



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL FI DE GRAU

IDENTIFICACIÓ DE VARIACIÓ EN EL NÚMERO DE CÒPIES (CNVS), I INSERCIONS/DELECCIONS (INDELS) ASSOCIADES A MALALTIA MENTAL GREU EN FAMÍLIES AMB ELEVADA PREVALENÇA MITJANÇANT GENOTIPAT PER SNP ARRAY.

Maria Elisabet Bennasar Roman

Grau de Biologia

Facultat de Ciències

Any Acadèmic 2020-21

IDENTIFICACIÓ DE VARIACIÓ EN EL NÚMERO DE CÒPIES (CNVS), I INSERCIONS/DELECCIONS (INDELS) ASSOCIADES A MALALTIA MENTAL GREU EN FAMÍLIES AMB ELEVADA PREVALENÇA MITJANÇANT GENOTIPAT PER SNP ARRAY.

Maria Elisabet Bennasar Roman

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2020-21

Paraules clau del treball:

Malalties mentals greus, esquizofrènia, trastorn bipolar, trastorn depressió major, malalties complexes, heretabilitat, variants genètiques rares, SNP array, CNVs, ddPCR

Nom Tutor/Tutora del Treball: Cristòfol Vives Bauzà

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resum

Les malalties mentals greus - esquizofrènia, trastorn bipolar, trastorn esquizoafectiu i trastorn depressiu major – són comuns en la població general. Es tracta de malalties complexes causades per la interacció entre factors genètics i ambientals, que s'agrupen en famílies. Des del punt de vista genètic, aquestes malalties són el resultat de l'efecte combinat de variants comunes i rares. En aquest treball s'ha realitzat un estudi amb famílies amb elevada prevalença de malaltia mental greu per poder identificar variants rares degudes a variacions en el nombre de còpies (CNV), associades al fenotip psicòtic. Es varen analitzar dues famílies aplicant la tècnica del genotipat per SNP array. Els CNVs varen ser identificats amb el programa Genome Studio basat en l'algoritme *cnv-Partition*. El resultat fou: a) en la família 1 es trobaren dues duplicacions rares (DUP3p26.3 i DUP16p23.3) i dues deleccions rares (DEL3q28 i DEL13q31.2), b) en la família 2 s'identificaren sis duplicacions rares (DUP3q29, DUP4q35.2, DUP9p24.1, DUP11p14.2, DUP18q22.1 i DUP22q11.23) i tres deleccions rares (DEL6p21.33, DEL8p23.2 i DEL12q14.1).

Abstract

Serious mental illnesses - schizophrenia, bipolar disorder, schizoaffective disorder and major depressive disorder - are common in the general population. They are complex disorders caused by the interaction between genetic and environmental factors, that usually accumulate in families. From a genetic point of view, these diseases are the result of the combined effect of common and rare variants. In this work, we have focused in identifying specific rare variants due to copy number variations (CNVs) in families with a high prevalence of severe mental disorder. Two families were analysed using SNP array genotyping, The CNVs were identified using the Genome Studio software based on the *cnv-Partition* algorithm. The results obtained were: a) in family 1 we identified two rare duplications (DUP3p26.3 and DUP16p23.3) and two rare deletions (DEL3q28 and DEL13q31. 2), b) in family 2, there were six rare duplications (DUP3q29, DUP4q35.2, DUP9p24.1, DUP11p14.2, DUP18q22.1 and DUP22q11.23) and three rare deletions (DEL6p21.33, DEL8p23.2 and DEL12q14.1).

Índex

	Pàgina
Introducció	5-7
Hipòtesis i objectius	8
Material i mètodes	9 -15
1. Famílies analitzades.....	9
2. Extracció d'ADN de sang.....	10
3. Genotipat per SNP-array.....	10-11
4. Anàlisi de CNVs a partir de la tècnica SNP-array.....	11-13
5. Confirmació CNV per PCR digital (ddPCR).....	13-15
Resultats	16-22
Discussió	23-28
Conclusions	29-30
Bibliografia	31-34

Introducció

La salut mental és definida, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), com: "*un estat de benestar on l'individu se'n adona de les seves pròpies capacitats, pot fer front a les tensions normals de la vida, pot treballar de forma productiva i fructífera, i és capaç de fer una contribució a la seva comunitat*".¹ Però no tothom gaudeix de salut mental, ja que les malalties mentals suposen el 14% de la càrrega de malaltia a nivell mundial. A més, s'estima que fins el 25% de les persones pateixen una o més malalties mentals o del comportament al llarg de la seva vida.²

Pel que fa a les persones amb malalties mentals greus (MMG) - inclou esquizofrènia, trastorn esquizoafectiu, trastorn bipolar i trastorn depressiu major³ – tenen una taxa de mortalitat més elevada que la població general i una esperança de vida menor^{4,5}. Si bé, el suïcidi explica part d'aquesta reducció d'esperança de vida, actualment s'ha pogut demostrar que la comorbiditat explica el 60% de les morts en pacients amb MMG⁶. La comorbiditat és la coexistència de malaltia mental i malaltia física en una mateixa persona. Tot i que els problemes de salut física als quals són propensos els pacients amb MMG –malalties cardiovasculars, respiratòries o càncer, entre altres⁷-, són malalties que prevalen a la població general, l'impacte que tenen als individus amb MMG és significativament major⁸. També cal tenir en compte que els individus amb MMG estan sotmesos a medicació antipsicòtica –a diferència de la població general- la qual té efectes secundaris que afecten especialment a la funció hepàtica.

El trastorn depressiu major (TDM) és una malaltia debilitant que es caracteritza per almanco un episodi depressiu que dura com a mínim dues setmanes i que implica canvis clars en l'estat d'ànim, els interessos i el plaer, canvis en la cognició i símptomes vegetatius. Algunes de les formes de depressió són lleugerament diferents, o poden desenvolupar-se en circumstàncies úniques, com la depressió post-part o el trastorn afectiu estacional⁹. S'estima que la prevalença mitja de dotze mesos de TDM és aproximadament del 6%. Ara bé, la prevalença de la malaltia al llarg de la vida sol ser tres vegades major que la prevalença de dotze mesos, afectant a un de cada sis adults. Pel que fa a la freqüència a la qual es presenta el TDM segons el sexe de l'individu, en el sexe femení es duplica.¹⁰ L'etiologia del trastorn depressiu major és multifactorial i s'estima que la seva heretabilitat és aproximadament del 35%¹¹. A més, els factors ambientals, com l'abús sexual, físic o emocional durant la infància, estan fortament relacionats amb el risc de desenvolupar-ho.¹⁰ En la majoria dels casos la depressió pot ser tractada. Com abans s'iniciï el tractament, més efectivitat tindrà aquest. Per tractar-ho es sol utilitzar medicaments antidepressius, psicoteràpia o ambdues.

L'esquizofrènia és una malaltia mental crònica que afecta aproximadament a l'1% de la població mundial. Es tracta d'un síndrome amb un conjunt de signes i símptomes d'etiologia desconeguts, definits predominants pels signes observats de psicosi. La psicosi és un domini de símptomes presents en diferents malalties mentals, caracteritzada per la pèrdua de contacte amb la realitat. Pel que fa a l'esquizofrènia, en la seva forma més comú, es presenta amb delusions i al·lucinacions auditives al final de l'adolescència o principis d'edat adulta.¹² Les delusions són creences falses. Per exemple, pensar que et persegueixen. Aquestes creences són fixes i inclús persisteixen quan són refutades per la realitat. Per altra banda, les al·lucinacions auditives són experiències sensorials que no estan basades en estímuls reals. Per exemple, sentir veus que ningú més és capaç de sentir.¹³

Hi ha varis factors que poden contribuir al risc de que una persona desenvolupi esquizofrènia, entre ells considerem la genètica i l'entorn. Pel que fa a la genètica, l'esquizofrènia a vegades és hereditària. Això no implica que si un membre de la família pateix esquizofrènia els altres membres la pateixin, però sí que tinguin major probabilitat a desenvolupar la malaltia. Amb els anys s'ha demostrat que es tracta de la combinació de gens diferents que augmenten aquesta probabilitat, i no d'un gen per si sol. L'entorn, en combinació amb la genètica, pot potenciar l'aparició de la malaltia⁹, la qual és tractada amb medicaments antipsicòtics i/o tractament psicosocials.

El trastorn bipolar és una malaltia mental crònica que afecta a més d'un 1% de la població mundial. Aquesta malaltia és caracteritzada per fluctuacions en l'estat d'ànim i l'energia.¹⁴ La principal característica que separa els trastorns bipolars d'altres trastorns afectius és la presència d'episodis maníacs o hipomaniacs recurrents que poden alternar-se amb episodis depressius. En els episodis maníacs, una persona pot sentir-se molt feliç, irritable i/o optimista, i hi ha un augment en el nivell d'activitat. En els episodis depressius, la persona pot sentir-se trista, indiferent o desesperada, a més de mostrar un nivell d'activitat molt baix. Finalment, pel que fa als episodis hipomaniacs, són com els episodis maníacs, però menys greus i problemàtics.¹⁵

Depenent de la simptomatologia de l'individu es classificarà la malaltia en tres tipus bàsics de trastorn bipolar. El trastorn bipolar I, el trastorn bipolar II i el trastorn ciclotímic. El trastorn bipolar I es caracteritza per presentar episodis maníacs i, fins en el 75% dels episodis hi apareixen símptomes psicòtics, com els deliris i les al·lucinacions. El trastorn bipolar II es caracteritza per presentar episodis depressius alternats amb episodis hipomaniacs. Per darrer, el trastorn ciclotímic es caracteritza per estats depressius i hipomaniacs recurrents, d'una duració mínima de 2 anys, que no arriba al llindar de diagnòstic d'un episodi afectiu major.¹⁶

Es desconeix la causa exacte del trastorn bipolar. Ara bé, es sap que és una malaltia co-segregada en famílies¹⁷ i que es tracta d'una malaltia complexa. Una malaltia complexa és aquella que es causada per factors genètics, factors ambientals i la combinació entre ells. Per diagnosticar el trastorn bipolar un metge pot fer un examen físic complet, demanar proves mèdiques per descartar altres possibles malalties i remetre a la persona per una avaluació psiquiàtrica. El psiquiatra diagnostica el trastorn bipolar basant-se amb els símptomes, el transcurs de la seva vida i les experiències de la persona afectada. Un cop diagnosticada la malaltia, aquesta es tracta amb medicaments, psicoteràpia o ambdues. El fàrmac més comú que se'ls recepta és el liti, un estabilitzador de l'estat d'ànim que ajuda a evitar episodis anímics o reduir la seva gravetat si ocorren. ¹⁵

Per tant, les MMG són malalties mentals comuns en la població general que comparteixen les característiques de ser malalties complexes i amb una heretabilitat elevada. Des d'un punt de vista genètic, totes les MMGs de manifestació en famílies amb elevada prevalença tenen una base genètica compartida –la qual té una arquitectura genètica formada per variabilitat genètica comú i variabilitat genètica rara. Les variants rares són molt penetrants i tenen un impacte major en el fenotip. Entre aquestes variants rares hi trobem els SNVs (Single Nucleotide Variants) i els CNVs (Copy Number Variants). Aquest treball s'ha centrat en identificar CNVs que segreguin amb psicosis en famílies amb elevada prevalença, amb la finalitat de determinar si aquests CNVs poden estar relacionats amb la malaltia.

S'entén per CNV els trams de nucleòtids més llargs d'1kb –a vegades més petits- que són eliminats, insertats o duplicats¹⁸. Pel que fa a la importància de la mida dels CNVs, tot i que els de mida menor solen associar-se amb malalties genètiques, el factor mida no pot utilitzar-se com a predictor de patogenicitat per si sol¹⁹. Per tant, no tots els CNVs són patogènics, sinó que també són una font de variabilitat; ara bé, els subjectes afectats per malalties complexes presenten un nombre major de CNVs en comparació amb la població normal²⁰. Per altra banda, la freqüència de CNVs ja s'ha vist associada positivament amb la complexitat fenotípica de malalties genòmiques, com la discapacitat intel·lectual. *

Tal i com s'ha indicat anteriorment, l'arquitectura genètica de les MMGs es caracteritza per ser una combinació entre variants comuns i rares^{21,22}. Però encara no es comprèn bé aquesta arquitectura, motiu pel qual s'ha realitzat aquest estudi on s'han aplicat tècniques de la genòmica de sistemes per comprendre millor el genotip de les malalties mentals i la seva relació amb el fenotip.

Hipòtesis i objectius

Hipòtesis: : L'acumulació de variabilitat genètica rara en forma de variació en el número de còpies (CNVs, per les seves sigles en anglès *Copy Number Variants*) és un factor de risc associat a la manifestació de MMG. Estudis amb famílies amb elevada prevalença de MMG permetrà determinar la correlació entre presència de CNVs, manifestació de MMG i severitat del fenotip clínic.

Objectius: OP (Objectiu Principal) i OE (Objectius Específics)

OP: Determinar la incidència de CNVs associats a manifestació de MMG en famílies amb elevada prevalença i estudiar la possible correlació entre els CNVs i la severitat del fenotip clínic.

OE.1. Genotipar, mitjançant matrius de polimorfismes de nucleòtid únic (SNP-Array), individus tant afectes com sans de 12 famílies amb elevada prevalença de MMG.

OE.2. Identificar els CNVs presents en cada membre de la família i determinar l'associació d'aquests CNVs amb els fenotips clínics de MMG.

Material i mètodes

1. Famílies analitzades

El present treball pretenia analitzar 14 famílies amb elevada prevalença de MMG –veure annex, **figures 1-14-**, però per motius associats a la pandèmia i al retràs en els permisos per poder accedir a les instal·lacions IdISBa, finalment només s'han pogut analitzar 2 d'aquestes famílies –veure annex, **figures 13-14-** de les quals ja es tenien les mostres genotipades.

La família 1 (veure annex, **figura 13**) –de Mallorca- va ser reclutada a partir d'una mare (subjecte 3) amb símptomes de psicosis –episodis depressius i maníacs alternats acompanyats d'ideació delirant de tipus paranoic. L'any 1985 s'iniciaren els símptomes després d'haver donat a llum a les seves filles bessones. A part de les bessones –subjectes 10 i 11- la mare té tres fills més –subjectes 7, 8 i 9-. El subjecte 7 presenta esquizofrènia des dels 19 anys, el subjecte 8 començà a tenir símptomes psicòtics quan tenia 16 anys i es suïcidà l'any 2014; i el subjecte 9 començà a presentar símptomes als 14 anys. Als tres membres, se'ls diagnosticà esquizofrènia. Les filles bessones, no presenten cap símptoma psicòtic. Pel que fa als antecedents familiars, el subjecte 3 tenia un germà que morí de cirrosi per alcoholisme (subjecte 304), un oncle amb autisme i psicosis (subjecte 203), un altre oncle amb malaltia mental i epilèpsia (subjecte 206) i una cosina amb ansietat (subjecte 6). El subjecte 6 té una filla afectada per trastorn bipolar (subjecte 12). El pare de la nina (subjecte 5) està diagnosticat de trastorn depressiu major.

Al llarg d'aquest treball es parlarà d'individus amb psicosis si pateixen esquizofrènia o trastorn bipolar, e individus malalts mentals no psicòtics (MMNP) si pateixen trastorn depressiu major.

Es van poder obtenir mostres de sang d'un total de **12 membres** (subjectes: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 i 12). D'aquests 12 subjectes **5 membres** presenten **psicosis** -*subjectes 3, 7, 8, 9 i 12-* i **3 membres** són **MMNP** –*subjectes 1, 2 i 6-*.

La segona família (veure annex, **figura 14**) és una família molt gran multigeneracional amb una elevada prevalença de malaltia mental provinent de “Las Alpujarras”, una regió amb taxes de prevalença d'esquizofrènia que dupliquen a les de la resta de l'Estat Espanyol.⁵¹⁷ Una branca de la família viu a Mallorca. En total es varen obtenir mostres de sang de **34 membres** (subjectes: 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 2-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17, 1-18, 1-19, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, 1-26, 1-27, 2-28, 3-29, 3-30, 3-31, 4-32, 3-33 i 3-34). D'aquests 34 membres, **9 membres** són **psicòtics** (*subjectes 1-2, 1-6, 3-11, 3-12, 1-18, 1-19, 1-25, 3-30 i 3-31*) i **11** són **MMNP** (*subjectes 1-1, 1-3, 1-5, 3-9, 3-10, 3-13, 4-15, 1-20, 1-22, 1-24 i 1-27*).

2. Extracció d'ADN de sang.

La sang es va recollir amb tubs BD Vacutainer (amb EDTA) i es va guardar a la gelera fins l'extracció de l'ADN. Es va extreure l'ADN utilitzant el següent kit: MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood version II (MB711400, Lucigen), seguint el protocol Buffy Coat, en el qual s'aïlla per centrifugació la fracció leucocitària.

En el protocol següent, primer es varen centrifugar les mostres de sang i es va separar la fracció de buffy coat – on es troben les cèl·lules blanques de la sang – per la seva extracció d'ADN. Un cop separades les cèl·lules blanques dels eritròcits i el sèrum, es posà Red Cell Lysis per rompre les membranes plasmàtiques de les cèl·lules. Mesclada la solució i deixada a temperatura ambient uns 10 minuts, es centrifugà i es tirà el sobrenedant. El pellet es va resuspendre amb Tissue and Cell Lysis –per acabar de rompre les membranes plasmàtiques- i MPC –que degrada les proteïnes-. Aquesta solució es centrifugà i el sobrenedant es posà amb isopropanol –per a que l'ADN precipiti-. Un cop precipitat l'ADN, la solució es centrifuga 10.621G i 4°C, on llavors es tirà el sobrenedant i es quedà el pellet. Al qual es van fer dos rentats amb etanol 70°C per llevar possible impureses. El pellet es deixà eixugar a l'estufa a uns 50°C i llavors es resuspenguè amb TE Buffer. Les mostres es varen deixar a temperatura ambient tot el vespre i al dia següent es varen quantificar.

Les mostres es varen quantificar amb el nanodrop i es tingué en compte que totes les mostres tinguessin un rati A260/280 aproximat a 1.8 –és el rati de qualitat estàndard pels àcids nucleics. Un cop quantificades, les mostres es varen guardar al congelador a -20°C.

Un cop extret l'ADN de totes les mostres, aquestes es varen preparar a una concentració de 50 ng/μL a un volum de 20 μL, dins una placa de 96 pouets i s'envià a genotipar al Centre Nacional de Genotipat (CEGEN, Madrid).

3. Genotipat per SNP-array

Es genotipà al Centre Nacional de Genotipat (CEGEN, Madrid). La tècnica SNP-Array es va utilitzar amb el propòsit d'identificar delecions i/o duplicacions que poguessin estar implicades en la manifestació de les malalties mentals greus estudiades. Els passos bàsics de la tècnica SNP-Array són: amplificació, fragmentació, precipitació i resuspensió de l'ADN, hibridació de l'ADN amb seqüències complementàries marcades i obtenció d'imatges.

Pel que fa a la hibridació, els fragments d'ADN genòmic són hibridats amb nucleòtids marcats. Els nucleòtids C/G és marquen amb dinitrofenol (DNP) i els nucleòtids A/T amb biotina. Un cop finalitzada la hibridació, les mostres es tracten amb anticossos primaris –anti-DNP-vermell

pels nucleòtids C/G i estreptavidina-verd (SA) pels nucleòtids A/T- i amb els seus respectius anticossos secundaris –anti-estreptavidina-biotina (anti-SA) i anti-AB-DNP. La fluorescència que emeten els anticossos secundaris és captada per un sistema làser confocal de dos colors (sistema iScan). Per tant, els locus amb C i/o G emetran una fluorescència vermella i els locus amb A i/o T verda.

4. Anàlisi de CNVs a partir de la tècnica SNP-Array

Es varen utilitzar les dades del SNP array per detectar possibles CNVs de mida gran (a partir d'unes 100.000 parelles de bases) mitjançant el software Genome Studio i l'algoritme *cnvPartition*.

4.1. Algoritme *cnvPartition* del Genome Studio

Per poder detectar els CNVs s'utilitzà l'algoritme *cnvPartition* del Genome Studio. Aquest algoritme es basa en dos paràmetres: la freqüència de l'al·lel B (BAF) i el ratio Log R (LRR). L'ús dels dos paràmetres junts permet comprovar la qualitat de les mostres i comprovar la presència de CNVs.

La BAF és una mesura del desequilibri al·lèlic. En una mostra ben genotipada s'esperen tres genotips: AA homozigot, AB heterozigot i BB homozigot. Cada genotip presenta dos al·lells, on un és provinent del pare i l'altre de la mare. Si es refereix a l'al·lel B, els valors de BAF esperats són: 0, 0.5 i 1, respectivament. La FAB del genotip AA serà 0 perquè l'al·lel B no està present, en el genotip AB la FAB serà 0.5 perquè l'al·lel B està present en una proporció 1:2 i en el genotip BB la FAB serà 1 perquè l'al·lel B està present en una proporció 2:2. Les alteracions poden ser causades per la presència d'un CNV, o bé una mala qualitat del genotip –motiu pel qual és important l'ús dels dos paràmetres junts

El LRR és una mesura d'intensitat relativa. Aquest valor s'obté normalitzant el valor R, que és la suma de les intensitat de les sondes utilitzades per genotipar els diferents marcadors.

Per tant, en l'hipotètic cas de que les mostres tinguessin una deleció en algun locus del genoma, el que s'esperaria veure és: per una banda una reducció d'intensitat relativa i l'absència de BAF en la zona de deleció. Per altra banda, en l'hipotètic cas de que les mostres tinguessin una duplicació en algun locus del genoma, el que s'esperaria veure és: un augment de la intensitat relativa i la presència de noves FAB en relació del tipus de genotip que s'hagi duplicat. Per exemple, una duplicació ABB tindria una FAB 0.6 aproximadament, ja que la proporció de l'al·lel B en aquest genotip és 2:3.

4.2. Protocol anàlisi dades mitjançant Genome Studio

El centre nacional de genotipat (CEGEN) envià una carpeta amb els resultats. Els passos seguits per analitzar les dades en el programa Genome Studio 2.0 van ser: *File > New Project > Genotyping > Create > Seleccionar carpeta > Load Samples > Manifest (seleccionar el document amb extensió “.bpm”) > Data Repository (seleccionar carpeta ScanData) > Directoris in Repository (seleccionar les 3 opcions) > Add > Import cluster positions (seleccionar el document “.egt”) > Finish*

Acabats aquests passos tardà uns 30 minuts en processar tota la informació de la carpeta i analitzar els SNPs. Llavors sortí una vinyeta on es demanà: “Voleu actualitzar les estadístiques del SNP per tots els SNPs?”. Seleccionar “Sí”. Fet aquest pas, el programa tardà uns 20 minuts més en realitzar l'anàlisi. Finalitzat, es continuà amb: *Analysis > CNV Analysis > Create New CNV Analysis > cnv-Partition 3.2.0 > Calculate > Current CNV Analysis > Save Project*. Guardat el projecte: *Analysis > Reports > Custom Report > CNV Region Report > CNV Analysis File (seleccionar el document “.bin”) > Nombrar i guardar el document > Finish*.

Fets tots els passos descrits, al entrar a la carpeta inicial aparagué un nou document: “*custom.txt*” on estaven els resultats de l'anàlisi dels CNVs. Per poder modificar les dades, el document es va obrir amb Excel. Els valors obtinguts varen ser: identificació de la mostra (“*Sample ID*”), el cromosoma on es troba el possible CNV (“*Chr*”), l'inici del possible CNV (“*Start*”), el final del possible CNV (“*End*”), el valor del CNV (“*CNV Value*”) i la confiança del CNV (“*CNV Conf*”).

4.3. Filtratge dels CNVs

Un cop obtinguts els possibles CNVs presents a les mostres, cal comprovar que són CNVs i no artefactes -factors que pertorben la correcta interpretació dels resultats, com per exemple: genotipat incorrecte, mala cobertura de SNPs, contaminació de la mostra, etc. Per tant, es varen seguir els següents passos:

1. Identificar els noms de les mostres amb les identitats dels pedigrís i separar les dues famílies.
2. En cada una de les famílies:
 - a. Determinar la mida dels CNVs – la diferència entre el final del CNV i el seu inici.
 - b. Filtrar CNVs per mida –només tenir en compte els CNVs majors a 80.000 parell de bases.
 - c. Eliminar els CNVs amb un CNV valor igual a 2 –ja que no hi ha cap tipus de deleció o inserció, observar la **figura 15** de l'annex.

3. Llavors, es tornà al Genome Studio per comprovar la validesa dels CNVs identificats i evitar artefactes.
 - a. Les instruccions seguides al Genome Studio per veure marcadors en cromosomes i poder avaluar BAF i LRR, foren:
 - i. *Tools > Show Genome Viewer > Seleccionar les mostres i els paràmetres (B allele freq i Log R ratio) > Add to favourite > Ok > View > Chromosome Browser*
4. Un cop seleccionat “*Chromosome Browser*” ja es va poder comprovar la validesa dels CNVs mitjançant els dos paràmetres de cnvPartition – BAF i LRR.

A l'annex s'adjunten figures representatives de mostres genotipades amb baixa qualitat (**figura 16-A**), amb bona qualitat on es confirma la validesa del CNV –tant per duplicació com per deleció- (**figura 16-B,C**) i amb bona qualitat però on no es confirma la validesa del CNV (**figura 16-D**).

Un cop seleccionats els CNVs vàlids: 1) Es comprovà la seva segregació en el pedigrí. 2) Es comprovà a CNVxplorer²³, DECIPHER²⁴ i Genome Browser²⁵ –bases de dades-: a) si el CNV s'havia descrit prèviament, b) si havia algun CNV en la mateixa regió, c) la freqüència del CNV per confirmar que són variants rares – s'esperen freqüències baixes, i d) es cercà si s'havia associats el CNV al fenotip estudiat – la psicosis.

5. Confirmació CNV per PCR Digital (ddPCR)

Els CNVs vàlids es van confirmar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) digital de gota.

La idea bàsica de la ddPCR és contar el nombre de molècules d'ADN amplificades en una reacció PCR que s'ha dividit en múltiples reaccions diferents. Per dur a terme la ddPCR és necessària una alta dilució de les mostres per a que cada reacció hagi 0 o 1 molècula d'ADN seguint una distribució de Poisson. Llavors, donat el nombre total de reaccions en què s'ha dividit la mostra i utilitzant l'estadística de Poisson és possible estimar la quantitat total d'ADN.

Per aconseguir una sola molècula d'ADN en cada reacció es dugué a terme la ddPCR de gotetes. La idea és: a partir d'una barreja mestra amb reactius i mostra, aconseguir milers de reaccions paral·leles (particions) mitjançant gotetes d'aigua en oli (ddPCR Droplet Reader Oil). De manera que en cada goteta hi hagi els reactius necessaris per a que la PCR es pugui dur a terme en cas de que hi hagi una molècula d'ADN. Aquestes particions s'aconsegueixen a través del generador de gotes QX200 de BioRad, que genera al voltant de 20.000 gotetes a partir de de 20 µL de barreja mestra.

Un cop amplificat l'ADN, en el termociclador c1000 Touch de BioRad, el producte de la PCR es llegit per un citòmetre de flux de gotes, el QX200™ Droplet Reader de BioRad. Aquest lector de gotes desempaqueta les gotes emulsionades i les fa passar en fila índia per un sistema de detecció òptica de dos colors de forma seriada. Cada reacció amb una molècula d'ADN amplificada la compta com a positiva (1), mentre que l'absència de molècula d'ADN ho compta com un negatiu (0). El citòmetre reconeix les gotetes amb ADN amplificat, perquè la barreja per a la PCR contenia el fluorocrom SybrGreen que s'intercala entre la doble cadena de l'ADN així com es va replicant. Per tant, només les gotetes amb presència d'ADN emetran fluorescència.

5.1. Procediment

Abans de la ddPCR, l'ADN genòmic (ADNg) de cada membre de la família es va digerir durant 1 hora a 37°C amb l'enzim de restricció Hind III. La barreja utilitzada va ser: 1000ng d'ADNg, 1µL de Hind III HF, tampó Cut Smart i H₂O en un volum final de 20µL.

Un cop digerit l'ADNg, es varen preparar les barreges mestres de PCR per a cada objectiu analitzat. La barreja contenia: DdPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) 1X, Primer Target Forward (900nM), Primer Target Reverse (900nM), Primer Reference Forward (900nM), Primer Reference Reverse (900nM), sonda FAM (Target) i sonda VIC (Reference) (500nm), H₂O i DNA de la mostra, en un volum final de 20µL.

Després, la barreja mestra es va partir en gotes mitjançant ddPCR Droplet Reader Oil i del generador de gotes QX200 de BioRad. Llavors la PCR es realitzà en el termociclador c1000 Touch de BioRad amb les següents condicions de cicle: desnaturalització inicial a 95°C durant 10 minuts, seguida de 39 cicles a 94°C durant 30 segons, una extensió a 57°C durant 1 minut i amb una desnaturalització final a 98°C durant 10 minuts. Finalment, el producte de la PCR va ser analitzat pel citòmetre de flux de gotes, el QX200™ Droplet Reader de BioRad.

5.2. Gel d'agarosa i electroforesis vertical

Un cop amplificades les mostres, aquestes es varen córrer en gels d'Agarosa 2% -a major concentració d'agarosa en el gel, els amplicons corren amb major dificultat i podem observar amplicons de major pes molecular.

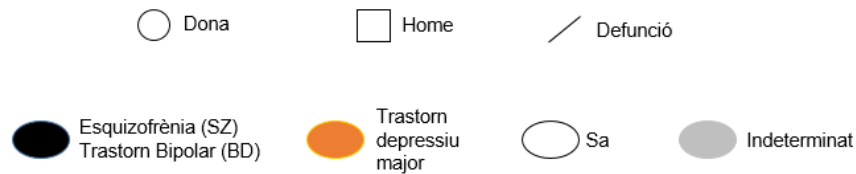
Per preparar el gel d'Agarosa 2% es mesclà 2 grams d'agarosa en 100 mL de Buffer TAE-1X i s'encalentí – l'agarosa en temperatura ambient es solidifica- i s'afegí intercalant d'ADN –el Midori Green Advance. Esperats uns 20 minuts per a la seva solidificació, el gel es col·locà dintre de la safata d'electroforesis amb Buffer TAE-1X i es carregaren les mostres. Es tapà la

safata i es connectà a una font d'electroforesi a 100V durant 40 minuts. La mostra va córrer del pol negatiu al pol positiu ja que l'ADN està carregat negativament.

Per les mostres amb deleción s'esperarà no veure cap banda a la zona delecionada, i en el cas de la duplicació, veure una banda més gruixada a la zona duplicada

Resultats

Els pedigrís adjuntats segueixen la següent llegenda:



Família 1

Es van identificar i validar per ddPCR –veure annex, **figura 17** - **cinc CNVs** que afecten als membres de la família 1: **tres duplicacions** rares (DUP3p26.3, DUP16p23.3 i DUP6q27) i **dues deleccions** rares (DEL3q28 i DEL13q31.2). Ara bé, la DUP6q27 no és segregada en aquest pedigrí.

Tal i com es pot observar a la **figura A**, els quatre CNVs identificats segreguen entre els pacients psicòtics.

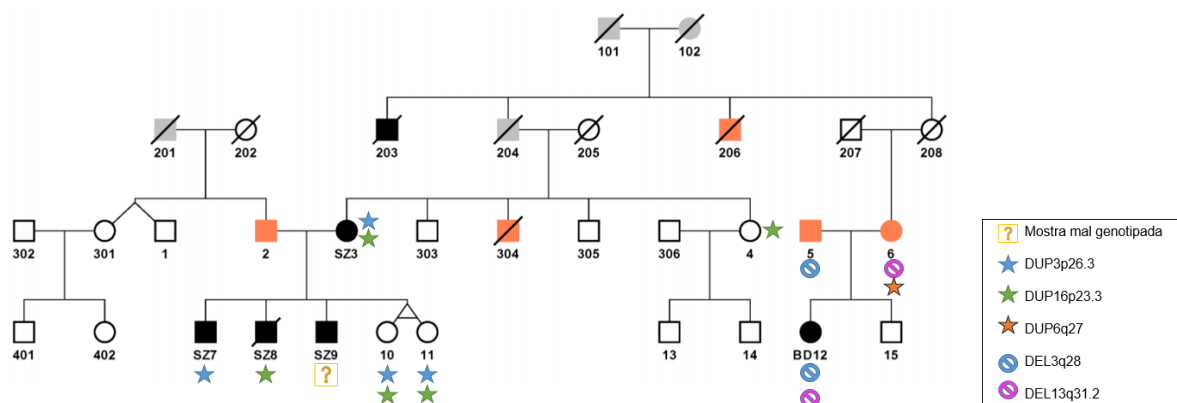


Figura A. Representació del pedigrí de la família 1 amb els fenotips i CNVs identificats de cada membre.

En aquesta família s'han identificat dues arquitectures genètiques diferents. El primer cas inclou els subjectes 3, 4, 7, 9, 10 i 11; el segon cas inclou els subjectes 5, 6 i 12. En el primer cas, la psicosis és altament influenciada per la combinació de dues duplicacions (DUP3p26.3 i DUP16p23.3). Tot i que la presència d'aquesta variant no determina la presència de malaltia, ja que els subjectes 10 i 11 –germanes bessones– són portadores d'ambdós CNVs i no presenten cap tipus de símptoma psicòtic. Pel que fa a presència de CNV associada a fenotip: la DUP3p26.3 la presenten l'individu 3 –la mare-, l'individu 7 –un fill- i els subjectes 10 i 11 –

filles bessones de l'individu 3. Dels 4 individus, 2 presenten fenotip psicòtic. Per altra banda, la DUP16p23.3 està present en l'individu 3, l'individu 4 –germana del subjecte 3-, l'individu 8 –un fill del subjecte 3- i els subjectes 10 i 11. Dels 5 individus que porten la duplicació, només 2 (individu 3 i 8) presenten fenotip psicòtic.

Per altra banda, la segona branca de la família és portadora de dues delecions (DEL3q28 i DEL13q31.2) i una duplicació (DUP6q27). Tots els membres amb presència de CNV presenten fenotips associats a MMG. Interessantment, la única pacient amb psicosis (subjecte 12) ha heretat la DEL3q28 del seu pare (subjecte 5, MMNP) i la DEL13q31.2 de la seva mare (subjecte 6, MMNP). Finalment, la DUP6q27 tan sols està present al subjecte 6, qui presenta un fenotip MMNP.

Un cop validats els CNVs per *cnv-Partition* i comprovat a la base de dades CNVxplorer que totes les variants identificades eren rares (freqüències al·lèliques inferiors al 1%, MAF<1%); es realitzà una recerca dels gens afectats per aquests CNVs. S'utilitzà les bases de dades: CNVxplorer²³, DECIPHER²⁴ i Genome Browser²⁵.

Gen	Banda citogenètica	Inici	Final	Mida CNV (pb)	Freqüència	Individus
Duplicacions						
CNTN6	3p26.3	1159787	1781739	621952	0.00118	3, 7, 10, 11
CDH13	16p23.3	82180075	83664582	1484507	0.00016	3, 4, 8, 10, 11
AFDN	6q27	168347396	168610954	263558	0.01111	6
Delecions						
OSTN, UTS2B	3q28	190923593	191020382	96789	0.00792	5, 12
SLITRK5	13q31.2	87510992	87714256	203264	0.00016	6, 12

Família 2

Es van identificar i validar per ddPCR **nou CNVs** que afecten als membres de la família 2: **sis duplicacions** rares (DUP3q29, DUP4q35.2, DUP9p24.1, DUP11p14.2, DUP18q22.1 i DUP22q11.23) i **tres delecions** rares (DEL6p21.33, DEL8p23.2 i DEL12q14.1).

A les **figures B, C i D** es poden observar la segregació dels CNVs identificats.

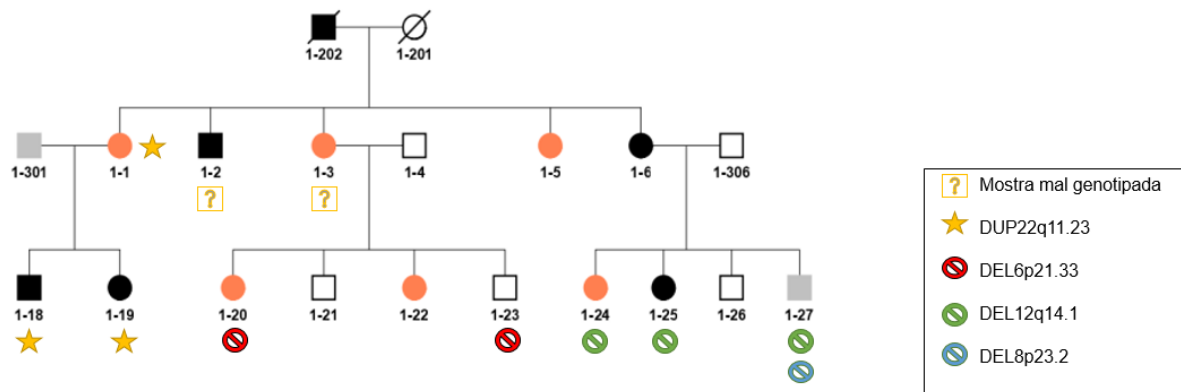


Figura B. Representació del pedigrí de la subfamília 1 de la família 2 amb els fenotips i CNVs identificats de cada membre.

A la subfamília 1 s'han observat 4 estructures genètiques diferents definides per la DUP22q11.23, la DEL6p21.33, la DEL12q14.1 i la DEL8p23.2. La mare 1-1 és portadora de la DUP22q11.23 i l'ha transmesa als seus dos fills (subjectes 1-18 i 1-19). Els tres subjectes presenten fenotips de MMG, tot i que la mare presenta un fenotip MMNP i els fills fenotip psicòtic. La DEL6p21.33 està present en els individus 1-20 i 1-23 –germans- on el 1-20 presenta un fenotip MMNP i el 1-23 està sa. Per tant, la presència d'aquesta variant no determina la presència de malaltia o si ho fa presentaria penetrància incompleta. La mare d'aquests dos individus (1-3) també presenta un fenotip MMNP, i podria ser que també presentés el CNV, però la mostra no es va genotipar correctament i no ho hem pogut demostrar en el context d'aquest treball. Per altra banda, l'individu 1-22 (germana dels subjectes 1-20,1-23 i filla d'1-3) presenta un fenotip MMNP, però no presenta la delecio identificada en els seus germans. La DEL12q14.1 està present als individus 1-24, 1-25 i 1-27, germans. El membre 1-24 presenta un fenotip MMNP, 1-25 un fenotip psicòtic i 1-27 és un subjecte indeterminat, del qual no disposam de dades fenotípiques. La DEL8p23.2 només està present a l'individu 1-27.

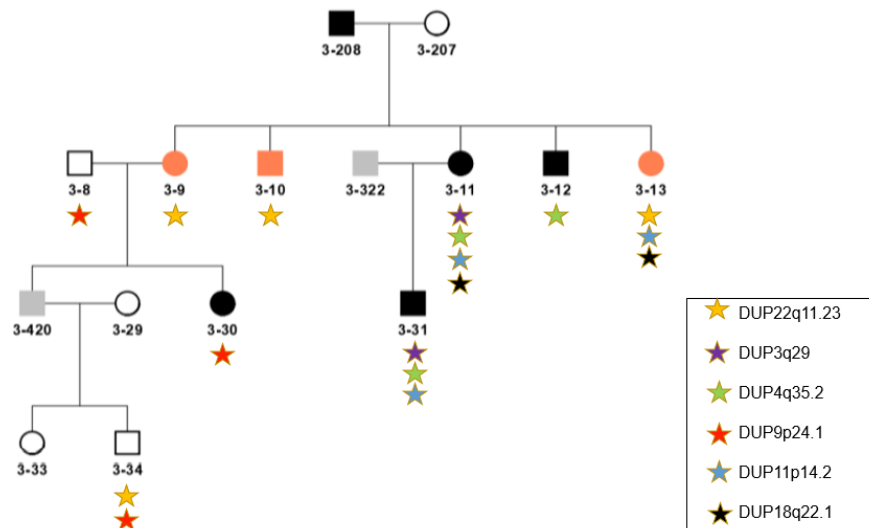


Figura C. Representació del pedigrí de la subfamília 3 de la família 2 amb els fenotips i CNVs identificats de cada membre.

A la subfamília 3 s'han observat 2 estructures genètiques diferents: les associades a les DUP22q11.23 i DUP9p24.1 per una banda; i la combinació de les duplicacions DUP3q29, DUP4q35.2, DUP11p14.2, DUP18q22.1 i DUP22q11.23, per altra banda.

En el primer cas: la DUP22q11.23 està present a la subjecte MMNP 3-9, que la degué transmetre al seu fill (subjecte 3-420, que no es va poder estudiar) i aquest la va passar al seu fill, subjecte 3-34, individu no afecte. Aquest individu 3-34 també és portador de la DUP9p24.1, heretada també del seu pare (3-420), que alhora la va heretar del seu progenitor (subjecte 3-8), individu extern del nucli familiar. Aquest pare 3-8 també va transmetre la DUP9p24.1 a la seva filla psicòtica (subjecte 3-30). Aquesta segregació familiar dificulta predir la contribució d'aquesta duplicació a la manifestació de la psicosi.

En el segon cas: la DUP22q11.23 està present als germans 3-9, 3-10 i 3-13, tots tres presenten fenotip MMNP. Destaca en aquesta branca familiar la mare psicòtica 3-11, ja que és portadora de quatre duplicacions: DUP3q29, DUP4q35.2, DUP11p14.2 i DUP18q22.1, de les quals n'ha transmès tres al seu fill psicòtic 3-11 (DUP3q29, DUP4q35.2 i DUP11p14.2) A més a més, la DUP4q35.2 també l'ha heretada el germà psicòtic de 3-11, 3-12. La DUP11p14.2 també l'ha heretada la subjecta 3-13, MMNP. Pel que respecta a la DUP18q22.1 està present a les germanes 3-11 (psicòtica) i 3-13 (MMNP). Per tant, els individus que presenten almanco una d'aquestes duplicacions presenta un fenotip de MMG.

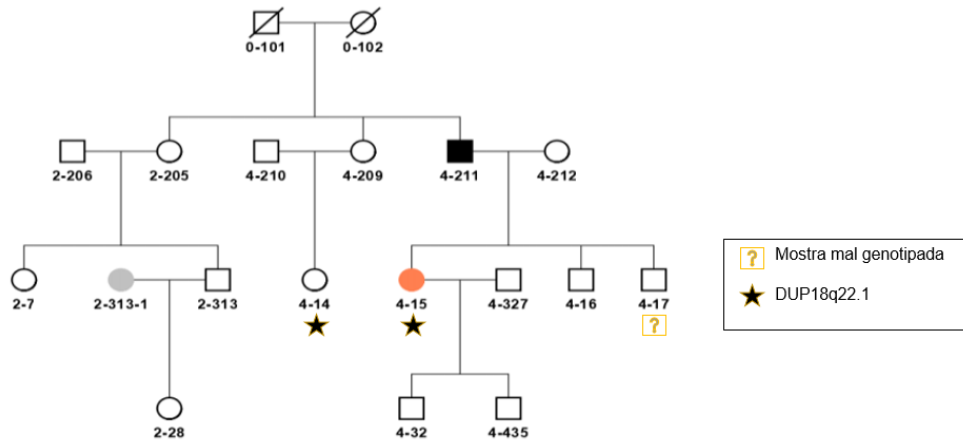


Figura D. Representació del pedigrí de la subfamília 4 de la família 2 amb els fenotips i CNVs identificats de cada membre.

A la subfamília 4 s'ha identificat una estructura genètica on hi intervé la DUP18q22.1, present en els individus 4-14 (sà) i 4-15 (MMNP) –cosines-.

A continuació s'adjunta una taula amb les característiques de cada una de les duplicacions i delecions identificats en aquesta família 2.

Gen	Banda citogenètica	Inici	Final	Mida CNV (pb)	Freqüència	Individus
Duplicacions						
DLG1, DLG1-AS1, BDH1, MIR4797, LINC02012	3q29	196884391	197303926	419535	0.000168	3-11, 3-31
FRG1-DT	4q35.2	190685303	190790811	105508	0.001013	3-11, 3-12, 3-31
KDM4C	9p24.1	6973166	7094860	121694	0.000675	3-8, 3-30, 3-34
FIBIN,BBOX1	11p14.2	27000266	27101170	100904	-	3-11, 3-13, 3-31
LOC284294, LINC01924	18q22.1	61959443	62302767	343324	0.000337	3-11, 3-13, 4-14, 4-15
ZDHHC8P1, CES5AP1, LINC01658, LINC01659, PCAT14, LOC388882	22q11.23	23695447	23894242	198795	0.000506	1-1, 1-18, 1-19, 3-9, 3-10, 3-13, 3-34
Delecions						
MICA, HCP5, LINC01149, PMSP, HCG26	6p21.33	31360255	31453705	93450	0.003550	1-20, 1-23
CSMD1	8p23.2	3938503	4028497	89994	0.000337	1-27
LRIG3	12q14.1	59256812	59776755	519943	0.000168	1-24, 1-25, 1-27

Anàlisi quantitatiu dels CNVs

Finalment s'analitzà quantitativament la presència de CNVs per individu, tal i com s'observa a la **figura E**.

	SANS	MALALTS MENTALS GREUS (MMG)	MALALTS MENTALS PSICÒTICS	MALALTS MENTALS NO PSICÒTICS
Individus	18	28	14	14
CNVs totals	10	30	18	12
CNVs per individu (CNVs totals / Individus)	0.55	1.07	1.29	0.86

Figura E. Anàlisi quantitatiu dels CNVs presents a les dues famílies.

Els individus es varen classificar en sans, MMG, malalts mentals psicòtics (esquizofrènia i trastorn bipolar) i malalts mentals no psicòtics (trastorn depressiu major). Entre les dues famílies hi havia un total de 18 individus sans i 28 individus que pateixen alguna MMG, dels quals la meitat (n=14) presenten una malaltia psicòtica i l'altre meitat (n=14) una malaltia mental no psicòtica. Dintre del grup sans es trobà un total de 10 CNVs, en el grup MMG 30 CNVs, en el grup psicòtic 18 CNVs i en el grup malalt mental no psicòtic 12 CNVs. Per tant, quantitativament, en cada grup hi ha 0.55 – 1.07 – 1.29 i 0.86 CNVs per individu, respectivament.

En conclusió, en aquestes dues famílies, els individus sans presenten una menor proporció de CNVs que els individus amb MMG. Dintre de l'espectre de MMG els malalts mentals amb psicosis presenten un nombre major de CNVs que els malalts mentals no psicòtics.

Discussió

Aquest treball s'ha centrat amb la utilització de la metodologia SNP-array amb l'objectiu de trobar variants rares associades a MMG de tipus CNVs. Cal destacar que amb l'SNP-array tan sols es detecten CNVs grossos (d'uns 100.000 pb) i això suposa una limitació de l'estudi. Per poder analitzar els CNVs petits s'hauria d'haver realitzat una seqüenciació massiva del genoma complet i emprar altres aproximacions bioinformàtiques desenvolupades per identificar petites insercions/delecions (INDELS), per exemple, els algorismes CNVnator²⁶, Manta²⁷ i/o BreakDancer²⁸.

Ara bé, tot i haver-hi aquesta limitació, en aquest estudi s'han identificat i validat un total de 14 CNVs diferents: 3 duplicacions i 2 delecions a la família 1; 6 duplicacions i 3 delecions a la família 2.

Pel que fa a la possible patogenicitat i raresa dels CNVs, cada un d'ells havien estat prèviament associats a fenotips patològics i tots presentaven freqüències menors a l'1% - podent-se considerar variants genètiques rares.

Referent a la genètica de les MMG, fins fa relativament poc hi ha hagut dues tendències principals. Per una banda es defensava que la malaltia és el resultat combinat o acumulat de l'efecte de centenars o milers de variants comuns –hipòtesis de les variants comuns²⁹. Per altra banda, es defensava que la malaltia és el resultat d'un origen recent, altament penetrant, estrany i amb més d'una variant genètica –hipòtesi de les variants rares³⁰. Però, actualment, hi ha una tercera tendència que considera que ambdues hipòtesis són vàlides^{31, 32}, defensant que la malaltia és el resultat de l'acumulació de variants genètiques comuns i rares.

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi de les variants genètiques rares de tipus CNV – ja que no s'han tingut en compte els polimorfismes de nuclèotid únic-. Ara bé, seria interessant realitzar un altre estudi, paral·lel a aquest, on s'estudiessin les variants genètiques comuns. Per poder realitzar tal estudi hauríem d'utilitzar-se unes altres metodologies: Genome-Wide Association Studies (GWAS)³³ i Polygenic Risk Score (PRS)³⁴.

En relació als resultats obtinguts en aquest treball, a la família 1 s'han identificat dues arquitectures genètiques diferents en cada una de les branques familiars, sent suggestives de tenir un paper significatiu en la patogènesis de la psicosis.

En la primera branca, la psicosis és el resultat de l'efecte combinat de dues duplicacions: DUP3p26.3 i DUP16p23.3. La DUP3p26.3 ha estat associada a trastorns neuropsiquiàtrics, incloent: l'esquizofrènia (SCZ), el trastorn d'espectre autista (TDA), el trastorn bipolar (BD), el

trastorn per dèficit d'atenció e hiperactivitat (TDAH), la discapacitat intel·lectual i el síndrome de Tourette ³⁵⁻⁴⁰. Aquesta duplicació afecta al gen *CNTN6* que codifica per la proteïna contactina-6, proteïna encarregada de l'adhesió neuronal. Aquestes proteïnes són importants per la senyalització d'adhesió cèl·lula-cèl·lula en múltiples processos de desenvolupament neuronal, incloent: migració neuronal, creixement de neurites, guia d'axons i sinaptogènesis⁴¹. Tot i presentar unes funcions crucials durant el desenvolupament del cervell, la penetrància d'aquesta duplicació és incompleta - ja que els subjectes 10 i 11 són portadores de la duplicació i són sanes.

La segona duplicació d'aquesta branca, la DUP16p23.3., afecta al gen *CDH13* que codifica per a una altre proteïna d'adhesió, la cadherina-13. Aquesta proteïna està altament expressada en el cervell on actua com a regulador negatiu del creixement dels axons durant la diferenciació neuronal i protegeix a les cèl·lules endotelials vasculars de l'apoptosi deguda a l'estrès oxidatiu⁴². Pel que fa a l'associació de *CDH13* a trastorns neuropsiquiàtrics, ha estat associat a: TDAH⁴³, TDA⁴⁴, MMG⁴⁵, BD⁴⁶ i SCZ⁴⁷. Al igual que la DUP3p26.3, la penetrància d'aquesta duplicació és incompleta - ja que els subjectes 10 i 11 són portadores de la duplicació i són sanes.

Ara bé, cal destacar, que en paral·lel a aquest treball, es realitzà un altre estudi del grup receptor de Neurobiologia a la família 1. Se'ls realitzà un test de cognició –test MATRICS (per les seves sigles en anglès *Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*)⁴⁸ -a cada un dels membres. Es realitzà aquest test perquè el dèficit de cognició és una dimensió associada a MMG. D'aquest estudi es va concloure que tots els membres que presentaven almanco una duplicació puntuaven molt baix, és a dir, que presentaven un marcat dèficit de cognició. Aquest fet suggereix que ambdues duplicacions podrien tenir una afectació específica en la dimensió de cognició de la MMG. De fet, altres autors varen descobrir que els CNVs que confereixen risc d'esquizofrènia i autisme afectaven a la cognició tant dels pacients com dels controls portadors⁴⁹.

En la segona branca de la família 1, la psicosi ve definida genèticament per la presència de dues delecions: DEL3q28 i DEL13q31.2 -sent ambdues delecions suggestives de participar en la fisiopatologia de la MMG que afecta als subjecte 5, 6 i 12.

La DEL3q28 afecta a l'expressió de dos gens: *OSTN* i *UTS2B*. *OSTN* sembla ser crucial pel desenvolupament del cervell humà. Aquest gen codifica per a la proteïna osteocrina, considerat com un regulador específic dels primats de la plasticitat neuronal que pot contribuir a la complexitat de la cognició i el comportament⁵⁰. Actualment, la desregulació de l'expressió d'aquest gen no s'ha associat directament a trastorns mentals. *UTS2B* codifica la urotensina

2B, un neuropèptid expressat principalment a les motoneurons del tronc cerebral i la medulla espinal, tot i que receptors d'urotensina s'expressen en regions cerebrals –sistema límbic, nuclis talàmics i estriat⁵¹ -implicades en la fisiopatologia dels principals trastorns mentals.⁵²

La DEL13q31.2 afecta a l'expressió de *SLITRK5*, gen que codifica per a la proteïna Slitrk5. Es tracta d'una molècula d'adhesió cel·lular sinàptica que regula el creixement de les neurites⁵³. Les isoformes de Slitrk s'han associat a múltiples trastorns neuropsiquiàtrics. Mutacions en Slitrk1 s'han identificat en pacients amb: trastorn obsessiu compulsiu (TOC), síndrome de Tourette i tricofilomania⁵⁴. Mutacions en Slitrk2 s'han associat amb SCZ i BD^{55,56}. Recentment, mutacions rares en Slitrk5 alteren la sinaptogènesis en pacients amb TOC⁵⁷.

Cal destacar que en aquesta branca familiar s'ha observat que DEL3q28 co-segregat amb DEL13q31.2 agreuja el fenotip i es manifesta com trastorn bipolar.

En definitiva, l'anàlisi dels gens portadors de variants rares -a la família 1- mostra un enriquiment en processos biològics rellevants per la malaltia, com l'organització i el desenvolupament neuronal.

Seguint amb la família 2, no s'ha trobat cap CNV compartit per la majoria de subjectes afectes, però sí que s'han trobat CNVs en branques específiques que segreguen molt bé. A la subfamília 1 s'han trobat dues delecions - DEL6p21.33 i DEL12q14.1- i una duplicació - DUP22q11.23- que segreguen amb psicosis. La DUP22q11.23 -i possiblement la DEL12q14.1 si el fenotip del subjecte 1-27 és de malaltia- són suggestives de participar en la fisiopatologia de la MMG que afecta als subjectes 1-1/1-18/ 1-19 i 1-24/1-25/1-27, respectivament. Per altra banda, la penetrància de la DEL6p21.33 és incompleta ja que el subjecte 1-23 és portador sa.

Respecte a la DUP22q11.23, afecta a l'expressió dels gens *ZDHHC8P1*, *CES5AP1*, *PCAT14*, *LINC01658*, *LINC01659* i *LOC388882*. El gen *ZDHHC8P1* és un pseudo-gen del *ZDHHC8*. Un pseudo-gen és una seqüència d'ADN que s'assembla a un gen, però que s'ha inactivat en el curs de l'evolució al produir-se mutacions en la seva seqüència⁵⁸. Pel que fa al gen *ZDHHC8* codifica per a una proteïna –la palmitol transferasa- involucrada en el transport dels àcids grassos a l'interior de la mitocòndria per a la seva oxidació. Mutacions en aquest gen ja han estat associats a susceptibilitat a l'esquizofrènia⁵⁹. El gen *CES5AP1* (carboxylesterase 5A pseudogene 1) és un pseudo-gen del gen *CES5A* que codifica una carboxilesterasa involucrada en: el metabolisme lipídic, el sistema de barrera hematoencefàlica, precursor de feromones i possible contribució en el procés de transferència de lípids en els fluids reproductius masculins⁶⁰. El gen *PCAT14* (prostate cancer associated transcript 14) és un ARN no codificant associat al càncer de pròstata⁶¹. La resta de gens: *LINC01658*, *LINC01659* i *LOC388882* codifiquen per ARN no codificants⁶²

La DUP22q11.23 és una variant que ja s'havia associat prèviament amb malaltia mental greu, ja que els pacients que la presenten corren un risc important de patir MMG: un de cada quatre desenvolupa esquizofrènia i un de cada sis, trastorns depressius greus. A més, aquesta variant és coneguda com síndrome de deleció 22q11 (22qDS), o com a síndrome de DiGeorge o velocardiofacial (DGS / VCFS)⁶³. És una anomalia genètica relativament freqüent que provoca malformacions de cor, la cara i les extremitats.

La DEL6p21.33 afecta a l'expressió dels gens: *MICA*, *HCP5*, *LINC01149*, *PMSP* i *HCG26*. El gen *MICA* (MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A) codifica per a una proteïna relacionada amb el complex major d'histocompatibilitat I (MHC I). El gen *HCP5* (HLA complex P5), *HCG26* (HLA complex group 26) i *LINC01149* (long intergenic non-protein coding RNA 1149) codifiquen per RNA no codificant. El gen *PMSP* (Homo sapiens mRNA for Papillomavirus minor structural protein interacting protein).

La DEL12q14.1 afecta a l'expressió del gen *LRIG3* (leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 3). Aquest gen codifica una proteïna transmembrana que conté repeticions riques en leucina i dominis similars a la immunoglobulina. *LRIG3* està implicat en la morfogènesis craniofacial i de l'oïda interna durant el desenvolupament embrionari ⁶⁴. En pacients amb glioblastoma –tumor del teixit cerebral- s'ha observat la baixa expressió d'aquest gen ⁶⁵.

Respecte a la subfamília 3, s'han identificat dues arquitectures genètiques diferents, dues duplicacions- DUP22q11.23 i DUP9p24.1- que segreguen amb psicosis. La penetrància d'aquestes duplicacions és incompleta perquè el subjecte 3-34 que és portador d'ambdues duplicacions i el subjecte 3-8 que és portador de la DUP9p24.1, són sans. Tot i això seria interessant realitzar algun estudi paral·lel, ja que la DUP22q11.23 és una variant molt penetrant i altament associada a MMG i el subjecte 3-34, tot i presentar-la, no presenta cap fenotip de malaltia.

La DUP9p24.1 afecta a l'expressió del gen *KDM4C* (lysine demethylase 4C). Aquest gen codifica per a una proteïna implicada en la desmetilació d'histones –regulant enzimàticament l'expressió gènica. En cèl·lules tumorals s'han trobat canvis en l'expressió d'aquest gen⁶⁶. Pel que fa als fenotips descrits prèviament associats a aquest CNV trobem autisme i psicosis ⁶⁷. Tot i que individus que presenten una deleció en aquestes coordenades, també presentaven psicosis (DECIPHER).

Per altra banda, a una altra branca de la subfamília 3 s'han trobat altres arquitectures genètiques que segreguen en psicosis - DUP3q29, DUP4q35.2, DUP11p14.2 i DUP18q22.1- que contenen els gens: *DLG1/DLG1-AS1/BDH1/MIR4797/LINC02012*, *FRG1-DT*, *FIBIN/BBOX1* i *LOC284294/LINC01924*, respectivament. Totes les duplicacions són

suggestives de participar en la fisiopatologia de la MMG que afecta als subjectes 3-11, 3-12, 3-13 i 3-31.

La DUP3q29 afecta a l'expressió dels gens: *DLG1*, *DLG1-AS1*, *BDH1*, *MIR4797* i *LINC02012*. El gen *DLG1* codifica una proteïna d'unió multidomini que és necessària pel desenvolupament normal. Aquesta proteïna té un paper en la transducció de les senyals, la proliferació cel·lular i l'activació dels limfòcits (NCBI). El gen *BDH1* codifica una proteïna deshidrogenasa que intervé en el metabolisme dels àcids grassos, concretament en la catàlisi dels cossos cetònics (NCBI). El gen *DLG1-AS1* (*DLG1* antisense RNA 1), *MIR4797* (microRNA 4797) i *LINC02012* (Long intergenic non-protein coding RNA 2012) codifiquen per ARN no codificants. Duplicacions properes s'han associat a retràs en el desenvolupament de la parla, hiperactivitat i/o autisme (DECIPHER).

La DUP4q35.2 afecta a l'expressió dels gens *FRG1-DT* (*FRG1* divergent transcript), un altre gen que codifica per ARN no codificants. Aquesta duplicació també ha estat associada a individus amb retràs en el desenvolupament de la parla i autisme (DECIPHER).

La DUP11p14.2 afecta a l'expressió dels gens: *FIBIN* i *BBOX1*. El gen *FIBIN* (fin bud initiation factor homolog) codifica per a la proteïna fibrina, proteïna involucrada en la formació d'una malla en el tap plaquetari i encarregada de mantenir la crosta adherida a la lesió fins a la formació del nou teixit epitelial (NCBI). El gen *BBOX1* (Gamma-butyrobetaine hydroxylase 1) codifica per la gamma butirobetaína hidroxilasa, que catalitza el darrer pas en la formació de la L-carnitina. Sent la L-carnitina essencial pel transport d'àcids grassos activats a través de la membrana mitocondrial durant la beta-oxidació mitocondrial (NCBI). Els casos prèviament descrits amb aquesta duplicació presentaven deteriorament cognitiu –es caracteritza per problemes de la memòria, el llenguatge o el pensament (DECIPHER).

La DUP18q22.1 afecta a l'expressió dels gens: *LOC284294* i *LINC01924* (Long intergenic non-protein coding RNA 1924), ARN no codificants. Pacients que presentaven aquesta duplicació han presentat símptomes neurocomportamentals d'aprenentatge específic i retràs en la parla (DECIPHER).

Per acabar amb la família 2, a la subfamília 4 s'ha trobat una duplicació -DUP18q22.1, prèviament descrita. La penetrància d'aquesta duplicació és incompleta ja que el subjecte 4-14 és portador de la duplicació i està sa.

En definitiva, les regions portadores de variants rares –a la família 2- són regions enriquides en gens implicats en: metabolisme lipídic, sistema immunitari i desenvolupament normal. A més, alguns presenten gens associats a càncer.

Respecte una possible correlació entre CNVs rars i severitat del fenotip, cal subratllar que en aquest treball s'ha observat que l'acumulació de CNVs rars ($MAF < 1\%$) –veure anàlisis quantitatiu dels resultats- va associat a la severitat clínica de la malaltia mental. És a dir, tot i que ser portador de CNVs rars no és per se causatiu, si hem obtingut evidències que els pacients amb fenotips més greus tendeixen a acumular més variabilitat rara en forma de CNVs (exemple, subjectes 3-11, 3-31), fet que suggereix que aquests CNVs constitueixen un clar factor de risc.

Els resultats obtinguts en aquest treball s'hauràn de validar en estudis més amplis, com el que originàriament havíem proposat amb l'estudi de les 14 famílies reclutades. De confirmar-se els nostres resultats preliminars, els CNVs podràn ser emprats com a biomarcadors predictors de risc i severitat clínica en subjectes que pertanyin a famílies amb elevada prevalença de MMG.

Conclusions

1. En famílies amb elevada prevalença de MMG, els individus afectes són portadors de més CNVs rars ($MAF < 1\%$) que els seus familiars sans.
2. Dintre d'aquestes famílies, els individus psicòtics acumulen un nombre major de CNVs rars que els seus parents afectes de malaltia mental no psicòtica.
3. A la família 1 s'han trobat dues duplicacions -DUP3p26.3 i DUP16p23.3- que segreguen amb psicosis. La penetrància d'aquestes duplicacions és incompleta ja que els subjectes 10 i 11 són portadores d'ambdues i són sanes.
4. Els gens continguts en ambdues duplicacions, *CDH13* i *CNTN6*, respectivament, participen en processos associats a cognició, fet que suggereix que ambdues duplicacions (DUP) poden tenir una afectació específica en aquesta dimensió de la MMG.
5. A la família 1 també s'han trobat les DEL3q28 i DEL13q31.2. DEL3q28 conté els gens *OSTN* i *UTS2B* i DEL13q31.2 el gen *SLITRK5*. Ambdues DEL són suggestives de participar en la fisiopatologia de la MMG que afecta als subjectes 5, 6 i 12.
6. A la subfamília 1 de la família 2 s'han trobat dues delecions - DEL6p21.33 i DEL12q14.1- i una duplicació - DUP22q11.23- que segreguen en psicosis. La DEL6p21.33 conté els gens *MICA/HCP5/LINC01149/PMSP/HCG26*, la DEL12q14.1 el gen *LRIG3* i la DUP22q11.23 conté els gens *ZDHHC8P1 / CES5AP1 / LINC01658 / LINC01659 / PCAT14 / LOC388882*. La DUP -i possiblement la DEL12q14.1 són suggestives de participar en la fisiopatologia de la MMG que afecta als subjectes 1-1/1-18/ 1-19 i 1-24/1-25/1-27, respectivament. Per altra banda, la DEL6p21.33 presenta penetrància incompleta ja que el subjecte sa 1-23 és portador.
7. A la subfamília 3 de la família 2 s'han trobat dues duplicacions - DUP22q11.23 i DUP9p24.1- que segreguen amb psicosis. La DUP22q11.23 conté els gens *ZDHHC8P1 / CES5AP1 / LINC01658 / LINC01659 / PCAT14 / LOC388882* i la DUP9p24.1 el gen *KDM4C*. La penetrància d'aquestes DUP és incompleta ja que el subjecte 3-34 és portador d'ambdues duplicacions i el subjecte 3-8 és portador de la DUP9p24.1 i són sans.

8. A la subfamília 3 de la família 2 també s'han trobat altres duplicacions que segreguen en psicosis - DUP3q29, DUP4q35.2, DUP11p14.2 i DUP18q22.1. La DUP3q29 conté els gens *DLG1/DLG1-AS1/BDH1/MIR4797/LINC02012*, la DUP4q35.2 el gen *FRG1-DT*, la DUP11p14.2 els gens *FIBIN/BBOX1* i la DUP18q22.1 els gens *LOC284294* i *LINC01924*. Totes les DUP són suggestives de participar en la fisiopatologia de la MMG que afecta als subjectes 3-11, 3-12, 3-13 i 3-31.
9. A la subfamília 4 de la família 2 s'ha trobat una duplicació -DUP18q22.1- que conté els gens *LOC284294* i *LINC01924*. La penetrància d'aquesta DUP és incompleta ja que el subjecte 4-14 és portador sà.

Referències

1. BENOIT, E. P. Toward a new definition of mental retardation. *Am. J. Ment. Defic.* **63**, 559–565 (1959).
2. Buitrago Ramírez, F. *et al.* Recomendaciones para la prevención de los trastornos de la salud mental en atención primaria. *Aten. Primaria* **48**, 77–97 (2016).
3. Chang, C. K. *et al.* Life expectancy at birth for people with serious mental illness and other major disorders from a secondary mental health care case register in London. *PLoS One* **6**, (2011).
4. Fekadu, A. *et al.* Excess mortality in severe mental illness: 10-Year population-based cohort study rural Ethiopia. *Br. J. Psychiatry* **206**, 289–296 (2015).
5. de Mooij, L. D. *et al.* Dying Too Soon: Excess Mortality in Severe Mental Illness. *Front. Psychiatry* **10**, 20–23 (2019).
6. De Hert, M. *et al.* Physical illness in patients with severe mental disorders. I. Prevalence, impact of medications and disparities in health care. *World Psychiatry* **10**, 52–77 (2011).
7. Correll, C. U. *et al.* Prevalence, incidence and mortality from cardiovascular disease in patients with pooled and specific severe mental illness: a large-scale meta-analysis of 3,211,768 patients and 113,383,368 controls. *World Psychiatry* **16**, 163–180 (2017).
8. Maj, M. Physical health care in persons with severe mental illness: A public health and ethical priority. *World Psychiatry* **8**, 1–2 (2009).
9. National Institute of Mental Health. *J. Contin. Educ. Nurs.* **2**, 29–34 (1971).
10. Otte, C. *et al.* Major depressive disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 1–21 (2016).
11. Jones, I. *et al.* Evidence for familial cosegregation of major affective disorder and genetic markers flanking the gene for Darier's disease. *Mol. Psychiatry* **7**, 424–427 (2002).
12. Insel, T. R. Rethinking schizophrenia. *Nature* **468**, 187–193 (2010).
13. Gearing, R. E. *et al.* Association of religion with delusions and hallucinations in the context of schizophrenia: Implications for engagement and adherence. *Schizophr. Res.* **126**, 150–163 (2011).
14. Grande, I., Berk, M., Birmaher, B. & Vieta, E. Bipolar disorder. *Lancet* **387**, 1561–1572 (2016).
15. Zubrzycki, A. Trastorno bipolar. *Salud(i)Ciencia* **18**, 290 (2011).
16. Geddes, J. R. & Briess, D. Bipolar disorder. *BMJ Clin. Evid.* **2007**, 58–66 (2007).
17. Kimmel, R. J. *et al.* Cosegregation of bipolar disorder and autosomal-dominant medullary cystic kidney disease in a large family. *Am. J. Psychiatry* **162**, 1972–1974 (2005).
18. Macé, A. *et al.* New quality measure for SNP array based CNV detection. *Bioinformatics* **32**, 3298–3305 (2016).
19. Itsara, A. *et al.* Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 148–161 (2008).
20. Mikhail, F. M. Copy number variations and human genetic disease. *Curr. Opin. Pediatr.* **26**, 646–652 (2014).

21. Purcell, S. M. *et al.* Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* **460**, 748–752 (2009).
22. Owen, M. J., Craddock, N. & O'Donovan, M. C. Suggestion of roles for both common and rare risk variants in genome-wide studies of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **67**, 667–673 (2010).
23. Requena, F. *et al.* CNVxplorer: a web tool to assist clinical interpretation of CNVs in rare disease patients. *medRxiv* 2021.03.19.21253806 (2021).
24. Bragin, E. *et al.* DECIPHER: Database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 993–1000 (2014).
25. Rosenbloom, K. R. *et al.* The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* **43**, D670–D681 (2015).
26. Abyzov, A., Urban, A. E., Snyder, M. & Gerstein, M. CNVnator: An approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing. *Genome Res.* **21**, 974–984 (2011).
27. Chen, X. *et al.* Manta: Rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics* **32**, 1220–1222 (2016).
28. Chen, K. *et al.* BreakDancer: An algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. *Nat. Methods* **6**, 677–681 (2009).
29. Peng, B. & Kimmel, M. Simulations provide support for the common disease-common variant hypothesis. *Genetics* **175**, 763–776 (2007).
30. Moutsianas, L. *et al.* The Power of Gene-Based Rare Variant Methods to Detect Disease-Associated Variation and Test Hypotheses About Complex Disease. *PLoS Genet.* **11**, 1–25 (2015).
31. Uher, R. The role of genetic variation in the causation of mental illness: An evolution-informed framework. *Mol. Psychiatry* **14**, 1072–1082 (2009).
32. Gibson, G. Rare and common variants: Twenty arguments. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 135–145 (2012).
33. Bergen, S. E. *et al.* Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **17**, 880–886 (2012).
34. Hjorthøj, C., Uddin, M. J., Hougaard, D. M., Sørensen, H. J. & Nordentoft, M. Polygenic risk for psychiatric disorder and singleness in patients with severe mental illness and controls. *J. Psychiatr. Res.* **119**, 60–66 (2019).
35. Kashevarova, A. A. *et al.* Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability. *Mol. Cytogenet.* **7**, 1–10 (2014).
36. Juan-Perez, C., Farrand, S. & Velakoulis, D. Schizophrenia and epilepsy as a result of maternally inherited CNTN6 copy number variant. *Schizophr. Res.* **202**, 111–112 (2018).
37. Huang, A. Y. *et al.* Rare Copy Number Variants in NRXN1 and CNTN6 Increase Risk for Tourette Syndrome. *Neuron* **94**, 1101-1111.e7 (2017).
38. Mercati, O. *et al.* CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry* **22**, 625–633 (2017).

39. Te Weehi, L. *et al.* Microduplication of 3p26.3 Implicated in Cognitive Development. *Case Rep. Genet.* **2014**, 1–6 (2014).
40. Hu, J. *et al.* CNTN6 copy number variations in 14 patients: A possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *J. Neurodev. Disord.* **7**, 1–9 (2015).
41. Sethi, M. K. & Zaia, J. Extracellular matrix proteomics in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 379–394 (2017).
42. Rivero, O. *et al.* Impact of the ADHD-susceptibility gene CDH13 on development and function of brain networks. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **23**, 492–507 (2013).
43. Lesch, K. P. *et al.* Molecular genetics of adult ADHD: Converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J. Neural Transm.* **115**, 1573–1585 (2008).
44. Sanders, S. J. *et al.* Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron* **70**, 863–885 (2011).
45. Terracciano, A. *et al.* Genome-wide association scan of trait depression. *Biol. Psychiatry* **68**, 811–817 (2010).
46. Xu, W. *et al.* Genome-wide association study of bipolar disorder in Canadian and UK populations corroborates disease loci including SYNE1 and CSMD1. *BMC Med. Genet.* **15**, (2014).
47. Otsuka, I. *et al.* Association analysis of the Cadherin13 gene with schizophrenia in the Japanese population. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **11**, 1381–1393 (2015).
48. Rodríguez Jiménez, R. *et al.* Déficit cognitivo en la esquizofrenia: MATRICS Consensus Cognitive Battery. *Rev. Neurol.* **55**, 549 (2012).
49. Stefansson, H. *et al.* CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature* **505**, 361–366 (2014).
50. Ataman, B. *et al.* Evolution of Osteocrin as an activity-regulated factor in the primate brain. *Nature* **539**, 242–247 (2016).
51. Suzuki, K. & Herbert, T. J. Spontaneous correction of dorsal intercalated segment instability deformity with scaphoid malunion in the skeletally immature. *J. Hand Surg. Am.* **18**, 1012–1015 (1993).
52. Xu, B. *et al.* De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia. *Nat. Genet.* **44**, 1365–1369 (2012).
53. Aruga, J., Yokota, N. & Mikoshiba, K. Human SLITRK family genes: Genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene* **315**, 87–94 (2003).
54. Ozomaro, U. *et al.* Characterization of SLITRK1 Variation in Obsessive-Compulsive Disorder. *PLoS One* **8**, 1–7 (2013).
55. Smith, E. N. *et al.* Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. *Mol. Psychiatry* **14**, 755–763 (2009).
56. Piton, A. *et al.* Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **16**, 867–880 (2011).
57. Song, M. *et al.* Rare synaptogenesis-impairing mutations in SLITRK5 are associated with obsessive compulsive disorder. *PLoS One* **12**, 1–14 (2017).
58. Tutar, Y. Pseudogenes. *Comp. Funct. Genomics* **2012**, (2012).

59. Mukai, J. *et al.* Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat. Genet.* **36**, 725–731 (2004).
60. Ru, Y. F. *et al.* An epididymis-specific carboxyl esterase CES5A is required for sperm capacitation and male fertility in the rat. *Asian J. Androl.* **17**, 292–297 (2015).
61. Shukla, S. *et al.* Identification and Validation of PCAT14 as Prognostic Biomarker in Prostate Cancer. *Neoplasia (United States)* **18**, 489–499 (2016).
62. Delihias, N. A family of long intergenic non-coding RNA genes in human chromosomal region 22q11.2 carry a DNA translocation breakpoint/AT-rich sequence. *PLoS One* **13**, 1–19 (2018).
63. Maynard, T. M., Haskell, G. T., Lieberman, J. A. & LaMantia, A. S. 22q11 DS: Genomic mechanisms and gene function in DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Int. J. Dev. Neurosci.* **20**, 407–419 (2002).
64. Safran, M. *et al.* GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford)*. **2010**, 1–16 (2010).
65. Kondo, T., Oka, T., Sato, H., Shinnou, Y. & Washio, K. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development. *Int. J. Oncol.* **35**, 547–557 (2009).
66. Lee, D. H. *et al.* Histone demethylase KDM4C controls tumorigenesis of glioblastoma by epigenetically regulating p53 and c-Myc. *Cell Death Dis.* **12**, (2021).
67. TCW, J. *et al.* Divergent Levels of Marker Chromosomes in an hiPSC-Based Model of Psychosis. *Stem Cell Reports* **8**, 519–528 (2017).



Annex

Família B-1
SZ BD TDM

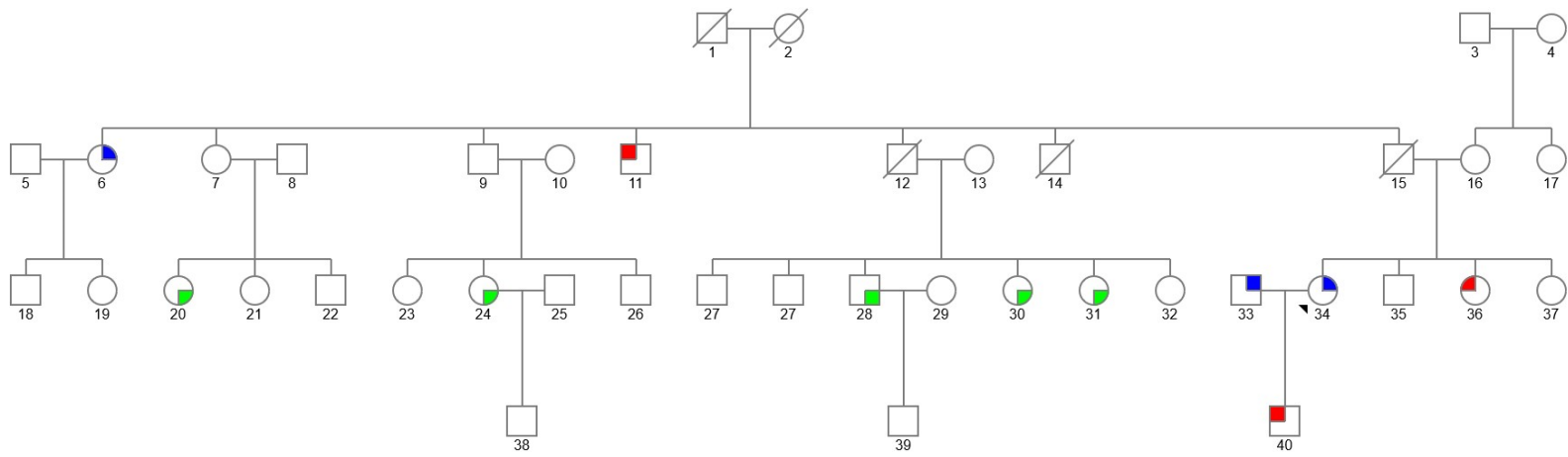


Figura 1. Pedigrí família B-1.

Família B-2

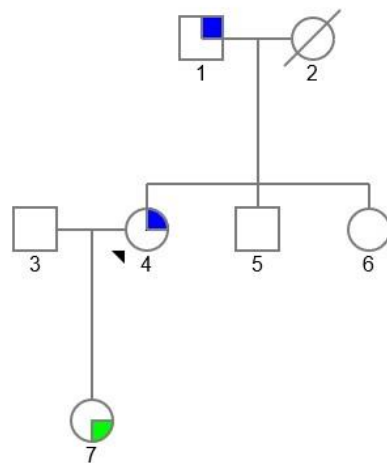
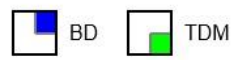


Figura 2. Pedigrí família B-2.

Família B-3

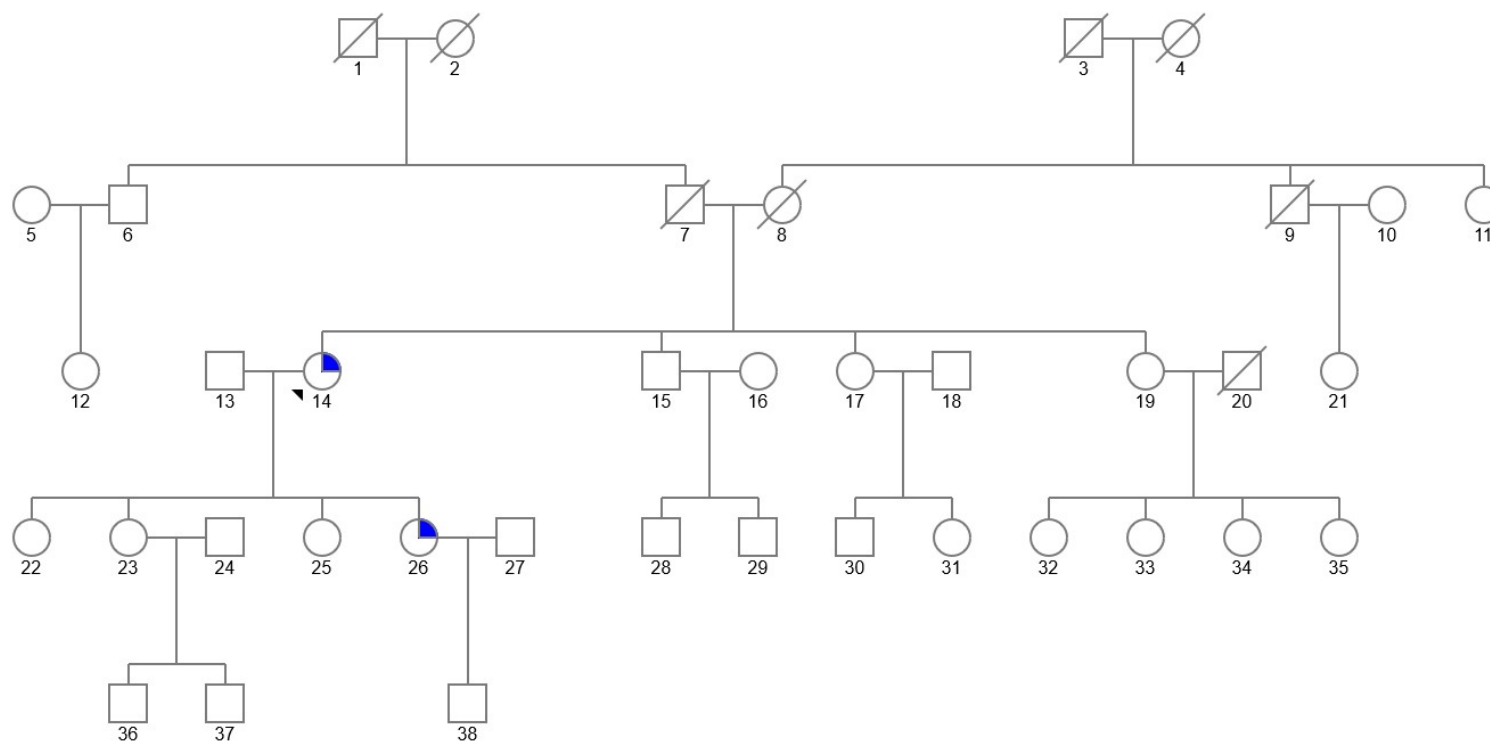


Figura 3. Pedigrí família B-3.

Família B-5

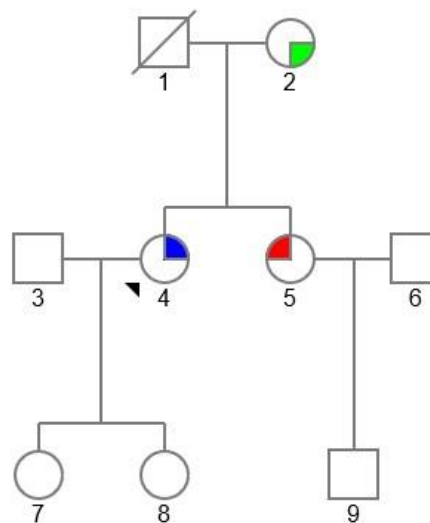


Figura 4. Pedigri família B-5.

Família B-6

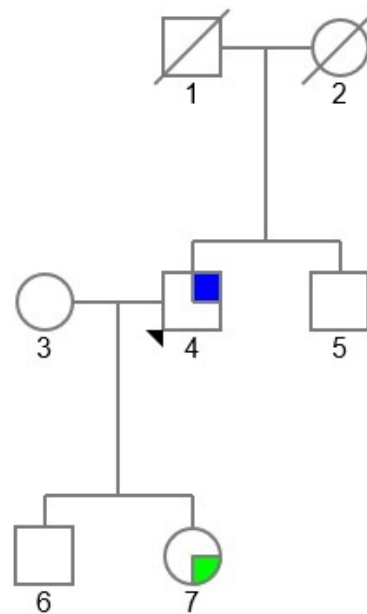
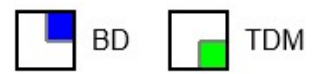


Figura 5. Pedigri família B-6.

Família B-7

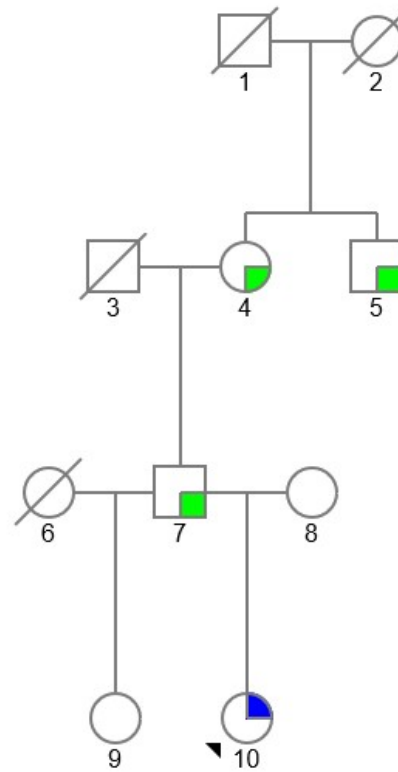


Figura 6. Pedigrí família B-7.

Família B-8
BD TDM

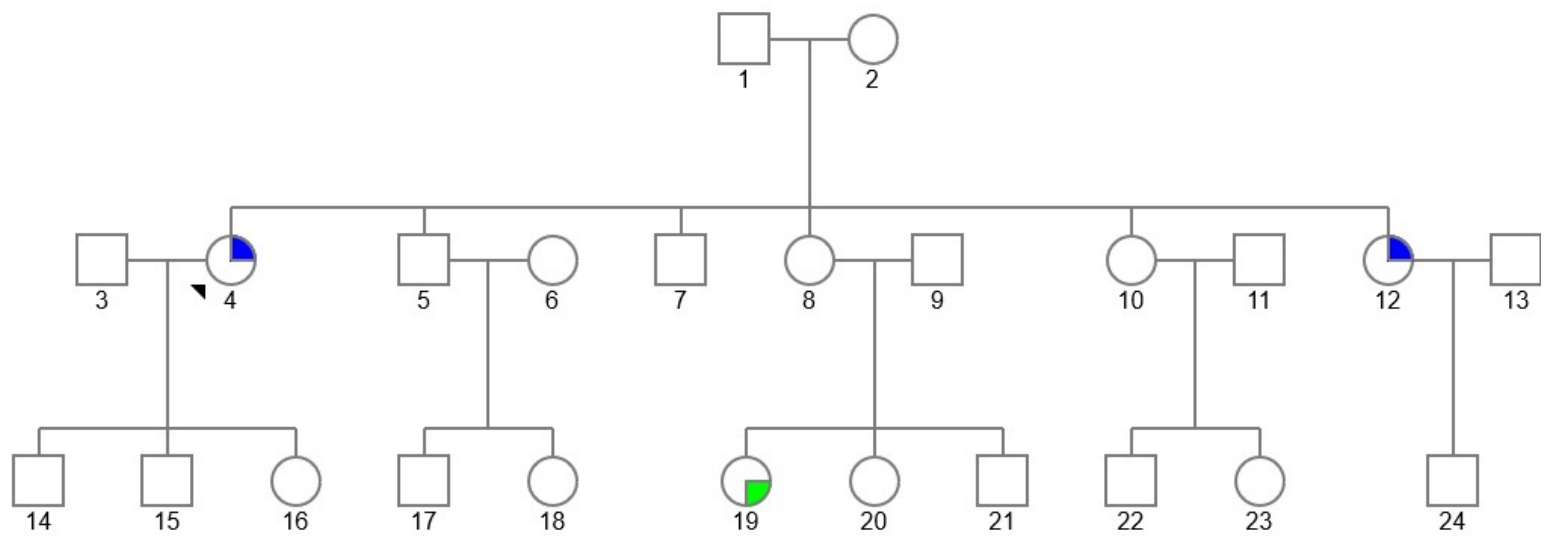


Figura 7. Pedigrí família B-8.

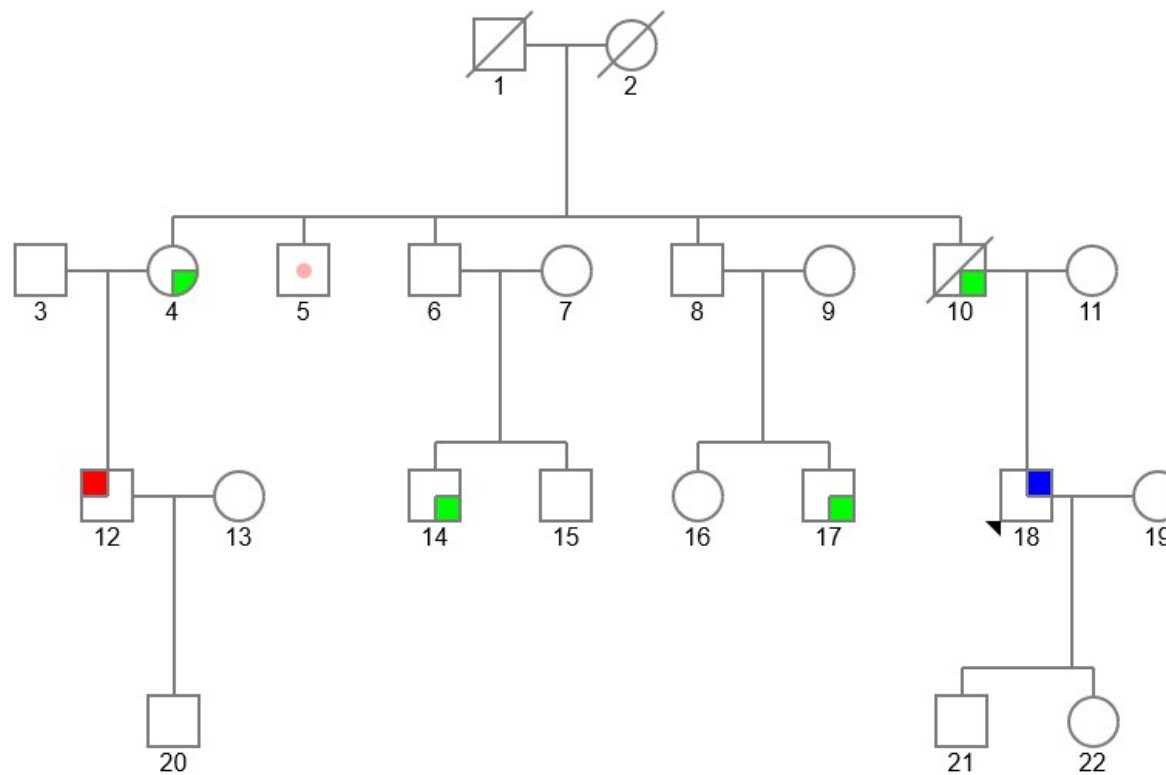
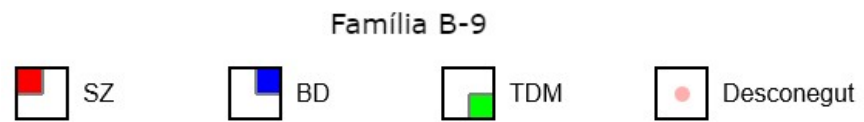


Figura 8. Pedigrí família B-9.

Família B-10

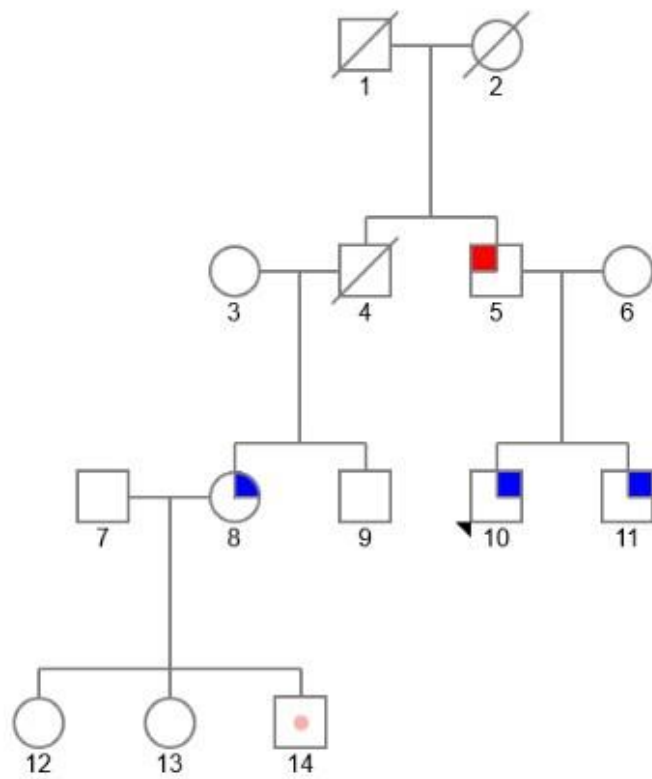


Figura 9. Pedigrí família B-10.

Família B-11

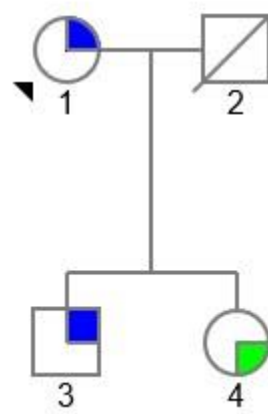


Figura 10. Pedigrí família B-11.

Família B-12

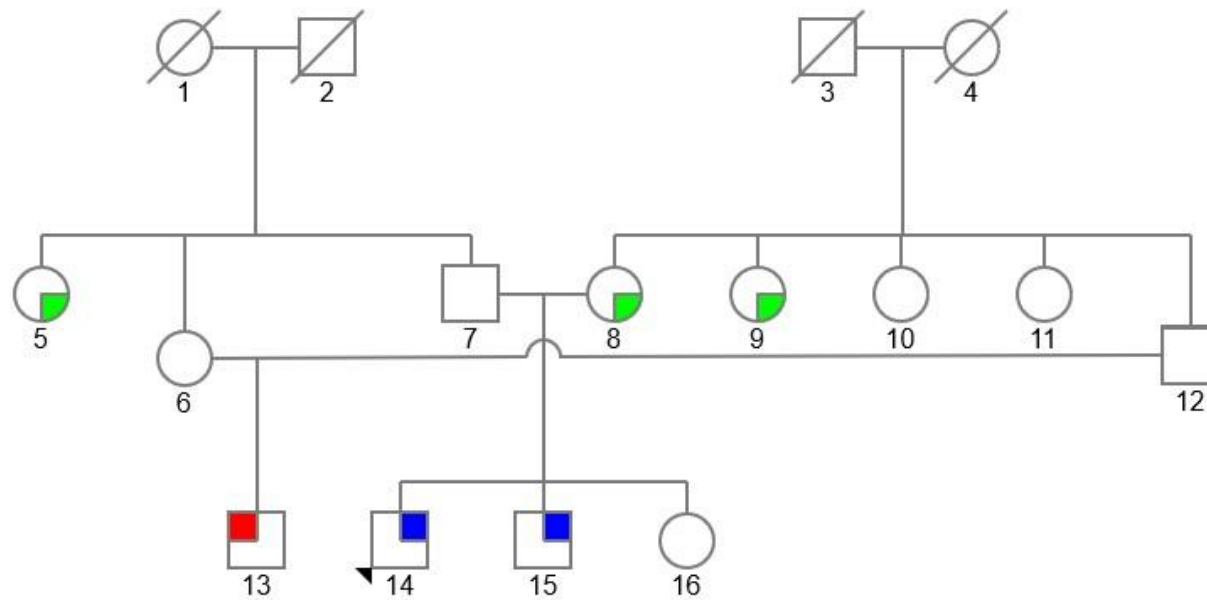
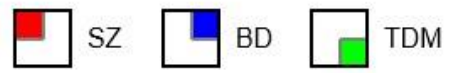


Figura 11. Pedigrí família B-12.

Família B-14

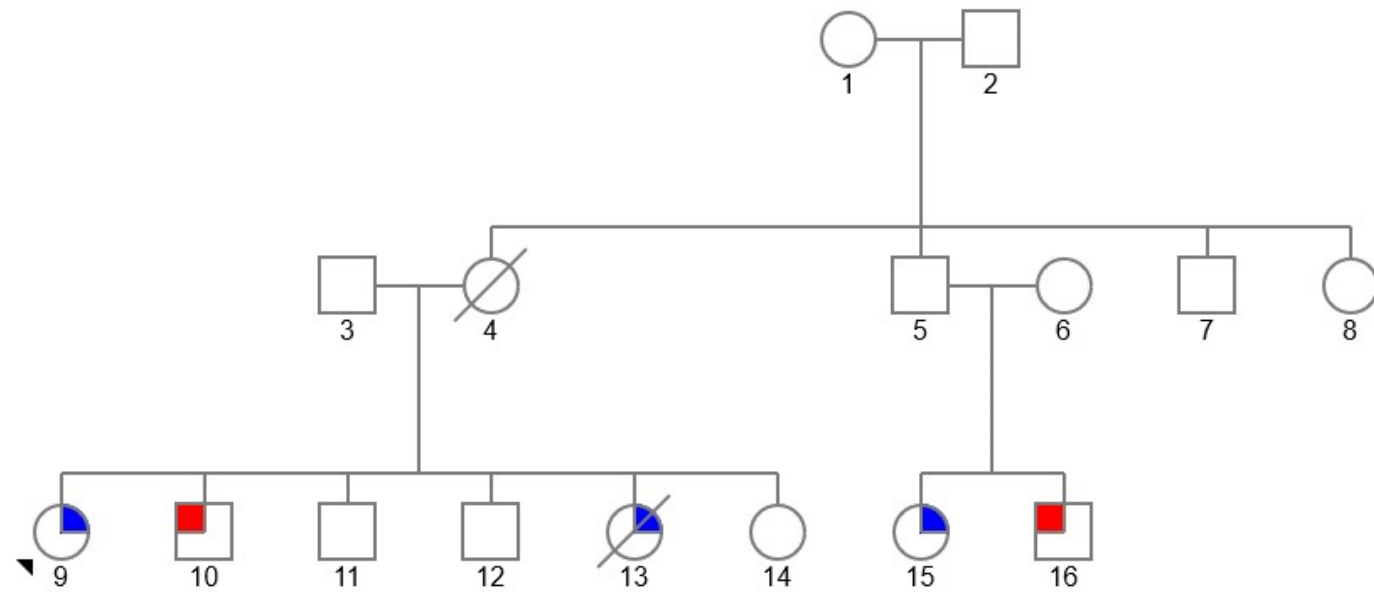


Figura 12. Pedigrí família B-14.

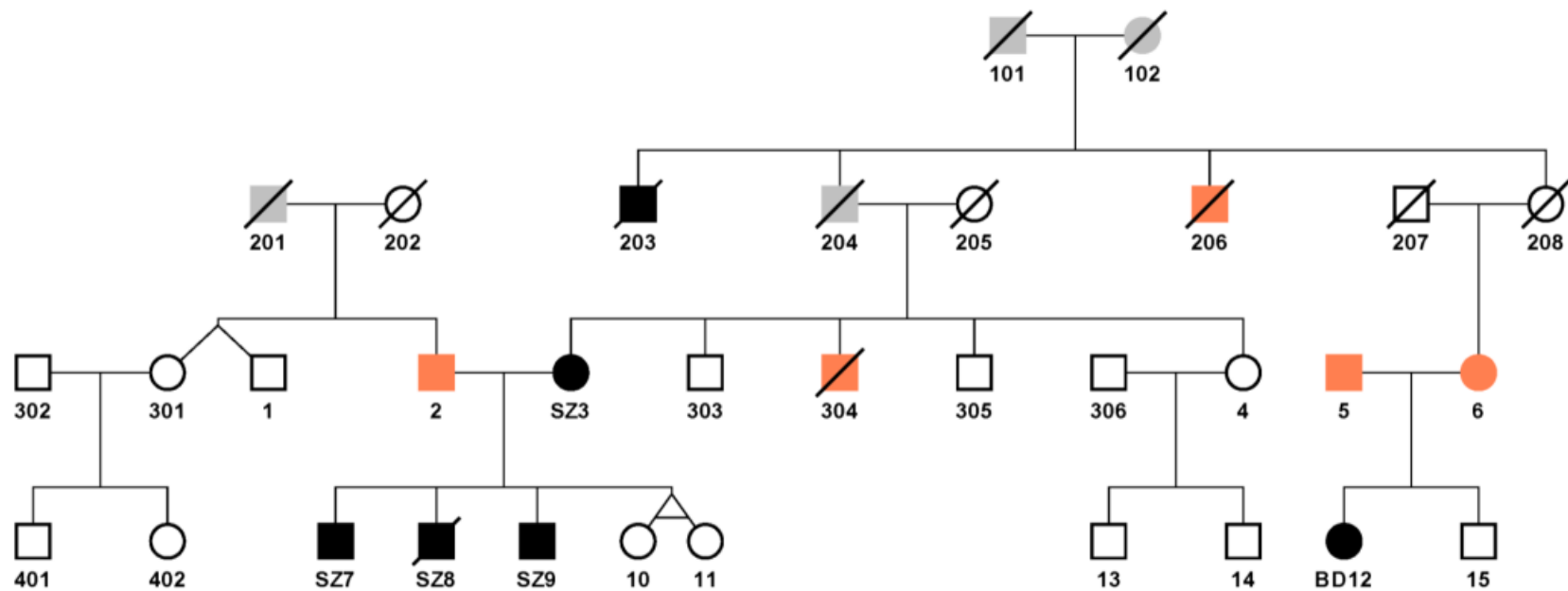


Figura 13. Pedigrí família 1. El sexe masculí es representat amb un quadrat i el sexe femení amb un cercle. Els individus amb una línia diagonal són individus morts. Pel que fa a la coloració de les figures, aquestes representen individus: blanc = sa, negre = psicòtic, taronja = malalt mental no psicòtic i gris = subjecte indeterminat . Els subjectes 10 i 11 són germanes bessones.

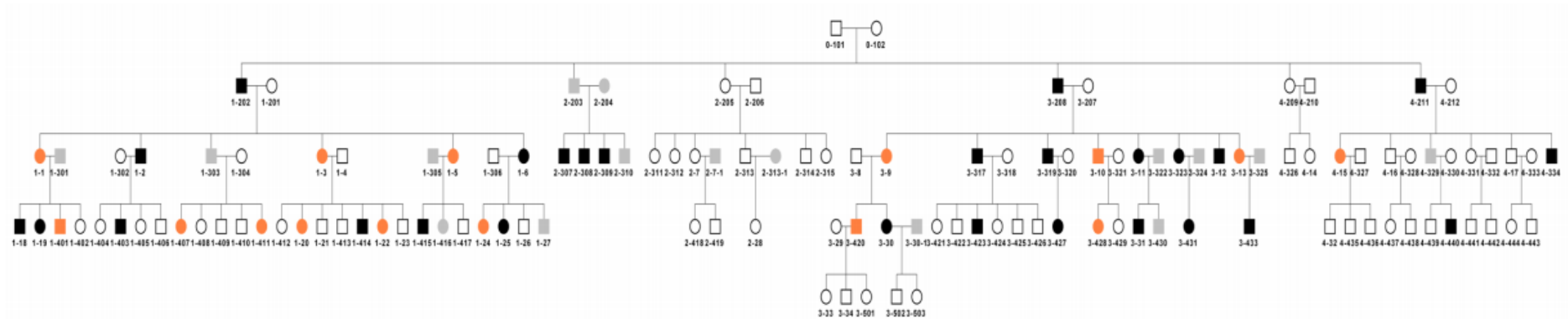


Figura 14. Pedigrí família 2. El sexe masculí es representat amb un quadrat i el sexe femení amb un cercle. Els individus amb una línia diagonal són individus morts. Pel que fa a la coloració de les figures, aquestes representen individus: blanc = sa, negre = psicòtic, taronja = malalt mental no psicòtic i gris = subjecte indeterminat . Al tractar-se d'una família tan gran, es separa en diferents subfamílies: subfamília 1, subfamília 2, subfamília 3 i subfamília 4.

Genotip	DD	A	B	AA	AB	BB	AAA	AAB	ABB	BBB	AAAA	AAAB	ABBB	BBBB
CN	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4

Figura 15. Número de còpies (CN) dels 14 genotips considerats per l'algoritme cnvPartition. (DD = Doble Deleció)

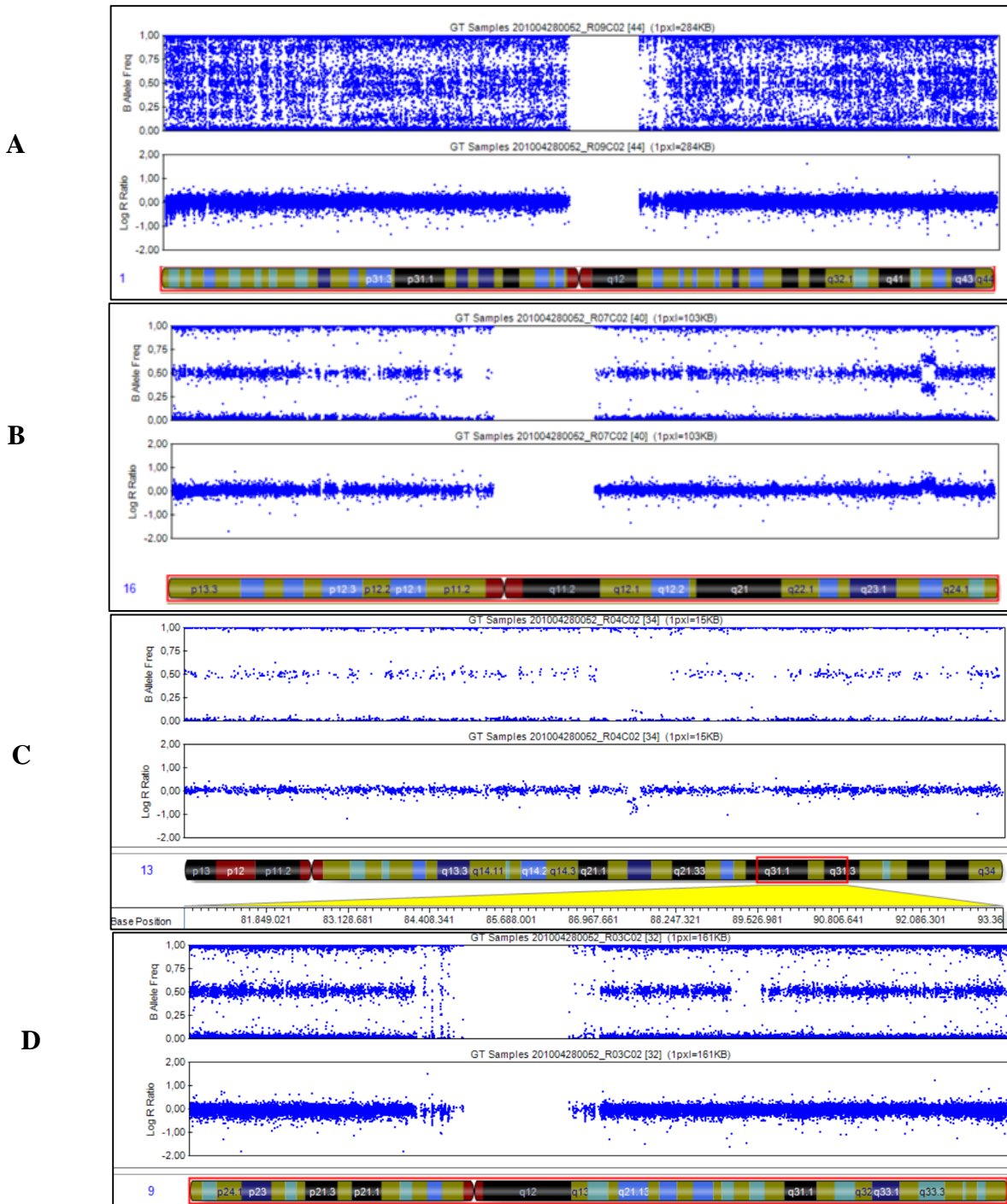


Figura 16. Gràfiques de BAF i LRR dels membres 9 (A), 8 (B), 12 (C) i 6 (D) de la família 1. La **mostra A** és un exemple de mostra mal genotipada, on no es poden apreciar els 3 genotips en el paràmetre BAR. La **mostra B, C i D** estan ben genotipats, ja que els 3 genotips estan perfectament delimitats. La **mostra B** presenta una duplicació en el cromosoma 16, la **mostra C** presenta una deleció en el cromosoma 13 i la **mostra D** és un exemple de possible deleció, però que no és confirmada amb el paràmetre LRR.

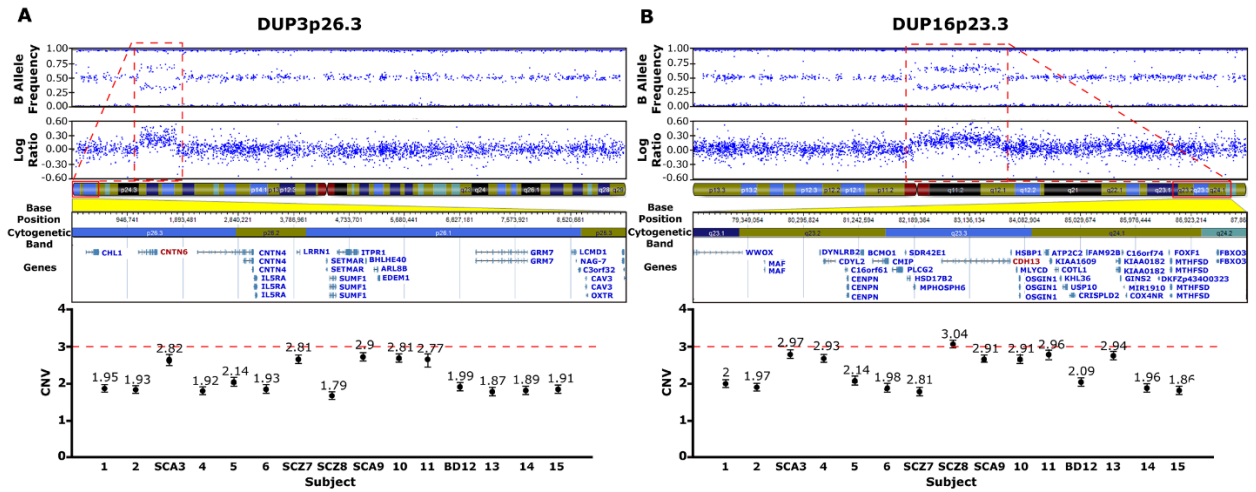


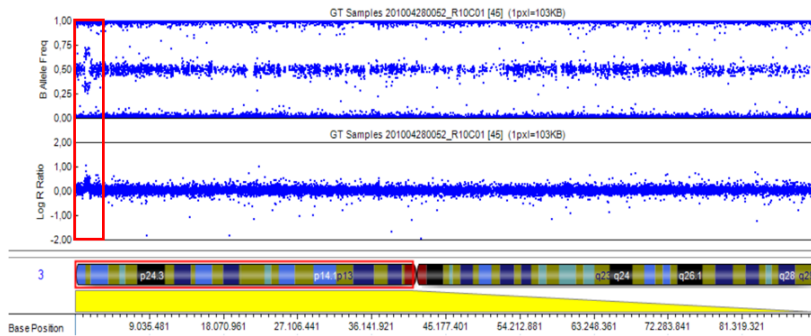
Figura 17. Gràfica de la quantificació de la PCR digital de la família 1 per les DUP3p26.3 i DUP16p23.3.



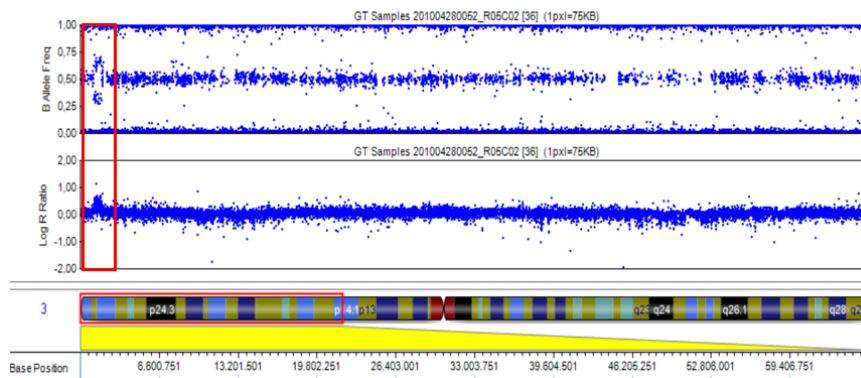
CNVs identificats per cnvPartition Família 1

DUP3p26.3

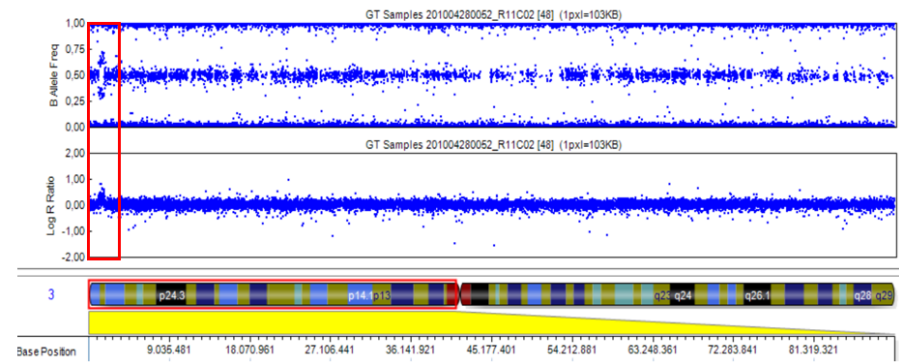
Individu 3



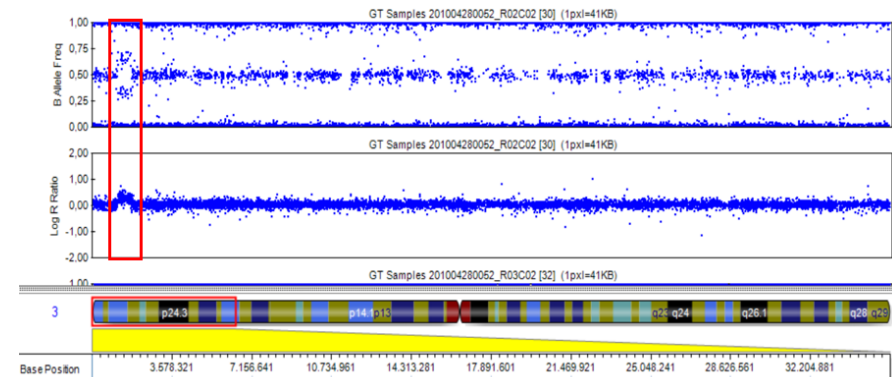
Individu 7



Individu 10

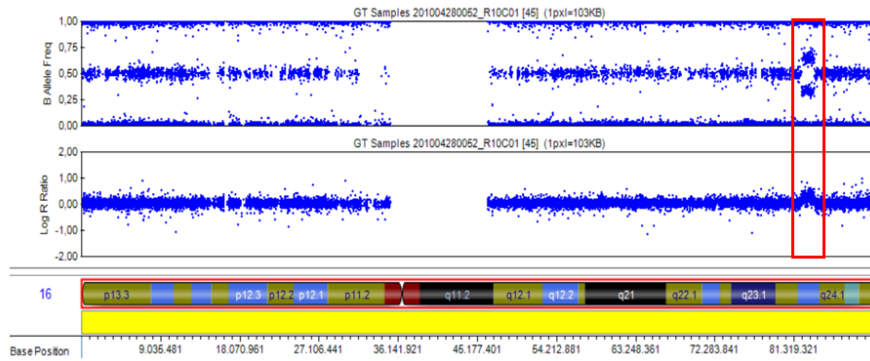


Individu 11

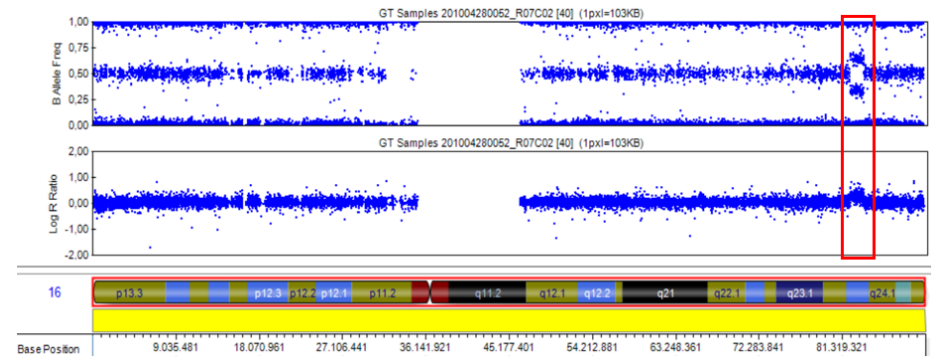


DUP16p23.3

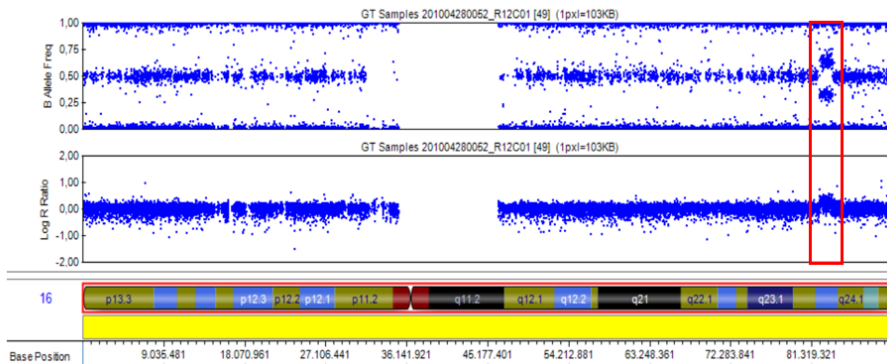
Individu 3



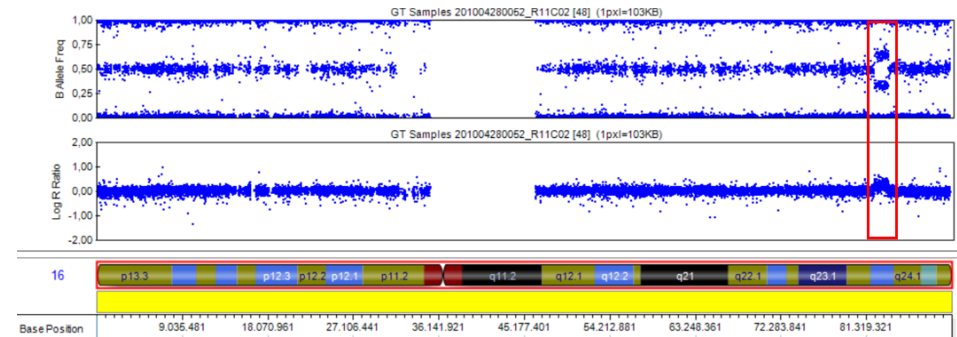
Individu 8



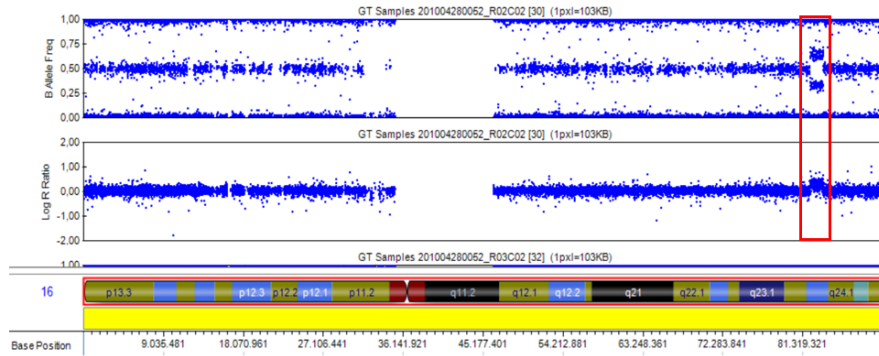
Individu 4



Individu 10

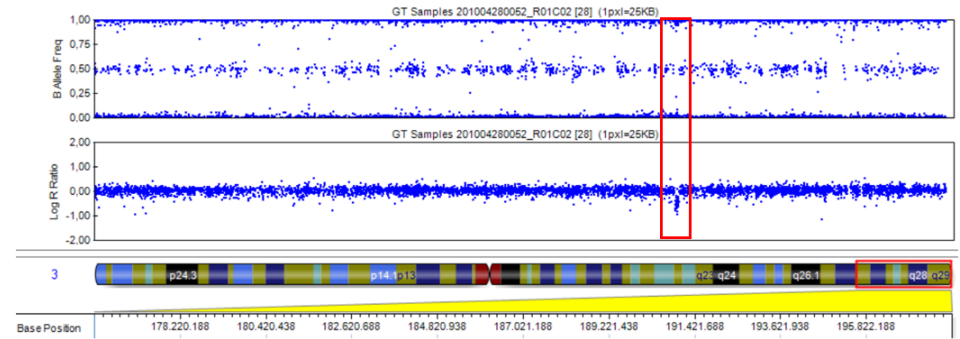


Individu 11

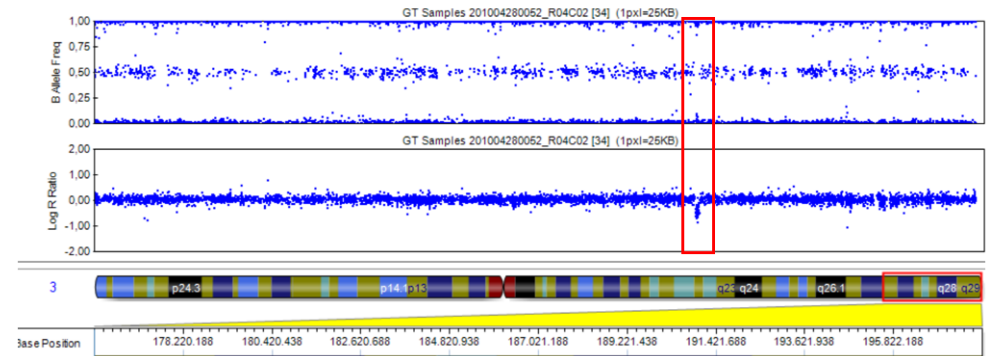


DEL3q28

Individu 5

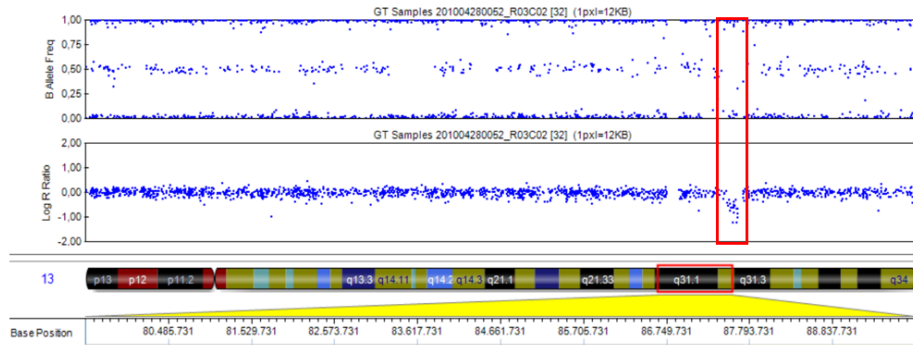


Individu 12

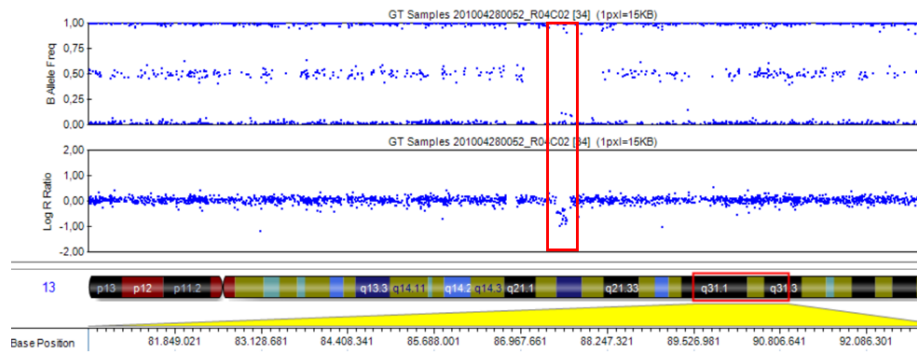


DEL13q31.2

Individu 6

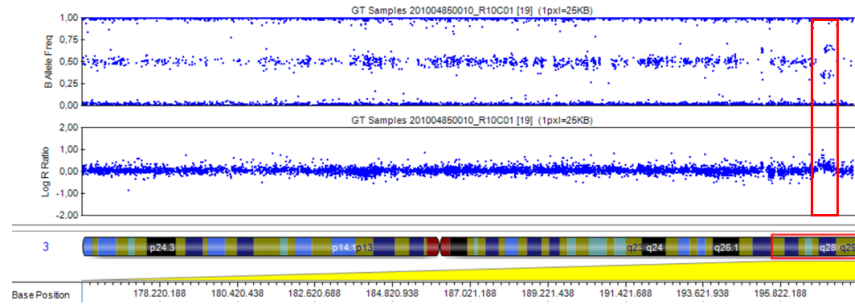


Individu 12

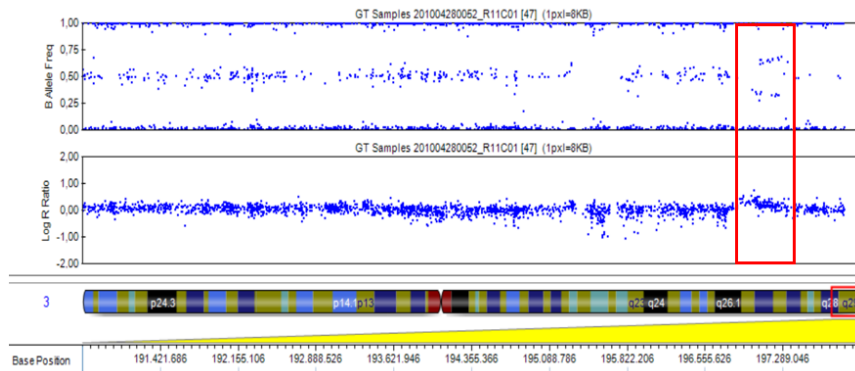


Família 2 DUP3q29

Individu 3-11

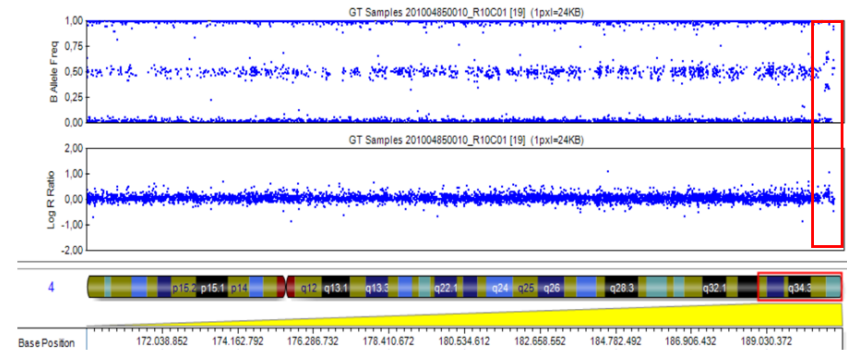


Individu 3-31

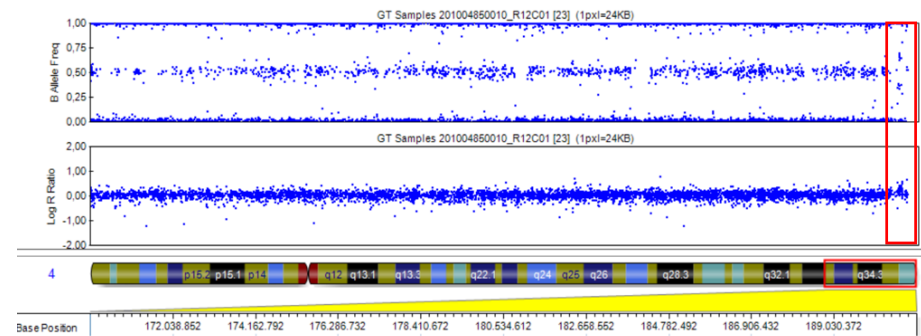


DUP4q35.2

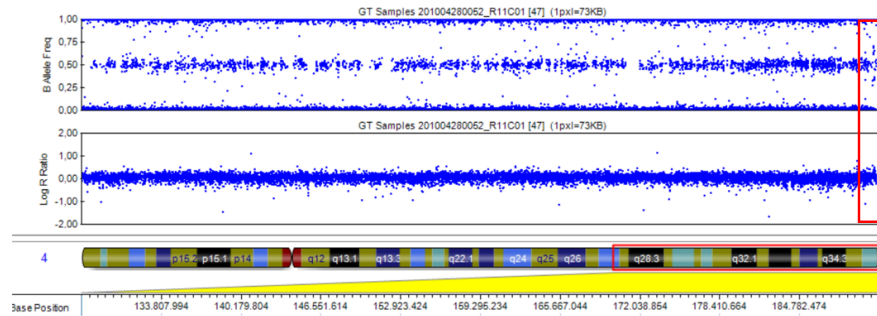
Individu 3-11



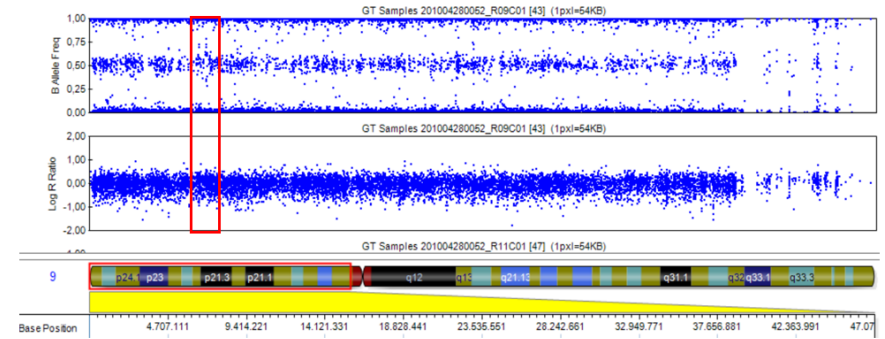
Individu 3-12



Individu 3-31

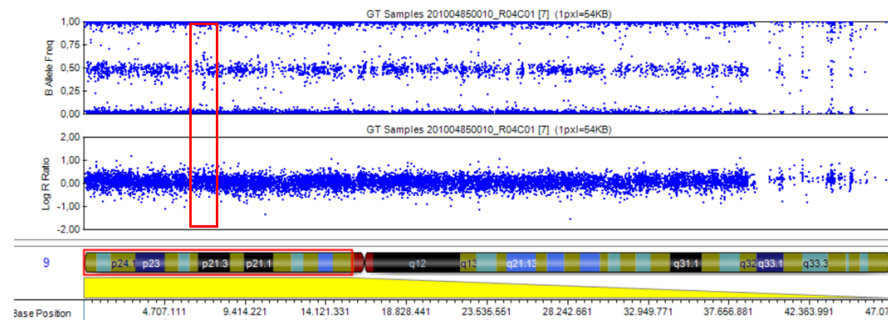


Individu 3-30

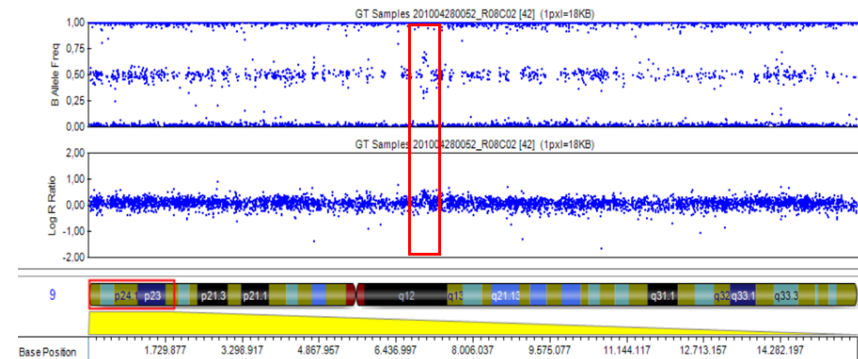


DUP9p24.1

Individu 3-8

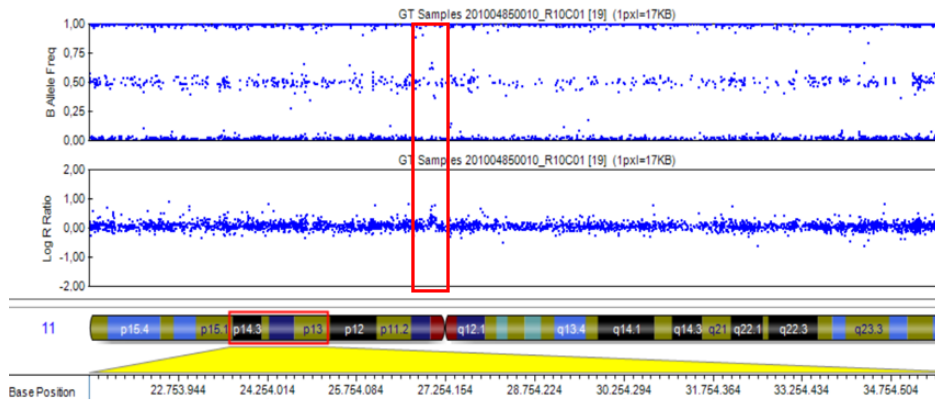


Individu 3-34

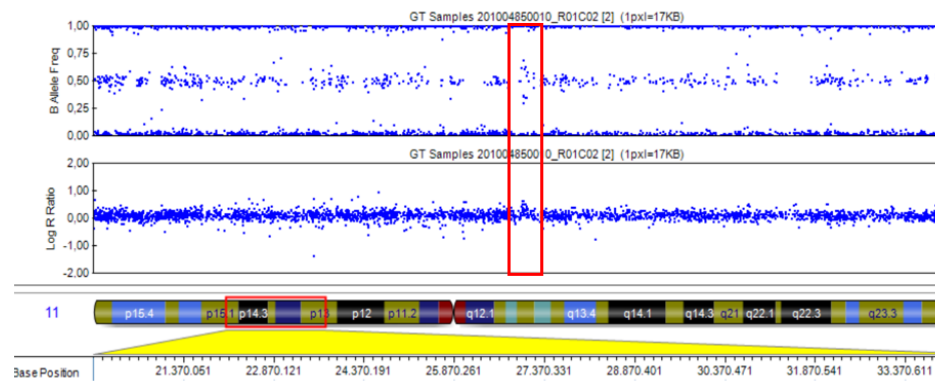


DUP11p14.2

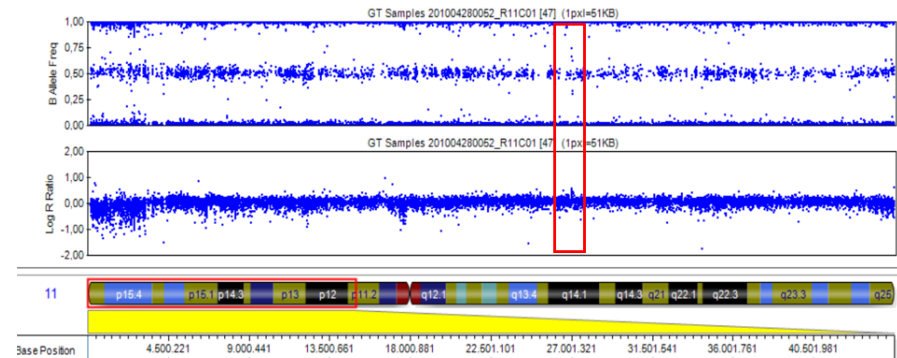
Individu 3-11



Individu 3-13

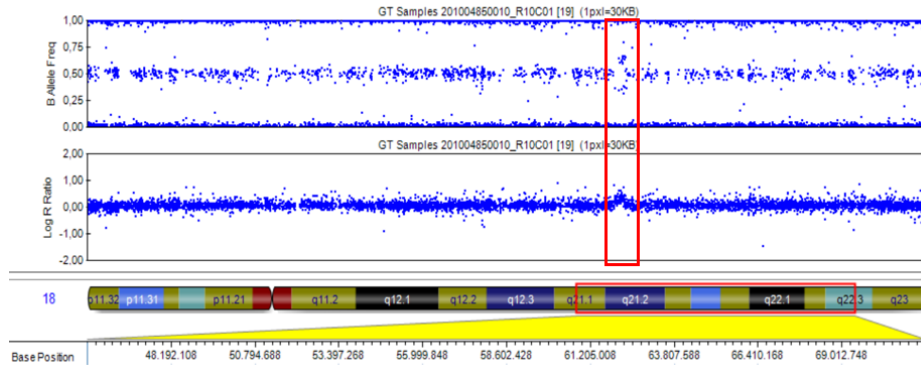


Individu 3-31

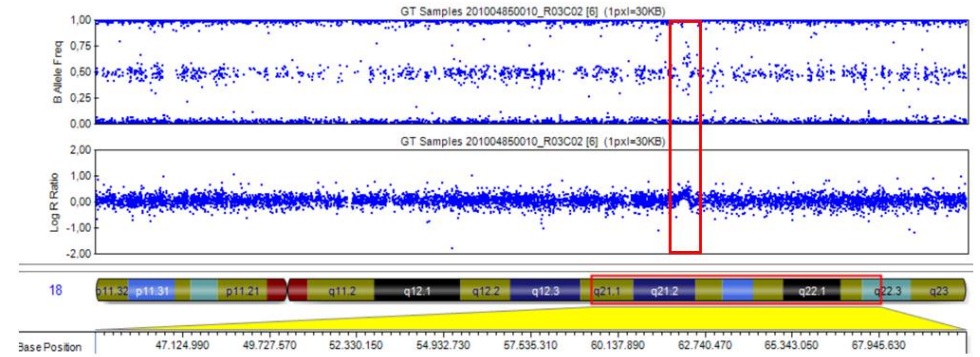


DUP18q22.1

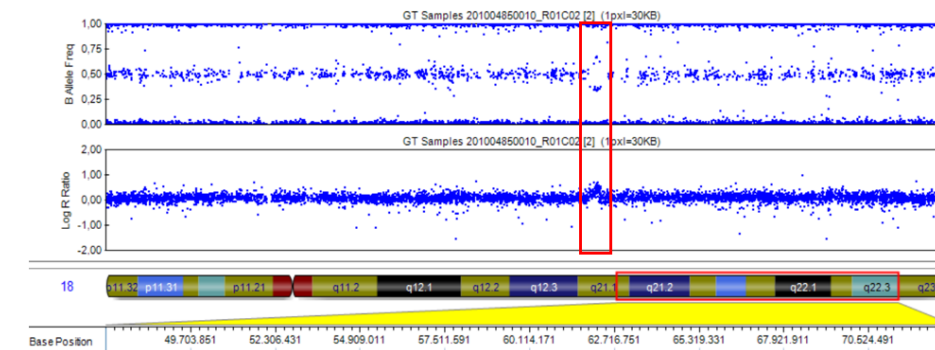
Individu 3-11



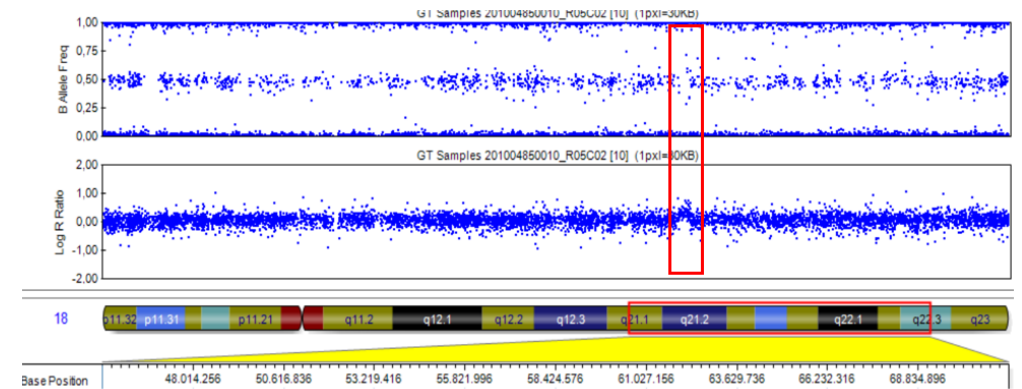
Individu 4-14



Individu 3-13

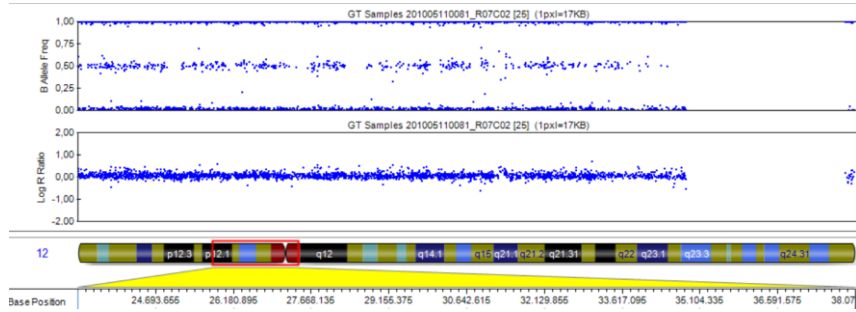


Individu 4-15

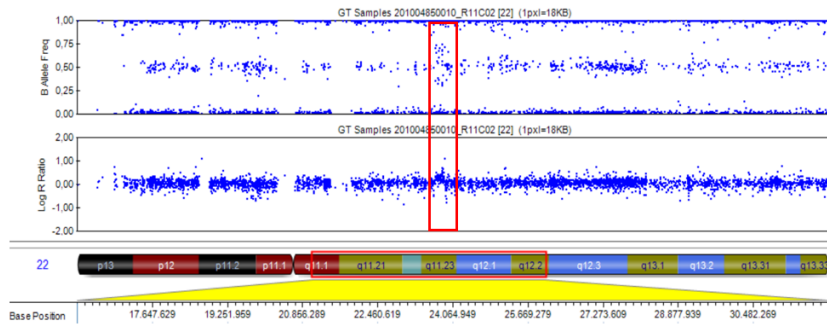


DUP22q11.23

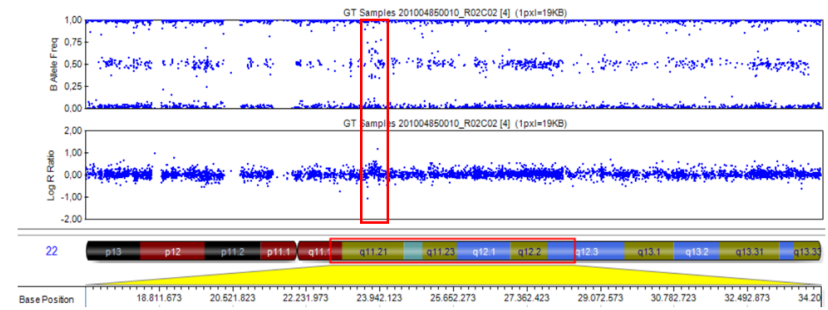
Individu 1-1



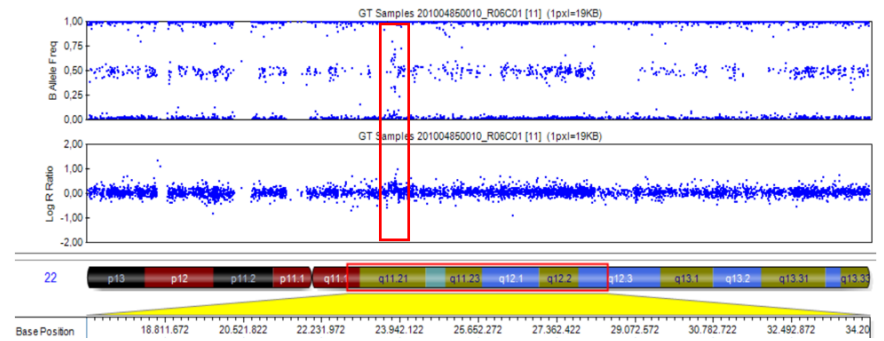
Individu 1-18



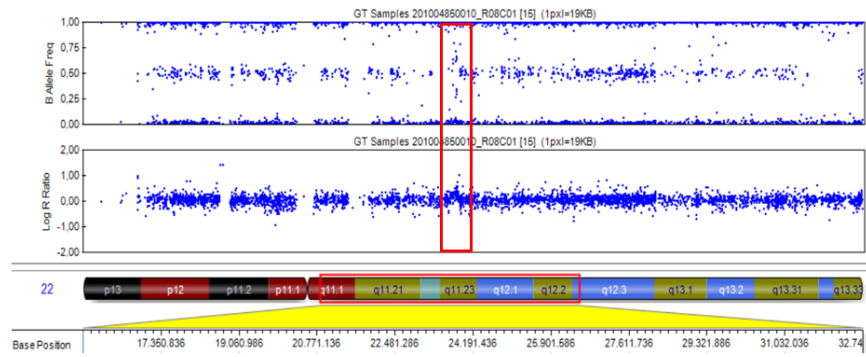
Individu 1-19



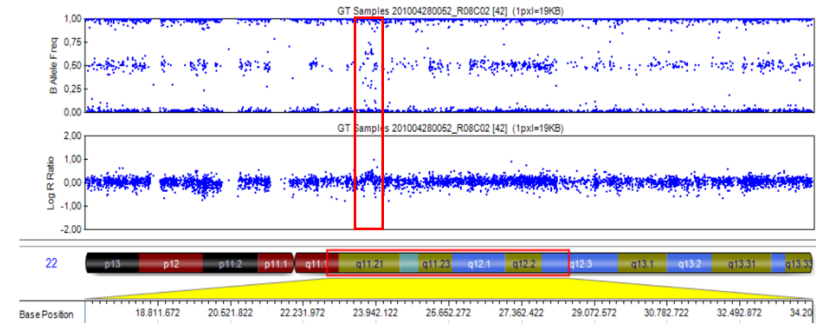
Individu 3-9



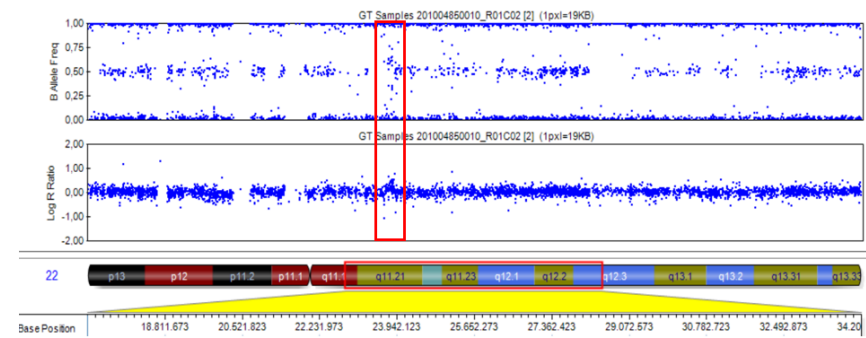
Individu 3-10



Individu 3-34

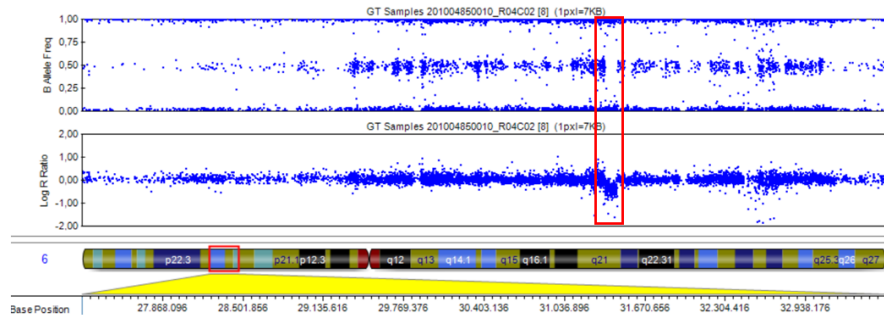


Individu 3-13

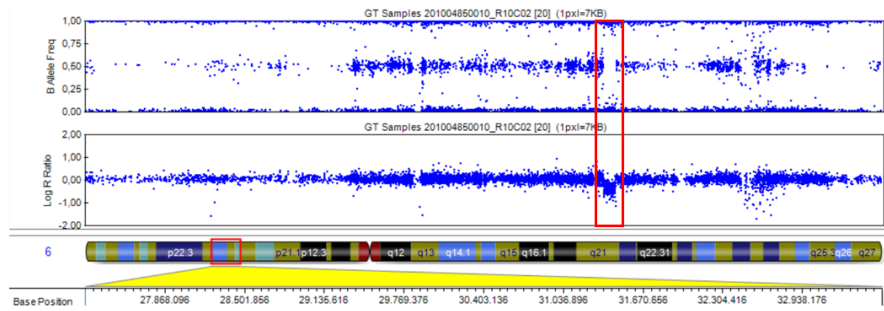


DEL6p21.33

Individu 1-20

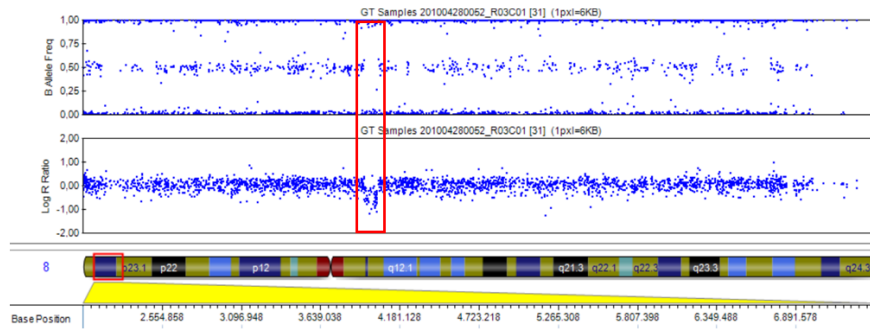


Individu 1-23

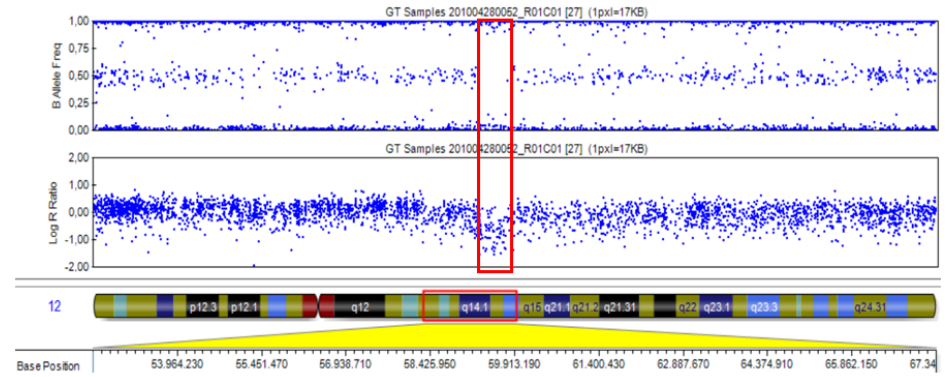


DEL8p23.2

Individu 1-27

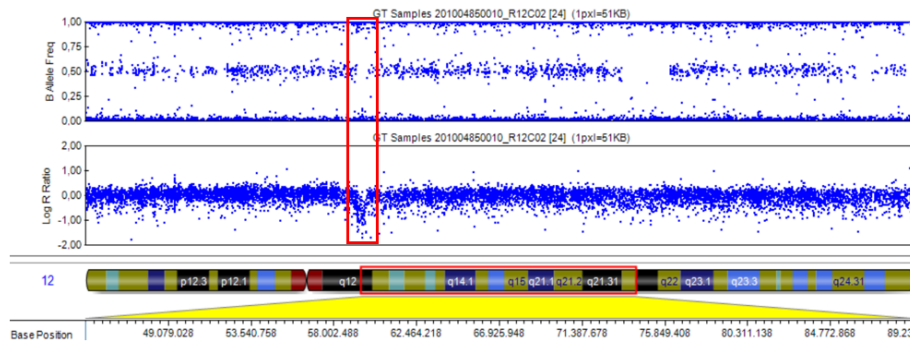


Individu 1-25



DEL12q14.1

Individu 1-24



Individu 1-27

