

**USO DE LA HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA-ARRAY (HGC-a) EN
PACIENTES CON RETRASO GLOBAL DEL DESARROLLO Y FENOTIPO
PARTICULAR. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA**

Dr. Sergio Alejandro Clavijo Hurtado
Residente de Pediatría
Universidad del Rosario

Tutor Temático: Dra. Heidi Mateus
Genetista Clínica
Universidad del Rosario

Tutor Metodológico: Dra. Marcela Galvez
Epidemióloga Clínica
Residente de Genética Clínica
Universidad del Rosario

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA
BOGOTÁ, 2013

**USO DE LA HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA-ARRAY (HGC-a) EN
PACIENTES CON RETRASO GLOBAL DEL DESARROLLO Y FENOTIPO
PARTICULAR. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA**

Sergio Alejandro Clavijo Hurtado

Revisión sistemática presentada como requisito parcial para optar por el título de:
Especialista en Pediatría

Tutor Temático: Dra. Heidi Mateus
Genetista Clínica
Universidad del Rosario

Tutor Metodológico: Dra. Marcela Galvez
Epidemióloga Clínica
Residente de Genética Clínica
Universidad del Rosario

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN PEDIATRIA
BOGOTA, 2013

DEDICATORIA

*“A mis pacientes quienes son la base de mi profesión y
el impulso para ser mejor médico cada día”*

AGRADECIMIENTOS

*“A todos quienes estuvieron a mi lado durante este gran reto de vida
y mi camino por la pediatría”*

RESUMEN

Introducción

La hibridación genómica comparativa es una técnica que permite la exploración de las anormalidades cromosómicas. Su utilidad en la aproximación de los pacientes con retraso global del desarrollo o fenotipo dismórfico, sin embargo, no ha sido explorada mediante una revisión sistemática de la literatura.

Metodología

Realizó una revisión sistemática de la literatura. Se incluyeron estudios controlados, cuasi-experimentales, de cohortes, de casos y controles, transversales y descriptivos publicados en idiomas inglés y español entre los años 2000 y 2013. Se realizó un análisis de la evidencia con un enfoque cualitativo y cuantitativo. Se realizó un análisis del riesgo de sesgo de los estudios incluidos.

Resultados

Se incluyeron 4 estudios que cumplieron con los criterios de inclusión. La prevalencia de alteraciones cromosómicas en los niños con retraso global del desarrollo fue de entre el 6 y 13%. El uso de la técnica permitió identificar alteraciones que no fueron detectadas mediante el cariotipo.

Conclusiones

La hibridación genómica comparativa es una técnica útil en la aproximación diagnóstica de los niños con retraso global del desarrollo y del fenotipo dismórfico y permite una mayor detección de alteraciones comparada con el cariotipo.

Palabras clave: Hibridación genómica comparativa-array, fenotipo, retraso global del desarrollo.

Tabla de Contenido

1. Justificación	7
2. Planteamiento del Problema	8
3. Objetivos del Proyecto	9
3.1 Objetivo General	9
3.2 Objetivos Específicos	9
4. Marco Teórico	10
4.1 Generalidades	10
4.2 Cromosomopatías	11
4.3 Abordaje del Paciente Dismórfico	13
4.4 Diagnóstico	18
4.4.1 HGC -a (Hibridación Genómica Comparativa – array)	21
5. Metodología	24
5.1 Criterios para la Inclusión de los Estudios	24
5.2 Métodos para la búsqueda de la Información	25
5.3 Recolección y Análisis de la Información	26
5.4 Criterios de Exclusión	28
5.5 Consideraciones Éticas	29
6. Resultados	30
6.1 Identificación de los Estudios	31
6.2 Evaluación del Riesgo de Sesgos	32
6.3 Uso de la HGC-a	33
7. Discusión	35
8. Recomendaciones	36
9. Bibliografía	37

1. JUSTIFICACIÓN

Con los cambios dados con el proceso de transición epidemiológica, las enfermedades genéticas comienzan a adquirir un interés especial dado que su contribución a la morbilidad y carga de la enfermedad han aumentado (1).

Alrededor de 1 de cada 120 nacidos vivos presentan algún tipo de anomalía cromosómica que se ve representada en alteraciones del fenotipo. La aparición de nuevas técnicas de evaluación citogenética, entre ellas la hibridación genómica comparativa-array (HGC-a), ha mejorado el nivel de resolución y a su vez, aumentado la detección de alteraciones que anteriormente pasaban desapercibidas (2).

A pesar de la importancia que ha adquirido esta técnica, aún no existe ningún trabajo de recopilación sobre su utilidad y comparación contra otras técnicas en la evaluación del retraso global del desarrollo y del fenotipo dismórfico. Esta revisión es el primer referente en ese sentido. Por otra parte este trabajo permitirá abrir espacios de discusión sobre la utilidad del uso de esta técnica en el proceso de evaluación dismórfico de los pacientes en edad pediátrica con sospecha de alteraciones genéticas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema que motiva el desarrollo de esta investigación se fundamenta en la importancia que tiene el diagnóstico genético preciso de pacientes pediátricos con retraso global del desarrollo, con el subsecuente beneficio social y económico para el afectado y su familia, ya que la identificación y el conocimiento de estas alteraciones se convierte en una de las herramientas más importantes para ejercer prevención de la enfermedad a través del asesoramiento genético.

En la práctica médica actual el abordaje diagnóstico de muchos de éstos pacientes es realizado por el pediatra, quien emplea como primera y única medida el análisis del cariotipo, pudiendo conllevar al subdiagnóstico de alteraciones cromosómicas estructurales que no pueden ser detectadas a través de la implementación de ésta técnica. La implementación de técnicas con mejor resolución como la HGC-a permite la detección de ganancias o pérdidas genómicas por debajo de 5 Kb (pequeñas), aun cuando el cariotipo inicial no muestre ninguna alteración (3).

La idea central del proyecto es mostrar a los pediatras y a los médicos en general que existen otras y nuevas técnicas (como la HGC-a) útiles en el diagnóstico de enfermedades de herencia cromosómica, y que no siempre el cariotipo es el gold standard para el estudio de las mismas (4). A través de esta revisión sistemática se intentó responderá a la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué utilidad tiene el uso de la HGC-a en la aproximación diagnóstica de los pacientes con fenotipo dismórfico y retraso global del desarrollo?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar una revisión sistemática de la literatura sobre la utilidad de la hibridación genómica comparativa-Array en pacientes con retraso global del desarrollo y fenotipo particular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una búsqueda sistemática de la literatura para identificar la evidencia existente sobre el uso de la hibridación genómica comparativa-array en el diagnóstico de pacientes con retraso global del desarrollo y fenotipo particular.
- Clasificar los estudios según su diseño metodológico.
- Realizar el análisis de calidad de los estudios incluidos.
- Analizar los indicadores de efecto del tratamiento y realizar el análisis combinado.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES

El diagnóstico de las enfermedades genéticas es sumamente importante para el desarrollo de pautas de conducta médica frente a las mismas. Conocer las bases genéticas y la herencia de estas enfermedades permite tener una aproximación pronóstica y predecir en términos de probabilidades el hecho de que determinada afectación pueda ser transmitida a la descendencia de una persona. Todo lo anterior cobrando importancia en lo que globalmente se conoce con el nombre de consejería genética que llevan a cabo los especialistas en la materia, y que abarca en la actualidad posibilidades diagnósticas a nivel prenatal y preimplantacional en aras de prevenir que estas enfermedades sean manifiestas.

Por otro lado es importante saber que el diagnóstico de éstas entidades pueden favorecer la instauración de un tratamiento, y que estos podrían favorecer el pronóstico y la evolución de patologías que sin tratamiento tendrían un curso clínico diferente e inclusive fatal.

Específicamente en Pediatría es muy importante el diagnóstico de las enfermedades genéticas, dado que la mayor parte de los pacientes afectados se encuentran dentro del grupo pediátrico. Una proyección al 2025 estima que su incidencia en nuestro medio oscila entre 37,3 y 52,8 por cada 1.000 habitantes (incluyendo las malformaciones congénitas que corresponden al 50% del total) (5, 6).

La idea del presente trabajo es describir como la técnica conocida como hibridación genómica comparativa - array puede ser superior a la técnica clásica del cariotipo para el estudio de cromosomopatías estructurales, dado que posee una mayor resolución para la detección de rearrreglos cromosómicos pequeños

que impliquen la ganancia o pérdida de información genética y que no serían observables en el cariotipo.

4.2 CROMOSOPATÍAS

La información genética de los seres humanos se encuentra contenida en una doble hebra de ácido desoxirribonucleico (ADN) en los 23 pares de cromosomas ubicados en los núcleos celulares. Los cromosomas se clasifican en dos grupos, los pares autosómicos, numerados del 1 al 22, y los sexuales (X e Y). El genoma normal de los seres humanos es diploide, el cual se obtiene a través de la fusión de células haploides (contienen una sola copia del genoma) provenientes del padre y la madre (7, 8).

La función de los cromosomas se ejerce a través de la transcripción del ADN en una hebra de la molécula de ácido ribonucleico (ARN) y su posterior traducción en los ribosomas del citoplasma celular. La porción del cromosoma que ejerce un efecto sobre la célula es conocida como gen (7, 8).

La descripción correcta del número de cromosomas en el ser humano se realizó en 1956, y tres años más tarde se identificaron las alteraciones numéricas conocidas como el Síndrome Down y Klinefelter. Actualmente se acepta que alrededor del 8% de los embarazos clínicamente evidentes y 50% de los abortos espontáneos del primer trimestre se asocian a alteraciones cromosómicas (7).

Las alteraciones cromosómicas se pueden clasificar en numéricas y estructurales, pudiendo afectar a cromosomas autosómicos o sexuales. Las células que no contienen un número de cromosomas múltiplo de 23 se denominan aneuploides, Se trata principalmente de monosomías (presencia de una sola copia de un cromosoma) y trisomías (tres copias de un cromosoma). Poliploidía es la presencia de un grupo completo de cromosomas extras en una célula. Mosaicismo

se define cuando son solamente algunas las células afectadas por esta aneuploidía (7).

Las trisomías más frecuentemente observadas en recién nacidos son la trisomía 21 o Síndrome Down (47,XX(Y),+21), trisomía 18 o Síndrome Edwards (47,XX(Y),+18), y la trisomía 13 o Síndrome Patau (47,XX(Y),+13). La alteración monosómica clásica es el síndrome de Turner (45,X0), y las poliploidías se subclasifican de acuerdo al número de grupos cromosómicos fusionados, en triploides o molas (69,XXX o 69,XXY), o tetraploide (92,XXXX) (7).

Las alteraciones estructurales son rearrreglos cromosómicos ocasionados por la reparación defectuosa de roturas en el DNA, o fallos en la recombinación. Se pueden clasificar en deleciones, denominadas como “del”, seguido del número del cromosoma comprometido entre paréntesis y por una descripción de la región comprometida por la delección en otro grupo de paréntesis (e.g. 46,XY, del(4) (p16.3). Otras alteraciones estructurales son la duplicación, denominada como “dup”, la cual es caracterizada por una porción extra de un segmento de otro cromosoma (e.g. 46,XX, dup(1) (q22q25); las inversiones denominadas como “inv” (e.g. 46,XY, inv(11) (p11p15), caracterizada por una reorganización de un segmento del cromosoma que se invierte y puede subclasificarse como paracéntrico (no incluye el centrómero) o pericéntrico (incluye el centrómero); los cromosomas en anillo, denominados como “r” (e.g. 46,XY, r(7) (p22q36) caracterizados por la delección de un telómero normal y fusión de las porciones terminales para formar un cromosoma circular; las translocaciones, denominadas como “t” (e.g. 46,XX, t(2;6) (q35;p21.3) que se caracterizan por una reagrupación intercromosómica que puede ser balanceada (cantidad de material genético normal pero con agrupación estructural anormal) o no balanceada (la célula gana o pierde material genético debido a la reestructuración cromosómica) (7).

Finalmente, los sitios frágiles son otra alteración estructural de los cromosomas y se caracterizan por presentar ciertos espacios en la estructura cromosómica, la

cual puede subclasificarse en las comunes (universales) o de baja incidencia (déficit de folato), siendo estas últimas heredables mendelianamente y causantes de enfermedades como el síndrome X frágil (7).

4.3 ABORDAJE DEL PACIENTE DISMÓRFICO

Aproximadamente el 16% de los abortos espontáneos son causados por anomalías cromosómicas. Entre un 2% y un 4% de los recién nacidos presentan defectos congénitos; los graves son una causa importante de mortalidad y morbilidad posnatal, por lo que el enfoque diagnóstico es de suma importancia ya desde el periodo prenatal, pero especialmente en el recién nacido donde se convierte en un reto para el pediatra y los médicos de las unidades neonatales (3, 9).

Los defectos congénitos se clasifican en mayores cuando tienen una repercusión médica, quirúrgica o cosmética importantes para el paciente; menores cuando no tienen dicha trascendencia y afectan a menos del 4% de la población, y variantes de la normalidad cuando, sin tener trascendencia, afectan a un mayor número de individuos. Estas últimas pueden variar ampliamente de unas poblaciones o razas a otras (4, 8).

La etiología de los defectos congénitos es compleja y diversa. Es por ello que sólo una clasificación patogénica nos permite una aproximación eficaz a la posible etiología. Existe una interacción entre factores ambientales y genéticos en todos los defectos congénitos, y el peso de cada uno de los factores varía con el tipo de defecto o defectos. Se estima que más del 50% de los defectos tienen una etiología parcial o totalmente genética. La observación detallada de los defectos puede aportar información relevante acerca del momento en el que se inició, el mecanismo por el que se produjo y la potencial causa del mismo (9).

Los defectos estructurales de comienzo prenatal pueden ser de dos tipos básicamente: los defectos primarios aislados del desarrollo, que afectan originalmente una única estructura y son los más frecuentes, y los que representan anormalidades malformativas múltiples (8,9).

Defectos primarios aislados del desarrollo

Malformación: es un defecto morfológico que resulta de un proceso anormal del desarrollo embriológico. La complejidad de la malformación depende del momento en que se produjo y el campo embrionario afectado. En general, entre más tarde aparezcan en el desarrollo embrionario o fetal, más simples serán. La causa es con frecuencia incierta y el consejo genético difícil. El riesgo de recurrencia se obtiene de forma empírica (a través del estudio epidemiológico de familias con este defecto concreto), y la incidencia y la recurrencia de estos defectos varían en las distintas poblaciones y familias, poniendo de relevancia que distintos genes y distintos factores ambientales confieren susceptibilidad para el defecto (8-10).

Deformación: es una forma, configuración o posición anormal de una parte del cuerpo normalmente diferenciada, producida por fuerzas mecánicas anormales, pero no disruptivas. La gran mayoría afectan el sistema musculo-esquelético y suelen estar producidas por moldeamiento intrauterino. Son de dos tipos: extrínsecas, caracterizadas por un efecto mecánico relacionado en su mayoría por un conflicto de espacio o posiciones anormales dentro de la cavidad uterina; e intrínsecas, que por el contrario son secundarias a hipotonía o hipoquinesia prenatal ocasionadas por anormalidades en la función neuromuscular o alteraciones primarias del sistema nervioso. La recurrencia de las deformaciones de origen extrínseco dependerá de que se haya o no solucionado la causa que dio lugar a la compresión. Así mismo, las deformaciones intrínsecas tendrán el riesgo de recurrencia que corresponda a la causa original (8-10).

Disrupción: Una disrupción es un defecto morfológico de un órgano, de parte de un órgano o de una región más extensa del cuerpo, que resulta de la lesión o destrucción de una estructura normalmente formada. Se conocen 2 mecanismos básicos etiológicos: las bandas fibrosas amnióticas que ocasionan desgarro e incluso amputación de la parte afectada, y la interrupción del flujo sanguíneo con isquemia, necrosis y/o reabsorción de la zona distal a la región afectada. El pronóstico dependerá de la zona afectada y de la extensión del daño, que suele ser mayor cuanto más precozmente se produjo en la gestación. Suelen deberse a causas de origen extrínseco (infección, teratógenos como cocaína, talidomida o misoprostol, traumatismos, etc.) o desconocido, como ocurre con muchas de las anomalías presuntamente causadas por una interrupción del flujo sanguíneo a una zona localizada del embrión o del feto. En muchas de estas anomalías de origen vascular, la preeclampsia materna, la edad materna joven y la nuliparidad son factores de riesgo (8-10).

Secuencia

Es considerada como una anomalía primaria simple o un mecanismo que actúa como factor para desencadenar una serie de eventos que conducen al paciente a una situación caracterizada por anomalías múltiples, que se relacionan entre sí por un mecanismo de producción en cascada; en estos enfermos la causa es desconocida, pero el desarrollo progresivo de las lesiones permite identificar, por su cronología, los mecanismos implicados en su patogenia. Es importante diferenciarlo de los patrones de anomalías múltiples, ya que el riesgo de recurrencia de la secuencia es el de la anomalía original o primaria. Dicha anomalía o defecto puede ser, a su vez, una malformación, deformación o disrupción. El ejemplo más ilustrativo es la secuencia de Pierre-Robin, en la que el defecto primario es una malformación, la hipoplasia mandibular, que secundariamente ocasiona que la lengua anormalmente elevada sólo pueda alojarse impidiendo el cierre adecuado del paladar (8-10).

Anormalidades malformativas múltiples

Síndrome polimalformativo (síndrome dismórfico): es un grupo de signos y síntomas que colectivamente indican o caracterizan una enfermedad; en este grupo las manifestaciones tienden a ocurrir juntas más no en secuencia, y de cierta manera reflejan la presencia de una condición particular de causa conocida cuyo mecanismo patogénico con frecuencia se ignora; generalmente tienen una historia natural similar y el riesgo de recurrencia puede obedecer a las leyes de la herencia; es decir las alteraciones suelen mostrar un patrón de combinación más o menos constante. El término espectro fenotípico señala el total de anomalías con sus respectivas frecuencias dentro de la población con dicho síndrome. En el reconocimiento de un síndrome de causa monogénica (de herencia mendeliana) hay que tener en cuenta los conceptos de penetrancia incompleta (falta de anomalías fenotípicas en presencia de un gen anómalo) y de expresión variable (manifestación fenotípica de gravedad variable en los distintos pacientes portadores de un gen dentro o fuera de una misma familia). Las causas de los síndromes polimalformativos son múltiples, y aunque muchos siguen teniendo una causa desconocida, continuamente se producen progresos en el conocimiento de sus causas genéticas. Muchos tienen modelos de etiología recientemente conocidos, como síndromes por microdelección, o patrones de herencia no mendeliana (8-10).

Asociación: es la aparición de anomalías múltiples que se asocian con más frecuencia de lo esperado por azar y de las que no se sabe que representen una secuencia o un síndrome. A medida que aumentan los conocimientos, las asociaciones pueden ser separadas en varios síndromes o secuencias. El ejemplo más típico es la asociación VATER o VACTERL, que incluye anomalías vertebrales, atresia de ano, cardiopatías, atresia de esófago, anomalías renales e hipoplasia radial. Estas alteraciones pueden aparecer en cualquier combinación de dos o más de ellas. Normalmente son esporádicas, su riesgo de recurrencia es próximo a cero y la etiología suele ser múltiple en cada una de ellas. La utilidad de

su reconocimiento es la necesidad de descartar la presencia de otras anomalías ocultas que se pueden asociar a una anomalía aparente (8-10).

Evaluación clínica del paciente dismórfico y/o con alteración cognoscitiva

Historia clínica: historia familiar de tres generaciones (consanguinidad, defectos congénitos, retraso mental, abortos, edad de los padres, etc.), antecedentes obstétricos, historia perinatal (teratógenos, movimiento fetal, etc.) (9, 10).

Exploración física: medidas antropométricas y comparación con valores normales estandarizados para la población, y documentación fotográfica. Intentar examinar a los familiares disponibles (9, 10).

Estudios complementarios: los estudios complementarios deben basarse en criterios clínicos de sospecha objetivos. Hay que conocer su utilidad precisa y sus implicaciones técnicas. El que se conozca el gen implicado no significa que exista una prueba disponible comercialmente para analizar las mutaciones. Todos los estudios genéticos y metabólicos deben ser secuenciales, por su complejidad y costo. Muchos requieren enviar muestras fuera del centro, y por ello, se requerirá un esfuerzo de coordinación para hacerlas llegar en condiciones óptimas. Pueden estar indicados estudios radiológicos o de otro tipo. En el neonato con defectos congénitos que fallece o en el feto, el esfuerzo diagnóstico debe ser tan intenso como en el neonato vivo (necropsia, fotos, Rx, cariotipo, etc.). No hay que olvidar que la historia y la exploración aportan el diagnóstico en la mayoría de los casos (9, 10).

Atención a la familia del paciente dismórfico

Todo el proceso diagnóstico y asistencial del paciente con dismorfismo debe incluir a la familia. La comunicación debe ser precoz y continua, coherente y planificada, multidisciplinaria pero sin informaciones contradictorias. El plan diagnóstico debe

estar claro, y la posibilidad de no llegar a un diagnóstico inmediato debe ser compartida con la familia, así como el hecho de que gran parte del plan terapéutico y del apoyo psicosocial son independientes del diagnóstico. Este apoyo debe garantizarse a largo plazo, dentro y fuera del hospital (9).

4.4 DIAGNÓSTICO

Cariotipo: es una técnica de citogenética en la que se obtiene el conjunto de cromosomas correspondientes al nivel más complejo de empaquetamiento de la cromatina. Con este método los cromosomas son recortados y ordenados u organizado; se colocan siempre de la misma manera: por tamaño y por forma. Se obtienen así dos tipos de estructuras: autosomas o cromosomas somáticos no sexuales (1-22) y cromosomas sexuales (X, Y). Es útil en el diagnóstico de alteraciones cromosómicas numéricas y aquellas estructurales que estén por encima de las 5 Kb (3, 7).

Los cromosomas metafásicos son estructuras bipartitas (2 partes), es decir, constan de 2 cromátides, cada una de las cuales contiene exactamente la misma información que la otra (copia de la misma cosa), por lo que lo que hay en una cromátide es exactamente lo mismo que hay en la otra. Las dos cromátides se encuentran divididas por la posición del centrómero en 2 brazos: brazo corto o “petit” (brazo p) y brazo largo (brazo q) (7).

Según la posición del centrómero los cromosomas se denominan (7):

- Metacéntricos: $p = q$ (si las 2 cromátides tienen los brazos iguales o muy similares).
- Submetacéntricos: $p < q$ ó $q < p$ (si uno de los brazos de las cromátides es más pequeño que el otro).
- Acrocéntricos: $p \ll q$ (cuando uno de los brazos cortos o p de una de las cromátides es muy pequeño)

- Telocéntricos: q (no existe brazo corto). En humanos solo se verán cromosomas telocéntricos en condiciones patológicas

Para identificar a los distintos cromosomas hace falta teñirlos y según las técnicas de tinción se pueden apreciar distintas bandas. Los cromosomas se clasifican en distintos grupos o letras por cuestiones históricas (carencia de tinciones específicas que impedían distinguir cromosomas dentro de un mismo grupo): A, B, C, D, E, F, G y los sexuales; esta clasificación hace referencia únicamente a la forma y el tamaño de los cromosomas e impide distinguir cromosomas de un mismo grupo o letra (no existían los bandeos). Antiguamente incluso el cromosoma X se colocaba dentro del grupo C, porque sin las técnicas específicas de tinción era imposible distinguir el CR sexual X de los CR del grupo C (7).

Entre las indicaciones del cariotipo se encuentran (3, 7):

- Sospecha de un síndrome genético conocido
- Múltiples anomalías congénitas
- Retardo mental de causa no conocida
- Estatura baja
- Retardo en el desarrollo sexual
- Genitales ambiguos
- Infertilidad de pareja
- Aborto habitual
- Leucemias y tumores linfoproliferativos
- Cáncer (algunos tipos)

FISH (Hibridación Fluorescente en Situ): es una técnica molecular que puede ser complementaria al cariotipo y permite localizar un determinado fragmento de ADN de interés particular, y que no siempre es observable al microscopio. Ésta técnica pone de manifiesto la presencia o ausencia de secuencias génicas específicas. Se puede aplicar sobre núcleos interfásicos de extensiones celulares o cortes de tejido o directamente en cromosomas. La posibilidad de poder utilizar

las técnicas de FISH sobre células que ni están dividiéndose es importante en aquellas neoplasias con baja tasa de división celular, como en los síndromes linfoproliferativos crónicos. Para ello utiliza sondas marcadas con fluorocromos. Dependiendo del tipo de sonda utilizada es posible evaluar la presencia de reordenamientos de los núcleos. Las sondas son pequeñas secuencias de cadena sencilla de ADN, que son complementarias a la secuencia de interés y así son dirigidas a un fragmento génico específico. Se utilizan diferentes tipos de sondas entre las que se encuentran: las sondas centroméricas o ADN satélite, las sondas de pintado cromosómico y las sondas de secuencia única (4, 9).

Para localizar la secuencia de interés, la sonda debe hibridar con la secuencia de ADN de la muestra. El primer paso es desnaturalizar las moléculas de ADN (separar las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del ADN), tanto de la sonda como la de la muestra de estudio. Después se hibridan la sonda con su región complementaria en el ADN de la muestra colocándose a 37°C, y por complementariedad de las bases se presenta el apareamiento entre las mismas y la formación del híbrido. Con un microscopio de fluorescencia se observan las señales de la sonda marcada (4, 9).

Esta técnica es útil para cuantificar alteraciones numéricas, tanto si se presentan o no en clones de baja expresión o baja capacidad proliferativa y para monitorizar clones hiperdiploides en leucemia linfoblástica aguda. Otra aplicación de la FISH es en el seguimiento de pacientes con trasplante alogénico de distinto sexo mediante el uso de sondas centroméricas para los cromosomas sexuales (4, 9).

La FISH, como complemento de la citogenética convencional, puede ser de utilidad diagnóstica y pronóstica en el estudio de las neoplasias hematológicas. Ambas metodologías tienen limitaciones y ventajas. La citogenética requiere que las células del clon neoplásico se estén dividiendo. Cuando los cromosomas son de mala calidad su interpretación es dudosa. Se analizan pocas células y tiene una baja sensibilidad. Por el contrario la FISH se puede utilizar sobre núcleos en

interfase y sobre células en metafase, pudiendo analizarse más células que con la citogenética, siendo además una técnica con mayor sensibilidad. La información brindada por la FISH está limitada al reordenamiento buscado, es decir a la sonda utilizada. Por eso la importancia en ocasiones de ser complemento del cariotipo con el que tenemos información de todos los cromosomas. La técnica FISH es más costosa que la citogenética convencional (4, 9).

MLPA (Amplificación Múltiple Dependiente de Sonda): ésta técnica es una variante de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que permite la amplificación de múltiples dianas con un único par de primers, evitando con esto las limitantes de la PCR multiplex que emplea más de un par. En ésta técnica cada sonda consta de 2 oligonucleótidos (uno derecho y otro izquierdo) que hibridan con el ADN de la muestra estudiada hasta encontrarse uno con el otro, momento en el que se complementa el análisis con la ligadura de una ligasa termoestable, para la posterior amplificación a través de PCR, y el posterior análisis del producto mediante electroforesis y comparación con un control normal. La técnica relativamente nueva descrita en el 2002 por Schouten es de importancia diagnóstica para un gran número de problemas genéticos que van desde un número anormal de cromosomas (aneuploidías), deleciones, duplicaciones y expansiones de genes, siendo descrita inclusive con mayor sensibilidad que el cariotipo y el FISH para lesiones pequeñas (4, 9).

4.4.1 HGC-a (Hibridación Genómica Comparativa – array)

La hibridación genómica comparativa mediante el uso de microarrays (“microchips de DNA”), está revolucionando la genética humana en las áreas de diagnóstico clínico e investigación. Esta relativa nueva técnica permite la exploración simultánea de múltiples áreas del genoma. Originalmente fue diseñada para el análisis de aberraciones cromosómicas y ha tenido una amplia aplicación en estudios de tumores, siendo actualmente importante en el diagnóstico simultáneo de alteraciones estructurales cromosómicas de relevancia clínica importante (3, 4).

Esta técnica se emplea básicamente para detectar la presencia de ganancias (duplicación o amplificación) o pérdidas (deleción o nulisomía) de segmentos del genoma. El método se basa en el análisis cuantitativo que evalúa diferencias regionales de fluorescencia, a lo largo de los cromosomas, identificando regiones anormales del genoma. La HGC detecta solamente cambios desbalanceados en los cromosomas; no detecta anomalías estructurales de los cromosomas balanceadas como translocaciones o inversiones (3, 4, 11, 12).

Cada región incluida en los microarrays está representada por 3 o 4 clones, y es estudiada en duplicado. Las muestras de los pacientes estudiados son procesadas para extracción de DNA y luego mezcladas con una muestra control de DNA de un individuo normal. La combinación de ambas muestras en cantidades equimolares es previamente marcada con fluorocromos que permiten su detección posterior. La muestra es luego hibridizada en el microarray. El microarray utilizado contiene los clones de interés que han sido adheridos a la superficie del vidrio mediante un proceso de siliconización. Luego de la hibridación y lavado, la detección de la señal fluorescente es efectuada por una escaneadora automática. Los datos obtenidos son analizados con un programa que permite la normalización de los clones con respecto a la muestra del paciente y el control. Se establecieron rangos de variación para facilitar el análisis y determinar la presencia de deleciones, duplicaciones o variantes polimórficas (4, 11, 12).

Además de ser de utilidad en analizar células tumorales, la CGH está indicada en la evaluación de niños con dismorfismo facial y corporal, malformaciones múltiples congénitas, retardo mental y del desarrollo de causa no especificada, autismo y en la definición detallada de alteraciones cromosómicas como deleción o duplicación previamente observadas en el cariotipo convencional, e incluso de aquellas no observables por técnicas de citogenética convencional dado que permite, junto con el análisis bioinformático, evaluar los genes y las regiones cromosómicas involucradas (11, 12).

El grupo de Genética Humana y Molecular del Texas Children's Hospital en análisis de muestras a la que aplicaron estudios preliminares con HGC-a, demostraron la detección de más de un 6 % de anomalías en pacientes que tenían estudios cromosómicos previos normales; proponiendo con ello que la HGC-a es una técnica superior a la citogenética convencional para la detección de microarreglos genómicos hasta de 1 Kb (4, 11, 12).

En conclusión HGC-a permite (3, 4, 11, 12):

- Detección simultanea de un gran número de alteraciones cromosómicas de alta relevancia clínica incluyendo deleciones y duplicaciones.
- Identificación de anomalías que difícilmente son detectadas con técnicas de análisis convencional como en el caso de las microduplicaciones que son raramente visibles aún con FISH en células en metafase y que requieren estudios de FISH en células de interfase.
- Efectuar correlaciones genotipo-fenotipo en alteraciones de regiones genómicas conocidas.
- Delineación de nuevos fenotipos.

5. METODOLOGÍA

En esta sección se presentan los métodos que se emplearon para la realización de esta revisión sistemática.

5.1 CRITERIOS PARA LA INCLUSIÓN DE LOS ESTUDIOS

5.1.1 Tipos de estudios

Se incluyeron estudios realizados en seres humanos de cualquier diseño metodológico: estudio descriptivo, estudio de corte transversal, estudio de cohortes, estudio de casos y controles, estudios cuasi experimentales y ensayos clínicos controlados. Los estudios debían estar publicados entre el primero de enero del 2000 y el 31 de enero del 2013. Se incluyeron estudios en idiomas inglés y español.

5.1.2 Tipos de participantes

Pacientes con retraso global del desarrollo o fenotipo dismórfico con edades entre 1 mes y 18 años, de cualquier raza o país de procedencia.

5.1.3 Tipos de comparaciones

Se incluyeron estudios que realizaran cualquier comparación de la técnica contra otros métodos diagnósticos.

5.1.4 Desenlaces

Desenlaces primarios

- Número de imbalances cromosómicos en pacientes con retraso global del desarrollo

- Numero de imbalances cromosómicos en pacientes con fenotipo dismórfico

Desenlaces secundarios

- Marcadores genéticos de la enfermedad
- Caracterización de las anomalías cromosómicas en estas poblaciones
- Descripción de genotipos y fenotipos
- Genes candidatos implicados en el desarrollo de estas anomalías

5.2 MÉTODOS PARA LA BÚSQUEDA DE LA INFORMACIÓN

5.2.1 Bases de datos

Para la búsqueda de la información se emplearon las siguientes bases de datos:

- Pubmed
- Embase
- Bireme

5.2.2 Estrategia de búsqueda y palabras clave

Se emplearon los descriptores MeSH:

Población: 1. phenotype, 2. Child Development Disorder

Intervención: 3. Array Based Comparative Genomic Hybridization

Desenlaces: .4. Chromosome Disorders, 5. Chromosome Aberrations

Con base en estas palabras clave se construyeron las estrategias de búsqueda:

PUBMED: 1 AND 3 AND 4, 1 AND 3 AND 5, 2 AND 3 AND 4, 2 AND 3 AND 5.

OVID: 1 AND 3 AND 4, 1 AND 3 AND 5, 2 AND 3 AND 4, 2 AND 3 AND 5.

EMBASE: 1 AND 3 AND 4, 1 AND 3 AND 5, 2 AND 3 AND 4, 2 AND 3 AND 5.

BIREME: 1 AND 3 AND 4, 1 AND 3 AND 5, 2 AND 3 AND 4, 2 AND 3 AND 5.

5.2.3 Otras fuentes de búsqueda

Se realizó una búsqueda a través de la base de datos de ensayos clínicos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos. Se realizó la revisión de referencias de los estudios incluidos.

5.3 RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

5.3.1 Selección de los estudios

Se realizó revisión pareada de los títulos y resúmenes de los artículos que arrojó la búsqueda. Se identificaron los criterios de inclusión y se descargaron los artículos que los cumplían. En caso de existir dudas sobre si un artículo cumplía con los criterios de inclusión se obtuvo el documento completo para evaluar si se incluía. Se clasificaron los estudios según su diseño metodológico.

5.3.2 Extracción y manejo de la información

Las variables a tener en cuenta fueron: revista, año de publicación, número de participantes, edad promedio de los participantes, sexo, criterios de inclusión y exclusión en el estudio, diagnóstico de los pacientes, dosis y esquema de manejo, grupo control, desenlaces clínicos y paraclínicos.

Para el manejo de la información se emplearon los programas Microsoft Excel versión 2007 y Review Manager versión 5.0 para Windows.

5.3.3 Calidad y riesgo de sesgo

Se planteó la aplicación de las recomendaciones para la evaluación del riesgo de sesgos propuestas por la colaboración Cochrane. Los parámetros que fueron tenidos en cuenta por la Colaboración son:

- Método de aleatorización
- Enmascaramiento o cegamiento de la asignación
- Cegamiento de los participantes
- Pérdidas y seguimiento de los sujetos de estudio
- Reporte de los desenlaces presentados
- Otras fuentes de error

Para cada artículo se revisarían cada uno de los ítems anteriores y se calificaron de acuerdo a tres categorías: si, cuando el ítem era descrito y el método utilizado era adecuado (en el caso del seguimiento corresponderá a pérdidas de sujetos menores al 20%), no, cuando no se mencionaba o el método era inadecuado (para el ítem seguimiento fueron pérdidas mayores al 20%) o sin claridad.

Se consideraron tres categorías de estudios según el riesgo de sesgos: baja probabilidad de sesgos cuando en todos los ítems anteriores se obtuviera una calificación de SI, probabilidad moderada de sesgos cuando en uno o más de los ítems fueran rotulados como SIN CLARIDAD y alta probabilidad de sesgos cuando uno o más ítems se hayan rotulado como NO.

5.3.4 Efecto del tratamiento

Para desenlaces dicotómicos se presentaron los resultados como riesgos relativos con intervalos de confianza del 95% o diferencias de riesgos con sus intervalos de confianza al 95%. Para desenlaces continuos se utilizó la diferencia del promedio con sus intervalos de confianza al 95% o diferencia promedio del peso del estudio

con sus intervalos de confianza al 95%. La diferencia promedio estandarizada se utilizó cuando se mida el mismo desenlace con técnicas diferentes.

5.3.5 Manejo de los datos perdidos

La información de los datos perdidos fue conseguida a través del contacto a los autores del estudio por correo electrónico, se esperó la respuesta por un plazo de hasta 15 días. Se empleó para el análisis el principio de intención de tratar.

5.3.6 Heterogeneidad

Cuando existiera heterogeneidad clínica entre los ensayos se realizó un análisis por subgrupos. Se planteó el uso del test Chi cuadrado y el cálculo del estadístico I cuadrado para cuantificar la heterogeneidad de los ensayos incluidos en la revisión. Se consideró que existía heterogeneidad si el resultado del I cuadrado era mayor del 50% o la prueba Chi cuadrado fuera significativa. Cuando no existiera evidencia de heterogeneidad se realizó el meta-análisis usando el modelo de efectos fijos. Cuando existió heterogeneidad significativa se empleó el modelo de efectos aleatorios.

5.3.7 Evaluación del sesgo de publicación

Se planteó la realización del análisis del sesgo de publicación mediante la construcción de una gráfica de embudo.

5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Estudios de baja calidad metodológica en los cuales se pierda más del 50% de la información sobre los resultados de los desenlaces.

5.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS

La resolución 8430 del año 1993 establece el marco de normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud en Colombia, clasifica este estudio de revisión sistemática de la literatura como una INVESTIGACIÓN SIN RIESGO dado que es un estudio que utiliza fuentes de información secundaria (artículos ya publicados) y por ende, el investigador no modifica ni interviene sobre variables biológicas, fisiológicas, psicológicas y/o sociales en sujetos de estudio.

6. RESULTADOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura para identificar la evidencia científica existente sobre el uso de la HGC-a en el diagnóstico de pacientes en edad pediátrica con fenotipo dismórfico y retraso global del desarrollo.

A través de la búsqueda en bases de datos se obtuvieron en total de 2926 resultados y en otras fuentes de búsqueda (registro de ensayos clínicos) se documentaron 4 resultados adicionales. De estos, 4 estudios cumplieron con los criterios de inclusión y fueron tenidos en cuenta dentro del análisis de la revisión sistemática. La figura 1 presenta el diagrama de flujo de la revisión sistemática.

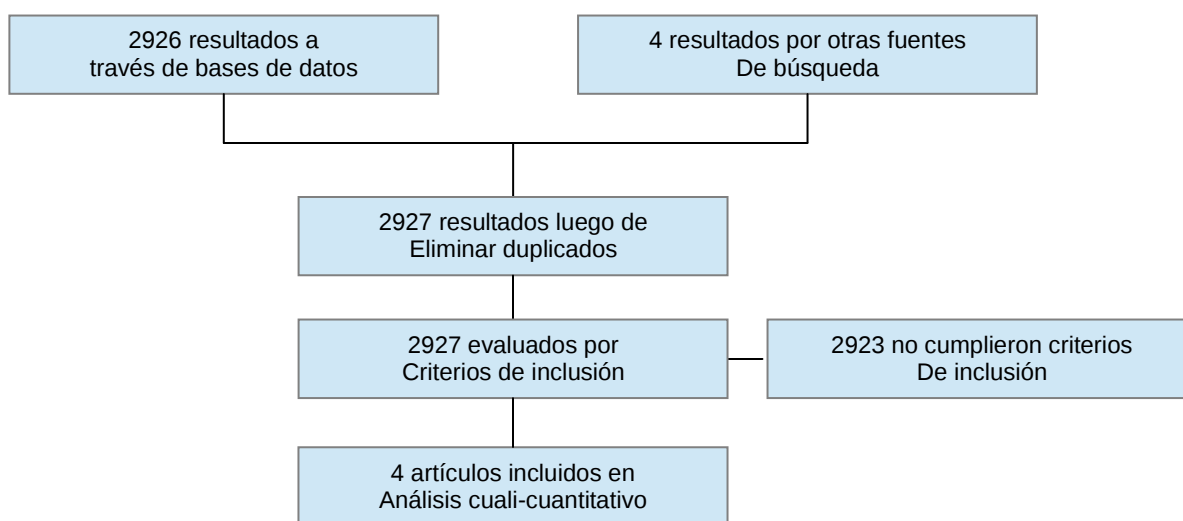


Figura 1. Diagrama de flujo de la revisión sistemática.

La descripción de resultados distribuidos según la estrategia de búsqueda y la base de datos se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la búsqueda sistemática.

Estrategia búsqueda	Pubmed	Embase	Bireme
Phenotype AND Array Based comparative genomic hybridization AND Chromosome disorders	281	278	5
Phenotype AND Array Based comparative genomic hybridization AND Chromosome aberrations	819	956	14
Child development disorder AND Array Based comparative genomic hybridization AND Chromosome disorders	103	125	3
Child development disorder AND Array Based comparative genomic hybridization AND Chromosome aberrations	183	157	2

Como puede apreciarse Pubmed y Embase fueron las bases de datos con mayor cantidad de resultados. Bireme tuvo la menor cantidad de resultados y estos se dieron en revistas de habla inglesa, no se documentaron resultados en el tema en revistas latinoamericanas.

6.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS

En total se incluyeron 4 estudios. Las características de estos estudios se presentan en la tabla 1.

Tabla 2. Identificación de los estudios incluidos

Autor	Año	Tipo de diseño	n	Desenlaces	Ref
Shevell MI	2008	Estudio descriptivo	94	Presencia de anomalías cromosómicas.	13
Newman WG	2007	Estudio descriptivo	36	Prevalencia de anomalías cromosómicas	14
Shaw-Smith C	2006	Estudio descriptivo	3	Prevalencia anomalías cromosómicas	15
Ness GO	2002	Estudio descriptivo	66	Prevalencia de anormalidades cromosómicas	16

No se documentaron estudios de cohortes o estudios de prueba diagnóstica que compararan la prueba HGC-a con otros métodos diagnósticos para estas alteraciones.

6.3 EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGOS

Se realizó una evaluación del riesgo de sesgos en los estudios incluidos. De entrada, por no tratarse de estudios controlados, se presume la posibilidad de introducción de sesgos importante en la información, no obstante, debe tenerse en cuenta, que por el tipo de intervención objeto de estudio, es evidente que las primeras aproximaciones serían a través de estudios descriptivos. Lamentablemente no se documentó la presencia de estudios de prueba diagnóstica para esta técnica que permitiera estimar su utilidad directa como prueba diagnóstica.

Se presentan a continuación los puntos críticos que pueden afectar la calidad de los estudios y ser fuente de sesgos en la información. Debe tenerse en cuenta que por tratarse de estudios no controlados son susceptibles a una fuente de sesgos importante.

- No aleatorización: Ninguno de los estudios fue aleatorizado. Se aumenta el riesgo de sesgo de confusión por introducción de variables de confusión.
- Grupo comparador: Dos estudios (Shaw-Smith C y Ness GO) realizaron una comparación de la técnica con hallazgos en cariotipo y método FISH.
- Calculo de tamaño de la muestra: no se emplea en ningún estudio, una técnica para la estimación del tamaño muestra lo cual podría comprometer el poder estadístico del estudio. Debe tenerse en cuenta que por tratarse de estudios sobre condiciones clínicas no tan frecuentes la consecución de pacientes para los mismos es difícil.

- Reporte de información de los desenlaces: No se encontró evidencia de sesgo por reporte selectivo de la información sobre los desenlaces.
- Inclusión de participantes: En todos los estudios se describe claramente los criterios de inclusión y de exclusión de los individuos.

6.3USO DE LA HGC-a

En el estudio de Shevell MI se incluyeron 94 niños con retraso global del desarrollo. A estos además se les realizaron estudios de cariotipo y neuroimágenes así como la confirmación con FISH de las anormalidades cromosómicas detectadas por la técnica. De todos los niños 5 presentaron anormalidades cromosómicas no detectadas previamente lo cual representa una prevalencia del 6.4%. En tres casos se apreció una localización subtelomérica de los mismos. La presencia de perfil dismórfico era predictora de hallazgos patológicos en la HGC-a, la severidad del retraso sin embargo no mostro ser un factor predictivo.

En el estudio de Newman WG et al se incluyeron 36 casos de niños con retraso del desarrollo. En cinco de estos casos se encontraron anomalías cromosómicas lo cual representa una prevalencia del 13.8%. Al realizar el análisis de costos se encontró que la intervención era económicamente viable cuando previamente se aplicaron criterios clínicos de selección de los casos clínicos con mayor probabilidad de alteración.

En el estudio de Shaw-Smith se incluyeron tres niños con alteración del crecimiento en los cuales se detectó una deleción a nivel del cromosoma 17q21.3, con un tamaño de entre 500 y 650 kb.

En el estudio de Ness GO se incluyeron 66 niños con retraso del desarrollo psicomotor con o sin rasgos de fenotipo dismórfico y malformaciones congénitas. En de 5 de 50 niños con cariotipo normal se detectó una anormalidad

cromosómica. En uno de siete casos con aparente translocación balanceada, se detectó en realidad una delección. En nueve casos en los cuales la detección de alteración de cromosoma era difícil por otra técnica, a través de la HGC-a fue realizada de manera precisa.

7. DISCUSIÓN

Se realizó una revisión sistemática de la literatura para identificar los estudios en humanos sobre uso de la HGC-a en la detección de anomalías cromosómicas en niños con retraso global del desarrollo o rasgos dismórficos.

Se incluyeron 4 estudios todos de diseño descriptivo. Ya que es la primera revisión sistemática que se realiza en este campo, no existen referentes previos que permitan identificar si la cantidad y calidad de la evidencia que se reporta es concordante.

Los estudios incluidos mostraron una prevalencia de entre el 6 y 13% de alteraciones cromosómicas en pacientes con retraso global del desarrollo. La presencia de rasgos dismórficos mas no el grado del retraso del desarrollo, fue predictor de la detección de estas alteraciones. Estos hallazgos resaltan la potencial utilidad del uso de la técnica en la aproximación diagnóstica de los niños con retraso del desarrollo. Futuros estudios deberán indagar por aspectos como el costo o la frecuencia de aparición de ciertas anomalías cromosómicas en la población colombiana. Otros estudios deben estar dirigidos a caracterizar la prevalencia de las anomalías genéticas en niños con retraso global del desarrollo. La información derivada de estas pruebas además puede servir para ilustrar el pronóstico del paciente durante la consulta de asesoría genética.

Una limitación de este estudio deriva del tipo de estudio incluido. El tipo de diseño de los estudios incluidos podría permitir la introducción de sesgos de confusión sin embargo por la naturaleza de la intervención en estudio se considera que este riesgo es mínimo. Otro inconveniente deriva de los límites para el tiempo e idioma de búsqueda, sin embargo cuando se realizó la búsqueda bibliográfica no se encontró evidencia fuera de los parámetros de los criterios de inclusión.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existe evidencia sobre el uso de la HGC-a en el proceso diagnóstico de los niños con retraso del desarrollo o con fenotipo dismórfico.

La prevalencia de anormalidades cromosómicas en niños con retraso global del desarrollo es de entre el 6 y 13%. Es necesario realizar estudios en la población colombiana para caracterizar esta prevalencia así como los sitios de afectación más frecuente.

La HGC-a es una técnica útil en la aproximación diagnóstica de pacientes con retraso del desarrollo y fenotipo dismórfico por cuanto permite la identificación de anormalidades cromosómicas no detectadas mediante el cariotipo.

En el futuro deben desarrollarse estudios que permitan identificar la costo-utilidad o el costo-beneficio de la aplicación de la HGC-a de rutina en la evaluación de los niños con retraso global del desarrollo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* 2010; 115 (22): 4331-6.
2. Benaiges RG. La citogenética en la valoración dismórfica. *BSCP Can Ped* 2004; 28: 195-199.
3. Hochstenbach R, et al. Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *European Journal of Medical Genetics* 52 (2009) 161–169
4. Miller DT, et al. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics* 86, 749–764, May 14, 2010.
5. Zarante I, Franco L, López C, Fernández N. Frecuencia de malformaciones congénitas: evaluación y pronóstico de 52.744 nacimientos en tres ciudades colombianas. *Biomédica* 2010; 30:65-71
6. Zarante I, López MA, Caro A, García JC, Ospina JC. Impact and risk factors of craniofacial malformations in a Colombian population. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 73 (2009) 1434–1437
7. Parra M, Schepeler M, Quiroz L. Cromosomopatías. Unidad Medicina Fetal, Hospital Universitario de Chile, 2000
8. Aviña JA, Wilson BT. Dysmorphic syndrome of multiple congenital abnormalities: Current classification updated. *Revista Mexicana de Pediatría*. Vol. 76, Núm 3. Mayo/Junio 2009. 132-135
9. Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006; 117 (6).
10. Casanelles MdC, García F, Reyes D, García A. Enfoque diagnóstico del niño dismórfico. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría. Neonatología*. España, 2008

11. Poot M, Hochstenbach R. A three-step workflow procedure for the interpretation of array-based comparative genome hybridization results in patients with idiopathic mental retardation and congenital anomalies. *Genetics IN Medicine*, Volume 12, Number 8, August 2010
12. Friedman JM, et al. Detection of pathogenic copy number variants in children with idiopathic intellectual disability using 500 K SNP array genomic hybridization. *BMC Genomics* 2009, 10:526
13. Shevell MI, Bejjani BA, Srour M, Rorem EA, Hall N, Shaffer LG. Array comparative genomic hybridization in global developmental delay. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B (7): 1101-8.
14. Newman WG, Hamilton S, Ayres J, Sanghera N, Smith A, Gaunt L, et al. Array comparative genomic hybridization for diagnosis of developmental delay: an exploratory cost-consequences analysis. *Clin Genet* 2007; 71 (3): 254-9.
15. Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, Martin H, Rickman L, Gribble S, et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 2006; 38 (9): 1032-7.
16. Ness GO, Lybaek H, Houge G. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 2002; 113 (2): 125-36.