

## La cartografía cromosómica de microarray sugiere la implicación de BSX y Neurogranina en las deficiencias cognitivas y del comportamiento en el trastorno por deleción terminal 11q (Síndrome de Jacobsen)

C. D. Coldren • Z. Lai • P. Shragg • E. Rossi •  
S. C. Glidewell • O. Zuffardi • T. Mattina • D. D. Ivy •  
L. M. Curfs • S. N. Mattson • E. P. Riley • M. Treier •  
P. D. Grossfeld

Recepción: 30 Marzo 2008 / Aceptado: 23 Septiembre 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Resumen** Hemos realizado un estudio preventivo sobre 14 pacientes 11q para determinar la relación entre el grado de deficiencia cognitiva y el tamaño relativo de su deleción. Se han valorado 17 funciones cognitivas. Nueve de los pacientes estudiados, en los que el tamaño de la deleción era mayor, comprendiendo al menos 12,1 megabases, tenían un déficit cognitivo global severo con un CI total inferior a 50; mientras que los otros cinco pacientes, cuyas deleciones eran menores, con un tamaño de 11,8 megabases o inferior, mostraron un déficit cognitivo leve, con un CI total igual o superior a 63 ( $p < 0,001$ ). Dentro de este grupo

de cinco pacientes, los dos cuya deleción era más amplia (11,4 y 11,8 Mb) mostraban una clara inferioridad en la capacidad de atención comparados con los otros tres pacientes con deleciones menores ( $\leq 9,1$  Mb). Proponemos la existencia de una región crítica proximal que contiene un gen para la expresión de la función cognitiva global y una región crítica distal que contiene un gen esencial para la capacidad de atención auditiva, que serían necesarios para optimizar la función intelectual. Esta región crítica proximal abarca 300 kilobases y contiene tres genes identificados. Uno de ellos, BSX, codifica una proteína

---

C. D. Coldren y Z. Lai han contribuido por igual a este estudio.

---

**Material electrónico adicional** La versión online de este artículo (doi:10.1007/s10048-008-0157-x) contiene material adicional disponible para usuarios autorizados.

---

C. D. Coldren – S. C. Glidewell  
Departamento de Medicina Pulmonar,  
Health Sciences Center de la Universidad de Colorado  
Denver, Colorado, USA

Z. Lai  
San Diego, California, USA

P. Shragg  
Departamento de Medicina, UCSD School of Medicine,  
La Jolla, California, USA

E. Rossi – O. Zuffardi  
Biología General y Genética Médica, Universidad de Pavia  
Pavia, Italia

T. Mattina  
Departamento de Medicina Genética, Universidad de Catania,  
Catania, Italia

D. D. Ivy  
División de Cardiología Pediátrica, The Children's Hospital,  
Denver, Colorado, USA

L. M. Curfs  
Departamento de Genética Clínica, Academic Hospital de  
Maastricht,  
Maastricht, Holanda

S. N. Mattson – E. P. Riley  
Departamento de Psicología, Center for Behavioral Teratology,  
San Diego State University,  
San Diego, California, USA

M. Treier  
Unidad de desarrollo Biológico,  
European Molecular Biology Laboratory,  
Heidelberg, Alemania

P. D. Grossfeld  
División de Cardiología, Departamento de Pediatría  
UCSD School of Medicine  
La Jolla, California, USA

P. D. Grossfeld (Contacto )  
Division of Pediatric Cardiology, 3020 Children's Way,  
San Diego, CA 92123, USA  
e-mail: pgrossfeld@ucsd.edu

homeótica<sup>A</sup> específica para la función cerebral, y se ha comprobado previamente en ratones seleccionados genéticamente que desempeña un papel en la regulación del comportamiento locomotor a través de las neuronas que expresan BSX en el hipotálamo. La región crítica distal, de aproximadamente 2,2 Mb, contiene 18 genes identificados. Anteriormente se ha comprobado en ratones que la Neurogranina, un gen presente en esta región, es crítico en la plasticidad sináptica<sup>B</sup> y la potenciación a largo plazo. Tomados en su conjunto, nuestros resultados implican la presencia de al menos dos localizaciones distales en 11q que, cuando sufren deleción, producen deficiencias globales y selectivas en la función neurocognitiva. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones en el consejo genético al paciente y en potenciales terapias genéticas específicas.

**Palabras clave** Síndrome de Jacobsen. Función cognitiva. Hibridación genómica comparada. Proteínas homeóticas específicas del cerebro. Neurogranina.

### Introducción

La etiología del retraso mental, que se da en torno al 4% de la población [1], es multifactorial y puede ser debida a factores ambientales y/o genéticos. La magnitud del déficit cognitivo o retraso mental [RM] se valora generalmente mediante la evaluación del cociente intelectual global (CI), junto con la exploración de capacidades adaptativas, en la que el RM es definido como un cociente igual o menor de 70. Generalmente se pueden encontrar más de 200 causas monogénicas para el RM en OMIM<sup>C</sup>.

El Síndrome de Jacobsen (JBS, MIM 147791), también denominado trastorno por deleción terminal 11q (11q-) es una anomalía genética causada por la pérdida del extremo del brazo largo del cromosoma 11 [2]. El grado de RM en pacientes 11q- es variable [3]. Nuestros estudios anteriores incluían un análisis de la función cognitiva en base al estudio genotípico y fenotípico inicial en 13 pacientes 11q- [3]. La cartografía de los puntos de ruptura para la deleción mediante hibridación por fosforescencia in situ (FISH) demostró una fuerte correlación entre el tamaño de la deleción y el nivel de pérdida cognitiva. Una de las limitaciones de dicho estudio fue la imposibilidad de determinar con precisión la localización de los puntos de ruptura en pacientes que, mediante FISH, aparentaban tener

un tamaño de deleción similar en todos ellos. Recientemente se han producido avances significativos que mejoran la resolución en el cartografiado de los puntos de ruptura hasta niveles de precisión de un simple gen.

En aquel estudio pretendíamos determinar cuáles de las causas monogénicas del retraso cognitivo observadas en individuos 11q- pueden ser definidas. En consecuencia hemos realizado un estudio preventivo en base a los análisis genotípicos y fenotípicos de la función cognitiva en 14 pacientes 11q-. Se han realizado análisis de microarray cromosómicos de alta resolución (CMA) en estos pacientes para determinar exactamente qué genes ha perdido cada paciente en concreto. Nuestros resultados implican dos localizaciones distales en 11q cuya deleción produce el déficit cognitivo observado en los pacientes 11q-. La región crítica más proximal, de aproximadamente 300kb, contiene tres genes identificados, incluyendo BSX, que codifica una proteína homeótica específica del cerebro [4]. La región crítica distal comprende aproximadamente 2,2 Mb y contiene 18 genes identificados, incluido Neurogranina, un gen crítico para la expresión de la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo. Debatimos las implicaciones de estos hallazgos con respecto al asesoramiento genético así como la posibilidad de aplicar terapias genéticas en pacientes 11q-.

### Materiales y método

#### Reclutamiento de pacientes

Los pacientes fueron reclutados en la Conferencia organizada por el *11q Research and Resource Group*, que tuvo lugar en junio de 2006 en San Diego, California. Se solicitó una declaración de conformidad a todos los pacientes de acuerdo con el protocolo normalizado por la Junta de Revisión Interna de la Universidad de California San Diego y de la Universidad Estatal de San Diego.

#### Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión contemplaban cualquier paciente de 6 años o más, diagnosticado previamente de Síndrome de Jacobsen mediante cariotipo. Sólo se incluyeron pacientes con una deleción totalmente distal. Todos los pacientes debían ser hablantes nativos de inglés.

#### Criterios de exclusión

Los pacientes con traslocaciones equilibradas (por ejemplo, deleción distal 11q y duplicación de otro punto cromosómico) no fueron aceptados. También se excluyó a los pacientes con historial de posibles lesiones cerebrales, nacimiento muy prematuro (gestación menor de 32 semanas), accidente cerebral, parada cardíaca/hipoxia severa, y/o hipotensión.

#### Reconocimientos cognitivos

Se realizó un análisis de inteligencia adecuado a cada edad utilizando el Test de Inteligencia para Niños Wechsler III, (WISC-III) y el Test de Inteligencia para Adultos Wechsler

(Nota del Tr.)

<sup>A</sup> Los genes homeóticos están implicados en la regulación del desarrollo embrionario y codifican proteínas que dan instrucciones a las células sobre la manera de formar los diferentes órganos y tejidos en los tres ejes espaciales.

<sup>B</sup> La plasticidad sináptica es la propiedad que manifiestan las neuronas cuando establecen comunicación, y que modula la percepción de los estímulos emitidos y recibidos, de tal modo que los estímulos recibidos reconfiguran el cerebro y modifican la percepción de los siguientes.

<sup>C</sup> OMIM: acrónimo en inglés de Online Mendelian Inheritance in Man. Es una biblioteca electrónica sobre la herencia Mendeliana en el ser humano.

Escala-III (WAIS-III). Se valoraron cuatro categorías completas que incluían inteligencia verbal, inteligencia visual-espacial y sintética, capacidad de concentración-memoria de trabajo, y cociente intelectual total.

#### Cartografía de la delección

Se realizó un mapa de la delección de cada paciente usando la plataforma Affymetrix 500k SNP (con una resolución media de unos 10 kb) en 8 pacientes y/o el sistema Agilent 44B (con una resolución media de 75 kb), también en 8 pacientes (en dos de los pacientes se utilizaron ambos métodos).

El dispositivo array para cartografía genómica humana *Affymetrix 500k SNP* consta de dos matrices: el array 250K Nsp y el array 250K Sty. Estos análisis fueron ejecutados mediante el dispositivo de microarray UCCC siguiendo el protocolo desarrollado por el propio fabricante. En resumen, se digirieron 250 nanogramos de ADN genómico con 10 unidades de NspI o StyI (*New England Biolabs*; Beverly, Massachusetts, USA) durante 2 horas a 37°C. Los extremos hidrolizados se ligaron a adaptadores específicos mediante ligasa de ADN T4 durante 2 horas a 16°C. Una vez diluidos en agua las muestras se amplificaron mediante PCR<sup>D</sup> utilizando cebadores específicos para la secuencia de adaptadores con los siguientes parámetros de amplificación: desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 20 seg a 95°C, 15 seg a 59°C, 15 seg a 72°C y una elongación final de 7 minutos a 72°C.

El material obtenido en la PCR se purificó y fragmentó usando 0,24 unidades de DNase I a 37°C durante 30 minutos. El ADN fragmentado se marcó con biotina utilizando 100 unidades de transferasa desoxinucleotidil terminal a 37°C durante 2 horas. Se realizó hibridación del ADN marcado con 250K del array correspondiente a 48°C durante 16-18 horas a 60 rpm. El chip hibridado se lavó, se marcó y se escaneó según las instrucciones facilitadas por el fabricante.

Se interpretaron los datos utilizando una herramienta estadística basada en modelos ocultos de Markov (HMM)<sup>E</sup> incorporada en el software CNAT 4.0 (*Affymetrix*; Santa Clara, California, USA). Los análisis HMM nos sugieren que lo que observamos experimentalmente (el número de copias visibles de un determinado SNP<sup>F</sup>) es el resultado de un proceso desconocido, pero que subyace una

(Nota de Tr.)

<sup>D</sup> PCR, acrónimo en inglés de Reacción en cadena de la Polimerasa. Es una técnica de biología molecular que permite amplificar un fragmento de ADN alternando temperaturas altas y bajas. Se utiliza para obtener grandes cantidades de material genético en poco tiempo a partir de una muestra mínima.

<sup>E</sup> Un Modelo Oculto de Markov es un procedimiento estadístico cuyo objetivo es determinar los parámetros desconocidos (ocultos) a partir de los parámetros observables..

<sup>F</sup> SNP, acrónimo en inglés de Poliformismo de Nucleótido Simple. Es una variación de la secuencia de ADN que afecta a una sola base nitrogenada.

circunstancia (es decir, el número “real” de copias en dicha localización) que se produce de forma relativamente continua. Los parámetros para este modelo incluyen un número de estados o situaciones, la mayor probabilidad para cada estado, la probabilidad de transiciones entre dichos estados y la probabilidad de emisión. En los pacientes 11q- los parámetros para este modelo se ajustaron basándose en la premisa de que el genoma de estos individuos es casi completamente diploide, con grandes regiones (entre 1 y 5 Mb) con números de copias alterados. Estas restricciones quedan reflejadas en la selección de cinco estados (que reflejan respectivamente un número de copias de 0, 1, 2, 3 y 4 o más), con grandes probabilidades para un número de copias igual a 2.

La probabilidad de transición refleja las posibilidades de que existan dos localizaciones adyacentes en el mismo estado. La probabilidad de emisión refleja las posibilidades que presenta un estado fundamental para ser observado experimentalmente. Los resultados HMM fueron recopilados y examinados en su contexto genómico (secuencia del genoma humano NCBI Build 36.1) utilizando el localizador genético de la UCSC (Universidad de California Santa Cruz).

Se realizó la cartografía genética en base a un chip CGH utilizando el kit Agilent 44B Microarray CGH del Genoma Humano (*Agilent Technologies*; Santa Clara, California, USA). Esta plataforma consta de un microarray de alta resolución basado en oligonucleótidos que posibilita el muestreo de un amplio espectro del genoma y una discriminación molecular de aberraciones genómicas con una precisión cercana a 75kb.

Se realizó el marcado e hibridación siguiendo el protocolo facilitado por Agilent. En resumen, se hidrolizaron, mediante encimas de restricción *RSAl* y *AluI* durante 2 horas a 37°C, 500 ng de ADN purificado de un paciente y 500 ng de una muestra de control (*Promega Corporation*; Madison, Wisconsin, USA). Tras 20 minutos a 65°C el ADN de cada muestra hidrolizada se marcó por cebado aleatorio (*Invitrogen*; Carlsbad, California, USA) durante 2 horas usando Cy5-dUTP para el ADN del paciente y Cy3-dUTP para el ADN de control. Los productos del marcado se sometieron a purificación en columna y se prepararon siguiendo el procedimiento de Agilent. Tras un test de desnaturalización y preapareamiento con 50 mg. de ADN Cot-1, se realizó hibridación a 65°C con rotación durante 40 horas. Tras dos lavados, los chips fueron analizados con el escaner de Agilent y el software *Feature Extraction* (v8.0). Se obtuvo una interpretación gráfica utilizando software de análisis CGH (v3.1).

#### Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron introducidos, procesados y analizados utilizando el software estadístico SPSS (v15). Se analizaron las diferencias más significativas entre los dos grupos de delecciones diferenciadas por el tamaño utilizando

Pruebas de grupos t de Student<sup>G</sup> para muestras independientes adaptadas para diferentes varianzas cuando fue necesario. Se calcularon los coeficientes rho de Spearman para determinar el grado de asociación lineal entre la calificación por tamaño de deleción y los múltiples tamaños asociados.

## Resultados

Se realizó el estudio sobre catorce pacientes. Seis de ellos (JS0103, 09, 12, 13 y 21) habían sido analizados anteriormente [3]. Según el análisis de cariotipo, 13 de los pacientes tenían deleción terminal 11q, y uno de los pacientes presentaba una deleción intersticial al final de 11q (11q 23.3–11q25). Siete de los pacientes eran hombres y siete eran mujeres. Las edades estaban comprendidas entre 6 y 25 años.

La Tabla 1 muestra los resultados de las pruebas cognitivas en los 14 pacientes, en orden descendiente según el tamaño de deleción. Se determinaron 17 parámetros. En algunos de los pacientes con los déficits más severos no se pudieron obtener resultados de todos los parámetros. La figura 1 muestra los puntos de ruptura para la deleción en la región distal 11q para los 14 pacientes, y la secuencia exacta de puntos de ruptura se muestra en la tabla adicional 1.

La figura 2 muestra la correlación entre el cociente intelectual total y el tamaño de la deleción ( $p < 0,001$ ). Los

(Nota de Tr.)

<sup>G</sup> Grupos t de Student es un procedimiento estadístico que permite el cálculo de medias para diferentes tipos de variables.

resultados de CI Total nos llevan a clasificar a los pacientes en dos grupos: los pacientes con las deleciones más pequeñas tienen un déficit cognitivo leve (de 64 a 81). El tamaño de la deleción en estos pacientes abarca desde 8,1 hasta 11,8 Mb. Los ocho pacientes con los tamaños de deleción más grande y el único paciente con deleción intersticial tenían los déficits cognitivos más graves, con resultados globales por debajo del nivel que se podía valorar de forma significativa ( $< 50$ ). Los ocho pacientes en este grupo con deleción terminal sufrían una pérdida comprendida entre 12,1 y 14,3 Mb. Un paciente con déficit cognitivo grave tenía una deleción intersticial que incluía toda la región perdida en los pacientes con las deleciones más grandes, así como parte de las regiones perdidas en los pacientes con déficit cognitivo leve. Se han manifestado estadísticamente diferencias significativas en la totalidad de los 17 parámetros valorados cuando comparamos los resultados de los pacientes con deleciones cuyo tamaño es de 11,8Mb o inferior, con aquellos cuyas deleciones son de 12,1 Mb o superiores (Tabla adicional 2).

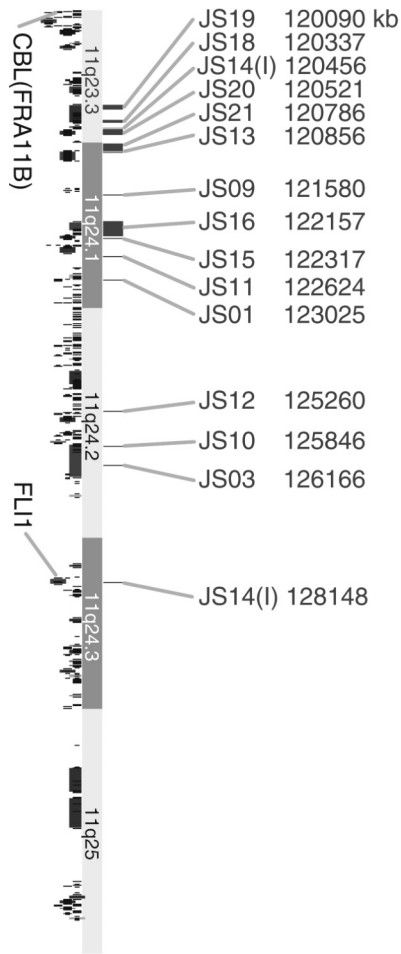
Entre los cinco pacientes con déficit leve, nuestro objetivo fue determinar si existían desequilibrios significativos de las funciones cognitivas entre ellos. Aunque las cifras son pequeñas, existe una significativa diferencia estadística para los valores de capacidad de atención (consistente en representación numérica y recuento aritmético) entre los tres pacientes con las deleciones más pequeñas (entre 8,1 y 9,1 Mb) comparados con los dos siguientes pacientes que sufrían deleciones ligeramente mayores (entre 11,4 y 11,8 Mb) pero que presentaban un leve déficit neurocognitivo global, y los nueve pacientes con déficit neurocognitivo severo. Ninguno de los parámetros restantes mostraban diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (por lo que no se muestran estos datos).

**Tabla 1** Resultados de las pruebas neurocognitivas de 17 parámetros en 14 pacientes

ID	Edad	Sexo	Del	FSIQ	VC	PO	FD	PS	VIQ	PIQ	Info	Sim	Arit	Voc	Com	DS	PC	Cd	PA	BD	OA	SS	Mz
JS19	10,4	V	14,3	40	50	50	50	50	46	46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	1
JS18	11,1	M	14	40	50	50	50	50	46	46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JS20	19,5	V	13,9	45	50	50	50	54	48	47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	1
JS21	13,8	M	13,7	40	50	50	50	50	46	46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JS13	11,2	V	13,6	40	50	50	50	50	46	46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	1	1
JS09	10,9	V	12,8	49	64	50	50	ND	59	46	4	5	1	3	1	1	1	1	1	1	1	ND	1
JS16	6,8	M	12,4	47	54	50	52	50	50	50	3	1	1	1	1	2	4	1	2	1	1	ND	1
JS15	14,5	V	12,1	40	50	50	50	50	46	46	1	1	1	ND	ND	ND	1	ND	ND	1	ND	ND	ND
JS11	19,8	M	11,8	64	74	65	63	68	68	65	5	7	3	4	6	3	4	3	7	4	2	4	4
JS01	19,1	M	11,4	66	82	62	55	68	73	63	6	8	2	4	8	3	5	4	6	3	4	3	2
JS12	6,7	M	9,1	81	79	90	81	104	74	91	7	6	3	2	9	10	10	10	7	8	8	11	5
JS10	13,8	M	8,6	73	93	56	72	88	89	73	8	11	5	7	9	5	3	7	1	2	4	8	4
JS03	25,3	V	8,2	70	74	72	71	68	73	72	7	5	5	4	5	7	5	4	7	6	4	3	5
JS14	7,6	V	INT	40	50	50	50	50	46	46	1	ND	1	1	ND	ND	1	ND	ND	1	ND	ND	ND

*Info* Información (conocimientos escolares), *Sim* Abstracción verbal (similitudes), *Arit* Cálculo matemático auditivo (aritmética), *Voc* Conocimientos Verbales (vocabulario), *Com* Razonamiento Social (comprensión), *DS* Atención auditiva simple (recuento de cifras), *PC* Atención visual (imágenes complejas), *Cd* Velocidad psicomotora (codificación), *PA* Razonamiento visual (acomodación de imágenes), *BD* Construcción visual-espacial abstracta (juego de construcciones), *OA* Construcción visual-espacial concreta (puzzles), *SS* Velocidad de procesado visual (búsqueda de símbolos), *Mz* Planificación/anticipación (laberintos), *MR* Razonamiento visual (matrices), *VIQ* Inteligencia verbal, *PIQ* Inteligencia manipulativa (visual-espacial, inteligencia sintética), *FSIQ* Cociente Intelectual Total (combinación de VIQ y PIQ), *VC* Indicador de comprensión verbal (factor verbal), *PO* Índice de organización perceptual (factor de organización visual-espacial), *FD* Capacidad de atención, *PS* índice de velocidad de procesamiento, *WM* Índice de memoria de trabajo

**Fig. 1** Los 16 Mb de la región terminal del cromosoma 11q. Los genes conocidos de la secuencia de referencia de NCBI se muestran bajo las bandas del cromosoma, junto a ellos se indican la localización de CBL (FRA11B) y FLI1. Se determinaron los puntos de ruptura para cada uno de los 14 pacientes con síndrome de Jacobsen mediante análisis de microarray y su localización cartográfica se indica a la derecha. El grosor de la marca que indica el punto de ruptura refleja el espacio que separa la última localización diploide de la primera haploide en cada paciente. El paciente JS14 tiene una deleción intersticial entre las dos localizaciones identificadas como JS14(l). El resto de los paientes tenían deleción terminal.



La figura 3 representa los genes identificados presentes en la región mínima de 300kb que delimita el grupo de deleciones más pequeñas ( $\leq 11,8$  Mb) del grupo con deleciones más grandes ( $> 12,1$  Mb): BSX, ASAM y HSPA8. Además se incluyen otros 18 genes comprendidos en la región distal de 2,2 Mb que separa los dos grupos de pacientes según el tamaño de deleción, un grupo de tres pacientes con deleciones más pequeñas y otro grupo de dos pacientes con deleciones mayores que presentan una deficiencia selectiva en la capacidad de atención (los datos no se muestran).

### Discusión

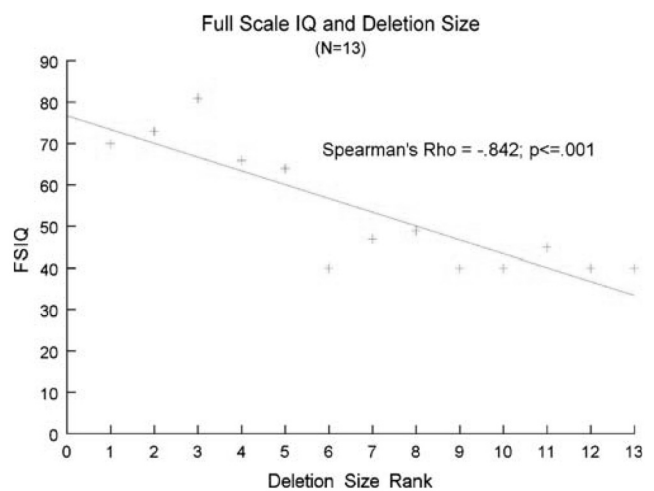
Nuestros estudios previos mostraban una fuerte correlación entre el grado de déficit cognitivo y el tamaño de la deleción en los pacientes 11q-, lo que implica la presencia en la región distal 11q de genes fundamentales para una función cognitiva normal. En el presente estudio, nuestros esfuerzos se han dirigido a la ejecución de un análisis preventivo en 14 pacientes 11q- para acotar con detalle las regiones críticas en la región distal 11q que continen genes implicados en la función cognitiva.

(Nota de Tr.)

<sup>ii</sup> Primordio es el estado rudimentario de un órgano en el periodo inicial de la organogénesis.

<sup>i</sup> Ratones knock out: son ratones modificados genéticamente a los que se suprime un determinado gen.

Los pacientes con las deleciones más grandes (al menos 12,1 Mb), así como el paciente con deleción intersticial, tenían un déficit cognitivo severo. Los cinco pacientes con tamaño de la deleción menor o igual a 11,8 Mb tenían un déficit cognitivo relativamente leve. Esto nos sugiere que hay un gen esencial para la función cognitiva global localizado en una zona de 300kb que separa los puntos de ruptura de los pacientes con déficit leve y deleciones menores (11,8Mb) y los de los pacientes con déficit severo y deleciones grandes (12,1 Mb); (Fig. 3). Hay tres genes identificados dentro de esta región de 300 kb [4]: BSX, un gen conservado evolutivamente cuya caja homeótica es específica de la función cerebral; HSPA8, perteneciente a la familia de proteínas de choque térmico 70kDa; y ASAM, un precursor molecular específico para la adhesión de adipocitos. Resulta interesante que, de estos tres genes, BSX se expresa de forma precoz durante el desarrollo cerebral en el diencéfalo ventral que dará lugar al hipotálamo y al primordio<sup>ii</sup> embrionario de la glándula pineal [5]. El gen BSX se sigue expresando en dichas estructuras durante la edad adulta. Los ratones con BSX ausente han demostrado tener un comportamiento locomotor alterado [6]. Aunque hasta ahora, los ratones knock out<sup>i</sup> a los que se suprimió BSX no han sido sometidos a pruebas cognitivas, las alteraciones que se observan en su comportamiento locomotor demuestran que las neuronas que expresan BSX presentes en el hipotálamo pueden, bien directa o indirectamente, afectar a la función cerebral o a sus estructuras superiores y, potencialmente, afectar a la función cognitiva.



**Fig. 2** Correlación entre el Cociente Intelectual total y el tamaño de la deleción para los 13 pacientes con deleción terminal en 11q. Se calcularon los coeficientes rho de Spearman para determinar el grado de asociación lineal entre la escala de deleciones y la de CI total.

Basándonos en los patrones de expresión evolutiva estudiados y en las funciones conocidas de BSX en ratones, proponemos BSX como el gen con mayores posibilidades para ser causante de las deficiencias cognitivas globales severas observadas en el subgrupo de pacientes 11q-. En consecuencia, los estudios que en el futuro se dirijan a

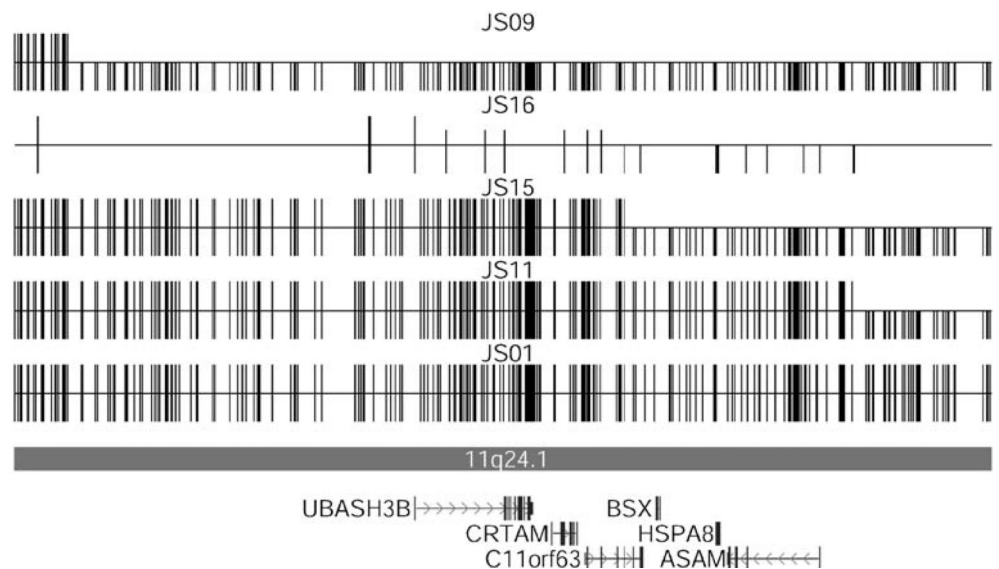
definir patrones específicos que involucren a BSX en la función cognitiva podían, en potencia, llevarnos al desarrollo de terapias innovadoras. Aunque los pacientes 11q- solo son haploinsuficientes<sup>J</sup> para BSX y no existen evidencias de que los ratones KO heterocigóticos<sup>K</sup> para BSX tengan un fenotipo evidente, existen antecedentes de esta circunstancia. Por ejemplo, la haploinsuficiencia para FOXL2 causa el Síndrome BPE (Blefaroptosis, Epicantus Inverso) mientras que en los ratones es necesario sufrir la delección de ambas copias de FOXL2 para que se manifieste el fenotipo [7,8].

Entre los cinco pacientes con déficit cognitivo leve, había una significativa relación inversa entre tamaño de delección y cociente intelectual total. Además, había una correlación inversa significativa entre el tamaño de la delección y un factor determinante de la función cognitiva, la capacidad de atención/memoria de trabajo, que consta de memoria auditiva y visual de cifras. En concreto, los tres pacientes con las delecciones menores (8,1–9,1 Mb) tenían unos índices de capacidad de atención/memoria de trabajo cercanos a la normalidad, mientras que los pacientes con las delecciones inmediatamente más largas (11,4–11,8 Mb), y

Mb centroméricos al telómero. Hay 18 genes conocidos dentro de este intervalo (no se muestran estos datos). Este o estos presuntos genes serían esenciales para permitir la totalidad de las funciones intelectuales y al menos un aspecto específico en concreto: la capacidad de atención auditiva. Así pues, la atención auditiva sería un requisito previo indispensable para optimizar la función intelectual en estos pacientes.

Un gen que se encuentra dentro de la región crítica distal de 2,2 megabases, Neurogranina, ha demostrado que tiene una función crítica en la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo en los ratones [9–12]. Resulta interesante que los ratones knock out modificados genéticamente para ser heterocigóticos a Neurogranina han manifestado deficiencias en el aprendizaje visual espacial, la sensibilidad al estrés y la resistencia a la ansiedad. Estas observaciones son análogas para los bajos índices en capacidad de atención y memoria de trabajo que hemos identificado solo en los pacientes 11q que son haploinsuficientes para Neurogranina. Los consiguientes estudios en ratones KO Neurogranina han demostrado que los individuos heterocigóticos, cuando son introducidos en

**Fig. 3** La región de 1,3 Mb en la sub-banda 11q24.1 del cromosoma contiene la región crítica de 300 kb. Los genes conocidos de la secuencia de referencia se muestran en la parte inferior del gráfico. Las localizaciones obtenidas mediante análisis de microarray están señaladas con líneas verticales. Los loci diploides se representan mediante líneas de doble altura y los loci haploides mediante líneas de media altura. Los pacientes JS09, JS16 y JS15 muestran una deficiencia neurocognitiva severa y sus puntos de ruptura se retraen hasta puntos centroméricos a BSX, HSPA8 y ASAM. Los pacientes JS11 y JS01 muestran déficit neurocognitivo leve o moderado y sus puntos de ruptura son teloméricos a dichos genes.



con un déficit neurocognitivo leve, mostraban un claro déficit selectivo en la capacidad de atención/memoria de trabajo (datos no mostrados). Los otros nueve pacientes, con déficit neurocognitivo severo también presentaban una notable dificultad en la capacidad de atención y la memoria de trabajo. Aunque solo hemos identificado cinco pacientes con deficit cognitivo leve, estos datos sugieren que podría haber un gen determinante de la capacidad de atención y la memoria de trabajo dentro de un intervalo de aproximadamente 2,2 Mb comprendidos entre 9,1 y 11,4

un entorno favorable (jaulas más amplias, juguetes novedosos, contacto con otros ratones y acceso a la rueda de ejercicios) experimentaban mejoras significativas en el déficit de aprendizaje y en el comportamiento. Se produjo un incremento asociado de los niveles de proteína neurogranina en el hipocampo cercano a los valores normales así como un incremento de la potenciación a largo plazo. Como era de esperar, los ratones KO homocigóticos no respondieron a los estímulos ambientales. Curiosamente los ratones tipo salvaje (aquellos con dos copias del gen Neurogranina) también incrementaron los niveles de proteína neurogranina cuando eran expuestos a un entorno de estimulación [13]. En consecuencia los pacientes 11q- haploinsuficientes para Neurogranina se beneficiarían de un entorno de aprendizaje estimulante o de cualquier otra intervención que pudiera incrementar los niveles de neurogranina en el hipocampo. Obviamente necesitamos

(Nota de Tr.)

<sup>J</sup> Haploinsuficiencia. Circunstancia que se da cuando son necesarios dos copias de un gen para expresar un fenotipo normal y una de ellos se ha perdido (p. ej. como consecuencia de una delección).

<sup>K</sup> Heterocigótico, genotipo expresado por la presencia de dos formas diferentes de un gen en el par de cromosomas homólogos.

estudiar más individuos con deleciones inferiores a 11,8 Mb para evidenciar el papel de la neurogranina como causa selectiva de discapacidad cognitiva en pacientes 11q-.

En resumen, hemos realizado un estudio completo de genotipo y fenotipo en 14 pacientes con trastorno por deleción terminal 11q. Los pacientes con un tamaño de deleción  $\geq 12,1$  Mb tienen discapacidad cognitiva global severa, mientras que los pacientes con tamaños  $\leq 11,8$  Mb tienen déficit cognitivo leve. Además, los datos obtenidos sugieren que los pacientes con tamaños de deleción  $\leq 1,8$  Mb pero  $\geq 9,1$  Mb, pueden sufrir una dificultad selectiva en la capacidad de atención. En conjunto, nuestros resultados implican al menos dos localizaciones que contribuyen a una disminución de la función cognitiva que se corresponde con el tamaño de la deleción. Proponemos que BSX, una proteína cerebral homeótica, es candidato crucial para la función cognitiva global y que la haploinsuficiencia de BSX sería necesaria y suficiente para causar retraso mental severo. También proponemos que la deleción de neurogranina, un gen esencial para la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo, produce el déficit de atención auditiva observado en la mayoría de los pacientes 11q-. Nuestros resultados aportan una importante información para realizar consejo genético con respecto al pronóstico cognitivo en base al tamaño de deleción. En concreto se prevee que los pacientes con tamaño de deleción de al menos 12,1 Mb sufran un déficit cognitivo global severo. Los pacientes con deleciones intersticiales distales en 11q que abarquen el gen BSX también se prevee déficit cognitivo severo, como sucedió con el único paciente de nuestro estudio que tenía una deleción intersticial que incluía BSX. Los estudios futuros deberán ser dirigidos a determinar el papel de estos genes candidatos en las dos regiones críticas en el desarrollo cognitivo y cómo su pérdida por deleción contribuye a manifestar el fenotipo cognitivo completo de los pacientes 11q.

**Reconocimientos** Los autores desean agradecer a todos los pacientes 11q- y a sus familias la participación en este estudio. Este estudio se realizó con el apoyo de PRIN 2005 y 2006 (OZ y ER), Fondazione Mariani y Fondazione CARIPO (OZ), The Carson Foundation (CC, DI),

NIH/NHLBI SCCOR P50 HL084923 (CC, DI), y la beca MO1-RR00827 para el General Clinical Research Center de la UCSD, del National Center of Research Resources de los Institutos Nacionales de Salud (PS).

## Referencias

1. Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14(6):701–713 Jun
2. Jacobsen P, Hauge M, Henningsen K, Hobolth N, Mikkelsen M, Philip J (1973) An (11;21) translocation in four generations with chromosome 11 abnormalities in the offspring. *Hum Hered* 23: 568–585
3. Grossfeld PD, Mattina T, Lai Z, Favier R, Jones KL, Cotter F, Jones C (2004) The 11q terminal deletion disorder: a prospective study of 110 cases. *Am J Med Genet A* 129(1):51–61 Aug 15
4. UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human>)
5. Cremona M, Colombo E, Andreazzoli M, Cossu G, Broccoli V (2004) Bsx, an evolutionary conserved Brain Specific homeobox gene expressed in the septum, epiphysis, mammillary bodies and arcuate nucleus. *Gene Expr Patterns* 4(1):47–51 Jan
6. Sakkou M, Wiedmer P, Anlag K, Hamm A, Seuntjens E, Ettwiller L, Tschöp MH, Treier M (2007) A role for brain-specific homeobox factor bxs in the control of hyperphagia and locomotory behavior. *Cell Metab* 5(6):450–463 Jun
7. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis /ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27(2):159–166 Feb
8. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131(4):933–942 Feb
9. Miyakawa T, Yared E, Pak JH, Huang FL, Huang KP, Crawley JN (2001) Neurogranin null mutant mice display performance deficits on spatial learning tasks with anxiety related components. *Hippocampus* 11(6):763–718
10. Fedorov NB, Pasinelli P, Oestreicher AB, DeGraan PN, Reymann KG (1995) Antibodies to postsynaptic PKC substrate neurogranin prevent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Eur J Neurosci* 7(4):819–822 Apr 1
11. Krucker T, Siggins GR, McNamara RK, Lindsley KA, Dao A, Allison DW, De Lecea L, Lovenberg TW, Sutcliffe JG, Gerendasy DD (2002) Targeted disruption of RC3 reveals a calmodulin-based mechanism for regulating metaplasticity in the hippocampus. *J Neurosci* 22:5525–5535
12. Pak JH, Huang FL, Li J, Balschun D, Reymann KG, Chiang C, Westphal H, Huang KP (2000) Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21):11232–11237 Oct 10
13. Huang FL, Huang KP, Wu J, Boucheron C (2006) Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *J Neurosci* 26(23):6230–6237 Jun 7