas de la célula; y además, muestran similitudes con la superfamilia Ras GTPasa (Wong et al., 1999).

A nivel genético, según la base de datos *Entrez Gene*, el gen RABL2B presenta una longitud de 16.2 Kb aproximadamente y se organiza en 12 exones.

1.3. Epigenética

Se entiende por epigenética al estudio de todos aquellos cambios producidos en la expresión génica que pueden ser heredados por la descendencia y no modifican la secuencia primaria de ácido desoxirribonucleico (ADN). Sin embargo, estos cambios epigenéticos no son estáticos y por tanto, pueden ser modificados. En este aspecto, existen evidencias de que el ambiente (factores físicos, químicos, nutricionales, psicosociales...) puede influir en la expresión génica a través de los mecanismos epigenéticos, dando lugar en ciertas ocasiones al desarrollo de enfermedades. Los mecanismos epigenéticos más estudiados son la metilación del ADN, la modificación de histonas (acetilación, fosforilación y metilación, entre otras) y la regulación por ácidos ribonucleicos (ARNs) no codificantes (Weinhold, 2006; Feil y Fraga, 2012).

La metilación del ADN, definida como la adición de un grupo metilo a los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG, puede que sea el mecanismo epigenético más importante y este ha sido relacionado con la región 22q13.33. Grafodatskaya et al. (2012), en una parte de su estudio, evaluaron la metilación del ADN de 6 sitios CpG del promotor del gen ARSA en 66 casos de TEA y en 70 controles. Tras el análisis de los datos de cada CpG, se describió un aumento significativo de la metilación del ADN en 2/6 sitios CpG, involucrando a 4 casos de TEA en uno de los sitios y en el otro a 5 casos de TEA. En un estudio llevado a cabo por Zhu et al. (2014), a través del análisis del gen SHANK3 en el tejido cerebral *post mortem* de 54 pacientes con TEA y 43 controles, encontraron un aumento significativo de la metilación de islas CpG intragénicas y una expresión alterada de isoformas específicas en aproximadamente un 15% de los pacientes con TEA.

El mecanismo de regulación de la expresión génica mediado por microARNs (miARNs) también ha sido objetivo de estudio. Choi et al. (2015) mostraron la regulación post-transcripcional de la expresión de SHANK3 por tres miARNs (miR-7, miR-34a y miR-504). Y

además, también mostraron que estos miARNs regulaban las espinas dendríticas neuronales de una manera dependiente de SHANK3. Por tanto, este estudio demuestra que la alteración del perfil de expresión de miARNs podría suponer el mecanismo patogénico de ciertos trastornos neuropsiquiátricos.

Por una parte, la etiología epigenética está más asentada en el TEA siendo varios los factores ambientales descritos que pueden repercutir en la patogénesis de esta enfermedad. Entre estos factores, se encuentran las hormonas y los factores nutricionales; el inapropiado cuidado de los niños como puede ser el abuso y la malnutrición por parte de padres que padecen algún problema psiquiátrico; y exposición prenatal al ácido valproico; entre muchos otros (Roberts et al., 2013; Roullet et al., 2013; Sealey et al., 2016). Por otra parte, la contribución de la epigenética en el caso del SPM no se ha asentado todavía. Algunos artículos la mencionan como una de las causas, basándose en los estudios realizados con pacientes diagnosticados de TEA o estudios realizados en animales y cultivos celulares sobre la regulación de SHANK3 (Choi et al., 2015). Esta conclusión se ha generado debido a la elevada asociación entre el SPM y el TEA, así como, a la consideración de SHANK3 como el principal causante de la patología neurológica del síndrome. Por último, la etiología epigenética sí que ha sido estudiada y documentada en la epilepsia (Weinhold, 2006; Qureshi y Mehler, 2010; Fontes et al., 2015).

1.4. Evolución de las tecnologías

Sin duda, hay que destacar la importancia de la evolución de la tecnología en la elucidación de las bases genéticas de muchas enfermedades.

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico y para la investigación de las enfermedades, se pueden dividir en tres grupos: citogenética convencional, citogenética molecular y genética molecular (Durmaz et al., 2015).

En la citogenética convencional destaca el cariotipado realizado mediante la técnica de bandeado G. Esta técnica permite detectar reordenamientos cromosómicos microscópicos como pueden ser grandes deleciones y translocaciones, y cromosomas en anillo, entre otros; los cuales han sido descritos en la región 22q13.3 (Luciani et al., 2003; Phelan y McDermid, 2012; Soorya et al., 2013). Sin embargo, la baja resolución (5-10 Mb) que presenta hace que anomalías cromosómicas más pequeñas no sea posible detectarlas (Faas et al., 2008). Entonces, aparecieron técnicas con mayor resolución como las técnicas de citogenética molecular y las primeras técnicas de genética molecular, permitiendo la detección de esas anomalías cromosómicas más pequeñas. Para la detección de deleciones submicroscópicas descritas también en la región 22q13.3, son útiles las tecnologías de microarray como la hibridación genómica comparada (HGC) y los análisis dirigidos por hibridación fluorescente *in situ* (HFIS) o *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) (Anderlid et al., 2002; Luciani et al., 2003; Soorya et al., 2013). Y para la detección de anomalías cromosómicas críticas pueden ser utilizadas las tres técnicas mencionadas arriba (Faas et al., 2008). Con el tiempo mejoraron las técnicas de genética molecular surgiendo las tecnologías de NGS, tecnologías de alto rendimiento entre las que se incluyen la secuenciación del genoma completo (SGC), la secuenciación del exoma completo (SEC) y la secuenciación dirigida, que permiten la identificación de variantes intragénicas como las mutaciones puntuales e indels (Buxbaum et al.,

2012). Estas técnicas NGS han permitido estudiar el genoma entero a nivel de bases nucleotídicas encontrando posibles causas genéticas de determinadas patologías en pacientes que no presentaban etiología conocida. Este es el caso de individuos diagnosticados con TEA idiopático, en los cuales se han identificado indels o mutaciones puntuales *de novo* en SHANK3 utilizando técnicas NGS como SEC y re-secuenciación dirigida a gran escala (Durand et al., 2007; De Rubeis et al., 2014). Además, se están descubriendo nuevos genes implicados en el TEA mediante el uso de técnicas como SGC (Yuen et al., 2017). También la epilepsia se ha beneficiado de estos avances en las técnicas de secuenciación (Mefford, 2015).

La evolución de las técnicas desde la citogenética convencional a la genética molecular, así como la mejora de cada una de las técnicas que se han ido estableciendo con dicha evolución ha aumentado el número de individuos diagnosticados en el TEA, SPM y epilepsia, y ha mejorado la comprensión de la etiología genética de dichas patologías.

1.5. Evolución de los tratamientos

Hoy en día, los tratamientos recibidos por los individuos diagnosticados con el TEA, el SPM y la epilepsia, se centran en el fenotipo de la enfermedad y no en el genotipo. Su objetivo es reducir de forma individual cada uno de los síntomas de las enfermedades.

El tratamiento de la epilepsia se basa principalmente en el uso de fármacos anti-epilépticos. Sin embargo, hay casos en los que estos fármacos no funcionan y entonces se contemplan otras posibilidades como una dieta cetogénica (Rogovik y Goldman, 2010). Por otro lado, para tratar los síntomas del SPM se utilizan terapias ocupacionales, físicas, de comportamiento y del habla; fármacos dirigidos a síntomas como la epilepsia, los problemas gastrointestinales... Y además, hay otros medicamentos cuyo efecto beneficioso sobre el fenotipo neurológico ha sido demostrado pero todavía requieren mayor estudio, como es el caso del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), la insulina intranasal y el risperidone (Costales y Kolevzon, 2015). Por último, para tratar los síntomas del TEA se pueden utilizar terapias ocupacionales, del habla y de integración sensorial, entre otras; dietas; medicamentos enfocados en la epilepsia, depresión...

Sin embargo, en los últimos tiempos han estado tomando forma nuevos conceptos, como la medicina de precisión; que se centran en el genotipo del paciente, los factores ambientales y el estilo de vida para establecer el mejor tratamiento adaptado al paciente. Por tanto, se focalizan en el enfermo y no en la enfermedad (Katsnelson, 2013). En este concepto se engloba a la terapia génica, con la cual se ha buscado suplir esa pérdida de función génica característica de muchas enfermedades. De los genes aquí estudiados, destacan los avances realizados en el uso de la terapia génica con el gen ARSA para tratar la LDM, donde se están desarrollando varias estrategias que están siendo ensayadas en modelos animales (Rosenberg et al., 2016). Recientemente, surgió un estudio en el que se consiguieron rescatar ciertas características del fenotipo autístico, como el déficit de interacción social o los comportamientos repetitivos, en ratones adultos con pérdida del gen SHANK3 mediante la re-expresión de ese mismo gen (Mei et al., 2016).

2. Objetivos

La etiología genética del TEA, el SPM y la Epilepsia converge en la región cromosómica 22q13 donde se encuentran los genes escogidos para el estudio (ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B). Las tres enfermedades se han manifestado asociadas con un claro fenotipo neurológico.

A pesar de haber sido demostrada la contribución de SHANK3 a la patología de estas enfermedades, el fenotipo varía entre los individuos; así que podría haber otros genes de la misma región implicados en esa variación de la sintomatología presentada por cada individuo.

Los objetivos de este trabajo son:

- Realizar una revisión sistemática de la evidencia científica publicada hasta la fecha acerca de la implicación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B en la etiología del TEA, el SPM y la epilepsia; y evaluar la calidad de los estudios para poder ser utilizada como fuente en posibles estudios de investigación.
- Estudiar cuál o cuáles de los genes seleccionados de la región 22q13 están más implicados en la sintomatología de estas enfermedades para ser estudiados en un posible proyecto de terapia génica posterior.

3. Materiales y métodos

La búsqueda literaria realizada en el presente estudio se llevó a cabo usando dos bases de datos de artículos científicos distintas: *PubMed* y *ScienceDirect*. La fecha de finalización de la búsqueda fue el 22 de mayo de 2017.

3.1. Criterios de inclusión

Se recopilaron revisiones sistemáticas debido a su menor probabilidad de sesgo dada la presencia de una metodología científica que permite al lector reproducir la investigación y verificar si llega a la misma conclusión (Gisbert y Bonfill, 2004). También se escogieron los estudios epidemiológicos tanto descriptivos como analíticos. Todos estos debían tratar de alguna manera la asociación de alguno o varios de los genes (ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B) con alguna de las enfermedades estudiadas (TEA, SPM y epilepsia).

En cuanto al rango temporal en el que se tienen que encontrar los estudios, se escogieron aquellos que habían sido publicados a partir del año 2000, es decir, de los últimos 17 años. Lo que permitió ver si habían aumentado o disminuido el número de publicaciones en el tema a tratar a lo largo del tiempo transcurrido durante el siglo XXI.

El idioma fue restringido a la lengua inglesa.

3.2. Criterios de exclusión

No fueron aceptados: a) los resúmenes y estudios duplicados, b) los estudios realizados con animales o con cultivos celulares tanto obtenidos de instituciones de colección de cultivos celulares como las procedentes de pacientes, c) los artículos que comparaban técnicas de diagnóstico con el objetivo de ver cuál de ellas era mejor o directamente la presentación de una técnica de diagnóstico como la mejor opción para ello, d) las revisiones sistemáticas que trataban muchos trastornos neurológicos o muchos trastornos del neurodesarrollo, e) revisiones sistemáticas que agrupaban artículos que ya habían sido recogidos en este trabajo de forma individual, f) las revisiones sistemáticas que utilizaban datos procedentes de estudios analíticos realizados en humanos pero no era especificado el número de pacientes utilizado en cada uno de los estudios recogidos y g) estudios analíticos que no especificaban el número de pacientes que se habían usado.

3.3. Términos de búsqueda

Lo primero que se hizo fue decidir cuales iban a ser las palabras claves que se iban a usar para la búsqueda de los artículos. Los términos de los genes fueron decididos mediante una consulta de cada uno de ellos en la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*; <https://www.omim.org>) y los términos de las enfermedades en base a una previa lectura superficial de varios artículos que trataban el tema. Las palabras clave se escribieron en inglés ya que este fue establecido como el idioma de los artículos que se recopilarían en cada una de las búsquedas.

Por un lado, para cada una de las enfermedades se utilizaron los siguientes términos: “*Phelan-McDermid syndrome*”, “*22q13 deletion syndrome*”, “*deletion 22q13 syndrome*”, “*chromosome 22q13 deletion syndrome*” y “PMS” [MIM 606232]; “*Epilepsy*” y “*seizures*”; “*Autism Spectrum Disorder*” y “ASD”.

Por otro lado, para cada uno de los genes se utilizaron los siguientes términos: “ARSA” y “*Arylsulfatase A*” [MIM 607574]; “SHANK3”, “*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*”, “ProSAP2” y “*Proline-rich synapse-associated protein 2*” [MIM 606230]; “ACR” y “*Acrosin*” [MIM 102480]; “RABL2B” y “*RAB-LIKE 2B*” [MIM 605413].

Con el objetivo de ser más precisos y productivos a la hora de hacer las búsquedas, evitando los miles de resultados que se obtienen de buscar las palabras clave al azar, se procedió al uso de los operadores booleanos. En esta revisión literaria se emplearon como operadores booleanos para definir mejor la búsqueda: “AND” (Operador de presencia) y “OR” (Operador de alternancia). “AND” permitió garantizar la presencia tanto del gen como de la enfermedad en el artículo encontrado y “OR” permitió combinar cada una de las formas de nombrar el gen o la enfermedad ampliando la búsqueda realizada con el operador booleano “AND” para así evitar que fuesen rechazados artículos donde se nombrara la enfermedad o el gen de forma distinta.

3.4. Frases de búsqueda

3.4.1. Búsqueda en PubMed

Las frases que se emplearon en la base de datos *PubMed* fueron:

- “(ARSA OR *Arylsulfatase A*) AND (*Phelan-McDermid syndrome* OR *22q13 deletion syndrome* OR PMS OR *deletion 22q13 syndrome* OR *chromosome 22q13 deletion syndrome*)”.
- “(SHANK3 OR *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3* OR ProSAP2 OR *Proline-rich synapse-associated protein 2*) AND (*Phelan-McDermid syndrome* OR *22q13 deletion syndrome* OR PMS OR *deletion 22q13 syndrome* OR *chromosome 22q13 deletion syndrome*)”.
- “(ACR OR *Acrosin*) AND (*Phelan-McDermid syndrome* OR *22q13 deletion syndrome* OR PMS OR *deletion 22q13 syndrome* OR *chromosome 22q13 deletion syndrome*)”.
- “(RABL2B OR *RAB-LIKE 2B*) AND (*Phelan-McDermid syndrome* OR *22q13 deletion syndrome* OR PMS OR *deletion 22q13 syndrome* OR *chromosome 22q13 deletion syndrome*)”.
- “(ARSA OR *Arylsulfatase A*) AND (*Epilepsy* OR *seizures*)”.
- “(SHANK3 OR *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3* OR ProSAP2 OR *Proline-rich synapse-associated protein 2*) AND (*Epilepsy* OR *seizures*)”.
- “(ACR OR *Acrosin*) AND (*Epilepsy* OR *seizures*)”.
- “(RABL2B OR *RAB-LIKE 2B*) AND (*Epilepsy* OR *seizures*)”.
- “(ARSA OR *Arylsulfatase A*) AND (ASD OR *Autism Spectrum Disorder*)”.
- “(SHANK3 OR *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3* OR ProSAP2 OR *Proline-rich synapse-associated protein 2*) AND (ASD OR *Autism Spectrum Disorder*)”.
- “(ACR OR *Acrosin*) AND (ASD OR *Autism Spectrum Disorder*)”.
- “(RABL2B OR *RAB-LIKE 2B*) AND (ASD OR *Autism Spectrum Disorder*)”.

3.4.2. Búsqueda en *ScienceDirect*

En esta base de datos, no se emplearon todos los vocablos que habían sido escogidos debido al exceso de artículos que aparecían, lo que hacía imposible el procesamiento de todos ellos. Las frases que se emplearon en la base de datos *ScienceDirect* fueron:

- “ARSA AND *Phelan-McDermid syndrome*”.
- “SHANK3 AND *Phelan-McDermid syndrome*”.
- “ACR AND *Phelan-McDermid syndrome*”.
- “RABL2B AND *Phelan-McDermid syndrome*”.
- “ARSA AND *Epilepsy*”.
- “SHANK3 AND *Epilepsy*”.
- “ACR AND *Epilepsy*”.
- “RABL2B AND *Epilepsy*”.
- “SHANK3 AND *Autism Spectrum Disorder*”.
- “ACR AND *Autism Spectrum Disorder*”.
- “ARSA AND *Autism Spectrum Disorder*”.
- “RABL2B AND *Autism Spectrum Disorder*”.

3.5. Selección de estudios

Empleando los criterios de inclusión y exclusión formulados en los apartados 3.1 y 3.2, respectivamente; se determinaron cuatro cribados que son explicados a continuación para facilitar una posible reproducción de los datos obtenidos por el lector:

- Primer Cribado

Los artículos recopilados fueron eliminados en este orden de preferencia por fecha, resúmenes (criterio de exclusión a)), por ser índices, reuniones anuales, congresos, posters, presentaciones, sesiones orales, contenidos, cartas de investigación, artículo retractado, por idioma y cuando la nomenclatura del gen o la enfermedad por la cual el motor de búsqueda escogió el artículo no se corresponde con el gen o la enfermedad (Ejemplos: ACR (*American College of Radiology, American College of Rheumatology, Anterior Corona Radiata...*) o ASD (*Atrial Septal Defect*)).

- Segundo Cribado

Los artículos aceptados en el primer cribado que estaban duplicados (criterio de exclusión a)) fueron eliminados.

Antes de realizar el tercer cribado con los artículos restantes del segundo cribado, se procedió a realizar una clasificación general de los artículos en tres grupos: revisiones narrativas, estudios epidemiológicos descriptivos y estudios epidemiológicos analíticos. Dentro del grupo de estudios analíticos se propusieron 3 grupos más: Animales, Humanos y Células.

- Tercer Cribado

Una vez clasificados se eliminaron las revisiones narrativas (capítulos de libros y artículos de revisión) ya que la falta de una metodología científica da lugar a la obtención de conclusiones

sesgadas e incluso erróneas (Gisbert y Bonfill, 2004), y los estudios epidemiológicos que usaban animales o cultivos celulares y no humanos (criterio de exclusión b)).

- Cuarto Cribado

Los artículos que pasaron el tercer cribado fueron eliminados si no trataban el objetivo de estudio mencionado en el apartado 3.1; o si cumplían alguno de los criterios de exclusión de c)-g).

3.6. Evaluación de la evidencia científica

Antes de proceder a la evaluación de la evidencia científica fue necesaria una caracterización más específica de los estudios que fueron aceptados en el cuarto cribado. Los estudios descriptivos se clasificaron en casos únicos o series de casos en función del número de individuos que se describen. Por otro lado, los estudios analíticos fueron clasificados en ensayos clínicos controlados aleatorizados, ensayos clínicos controlados no aleatorizados (prospectivo o retrospectivo), ensayos no controlados, estudios de cohorte y, estudios de casos y controles. Por último, quedaron las revisiones sistemáticas.

La figura 2 muestra el esquema que se utilizó para clasificar los estudios analíticos, extraído de Argimon y Jiménez (2013).

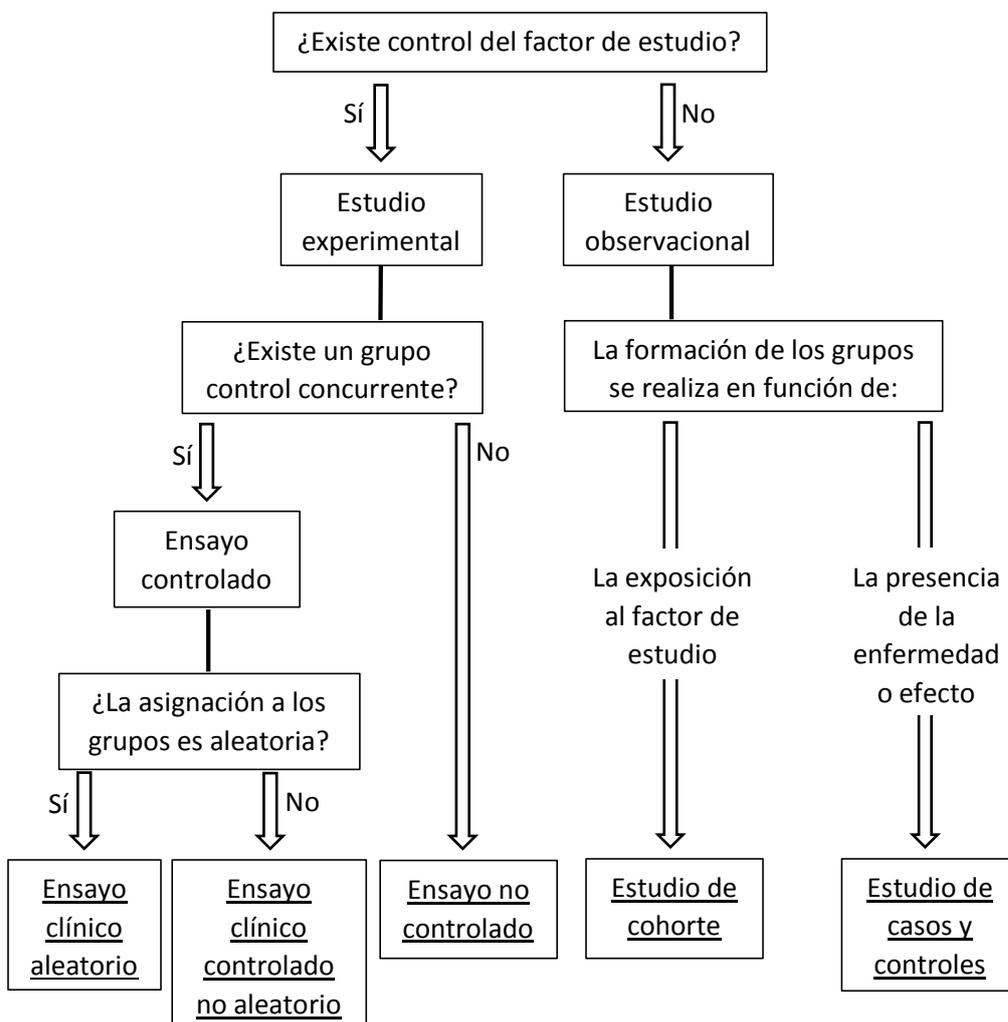


Figura 2. Algoritmo de clasificación de los estudios analíticos (Argimon y Jiménez, 2013). Siguiendo el camino en base a las preguntas y las respuestas, se determinó el tipo específico de estudio analítico que era.

Una vez clasificados, para la evaluación de la evidencia científica se usó el esquema de gradación propuesto por la Agència d’Avaluació de Tecnologia Mèdica (AATM) de la Generalitat de Catalunya basado en el tipo de diseño del estudio además de las condiciones de rigurosidad científica (Jovella y Navarro-Rubio, 1995; Primo, 2003).

La Tabla 2 muestra los distintos niveles de calidad de la evidencia científica especificados en números romanos de mayor (I) a menor (IX) evidencia científica, así como la fuerza de la evidencia correspondiente a cada nivel. Como se puede apreciar en la tercera columna, el diseño del estudio determinado previamente fue importante para relacionar el estudio con el nivel de evidencia científica.

Tabla 2: Esquema de los niveles de la evidencia científica propuesto por la AATM (3, 4). ECA: Ensayo Controlado Aleatorizado.

Nivel	Fuerza de evidencia	Tipo de diseño	Condiciones de rigurosidad científica
I	Adecuada	Meta-análisis de ECA	Análisis de datos individuales de los pacientes Sin heterogeneidad Diferentes técnicas de análisis Meta-regresión Mega-análisis Calidad de los estudios
II	Adecuada	ECA de muestra grande	Evaluación del poder estadístico Multicéntrico Calidad del estudio
III	Buena a regular	ECA de muestra pequeña	Evaluación del poder estadístico Calidad del estudio
IV	Buena a regular	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado	Controles coincidentes en el tiempo Multicéntrico Calidad del estudio
V	Regular	Ensayo retrospectivo controlado no aleatorizado	Controles históricos Calidad del estudio
VI	Regular	Estudios de cohorte	Multicéntrico Apareamiento Calidad del estudio
VII	Regular	Estudios de casos y controles	Multicéntrico Calidad del estudio
VIII	Pobre	Series clínicas no controladas Estudios descriptivos (vigilancia epidemiológica, encuestas, registros y bases de datos) Comités de expertos Conferencias de consenso	Multicéntrico
IX	Pobre	Anécdotas y casos únicos	----

3.7. Estadístico (Prevalencia)

Tras la evaluación de la evidencia científica, se calculó el estadístico prevalencia en los artículos que presentaban el nivel de evidencia científica seleccionado. Según el NIH, la prevalencia es la proporción de una población con una característica específica en un periodo de tiempo dado. En este caso, la población sería una cohorte de individuos con una deleción, mutación puntual... de uno o varios de los genes estudiados de la región 22q13.33 (ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B) y la característica específica sería la enfermedad (TEA, SPM o epilepsia). En resumen, se calculó que porcentaje de individuos con una pérdida de dosis génica en uno o más genes presentaba la enfermedad.

3.8. Análisis de la relación del tamaño de la deleción del 22q13 con el fenotipo

Se revisó el análisis genotipo-fenotipo de aquellos artículos que presentaban el nivel de evidencia científica seleccionado. Se extrajo la información de que síntomas de la enfermedad estudiada en ese caso estaban asociados significativamente al tamaño de la deleción de la región cromosómica 22q13. Este análisis permitirá determinar si otros genes de la región 22q13 podrían influir en la aparición o severidad del fenotipo de la enfermedad.

3.9. Codificación de los estudios

Los datos que se extrajeron para codificar cada uno de los artículos con el objetivo de facilitar el flujo de selección fueron: 1) apellido del primer autor, 2) año de publicación, 3) gen, 4) enfermedad, 5) PMID (solo en el caso de las base de datos de *PubMed*), 6) tipo de revisión o tipo de estudio epidemiológico y 7) tipo de modelo utilizado para el estudio: humano, animal o cultivo celular.

Por último, después de evaluar la evidencia científica y seleccionar los artículos a estudiar, se extrajo: 8) el número de individuos de la cohorte y 9) el número de estos individuos que exhibían la enfermedad.

4. Resultados

4.1. Resultados de la búsqueda.

Como muestra la Figura 3, el número de artículos identificados en las bases de datos *PubMed* y *ScienceDirect* fueron 1497. Los artículos que no pudieron ser descargados fueron proporcionados por el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra. En el primer y segundo cribado explicados en el apartado 3.5, se descartaron 605 y 356 artículos, respectivamente; y se aceptaron un total de 536. En el tercer cribado, después de haber realizado la clasificación mencionada en el apartado 3.5 mediante una lectura de la parte metodológica y en caso de duda también del resumen de cada artículo, fueron eliminados 383 y se aceptaron 153 artículos. Por último, en el cuarto cribado se leyeron los títulos y resúmenes; y en caso de duda, se realizó una lectura más profunda quedando eliminados 83 artículos y aceptados **70**.

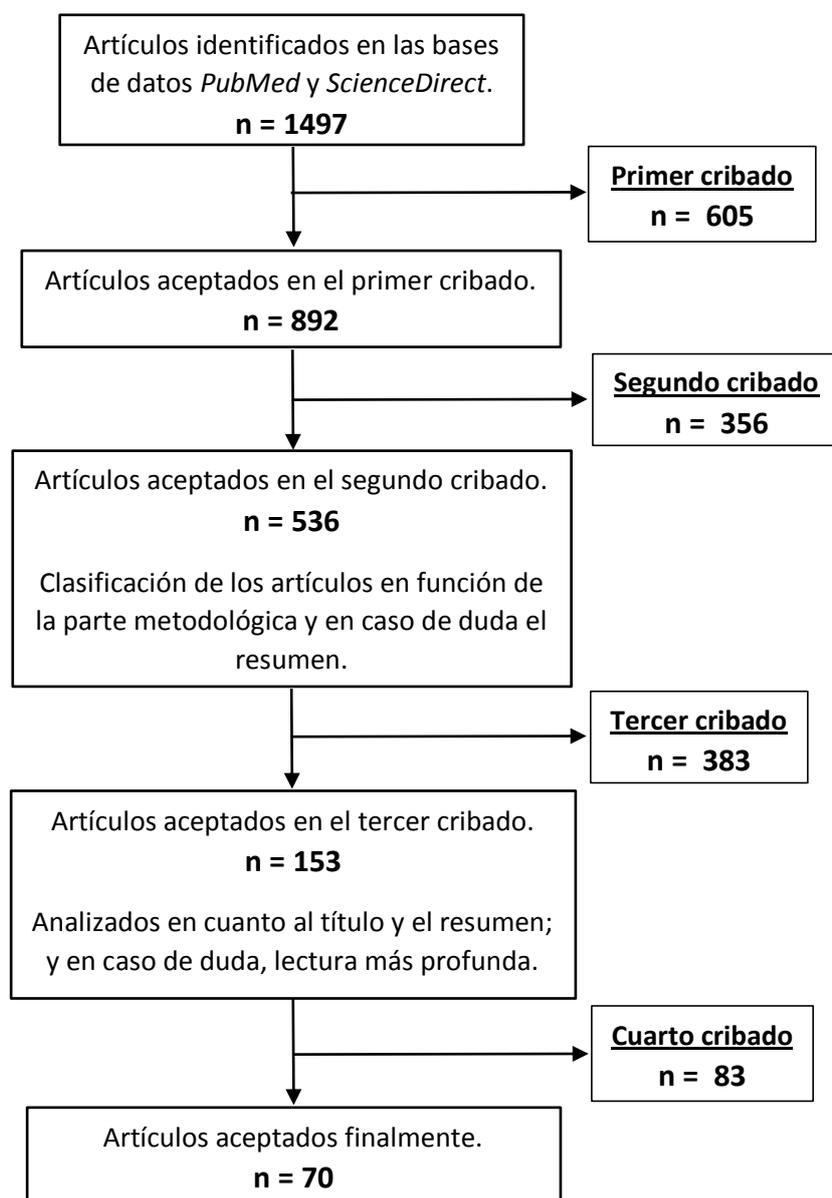


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de selección de artículos. Son representados en el esquema el número de artículos que van siendo eliminados en cada cribado (1 – 4), desde la identificación de los mismos en las bases de datos hasta obtener los artículos que pasaran al estudio de la evidencia científica.

4.2. Evaluación de la evidencia científica.

Los 70 artículos aceptados en el apartado 4.1, los cuales cumplían los requisitos del estudio establecidos en la metodología, fueron evaluados mediante la tabla 2. Se obtuvieron artículos en 5 de los 9 niveles de evidencia científica (III, VI-IX). Como se muestra en la Tabla 3 y la Figura 4, aproximadamente el 97% de los artículos presentaban un nivel entre VI–IX con una fuerza de evidencia asociada entre regular (VI y VII) y pobre (VIII y IX). Solo 2 artículos presentaron un nivel III con una fuerza de evidencia asociada de buena a regular. Sin embargo, fueron los artículos del nivel VI, correspondiente a estudios de cohorte, los que fueron escogidos para estudiar cual o cuales eran los genes más implicados en la patología de las enfermedades. La elección del nivel VI vino dada: a) por la mínima cantidad de artículos presentes en el nivel III (2; 2.86%); b) por ser el siguiente nivel con más evidencia científica que tiene artículos; c) y por presentar una cantidad suficiente de artículos (10; 14.29%), así como, los datos de prevalencia y los análisis tamaño de la deleción-fenotipo necesarios para realizar el estudio.

Tabla 3: Porcentaje de artículos por nivel de evidencia científica. Nivel de evidencia científica (columna 1): I-IX. Número de artículos correspondiente a cada nivel (columna 2). Y, porcentaje de artículos en cada nivel.

Nivel de evidencia científica	Número de artículos	Porcentaje
I	0	0.00%
II	0	0.00%
III	2	2.86%
IV	0	0.00%
V	0	0.00%
VI	10	14.29%
VII	24	34.29%
VIII	12	17.14%
IX	21	31.43%

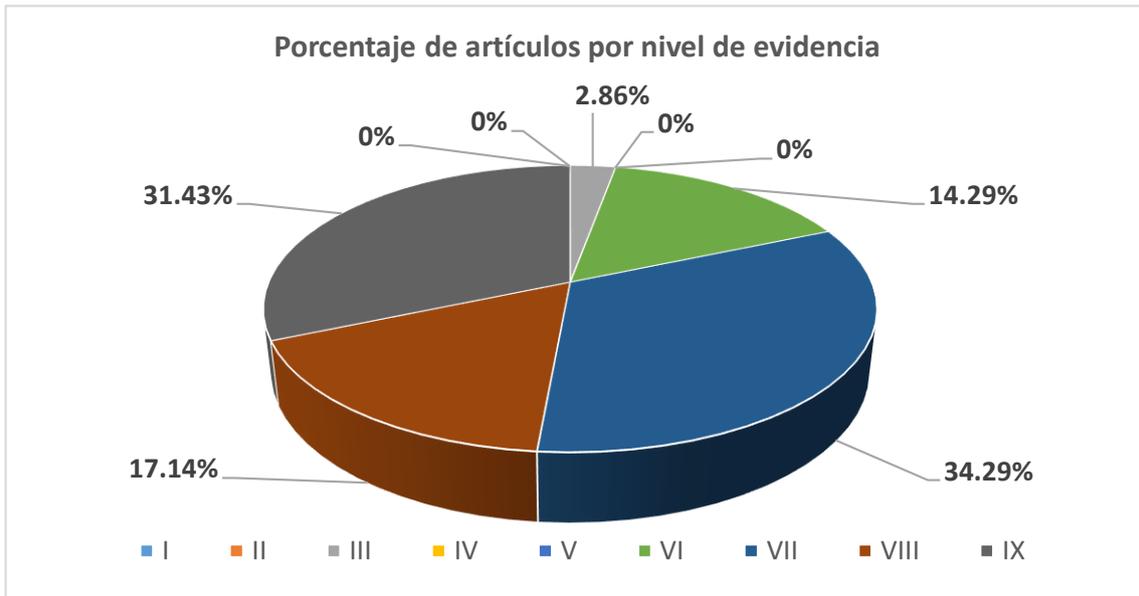


Figura 4. Porcentaje de artículos por nivel de evidencia científica. Representación gráfica mediante un pie chart del porcentaje de artículos presentes en cada nivel de evidencia científica (I-IX).

Los estudios con nivel VI de evidencia científica (Estudios de cohorte) fueron: Wilson et al. (2003), Sarasua et al. (2011), Bonaglia et al. (2011), Aldinger et al. (2012), Soorya et al. (2013), Sarasua et al. (2013), Oberman et al. (2015), Holder y Quach (2016), Zwanenburg et al. (2016a) y Reiersen et al. (2017).

4.3. Prevalencia de las enfermedades asociadas a la delección de genes concretos de la región 22q13

De los 10 artículos escogidos para realizar el estudio, 7 permitieron obtener algún dato de la prevalencia. Sin embargo, en la gran parte de los casos solo se hizo referencia a que la cohorte de individuos presentaba una deficiencia de SHANK3 debido a delecciones de la región 22q13 y a mutaciones puntuales que afectaban concretamente a este gen.

Por un lado, Sarasua et al. (2011), Bonaglia et al. (2011), Soorya et al. (2013) y Sarasua et al. (2013) proporcionaron información suficiente para el cálculo de la prevalencia del TEA entre individuos con deficiencia de SHANK3.

En Sarasua et al. (2011), se llevó a cabo un estudio con 71 individuos que presentaban una delección terminal de la región cromosómica 22q13, incluyendo siempre SHANK3. De los 71 individuos, solo aquellos con 3 o más años fueron evaluados para el TEA en base al historial médico de cada uno. Se obtuvo una prevalencia del TEA entre los individuos de la cohorte del 26.41% (14/53).

En Bonaglia et al. (2011), se hizo un estudio con 44 individuos que presentaban delecciones de la región cromosómica 22q13, siempre incluyendo SHANK3; pero fueron

eliminados 4 individuos para el análisis clínico por llevar asociadas duplicaciones de regiones cromosómicas que podrían dificultar la evaluación. Se concluyó que el 13% de los individuos presentaban autismo englobado actualmente bajo la definición TEA según el DMS-V.

En Soorya et al. (2013), se realizó un estudio con 32 pacientes de los cuales 30 presentaban una deleción 22q13 terminal incluyendo SHANK3 y 2 presentaban mutaciones puntuales *de novo* en SHANK3. Tras una evaluación de los síntomas del TEA en los 32 pacientes utilizando métodos de diagnóstico estandarizados como *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) (Lord et al., 1994) y *Autism Diagnostic Observation Schedule-G* (ADOS-G) (Lord et al., 2000), se concluyó que había una prevalencia del TEA entre los individuos del 84%.

En Sarasua et al. (2013), se hizo un estudio con 70 pacientes que transportaban deleciones terminales de la región 22q13, siempre involucrando a SHANK3. Solo en aquellos individuos con 3 o más años, para los que hubiese historial médico que aportase información al respecto y que no presentasen anomalías cromosómicas asociadas, se evaluó el TEA. El resultado fue una prevalencia del TEA entre los individuos del 25% (13/52).

El resto de artículos no hizo referencia a la prevalencia del TEA entre individuos con deleción o mutación puntual de SHANK3 u otro de los genes aquí estudiados. Oberman et al. (2015), proporcionó la prevalencia del TEA entre una cohorte de 40 individuos con deleciones de la región cromosómica 22q13, excepto un caso que presentaba una mutación puntual. Sin embargo, no se hizo referencia a que genes estaban involucrados en la deleción ni tampoco que gen era el que presentaba la mutación puntual. De modo que aunque determinasen que la prevalencia del TEA era 52.5% (21/40), esta no pudo ser asociada a la pérdida de ningún gen en concreto.

Cabe destacar que a excepción del 84% de prevalencia obtenido en Soorya et al. (2013); en los otros artículos que proporcionaron la prevalencia del TEA entre individuos con pérdida de SHANK3, esta varió entre el 13-26%.

Por otro lado, Bonaglia et al. (2011), Sarasua et al. (2013) y Holder y Quach (2016) proporcionaron información suficiente para el cálculo de la prevalencia de la epilepsia entre individuos con deficiencia de SHANK3. A continuación, se proporcionan los datos de prevalencia pero sin repetir la información aportada en los párrafos anteriores que tratan el TEA.

En Bonaglia et al. (2011) y Sarasua et al. (2013), se obtuvo una prevalencia de ataques epilépticos del 30% y el 18.5% (10/54), respectivamente, entre individuos con pérdida de SHANK3. En el caso de Sarasua et al. (2013), su cálculo fue independiente de la edad al contrario que en el cálculo de la prevalencia del TEA, por lo que el total de individuos sobre el que se evaluaron los ataques epilépticos fue 54.

En Holder y Quach (2016), se realizó un estudio con 24 pacientes de los cuales 20 presentaban una deleción 22q13 incluyendo el SHANK3 y 4 presentaban mutaciones puntuales que causaban una pérdida de función de SHANK3. Tras la evaluación de la información de los pacientes, se concluyó que existía una prevalencia de ataques epilépticos entre los individuos con pérdida de función de SHANK3 de aproximadamente el 46%.

El resto de artículos no mostró datos de prevalencia de ataques epilépticos entre individuos con deleción o mutación puntual de SHANK3 u otro de los genes aquí estudiados. Sin

embargo, como ya había ocurrido en el caso del TEA, Oberman et al. (2015) y Reiersen et al. (2017) proporcionaron datos de la prevalencia de los ataques epilépticos entre individuos con deleciones en la región 22q13 pero sin saber que genes de los aquí estudiados eran delecionados. Los datos de prevalencia fueron del 20% (8/40) y el 63% (22/35), respectivamente. Este último fue un estudio con 50 individuos pero solo 35 presentaron un historial médico con datos al respecto.

Por tanto, la prevalencia de los ataques epilépticos entre pacientes con pérdida de SHANK3 varió entre 18-46%.

4.4. Análisis de la relación del tamaño de la deleción del 22q13 con el fenotipo.

Algunos de los estudios de cohorte estudiaron si existía correlación entre el tamaño de la deleción de la región 22q13 y la severidad o aparición de determinados síntomas del fenotipo de la enfermedad estudiada en el artículo. En la mayoría de los casos la enfermedad era el SPM que presentaba asociados el TEA y la epilepsia.

Wilson et al. (2003) realizaron un estudio con 56 individuos que presentaban una deleción terminal de la región cromosómica 22q13. La comparación de 50 características clínicas con el tamaño de la región 22q13 delecionada se consiguió mediante el uso de un método matemático de regresión lineal con el que se obtuvo un coeficiente de correlación. Muchas de estas características clínicas no presentaron relación con el tamaño de la región delecionada; sin embargo, un 18% de las características clínicas (9/50) sí que presentaron relación con el tamaño obteniéndose un coeficiente de correlación estadísticamente significativo: Problemas dentales, barbilla puntiaguda, infecciones recurrentes del oído, hipotonía y circunferencia de la cabeza. También, las habilidades de la vida diaria personal (comer, vestirse, asearse, cuidado personal...) y las habilidades de la vida en la comunidad (uso del dinero, el tiempo...) que son dominios del test *Scales of Independent Behaviour-Revised* (SIB-R), usado para medir la conducta adaptativa y los problemas de conducta (Bruininks et al., 1996), fueron asociados al tamaño de la deleción al recibir inferiores puntuaciones con tamaños de deleción más grandes. Y la autoayuda (comer, vestirse y asearse), que es un dominio del método de evaluación *Developmental Profile II* (DPII), diseñado para la evaluación del nivel de desarrollo funcional de niños (Alpern et al., 1986), fue asociada al tamaño de la deleción por recibir también puntuaciones inferiores con tamaños de deleción más grandes. Entre los síntomas no asociados al tamaño de deleción se encontraban los ataques epilépticos.

En Sarasua et al. (2011), tras el análisis genotipo-fenotipo de los individuos de la cohorte, se concluyó que el 19% de las características fenotípicas estudiadas (16/84) se asociaban a tamaños de deleción grandes: dolicocefalia, asimetría facial, frente prominente, manos grandes o carnosas, uñas de los pies displásicas, alta estatura, macrocefalia, reflejos atípicos, anomalías genitales masculinas, hipotonía neonatal, problemas alimenticios neonatales, hiporeflexia neonatal, retraso del habla, retraso del desarrollo, retraso en la adquisición de la marcha y la capacidad de gatear. En el retraso del desarrollo y del habla se encontró que existía una correlación entre el tamaño de la deleción y la severidad del síntoma. Por otro lado, el 2.4% de las características fenotípicas (2/84) fue asociado a tamaños de deleción más pequeños: TEA y el comportamiento agresivo.

En Aldinger et al. (2012), se examinaron 10 individuos que presentaban una deleción terminal de la región cromosómica 22q13 a excepción de uno que presentó una deleción intersticial. En este caso, se estudiaron malformaciones a nivel cerebral pero no se encontró ninguna asociación evidente entre el tamaño de la deleción y el fenotipo ya que las deleciones de tamaño intermedio se caracterizaron por exhibir un fenotipo más severo con tamaño agrandado de la cisterna magna e hipoplasia del vermis cerebeloso. Sin embargo, las deleciones de mayor tamaño presentaron tamaño normal de la fosa posterior y del vermis, o una ligera hipoplasia del vermis cerebeloso; y las deleciones más pequeñas tenían un tamaño normal del vermis y un ligero aumento del tamaño de la fosa posterior.

En Soorya et al. (2013), se realizó un análisis de la correlación genotipo-fenotipo y se determinó que deleciones más grandes estaban significativamente asociadas con un mayor número de rasgos dismórficos, comorbilidades médicas y, déficits o anomalías en el dominio social (interacciones sociales recíprocas) y en el dominio comunicación del método de diagnóstico ADI-R, usado para la evaluación de los síntomas del TEA. Otro análisis fue llevado a cabo profundizando más en algunos de los síntomas que presentaba la cohorte. Se observó que individuos con deleciones grandes presentaban comorbilidades médicas que con menores deleciones no se manifestaban, estas eran el asma, el linfedema y las anomalías cardíacas y renales. Sin embargo, síntomas como ataques epilépticos, enfermedad del reflujo gastroesofágico, hipotonía, trastornos del sueño, imagen de resonancia magnética anormal, electroencefalograma anormal y ciertas características dismórficas como manos grandes y carnosas o dolicocefalia fueron encontrados en muchos de los pacientes incluyendo aquellos con las deleciones más pequeñas o mutaciones puntuales en SHANK3. Por lo tanto, estos últimos al manifestarse tanto en individuos con deleciones pequeñas como con deleciones más grandes, no parecían estar asociados al tamaño de la deleción.

En Sarasua et al. (2013), se realizó un análisis genotipo-fenotipo distinto al resto de estudio. En este caso, se determinó cual era el punto de corte de la deleción terminal 22q13 de cada individuo y se construyeron 4 grupos en función de la región cromosómica donde se encontraba el punto de corte (22q13.3, 22q13.31, 22q13.32 y 22q13.33). Se evaluaron 22 características clínicas y se calculó el porcentaje de individuos de cada grupo que manifestaban la característica clínica. El resultado fue que ciertos síntomas se encontraron más asociados a individuos con deleciones cuyo punto de corte se localizaba entre las regiones cromosómicas 22q13.2q13.32, es decir, deleciones de mayor tamaño. Estos síntomas son: hipotonía neonatal, severo retraso del habla, retraso en la edad de andar, anomalías genitales masculinas, uñas de los pies displásicas, manos grandes y carnosas, macrocefalia, estatura, asimetría facial y reflejos atípicos. Sin embargo, otros síntomas fueron más asociados a deleciones de menor tamaño como es el caso del TEA, los comportamientos agresivos o un comportamiento como es el de pellizcar a la gente. Los ataques epilépticos y la microcefalia no fueron asociados a ninguna región cromosómica. También es importante mencionar que algunos de los síntomas que resultaron estar asociados no poseían un nivel de significancia estadística adecuado como las uñas de los pies displásicas, los reflejos atípicos, la conducta agresiva y la estatura.

Oberman et al. (2015) analizaron la asociación entre el tamaño de la deleción 22q13 y ciertas características del TEA. Mediante el método de diagnóstico estandarizado ADI-R, se obtuvo una relación negativa entre el tamaño de la deleción y la severidad de los patrones

repetitivos y restrictivos de comportamiento, intereses y actividades; dando lugar a un fenotipo más severo cuando el tamaño es menor. También fueron negativamente correlacionadas con el tamaño de la deleción los déficits o problemas en las habilidades de la vida diaria, las habilidades motoras y la comunicación que son dominios del test Vineland-II, el cual es una medida de la conducta adaptativa y es usado normalmente para apoyar el diagnóstico de la DI (Sparrow et al., 2005). Por otro lado, los déficits de comunicación social evaluados mediante ADI-R, otra característica importante del TEA según el DMS-V, no fueron significativamente asociados con el tamaño de la deleción; al igual que los problemas de socialización, otro dominio del test Vineland-II.

En Zwanenburg et al. (2016a), se hizo un estudio con niños que presentaban deleciones 22q13 terminales. En este caso, se formaron 3 grupos en función del tamaño de la deleción. El primer grupo presentaba deleciones de menos de 250Kb incluyendo solo SHANK3, ACR y RABL2B (n = 4); el segundo grupo presentaba abarcaba deleciones de menos de 6.7Mb pero mayores de 250Kb (n = 23); y el tercer grupo deleciones mayores de 6.7Mb (n= 5). Entonces, se llevó a cabo una evaluación del desarrollo cognitivo equivalente a la edad, midiendo el desarrollo en función de la edad cronológica, para cada uno de los grupos con el objetivo de determinar cómo afectaba el tamaño de la deleción. El desarrollo cognitivo fue medido mediante el instrumento *Bayley Scales of Infant and Toddler Development, third edition* (Bayley-III-NL) (Van Baar et al., 2014). El desarrollo de la comunicación y el desarrollo motor también fueron evaluados mediante el Bayley-III-NL, obteniéndose igual que en el desarrollo cognitivo mejores niveles de desarrollo para el grupo 1. El resultado fue que aquellos individuos con mayores deleciones (grupo 3) presentaban, a un mismo tiempo transcurrido, un menor desarrollo cognitivo que el grupo 2 y mucho menor que el grupo 1, concluyendo que el desarrollo cognitivo se veía afectado por el tamaño de la deleción.

Reierson et al. (2017) realizaron un estudio con 50 individuos que presentaban deleciones 22q13. Tras el análisis genotipo-fenotipo con aquellos individuos que presentaban datos para los síntomas estudiados, no se encontró ninguna asociación significativa entre el tamaño de la deleción y, los ataques epilépticos y la regresión experimentada por los individuos. Sin embargo, el electroencefalograma anormal sí que fue asociado significativamente a las grandes deleciones.

En base a los datos mostrados en este apartado, se pudo apreciar una correlación entre el tamaño de la deleción y la aparición o severidad de los síntomas. Sin embargo, estos análisis no dejaron tampoco una conclusión clara a cerca de que síntomas presentaban una correlación con el tamaño de la deleción ya que manifestaciones clínicas que estaban relacionadas en un artículo, en otro no lo estaban. Aunque sí que propusieron otros genes que podrían tener un papel en el fenotipo patológico y por lo tanto deberían ser estudiados.

5. Discusión

5.1. Evaluación de la evidencia científica

Tras la búsqueda bibliográfica realizada en este estudio, se llevó a cabo una evaluación de la evidencia científica de los 70 estudios que fueron aceptados sobre la implicación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B en el TEA, el SPM y la epilepsia. Para ello se utilizó el esquema de gradación propuesto por la AATM y se observó que los estudios publicados hasta el momento son asociados a niveles de evidencia con una fuerza de evidencia científica que varía entre regular y baja (VI-IX). En este sentido, hay que tener en cuenta la existencia de ciertas limitaciones que dificultan el estudio. Por un lado, el SPM es una enfermedad rara por lo que su prevalencia es baja dificultando la formación de grupos grandes de estudio. Por otro lado, teniendo en cuenta que aproximadamente solo el 15% de los casos de TEA presentan causa conocida y la elevada heterogeneidad genética de este trastorno del neurodesarrollo, la cantidad de individuos que padecen esta enfermedad neurológica debido a alteraciones genéticas de la región 22q13 será también pequeña (Leblond et al., 2014; Guest, 2017). Estas limitaciones influyen a la hora de invertir en la investigación sobre la contribución de la región cromosómica 22q13 a la etiología de estas enfermedades y en consecuencia, se ve reflejado en la evidencia científica.

A pesar de las limitaciones, cabe resaltar que se ha producido un incremento en el número de investigaciones que tratan de alguna manera la relación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B en las enfermedades aquí estudiadas durante el siglo XXI. Por un lado, este aumento puede ser debido a la evolución de la tecnología desde la citogenética convencional a la genética molecular. Hay que destacar en este caso a las tecnologías NGS, con las que se ha conseguido identificar de forma masiva variaciones intragénicas (mutaciones puntuales e indels) como una causa más; aumentando la prevalencia de las enfermedades, así como en algunas enfermedades el número de genes responsables de las mismas (Buxbaum et al., 2012; De Rubeis et al., 2014; Mefford, 2015). Por otro lado, la financiación de algunos proyectos de investigación o, la diseminación de la información y la concienciación de la sociedad, también pueden ser en parte responsables del incremento en el número de investigaciones. En este aspecto, las respectivas fundaciones o asociaciones de cada enfermedad como puede ser la Asociación Síndrome Phelan-McDermid, tanto a nivel nacional como internacional, apoyan económicamente algunos proyectos y organizan congresos internacionales con los que informan a cerca de los avances realizados en las enfermedades e intentan concienciar a la sociedad. Además, a nivel europeo destacan organizaciones sin ánimo de lucro como Autismo-Europa con programas como el proyecto Trastornos del Espectro del Autismo en la Unión Europea (ASDEU) en el que están involucradas organizaciones de pacientes, universidades e instituciones expertas en ese campo; o como Epilepsy Alliance Europe (EAE), la cual cuenta con el apoyo de la ILAE e IBE. Ambas organizaciones además de promover la investigación de tratamientos y nuevas formas de diagnóstico de sus respectivas enfermedades, también buscan proteger los derechos de los pacientes y sus familias intentando mejorar su calidad de vida. Por lo que respecta al SPM, es la enfermedad que menos apoyo recibe de las tres aquí estudiadas debido a la baja prevalencia que posee, como se ha mencionado en el párrafo anterior, dificultando la adquisición de financiación para proyectos de investigación.

Como se puede apreciar en la figura 5, solo en el año 2011 ya se habían publicado el mismo número de artículo que entre los años 2000-2007; y aún más recientemente, en 2016, el número de artículos todavía es mayor, lo que indica un crecimiento en el número de estudios. Pero es necesario que este aumento también vaya acompañado de un incremento de la calidad metodológica.

Por lo tanto, son necesarios más ECAs ya que estos presentan un nivel de evidencia científica con una fuerza asociada mayor que los estudios de cohorte aquí estudiados. En la búsqueda bibliográfica muy pocos artículos fueron encontrados con un nivel III y una fuerza asociada de buena a regular (Kolevzon et al., 2014b; Zwanenburg et al., 2016b). En los dos casos se estudió un tratamiento para pacientes que padecían el SPM. En Zwanenburg et al. (2016b) se estudió el uso de la insulina intranasal, la cual había sido implicada a nivel cerebral en la mejora de ciertas características como el procesamiento de la memoria y la plasticidad sináptica en modelos celulares de neuronas (Schmidt et al., 2008). Y en Kolevzon et al. (2014b) se investigó el uso del IGF-1, polipéptido capaz de atravesar la barrera hematoencefálica que es producido en grandes cantidades cuando se está desarrollando el SNC para así promover la maduración neuronal y la formación de sinapsis (D’Mello et al., 1997).

Dos limitaciones no mencionadas al principio del apartado son el uso de solo dos bases de datos y el uso de solo el idioma inglés. En este caso, se han usado *PubMed* y *ScienceDirect* pero existen otras como Scopus, Google Scholar, Web of Science, Cochrane... En cuanto al idioma también se podía haber usado el español. Si hubiesen sido usadas más bases de datos y otro idioma como el español quizá el incremento experimentado en el número de publicaciones hubiese sido mayor.

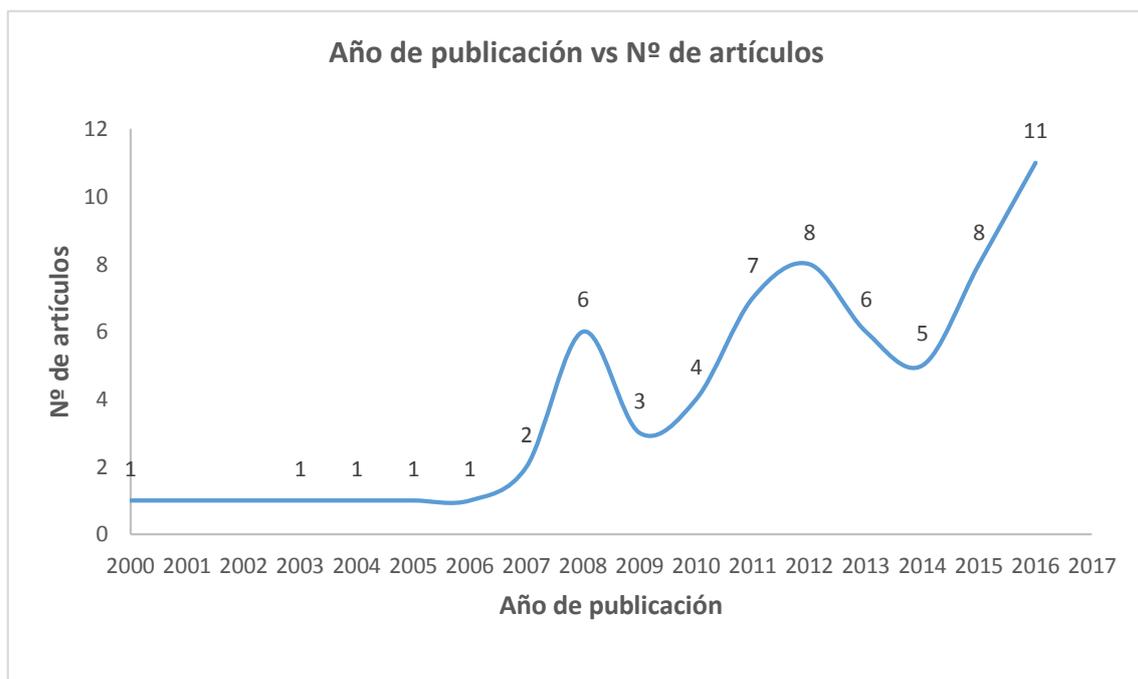


Figura 5. Número de publicaciones aceptadas en el cuarto cribado por año de publicación. Representación cronológica del número de investigaciones publicadas cada año en el rango temporal 2000-2016, mediante el uso de un gráfico de dispersión. El eje X representa el año de

publicación y el eje Y representa el número de publicaciones. El número situado sobre la línea azul responde al número de publicaciones. Los datos del año 2017 fueron eliminados del gráfico ya que al no haber acabado el año, el número de estudios no era representativo.

5.2. Implicación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B, y otras posibilidades génicas de la región 22q13

Después de la evaluación de la evidencia científica publicada hasta la fecha, se escogieron los artículos con un nivel de evidencia científica VI (Wilson et al., 2003; Sarasua et al., 2011; Bonaglia et al., 2011; Aldinger et al., 2012; Soorya et al., 2013; Sarasua et al., 2013; Oberman et al., 2015; Holder y Quach, 2016; Zwanenburg et al., 2016a; Reiersen et al., 2017), correspondiente a los estudios de cohorte; para así poder evaluar la implicación de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B en el TEA, el SPM y la epilepsia que es el objetivo principal del trabajo. En base a los resultados que se obtuvieron, se puede decir que SHANK3 es el gen candidato que con mayor probabilidad contribuye al SPM, TEA y epilepsia ya que la pérdida de este gen aparece en más de la mitad de los casos presentados y en el resto de los casos no se aporta información de su presencia. En todos los estudios, los individuos de la cohorte presentaban deleciones terminales y en algunos casos deleciones intersticiales o mutaciones puntuales; siempre afectando a SHANK3 en más de la mitad de los estudios. Además, su participación en la formación de la sinapsis y la maduración de las espinas dendríticas le hacen ser el candidato perfecto para estas enfermedades (Boeckers et al., 2002). Sin embargo, RABL2B y ARSA podrían tener un papel adicional al de SHANK3 contribuyendo concretamente a ciertos síntomas pero ambos requieren un estudio más individualizado para poder sacar más conclusiones en claro.

Para poder determinar cuál era el gen más implicado se procedió al cálculo de la prevalencia de cada una de las enfermedades (TEA, SPM y epilepsia) en cada uno de los genes (ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B), es decir, la proporción de individuos de la cohorte que desarrollaban cada una de las enfermedades debido a la pérdida de función de cada uno de los 4 genes. Sin embargo, la facilidad de cálculo del dato de prevalencia se vio perjudicada por varias causas. Por un lado, la falta de información y estudio de los genes ARSA, ACR y RABL2B hizo que solo se pudiese calcular la prevalencia de las enfermedades para el caso de la pérdida de SHANK3. Al respecto, es importante resaltar que prácticamente todas las anomalías cromosómicas de los individuos que componían las cohortes eran deleciones terminales a excepción de algunos estudios en los que se hacía referencia a alguna deleción intersticial o mutación puntual. Por tanto, si todas las deleciones terminales englobaban a SHANK3 también englobarían a ACR y RABL2B, porque se encuentran más próximos al telómero y; en la gran mayoría de los casos también a ARSA, ya que este gen es el siguiente más próximo al telómero después del gen SHANK3. De modo que, es importante resaltar la necesidad de estudio de estos tres genes, en concreto de ARSA y RABL2B, que al situarse junto a SHANK3 en la parte final de la región 22q13.33, todas las investigaciones se han centrado en SHANK3 y no han sido estudiados en profundidad. Por otro lado, una dificultad que apareció durante los cribados y que posteriormente se vio reflejada en el cálculo de la prevalencia del SPM, fue la clasificación de los estudios en el nivel VI, correspondiente a los estudios de cohorte. Tomando como referencia la figura 2 (página 15), en los estudios de casos y controles se formaron dos grupos

en función de la presencia o ausencia de la enfermedad y se evaluó en los individuos de los dos grupos si hubo exposición al factor de estudio (pérdida de los genes ARSA, SHANK3, ACR y RABL2B). Y en los estudios de cohorte, se forman los grupos en función del factor de estudio y se evalúa la proporción de individuos de cada grupo que desarrollan la enfermedad y la que no la desarrolla. En este trabajo, todos los estudios que fueron clasificados en el nivel VI presentaban una única cohorte de individuos y; en prácticamente todos los estudios, estos individuos estaban diagnosticados del SPM (formación del grupo en base a la enfermedad o efecto) por lo que podría haber una confusión a la hora de clasificar el tipo de estudio. Pero, tras una lectura más profunda de los mismos, se llegó a la conclusión de que la elección de individuos con el SPM era una estrategia para obtener una cohorte con la región cromosómica 22q13 afectada (formación del grupo en base al factor genético); y así poder estudiar enfermedades asociadas a este síndrome como el TEA y la epilepsia. Por tanto, no sería correcto sacar un dato de prevalencia de una enfermedad partiendo de un grupo de individuos donde el 100% de los individuos estaban diagnosticados del SPM; y por ello, solo se pudo sacar la prevalencia para el TEA y la epilepsia

Los resultados obtenidos de la prevalencia del TEA y la epilepsia para la pérdida de SHANK3 presentaron una cierta variación; pero, demostraron la asociación de estas dos enfermedades con el SPM y con el gen SHANK3. En el caso del TEA, varios estudios (Sarasua et al., 2011; Bonaglia et al., 2011; Sarasua et al., 2013) presentaron una prevalencia entre 13-26% y otro estudio (Soorya et al., 2013) presentó una prevalencia del 84%. Esta variación se corresponde con la ya vista en la literatura científica acerca de la asociación del TEA con el SPM (Kolevzon et al., 2014a). En el caso de los ataques epilépticos ocurre lo mismo obteniéndose un rango de prevalencia entre 18-46% (Bonaglia et al., 2011; Sarasua et al., 2013; Holder y Quach, 2016), cercano a la prevalencia de ataques epilépticos (40%) descrita en el SPM según la PMSF. Para validar que el gen SHANK3 aumenta la probabilidad de que desarrolles el TEA o la epilepsia asociados al SPM, sería necesario utilizar cohortes de mayor tamaño y con mutaciones puntuales o indels que afectaran solo a SHANK3. De este modo, se conseguiría obtener un resultado más preciso en el que no pudiesen tomar parte otros genes de la región 22q13 que hubiesen sido englobados en las deleciones de los individuos de las cohortes de estos estudios seleccionados.

Como se ha mencionado anteriormente, la investigación publicada hasta el momento se ha centrado en el estudio de SHANK3, y por tanto, hay una falta de información de los otros tres genes cuya contribución al fenotipo de estas enfermedades se ha querido también estudiar en este trabajo. A pesar de ello, teniendo en cuenta la función biológica de cada uno de estos genes se pueden sacar ciertas conclusiones a cerca de su posible contribución. Por un lado, la pérdida del gen ARSA, que codifica para la enzima lisosomal arilsulfatasa A encargada de hidrolizar el cerebrósido-3-sulfato, es responsable de la LDM (Biffi et al., 2006). Esta enfermedad presenta una sintomatología predominantemente neurológica donde destacan manifestaciones que solapan con el SPM como pueden ser los ataques epilépticos, la pérdida del habla, la incapacidad de caminar, la pérdida de audición y visión, el deterioro de las habilidades motoras... (Bostantjopoulou et al., 2000; Kelly, 2013). Esto demuestra que ARSA podría contribuir también al fenotipo del SPM y a la epilepsia asociada al síndrome. En este sentido, cabe destacar que la baja actividad de ARSA ha sido descrita en el SPM (Phelan y McDermid, 2012; Artigalás et al., 2012). En cambio, ACR es muy poco probable que contribuya al fenotipo de las enfermedades aquí estudiadas debido a su función biológica. Este gen codifica para una proteinasa almacenada en el acrosoma de espermatozoides maduros encargada de lisar la zona pelúcida del ovocito (Yamagata et al., 1998). De modo que, por su función ACR podría provocar infertilidad

masculina, pero hasta la fecha esta no ha sido descrita en la sintomatología del SPM. Por otro lado, en cuanto a RABL2B, un importante parólogo de este gen es RABL2A, el cual se localiza en el cromosoma 2q13 y cuya expresión es considerada suficiente para compensar la haploinsuficiencia de RABL2B; así que, sería poco probable que la pérdida de uno de los cuatro genes RABL2 fuese responsable de estas enfermedades (Wilson et al., 2003). Sin embargo, la elevada expresión de RABL2B en el cerebro fetal, así como la presencia de una isoforma de *splicing* específica de músculo, podrían explicar algunos déficits cognitivos característicos del TEA asociado al SPM y la hipotonía muscular que presentan los pacientes del SPM (Anderlid et al., 2002; Brunson et al., 2014). Por último, SHANK3 participa en la formación de la sinapsis y en la maduración de las espinas dendríticas; y promueve la plasticidad sináptica que es un proceso crítico para el aprendizaje y la memoria (Ehlers, 1999; Boeckers et al., 2002). Se trata de una proteína de andamiaje que juega un papel importante en la organización de la densidad postsináptica de sinapsis excitatorias. Se encarga de conectar los receptores de la superficie de la membrana postsináptica AMPAR, mGluR5 y receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), con la actina del citoesqueleto a través de proteínas de interacción como Homer, proteína asociada a la guanilato-quinasa (GKAP), cortactina... (Naisbitt et al., 1999). Por lo tanto, teniendo en cuenta la función biológica de SHANK3 y, que la haploinsuficiencia o pérdida de una copia funcional de SHANK3 por delección o mutación puntual parece estar involucrada prácticamente siempre; este gen es considerado la principal causa de la sintomatología neurológica del SPM: DI, retraso de habla, hipotonía, TEA y epilepsia (Bonaglia et al., 2006; Durand et al., 2007; Phelan y McDermid, 2012).

Sin embargo, han sido documentados casos donde los individuos padecían el SPM, pero el gen SHANK3 no estaba incluido en la delección característica del síndrome. Por tanto, esto demuestra que quizá no siempre esté involucrado SHANK3 en las enfermedades aquí estudiadas. En el estudio realizado por Disciglio et al. (2014), se describieron 9 individuos que exhibían características típicas de la sintomatología del SPM como retraso del habla, hipotonía y retraso del desarrollo, entre otras; pero, presentaban deleciones intersticiales del cromosoma 22q13 que no incluían el gen SHANK3. Existen 13 casos de individuos con deleciones intersticiales del 22q13 que no incluyen SHANK3 pero presentan sintomatología compartida con el SPM lo que demuestra la importancia de otros genes de la misma región (Fujita et al., 2000; Wilson et al., 2008; Simenson et al., 2014; Disciglio et al., 2014). Además, 12 de los 13 casos presentan el 22q13.2 afectado aumentando la necesidad de estudio de esa región.

Para poder determinar si podría haber otros genes de la región 22q13 implicados, se estudió el análisis genotipo-fenotipo que llevaron a cabo varios estudios con el fin de averiguar si el tamaño de la delección de la región cromosómica 22q13 influía en la severidad o aparición de los síntomas. 8 de los 10 estudios con nivel VI de evidencia científica presentaron un análisis genotipo-fenotipo. Como ya se ha mencionado anteriormente, los individuos de todos los artículos estaban diagnosticados con el SPM; de modo que, el fenotipo investigado en el análisis fue el del síndrome. Pero, entre los síntomas estudiados, es importante destacar el TEA y los ataques epilépticos asociados al síndrome que se están estudiando en este trabajo.

Por un lado, algunos artículos proporcionaron información acerca de los ataques epilépticos (Wilson et al., 2003; Soorya et al., 2013; Sarasua et al., 2013; Reiersen et al., 2017), y en todos ellos, no fue identificada ninguna relación entre el tamaño de la delección y los ataques. Además, en Soorya et al. (2013), esta falta de asociación fue identificada en muchos individuos, incluyendo todos aquellos con las deleciones más pequeñas o solo con mutaciones

puntuales en SHANK3. Por tanto, con esta información todas las direcciones apuntan a que SHANK3 es el responsables de los ataques epilépticos.

Por otra lado, varios artículos que proporcionaron información acerca del TEA (Wilson et al., 2003; Sarasua et al., 2011; Soorya et al., 2013; Sarasua et al., 2013; Oberman et al., 2015; Zwanenburg et al., 2016a). Entre estos, algunos se centraron en ciertas características, tanto las principales (reunidas en los criterios establecidos por el DSM-V) como otras manifestadas de forma asociada y de elevada prevalencia en el trastorno, como pueden ser la discapacidad motor. Esta última aunque en este momento no sea considerada un síntoma principal para el diagnóstico del TEA por el DSM-V, sí que se ha observado en la literatura científica que tienen un importante impacto en el desarrollo social y la calidad de vida de los pacientes (Lai et al., 2013).

En Sarasua et al. (2011) y Sarasua et al. (2013), el TEA fue asociado a tamaños de deleción de la región cromosómica 22q13 menores y; en Oberman et al. (2015), la severidad de varias características del TEA como los patrones repetitivos y restrictivos de comportamiento, intereses y actividades, los déficits motores... presentaron una correlación negativa con el tamaño de la deleción, y en cambio, otras como los déficits de comunicación social no presentaron asociación. Esta información focaliza la responsabilidad de este trastorno sobre genes localizados en las regiones más próximas al telómero como podría ser principalmente SHANK3, u otros genes como ARSA y RABL2B o por ejemplo también, IB2. Este último gen está próximo al telómero y además va acompañado de una función biológica que permitiría atribuirle la responsabilidad de esta sintomatología neurológica (Giza et al., 2010). Sin embargo, el resto de artículos identificaron una correlación positiva entre el tamaño de la deleción de la región 22q13 y la severidad o aparición de ciertas características del TEA, lo que contrasta con los resultados que se obtuvieron en los anteriores artículos. Fueron correlacionadas con el tamaño de la deleción: 4 de las 12 componentes de la evaluación del desarrollo que midieron mediante SBI-R y DPII en Wilson et al. (2003); 2/7 características del TEA evaluadas mediante el Vineland-II y ADI-R en Soorya et al. (2013); y el desarrollo cognitivo, motor y de la comunicación medidos mediante el Bayley-III-NL en Zwanenburg et al. (2016a). En el estudio de Soorya et al. (2013) se utilizó otro instrumento de medición del TEA como el ADOS-G, pero sus datos no fueron posteriormente usados en el análisis genotipo-fenotipo.

En base a toda esta información, no se puede concluir si hay una asociación positiva o negativa del tamaño de la deleción con el TEA. Las limitaciones que se exponen a continuación pueden ser las responsables de esa variación de resultados. En primer lugar, puede deberse al tamaño de las cohortes, que como ya se ha mencionado en el apartado de la evaluación de la evidencia científica son pequeñas debido a la baja prevalencia del SPM cuyos individuos han sido utilizados para formar los grupos de estudio. Además, en el caso del estudio de Zwanenburg et al. (2016a) donde se forman 3 grupos de individuos en función del tamaño de la deleción, el grupo 1 correspondiente a deleciones menores de 225Kb solo presenta 4 individuos mientras que el grupo 2 correspondiente a mayores deleciones (225Kb-6.7Mb) presenta 23 individuos, lo que podría influir en el resultado de la asociación al tamaño. En segundo lugar, el porcentaje de individuos que presentan TEA en la cohorte también puede influir. En este sentido, se pueden sacar conclusiones confrontadas como ocurre entre los artículos de Sarasua et al. (2011) y Soorya et al. (2013) que presentan un 26% (14/53) y un 84% (27/32) de individuos con TEA, respectivamente. En tercer lugar, también puede haber contribuido el elevado número de instrumentos estandarizados utilizados en la evaluación de las características del TEA (SBI-R, DPII, ADI-R, Bayley-III-NL y Vineland-II, entre otros); así como, el contraste con otros estudios

(Sarasua et al., 2011; Sarasua et al., 2013) que utilizaron cuestionarios completados por los padres para evaluar el TEA. Y por último, la manifestación de síntomas con una mayor severidad asociada a deleciones grandes, como es el caso de la hipotonía, puede dificultar el uso de instrumentos estandarizados para la evaluación del TEA. Esto se debe a que a pesar de no ser incluidos los déficits motores en el DSM-V sí que hay una mínima descripción que hace referencia a los movimientos corporales estereotipados y/o repetitivos; y además, muchos instrumentos y tests de diagnóstico puntúan un dominio motor que sería difícil evaluar con una severa hipotonía.

Para el resto de síntomas del SPM como la hipotonía neonatal, electroencefalograma anormal, uñas displásicas, dolicocefalia, macrocefalia, manos grandes y carnosas, anomalías genitales masculinas, retraso en la adquisición de la marcha, reflejos atípicos... no se pudo sacar una conclusión en base a la información que proporcionó la evidencia científica evaluada. Únicamente la hipotonía neonatal consiguió aparecer asociada a tamaños de deleción más grandes.

Tras el estudio realizado de los artículos con nivel VI de evidencia científica, se identificó una posible contribución a los síntomas neurológicos del SPM como el TEA por parte del gen *IB2* (*islet brain 2*). Este gen, también conocido como *MAPK8IP2* (*mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2*), se encuentra en la región 22q13.33 cerca de *SHANK3*, en concreto a unas 70Kb de distancia, por lo que es delecionado también en casi todos los pacientes con el SPM y; además, presenta una función biológica que podría ser la responsable del TEA asociado al síndrome (Giza et al., 2010). Mediante la disrupción de este gen en ratones, Giza et al. (2010) demostraron que la pérdida de *IB2* podía alterar la morfología del árbol dendrítico de un tipo de neuronas denominadas células de Purkinje y, reducir la transmisión glutamatérgica mediada por el AMPAR o aumentar la mediada por el NMDAR en el cerebelo lo que altera el equilibrio de la corriente glutamatérgica afectando a la transmisión sináptica. Además, la evaluación de la sintomatología neurológica de estos ratones demostró que la pérdida de *IB2* podía reducir la capacidad cognitiva, el aprendizaje y la interacción social, e inducir déficits motores. Estas manifestaciones han sido identificadas en individuos que presentaban el TEA (Lai et al., 2013; Brunson et al., 2014). En comparación con *SHANK3*, *IB2* también codifica para una proteína de andamiaje altamente enriquecida en la densidad postsináptica y la deficiencia de ambos genes afecta a la transmisión sináptica.

También es importante destacar el mecanismo de regulación de la expresión génica mediado por miARNs, como se ha explicado en la introducción. En este sentido, se identificó un miARN denominado miR-1249 que es codificado en la región cromosómica 22q13.31. Entre los genes que se ha predicho que pueden ser regulados por este miARN, destaca *SHANK3* pero también hay otros genes asociados con el desarrollo (Friedman et al., 2009). De modo que, deleciones terminales de la región 22q13 que afectan a la región 22q13.31, producen la pérdida del miR-1249 y; en consecuencia, esto podría dar lugar a una desregulación de la copia de *SHANK3* conservada, aumentando la severidad de los síntomas neurológicos de la haploinsuficiencia de *SHANK3*. Además, esta pérdida de miR-1249, también podría ser la causa del SPM en aquellos individuos que presentan deleciones intersticiales que no engloban a *SHANK3*, al producir esa desregulación del gen *SHANK3* (Fujita et al., 2000; Wilson et al., 2008; Simenson et al., 2014; Disciglio et al., 2014).

Por último, el gen IB2 y miARNs como miR-1249 permiten la posibilidad de abrir más líneas de investigación. IB2 aparece como un competidor para SHANK3 ante la posibilidad de realizar un proyecto de terapia génica ya que es bien sabido que en muchas ocasiones una de las dificultades de estos proyectos es la elección del vector adecuado con una capacidad de trasngen suficiente para el gen seleccionado. En este caso, SHANK3 presenta una longitud de alrededor de 58.6Kb mientras que IB2 mide aproximadamente 13.3Kb; así que, esta diferencia de tamaño hace a IB2 ser considerado un posible candidato. Sin embargo, a diferencia de SHANK3 que es un gen que se lleva estudiando desde hace más tiempo y son más los casos que lo respaldan, IB2 requiere más estudio.

6. Conclusiones

- La evidencia científica publicada durante el presente siglo se asocia a niveles con una fuerza que varía entre regular y baja. Estos niveles se corresponden con estudios de cohorte, estudios de casos y controles, series de casos, casos únicos o anécdotas...
- La haploinsuficiencia del gen SHANK3 parece ser la causa principal de la sintomatología neurológica del SPM como el TEA y la epilepsia.
- Teniendo en cuenta la función biológica que desempeñan ARSA y RABL2B, y su cercanía a SHANK3, es posible que parte de la sintomatología presentada en el SPM sea debida a la haploinsuficiencia de los mismos.
- La pérdida de ARSA ha sido relacionada con la LDM, la cual también se caracteriza por ataques epilépticos. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado su vinculación con el SPM a pesar de encontrarse en la mayoría de las deleciones de los pacientes afectados por el síndrome.
- La disfunción del RABL2B en pacientes diagnosticados con el SPM, con sintomatología del TEA y ataques epilépticos, parece no contribuir al fenotipo debido a que el gen RABL2A situado en el cromosoma 2 podría suplir la pérdida de dosis génica. Pero como ocurre con ARSA, las investigaciones publicadas no se han centrado en RABL2B.
- A pesar de su presencia en todas las deleciones terminales que provocan el SPM, ACR no parece estar implicado en las manifestaciones clínicas de pacientes con trastornos neurológicos ya que codifica para una enzima encargada de lisar la zona pelúcida del ovocito.
- IB2 comparte función con SHANK3 y ha sido demostrada que su disrupción en modelos animales puede generar características del TEA que se han visto en pacientes con el SPM.
- Ante un posible proyecto de medicina personalizada como es la terapia génica se podría valorar el uso del gen SHANK3 por su gran implicación en la sintomatología neurológica del SPM.

7. Bibliografía

- ADHAM, I., NAYERNIA, K., & ENGEL, W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Molec. Reprod. Dev.*, 46(3), 370-376.
- ALDINGER, K., KOGAN, J., KIMONIS, V., FERNANDEZ, B., HORN, D., & KLOPOCKI, E. et al. (2012). Cerebellar and posterior fossa malformations in patients with autism-associated chromosome 22q13 terminal deletion. *Am. J. Med. Genet. A*, 161(1), 131-136.
- ALPERN, G., BOLL, T. & SHEARER, M. (1986). *Developmental Profile II*. Los Angeles: Western Psychological Services.
- AMIET, C., GOURFINKEL-AN, I., BOUZAMONDO, A., TORDJMAN, S., BAULAC, M., & LECHAT, P. et al. (2008). Epilepsy in Autism is Associated with Intellectual Disability and Gender: Evidence from a Meta-Analysis. *Biol. Psychiatry*, 64(7), 577-582.
- ANDERLID, B., SCHOUMANS, J., ANNERÉN, G., TAPIA-PAEZ, I., DUMANSKI, J., BLENNOW, E., & NORDENSKJÖLD, M. (2002). FISH-mapping of a 100-kb terminal 22q13 deletion. *Hum. Genet.*, 110(5), 439-443.
- ARGIMON, J., Y JIMÉNEZ, J. (2013). *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. 4ª Ed. Barcelona: Elsevier.
- ARTIGALÁS, O., PASKULIN, G., RIEGEL, M., BURIN, M., SARAIVA-PEREIRA, M., & MALUF, S. et al. (2012). A patient presenting a 22q13 deletion associated with an apparently balanced translocation t(16;22): an illustrative case in the investigation of patients with low ARSA activity. *Genet. Mol. Biol.*, 35(2), 424-427.
- ARTIGAS, J., GABAU, E. Y GUITART, M. (2005). El autismo sindrómico: I. Aspectos generales. *Rev. Neurol.*, 40 (Supl 1), S143-9.
- BABA, T., KASHIWABARA, S., WATANABE, K., ITOH, H., MICHIKAWA, Y., & KIMURA, K. et al. (1989). Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J. Biol. Chem.*, 264(20), 11920-11927.
- BARON, M., BOECKERS, T., VAIDA, B., FAHAM, S., GINGERY, M., & SAWAYA, M. et al. (2006). An Architectural Framework That May Lie at the Core of the Postsynaptic Density. *Science*, 311(5760), 531-535.
- BERKEL, S., MARSHALL, C., WEISS, B., HOWE, J., ROETH, R., & MOOG, U. et al. (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat. Genet.*, 42(6), 489-491.
- BETANCUR, C. (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.*, 1380, 42-77.
- BIFFI, A., CAPOTONDO, A., FASANO, S., CARRO, U., MARCHESINI, S., & AZUMA, H. et al. (2006). Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J. Clin. Invest.*, 116(11), 3070-3082.
- BOECKERS, T., BOCKMANN, J., KREUTZ, M., & GUNDELFINGER, E. (2002). ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J. Neurochem.*, 81(5), 903-910.
- BONAGLIA, M., GIORDA, R., BERI, S., DE AGOSTINI, C., NOVARA, F., & FICHERA, M. et al. (2011). Molecular Mechanisms Generating and Stabilizing Terminal 22q13 Deletions in 44 Subjects with Phelan/McDermid Syndrome. *PLoS Genet.*, 7(7), e1002173.

- BONAGLIA, M., GIORDA, R., BORGATTI, R., FELISARI, G., GAGLIARDI, C., SELICORNI, A., & ZUFFARDI, O. (2001). Disruption of the ProSAP2 Gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) Is Associated with the 22q13.3 Deletion Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 69(2), 261-268.
- BONAGLIA, M., GIORDA, R., MANI, E., ACETI, G., ANDERLID, B., & BARONCINI, A. et al. (2006). Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J. Med. Genet.*, 43(10), 822-828.
- BOSTANTJOPOULOU, S., KATSAROU, Z., MICHELAKAKI, H., & KAZIS, A. (2000). Seizures as a presenting feature of late onset metachromatic leukodystrophy. *Acta Neurol. Scand.*, 102(3), 192-195.
- BOZZI, Y., CASAROSA, S., & CALEO, M. (2012). Epilepsy as a Neurodevelopmental Disorder. *Front. Psychiatry*, 3, 19.
- BRUININKS, R., WOODCOCK, R., WEATHERMAN, R., & HILL, B. (1996). *Scales of Independent Behavior Revised*. Itasca, IL: Riverside Publishing.
- BRUNSDON, V., COLVERT, E., AMES, C., GARNETT, T., GILLAN, N., & HALLETT, V. et al. (2014). Exploring the cognitive features in children with autism spectrum disorder, their co-twins, and typically developing children within a population-based sample. *J. Child Psychol. Psychiatry.*, 56(8), 893-902.
- BUXBAUM, J., DALY, M., DEVLIN, B., LEHNER, T., ROEDER, K., & STATE, M. (2012). Autism Sequencing Consortium; The autism sequencing consortium: large-scale, high-throughput sequencing in autism spectrum disorders. *Neuron*, 76(6), 1052-1056.
- CAGLAYAN, A. (2010). Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. *Dev. Med. Child Neurol.*, 52(2), 130-138.
- CHOI, S., PANG, K., KIM, J., RYU, J., KANG, H., & LIU, Z. et al. (2015). Post-transcriptional regulation of SHANK3 expression by microRNAs related to multiple neuropsychiatric disorders. *Mol. Brain*, 8(1), 74.
- COSTALES, J., & KOLEVZON, A. (2015). Phelan–McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics*, 12(3), 620-630.
- CUSMANO-OZOG, K., MANNING, M., & HOYME, H. (2007). 22q13.3 deletion syndrome: A recognizable malformation syndrome associated with marked speech and language delay. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, 145C(4), 393-398.
- D’MELLO, S., BORODEZT, K., & SOLTOFF, S.P. (1997). Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J. Neurosci.*, 17, 1548–1560.
- DE RUBEIS, S., HE, X., GOLDBERG, A., POULTNEY, C., SAMOCHA, K., & ERCUMENT CICEK, A. et al. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515(7526), 209-215.
- DHAR, S., DEL GAUDIO, D., GERMAN, J., PETERS, S., OU, Z., & BADER, P. et al. (2010). 22q13.3 deletion syndrome: Clinical and molecular analysis using array CGH. *Am. J. Med. Genet. A*, 152A(3), 573-581.
- DISCIGLIO, V., LO RIZZO, C., MENCARELLI, M., MUCCIOLO, M., MAROZZA, A., & DI MARCO, C. et al. (2014). Interstitial 22q13 deletions not involving SHANK3 gene: a new contiguous gene syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 164A, 1666-1676
- DONNAN, G., FISHER, M., MACLEOD, M. & DAVIS, S. (2008). Stroke. *Lancet*, 371(9624), 1612-23.
- DURAND, C., BETANCUR, C., BOECKERS, T., BOCKMANN, J., CHASTE, P., & FAUCHEREAU, F. et al. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.*, 39(1), 25-27.

- DURMAZ, A., KARACA, E., DEMKOW, U., TORUNER, G., SCHOUMANS, J., & COGULU, O. (2015). Evolution of Genetic Techniques: Past, Present, and Beyond. *Biomed Res. Int.*, 2015, 1-7.
- EHLERS, M. (1999). Synapse structure: Glutamate receptors connected by the shanks. *Curr. Biol.*, 9(22), R848-R850.
- FAAS, B., NILLESEN, W., VERMEER, S., WEGHUIS, D., DE LEEUW, N., SMITS, A., & VAN RAVENSWAALJ-ARTS, C. (2008). Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *Eur. J. Med. Genet.*, 51(6), 511-519.
- FAROOQUI A. (2010). *Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases*. New York: Springer.
- FAROOQUI, A. (2012). *Phytochemicals, signal transduction, and neurological disorders*. New York: Springer.
- FAROOQUI, T. & FAROOQUI, A. (2016). *Trace amines and neurological disorders: Potential Mechanisms and Risk Factors*. Academic Press.
- FEIL, R., & FRAGA, M. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.*, 13, 97-109.
- FISHER, R., ACEVEDO, C., ARZIMANOGLU, A., BOGACZ, A., CROSS, J., & ELGER, C. (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.
- FISHER, R., BOAS, W., BLUME, W., ELGER, C., GENTON, P., LEE, P., & ENGEL, J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.
- FRIEDMAN, R., FARH, K., BURGE, C., & BARTEL, D. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.*, 19(1), 92-105.
- FUJITA, Y., MOCHIZUKI, D., MORI, Y., NAKAMOTO, N., KOBAYASHI, M., & OMI, K. et al. (2000). Girl with accelerated growth, hearing loss, inner ear anomalies, delayed myelination of the brain, and del(22)(q13.1q13.2). *Am. J. Med. Genet.*, 92(3), 195-199.
- GASTAUT, H. (1970). Clinical and Electroencephalographical Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*, 11(1), 102-112.
- GISBERT, J., Y BONFILL, X. (2004). ¿Cómo realizar, evaluar y utilizar revisiones sistemáticas y metaanálisis?. *Gastroenterol. Hepatol.*, 27(3), 129-149.
- GIZA, J., URBANSKI, M., PRESTORI, F., BANDYOPADHYAY, B., YAM, A., & FRIEDRICH, V. et al. (2010). Behavioral and Cerebellar Transmission Deficits in Mice Lacking the Autism-Linked Gene Islet Brain-2. *J. Neurosci.*, 30(44), 14805-14816.
- GRAFODATSKAYA, D., RAJENDRAM, R., LOU, Y., BUTCHER, D., SENMAN, L., & WINDPASSINGER, C., et al. (2012). *Association of Gain of DNA Methylation At the Arylsulfatase A Gene Promoter with Autism Spectrum Disorders*. Conference: International Meeting for Autism Research. Sheraton Hall (Sheraton Centre Toronto).
- GUEST, P. (2017). *Proteomic Methods in Neuropsychiatric Research*. Cham: Springer.
- GUPTA, S. & KULHARA, P., (2010). What is schizophrenia: A neurodevelopmental or neurodegenerative disorder or a combination of both? A critical analysis. *Indian J. Psychiatry*, 52(1), 21-7.
- HAN, G., SUN, J., WANG, J., BAI, Z., SONG, F., & LEI, H. (2014). Genomics in Neurological Disorders. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 12(4), 156-163.
- HARDY, J. & GWINN-HARDY, K. (1998). Genetic Classification of Primary Neurodegenerative Disease. *Science*, 282(5391), 1075-1079.

- HOLDER, J., & QUACH, M. (2016). The spectrum of epilepsy and electroencephalographic abnormalities due to SHANK3 loss-of-function mutations. *Epilepsia*, 57(10), 1651-1659.
- JEFFRIES, A., CURRAN, S., ELMSLIE, F., SHARMA, A., WENGER, S., HUMMEL, M., & POWELL, J. (2005). Molecular and phenotypic characterization of ring chromosome 22. *Am. J. Med. Genet. A.*, 137A(2), 139-147.
- JOKIRANTA, E., SOURANDER, A., SUOMINEN, A., TIMONEN-SOIVIO, L., BROWN, A., & SILLANPÄÄ, M. (2013). Epilepsy Among Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders: A Population-Based Study. *J. Autism Dev. Disord.*, 44(10), 2547-2557.
- JONGKAMONWIWAT, N., & NOISA, P. (2013). Biomedical and Clinical Promises of Human Pluripotent Stem Cells for Neurological Disorders. *Biomed Res. Int.*, 2013, 1-10.
- JOVELLA, A., Y NAVARRO-RUBIO, M. (1995). Evaluación de la evidencia científica. *Med. Clin.*, 105, 740-743.
- KATSNELSON, A. (2013). Momentum grows to make 'personalized' medicine more 'precise'. *Nat. Med.*, 19(3), 249.
- KELLY, E. (2013). *Encyclopedia of Human Genetics and Disease*. Santa Barbara: Greenwood.
- KLEIJER, K., SCHMEISSER, M., KRUEGER, D., BOECKERS, T., SCHEIFFELE, P., & BOURGERON, T. et al. (2014). Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets. *Psychopharmacology*, 231(6), 1037-1062.
- KLEMM, U., MULLER-ESTERL, W., & ENGEL, W. (1991). Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum. Genet.*, 87(6), 635-641.
- KOLEVZON, A., ANGARITA, B., BUSH, L., WANG, A., FRANK, Y., & YANG, A. et al. (2014a). Phelan-McDermid syndrome: a review of the literature and practice parameters for medical assessment and monitoring. *J. Neurodev. Disord.*, 6(1), 39.
- KOLEVZON, A., BUSH, L., WANG, A., HALPERN, D., FRANK, Y., & GRODBERG, D. et al. (2014b). A pilot controlled trial of insulin-like growth factor-1 in children with Phelan-McDermid syndrome. *Mol. Autism.*, 5(1), 54.
- KREIENKAMP, H. (2008). Scaffolding proteins at the postsynaptic density: Shank as the architectural framework. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 186, 365-380.
- KUMAR, R., & CHRISTIAN, S. (2009). Genetics of autism spectrum disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 9(3):188-197.
- LAI, M., LOMBARDO, M., & BARON-COHEN, S. (2013). Autism. *Lancet*, 383(9920), 896-910.
- LEBLOND, C., NAVA, C., POLGE, A., GAUTHIER, J., HUGUET, G., & LUMBROSO, S. et al. (2014). Meta-analysis of SHANK mutations in autism spectrum disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet.*, 10(9), e1004580.
- LEE, B., SMITH, T., & PACIORKOWSKI, A. (2015). Autism spectrum disorder and epilepsy: Disorders with a shared biology. *Epilepsy Behav.*, 47, 191-201.
- LEVY, S., GIARELLI, E., LEE, L., SCHIEVE, L., KIRBY, R., & CUNNIFF, C. et al. (2010). Autism Spectrum Disorder and Co-occurring Developmental, Psychiatric, and Medical Conditions Among Children in Multiple Populations of the United States. *J. Dev. Behav. Pediatr.*, 31(4), 267-275.
- LONGO, D., FAUCI, A., KASPER, D., HAUSER, S., JAMESON, J. & LOSCALZO, J. (2012). *Harrison's principles of internal medicine*. 18th Ed. New York: McGraw-Hill.
- LORD, C., RISI, S., LAMBRECHT, L., COOK, E., LEVENTHAL, B., & DILAVORE, P. et al. (2000). The Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic: a standard measure of social and

- communication deficits associated with the spectrum of autism. *J. Autism Dev. Disord.*, *30*, 205–223.
- LORD, C., RUTTER, M., & LE COUTEUR, A. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: A revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.*, *24*(5), 659-685.
- LUCIANI, J., DE MAS, P., DEPETRIS, D., MIGNON-RAVIX, C., BOTTANI, A., & PRIEUR, M. et al. (2003). Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. *J. Med. Genet.*, *40*(9), 690-696.
- MEFFORD, H. (2015). Clinical Genetic Testing in Epilepsy. *Epilepsy Curr.*, *15*(4), 197-201.
- MEI, Y., MONTEIRO, P., ZHOU, Y., KIM, J., GAO, X., FU, Z. & FENG, G. (2016). Adult restoration of Shank3 expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature*, *530*(7591), 481-484.
- MITCHELL, K. (2015). *The genetics of neurodevelopmental disorders*. Hoboken: Wiley Blackwell.
- NAISBITT, S., KIM, E., TU, J., XIAO, B., SALA, C., & VALTSCHANOFF, J. et al. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, *23*, 569–582.
- OBERMAN, L., BOCCUTO, L., CASCIO, L., SARASUA, S., & KAUFMANN, W. (2015). Autism spectrum disorder in Phelan-McDermid syndrome: initial characterization and genotype-phenotype correlations. *Orphanet J. Rare Dis.*, *10*(1), 105.
- PHELAN, K., & MCDERMID, H. (2012). The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol. Syndromol.*, *2*(3-5), 186-201.
- PHELAN, M. (2008). Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.*, *3*, 14.
- PHELAN, M., ROGERS, R., SAUL, R., STAPLETON, G., SWEET, K., & MCDERMID, H. et al. (2001). 22q13 deletion syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, *101*, 91-99.
- PRIMO, J. (2003). Niveles de evidencia y grados de recomendación (I/II). *Enfer. Inflamat. Intest.*, *2*, 39-42.
- PROEPPER, C., PUTZ, S., RUSSELL, R., BOECKERS, T., & LIEBAU, S. (2014). The Kvβ2 subunit of voltage-gated potassium channels is interacting with ProSAP2/Shank3 in the PSD. *Neuroscience*, *261*, 133-143.
- PRZEDBORSKI, S., VILA, M., & JACKSON-LEWIS, V. (2003). Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we?. *J. Clin. Invest.*, *111*(1), 3-10.
- PULIDO FONTES, L., QUESADA JIMENEZ, P., & MENDIORIZ IRIARTE, M. (2015). Epigenetics and epilepsy. *Neurología (English Edition)*, *30*(2), 111-118.
- QURESHI, I., & MEHLER, M. (2010). Epigenetic mechanisms underlying human epileptic disorders and the process of epileptogenesis. *Neurobiol. Dis.*, *39*(1), 53-60.
- RAO, M., & GERSHON, M. (2016). The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, *13*(9), 517-528.
- RAVNAN, J. TEPPERBERG, J., PAPHENHAUSEN, P., LAMB, A., HEDRICK, J., & EASH, D. et al. (2006). Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J. Med. Genet.*, *43*(6), 478-489.
- RAYNAUD, F., JANOSSY, A., DAHL, J., BERTASO, F., PERROY, J., & VARRAULT, A. et al. (2013). Shank3-Rich2 Interaction Regulates AMPA Receptor Recycling and Synaptic Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.*, *33*(23), 9699-9715.

- REIERSON, G., BERNSTEIN, J., FROELICH-SANTINO, W., URBAN, A., PURMANN, C., & BERQUIST, S. et al. (2017). Characterizing regression in Phelan McDermid Syndrome (22q13 deletion syndrome). *J. Psychiatr. Res.*, *91*, 139-144.
- REIM, D., DISTLER, U., HALBEDL, S., VERPELLI, C., SALA, C., & BOCKMANN, J. et al. (2017). Proteomic Analysis of Post-synaptic Density Fractions from Shank3 Mutant Mice Reveals Brain Region Specific Changes Relevant to Autism Spectrum Disorder. *Front. Mol. Neurosci.*, *10*, 26.
- ROBERTS, A., LYALL, K., RICH-EDWARDS, J., ASCHERIO, A., & WEISSKOPF, M. (2013). Association of Maternal Exposure to Childhood Abuse With Elevated Risk for Autism in Offspring. *JAMA Psychiatry*, *70*(5), 508.
- ROGOVIK, A., & GOLDMAN, R. (2010). Ketogenic diet for treatment of epilepsy. *Can. Fam. Physician*, *56*(6), 540-542.
- ROSENBERG, J., KAMINSKY, S., AUBOURG, P., CRYSTAL, R., & SONDDHI, D. (2016). Gene therapy for metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci. Res.*, *94*(11), 1169-1179.
- ROULLET, F., LAI, J., & FOSTER, J. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, *36*, 47-56.
- SAID, G., & KRARUP, C. (2013). *Peripheral nerve disorders*. Amsterdam: Elsevier.
- SARASUA, S., BOCCUTO, L., SHARP, J., DWIVEDI, A., CHEN, C., & ROLLINS, J. et al. (2014). Clinical and genomic evaluation of 201 patients with Phelan–McDermid syndrome. *Hum. Genet.*, *133*(7), 847-859.
- SARASUA, S., DWIVEDI, A., BOCCUTO, L., CHEN, C., SHARP, J., & ROLLINS, J. et al. (2013). 22q13.2q13.32 genomic regions associated with severity of speech delay, developmental delay, and physical features in Phelan–McDermid syndrome. *Genet. Med.*, *16*(4), 318-328.
- SARASUA, S., DWIVEDI, A., BOCCUTO, L., ROLLINS, J., CHEN, C., & ROGERS, R. et al. (2011). Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermid syndrome (22q13 deletion syndrome). *J. Med. Genet.*, *48*(11), 761-766.
- SATO, D., LIONEL, A., LEBLOND, C., PRASAD, A., PINTO, D., & WALKER, S. et al. (2012). SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.*, *90*(5), 879-887.
- SCHMIDT, H., KERN, W., GIESE, R., HALLSCHMID, M., & ENDERS, A. (2008). Intranasal insulin to improve developmental delay in children with 22q13 deletion syndrome: an exploratory clinical trial. *J. Med. Genet.*, *46*(4), 217-222.
- SEALEY, L., HUGHES, B., SRISKANDA, A., GUEST, J., GIBSON, A., & JOHNSON-WILLIAMS, L. et al. (2016). Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environ. Int.*, *88*, 288-298.
- SHORVON, S. (2011). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, *52*(6), 1052-1057.
- SIMENSON, K., ÖIGLANE-SHLIK, E., TEEK, R., KUUSE, K., & ÖUNAP, K. (2014). A patient with the classic features of Phelan-McDermid syndrome and a high immunoglobulin E level caused by a cryptic interstitial 0.72-Mb deletion in the 22q13.2 region. *Am. J. Med. Genet. A*, *164*(3), 806-809.
- SOORYA, L., KOLEVZON, A., ZWEIFACH, J., LIM, T., DOBRY, Y., & SCHWARTZ, L. et al. (2013). Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. *Molec. Autism*, *4*(1), 18.
- SPARROW, S., CICCETTI, D. & BALLA, D. (2005). *Vineland adaptive behavior scales: second edition (Vineland II), survey interview form/caregiver rating form*. Livonia: Pearson Assessments.

- STEIN, C., GIESELMANN, V., KREYSING, J., SCHMIDT, B., POHLMANN, R., & WAHEED, A. et al. (1989). Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J. Biol. Chem.*, *264*, 1252-1259.
- TICK, B., BOLTON, P., HAPPÉ, F., RUTTER, M., & RIJSDIJK, F. (2015). Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J. Child Psychol. Psychiatry.*, *57*(5), 585-595.
- VAN BAAR, A., STEENIS, L., VERHOEVEN, M., & HESSEN, D. (2014). *Bayley-III-NL Technische Handleiding*. Amsterdam: Pearson Assessment and Information B.V.
- VEENSTRA-VANDERWEELE, J., CHRISTIAN, S., & COOK, JR., E. (2004). Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, *5*(1), 379-405.
- VERPELLI, C., DVORETSKOVA, E., VICIDOMINI, C., ROSSI, F., CHIAPPALONE, M., & SCHOEN, M. et al. (2011). Importance of Shank3 Protein in Regulating Metabotropic Glutamate Receptor 5 (mGluR5) Expression and Signaling at Synapses. *J. Biol. Chem.*, *286*(40), 34839-34850.
- WEINHOLD, B. (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environ. Health Perspect.*, *114*(3), A160-A167.
- WILSON, H., CROLLA, J., WALKER, D., ARTIFONI, L., DALLAPICCOLA, B., & TAKANO, T. et al. (2008). Interstitial 22q13 deletions: genes other than SHANK3 have major effects on cognitive and language development. *Eur. J. Hum. Genet.*, *16*(11), 1301-1310.
- WILSON, H., WONG, A., SHAW, S., TSE, W., STAPLETON, G., & PHELAN, M. et al. (2003). Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J. Med. Genet.*, *40*(8), 575-584.
- WONG, A., NING, Y., FLINT, J., CLARK, K., DUMANSKI, J., LEDBETTER D., & McDERMID H. (1997). Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.*, *60*(1), 113-120.
- WONG, A., SHKOLNY, D., DORMAN, A., WILLINGHAM, D., ROE, B., & McDERMID, H. (1999). Two Novel Human RAB Genes with Near Identical Sequence Each Map to a Telomere-Associated Region: The Subtelomeric Region of 22q13.3 and the Ancestral Telomere Band 2q13. *Genomics*, *59*(3), 326-334.
- WOOLFENDEN, S., SARKOZY, V., RIDLEY, G., COORY, M., & WILLIAMS, K. (2012). A systematic review of two outcomes in autism spectrum disorder - epilepsy and mortality. *Dev. Med. Child Neurol.*, *54*(4), 306-312.
- YAMAGATA, K., MURAYAMA, K., OKABE, M., TOSHIMORI, K., NAKANISHI, T., KASHIWABARA, S., & BABA, T. (1998). Acrosin Accelerates the Dispersal of Sperm Acrosomal Proteins during Acrosome Reaction. *J. Biol. Chem.*, *273*(17), 10470-10474.
- YUEN, R., MERICO, D., BOOKMAN, M., HOWE, J., THIRUVAHINDRAPURAM, B., & PATEL, R. et al. (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.*, *20*(4), 602-611.
- ZHU, L., WANG, X., LI, X., TOWERS, A., CAO, X., & WANG, P. et al. (2014). Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.*, *23*(6), 1563-1578.
- ZWANENBURG, R., BOCCA, G., RUITER, S., DILLINGH, J., FLAPPER, B., VAN DEN HEUVEL, E., & VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. (2016b). Is there an effect of intranasal insulin on development and behaviour in Phelan-McDermid syndrome? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur. J. Hum. Genet.*, *24*(12), 1696-1701.
- ZWANENBURG, R., RUITER, S., VAN DEN HEUVEL, E., FLAPPER, B., & VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. (2016a). Developmental phenotype in Phelan-McDermid (22q13.3 deletion) syndrome: a systematic and prospective study in 34 children. *J. Neurodev. Disord.*, *8*(1), 16.