



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Facultat de Medicina

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva i  
Salut Pública

APORTACIÓ DEL MICROARRAY CROMOSÒMIC A  
L'ESTUDI PRENATAL DELS FETUS  
DIAGNOSTICATS DE RETARD DE CREIXEMENT  
PRECOÇ, TRANSLUCÈNCIA NUCAL PATOLÒGICA  
I/O MALFORMACIONS FETALS MAJORS

Tesi doctoral presentada per la llicenciada  
Silvia Pina Pérez  
per optar a la titulació de Doctor en Medicina

Direcció de la tesi: Dra. Judith Lleberia Juanós i Dra. Neus Baena Díez

Tutor de la tesi: Dr. Antoni Payà Panadés

Sabadell, 2020



**UAB** Universitat Autònoma  
de Barcelona

 **Parc Taulí**  
Hospital Universitari



Facultat de Medicina

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva i  
Salut Pública

APORTACIÓ DEL MICROARRAY CROMOSÒMIC A L'ESTUDI PRENATAL DELS  
FETUS DIAGNOSTICATS DE RETARD DE CREIXEMENT PRECOÇ,  
TRANSLUCÈNCIA NUCAL PATOLÒGICA I/O MALFORMACIONS FETALS MAJORS

Tesi doctoral presentada per la llicenciada

SILVIA PINA PÉREZ

per optar a la titulació de Doctor en Medicina

DIRECTOR/A: JUDITH LLEBERIA JUANÓS I NEUS BAENA DÍEZ

TUTOR: ANTONI PAYÀ PANADÉS

Sabadell, 14 de Setembre de 2020



Als meus fills, Marc i Judit

Als meus pares i germana

Per la paciència i l'amor que em dediquen





## AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu agraïment al tutor d'aquesta Tesi, Dr. Antoni Payà Panadés, per recordar-me amb insistència que tan important és la forma com el fons i per la consideració a l'hora de fer les correccions.

A les meves directores pel suport rebut. A la Dra. Judith Lleberia Juanós, per haver-me iniciat en el camí, per contagiar-me el seu entusiasme per la feina, per la seva permanent disposició i la seva paciència. A la Dra. Neus Baena Díez per l'ajut en la interpretació dels resultats genètics i en les correccions sempre pertinents.

Als companys i amics del Diagnòstic Prenatal, excel·lents professionals, i molt especialment als ecografistes, Francisco Mellado, Manuel Corona i Laura Serra perquè sempre tenen alguna cosa a ensenyar.

Als meus companys de feina, col·legues i mestres alhora, Jordi Costa Pueyo i Maria Grimau Gallego, que m'han enriquit i m'han aportat experiència sempre.

A les companyes de la Unitat de Genètica de l'Hospital, per la seva valuosa aportació en els estudis dels array-CGH.

A tots els professionals del Servei de Ginecologia i Obstetrícia per la seva gran tasca diària en l'atenció a la dona.

Als Neonatòlegs, Neuropediatres i Cardiólegs Pediàtrics pel seguiment dels nadons amb tanta cura i professionalitat.

I molt especialment a la meva família i amics, per ser-hi sempre, en tots els moments.

I sobretot als pacients i les seves famílies per la seva confiança.

A tots ells, el meu agraïment.



**APORTACIÓ DEL MICROARRAY CROMOSÒMIC A L'ESTUDI  
PRENATAL DELS FETUS DIAGNOSTICATS DE RETARD DE  
CREIXEMENT PRECOÇ, TRANSLUCÈNCIA NUCAL  
PATOLÒGICA I/O MALFORMACIONS FETALS MAJORS**



## ÍNDIX

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓ .....   | 18 |
| ◦ 1.1. INTRODUCCIÓ AL DIAGNÒSTIC PRENATAL.....   | 20 |
| ◦ 1.2. TECNOLOGIA DE L'ARRAY.....  | 21 |
| ◦ 1.3. TIPUS DE MICROMATRIUS .....   | 22 |
| ◦ 1.4. RESOLUCIÓ DE L'ARRAY CROMOSÒMIC.....  | 24 |
| ◦ 1.5. AVANTAGES I LIMITACIONS DE L'ANÀLISI D'ARRAY-CGH .....  | 25 |
| ◦ 1.6. MICORARRAY A LA PRÀCTICA CLÍNICA .....  | 27 |
| ▪ 1.6.1. MICROARRAY I CÀNCER .....   | 27 |
| ▪ 1.6.2. MICROARRAY EN L'AVALUACIÓ DE LA DISCAPACITAT<br>INTEL·LECTUAL .....   | 28 |
| ▪ 1.6.3. MICROARRAY I TRASTORNS DE L'ESPECTRE AUTISTA .....  | 32 |
| ◦ 1.7. MICROARRAY EN DIAGNÒSTIC PRENATAL .....   | 35 |
| ▪ 1.7.1. MICROARRAY I AVORTAMENT ESPONTANI .....   | 36 |
| ▪ 1.7.2. MICROARRAY I ÒBIT FETAL .....   | 39 |
| ▪ 1.7.3. MICROARRAY I MALFORMACIONS CONGÈNITES .....   | 42 |
| ◦ 1.7.3.1. MICROARRAY I CARDIOPATIES CONGÈNITES.....   | 45 |
| ◦ 1.7.3.2. MICROARRAY I MALFORMACIONS DEL<br>SISTEMA NERVIOS CENTRAL .....   | 47 |
| ◦ 1.7.3.3. MICROARRAY EN FETUS AMB<br>ALTRES MALFORMACIONS ESTRUCTURALS .....  | 51 |
| ▪ 1.7.4. MICROARRAY EN FETUS AMB INCREMENT DE<br>LA TRANSLUCÈNCIA NUCAL .....  | 53 |
| ▪ 1.7.5. IMPORTÀNCIA DELS MARCADORS DE SEGON TRIMESTRE.<br>PAPER DEL PLEC NUCAL DESPRÉS DE LA IMPLEMENTACIÓ DE LA TN<br>A L'ECOGRAFIA DEL PRIMER TRIMESTRE ..... | 57 |
| ▪ 1.7.6. MICROARRAY I CREIXEMENT INTRAUTERÍ<br>RESTRINGIT .....  | 60 |
| ◦ 1.8. VARIANTS EN NOMBRE DE CÒPIA .....   | 63 |

|   |        |
|---|--------|
| ◦ 1.9. SÍNDROMES DE MICRODELECCIÓ-MICRODUPLICACIÓ .....   | 68     |
| ◦ 1.10. INDICACIONS DE L'ARRAY EN DIAGNOSTIC PRENATAL .....   | 70     |
| ◦ 1.11. ASSESSORAMENT GENÈTIC .....   | 71     |
| ▪ 1.11.1. ASSESSORAMENT PRETEST .....   | 71     |
| ▪ 1.11.2. ASSESSORAMENT POSTTEST .....  | 72     |
| ▪ 1.11.3. L'INFORME PRENATAL .....  | 73     |
| ▪ 1.11.4. COST-BENEFICI .....   | 74     |
| ◦ 1.12. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PRENATAL I NOUS ALGORITMES. IRRUPCIÓ DE<br>NOVES TECNOLOGIES EN EL DIAGNÒSTIC<br>PRENATAL..... | 75     |
| ▪ 1.12.1. SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA .....   | 75     |
| ▪ 1.12.2. CRIBRATGE PRENATAL NO INVASIU A PARTIR D'ADN FETAL<br>EN SANG MATERNA .....                                     | 77     |
| <br>2. HIPÒTESI DE L'ESTUDI .....   | <br>82 |
| <br>3. OBJECTIUS .....  | <br>86 |
| ◦ 2.1. OBJECTIU PRINCIPAL .....   | 88     |
| ◦ 2.2. OBJECTIUS SECUNDARIS .....   | 88     |
| <br>4. MATERIAL I MÈTODE .....  | <br>90 |
| ◦ 4.1. DISSENY DE L'ESTUDI .....  | 92     |
| ◦ 4.2. SELECCIÓ DE CASOS .....  | 92     |
| ◦ 4.3. MICROARRAY CROMOSÒMIC .....  | 92     |
| ◦ 4.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA .....  | 94     |
| ◦ 4.5. MOSTRA .....   | 94     |
| ◦ 4.6. CRITERIS D'INCLUSIÓ .....  | 94     |
| ◦ 4.7. CRITERIS D'EXCLUSIÓ .....  | 95     |

|   |     |
|---|-----|
| ◦ 4.8. VARIABLES .....  | 95  |
| ▪ 4.8.1. VARIABLES PRINCIPALS .....   | 95  |
| ▪ 4.8.2. VARIABLES SECUNDÀRIES .....  | 95  |
| ▪ 4.8.3. VARIABLES DESCRIPTIVES .....   | 95  |
| <br>  |     |
| 5. RESULTATS .....  | 98  |
| ◦ 5.1. MICROARRAY EN ELS FETUS DIAGNOSTICATS PRENATALMENT DE<br>RESTRICCIÓ PRECOÇ DEL CREIXEMENT INTRAUTERÍ .....                             | 100 |
| ◦ 5.2. MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB<br>TRANSLUCÈNCIA NUCAL PATOLÒGICA I/O PLEC NUCAL PATOLÒGIC .....                   | 108 |
| ▪ 5.2.1. MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB<br>TRANSLUCÈNCIA NUCAL $\geq$ p99 .....  | 108 |
| ▪ 5.2.2. MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB<br>TRANSLUCÈNCIA NUCAL $\geq$ p95 ( $p > 95$ i $< 99$ ) .....                    | 116 |
| ▪ 5.2.3. MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB PN<br>PATOLÒGIC ( $p > 99$ ) AL II TRIMESTRE .....                               | 118 |
| ◦ 5.3. MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB<br>MALFORMACIONS ESTRUCTURALS .....  | 122 |
| <br>  |     |
| 6. DISCUSSIÓ .....  | 138 |
| ◦ 6.1 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN ELS FETUS DIAGNOSTICATS<br>PRENATALMENT DE RESTRICCIÓ PRECOÇ DEL CREIXEMENT INTRAUTERÍ<br>.....           | 140 |
| ◦ 6.2 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS<br>FETUS AMB TRANSLUCÈNCIA NUCAL PATOLÒGICA I/O PLEC NUCAL<br>PATOLÒGIC ..... | 148 |
| ▪ 6.2.1 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS<br>FETUS AMB TRANSLUCÈNCIA NUCAL $\geq$ p99 .....                           | 148 |



|   |     |
|---|-----|
| ▪ 6.2.2 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB TRANSLUCÈNCIA NUCAL $\geq p95$ ( $p \geq 95$ i $< 99$ ) ..... | 160 |
| ▪ 6.2.3. L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB PN PATOLÒGIC ( $p > 99$ ) AL II TRIMESTRE .....              | 162 |
| ◦ 6.3. L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB MALFORMACIONS MAJORS .....                                     | 164 |
| <br>  |     |
| 7. CONCLUSIONS .....  | 176 |
| <br>  |     |
| 8. APLICABILITAT I LIMITACIONS DE L'ESTUDI.....   | 180 |
| <br>  |     |
| 9. TERMINOLOGIA I ABREVIACIONS.....   | 184 |
| <br>  |     |
| 10. BIBLIOGRAFIA .....  | 190 |





## **1. INTRODUCCIÓ**



## 1.1 INTRODUCCIÓ AL DIAGNÒSTIC PRENATAL

Els defectes congènits són una causa important de morbiditat i mortalitat neonatal. A Europa fins a un 25% dels casos de mort en menors d'un any es deuen a defectes congènits (1,2). Segons l'OMS, un defecte congènit és qualsevol anomalia del desenvolupament morfològic, estructural, funcional o molecular present al naixement, encara que pugui manifestar-se de forma més tardana, externa o interna, familiar o esporàdica, hereditària o no, única o múltiple (Comitès de Treball de l'OMS, 1970, 1975, 1982). L'origen d'aquests defectes congènits pot ser genètic, infecció o arran de l'exposició a teratògens. Existeixen actuacions de prevenció primària com adequar l'aportació d'àcid fòlic i iode a la gestant (3). No obstant això, és la prevenció secundària, amb la detecció precoç, on el diagnòstic prenatal es desenvolupa plenament fins a exercir una important funció. El diagnòstic prenatal agrupa totes aquelles accions dirigides a diagnosticar precoçment un defecte congènit fetal (4).

El diagnòstic prenatal permet l'abordatge de la patologia fetal bàsicament a partir de dues aproximacions: les tècniques d'imatge i les tecnologies de laboratori. La seva evolució està íntimament lligada a l'estudi de les cromosomopaties d'ençà que l'any 1966 Acer i Breg (5) demostren que l'estudi cromosòmic del fetus es pot realitzar a partir de l'anàlisi de cèl·lules de líquid amniòtic. L'any 1967, Jacobson i Barter (6) realitzen el primer diagnòstic prenatal d'una anomalia cromosòmica. Des de llavors l'estudi del cariotip fetal es realitza a partir del cultiu de cèl·lules fetals obtingudes mitjançant tècnica invasiva: biòpsia corial (placenta), amniocentesi (líquid amniòtic) o cordocentesi (sang fetal). Aquest cariotip o cariotip convencional pot detectar anomalies cromosòmiques numèriques així com reordenaments aparentment equilibrats dins dels límits de la resolució de la tècnica que es troba en un rang de 7-10 Mb (1Mb=1 milió de parells de bases)(7). Microdelecions o microduplicacions no poden ser detectades amb la citogenètica convencional.

L'aparició de tècniques moleculars com la FISH (Fluorescent in situ Hibridation), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) i la QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) ens permeten la detecció ràpida (2-3 dies) de les aneuploïdies més comunes en les mostres prenatales. Aquestes tècniques moleculars sorgeixen de la necessitat de disposar d'un coneixement ràpid de l'estat de fetal. Rutinàriament s'estudien els cromosomes 13, 18, 21, X, Y que són aquells que amb més freqüència provoquen anomalies cromosòmiques (8-13). Malgrat no estar dissenyades per detectar una gamma completa d'anomalies cromosòmiques, aquestes tècniques moleculars representen un avanç molt valuós dins del diagnòstic prenatal.

El "cariotip molecular", també anomenat "microarray cromosòmic", és una tecnologia que recentment s'ha incorporat a l'anàlisi genètica, basat en una hibridació sobre una matriu de sondes d'ADN que interroguen diversos "locus" distribuïts al llarg del genoma. Té una resolució entre 10 i 1000 vegades superior a la del cariotip convencional (14,15) i un temps de resposta més curt, ja que no requereix cultiu cel·lular. Detecta pèrdues i guanys de material genètic, però no detecta ni les reorganitzacions equilibrades (a diferència del cariotip), ni les mutacions puntuals (que tampoc es detecten amb el cariotip convencional). Aquesta tècnica compara el contingut genòmic (ADN) d'un individu problema amb la d'un individu control (normal) i detecta no només aneuploïdies i grans canvis estructurals, sinó també els guanys o pèrdues submicroscòpiques, i els reordenaments desequilibrats.

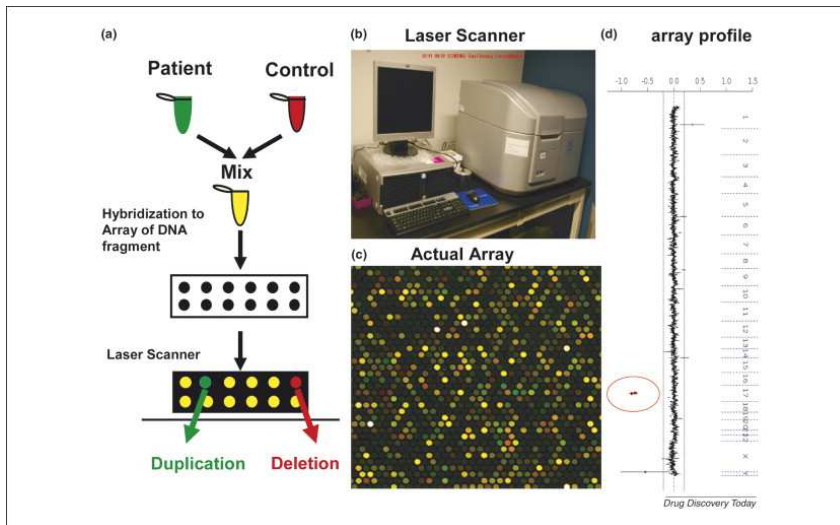
La hibridació genòmica comparada (aCGH) es va començar a utilitzar inicialment amb pacients amb càncer (16) per després fer-la extensiva a pacients amb trastorn de l'aprenentatge. Sagoo (17) realitza una interessant metanàlisi que inclou dinou estudis i un total de 13.926 subjectes, per avaluar el rendiment diagnòstic d'aquesta tecnologia. Aquesta metanàlisi proporciona evidència per donar suport a l'ús de la hibridació genòmica comparada basada en matrius en la investigació dels pacients amb trastorns de l'aprenentatge i anomalies congènites en els quals les proves citogenètiques convencionals no han demostrat ser prou sensibles. Però també identifica anomalies genètiques que es consideren no causals o d'importància desconeguda amb una freqüència similar a l'increment del diagnòstic. Per aquest motiu, malgrat que ja ha quedat definit com a prova diagnòstica genètica de primera línia, es recomana des de les Societats Científiques (18–20) precaució a l'hora d'aplicar-ho a la pràctica clínica i un bon assessorament genètic, especialment en tot el referent al diagnòstic d'anomalies congènites. L'experiència amb la tecnologia de microarray a la població pediàtrica és extensa, no obstant això, és més reduïda en el camp de les anomalies congènites i del diagnòstic prenatal on és altament interessant la seva implementació. L'estudi cromosòmic fetal és necessari davant un diagnòstic prenatal de malformació fetal per descartar anomalies cromosòmiques associades i les dades de la literatura indiquen que existeix benefici a l'hora d'aplicar l'anàlisi de microarray cromosòmic com a part estàndard de les proves d'estudi prenatal.

L'aplicació de l'array-CGH en diagnòstic prenatal és una alternativa atractiva, proporcionant una visió àmplia per als desequilibris genòmics amb una resolució superior, això permet la detecció de síndromes microdeleció-microduplicació quan s'utilitza una resolució mínima de 500 kb. Més encara, l'array-CGH permet una caracterització més precisa dels desequilibris, proporcionant una millor predicció del fenotip. La delimitació més precisa d'un desequilibri permet també la comparació del fenotip amb altres pacients que presenten desequilibris en la mateixa regió, correlacionant el fenotip amb gens. La nostra hipòtesi de treball es basa en aquesta capacitat de l'array per detectar canvis molt petits en el genoma proporcionant-nos una major taxa de detecció d'anomalies en comparació amb els sistemes convencionals.

## **1.2 TECNOLOGIA DE L'ARRAY**

La tecnologia de microarray té com a principi la hibridació de l'àcid nucleic, hibridant la mostra problema amb una mostra control. Les plataformes inclouen múltiples fragments o sondes d'ADN i permeten detectar pèrdues o guanys de material genòmic submicroscòpic (< 10 Mb) i per tant no detectables pel cariotip convencional. L'ADN de la mostra a estudiar es marca amb un tint verd i l'ADN de referència es marca amb tint vermell (depenent de la plataforma d'array el color pot anar a l'inrevés). Mitjançant l'ús de fluorescència, diferent a cada mostra, es comparen ambdues amb la finalitat de detectar pèrdues o guanys genòmics. Les dues mostres es barregen i s'hibriden competitivament en una matriu de sondes d'ADN genòmic o targets, que han estat triats i col·locats en un portaobjectes de vidre. La relació resultant de les intensitats de fluorescència és proporcional a la relació de nombres de còpies de seqüències d'ADN en els genomes d'assaig i de referència. Un cop sotmès l'array a l'escàner làser, una sortida de l'exploració representa centenars de punts amb diferents proporcions de la fluorescència, així les àrees que apareixen verdes indiquen material cromosòmic extra (duplicació) en la mostra de prova i en la regió en particular i les àrees que apareixen vermelles indiquen pèrdua de material cromosòmic en la mostra de prova en aquesta regió en particular (21) (Figura 1).

Figura 1. Metodologia de l'array-CGH.



www.drugdiscoverytoday.com

Amb els avenços en les tècniques moleculars, la tecnologia de microarray permet la detecció de delecions o duplicacions submicroscòpiques en segments tan petits com de desenes a centenars de kilobases (kb), que està molt per sota del nivell de discriminació del cariotip convencional amb bandes G. En l'actualitat, l'array-CGH és el mètode d'elecció per detectar aquests petits desequilibris cromosòmics, coneguts com a síndromes de microduplicació-microdelecio (22).

L'habilitat per a proporcionar un ampli perfil de tots els guanys i pèrdues genòmiques conegudes i clínicament rellevants en una sola prova, fan de l'array-CGH una eina molt útil per al diagnòstic genètic prenatal. La viabilitat de la tecnologia d'array-CGH per al diagnòstic prenatal en els casos amb citogenètica anormal, incloent-hi translocacions aparentment equilibrades, ja s'ha demostrat en alguns estudis (23). Encara que l'anàlisi d'alta resolució permeti la identificació de petits canvis en el genoma també pot crear problemes en la interpretació de les dades donada la possibilitat de detecció de noves variants en nombre de còpies de dubtosa significació clínica (VOUS, acrònim de l'anglès variants of unknown significance) que es fan evidents amb aquesta tecnologia. És per això que el Col·legi Americà de Ginecòlegs i Obstetres (ACOG) recomana l'anàlisi de microarray (CMA) per al diagnòstic prenatal en fetus amb anomalies estructurals. No obstant això, per a la gestant que opta a un diagnòstic prenatal i té un fetus estructuralment normal, encara es proposa la realització d'un cariotip convencional (24).

### 1.3 TIPUS DE MICROMATRIUS

Hi ha diversos tipus de microarray (de dosi, d'expressió, de metilació, de micro-RNA), però a la medicina assistencial predomina l'ús de l'array de dosi (comparative genòmic hybridization, array-CGH), entre els quals destaquen: BAC array-CGH (BAC, acrònim de l'anglès bacterial artificial chromosome) i l'array-CGH d'oligonucleòtids. Les sondes poden presentar un elevat nombre de nucleòtids (BACs) o bé un nombre reduït de nucleòtids (oligonucleòtids).

Tipus de micromatrius:



- **Array-CGH.** Consisteix d'una hibridació genòmica competitiva entre un ADN fetal i un ADN control, en una matriu de sondes d'ADN. Les sondes poden ser de grans dimensions: BACs (bacterial artificial chromosomes, 75-200 kb) o de mida més petita (oligonucleòtids, 25-85 kb).

La resolució de matriu depèn del nombre i dels tipus de sondes utilitzades i la seva distribució a tot el genoma. Les sondes BAC (75.000 a 150.000 parells de bases de longitud) són més grans que les sondes d'oligonucleòtids que s'utilitzen que solen ser de 50 a 60 parells de bases de longitud. L'array-CGH d'oligonucleòtids ofereix una resolució més alta que no pas el de BACs, però també és més exigent pel que fa a qualitat i quantitat de l'ADN de la mostra (25).

La dificultat de l'obtenció d'ADN a partir de líquid amniòtic no cultivat va propiciar la difusió de l'array de BACs, amb una resolució mitjana mínima 1 Mb. Però actualment aquest tipus de microarray està sent substituït pel microarray d'oligonucleòtids. L'array basat en oligonucleòtids té una capacitat diagnòstica més gran que l'array basat en BACs (14,83 enfront de 9,76%, respectivament), amb una resolució mitjana mínima 0,5 Mb (26).

- **Array-SNP.** L'array basat en polimorfismes de nucleòtid únic (SNP, acrònim de l'anglès single nucleotide polymorphisms) té una utilitat creixent. Compara la intensitat d'hibridació de l'ADN fetal amb un senyal control prèviament determinat. Aquest array basat en polimorfismes de nucleòtid únic (SNP) mostra un rendiment cada dia més important a l'assistència mèdica, ja que aporta informació de dosis genòmica i addicionalment també és possible detectar la pèrdua d'heterozigotitat i els problemes de disomia uniparental (27,28).

La resolució genòmica de les diferents plataformes d'array-CGH es determina per l'espaiament i longitud de les sondes o targets d'ADN. La majoria de les plataformes d'array-CGH clínicament disponibles han estat dissenyades per detectar aneuploïdies, síndromes microdeleció o microduplicació i reordenaments cromosòmics desequilibrats subtelomèriques o altres dirigits. Actualment els que són més determinats per al diagnòstic prenatal són els d'hibridació genòmica comparada, array-CGH, i especialment els d'oligonucleòtids.

Hi ha 3 dissenys diferenciats de microarray o micromatriu en funció de la disposició de les sondes d'ADN:

- **Micromatrius dirigits** (*targeted*): totes les sondes estan dirigits a regions causants de trastorns coneguts.

- **Micromatrius de genoma complet** (*WGA: Whole Genome Array*): tenen una distribució uniforme de les sondes d'ADN en totes les regions.

- **Micromatrius mixtes**: combinen sondes distribuïdes al llarg de tot el genoma amb una separació uniforme, amb una major densitat de sondes en les regions causants de trastorns coneguts. És l'array més utilitzat en diagnòstic prenatal.

## 1.4 RESOLUCIÓ DE L'ARRAY CROMOSÒMIC

L'experiència amb el microarray a la població pediàtrica és extensa. Els nens amb discapacitat intel·lectual en múltiples ocasions suposen un repte a les consultes de neurologia infantil atès que establir un diagnòstic etiològic no sempre és fàcil.

Entre les etiologies, el desequilibri cromosòmic és una de les causes més importants. No obstant això, molts d'aquests desequilibris cromosòmics són submicroscòpics i no poden ser detectats per mètodes citogenètics convencionals. L'array-CGH es considera necessari per a la investigació de delecions o duplicacions cromosòmiques en nens amb discapacitat intel·lectual, i ha demostrat millorar la taxa de detecció entre un 5-17% en aquests pacients respecte a la citogenètica convencional (29,30). El seu ús, cada cop més extensiu en l'àmbit prenatal, ha fet que ens resulti imprescindible establir recomanacions per tal d'assessorar adequadament a la dona gestant amb la finalitat de què entengui l'abast de l'estudi, les limitacions i els beneficis.

La resolució del microarray depèn del nombre de sondes, la seva mida i sobretot de la seva localització. La dificultat de l'extracció d'ADN a partir de líquid amniòtic no cultivat va propiciar en un inici la difusió del microarray de BACs, amb una resolució mitjana mínima 1 Mb. Però aquest tipus de microarray va ser substituït pel microarray d'oligonucleòtids, amb una resolució mitjana mínima 0,5 Mb. En diagnòstic prenatal es recomana una resolució mitjana no inferior a 0,5-1 Mb. L'array-CGH d'oligonucleòtids ofereix una resolució més elevada, però alhora és més exigent pel que fa a la qualitat i quantitat de l'ADN de la mostra. La majoria de les plataformes clíniques actuals d'array-CGH poden detectar canvis en el nombre de còpies amb un límit inferior de resolució de 500 kb al llarg del genoma, això representa una resolució almenys 10 vegades major que el cariotip convencional (31). Tanmateix aquest nivell de resolució ens proporciona un diagnòstic fiable per a les síndromes de microdeleció i microduplicació i permet minvar la detecció de variants de significat incert (VOUS).

Per tal de minimitzar l'impacte de les VOUS en prenatal es pot utilitzar un microarray d'alta resolució i filtrar posteriorment els resultats, seleccionant només les variants en nombre de còpies patogèniques i les de mida més gran. Qualsevol mostra fetal amb prou quantitat d'ADN és vàlida per a realitzar un estudi mitjançant microarray, com ara: vellositats corials, líquid amniòtic o sang fetal. En paral·lel a l'extracció de l'ADN, és recomanable d'establir un cultiu cel·lular de rescat, que pot ser útil per extreure més ADN, realitzar un cariotip o per altres tècniques de confirmació diagnòstica posteriors. Per aquest motiu, s'aconsella l'extracció de 15-20 cc de líquid amniòtic o 20-40 mg de vellositat corial. En general, és convenient realitzar una QF-PCR prèvia per a descartar la contaminació materna de les mostres, determinar el sexe fetal (per seleccionar el sexe de l'ADN control) i diagnosticar les aneuploidies més freqüents i les triploidies.

Si parlem de resolució de l'array-CHG no podem deixar d'explicar les variants en nombre de còpies (CNV, acrònim de l'anglès copy number variations). Els organismes diploides tenen dues còpies de cada regió autosòmica, una per cada cromosoma, però hi ha regions genètiques on hi ha una variació en el nombre de còpies, és a dir, menys o més de dos. Les variants en nombre de còpies (VNC/CNV) es defineixen com a seqüències d'ADN més gran de 1000 parells de bases (pb) que normalment es troben només una vegada en cada cromosoma, però en alguns individus aquestes seqüències es dupliquen o tripliquen, és a dir, es produeix una variació en el nombre de còpies d'aquesta secció d'ADN. Aquest fenomen va ser descobert durant el primer projecte del genoma humà, i pot ocórrer com a resultat de delecions o duplicacions, i pot ser produït de forma hereditària o *de novo* (32-35). Encara que aquesta anàlisi d'alta resolució

permet la detecció de petits canvis en el genoma també crea problemes en la interpretació de les dades donat que moltes noves CNV de dubtosa significació clínica es fan evidents.

En funció de la seva rellevància clínica, les CNV es classifiquen en 3 tipus:

-Benignes

-Patogèniques

-Incertes o VOUS (variants of unknown significance). Es considera que una variant en nombre de còpies és una VOUS quan no hi ha prou evidència en la literatura o en les bases de dades per establir associació amb fenotips normals. El fet que algunes variants tinguin una penetrància incompleta fa més difícil demostrar la seva patogenicitat.

És important distingir si les CNVs que es troben durant l'anàlisi d'array-CGH són CNVs heretades dels progenitors (variants de nombre de còpia heretada) o *de novo*, és a dir, que estan absents en els pares i que poden sorgir espontàniament en el fetus/nen (variants en nombre de còpies *de novo*). Les CNVs heretades numèriques són relativament comuns i representen polimorfismes benignes en la majoria dels casos, tot i que també existeixen CNVs patogèniques heretades amb una penetrància incompleta. Recentment es creu que CNVs heretades de progenitors aparentment "normals" poden també ser responsables de patologia en la descendència, encara que sempre les CNV *de novo* tenen més probabilitats de ser responsables d'anomalies congènites del desenvolupament. Com podem veure la interpretació de les CNVs dista de ser fàcil. No obstant això, la creixent experiència clínica amb el conjunt de tot el genoma i el desenvolupament de bases de dades de CNVs permetran cada cop més reduir el nombre de VOUS millorant l'assessorament a la pràctica clínica d'aquests pacients.

## 1.5 AVANTATGES I LIMITACIONS DE L'ANÀLISI D'ARRAY-CGH

L'array-CGH és una anàlisi d'alt rendiment i gran resolució. La majoria de les plataformes d'array-CGH clínicament disponibles estan dissenyades per detectar els guanys de nombre de còpies d'ADN i les pèrdues associades amb alteracions cromosòmiques no balancejades.

Les regions amb una absència o pèrdua d'heterozigositat (AOH), regions d'homozigosi, poden detectar-se per les plataformes amb el polimorfisme d'un sol nucleòtid o array-SNP. Algunes d'aquestes regions amb AOH poden ser indicatives de disomies uniparentals i estar associades a síndromes genètiques (imprinting genòmic) (36,37).

Les Societats Científiques recomanen utilitzar l'array-CGH per a la detecció de pèrdues i guanys en pacients amb discapacitat intel·lectual i trastorns de l'espectre autista. Més recentment també per al diagnòstic prenatal en fetus amb anomalies estructurals (21,24).

### **Els avantatges potencials de l'array-CGH inclouen:**

- Presenta una resolució superior al cariotip convencional de bandes-G en l'estudi d'anomalies cromosòmiques no equilibrades.
- No requereix grans quantitats de mostra (ADN) per a l'estudi i el temps de resposta és més curt ja que evita el cultiu de cèl·lules fetals. Hi ha la possibilitat de personalitzar la plataforma i concentrar les sondes en àrees d'interès.
- La interpretació de les dades es realitza d'una forma objectiva.
- És possible detectar disomies uniparentals amb les plataformes de SNP-array.
- El procés és susceptible d'automatització i s'escurça el temps de resultat (3-4 dies).

### **D'altra banda, les limitacions són:**

- Només detecta canvis de dosi genètica (guanys o pèrdues), per aquest motiu no detecta translocacions cromosòmiques o altres reordenaments equilibrats com les inversions. No estan dissenyats per identificar duplicacions ni delecions per sota del nivell de detecció d'acord amb la cobertura i el rendiment de la sonda, tampoc mutacions puntuals, l'expressió de gens o anomalies de metilació que poden contribuir al fenotip del pacient. No poden detectar poliploïdies, ja que són canvis globals de material genètic.
- El mecanisme cromosòmic responsable del desequilibri genètic pot no ser dilucidat.
- Un cromosoma marcador podria no ser detectat per l'array-CHG, depenent de la mida, del nivell de mosaïcisme, la seva composició i la cobertura de la regió cromosòmica específica de l'array-CHG present en el cromosoma marcador.
- Igualment podria succeir amb un nivell baix de mosaïcisme per sota de 20%. Mosaïcisme de baix nivell de reordenaments desequilibrats i aneuploïdia poden no ser detectats. La sensibilitat de l'array-CGH per a la detecció de mosaïcismes es veurà influenciada per la plataforma, tipus de mostra, l'estat del nombre de còpies, la qualitat de l'ADN, qualitat de les dades, i la mida de desequilibri.
- CNVs de regions genòmiques no representades a la plataforma no seran detectades.
- ADN ha de ser de bona qualitat, no ha d'estar fragmentat.
- Els costos econòmics són significativament superiors als de l'anàlisi de cariotip convencional.

## **1.6 MICROARRAY A LA PRÀCTICA CLÍNICA**

L'array-CGH té cada cop més un nombre creixent d'indicacions fins al punt que poden proporcionar informació completa sobre aspectes d'estatus o funció biològica. A curt termini, aquestes tècniques poden proporcionar informació de correlació útil per a aplicacions clíniques en oncologia i genètica mèdica, i la informació bàsica sobre les característiques fonamentals de l'estructura del genoma. Les aplicacions clíniques de la genètica mèdica són particularment convincents i seran extenses en el futur immediat. Hem de tenir molta cura en l'anàlisi de les alteracions que es detectin i la seva interpretació. A més llarg termini, la combinació de mesuraments de nombre de còpies d'ADN, ARN i els nivells d'expressió de proteïnes, pantalles de RNA i la seqüenciació massiva conduiran a avenços substancials en la comprensió dels processos biològics (38).

Les alteracions estructurals (delecions, duplicacions, translocacions, inversions i cromosomes marcadors) són una causa subjacent de les anomalies congènites, dismòrfia, discapacitat intel·lectual, trastorns de l'espectre autista, avortaments espontanis i diverses síndromes genètiques. La resolució genòmica de les diferents plataformes d'array-CGH permet augmentar la capacitat de detectar CNVs genòmiques patogèniques en aquests pacients. S'estan convertint en una bona eina per al descobriment de gens de malalties i en diagnòstic prenatal.

També està mostrant resultats prometedors en la investigació del càncer, tant en el diagnòstic, com en la classificació i pronòstic de diferents processos malignes. Les aplicacions clíniques de l'array-CGH en els últims anys han revolucionat el diagnòstic dels pacients en múltiples àmbits de la Medicina (26,39).

El registre d'anomalies genètiques mitjançant bases de dades disponibles i d'ús públic està facilitant enormement el treball del clínic en la presa de decisions sobre la importància dels desequilibris detectats per microarray.

### **1.6.1 MICROARRAY I CÀNCER**

Actualment, s'està desenvolupant com una veritable eina de recerca per a la investigació genòmica dels desequilibris en càncer i està reemplaçant gradualment als mètodes citogenètics en un nombre creixent de laboratoris genètics. Amb freqüència en el càncer es produeixen alteracions de dosificació i reordenaments genètics que contribueixen a la seva patogènesi. La detecció d'aquestes alteracions per l'array-CGH proporciona informació sobre la ubicació dels gens del càncer i pot tenir ús clínic en el diagnòstic, la classificació del càncer i el pronòstic (40–42).

## 1.6.2 MICROARRAY EN L' AVALUACIÓ DE LA DISCAPACITAT INTEL·LECTUAL

La discapacitat intel·lectual (DI) és un trastorn del neurodesenvolupament que es produeix abans dels 18 anys d'edat, i s'estima que afecta el 2-3% de la població (43,44). El terme retard global del desenvolupament (RGD), s'utilitza sovint en els nens abans dels 5 anys d'edat, amb afectació de la funció motora, la capacitat cognitiva, el llenguatge o combinacions (30,45,46). Aquest és malauradament un problema comú en la salut infantil i un motiu freqüent de derivació a les consultes de neurologia infantil.

Les estimacions del rendiment dels diferents estudis per esbrinar l'etiologia de la DI oscil·len entre el 10% i el 81% en nens amb retard global del desenvolupament, com es pot observar l'espectre és molt ampli. L'estudi citogenètic presenta en aquests casos un rendiment diagnòstic del 3,5-10% fins i tot en absència de trets dismòrfics (47,48). Malgrat això, tot i els nombrosos estudis, encara no està clar si una combinació d'examen clínic i la investigació citogenètica rutinària podrien resultar cost-efectiva en el maneig d'aquests pacients. Aquesta variabilitat en el rendiment diagnòstic es pot atribuir a les diferències en una varietat de factors que inclouen: les característiques de la població de la mostra, la gravetat de la discapacitat en els nens estudiats, l'abast de les investigacions clíniques per establir un diagnòstic, i els avenços tecnològics, especialment pel que fa a les tècniques genètiques i de neuroimatge.

Malgrat tot això, en un gran nombre d'aquests pacients l'etiologia de la DI pot romandre desconeguda. Les causes inclouen trastorns congènits, infecciosos i genètics, entre altres. Es considera que entre un 18,6% i un 44,5% dels casos es deuen a causes exògenes, com l'exposició a teratògens o les infeccions, i del 17,4% al 47,1% a causes genètiques (48). Determinar si la DI està associada a trets dismòrfics permet guiar la selecció de proves complementàries necessàries per poder diagnosticar l'entitat responsable del quadre de discapacitat cognitiva.

La importància de les anomalies cromosòmiques com a causa de la DI idiopàtica està actualment ben reportada. L'exemple més conegut d'un desequilibri genètic compatible amb la vida és la síndrome de Down, causada per la trisomia del cromosoma 21 i està present en 1 de cada 650 nens acabats de néixer. Delecions genòmiques o duplicacions també poden donar lloc a fenotips clínics. Síndromes de microdeleció ben conegudes inclouen la síndrome de Williams, la síndrome de PraderWilli, la síndrome d'Angelman, la síndrome de Wolf-Hirschhorn o la síndrome 22q11.2. L'estudi tradicional dels cromosomes amb tècniques de bandeig pot descobrir canvis genòmics a gran escala i ha estat una eina de diagnòstic important en la identificació de les causes de la DI. S'estima que l'anàlisi del cariotip convencional en els nens amb trastorns del neurodesenvolupament diagnostica d'aproximadament un 3,7% dels casos. Reordenaments en els extrems dels cromosomes poden ser detectats en el 4-5% dels casos. La prevalença d'anomalies telomèriques és més gran en pacients amb DI de moderada a severa i en els casos de dismòrfia associada, amb un rang que va des del 2 al 29%, aproximadament la meitat d'aquests casos són causats per una deleció *de novo*, i l'altra meitat per una translocació equilibrada amb segregació familiar (49-51). La identificació de desequilibris telomèrics submicroscòpics per l'aplicació de l'anàlisi de FISH dona un increment diagnòstic respecte al cariotip convencional en el 2,5-7% dels pacients (52,53). Malgrat això, desequilibris subtelomèrics també s'han identificat en subjectes normals sense cap fenotip alterat aparentment.

Autors com Joyce no detecten major incidència de desequilibris subtelomèrics en pacients amb DI idiopàtica, malgrat que poden ser una troballa poc comú en la població general (49). Aquest autor en el seu estudi realitza cariotip convencional-FISH i això ens

deixa una porta oberta a la resolució de l'array. Com ja hem mencionat el rendiment diagnòstic dels estudis genètics en aquests pacients varia àmpliament, a conseqüència de les diferències de població i les diferents eines de diagnòstic utilitzades per a la seva avaluació (Taula 1).

**Taula 1. Síndromes genètiques amb DI.**

|                                    | <b>Expressió fenotípica</b>  | <b>Prevalença</b> | <b>Anomalia cromosòmica</b> | <b>Localització</b> |
|------------------------------------|--|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| <b>Síndrome de Down</b>            | Fenotip característic amb plec epicàntic, boca, nas i mans petites, hipotonia, DI, cardiopatia congènita           | 1:650             | Trisomia 21                 |                     |
| <b>Síndrome d'Edwards</b>          | Creixement intrauterí restringit (CIR), llavis, micrognàtia, microcefàlia i hipotonia                              | 1:7 000           | Trisomia 18                 |                     |
| <b>Síndrome de Patau</b>           | CIR, microcefàlia, cardiopatia congènita   | 1 :12 000         | Trisomia 13                 |                     |
| <b>Trisomia 8</b>                  | Dimorfisme facial, cardiopatia congènita, malformacions genitourinàries, DI  | 1 :25 000         | Trisomia 8                  |                     |
| <b>Síndrome de Wolf-Hirschhorn</b> | CIR, dimorfisme facial, DI   | 1:50 000          | Deleció 4p                  | 4p16,3              |
| <b>Cri-du-chat</b>                 | CIR, microcefàlia, plor peculiar   | 1:50 000          | Deleció 5p                  | 5P13-5              |
| <b>Síndrome Williams Beuren</b>    | Fenotip característic amb boca gran i nas curt, hipotonia, cardiopatia, malformacions genitourinàries, autisme, DI | 1: 25 000         | Deleció 7q                  | 7q11.23             |
| <b>Dup (9p)</b>                    | CIR, hipotonia, microcefàlia, cardiopatia congènita, hipospàdies, epilèpsia  | rara              | Duplicació 9p               |                     |
| <b>WAGR</b>                        | Predisposició a tumor de Wilms, anirídia, trastorns genitourinaris   | rara              | Deleció 11p                 | 11p13               |
| <b>Del (13q)</b>                   | Retinoblastoma, dismòrfia, taques de Brushfeld a l'iris, trigonocèfalia, pavellons auriculars prominents           | rara              | Deleció 13q                 | 13q14               |
| <b>Síndrome d'Angelman</b>         | Hipopigmentació, llengua prominent, boca gran, dents separades, microcefàlia, epilèpsia, mans i peus petits        | 1:100 000         | <i>UBE3A</i>                | 15q11q13            |
| <b>Síndrome de Smith-Magenis</b>   | CIR, clinodactília, fenotip característic, neuropatia sensitivo-motora, hipoacúsia                                 | rara              | Deleció 17p                 | 17p11               |
| <b>Síndrome de Miller Dieker</b>   | Lissencefàlia, hipotonia, epilèpsia, DI  | rara              | Monosomia 17p               | 17p13               |
| <b>Del (18p)</b>                   | Dismòrfia facial, clinodactília, talla baixa   | rara              | Deleció 18p                 |                     |
| <b>Del (18q)</b>                   | Fenotip característic, hipotonia, microcefàlia, coloboma, cardiopatia, dits espatulats                             | rara              | Deleció 18q                 |                     |
| <b>S.VeloCardioFacial</b>          | Microcefàlia, cardiopatia congènita, sordesa, cataractes, apnees de la son   | 1:5 000           | Deleció 22q                 | 22q11.2             |
| <b>Síndrome de Prader-Willi</b>    | Hipotonia, fenotip amb mans i peus petits, hiperfàgia des del primer any   | 1:25 000          | <i>SNORD116</i>             | 15q11q13            |
| <b>X fràgil (S. Martin-Bell)</b>   | Dèficit d'atenció, macrocefàlia, epilèpsia, autisme  | 1:1 200           | <i>FMR1</i>                 | Xq27                |



Com ja hem exposat amb anterioritat, la citogenètica convencional no pot detectar amb fiabilitat els reordenaments de segments genòmics més petits (7-10 milions de pb). Les alteracions cromosòmiques submicroscòpiques es diagnostiquen bé per FISH específica, que proporciona una resolució superior a la citogenètica convencional mitjançant una tècnica microscòpica que utilitza sondes dissenyades específicament per a cada locus (o per un relativament petit nombre de locus), per tant, no és el mètode d'elecció quan pretenem realitzar una recerca diagnòstica davant un quadre clínic d'etiologia desconeguda. Això suggereix que l'aplicació d'una resolució més gran amb tècniques de cribratge de tot el genoma potencialment augmentarà el rendiment diagnòstic en una proporció significativa dels casos. Calen mètodes d'estudi del genoma de forma més complet i amb millor resolució, i és aquí on entra en joc l'array-CGH. La hibridació genòmica comparada obre una porta a la detecció de delecions-duplicacions submicroscòpiques que fins ara no podien ser detectats per mètodes citogenètics convencionals.

Veltman en el seu moment estudia 20 pacients amb DI i objectiva que l'array-CGH, a més dels canvis citogenètics prèviament identificats, revela reordenaments addicionals dels telòmers en 3 dels 20 pacients estudiats, obtenint un 15% d'increment diagnòstic addicional respecte al cariotip convencional (54).

Altres estudis, amb pacients amb dificultats d'aprenentatge i dismòrfia, troben que fins al 10-15% d'aquests malalts mostren petites delecions o duplicacions que podrien ser detectades mitjançant array, però no mitjançant cariotip convencional de bandes-G (52,55). Estudis addicionals i posteriors amb un major nombre de pacients informen de taxes de detecció clínicament significatives respecte a alteracions *de novo* d'entre el 10% i el 16% (29,30). Shaw-Smith estudia a 50 pacients amb cariotips normals o aparentment equilibrats, els pacients patien alteracions en el neurodesenvolupament, juntament amb trets facials dismòrfics i cariotip de bandes G normal i en la majoria dels casos reordenaments dels telòmers havien estat exclosos per FISH, encara i així aquest autor detecta una pèrdua o guany de material cromosòmic en 12 pacients, amb una taxa de detecció de fins al 24% (56).

L'anàlisi de microarray pot descobrir guanys i pèrdues en les regions del genoma que poden tenir importància clínica o fins i tot importància clínica incerta. La interpretació de variacions del nombre de còpia com a causa de la discapacitat intel·lectual és complexa. La taxa de detecció de reordenaments genòmics en els pacients amb DI és més gran quan la DI és severa i/o es combina amb malformacions congènites o trets dismòrfics. No obstant això, una estimació global podria ser que amb l'array-CGH (amb resolució d'1 Mb) poden detectar-se canvis causals en el 10-15% dels pacients amb DI idiopàtica i cariotip de bandes G normal (29,30). Estudis recents han demostrat que l'array-CGH és un mètode eficaç i eficient per al diagnòstic i la investigació de la DI. L'array-CGH té una major sensibilitat que el cariotip convencional i pot apuntar més locus que la FISH d'una manera rendible. Aquest avanç tecnològic en les proves genètiques ha augmentat la probabilitat d'un diagnòstic positiu per als pacients amb DI, facilitant un millor assessorament genètic a les famílies.

Malgrat aquests avenços, hi ha una escassetat d'informació sobre les correlacions genotip / fenotip de molts dels reordenaments subtelomèrics, fet que complica les implicacions diagnòstiques i pronòstiques. Si la importància dels desequilibris subtelomèrics en l'etiologia de la DI encara està per determinar, és vital establir la freqüència d'aquests desequilibris entre les persones amb fenotípic normal. Encara hi ha poca informació sobre l'efecte fenotípic dels reordenaments subtelomèrics, en part



perquè els reordenaments són heterogenis, i en part perquè encara no saben quanta monosomia o trisomia pot ser tolerada per l'individu sense efecte fenotípic. Per tant, es necessiten més estudis per a totes les regions telomèriques per tal de definir la quantitat de monosomia o trisomia que pot ser tolerada sense efectes fenotípics i, per contra, la quantitat de monosomia o trisomia que tindrà un efecte fenotípic clar i ajudar així en la diferenciació entre els reordenaments dels telòmers que són patogènics davant els que són variants benignes que no tenen conseqüències fenotípiques conegudes. Aquestes observacions suggereixen que no tots els desequilibris subtelomèrics donen com a resultat un fenotip patològic i que la manca d'efecte al fenotip pot estar relacionada amb la mida del reordenament i la implicació de les regions del genoma que es veuen afectades. D'altra banda queden també anomalies genòmiques com són principalment delecions i duplicacions intersticials que es podrien investigar amb més profunditat i el seu paper dins de la patologia.

Tot i que els esdeveniments citogenètics podrien semblar equilibrats «a priori», molts tenen un desequilibri submicroscòpic, especialment si s'afegeix un fenotip alterat. Els mètodes basats en l'array-CGH proporcionen una resolució superior i s'apliquen a tot el genoma, especialment a l'estudi de variants en nombre de còpies (CNVs) submicroscòpiques. Les delecions i duplicacions submicroscòpiques detectades en aquests estudis varien en grandària de 0,5 a 15 Mb. No obstant això, delecions i duplicacions petites també poden ser causades de DI. La tècnica ideal seria, per tant, identificar les CNVs amb una major resolució. L'array-CGH no només estan proporcionant explicacions per als casos prèviament no diagnosticats de discapacitat intel·lectual, sinó que també estan definint encara més la freqüència dels reordenaments subtelomèrics en diferents poblacions clíniques per tal d'aclarir el fenotip associat amb aquests reordenaments.

Sintetitzant, els resultats dels estudis citogenètics demostren que el rendiment mitjà d'alteracions cromosòmiques en citogenètica convencional pot arribar a ser del 4,1% en la DI lleu i del 13,3% en la DI moderada o severa. L'anàlisi FISH dona un increment diagnòstic respecte al cariotip convencional del 2,5-7%, centrant-se especialment en els desequilibris telomèrics com a causa de la DI (57). Pel que fa a la detecció del cromosoma X fràgil, els rendiments són del 5,4% en estudis citogenètics i del 2% addicional en estudis moleculars. Es considera que l'array-CGH proporciona prop d'un 10-15% d'increment diagnòstic respecte al cariotip convencional en la DI idiopàtica (58-60). Un rendiment encara major si el pacient presenta dismòrfia associada al dèficit cognitiu, amb oscil·lacions d'entre el 39-81% segons els diferents autors (61,62). La incidència de mosaïcismes de baix nivell és relativament petita en comparació a la incidència d'altres desequilibris cromosòmic en aquesta població de pacients. Encara que es necessiten estudis de validació per a l'array-CGH, l'experiència indica que els mosaïcismes són detectables a un nivell d'aproximadament del 20% de cèl·lules de mosaic amb la majoria de plataformes d'array. Els SNP-array actualment poden detectar nivells fins i tot més baixos de mosaïcisme, per sota de 5% en alguns casos (63,64). L'array-CGH té impacte en el diagnòstic i posterior assessorament genètic dels pacients amb discapacitat intel·lectual i les seves famílies, a un cost raonable.

### 1.6.3 MICROARRAY I TRASTORNS DE L'ESPECTRE AUTISTA

Els trastorns de l'espectre autista (TEA) són condicions del desenvolupament neurològic clínicament heterogènies caracteritzades per tres trets bàsics: un deteriorament en la interacció social, acompanyats d'un retard o absència de llenguatge i comportament amb moviments estereotipats. Els termes sinònims trastorns de l'espectre autista fan referència a un ampli espectre dels desordres cognitius i de comportament neurològic associats, incloent-hi, però no limitat a, tres característiques principals: deficiències en la socialització, deficiències en la comunicació verbal i no verbal, i patrons restringits i repetitius de comportament. La complexitat i l'àmplia variabilitat dels símptomes de l'espectre autista fa que múltiples etiologies s'agrupin sota aquest diagnòstic paraigües a causa del comportament de nucli de similar simptomatologia (65,66). Avui dia el terme trastorn de l'espectre autista (TEA) s'utilitza comunament per abastar l'autisme, síndrome d'Asperger i PDD-NOS (trastorn del desenvolupament no especificat).

Els trastorns de l'espectre autista no són malalties tan rares com es pensa, poden arribar a ser igual de prevalents en la població pediàtrica que el càncer, la diabetis, l'espina bífida o la síndrome de Down. Els estudis epidemiològics més primerencs van observar una prevalença de l'autisme infantil de 4-5 per 10 000 nens (66,67).

La prevalença dels TEA sembla haver-se incrementat les darreres dècades, malgrat que alguns autors no ho reportin així (68), els últims informes als EUA i al Regne Unit apunten a una prevalença d'aproximadament d'entre 1-11,3 per 1000 nens (68-71). Els homes es veuen més afectats que les dones amb una proporció de 4:1 (72). En els estudis epidemiològics recents ha augmentat la consciència i preocupació per la prevalença d'aquests trastorns. No obstant això, les diferències en la metodologia dels estudis, en particular els canvis en la definició de "cas" i la identificació de casos a través del temps, han fet que les comparacions entre autors siguin difícils de realitzar i interpretar. En una revisió de 32 estudis de diversos països publicats entre 1966 i 2001, Fombonne et al. (60) informen, que si bé investigacions anteriors estimen la prevalença de TEA al voltant de 30/10 000, aquesta pot aproximar-se fins al 60/10 000.

La prevalença de l'autisme avui dia s'estima en 13 per 10 000, el trastorn d'Asperger és d'aproximadament 3 per 10.000, i el trastorn desintegratiu infantil al voltant de 0,2 per 10 000 (72-74). El procés d'avaluació, mida de la mostra, any de publicació, i la ubicació geogràfica de tots els estudis tenen un efecte sobre les estimacions de la prevalença. Hi ha una gran variació en les taxes de prevalença i això es pot explicar pels enfocaments metodològics diferents i manca d'uniformitat en els diagnòstics empleats. Hi ha una preocupació generalitzada que aquest possible augment. No obstant això, no està clar si la tendència a l'alça és real o producte de canvis en les circumstàncies que afecten el resultat de diagnòstic o l'avaluació millorada de les persones en risc (75).

En l'absència de marcadors biològics, diagnòstics de TEA es basen en la presentació clínica i l'aplicació de criteris diagnòstics, juntament amb el suport als resultats de les proves psicomètriques. Els dos sistemes de classificació internacionals actuals que contenen criteris són el Manual Diagnòstic i Estadístic (DSM) (American Psychiatric Association)(76) i la Classificació Internacional de Malalties (CIE) (Organització Mundial de la Salut). Tots dos descriuen alteracions qualitatives en els dominis: social, comunicació i desenvolupament. No obstant això, aquests instruments, fins i tot quan s'apliquen rigorosament, s'associen amb algun grau d'interpretació subjectiva que dona lloc a discrepàncies. A més, a causa de la naturalesa dels TEA, aparició dels símptomes

pot variar segons l'edat del nen, el que resulta en una variació considerable dins i entre individus. Una complicació addicional és que els criteris del DSM han anat canviant amb cada revisió dels manuals, el que ha provocat debat i conjectura sobre els efectes de l'ampliació dels límits de diagnòstic sobre la incidència i la prevalença percebuda.

En la seva metanàlisi de la influència de la metodologia d'estudi en les estimacions de prevalença, Williams i Wazana troben que l'ús del DSM-IV o DSM-V i la diferència de criteris podrien produir augments de la prevalença del trastorn autista d'entre 2 i 28 vegades (77–79). Aquests estudis demostren quantitativament l'impacte del canvi dels criteris de diagnòstic en les estimacions de la prevalença. No obstant això, autors com Blaxill (80) defensen que el DSM-IV es va associar amb una reducció dels criteris en relació amb el DSM-III-R i que els canvis en la prevalença s'han produït de forma independent dels canvis en els criteris diagnòstics. Per tant, sembla probable que el canvi en els criteris de diagnòstic no és l'únic factor que influeix en la prevalença, i que les diferències geogràfiques i altres factors locals també poden resultar importants. Amb això el que volem deixar patent és que en les últimes dècades, la nomenclatura de l'autisme ha sofert una evolució ràpida i canviant, fet que s'ha afegit a les dificultats per establir la prevalença de l'entitat. L'evidència suggereix que els canvis en els criteris de diagnòstic i la millora en el coneixement i reconeixement dels trastorns de l'espectre autista han tingut impacte en la prevalença, no obstant això, si n'hi ha o no un veritable augment de la incidència d'aquests trastorns segueix sent una pregunta oberta avui dia.

Les causes dels trastorns de l'espectre autista són desconegudes (76). Sandin estudia l'agregació familiar i l'heretabilitat dels TEA i observa que el risc individual de TEA i el trastorn autista s'incrementa amb l'augment de la relació genètic-familiar. L'heretabilitat dels TEA s'estima que pot arribar a ser de fins al 50% (81). La taxa de recurrència en els germans de nens afectats és d'aproximadament 2% a 8%, superior a la taxa de prevalença en la població general, però molt menor que en les malalties monogèniques.

Els estudis amb bessons reporten un 50-60% de concordança per a l'autisme clàssic en bessons monozigòtics davant un 0% de concordança en bessons dizigòtics, aquesta major concordança en monozigòtics fa pensar que l'herència sigui l'agent causal predominant (82). La revaluació d'un fenotip autista ampliat incloent la comunicació i els trastorns socials augmenta notablement la concordança d'entre un 60-92% en bessons monozigòtics i del 0-10% en dizigòtics. Els trastorns de l'espectre autista s'han relacionat també al llarg del temps amb diverses complicacions prenatales i perinatales (83), factors ambientals i fins i tot amb les vacunes (84–87). Tot i que s'han postulat moltes hipòtesis de patògens ambientals que podrien causar trastorns de l'espectre autista, cap d'ells ha estat demostrat científicament (88,89). L'avaluació del paper dels neurotòxics com a agents etiològics en TEA tampoc ha donat resultats definitius (90–93). Manquen estudis capaços d'establir una associació significativa entre factors ambientals i TEA. Cap de les possibles causes ambientals, incloent-hi les vacunes, han estat confirmades per l'evidència científica, mentre que hi ha una forta evidència que els factors genètics juguen un paper important en l'etiologia, malgrat que és poc probable que sigui el resultat d'un sol gen, més aviat una combinació de susceptibilitat genètica (83,88).

L'heterogeneïtat dins del diagnòstic d'autisme no permet establir la base genètica de la malaltia amb claredat. Amb l'objectiu de solucionar això i intentar homogeneïtzar la mostra, podem dividir els individus afectats pel TEA en dos grans subgrups: «autisme complex» en presència de trets dismòrfics, microcefàlia i/o malformacions cerebrals estructurals i «autisme essencial» en absència d'aquests resultats. Entre els anys 1995 i 2001, Miles examina 260 individus que complien els criteris del DSM-IV per al trastorn

autista. El 5% (13/260) presentaven microcefàlia i el 16% (41/260) tenien anomalies físiques importants. Individualment, cada tret va predir un pitjor resultat. En conjunt, el subgrup "autisme complex", comprenia el 20% (46/233) de la població total de l'autisme. Les persones amb autisme complex presentaven coeficients intel·lectuals (CI) més baixos, més convulsions, EEG més anormals (46% vs. 30%) i més anomalies cerebrals per ressonància magnètica (28% vs. 13%). L'autisme essencial era el grup més heretable amb una major recurrència (4% enfront de 0%), més familiars amb autisme (20% vs. 9%), i una major proporció home-dona (6,5:1 enfront de 3,2:1) amb un CI més alt i menys convulsions (94).

Una etiologia clara només pot identificar-se en aproximadament el 10-20% dels individus amb TEA (66,95,96). Aquestes causes inclouen anomalies cromosòmiques detectables amb els mètodes citogenètics (duplicacions del cromosoma 15q11q12) i malformacions, trastorns d'un sol gen (síndrome de X fràgil, la síndrome de Rett, esclerosi tuberosa o mutacions en els gens *SHANK3*, *NLGN3*, *NLGN4*), o fins i tot, condicions metabòliques. Les anomalies cromosòmiques microscòpiques detectables es troben en un 0,5 -5,8% dels casos de TEA (97-102). No obstant això, en la majoria d'aquests pacients amb «autisme essencial o idiopàtic», fins al 80-90% la recerca no revela una etiologia definitiva. La identitat i el nombre de gens implicats no són del tot coneguts. Funcionalment, els gens de risc convergeixen en les vies que modulen la transmissió sinàptica, remodelació de la cromatina i la regulació transcripcional. Fins al moment, anomalies en la regió 7q31-Q33, de la parla i el llenguatge, semblen ser les més fortament relacionades amb l'autisme juntament amb les anomalies citogenètiques en el locus 15q11-q13 (1-3% dels casos) (66,97).

L'aplicació de l'array-CGH ha permès que el percentatge de pacients amb anomalies cromosòmiques submicroscòpiques diagnosticats sigui encara superior, donada la seva major resolució, es poden arribar a detectar CNVs entre 7-27% dels casos, amb major resolució per «l'autisme complex» respecte a «l'autisme idiopàtic» (99-104). El 5-15% d'aquestes mutacions són mutacions *de novo* (105). Aquests estudis demostren que l'array-CGH és especialment eficaç en el diagnòstic dels casos «autisme complex». Però, autors com Jacquemont, després d'excloure aquests casos, detecten CNVs *de novo* en el 7-10% dels individus amb «autisme idiopàtic»(104). Entre el 5-16% dels individus amb TEA presenten CNVs *de novo* davant de l'1-2% en la població general (106). Els treballs d'Eriksson parlen de què d'aquestes CNVs, un 8% serien de significat patològic i un altre 8% de significat incert (89).

L'aplicació més àmplia de l'array-CGH millorarà el rendiment de detecció en pacients amb TEA en els pròxims anys.

## 1.7 MICROARRAY EN DIAGNÒSTIC PRENATAL

En 1959 Lejeune (107) demostra que una còpia extra del cromosoma 21 era la responsable de la síndrome de Down. Ford (108) i Jacobs-Strong (109) fan l'equivalent amb les síndromes de Turner i Klinefelter respectivament. Aquestes primeres observacions de la base citogenètica de les malalties humanes va marcar el començament de la genètica clínica. Posteriorment es descriuen altres síndromes, com la síndrome d'Edwards (110) causada per una còpia extra del cromosoma 18 i la síndrome de Patau causada per una còpia extra del cromosoma 13 (111). Aquestes van ser només les primeres de moltes síndromes, identificades com a entitats clíniques, sobre la base causal d'una anomalia cromosòmica.

Encara que posteriorment es va fer evident que l'única monosomia completa compatible amb la vida era la del cromosoma X i les trisomies compatibles amb la supervivència a terme van ser les relacionades amb els cromosomes sexuals i els autosomes 13, 18 i 21, moltes monosomies i trisomies parcials ara se sap que són la causa d'una gran varietat d'anomalies i síndromes congènites.

La prevalença global de les anomalies cromosòmiques és d'aproximadament 9 per 1000 nadons. S'estima que la majoria dels casos (6 per cada 1000 nounats) hi ha material cromosòmic en excés o en defecte. Les anomalies cromosòmiques «en desequilibri» estan vinculades a diferents nivells de discapacitat física i mental. S'inclouen en aquest grup les trisomies 21, 18 i 13, i les anomalies numèriques dels cromosomes sexuals. La resta de les anomalies, que es troben en aproximadament el 3 per cada 1000 nounats, s'anomenen anomalies cromosòmiques «equilibrades». Les persones amb aquestes anomalies no solen tenir cap símptoma. No obstant això, estan en risc de tenir descendència cromosòmicament desequilibrada.

L'anàlisi mitjançant cariotip convencional a partir de les cèl·lules cultivades ha estat considerat el «gold standard» del diagnòstic prenatal durant més de trenta anys. Aquest procediment ha demostrat ser altament fiable per identificar anomalies del nombre de còpies de cromosomes i grans reordenaments estructurals. Una limitació important d'aquesta tècnica és la resolució, en general, les reorganitzacions estructurals de 7-10 Mb es poden detectar de forma fiable, malgrat que avui dia mètodes d'alta resolució permeten la detecció d'anomalies més petites. Una altra limitació addicional i molt important del cariotip convencional és la necessitat de cultiu cel·lular, això vol dir que el temps mitjà d'obtenció de resultats d'una anàlisi de cariotip convencional oscil·la entre 2-3 setmanes i aquest interval de temps entre la presa d'una mostra prenatal i l'informe dels resultats representa un moment de gran ansietat per als pares durant un embaràs i és vital a l'hora de prendre decisions. Per tant, hi ha una necessitat de tècniques alternatives més ràpides, que no requereixin cultiu cel·lular i d'aplicació a l'àmbit prenatal. Tècniques com la FISH i la QF-PCR han demostrat ser molt útils i s'han introduït en aquest camp per tal de respondre a les preguntes de diagnòstic específiques, escurçant els temps de resposta. L'array-CGH en contrast és una estratègia de cribratge de tot el genoma complet per a la detecció de variants en nombre de còpies d'ADN, ràpida i susceptible d'automatització. L'array té el potencial de ser utilitzat per al diagnòstic prenatal i pot fer front a moltes de les limitacions de les anàlisis citogenètiques microscòpiques convencionals fins ara mencionades.



### 1.7.1. MICROARRAY I AVORTAMENT ESPONTANI

Aproximadament el 10-15% de tots els clínicament reconeguts els embarassos acaben en un avortament involuntari, la majoria durant el primer trimestre de la gestació (112).

L'any 1963, Carr publica el primer estudi citogenètic de material de fetus avortats de forma espontània i demostra que una proporció notablement elevada de les pèrdues gestacionals s'associen amb anomalies cromosòmiques incompatibles amb la supervivència (113). Estudis posteriors revaliden les observacions de Carr i actualment s'accepta que aproximadament el 50% de tots els embarassos que sobreviuen el temps suficient per ser clínicament reconeguts i que són posteriorment avortats de forma espontània abans de la setmana 24 tenen alguna anomalia cromosòmica (114,115). La majoria d'aquestes anomalies genètiques, un 86% aproximadament, són anomalies cromosòmiques numèriques, incloses trisomies, monosomies i poliploïdies. Anomalies cromosòmiques estructurals, duplicació o delecions visibles mitjançant cariotip convencional, representen un 6% més i altres anomalies com són les mutacions d'un gen i mosaïcismes un 8% (116,117).

Diferents estudis reporten resultats després de l'aplicació de l'array-CGH en l'anàlisi d'anomalies cromosòmiques en avortaments espontanis (118). Schaeffer (119) després d'analitzar avortaments espontanis amb cariotip convencional de bandes-G i array-CGH, descriu un increment del rendiment diagnòstic per l'array-CGH del 9,8%. Benkhalifa, entre altres autors, troba anomalies submicroscòpiques detectables per array-CGH en un 15% dels avortaments espontanis amb cariotip normal (120,121).

Aquests resultats es mantenen també en els avortaments espontanis després d'una tècnica de reproducció assistida (TRA). Les dades donen suport a l'opinió de que l'anomalia cromosòmica és una de les principals causes d'avortament espontani després d'una fecundació in vitro. També s'ha estudiat l'associació entre els canvis cromosòmics en aquests fetus avortats espontàniament i l'edat materna, els patrons d'infertilitat, les causes de la infertilitat, i les diferents tècniques de fecundació in vitro (incloent-hi la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides, la donació d'òvuls i la donació d'embrions). No s'ha trobat cap correlació significativa, no s'han pogut establir diferències analitzant les causes que provoquen l'avortament en la gestació espontània i l'avortament en la gestació aconseguida per TRA. L'anomalia cromosòmica és la causa principal que provoca la pèrdua del producte de la gestació en ambdues situacions (122,123).

La comprensió de la causa de la pèrdua fetal pot ser molt valuosa, ja que pot condicionar la realització d'altres proves diagnòstiques i proporcionar una millor estimació del risc de recurrència per a la parella en qüestió. La informació clínica s'obté habitualment per l'anatomia patològica i l'anàlisi citogenètica de les restes abortives. L'estudi citogenètic convencional requereix teixit viable i fins al 40% dels casos pot ser deficient per problemes de cultiu (124,125). L'array-CGH és capaç de superar alguns dels inconvenients del cariotip convencional, especialment pel que fa al cultiu de teixits, ja que no requereix cromosomes en metafase i per tant evita els problemes tècnics associats amb el cultiu cel·lular, com fallides de cultiu, creixement excessiu de cèl·lules maternes, qualitat subòptima del material genètic, i també el límit de la resolució, superior respecte al cariotip convencional. En el present estudi, Fritz (125) aplica l'array-CGH per identificar anomalies cromosòmiques en 60 avortaments espontanis de primer trimestre, on havia fracassat el cariotip convencional per problemes amb el cultiu. En 57 dels 60 casos l'array-CGH va ser un èxit. La taxa d'aneuploïdia total detectada va ser

del 72%. La trisomia era l'anomalia cromosòmica predominant representant el 68% dels avortaments, seguida de la triploïdia (17,1%) i monosomia X (9,8%). Una reorganització estructural desequilibrada es va trobar en un avortament (2,4%). Els cromosomes més freqüentment implicats eren els cromosomes 16 (32,1%), 7 i 22 (10,7% cadascun), 4, 13, 15, i 21 (7,2% cadascun). La contaminació cel·lular materna i la qualitat subòptima de preparacions cromosòmiques són factors que poden limitar l'anàlisi de cariotip.

D'altra banda, la possibilitat que avortaments involuntaris poden ser deguts a alteracions cromosòmiques submicroscòpiques s'ha plantejat sovint a la literatura. Estudis recents (126) demostren que l'array-CGH és una eina molt útil per a detectar aquests canvis submicroscòpics que no són visibles per anàlisi citogenètica de rutina. Alteracions submicroscòpiques es troben en un 4-13% dels avortaments involuntaris (119,121,127). L'anàlisi de microarray en productes de la concepció té un bon rendiment diagnòstic, molt especialment en els casos on no hi ha creixement del cultiu cel·lular quan es realitza un cariotip convencional. L'array-CGH en els casos d'avortaments espontanis sense creixement en el cultiu cel·lular revela anomalies cromosòmiques en el 29-58% dels casos. Aquests estudis indiquen que CNVs petites estan presents en un 1-13% de les mostres (120,127). Treballs més recents informen de la detecció de CNVs submicroscòpiques patogèniques en el 6-12% dels casos, predominantment heretades, tot i que un 10% de les CNVs eren *de novo* (126-128). Per tant, l'estudi amb tecnologia d'array dels avortaments espontanis amb cariotip normal té el potencial afegit d'identificar CNVs que podrien conduir a la pèrdua de la gestació. Autors com Zhan, entre altres, reporten un increment diagnòstic de l'array per a les pèrdues gestacionals espontànies amb cariotip normal del 10-18%, a expenses de CNVs indetectables en el cariotip convencional (127,129,130).

Curiosament, la majoria de les CNVs identificades fins al moment en avortaments involuntaris amb un cariotip normal són d'origen familiar. CNVs heretades de pares normals són menys probablement causants de fenotips anormals, però, poden arribar a ser igualment patogèniques. Cal tenir en compte que heretar un desequilibri pot conduir a diferents resultats fenotípics a conseqüència d'una penetrància incompleta. Tanmateix, un desequilibri *de novo* és més probable que sigui la causa responsable d'una ecografia anormal o d'una anomalia del desenvolupament. CNVs parentals poden provocar un avortament si afecten els gens necessaris per a la funció reproductiva, incloent-hi, per exemple, els gens necessaris per a la funció òptima de la placenta, la preparació endometrial per al manteniment de l'embaràs i l'estabilitat genòmica dels espermatozous. Aquests processos són essencials per a la viabilitat de l'embaràs, però no necessàriament poden posar en perill la salut dels pares. Recentment, autors com Nagirnaja, suggereixen un paper destacat per a la regió cromosòmica 5p13.3, regió que podria representar un factor de risc de complicacions durant l'embaràs, ja que conté els gens expressats predominantment en la placenta (131).

Tanmateix succeeix amb altres gens que comencen a destacar en la patogènesi de l'avortament, especialment en casos d'avortament recurrent. L'avortament recurrent afecta el 3-5% de les parelles (132). Factors clàssics associats inclouen translocacions cromosòmiques dels progenitors, factors uterins, endocrins i autoimmunes. Malgrat una extensa avaluació, fins a un 40% de les parelles amb antecedents d'avortivitat recurrent no tenen factors identificables. Per tant, es classifiquen com infertilitat idiopàtica (132). L'avanç de les noves tecnologies d'ADN, l'avaluació de tot el genoma a resolucions més gran, facilita l'estudi d'aquestes parelles. S'ha investigat la possibilitat que els canvis cromosòmics submicroscòpics, no detectables per anàlisi citogenètica convencional, estiguin implicats en avortaments involuntaris amb cariotip normal de les parelles amb avortivitat recurrent idiopàtica. L'origen matern d'algunes CNVs pot ser d'interès,

especialment aquelles en les que participen els gens *TIMP2* i *CTNNA3*, que s'expressen normalment només des de la còpia materna en la placenta (126). El perfil genòmic dins del grup d'avortivitat recurrent va ser significativament enriquit per a les CNVs que afecten principalment als gens relacionats amb la senyalització de la immunitat i les interaccions immunorreguladores. Mencionar, com una troballa important, la identificació d'una CNV en 5p13.3 que confereix gairebé cinc vegades més risc d'avortament, i dos nous gens candidats (*PDZD2* i *GOLPH3*) associats amb el manteniment de l'embaràs (131). Aquests estudis demostren que l'array-CGH és útil per detectar CNVs també en els casos d'avortivitat recurrent.

Per tal d'investigar més a fons el paper potencial d'aquestes CNVs en avortaments involuntaris recurrents s'estan realitzant estudis d'anàlisi funcional (ARN i proteïnes d'expressió) de gens implicats. Canvis en l'expressió d'alguns gens podrien ser rellevants per l'avortament involuntari a causa del seu paper en processos importants per al creixement de l'embrió i la preparació endometrial pel suport de l'embaràs (133). Tot i que el paper d'aquestes CNVs segueixen sent incert, investigacions emergents apunten al fet que alguns d'aquests gens estan implicats en la transcripció, la regulació del cycle cel·lular, l'apoptosi, la metilació de l'ADN, la modificació d'histones i la diferenciació cel·lular. Aquestes dades poden conduir a la identificació d'altres CNVs patogèniques implicades en l'avortament espontani o recurrent. Això seria d'interès per tal de comprendre millor les etapes precoces del desenvolupament humà i adequar la gestió de les parelles amb aquest problema.

La contribució genètica a la pèrdua de l'embaràs encara se subestima avui dia. Les investigacions dels teixits d'avortament suggereixen que la contribució de les alteracions cromosòmiques a la pèrdua de l'embaràs a primer trimestre és d'almenys el 50% en casos d'avortaments espontanis i de fins al 89% en casos de gestacions anembrionades (134). L'anàlisi de microarray en productes de la concepció és una tecnologia útil. Diferents autors (119,121,127) reporten un increment diagnòstic per l'array-CGH d'entre 9,8-18,6% addicional per a les anomalies cromosòmiques en els casos d'avortament, augmentant així la taxa de detecció en comparació amb el cariotip convencional. L'array-SNP està indicat a l'hora d'estudiar la disomia uniparental (128,135).



### 1.7.2. MICROARRAY i ÒBIT FETAL

Existeix alguna similitud quan analitzem les pèrdues gestacionals en setmanes avançades. Totes les morts fetals  $\geq 500$  g han de ser enregistrades; quan el pes no està disponible, s'utilitza l'edat gestacional,  $\geq$  vint-i-dues setmanes, com a criteri per a distingir una mort fetal d'un avortament. A escala mundial, la taxa de mort fetal ha disminuït des del 35/1000 nascuts vius en 1980 al 15/1000 nascuts vius en 2015 (136). La reducció s'ha associat amb un millor accés i utilització de l'atenció prenatal i una major atenció als riscos materns associats a la mort fetal. Les taxes de mort fetal en països amb baix índex sociodemogràfic són substancialment majors (al voltant de 21/1000 nascuts vius) que als països amb índexs sociodemogràfics més elevats (al voltant de 3/1000 naixements vius) (136–138). La mort fetal és el resultat final d'una varietat de trastorns materns, fetals i placentaris. Les causes que acaben provocant una mort fetal semblen diferir entre els països en desenvolupament i els països desenvolupats (139,140), i entre principis i finals de la gestació.

La preeclàmpsia i la infecció s'han reportat com a causes comunes de mort fetal en els països en desenvolupament, mentre que les anomalies congènites, els problemes placentaris associats amb la restricció del creixement, i les malalties mèdiques materns semblen ser les causes més comunes en els països desenvolupats (140). La mortalitat fetal precoç sembla estar relacionada amb anomalies congènites, infeccions, restricció del creixement intrauterí, i condicions mèdiques materns subjacents, mentre que la mortalitat fetal tardana sembla es deu tant a trastorns mèdics materns com a trastorns obstètrics, que en general, es desenvolupen al voltant del moment del part, com ara el desprendiment prematur de placenta normalment inserta (DPPNI) i la placenta prèvia, el prolapse del cordó o altres complicacions presents en el part.

Una mort fetal no explicada és una mort fetal que no pot atribuir-se a una causa identificable. Del 25 al 60 per cent de totes les morts fetals són inexplicables (141–144). La variació en la proporció reflecteix si la mort fetal s'ha avaluat completament (143) i del sistema de classificació que s'ha utilitzat per a la seva avaluació; ReCoDe sembla que disminueix el percentatge de mort fetal de causa desconeguda a un 15% enfront altres sistemes com ara Wigglesworth (145). Man (144), en el seu treball en 2016, estudia 1064 morts fetals (246 morts fetals intrauterines de  $< 20$  setmanes, 179 entre les 20-23 setmanes i 639 de  $\geq 24$  setmanes de gestació) i troba un 40% dels casos de mortalitat amb una causa identificable (412 casos), mentre que al voltant del 60% dels casos de mortalitat van ser classificats com a "morts fetals de causa desconeguda" (652 casos). Aquí juga un paper important l'estudi postmortem, eines com l'array ens poden ajudar a conèixer la causa de morts fetals fins al moment no atribuïbles a causes conegudes. Malgrat que la majoria de les aneuploïdies són letals intraúter, algunes aneuploïdies, com ara la trisomia 21, 18, i 13 i monosomia X, confereixen un major risc de mort fetal. Tot i que la mort d'un fetus amb cariotip alterat és més comú en el primer trimestre de l'embaràs, pot ocórrer en qualsevol etapa de la gestació (146). La freqüència de cariotip anormal en nascuts morts i morts neonatals és d'aproximadament un 16 i 6 per cent, respectivament, davant de 0,7 per cent en nascuts vius. La combinació d'una anomalia congènita i mort fetal augmenta la probabilitat d'una anomalia cromosòmica. En un estudi (147) de 750 fetus nascuts morts, les anomalies cromosòmiques es van identificar en el 38 per cent dels nascuts morts amb anomalies en comparació amb el 4,6 per cent dels nascuts morts que eren morfològicament normals.

La taxa diagnòstica per a les anomalies citogenètiques és significativament major per a les proves invasives (85%) que per a l'anàlisi de teixits postpart (28%). L'anàlisi citogenètica va ser valuosa en la determinació de la causa en el 19% de les morts fetals (147). La majoria de les anomalies cromosòmiques en la pèrdua de l'embaràs són aneuploïdies i es detecten tradicionalment a través d'anàlisi citogenètica convencional. Però, es requereix cèl·lules vives en divisió, i els problemes en l'estudi dels casos d'òbit fetal poden aparèixer, a conseqüència de la manca de creixement en el cultiu cel·lular, el creixement excessiu de cèl·lules maternes, la contaminació microbiana o una mala morfologia cromosòmica. Aquests fets sovint dificulten l'obtenció de resultats d'alta qualitat a partir dels embarassos no viables. L'anàlisi de microarray pot eludir molts d'aquests problemes. Pocs estudis s'han centrat en l'ús d'aquestes plataformes d'array per a la identificació d'alteracions genòmiques en material de fetus mort. Això pot ser degut, en part, als estrictes requisits de recollida de teixit i aïllament d'ADN associats amb l'array-CGH. Una gran quantitat de variacions poden condicionar la viabilitat del material procedent de la mort fetal, en particular en casos de fetus macerats. En conseqüència, la capacitat d'aïllar l'ADN de pes molecular suficient i la qualitat pot limitar la utilitat d'aquest tipus de mostra. En una investigació de 15 casos de mort fetal intrauterina, Raca et al. (148) utilitzant l'array-CGH troba un 13% de resultats patològics en fetus amb anomalies en almenys dos òrgans diferents. L'aïllament d'ADN es va intentar en 26 casos de teixit congelat i cèl·lules cultivades però l'ADN genòmic no va poder ser recuperat en tots els casos. Malgrat tot, els resultats suposen una millora sobre l'anàlisi citogenètica tradicional d'espècimens morts.

Rosenfeld et al. (149) identifiquen un 12,8% de resultats patològics en fetus morts amb anomalies morfològiques i cariotips normals o desconeguts i un 6,9% en el grup de fetus sense anomalies morfològiques amb cariotip normal. Aquesta taxa de detecció no va variar significativament amb l'edat gestacional, el que suggereix que, a diferència d'aneuploïdia, la contribució de les anomalies cromosòmiques submicroscòpiques a la mort fetal no varia amb l'edat gestacional. L'array-CGH fracassa en el 8,3% dels seus casos per problemes amb la qualitat de l'ADN, una notable millora si pensem que els resultats per citogenètica convencional s'obtenen només en el 45% a 65% dels nascuts morts a causa de problemes amb els cultius cel·lulars (148). Mentre que autors com Pinar (150) no troben un augment significatiu de la detecció d'anomalies de cariotip quan comparen fetus fenotípicament normals amb fetus amb anomalies, altres presenten taxes de detecció d'anomalies cromosòmiques significativament majors, de fins al 38%, sobretot en nascuts morts dismòrfics (148,149). Cal afegir que Pinar treballa, en l'estudi presentat, amb cariotip convencional mentre que altres autors ho fan amb tecnologia de microarray. Per tant, la resolució més gran proporcionada per l'array-CGH suggereix que es pot utilitzar aquesta tecnologia com una alternativa, o almenys, com un mètode complementari a l'anàlisi del cariotip convencional per a l'examen d'alteracions genòmiques en morts fetals no explicades. Si bé el cost de l'array-CGH és encara més gran que el d'un cariotip normal, s'espera que continuï disminuint a mesura que el seu desenvolupament millori l'automatització. A més de la seva capacitat per detectar canvis clínicament significatius en el nombre de còpies, l'array-CGH també evita la baixa taxa de detecció d'anomalies citogenètiques que resulten de la manca de creixement de les cèl·lules del fetus o la placenta in vitro (148).

En general, les causes intrínseques fetals (malformacions, deformacions, síndromes, i displàsies) representen fins al 25% dels nascuts morts. La taxa d'anomalies cromosòmiques varia del 5-16% a la mort fetal intrauterina sense anomalies físiques i del 35%-40% a la mort fetal intrauterina amb anatomia anormal (146,151,152). Aquesta taxa varia d'un país a un altre i està molt influenciada per la disponibilitat del diagnòstic prenatal i la interrupció de l'embaràs.

El diagnòstic d'una anomalia cromosòmica com a causa de la pèrdua de l'embaràs proporciona informació important per al consell en el risc de recurrència i ajuda a identificar reordenaments cromosòmics familiars que poden predisposar a les parelles a pèrdues recurrents o al naixement de nens amb anomalies congènites o discapacitat intel·lectual. D'altra banda, arribar a un diagnòstic pot alleujar els sentiments de culpa amb freqüència associats amb la pèrdua de l'embaràs i proporcionar opcions de diagnòstic prenatal, o fins i tot diagnòstic genètic preimplantacional en embarassos futurs. Els pares han de ser aconsellats sobre els aspectes de l'anàlisi citogenètica després de la mort del fetus. Fins i tot s'aconsella realitzar proves invasives, després de la mort del fetus i abans del part, en tots els casos que no tenen estudi de cariotip previ. L'array pot ajudar en aquest sentit, tant en els casos en què no hi ha cariotip com en els casos associats a anomalies morfològiques en presència d'un cariotip normal.

### 1.7.3. MICROARRAY I MALFORMACIONS CONGÈNITES

Les anomalies congènites són anomalies morfològiques, estructurals, funcionals o moleculars que ocorren durant la vida intrauterina i es detecten durant l'embaràs, en el part o en un moment posterior de la vida. Els defectes congènits formen un grup heterogeni de trastorns d'origen prenatal que poden obeir a la presència d'un sol gen defectuós, a alteracions cromosòmiques, poden ser esporàdics o deguts a una combinació de factors hereditaris, o fins i tot, a teratògens presents en el medi ambient o a mancances de micronutrients.

Els trastorns congènits són una patologia freqüent. L'OMS calcula que l'any 2004 unes 260 000 morts al món (al voltant d'un 7% de totes les morts de nounats) van ser causades per anomalies congènites. A Europa fins a un 25% dels casos de mort neonatal es deuen a anomalies congènites. En l'actualitat no hi ha estimacions sòlides del nombre de nens nascuts amb un trastorn congènit greu atribuïble a causes genètiques o ambientals. Els més freqüents d'aquests trastorns greus són els defectes cardíacs congènits, els defectes del tub neural i la síndrome de Down (152). Subsisteixen importants incerteses respecte a la prevalença i la mortalitat atribuïbles a trastorns congènits, sobretot en països que no tenen un sistema adequat de registre de defectes congènits i de defuncions.

Els trastorns congènits es produeixen en aproximadament un 2-4% dels nascuts vius (153). La prevalença global de la majoria dels principals defectes de naixement no varia molt entre els diferents grups ètnics (154). No obstant això, el risc de diferents tipus de malformacions és variable i pot estar relacionat amb susceptibilitats genètiques, així com d'ambientals o socioculturals. Malformacions d'etiologia desconeguda són probablement la manifestació de condicions monogèniques, mutacions que sorgeixen en etapes primerenques del desenvolupament o multifactorials, resultat de la interacció de múltiples gens i factors ambientals.

Les anomalies citogenètiques són una de les principals causes d'anomalies congènites, especialment quan estan associades a alteracions en el desenvolupament neurològic o afecten a més d'un òrgan o sistema. La presència d'alteracions en l'ecografia fetal, com l'augment de la translucència nugal, el creixement fetal restringit de forma precoç o les anomalies estructurals, dibuixen un escenari molt adequat per a l'ús de l'array-CGH en el diagnòstic prenatal.

La majoria dels embarassos amb anomalies a l'examen ecogràfic mostren un cariotip convencional normal i per tant són susceptibles de beneficiar-se de l'anàlisi d'array. Tant Tyreman et al. (155) com Faas et al. (156) utilitzant tecnologia d'array-CGH, en fetus amb anomalies ultrasonogràfiques i cariotip convencional normal, detecten entre un 10% i un 16% de CNVs clínicament rellevants, respectivament.

Una altra raó que requereix l'aplicació de l'array és la presència en el cariotip fetal d'una translocació recíproca *de novo* o un cromosoma marcador supernumerari *de novo*. Les translocacions recíproques són dels reordenaments cromosòmics més freqüents en els éssers humans; 1/500 segons Jacobs et al. (109). D'aquestes translocacions que són aparentment equilibrades, aproximadament el 6% s'associen a anomalies fenotípiques. S'han demostrat l'existència de delecions críptiques en els punts de trencament de la translocació o en un altre lloc en el genoma en aproximadament un 40% de translocacions recíproques, siguin *de novo* o heretades, detectades en pacients amb anomalies fenotípiques, explicant perfectament la correlació fenotip-genotip (157). Atès que els punts de ruptura de la gran majoria de les translocacions recíproques són de

caràcter no recurrent, és raonable pensar que només les plataformes que cobreixen la major part del genoma són adequades per detectar-les. Una situació similar s'aplica a marcadors cromosòmics, la gran majoria són de caràcter no recurrent, i poden localitzar-se tant en regions pericentromèriques com en qualsevol altra regió genòmica. Evidentment només plataformes que cobreixen la major part del genoma poden detectar aquestes duplicacions o amplificacions que poden caure en qualsevol lloc al llarg del genoma.

Aproximadament el 6% dels portadors d'una translocació recíproca aparentment equilibrada i al voltant d'una quarta part dels pacients amb reordenaments cromosòmics equilibrats complexos (que impliquen 2 cromosomes o més de 2 punts de trencament) tenen fenotips anòmals. El fenotip anòmal suggereix que els desequilibris cromosòmics, que causen la interrupció dels gens, són comuns en aquests pacients. L'aplicació de l'array-CGH revela que el 40% dels pacients amb fenotips afectats i translocacions recíproques *de novo* equilibrades per citogenètica convencional presenten resultats patològics, i el 18% d'ells tenen reordenaments complexos amb > 3 punts de trencament (157). Aquestes dades posen en relleu la necessitat de realitzar l'array-CGH en qualsevol nen amb fenotip afectat que presenti un reordenament cromosòmic aparentment equilibrat per mètodes citogenètics convencionals. Aquest mateix estudi demostra que el 8,4% dels pacients amb malformacions congènites i/o discapacitat intel·lectual tenen desequilibris cromosòmics clínicament rellevants (157). Les dades d'aquests i altres estudis generen un interès creixent en la utilització de l'array-CGH. En qualsevol cas, una definició precisa de la magnitud del desequilibri i el coneixement del seu contingut de gens ens pot ajudar a donar un assessorament genètic més exhaustiu.

En aquests últims anys, l'array-CGH s'ha introduït en la rutina clínica per a l'estudi postnatal de diferents desequilibris cromosòmics. De fet, està acceptat el seu ús com a primera prova en lloc del cariotip convencional, en pacients amb discapacitat intel·lectual, malformacions congènites múltiples, autisme, tal com ja hem exposat en apartats anteriors. El Col·legi Americà de Ginecòlegs i Obstetres (ACOG), l'any 2009 (24), estableix una sèrie de recomanacions al respecte, i assenyala que l'array-CGH en concert amb un adequat assessorament genètic, pot oferir-se en aquells casos prenatals amb troballes anatòmiques anormals i un cariotip convencional normal, així com en els casos de mort fetal amb anomalies congènites. El Col·legi de Ginecòlegs Canadencs (SOGC), en el seu número 270 de desembre de 2011 (158), arriba a conclusions similars, sempre comptant amb assessorament genètic adient a l'hora d'informar. Recentment, l'ACOG juntament amb la Societat de Medicina Materno-Fetal (SMFM) recomanen utilitzar la tecnologia de l'array (CMA) en casos amb anomalies estructurals fetals o mort fetal, i reemplaça la necessitat de cariotip fetal en aquests casos (Nivell Evidència 1A) (159).

L'experiència de l'array-CGH en el camp de diagnòstic prenatal està centralitzada especialment en fetus amb anomalies ecogràfiques (160). En general, la major part d'estudis sobre l'ús de l'array-CGH prenatal aplicat a poblacions d'alt risc estableixen el percentatge de detecció d'alteracions cromosòmiques al voltant del 6% (5,8-7,6%) (14,15,161-163). Aquesta taxa de detecció augmenta quan s'analitzen només aquells fetus amb malformacions estructurals ecogràfiques arribant a ser del 8% (5,2-13,3%) (15,162-167). Quan revisem la bibliografia amb la idea de valorar l'increment diagnòstic de l'array respecte al cariotip convencional en mostres prenatales, trobem que l'array-CGH detecta una mitjana de 3,6% (1,5-8,5%) de desequilibris genòmics addicionals en mostres amb cariotip normal, pel que sembla d'una manera global sense especificar la indicació per l'estudi de cariotip (14,15,164,168,169). No obstant això, aquest percentatge augmenta a una mitjana de 5,2% (1,9-13,9%) quan la indicació per fer

l'estudi és una malformació estructural fetal diagnosticada per ecografia (14,15,167,170) i del 9,5% quan es veien afectats més de dos òrgans o sistemes (171). Tal com era d'esperar, el cariotip convencional en aquests estudis no va detectar reordenaments cromosòmics addicionals quan el resultat de l'array-CGH va ser normal, suggerint que les àrees en què aquesta tecnologia no és informativa (translocacions equilibrades, inversions i una menor sensibilitat per triploïdies o mosaïcismes) no semblen ser tan comuns en una població de referència, si bé cal assenyalar que es tractava de població molt seleccionada en la major part dels estudis.

Per tant, s'estableix una major taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques amb l'array-CGH, tant en mostres amb indicacions generals com en aquelles obtingudes amb indicació d'alteracions ecogràfiques, si bé en aquests últims casos, els percentatges de detecció són superiors. Respecte a altres condicions: edat materna, ansietat parental, la taxa de detecció per l'array en els embarassos amb fetus estructuralment normals per ecografia i cariotip normals és d'aproximadament un 1,7% (15). Una revisió de quatre estudis informa de CNVs clínicament significatives en el 1% (50/5108 casos) dels casos amb l'edat materna avançada, i el 1,1% (44/4164 casos) dels casos en què l'amniocentesi o la biòpsia corial es va dur a terme per un altre motiu, incloent l'ansietat dels pares o la història d'una anomalia cromosòmica prèvia (172). Breman (162) reporta dades molt semblants en el seu treball, al igual que altres autors (161)(173). Alguna cosa semblant succeeix quan s'aplica un array de SNPs al diagnòstic de fetus amb anomalies ecogràfiques, la prevalença i naturalesa genètica dels resultats patològics no va variar, detectant-se un 7,4% d'anomalies cromosòmiques (174,175), amb un increment diagnòstic respecte al cariotip convencional del 3,6% en aquests fetus (176).

Del conjunt d'aquests estudis prospectius s'extreu una major evidència sobre la viabilitat d'introduir l'array-CGH en la rutina del diagnòstic prenatal com a prova de primera línia en indicacions seleccionades tal i com recomana l'ACOG (159)(172).

En el cas de cariotip prenatal després de la detecció d'una malformació fetal en l'examen ecogràfic, la probabilitat a priori per a detectar una anomalia cromosòmica responsable és gran, especialment si hi ha anomalies molt específiques. Quan analitzem la literatura respecte a la presència d'alteracions a l'array-CGH segons les troballes ecogràfiques trobem que els autors es centren sobretot en l'increment diagnòstic que l'array ens aporta davant el cariotip convencional, però pocs estudien quines d'aquestes anomalies ecogràfiques presenten més freqüentment associacions amb array-CGH alterats, de fer-ho les series presentades són curtes o fins i tot trobem referències a casos aïllats, tal com era d'esperar per la innovació pròpia de la tecnologia i la prevalença de les malformacions fetals de diagnòstic prenatal. Les cardiopaties congènites i les malformacions del sistema nerviós central (SNC) són les més freqüentment associades a CNVs (177,178).



### 1.7.3.1. MICROARRAY I CARDIOPATIES CONGÈNITES

Les cardiopaties congènites (CC) són les malformacions congènites severes més freqüents. Afecten aproximadament al 0,8-1% (179) dels nadons i en la meitat dels casos corresponen a defectes severes. Els primers estudis de prevalença informen de 4-8 casos per cada 1 000 nascuts vius (180–183), però autors com Hoffman reporten xifres superiors de fins a 19/1000 nascuts vius (184). La taxa de detecció prenatal global és del 25%, d'entre 14 i 45% en funció de la CC i del grup de treball (185). Hi ha una considerable variació en la taxa de detecció prenatal entre els països. L'Eurofetus Study (185) reporta taxes de detecció prenatal de CC del 38,8%. L'Euroscan Group (183) documenta taxes de detecció més baixes als països de l'est d'Europa (Croàcia, Lituània i Ucraïna; 8%) que a l'Europa occidental on la taxa de detecció va oscil·lar entre 19-48%. La prevalença de la CC en els diferents estudis varia enormement des d'aproximadament 4/1000 a 50/1000 nascuts vius (185). La freqüència relativa de les diferents CC també difereix molt d'un estudi a un altre. A més, altres 20/1000 nascuts vius presenten: vàlvula aòrtica bicúspide, anomalia aïllada de venes pulmonars o conducte arteriós permeable de forma asimptomàtica. Hoffman (184) realitza una revisió exhaustiva de 62 estudis publicats des de 1955, i observa que la prevalença total de la CC està relacionada amb la freqüència relativa dels defectes septats ventriculars (DSV), el tipus més comú de CC. Exposa que si les formes principals de CC s'estratifiquen en categories: lleu, moderada i greu, la variació en la prevalença depèn principalment del nombre de lesions lleus incloses. La prevalença de formes moderades i severes de CC és d'aproximadament 6/1000 nascuts vius (19/1.000 nascuts vius si s'inclou la vàlvula aòrtica bicúspide potencialment greu), i arriba a augmentar fins a 75/1000 nascuts vius si els defectes menors, especialment DSV musculars presents en el naixement, s'inclouen.

Els defectes congènits del cor diagnosticats prenatalment amb més freqüència són els defectes del septe ventricular (31,41%). Altres CC diagnosticades són: estenosi aòrtica (7,64%), estenosi pulmonar (7,13%), coartació de l'aorta (5,77 %), transposició de les grans artèries (5,43%), ductus arteriós persistent (4,75%), defecte del septe atrio-ventricular (4,07%), síndrome del cor esquerre hipoplàsic (4,07%), tetralogia de Fallot (3,56%) i atrèsia pulmonar (2,38%) (186,187).

La CC és la principal causa de mortalitat neonatal no infecciosa. La mortalitat global davant una CC diagnosticada en vida fetal se situa entre el 25-35% i en l'actualitat, el 15% dels nens nascuts amb una CC greu no arribaran a l'adolescència (188). La prevalença d'anomalies cromosòmiques associades a les CC fetals és també alta i pot arribar a ser de fins al 28-40% (189). Les més descrites són: trisomia 21 (43,6%), trisomia 18 (19,1%), trisomia 13 (9,6%), monosomia X (7,4%) i deleció 22q11.2 (7,4%) (189). Autors com Chaoui (190) documenten altes taxes d'associacions de CC amb anomalies cromosòmiques: defecte del septe auriculoventricular (55%), defecte del septe ventricular amb associació amb coartació aòrtica (43%), tetralogia de Fallot i doble sortida del ventricle dret conjuntament (36%). En comparació, els fetus amb transposició de les grans artèries i atrèsia/estenosi pulmonar que presentaven baix risc de cromosomopaties.

Hartman (191) reporta una associació especialment elevada d'anomalia cromosòmica amb la interrupció de l'arc aòrtic (tipus B; 69,2%). Aquesta taxa augmenta per a les síndromes i les malformacions múltiples associades arribant a ser del 51,9% i 48,6% respectivament (192). Per a la majoria dels casos de CC, és possible la reparació o la pal·liació quirúrgica, amb resultats que han anat millorant al llarg del temps. En aquells casos, però, on hi ha malformacions o cromosomopaties associades sovint són

aquestes les que marquen el pronòstic. La taxa de mortalitat és major si hi ha una anomalia citogenètica o malformacions associades, unes 2,4 vegades més, independentment de la complexitat de la CC (193). A més, els fetus amb CC presenten risc d'altres anomalies genètiques addicionals, incloent-hi les síndromes de microdeleció o microduplicació com ara la síndrome de deleció 22q11.2, que afecta aproximadament 1/2000-4000 nascuts vius i és la síndrome de microdeleció més comuna en els éssers humans (194–197), la síndrome de Williams-Beuren i Potocki-Lupski, o anomalies monogèniques com la síndrome de Noonan. Tanmateix presenten major risc d'alteracions en el neurodesenvolupament inclús en absència d'anomalies genètiques, i independentment del risc quirúrgic (198). Una alta proporció de fetus amb CC tenen biometries cefàliques petites respecte a l'edat gestacional amb un augment de la perfusió cerebral ja en el segon trimestre de l'embaràs, fet que suggereix un inici precoç dels mecanismes que condueixen a neurodesenvolupament més pobre en aquests nens (199–204). Proporcionar informació sobre l'associació de CC amb problemes addicionals és important per a l'assessorament prenatal de les parelles afectades (205).

La presència d'una CC incrementa el risc de presentar una altra malformació, entre un 11,7%-31,2% (193,206–208). Les CC, amb la més alta incidència d'anomalies extracardíaques (>25%) són: l'heterotàxia, l'atrèsia tricuspídica, la síndrome del cor esquerre hipoplàsic i la tetralogia de Fallot (189). Les malformacions més freqüentment associades són les urinàries i gastrointestinals. La majoria (> 90%) de CC apareixen en fetus procedents de la població general, és a dir sense antecedents o factors de risc coneguts. Per això, el paper de l'ecografia prenatal de screening és fonamental per al seu diagnòstic i la sospita de CC en l'ecografia constitueix en l'actualitat l'eina principal per al diagnòstic de les CC fetals. Van Velzen (209) reporta una congruència entre el diagnòstic ecocardiogràfic prenatal i postnatal del 82,1%. Està actualment acceptat que el diagnòstic prenatal de les CC té un efecte clarament beneficiós sobre el pronòstic, adequant el control de la gestació i planificant el part. Això té un impacte positiu en el pronòstic postnatal de gran part de les CC, especialment en aquelles ductus dependent. El diagnòstic prenatal redueix la necessitat de trasllat postnatal i l'ús de prostaglandines en aquests nens (210,211).

Detectar CNVs patogèniques és crucial per al pronòstic de la CC. L'array-CGH detecta la presència de CNVs amb una major resolució que el cariotip convencional. Jansen (179) en la seva metanàlisi demostra que existeix un rendiment diagnòstic incrementat de fins a un 7,0% per a la detecció de CNVs quan es fa servir l'array-CGH, excloent els casos de microdeleció 22q11.2 i aneuploidia, amb un 3,4% de rendiment incrementat en els casos de CC aïllades, i un 9,3% quan s'hi detecten malformacions extracardíaques associades. Aquestes dades són semblants a les publicades per a altres autors (212). En general, l'array aplicat al diagnòstic de les CC presenta un rendiment diagnòstic d'entre el 6,6-12%, amb un rendiment addicional de 3,4-5,3% per a la detecció de variants de significat desconegut (VOUS) (213). Mademont-Soler (208) presenta xifres discretament inferiors, amb un increment de rendiment diagnòstic per l'array del 2% respecte a la citogenètica convencional. Mentre que autors com Schmid (214) presenten dades més optimistes amb detecció de CNVs patogèniques en el 16-25% dels casos de CC amb cariotip normal, especialment quan se centren els esforços a investigar específicament regions d'interès. Factors de risc ambientals específics sembla que poden interactuar i donar lloc a polimorfismes i mutacions de gens específics (*NKX2-5*, *NOTCH1*, *NSD1*, *EHMT*) vinculats a la CC (215,216) i altres de nous, com el gen *PROSIT240* (217) identificat en alguns pacients amb transposició de grans artèries i el gen *LVOTD* (218) relacionat amb les cardiopaties congènites conotruncals.



### 1.7.3.2 MICROARRAY I MALFORMACIONS DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Al voltant del 3-4% dels nascuts vius presenten algun tipus d'anomalia, però aquesta xifra s'incrementa fins al 4-7% a l'any de vida (153). Les anomalies del sistema nerviós central (SNC) són de les anomalies congènites fetals més freqüents. S'estima que podrien presentar-se en 1 de cada 1000 nadons (0,14-0,16% en nascuts vius i 3-6% en mortinats) (219), fet que suggereix que la freqüència d'anomalies del SNC en embrions difereix de la observada en fetus i nadons. Tanmateix, la incidència d'anomalies intracranials amb tub neural íntegre és un pèl incerta, ja que es creu que moltes d'aquestes malformacions poden passar desapercibudes al naixement i manifestar-se de forma més tardana, motiu pel qual encara podríem estar parlant d'una incidència superior, fins a un 1% segons alguns autors (220).

Les anomalies del SNC són un grup de defectes congènits greus associats amb altes taxes de mort o discapacitat infantil. Encara que l'etiologia de les anomalies fetals del SNC és molt heterogènia: dèficits d'àcid fòlic, malalties maternes com per exemple aquelles que comprometen la producció d'hormones tiroïdals, malalties fetals com la trombopènia al·loimmune, agents contaminats mediambientals, drogues com l'alcohol, fàrmacs com els antiepilèptics, entre molts altres (221–228). Els agents infecciosos també tenen el seu protagonisme com succeeix per exemple amb el toxoplasma (229–231), el citomegalovirus (CMV)(232–234) o el virus Zika (225,235–239). La transmissió vertical d'aquests virus pot donar com a resultat nens nascuts amb deteriorament cognitiu, o en risc de presentar deficiències en el neurodesenvolupament a llarg termini. Si s'ha produït infecció fetal, la microcefàlia, les anomalies corticals, les calcificacions periventriculars i els quists intraparenquimatosos mostren una forta correlació amb un resultat neurològic deficient (226,240).

Les condicions genètiques són igualment reconegudes com una causa important de malformacions cranioencefàliques (241). Els defectes neurològics fetals poden ser causats per desequilibris genòmics submicroscòpics o mutacions d'un sol gen en el període neonatal. L'anàlisi de microarray permet avaluar molts trastorns cromosòmics submicroscòpics responsables de malformacions neurològiques fetals. La rellevància de les mutacions genètiques també se subratlla pel fet que molts factors ambientals donen lloc a malformacions del sistema nerviós central a través dels seus efectes mutagènics. El diagnòstic etiològic es converteix sovint en un repte en els fetus i nounats amb malformacions del SNC donat que les presentacions clíniques poden ser atípiques, poden tenir característiques fenotípiques poc específiques, compartir trastorns genètics diferents, aparèixer en edats gestacionals tardanes o fins i tot manifestar-se postnatalment. L'etiologia és complexa i el diagnòstic prenatal difícil en molts casos.

Els estudis demostren que les malformacions del SNC detectades per ecografia estan fortament associades amb anomalies cromosòmiques, especialment la trisomia 13 i 18 (242–244). El potencial dels ultrasons per al diagnòstic prenatal d'anomalies en la mida o forma del crani (macrocefàlia, microcefàlia, craniosinostosi), defectes del tub neural (DTN), ventriculomegàlia, hidrocefàlia, defectes de fossa posterior (anomalies en la grandària de la cisterna magna, anomalies del cerebel), anomalies de la línia mitjana (holoprosencefàlia, anomalies del cos callós), lesions isquèmiques o hemorràgiques, tumors i imatges hiperecogèniques intraparenquimatoses, difereix del primer al segon trimestre. A causa dels avenços en la tecnologia i l'augment de l'expertesa de l'ecografista amb l'exploració en la gestació primerenca, moltes malformacions fetals ara poden ser detectades en el primer trimestre. L'avaluació al primer trimestre del SNC del fetus és difícil (245). No obstant això, amb un bon coneixement de neuroembriologia, es

poden arribar a sospitar anomalies del SNC ja en el primer trimestre (246–250). En general, les anomalies letals com ara l'anencefàlia o la hidrocefàlia són fàcilment diagnosticades per l'examen ecogràfic prenatal, i gairebé sempre com a resultat del diagnòstic la gestant decideix la interrupció de l'embaràs (251). Una majoria dels casos amb mielomeningocele també són diagnosticats prenatalment, els darrers anys s'ha millorat l'assessorament prenatal i les teràpies aplicables en aquests casos, fins i tot per fetoscòpia (252–257). Però un nombre creixent d'anomalies més subtils, incloent-hi problemes a la línia mitja o defectes de la fossa posterior, poden ser diagnosticats per ecografia prenatal però la seva evolució postnatal no sempre es pot predir amb exactitud, malgrat l'ús d'altres proves complementàries com la ressonància magnètica fetal (258–262). En aquests casos, un enfocament interdisciplinari, amb perinatòlegs, radiòlegs pediàtrics, neuropatòlegs, neurocirurgians i neuròlegs, és crucial per aconsellar adequadament als pares. Hem de considerar l'aportació de la ressonància magnètica fetal (RMf) a l'estudi de les malformacions del SNC, particularment útil en la detecció dels trastorns de la migració neuronal (263–266). Algunes anomalies cerebrals, no obstant això, segueixen sent extremadament difícil o fins i tot impossible de diagnosticar prenatalment malgrat els avenços en la imatge ecogràfica. Això es deu al fet que el deteriorament neurològic greu pot ser el resultat de condicions que no afecten substancialment la morfologia del cervell. Les peculiaritats del desenvolupament del mateix SNC el fan diferent de la resta d'òrgans. El seu desenvolupament es manté durant tota la gestació i prossegueix després del naixement, és per aquesta raó que situacions de risc de diferent naturalesa poden presentar-se en qualsevol edat gestacional i causar alteracions.

La sensibilitat diagnòstica de l'ecografia varia segons l'edat gestacional, i també una funció de l'experiència de l'operador. A les 12-13 setmanes, les anomalies greus poden ja ser detectades. A les 22 setmanes, s'incrementa la sensibilitat de l'ecografia per a altres anomalies com el mielomeningocele, l'agenèsia del cos callós, la ventriculomegàlia, i les anomalies de la fossa posterior.

No obstant això, en alguns casos, el seguiment pot ser necessari fins al tercer trimestre per establir el pronòstic. Carvalho (267) va identificar en una sèrie de 2853 gestants entre les 11-14 setmanes un 4,6% defectes prenatals amb una taxa de detecció de defectes fetals per ultrasò prenatal del 71,5%. La detecció prenatal de l'ecografia de rutina al segon trimestre a la població de baix risc és del 60-78,3% (268,269). Al primer trimestre, 11-14 setmanes, la sensibilitat de l'ecografia per al diagnòstic de les malformacions fetals disminueix i es troba al voltant del 31,2-51% (248,267,270,271) si s'exclouen els diagnòstics de TN incrementades com a troballa aïllada, donat que no és una malformació com a tal. Aquest percentatge disminueix dràsticament quan es valoren defectes menors, fins al 4,7%. La detecció per malformacions del sistema nerviós central va ser del 14,4% i del 6,1 % per als DTN a l'ecografia de les 11-14 setmanes segons Carvalho (267) i del 45% i 16% respectivament, segons Blaas (251). A l'ecografia de rutina del segon trimestre la sensibilitat reportada per l'Eurofetus Study és del 88% (269). L'experiència de l'ecografista és igualment important, Taipale (272) va percebre variacions en la detecció precoç de malformacions segons l'expertesa del professional, fins al punt que la sensibilitat per al diagnòstic ecogràfic precoç de malformacions fetals es va incrementar de 22% a 79% durant els sis anys que va durar el seu estudi fet que novament emmarca el diagnòstic acurat de les malformacions en mans expertes i fa referència a la corba d'aprenentatge i al seu impacte.

L'anàlisi dels cromosomes per cariotip convencional ha estat el mètode estàndard per a la detecció d'una àmplia gamma d'anomalies cromosòmiques en les últimes dècades. Estudis recents avaluen específicament l'ús de l'array-CGH en el diagnòstic prenatal

dels fetus amb anomalies estructurals de diagnòstic prenatal ecogràfic, especialment del sistema nerviós central. Els avenços en les tecnologies genòmiques han conduït a la identificació de gens crítics per al desenvolupament normal del cervell. Estudis citogenètics i de genètica molecular han identificat anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals, així com mutacions en gens importants per a l'etiologia dels trastorns neurològics fetals. Autors com Sun L. (273) informen d'un 10.9% de CNVs patogèniques en fetus que presenten malformacions del SNC i cariotip convencional normal. Les taxes de detecció de CNVs patogèniques reportades per als diferents tipus de malformacions del SNC són diferents. Cal destacar, per exemple, que els fetus amb una malformació de Dandy-Walker presenten amb més freqüència anomalies cromosòmiques submicroscòpiques (33%), així com delecions en els cromosomes 13q i 7p (273,274). Aquest autor identifica també l'holoprosencefàlia com la segona malformació del SNC més freqüentment associada amb CNVs patogèniques (28,6%). Tot l'exposat suggereix que les CNVs podrien ser una causa important d'aquest tipus d'anomalies del SNC. Shaffer (171) realitza una anàlisi retrospectiva per tal d'establir la taxa de detecció de CNVs patogèniques en 2858 embarassos diagnosticats de diferents malformacions del SNC amb cariotips de bandes normals i troba que els defectes de la fossa posterior (incloent-hi la malformació de Dandy-Walker i la hipoplàsia cerebel·lar) i l'holoprosencefàlia són les malformacions associades a taxes de detecció més elevades per CNVs clínicament significatives (14,6% i 10,6%, respectivament). La taxa de detecció de CNVs significatives va ser del 6,5% en els fetus amb una sola anomalia SNC i de l'11% en els casos amb malformacions del SNC associades a altres anomalies.

Aquestes dades són inferiors a les descrites per Schuman que reporta un 11,4% de CNVs patogèniques i 25,7% de CNVs de significat incert per a la malformació aïllada del SNC, detectant la implicació de regions específiques que incloïen regions cromosòmiques 6p25.1-6p25.3 (*FOXC1*), 6q27, 16p12.3, Xp22.2-Xp22.32 (*MID1*) i Xp22.32-Xp22.33 (275). Krutze (276) reporta fins a un 45,4% de CNVs en anomalies del SNC associades a altres malformacions.

Pel que fa a la ventriculomegàlia (VMG) lleu aïllada no progressiva és una troballa bastant comuna que en absència de cariotip anormal associat i altres anomalies ecogràficament demostrables, la ventriculomegàlia generalment es comporta com una condició benigna amb un pronòstic favorable: neurodesenvolupament neonatal normal del 87-93% (277-279) que es redueix a un 79% si s'incrementa el temps de seguiment d'aquests nens a dos anys (280). Amb la presència de malformacions associades o en el cas de ventriculomegàlies moderades o greus, el desenvolupament neurològic a llarg termini es pot veure compromès en un 25-38% dels casos (279). El diagnòstic sonogràfic prenatal de la ventriculomegàlia fetal és relativament senzill (281) i finalment s'ha acceptat que l'amplada atrial mesurada en un tall axial transventricular continua sent la millor manera de reconèixer la dilatació ventricular (282,283). Amb una incidència del 0,3-2,5/1000 nascuts vius (284), la VMG com a tal, és un signe ecogràfic d'obstrucció del flux del líquid cefalorraquidi, que pot estar present en defectes del tub neural, dany cerebral derivat d'infeccions congènites, hemorràgia cerebral, trastorns del desenvolupament, malformació de Dandy-Walker (MDW), agenèsia del cos callós i anomalies cromosòmiques o genètiques. Així doncs, el pronòstic dels fetus amb VMG pot variar depenent de l'etiologia, el grau d'ampliació ventricular, les anomalies associades i la presència d'anomalies cromosòmiques. La incidència d'anomalies cromosòmiques en els casos de ventriculomegàlia està fortament relacionada amb la presència de malformacions associades. Així, només el 3% dels fetus amb ventriculomegàlia aïllada enfront del 36% d'aquells amb malformacions addicionals

presentaven defectes cromosòmics (285). Recentment, Hu (277) publica una sèrie de 154 casos de VMG aïllada amb una taxa de CNVs patogèniques del 9,09% i un 35% de resultat perinatal advers en aquest grup, respecte al 87,2% de bon pronòstic neurològic quan la VMG no s'associa a CNVs patogèniques.

Alguna cosa semblant succeeix amb l'agenèsia de cos callós (ACC), on la detecció de CNVs és del 12% (286). Schumann (275) suggereix la implicació dels gens: *CNTN6* i *KLHL15* en l'etiologia de l'agenèsia del cos callós, *RASD1* i *PTPRD* en la malformació de Dandy-Walker i *ERMARD* en la ventriculomegàlia.

Pel que fa als defectes de tub neural, les anomalies cromosòmiques es reporten en el 2,5-16,3% dels fetus (287,288). Les anomalies cromosòmiques es diagnostiquen en el 0,66-5,56% dels casos d'anencefàlia, el 2,08-12,29% dels casos d'encefalocele i el 4,38-17,31% dels casos d'espina bífida (289–291). La duplicació 3q26.1 i la deleció 5p13.33 s'han identificat en casos de recurrència de espina bífida (291).

L'anàlisi de microarray permet avaluar els desequilibris genòmics submicroscòpics que causen anomalies neurològiques fetals, especialment en holoprosencefàlia, lissencefàlia, i agenèsia del cos callós. Per tant, pot ajudar en el diagnòstic, la intervenció neonatal primerenca i l'assessorament genètic, proporcionant informació addicional en els fetus amb malformacions del sistema nerviós central i cariotip normal. L'array ha de considerar-se com a part de l'estudi de diagnòstic prenatal en fetus amb malformacions del sistema nerviós central.

Durant l'última dècada, enormes volums de dades s'han generat a través d'enfocaments genòmics integrats per entendre la genètica molecular de les malformacions cerebrals fetals.

Aquests esforços han avançat significativament la nostra comprensió de la patogènesi de les malformacions del SNC, i han permès traçar els subtipus moleculars diferents dels trastorns neurològics en el fetus. Hem estat capaços de mapejar i clonar gens de malalties humanes, incloent-hi els gens causants de malformacions cerebrals humanes com ara holoprosencefàlia (*SHH*, *SIX3*, *TGIF*, *NODAL*, *FOXH1* i *ZIC2*), lissencefàlia (*DCX* i *LIS1*), ACC (*ZNF238*), MDW (*RASD1* i *PPTPRD*) i DTN (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *DACT*, *VANGL1* i *VANGL2*) (241,275,292–294). A més la caracterització d'aquests subtipus moleculars permetrà la identificació dels que tenen un mal pronòstic, d'aquells amb un pronòstic favorable.

### 1.7.3.3. MICROARRAY EN FETUS AMB ALTRES MALFORMACIONS ESTRUCTURALS

Diverses organitzacions com l'American College of Obstetricians i Gynecologists (ACOG), el Royal College of Obstetricians i Gynecologists (RCOG), la Society of Obstetricians i Gynecologists of Canada (SOGC) i la International Society of Ultrasound in Obstetrics (ISUOG) han resolt que l'ultrasonografia de segon trimestre s'ha d'oferir rutinàriament a totes les dones embarassades i ha de seguir directrius específiques (295–298). L'estudi Eurofetus (185,269), projecte multicèntric en 61 unitats obstètriques de 14 països europeus, examina la sensibilitat de l'ecografia de rutina del segon trimestre en poblacions no seleccionades, per al diagnòstic de les malformacions fetals, que va resultar ser d'un 56,2%. Un 55% de les malformacions majors eren detectades abans de la setmana 24 de gestació i per aquestes la sensibilitat augmentava fins al 77%. L'estudi Eurofetus demostra que les anomalies del SNC i del tracte urinari presenten millors taxes de diagnòstic que les cardiopaties congènites (CC) o anomalies de grans vasos. La sensibilitat diagnòstica de l'exploració ecogràfica varia en funció de l'òrgan examinat.

Els defectes congènits del tracte urinari presenten elevades taxes de detecció prenatal (84% Eurofetus), malgrat això les anomalies genètiques responsables continuen sent desconegudes. Variacions del nombre de còpies (CNVs) s'han detectat en un 10,1% dels pacients, el 3,9% eren de patogenicitat coneguda i el 6,2% de significació desconeguda. El pocs estudis presents a la literatura manifesten que els pacients diagnosticats amb ronyó displàsic multiquístic i aquells afectes de valves uretrals posteriors són els que presentaven una major incidència de CNVs (299). La displàsia multiquística renal malgrat no ser una entitat massa prevalent (1/4300 naixements) presenta associació amb CNVs en un 13% dels casos (300). Les mutacions genètiques responsables de la majoria dels casos de continuen sent desconegudes. La duplicació 22q11.1, la microdeleció 4q35.2, la duplicació 22q13.33 i la duplicació de 1p33 s'han associat amb la displàsia multiquística fetal. Mutacions dels gens *PEX26*, *ELN*, *HNF1B*, *ALG12*, *FRG1*, *FRG2* i *CYP4A11* semblen estar implicades en l'etiopatogènia d'aquesta patologia (301).

Alguna cosa similar succeeix amb altres defectes fetals on manca informació a la literatura envers la utilitat del microarray. L'hèrnia diafragmàtica congènita (HDC) és fenotípica i genèticament un trastorn heterogeni. Es dona en aproximadament un de 5000 naixements (0,2 per 1000)(302). Es pot produir com una anomalia aïllada, associada a múltiples defectes o com a part d'una síndrome definida. S'han detectat desequilibris genòmics associats en pacients amb HDC aïllats en un 4% dels casos. Encara que l'etiologia exacta de la majoria dels casos de HDC es desconeguda, hi ha una evidència creixent de que els factors genètics tenen un paper important en el desenvolupament de la HDC. Diferents anomalies cromosòmiques estan associades a l'hèrnia diafragmàtica congènita, prop del 10% dels casos detectats de forma prenatal. S'identifiquen sovint amb aneuploïdies (303). Amb l'aparició de noves tècniques moleculars, un nombre creixent de anomalies cromosòmiques submicroscòpiques estructurals han estat descrites en associació amb aquesta malformació. Les principals regions crítiques relacionades són: 15q26.2, 15q24, 15q22, 1q41-q42, 8p23.1 i 4p16.3 (304,305), que contenen gens candidats (*NR2F2* i *CHD2*), que contribueixen a una via

alterada de senyalització de l'àcid retinòic implicada en el desenvolupament del pulmó i el diafragma (304,306,307).

Cada cop més veiem com es relacionen gens amb malalties, síndromes genètiques i malformacions fetals. Malgrat tot encara manquen treballs que relacionin CNVs amb anomalies fetals específiques, degut a que la prevalença de cadascuna d'aquestes malformacions és baixa i trobar associacions resulta difícil.



#### 1.7.4 MICORARRAY EN FETUS AMB INCREMENT DE LA TRANSLUCÈNCIA NUCAL

Durant l'embaràs, les indicacions per l'anàlisi prenatal invasiu cromosòmic generalment s'estableixen tenint en compte el risc a priori d'alteracions cromosòmiques detectables en el fetus i el risc d'avortament involuntari associat amb el mostreig fetal. Les proves de detecció, basades en l'edat materna (308–310), paràmetres bioquímics sèrics materns (311,312), i paràmetres ecogràfics fetals (313,314), són les utilitzades fins avui dia per proporcionar una avaluació del risc de trisomies (especialment 21, 18 i 13). Actualment, diferents estratègies de cribratge i mètodes de diagnòstic s'apliquen en diferents països (245,315).

La translucència nucal (TN) és un paràmetre important a tenir en compte dins d'aquestes estratègies de cribratge. Es defineix com un patró ultrasonogràfic de l'acumulació de fluid subcutani darrere del coll fetal (316). L'augment del gruix de translucència nucal fetal (TN) entre les 11-14 setmanes de gestació és una expressió fenotípica comuna d'anomalies cromosòmiques, inclosa la trisomia 21 (317,318). En el fetus el gruix de la TN augmenta amb la longitud crani-caudal (CRL). En un estudi (319) en 96.127 embarassos, la mitjana i el percentil 95 per un CRL de 45 mm va ser d'1,2 i 2,1 mm, respectivament. El percentil 99 no va canviar significativament amb el CRL i era d'uns 3,5 mm. L'augment de la TN es refereix a una mesura per sobre del p95, i el terme s'utilitza independentment de si està o no septada, en fetus de menys de 14 setmanes. La possibilitat de lliurar un nadó sense trisomies és del 97% quan la TN està per sota del percentil 95 i del 93% per TN entre els percentils 95 i 99. En els fetus amb TN entre els percentils 95 i 99, aproximadament un 4% del total dels embarassos, s'ha de tenir especial cura a l'hora d'examinar l'anatomia donat que la prevalença d'anomalies importants és d'un 2,5%, en comptes d'un 1,6% en aquells amb TN per sota del percentil 95, especialment s'ha de ser exhaustiu amb l'exploració del cor fetal. TN fetals superiors a 3,5 mm es troben en aproximadament 1% de les gestacions. El risc d'anomalies cromosòmiques en aquests casos és molt elevat i augmenta d'aproximadament un 20% per TN de 4,0 mm, 33% per TN de 5,0 mm, 50% per TN de 6,0mm i 65% per TN de 6,5 mm o més. En conseqüència, la primera línia de maneig d'aquests embarassos hauria de ser oferir l'estudi del cariotip de fetus (320).

El terme "higroma quístic" en el primer període d'embaràs es refereix a la visualització simultània de septes i augment de la TN. No obstant això, no hi ha un consens general a la literatura sobre com definir amb precisió l'higroma quístic ni tampoc si l'higroma és factor independent de la TN. Malone (321) defineix l'higroma quístic com un augment de l'espai hipoecoic a la part posterior del coll fetal, que s'estén al llarg de la part posterior del fetus, i on els septes són clarament visibles; en canvi, Kharrat (322) van proposar que el terme "higroma quístic" s'utilitzés per descriure els sacs limfàtics jugulars bilaterals del coll fetal sense necessàriament ser visibles els septes de separació interna, informant que la prevalença d'higroma quístic era del 0,62% en exàmens ecogràfics consecutius de primer trimestre amb l'ús de sonografia transabdominal i transvaginal. L'estudi FASTER (323) realitzat a 15 centres dels Estats Units, dissenyat per determinar la visualització dels septes en aquells fetus amb TN incrementada a l'ecografia del primer trimestre de l'embaràs, conclou que la visualització dels septes en els fetus amb TN incrementada per sobre del percentil 95 per a la longitud crani-caudal corresponent, quan es va examinar en el pla transversal suboccipital, depenia d'obtenir el correcte pla transversal del cap i d'utilitzar ecògrafs d'alta resolució. No obstant això, aquests autors no especifiquen si tots els fetus van ser examinats amb les mateixes condicions. A més, els autors no van indicar si la visualització era igualment establerta per via transabdominal o transvaginal, i com influeix la prevalença de l'obesitat materna en

l'observació d'aquests paràmetres. En publicacions posteriors, diferents autors arriben a conclusions similars, els septes van ser observats en tots els fetus amb augment de la TN si l'ecografia es realitzava segons recomanacions específiques (pla ecogràfic correcte) i s'utilitzaven ecògrafs d'alta resolució (324).

A l'estudi FASTER (323), els fetus informats inicialment com a higroma quístic van ser analitzats separatament d'aquells amb TN augmentada i van obtenir resultats significativament pitjors per als casos d'higroma en comparació amb els fetus que només presentaven incrementada la TN. Altres autors arriben a conclusions similars, un estudi retrospectiu de cohorts en 944 fetus amb higroma quístic del primer trimestre, informa que el gruix de la TN augmentava en els fetus amb higroma quístic així com les probabilitats d'un cariotip anormal o d'una anomalia congènita (325). Recentment, Mack (326), sobre el paper dels septes nucals al primer trimestre, determina que el fet que hi siguin presents augmenta el risc de cromosomopaties, independentment de l'augment de la TN.

La tècnica de mesura de la TN necessita una formació adequada (327) i permet l'aplicació d'un cribratge eficaç per a les anomalies cromosòmiques al primer trimestre. La mida del gruix de les TN, mitjançant l'examen ecogràfic entre les 11-14 setmanes de gestació, és una eina de detecció efectiva per a la trisomia 21 i pot arribar a identificar un 75% dels embarassos trisòmics. Amb l'associació d'alguns marcadors bioquímics com la gonadotropina coriònica (beta-hCG), la proteïna plasmàtica A (PAPP-A), l'alfa-fetoproteïna i el factor de creixement placentari, és possible identificar més del 95% de gestacions amb fetus trisòmics amb una taxa de falsos positius de l'1-2% (328).

Més recentment, s'han introduït a l'exploració ecogràfica del primer trimestre el flux sanguini de ductus venós (DV) i la regurgitació tricuspídica com a paràmetres marcadors d'aneuploïdies i defectes cardíacs (329-332). Les taxes de detecció de la trisomia 21 en el primer trimestre de la gestació són substancialment majors si es valoren aquests tres marcadors en comptes d'un sol amb taxes de detecció d'aproximadament 80%, 87% i 94%, respectivament, per una taxa de falsos positius del 3% (333). La combinació d'aquests marcadors (especialment TN amb DV revers o absència d'ona A) són forts indicadors d'aneuploïdia. L'efectivitat dels estudis Doppler de DV en una població general sense selecció prèvia per TN s'ha avaluat recentment en diferents estudis, que estableixen resultats no del tot concloents pel que fa al valor predictiu del flux sanguini de DV en els fetus amb TN normal. Mentre que autors com Oh i Martínez afirmen que el DV patològic és un factor de mal pronòstic per la gestació independentment de la TN, especialment en els casos de CC i mort perinatal (334,335). Altres autors manifesten que el DV patològic com a marcador aïllat és una eina de cribratge insuficient per l'aneuploïdia i la CC (336) i apunten que en fetus amb dotació cromosòmica normal, la suma d'un DV patològic a l'augment de TN no millora les prestacions de la TN en si mateixa pel que fa a la detecció de defectes cardíacs majors en el primer trimestre (329,337,338). Malgrat això, Martínez (335) conclou que l'avaluació del flux sanguini de DV augmenta en un 11% la detecció de CC respecte a l'ús de TN aïllada i que ha de ser indicació per a practicar una ecocardiografia fetal precoç. D'aquí neix la recomanació d'incorporar un nou algoritme per estimar el risc de defectes cardíacs, que inclogui l'avaluació de TN i DV en el primer trimestre.



Ghi (339) descriu una prevalença de defectes cardíacs majors en fetus amb un gruix de translucència nucal en el rang de 2,5-3,4 mm del 2,5% i en aquells amb un gruix de translucència nucal  $\geq 3,5$  mm del 7%. Makrydimas (331) troba fins a un 31% de detecció de defectes cardíacs per una TN en el percentil 99 o superior i Galindo (340) informa d'un 24% de CC quan el gruix de la TN  $> 6$  mm. Com veiem, a major TN major risc tant d'aneuploïdia com de CC. No obstant això, fins i tot en absència d'aneuploïdia i CC, l'engruïment de la TN és clínicament rellevant perquè s'associa amb un augment de resultat perinatal advers, malformacions fetals, síndromes genètiques i un major risc d'avortament involuntari i mort fetal intrauterina (341)(342).

El risc de síndromes genètiques i d'alteracions del neurodesenvolupament en els fetus amb TN incrementada a les 11-14 setmanes i cariotip normal no està ben establert encara. La prevalença de trastorns genètics quan és TN  $> 3,5$  mm o  $>$  percentil 99 pot ser tan baixa com del 0,5% o tan alta com del 6,6% (343). S'han descrit més de 50 condicions genètiques associades amb una TN augmentada, encara que algunes, com l'atròfia muscular espinal, no han estat confirmats en altres estudis. Entre els trastorns més freqüentment coneguts destaquen la síndrome de microdeleció 22q11, la síndrome de Noonan, la síndrome de Zellweger, la síndrome de Smith-Lemli-Opitz, la seqüència de deformació d'acinèsia fetal (o síndrome de Pena-Shokeir tipus I), la síndrome de Fanconi, la displàsia septo-òptica i l'associació de VACTERL, entre altres (344–346). La incidència total d'un resultat desfavorable en el grup de fetus cromosòmicament normal amb translucència nucal augmentada pot arribar a ser de fins al 32%. Per contra, en el grup de fetus amb una translucència nucal normal, la incidència d'un resultat desfavorable és del 7,5% (347). Tanmateix, si es descarten aneuploïdies i CC, i si l'ecografia específica de les 20-22 setmanes no revela cap anomalia, els riscos d'un resultat perinatal advers o de presentar trastorns del neurodesenvolupament postnatalment no augmenten estadísticament respecte a la població general, risc de discapacitat intel·lectual o autisme inferior a l'1% (320,348–352).

Les associacions entre l'augment de la translucència nucal, les malformacions congènites, les anomalies cromosòmiques i les síndromes genètiques s'han demostrat en nombrosos estudis (319,353). D'aquí la importància d'analitzar l'impacte del microarray en els fetus amb TN augmentada. Diferents autors conclouen que l'estudi amb microarray proporciona informació addicional clínicament valuosa sobre el cariotip convencional en un 2,5-12,8% d'aquests fetus, un cop descartada les trisomies, amb una càrrega mínima del 0,8-3% de VOUS (354–357). El microarray s'hauria de realitzar en els casos amb TN augmentat després que les aneuploïdies més freqüents s'hagin descartat per QF-PCR.

Afegir que en bessons monocorials, la discordança en la mesura del TN representa un signe precoç de la síndrome de transfusió feto-fetal (STFF) (358–360).

Hi ha heterogeneïtat de les condicions associades a l'augment de la TN, el que suggereix que pot no existir un únic mecanisme subjacent per a aquesta condició. Els mecanismes inclouen disfunció cardíaca associada amb anomalies del cor i grans artèries, alteració de la composició de la matriu extracel·lular, fracàs del drenatge limfàtic causat per anomalies en el desenvolupament del sistema limfàtic, anèmia fetal o hipoproteïnèmia i infecció congènita. L'evidència recolza l'associació d'una major TN en el primer trimestre de l'embaràs amb anomalies cromosòmiques, síndromes genètiques, defectes congènits i anomalies estructurals fetals, a més de resultats perinatals adversos. No s'ha trobat relació entre la mida de la TN en el primer trimestre i les

complicacions maternes que es podrien produir durant l'embaràs, com la diabetis materna o la malaltia hipertensiva de l'embaràs (361).

L'augment de la TN sol resoldre's, però en alguns casos pot persistir en el temps, fet que indubtablement empitjora el seu pronòstic. L'absència de qualsevol anomalia cromosòmica i ecogràfica si es produeix la normalització de la TN, ens permet assegurar que les probabilitats de tenir un nadó sense anomalies importants són més del 95%. Els pares poden ser aconsellats que el risc de tenir un nadó amb una anomalia greu o alteració del desenvolupament neurològic no ha de ser superior al de la població general en aquests casos. No obstant això, la persistència de l'augment inexplicable de TN a partir de les 14-16 setmanes, o l'evolució a hidrops fetal, planteja la possibilitat d'una infecció congènita o una síndrome genètica amb major risc de mort perinatal i de presentar trastorns en el neurodesenvolupament. En molts casos, els estudis prenatals, incloent-hi el cariotip convencional o molecular del fetus, l'estudi ecogràfic de la morfologia fetal, l'ecocardiografia fetal, així com altres proves genètiques, permeten completar el diagnòstic, distingint entre els embarassos amb un resultat perinatal advers d'aquells que conduiran al naixement d'un nounat sense defectes.

### 1.7.5 IMPORTÀNCIA DELS MARCADORS DE SEGON TRIMESTRE. PAPER DEL PLEC NUCAL DESPRÉS DE LA IMPLEMENTACIÓ DE LA TN A L'ECOGRAFIA DEL PRIMER TRIMESTRE

Abans de l'aparició del cribratge de primer trimestre, el cribratge de segon trimestre per a la síndrome de Down amb marcadors sèrics materns va ser l'estàndard de l'atenció clínica. Actualment s'ofereix a la població de dones gestants el cribratge combinat (bioquímic i ecogràfic) de primer trimestre per a trisomies 21, 18 i 13 presenta una taxa de detecció de trisomia 21 del 90% per a una taxa de falsos positius del 4% (362,363). Amb la intencionalitat d'augmentar el rendiment d'aquest cribratge s'han suggerit diferents protocols que combinen les dades del cribratge de primer trimestre amb dades de segon trimestre, i marcadors ecogràfics (PN, intestí hiperecogènec, fèmur curt, focus ecogènec intracardíac i èctasi pièlica renal), segons ràtios de versemblança, per a posteriorment ajustar el risc previ assignat (364).

S'han descrit diferents tipus de protocols de cribratge (365): (1) *selecció integrada* (sense divulgació) en què els resultats de cribratge del primer trimestre de la pacient no s'informen fins que els resultats de cribratge del segon trimestre estan disponibles, i els riscos es calculen en funció dels marcadors del primer i el segon trimestre; (2) *cribratge seqüencial independent*, en el qual es proporcionen riscos tant del primer trimestre com del segon trimestre a la pacient i els riscos en el primer i segon trimestre es calculen de forma independent; (3) *seqüencial progressiu*, en el qual es proporcionen riscos del primer trimestre a la pacient, a totes les pacients amb resultat negatiu s'ofereix un cribratge del segon trimestre i els riscos del segon trimestre es basen tant en els marcadors del primer trimestre com del segon trimestre; (4) *cribratge contingent*, en el qual els riscos es calculen de la mateixa manera que el cribratge seqüencial pas a pas, però en el cribratge del primer trimestre, els pacients es classifiquen en tres subgrups, un grup amb resultat positiu, un grup amb resultat negatiu i un grup límit, aplicant el factor de correcció segons marcadors de segon trimestre als subgrups de baix risc o de risc intermedi poden veure modificat el seu risc inicial. El cribratge integrat sense revelació dels resultats del primer trimestre generalment es considera poc ètic, mentre que el cribratge seqüencial independent presenta taxes de falsos positius inacceptablement elevades. Per tant, els protocols seqüencials progressius i contingents s'han proposat com els més idonis. Aquestes eines de cribratge es basen en enfocaments estadístics i es poden modificar o ajustar fàcilment segons marcadors ecogràfics. Krantz (366) demostra amb el seu estudi que el sonograma genètic de segon trimestre és una alternativa viable i vàlida al cribratge sèric del segon trimestre dins dels protocols seqüencials o contingents avançats. Aquest autor estableix que en protocols seqüencials progressius, el sonograma genètic presenta taxes de detecció del 94,6% per a una taxa de falsos positius del 5,4% enfront del 6,2% per a la detecció de paràmetres sèrics materns de segon trimestre, mentre que les taxes de detecció són similars (94,6% vs. 94,8%). De manera semblant, en protocols contingents, el sonograma genètic presenta una taxa de falsos positius baixa, del 4,9% enfront del 5,3% per a marcadors sèrics, amb les taxes de detecció similars: 93,3% per al sonograma genètic vs. 93,7% per a marcadors sèrics materns de segon trimestre.

S'han definit una àmplia varietat de troballes ecogràfiques en fetus amb una síndrome de Down, de forma més prevalent que a la població general, que inclouen malformacions i anomalies anomenades "marcadors ecogràfics". Les troballes ecogràfiques acceptades com a marcadors potencials de trisomia 21 durant el segon trimestre inclouen: plec nucal, intestí hiperrefringent, ventriculomegàlia, artèria subclàvia dreta aberrant, os nasal hipoplàsic, focus hiperecogènec intracardíac, fèmur o húmer curt i èctasi pièlica renal. Aquests marcadors no són específics, també estan presents en fetus

sense anomalies cromosòmiques, però així i tot és més freqüent trobar-les a la població de fetus amb trisomia 21.

Benacerraf (367), l'any 1992, estudia més de 5000 fetus entre les 14-20 setmanes i diagnòstica quaranta-tres casos de trisomies autosòmiques per cariotip convencional (32 amb trisomia 21, nou amb trisomia 18 i dos amb trisomia 13). Aquest autor avalua i compara les característiques ecogràfiques d'aquests 43 fetus trisòmics enfront de la resta de fetus normals: les longituds de fèmur i húmer, plecs nucals, dimensions de pelvis renals i defectes estructurals importants en els fetus normals i trisòmics. Sobre la base d'aquests resultats, desenvolupa una puntuació ecogràfica ponderada per tal d'optimitzar la detecció de fetus amb risc d'aneuploidia: PN= 2, defecte estructural major = 2, i fèmur curt, húmer curt i èctasi pièlica renal = 1 cadascuna. La selecció de fetus amb una puntuació de  $> 0 = 2$  identificaria el 81% de fetus amb la síndrome de Down i el 100% de fetus amb trisomies 18 i 13, però també un 4,4% dels fetus normals. D'aquí el concepte de marcador ecogràfic, encara vigent.

Agathokleous (368) realitza una metanàlisi sobre el rendiment de cribratge dels marcadors ecogràfics de segon trimestre per a la trisomia fetal 21 i calcula les estimacions independents ponderades de la taxa de detecció, la taxa de falsos positius i les ràtios de probabilitat positiva i negativa (LR) dels marcadors. Les estimacions conjuntes resultants de LR positives i negatives van ser, respectivament: 5,83 i 0,80 per al focus hiperecogènic intracardíac; 27,52 i 0,94 per a la ventriculomegàlia; 23,30 i 0,80 per a l'augment del PN; 11,44 i 0,90 per a l'intestí hiperecogènic; 7,63 i 0,92 per a l'èctasi pièlica renal; 3,72 i 0,80 per al fèmur curt; 4,81 i 0,74 per a l'húmer curt; 21,48 i 0,71 per a l'artèria subclàvia dreta aberrant (ARSA); i 23,27 i 0,46 per a l'os nasal absent o hipoplàsic. Les malformacions majors s'observen en aproximadament el 25% dels fetus afectats, i els marcadors ecogràfics de segon trimestre en més del 50%. En el cas de la majoria dels marcadors aïllats només hi ha un petit efecte en la modificació del risc previ, però la ventriculomegàlia, el PN augmentat i l'ARSA comporten un augment del risc de 3-4 vegades, i l'os nasal hipoplàsic augmenta el risc fins a 6-7 vegades.

La fisiopatologia de l'increment del PN no és del tot coneguda, però sabem que hi ha una correlació entre les mesures de TN i PN (369). El gruix del PN, igual que la TN del primer trimestre, correspon a una expressió fenotípica comuna dels desequilibris genètics, com ara aneuploides (trisomia 21, 18 i 13, triploidia i monosomia X). El PN de segon trimestre ja s'associa amb la síndrome de Down des de l'any 1985 (370). Aquesta troballa la confirma posteriorment autors com Ginsberg (371) i Crane (372). La mesura del gruix del PN en el segon trimestre es considera un dels marcadors ecogràfics més sensibles i específics per a la identificació de casos sospitosos de trisomia 21 (372-374). L'associació entre el PN i les CNVs patogenètiques està menys reportada. Lushan Li (375) estudia 72 fetus amb PN patològic amb cariotip i array-CGH, els seus resultats mostren que la trisomia 21 es troba en el 2,8%, la síndrome de Turner en el 2,8%, la trisomia 13 en l'1,4% i CNVs patogenètiques en el 6,9%.

Independentment de l'aneuploidia o de les alteracions estructurals cromosòmiques, el PN també s'associa a diverses anomalies estructurals. Hi ha descrites associacions amb malformacions estructurals fetals. A mesura que augmenta el PN, la taxa de malformacions fetals també augmenta, fins al 29,5% dels fetus amb mides de PN entre 5-7,9 mm presenten malformacions estructurals, arribant al 76,4% quan la mida del PN  $\geq 10$  mm, (375). Amb un PN  $p > 99$  (6 mm) hem de valorar també altres riscos addicionals com el risc d'evolució a hidrops, el risc de mort fetal intraúter, el risc d'associació a síndromes genètiques (que arriba a ser de fins a un 10%), el risc de defectes congènits, d'un 10-15%, sobretot de cardiopatia congènita, hèrnia diafragmàtica, omfalocèle,

fissura palatina, displàsia esquelètica, síndrome de Smith-Lemli-Opitz i síndrome de Noonan. La síndrome de Noonan es presenta en el 5% dels PN patològics persistents. Si apareix algun altre signe ecogràfic addicional suggestiu afegit al PN patològic que augmenti la sospita diagnòstica haurem de valorar la realització d'un estudi específic per aquesta entitat (estenosi pulmonar, miocardiopatia hipertròfica, fèmur curt, anomalies facials, pectum excavatum, vessament pleural, hidrops, polihidramnis) (376). També risc de trastorns en el neurodesenvolupament, d'un 3-5% (320).

En definitiva, subratllar la importància d'un PN p > 99 al segon trimestre, especialment en un fetus amb estudi anatòmic i cromosòmic normal, atès que hauria d'impulsar un assessorament genètic específic.

### 1.7.6 L'ARRAY I EL CREIXEMENT INTRAUTERÍ RESTRINGIT

En primer lloc, i abans de diagnosticar un fetus de restricció del creixement intrauterí (RCIU) o creixement intrauterí restringit (CIR), hem de determinar l'edat de la gestació a partir d'una correcta datació de l'embaràs. El diagnòstic dels trastorns del creixement per defecte d'un fetus s'estableix a partir de discrepàncies entre les mesures biomètriques ecogràfiques reals i esperades per l'edat gestacional. Tradicionalment, s'ha definit com a pes fetal < percentil 10 per a l'edat gestacional i això inclou el diagnòstic de fetus petits per a l'edat gestacional (PEG) i fetus amb creixement intrauterí restringit (CIR). Els paràmetres de velocimetria Doppler ens permeten diferenciar el fetus petit constitucionalment del fetus que presenta un desenvolupament restringit. Una evolució normal del creixement, la velocimetria Doppler normal de l'artèria umbilical i el volum normal de líquid amniòtic suggereixen que un fetus és constitucionalment petit i que l'impacte de la insuficiència uteroplacentària serà lleu i el diferenciarà d'aquell altre fetus amb major risc de resultats adversos. Es considera un fetus PEG el que té un pes fetal estimat (PFE) inferior al percentil 10 i major al percentil 3 per l'edat gestacional amb l'estudi Doppler dins de la normalitat. Per altra banda, el fetus amb creixement intrauterí restringit presenta un PFE < al percentil 3 o un PFE inferior al percentil 10 amb alteració del Doppler.

El diagnòstic del CIR és ecogràfic. L'estimació ecogràfica del pes fetal requereix: la correcta assignació d'un fetus a la seva edat gestacional, l'estimació del pes a partir de les biometries fetals, i el càlcul del percentil de pes per a l'edat gestacional. Calculem el PFE segons algoritme que inclou diàmetre biparietal (DBP), perímetre cefàlic (CC), perímetre abdominal (CA) i longitud del fèmur (LF) (377). El PFE s'ajusta segons el sexe del fetus i el nombre de fetus (378,379). L'estudi Doppler normal diferencia el fetus constitucionalment petit, que no està en major risc de resultats adversos, d'aquell altre fetus petit amb el potencial de creixement restringit que si té un major risc de morbiditat perinatal i mortalitat (380).

Distingir el fetus constitucionalment petit del fetus amb restricció patològica del creixement pot ajudar a evitar intervencions innecessàries (381–384). L'ús d'aquest llinar per definir el fetus amb PEG/CIR està recolzat per les troballes d'un gran assaig observacional prospectiu (385) que va incloure més de 1100 embarassos amb fetus amb pes fetal inferior al percentil 10. Només el 2% dels fetus en els percentils entre 3-10 van experimentar un resultat perinatal advers, mentre que el 6,2% dels fetus amb pes estimat en el percentil < 3 van tenir un resultat advers i totes les morts enregistrades van ser en aquest darrer grup. La combinació de pes fetal estimat inferior al percentil 10 i Doppler umbilical anormal va ser un fort predictor de resultats adversos: el 16,7% d'aquests fetus van desenvolupar hemorràgia intraventricular, leucomalàcia periventricular, encefalopatia isquèmica hipòxica, displàsia broncopulmonar, sèpsia o mort. El Doppler anormal en aquest estudi va incloure tant l'índex de pulsatilitat patològic (> 95 percentil) com el flux diastòlic absent o revers.

La restricció fetal del creixement és un factor determinant del resultat perinatal advers (386–388). Els procediments de detecció dels defectes del creixement fetal han de diferenciar els fetus petits, i que després són sans, dels que són patològicament petits. L'estudi POP (389) demostra a partir de l'estudi prospectiu de dues cohorts de dones nul·líparas amb un embaràs viable de fetus únic, una cohort de dones de baix risc on l'ecografia del tercer trimestre es realitza de rutina i una segona cohort on l'ecografia de tercer trimestre es realitza quan hi ha indicació mèdica, que l'ecografia universal presenta una taxa de detecció superior per al diagnòstic de fetus petit. L'anàlisi combinada de la biometria fetal i la velocitat del creixement fetal va identificar un



subconjunt de fetus amb un major risc de morbiditat neonatal. La sensibilitat per a la detecció de fetus PEG/CIR va ser del 20% per a la cohort d'ecografia selectiva i del 57% per a la cohort d'ecografia universal. Un 14,1% dels fetus van ser identificats amb un pes fetal estimat inferior al 10è percentil. En embarassos de baix risc, ecografia rutinària durant el tercer trimestre es va associar a una taxa de detecció de fetus petits per l'edat gestacional superior però no necessàriament amb una reducció en la incidència d'efectes perinatals adversos greus.

L'ecografia universal presenta una major sensibilitat diagnòstica per a la detecció del PEG/CIR però són molts els autors que posen en dubte l'impacte d'aquest diagnòstic en població de baix risc (390). Ewigman (391) realitza un assaig aleatoritzat amb 15.151 dones embarassades amb gestacions de baix risc per determinar si el cribratge d'ultrasons permet disminuir la freqüència de resultats perinatals adversos. Les dones assignades aleatòriament al grup de detecció d'ultrasons van realitzar un examen ecogràfic a les 15 a 22 setmanes de gestació i un altre de les 31 a 35 setmanes. Les dones del grup de control es van sotmetre a ecografia només per indicació mèdica. El resultat perinatal advers es va definir com la mort fetal, la mort neonatal o la morbiditat neonatal com l'hemorràgia intraventricular. La mitjana d'ecografies per dona en els grups de control i grup de detecció d'ultrasons van ser de 2,2 i 0,6, respectivament. La taxa de resultat advers perinatal va ser del 5,0% en el grup de detecció d'ultrasons i del 4,9% en el grup de control. Les taxes de part prematur i la distribució de pesos al naixement van ser gairebé idèntiques en els dos grups. No es van observar diferències significatives entre ambdós grups en els resultats perinatals en aquest treball. Existeix controvèrsia sobre si els ecografistes diagnostiquen prou bé el fetus PEG/RICU, amb la dificultat addicional de saber realment quantes ecografies s'han de realitzar, en quines setmanes i en quins grups de gestants, per tal d'optimitzar en termes de cost-benefici les exploracions ecogràfiques durant l'embaràs.

S'estima que els defectes en el creixement dels fetus afecten aproximadament entre un 5 i un 15% dels embarassos i són la segona causa de mortalitat perinatal (389,392). El potencial de creixement predeterminat genèticament d'un fetus es pot veure modificat com a conseqüència d'alteracions maternes, placentàries i fetals (393). Els factors maternos inclouen la malaltia hipertensiva, els trastorns autoimmunitaris, certs medicaments, la desnutrició severa i l'estil de vida matern, incloent-hi el consum de tòxics com tabac, alcohol i cocaïna. Entre les etiologies fetals destaquen les malformacions, les síndromes genètiques i les infeccions virals o protozoàries perinatals, totes elles també poden modificar el creixement fetal. Els factors placentaris poden estar implicats en moltes afeccions com anomalies anatòmiques, vasculares, cromosòmiques i morfològiques. S'ha proposat una contribució genètica a aquests factors d'aproximadament un 20%. Moltes d'aquestes condicions que tenen una etiologia genètica (cromosòmica, trastorns gènics o mutacions epigenètiques) poden formar part d'una síndrome i associar-se a alteracions en diferents òrgans.

No obstant això, l'estudi de la història natural del CIR presenta particularitats que han fet difícil la seva sistematització. En primer lloc, els defectes del creixement fetal no sempre es detecten prenatalment, i en la pràctica clínica, nadons en risc de patir problemes en el creixement poden no ser detectats com a tal abans del part. En l'embaràs de baix risc, amb un lliandar inferior de sospita, la taxa de detecció és encara més baixa. En segon lloc, quan es reconeix el fetus amb CIR, l'embaràs és probable que s'interrompi si la insuficiència del creixement es considera severa o si el fetus és prou madur per tenir una millor probabilitat de supervivència en l'ambient extrauterí. Per tant, la majoria d'evidències qualitatives i quantitatives per a la importància del diagnòstic del CIR i les seves implicacions pronòstiques provenen de l'avaluació retrospectiva de

nadons vius. En tercer lloc, els estudis s'han vist obstaculitzats per la pràctica generalitzada de la utilització dels termes petits per a l'edat gestacional i creixement intrauterí restringit de manera sinònima. Això ens dificulta el fet d'establir, d'una banda, l'abast real del problema i d'altra, determinar quants d'aquests fetus presenten un creixement intrauterí restringit en setmanes precoces (28-32 setmanes) i com això afecta el pronòstic definitiu d'aquests fetus.

Diversos factors s'han associat amb un major risc de CIR i CIR precoç. S'ha proposat una important contribució a aquest diagnòstic de factors genètics. L'estudi de microarray proporciona una cobertura genòmica d'alta resolució i s'ha aplicat quan hi ha indicació de diagnòstic prenatal invasiu. La incidència de microduplicacions-microdeleccions i trastorns d'un gen en fetus amb CIR i CIR precoç amb cariotip normal no està ben establerta. S'ha informat anomalies cromosòmiques fins a un 9,3-19% de fetus amb CIR aïllat i fins a 4-21% en fetus amb CIR associat a anomalies estructurals. Pel que sembla, l'anàlisi de microarray cromosòmic va aconseguir un increment del rendiment diagnòstic addicional del 4% sobre el cariotip convencional en fetus amb CIR aïllat, i un increment del rendiment diagnòstic addicional del 10% en fetus amb CIR quan es van associar altres malformacions fetals (394). Les triploïdies i la trisomia 18 són les anomalies més comunes en els fetus abans i després de les 28 setmanes de gestació, respectivament.

Pel que fa als resultats perinatals, és difícil trobar una població d'estudi similar a la nostra, donada la gran diversitat d'estudis i la poca homogeneïtat entre ells. Un estudi aleatoritzat multicèntric prospectiu de la gestió de restricció del creixement fetal (Trial of Array Umbilical and Fetal Flow in Europe, TRUFFLE) (395) realitzat en 20 centres perinatals europeus entre 2005 i 2010, que incloïa dones amb un fetus a les 26-32 setmanes de gestació, amb circumferència abdominal < 10 percentil i artèria umbilical amb Índex de pulsilitat Doppler > 95 percentil, demostra que el 2,4% dels fetus amb aquesta patologia poden morir intraúter, dada inferior a la publicada pel grup de Story (396). Segons la literatura, el CIR precoç és un factor de risc important per a la mortalitat fetal, la mort neonatal, el part prematur, l'encefalopatia isquèmica, la paràlisi cerebral, les necessitats educatives especials i altres malalties en la vida adulta (397).

Existeixen poques dades sobre l'assessorament i el maneig perinatal de les dones després d'un diagnòstic prenatal de restricció del creixement fetal, especialment si aquest s'estableix en etapes prematures de la gestació. A més, la poca homogeneïtat dels treballs a la literatura continua sent un problema important.

Quan l'examen d'ecografia suggereix una restricció del creixement fetal, l'atenció prenatal implica confirmar el diagnòstic, determinar la causa i la severitat del problema, assessorar els pares, controlar de prop el creixement fetal i el benestar i determinar el moment òptim de la finalització de l'embaràs. L'estudi cromosòmic és part necessària quan es diagnostica un fetus amb CIR precoç. Tanmateix, la incidència de síndromes de microduplicacions-microdeleccions i trastorns d'un únic gen en el creixement intrauterí restringit precoç (per sota de les 28 setmanes d'embaràs) amb cariotip normal no està ben establerta i d'aquí la importància de treballs com el nostre.



## 1.8 VARIANTS EN NOMBRE DE CÒPIA

El genoma humà es caracteritza per presentar una gran variació genètica entre individus. Fins fa poc, només un grapat de variants havien estat identificades per la seva implicació en malalties, tot i que la majoria de la variació fenotípica hereditària es deu a alteracions en la seqüència d'ADN (398). Altrament, la genètica de les condicions mendelianes causades per mutacions rares que es produeixen de forma esporàdica o hereditària s'han caracteritzat millor.

El genoma humà, genoma de l'*Homo sapiens*, conté 23 parells de cromosomes en el nucli de cada cèl·lula humana diploide. Dels 23 parells, 22 són cromosomes autosòmics i un parell determinant del sexe (dos cromosomes X en dones i un X i un Y en homes). Tenen una mida total aproximada de 3 200 milions de parells de bases d'ADN que contenen uns 20 000–25 000 gens (399). El genoma humà presenta una densitat de gens molt inferior a la que inicialment s'havia predit, amb només un 1,5% de la seva longitud constituïda per exons que codifiquen per proteïnes.

El Projecte Genoma Humà, finalitzat el 2003, va esclarir la seqüència completa del genoma. Aquesta seqüència, juntament amb la disponibilitat de mètodes de genotipatge i seqüenciació d'ADN capaços d'estudiar variacions en un gran nombre d'individus, han donat lloc a una ràpida expansió de la llista de variants genètiques que contribueixen a la susceptibilitat de malalties, progressió de la malaltia, i variabilitat en la resposta al tractament.

La variació genètica en el genoma humà pren moltes formes, des de les grans anomalies cromosòmiques visibles microscòpicament fins a canvis d'un sol nucleòtid. Recentment, diversos estudis han descobert una abundància de variació de la quantitat de còpies submicroscòpiques dels segments d'ADN que van des de kilobases (kb) fins a megabases (Mb) en la grandària (400). S'han trobat deleccions, insercions, duplicacions i variants complexes, denominades col·lectivament variants en nombre de còpies (CNVs) o polimorfismes de còpies, presents en tots els humans. Definim una CNV com un segment d'ADN que té 1 kb o més i es troba present en un nombre de còpies variable en comparació amb un genoma de referència (401). El terme "CNV" no implica significació clínica, per tant, per a classificar una CNV patogènica o benigna és necessària una associació clara amb una clínica determinada (402).

Les CNVs influeixen en l'expressió gènica, la variació fenotípica i l'adaptació mitjançant la interrupció dels gens o alterant la dosi gènica, i poden causar malalties com ara els trastorns de microdelecció-microduplicació, o conferir riscos a trets complexos de malalties com la infecció pel VIH-1, la glomerulonefritis o l'artritis reumatoide, entre altres (403–407). Les CNVs sovint afecten gens vinculats amb malalties específiques, i cada vegada es coneixen més exemples: casos de la síndrome de CHARGE associats a mutacions en el gen *CHD7* localitzat en la regió cromosòmica 8q12.1 (408–410), formes familiars de la malaltia de Parkinson associades amb mutacions causals del gen *PARK2* o casos d'Alzheimer (411–413). També en el càncer (414,415). A més, les CNVs poden influir indirectament en l'expressió gènica mitjançant efectes de posició i predisposar a canvis genètics perjudicials. El mapa de variacions en nombre de còpies en el genoma humà demostra una alta complexitat i suggereix que la contribució de les CNVs a la variació fenotípica no és gens menyspreable així com l'impacte de la variació en nombre de còpies en la variació de l'expressió gènica (416,417).

L'avaluació de les CNVs és imprescindible a l'hora d'estudiar les bases genètiques de la variació fenotípica, inclosa la susceptibilitat de malalties. De la mateixa manera, és important la identificació i el registre d'aquestes CNVs responsables de malalties. Bases de dades com DECIPHER (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>) (418,419) i ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (420–422) són necessàries per enregistrar i compartir informació de nombres de còpies en pacients amb fenotips rars i greus, a més de ser molt útils en l'assessorament d'aquests pacients.

Les CNVs poden sorgir *de novo* o ser heretades (423–425). L'aparellament erroni de regions altament homòlogues pot causar la desalineació i la recombinació desigual durant la meiosi i pot provocar tant duplicacions com delecions del material cromosòmic donant com a resultat a l'aparició de CNVs. Aquest procés es coneix com a recombinació homòloga no al·lèlica, i és el mecanisme més comú per a la formació de reordenaments genòmics. Altres mecanismes inclouen recombinació no homòloga i la replicació-ruptura induïda (426,427). Encara que les regions genòmiques riques en seqüències de repetició de còpies poden donar lloc a CNVs recurrents, normalment ben descrites en la literatura mèdica, moltes CNVs representen una variació rara. En molts casos és necessària la intervenció del genetista clínic per avaluar el contingut genòmic de la CNV, correlacionar-ho amb la literatura clínica establerta i proporcionar una interpretació coherent. Tanmateix, atesa la presència de CNVs benignes dins del genoma i el descobriment continu de noves CNVs, avaluar la importància clínica d'aquestes pot arribar a ser un desafiament.

Recomanacions per l'avaluació d'una CNV:

-Mida de la CNV.

Encara que la relació directament proporcional entre la grandària i la importància de la CNV no sempre és certa, sí que es pot mantenir com a regla general. No obstant això, les CNVs poden ser de naturalesa benigna i grans o de mides molt petites però clínicament significatives. Per tant, es recomana davant de qualsevol mida analitzar el contingut de la CNV (428,429).

-Contingut genòmic de la CNV.

Aquesta és, amb diferència, la consideració més rellevant a l'hora d'interpretar una CNV i té un abast molt ampli. S'ha de considerar si la CNV conté gens o no. La distribució de CNVs al llarg del genoma no sembla ser deguda a l'atzar. Hi ha un enriquiment de CNVs en regions riques en gens, acumulant-se preferiblement en regions telomèriques i centromèriques. El contingut dels gens s'ha d'examinar acuradament per determinar si existeix una associació clínica documentada i rellevant, i verificar si són gens sensibles a dosi.

Quan es considera l'efecte fenotípic potencial cal investigar si els gens implicats s'associen amb els trastorns clínics que presenta el pacient.

La naturalesa de les CNVs associades a malaltia hauria de ser acuradament interrogada per tal garantir la seva rellevància clínica. En el marc dels mecanismes genètics hem de tenir en compte: (1) un gen associat amb un fenotip clínic a causa de l'haploinsuficiència no pot tenir un fenotip associat amb un guany de nombre de còpies. (2) Els trastorns dominants solen derivar de mutacions específiques de guanys de funció en comptes de desequilibris de dosificació. (3) Els guanys de nombre de còpies que impliquen només una part d'un gen poden generar una interrupció de la seqüència de codificació i no s'haurien de desestimar. (4) Els gens associats amb malaltia recessiva només poden suggerir l'estat de la companyia per a la condició. (5) CNVs petites que només inclouen una seqüència intrònica no poden tenir efectes sobre la funció gènica. (6) Tenir precaució quan inferim un paper patogènic a un gen basant-nos únicament en la funció del gen predeterminada o en models *in vitro*. Aquesta inferència és especulativa fins que es caracteritza en la població humana (402).

A com ara, la decisió de reportar una determinada CNV s'ha de fer seguint les recomanacions de les societats científiques.

- Associació amb síndromes gèniques ben establertes.

S'han de reconèixer les regions crítiques i s'han d'estudiar acuradament abans oferir interpretacions clíniques de les CNVs. Cal remarcar la utilitat de les bases de dades (OMIM, DECIPHER, ClinVar) (418,430–433) a l'hora d'establir la patogenicitat d'una CNV. Una CNV que està ben documentada com una variant benigna pel laboratori d'execució, en informes publicats per experts o en bases de dades, probablement necessita poca investigació addicional. Una CNV en la qual el laboratori no té experiència prèvia s'hauria de comparar acuradament amb les bases de dades de variants en nombre de còpies.

S'han d'utilitzar les directrius descrites anteriorment per a la investigació sistemàtica d'una CNV, i s'hauria d'assignar qualsevol CNV que s'hagi d'informar a un pacient a una de les tres categories principals de significació clínica. Es recomana que s'utilitzi una terminologia coherent amb aquestes categories en l'informe clínic per a facilitar la comunicació de forma inequívoca pel que fa a la significació clínica tant al metge com al pacient.

A tall de recapitulació, les CNVs es classifiquen en les següents categories (402):

- Patogènica. La CNV està documentada com a clínicament significativa en diverses publicacions revisades per experts, tot i que es coneix que la penetrància i l'expressivitat d'una CNV pot ser variable. No necessàriament la CNV descrita a la literatura mèdica ha de ser idèntica a l'observada en el pacient, però sí que s'ha de superposar en un interval més o menys ampli amb una significació clínica clarament establerta.

- Significat clínic incert. No hi ha evidència clínica suficient per determinar la seva associació clínica. Aquesta representa una categoria bastant àmplia i inclou CNVs que potser després amb el temps i l'augment de l'evidència científica es demostrin clarament patogèniques o benignes.

S'han creat categories per classificar-les:

- Importància clínica incerta, probablement patogènica: (1) CNVs que es descriuen en un únic cas, però amb punts de ruptura i fenotip ben definits, així com rellevants per a les troballes del pacient. (2) Un gen concret dins de la CNV.
- Importància clínica incerta, probablement benigna: (1) CNVs que no tenen gens a l'interval. (2) CNVs que es reporten en un petit nombre de casos, però no representen un polimorfisme comú.
- Encara dins d'aquest grup hi ha CNVs de significat clínic incert que no pertanyen a cap dels dos grups anteriorment exposats: (1) CNVs que contenen gens, però no se sap si els gens de l'interval són sensibles a dosi. (2) CNVs que es descriuen en publicacions de forma contradictòria, i encara no s'han establert conclusions fermes sobre la seva significació clínica.

- Benigna. CNVs que han estat reportades en múltiples publicacions revisades o bases de dades com una variant benigna, en particular si la naturalesa de la variació del nombre de còpia ha estat ja ben caracteritzada. Per qualificar-se de polimorfisme, la CNV hauria de documentar-se en 1% de la població general. És important considerar acuradament la dosi de la CNV documentada com una variant benigna, donat que les duplicacions d'algunes regions poden ser benignes, mentre que les delecions del mateix interval poden tenir rellevància clínica.

Quan es demostra que una CNV s'origina *de novo*, generalment es pren com a evidència que recolza la patogenicitat, sobretot si es sospita que la CNV té significat clínic, basant-nos en altres línies d'evidència, com el contingut de gens. Quan una CNV es troba en un progenitor o altre membre de la família rellevant, hi ha nombroses advertències que cal tenir en compte. Rarament es pot fer una inferència concloent en funció del patró d'herència observat en una sola família. El progenitor i altres familiars rellevants haurien de tenir una avaluació mèdica completa per la presència o absència de les característiques clíniques presents en el problema. Si el progenitor està afectat, en general, es pot considerar cautelosament com a prova que dona suport a la CNV com a causa de les característiques clíniques. Quan sigui possible es poden avaluar altres membres de la família per determinar si la CNV continua segregant-se en concordança amb el fenotip clínic.

S'ha de tenir compte també:

- Penetrància incompleta: La CNV pot ser patogènica però no penetrant en el progenitor. Així una penetrància del 95%, implica que només un 5% de les persones portadores del genotip associat a la patologia no desenvolupen símptomes de la malaltia. En cap cas el terme penetrància fa referència al grau d'expressió del fenotip, en aquest cas es parla d'expressivitat, sinó tan sols a la presència o absència d'un fenotip determinat.

- Expressivitat variable: El progenitor portador pot tenir alteracions subclíniques que es manifestaran més endavant en l'espectre del trastorn causat per la CNV o fins i tot no arribar a manifestar-se.

- Gens sotmesos a imprompta genòmica: Algunes malalties genètiques apareixen a la descendència solament quan s'hereten a partir d'un determinat progenitor. Aquest fenomen s'anomena imprompta genòmica o "imprinting", en el qual un gen està marcat o silenciada. Aquest marcatge condicionaria que els gens implicats no arribessin a expressar-se i que romanguessin inactius. Aquesta inactivació es produiria a través de la metilació dels residus de citosina en els dinucleòtids de citosina-guanina. Ja que la metilació és fonamental en la regulació del silenciament gènic, i pot provocar alteracions en la transcripció genètica sense necessitat que es produeixi una alteració en la seqüència de l'ADN. L'imprompta es pot definir com la diferència funcional entre cromosomes o regions, derivats del pare i de la mare. De manera que el trastorn només es manifesta quan s'hereta d'un progenitor determinat (434,435).

- Disomia uniparental: La disomia uniparental consisteix en la presència d'una línia diploide que conté dos cromosomes, o part de dos cromosomes, homòlegs procedents d'un mateix progenitor. Si es tracta d'un mateix cromosoma repetit s'anomena isodisomia, i si són dos cromosomes homòlegs d'un únic progenitor es tracta d'una heterodisomia. A conseqüència d'una disomia unilateral poden aparèixer malalties recessives en què solament un dels progenitors és portador del gen recessiu (436).

- La CNV detectada en el cas índex pot no ser idèntica a la detectada en el progenitor. S'han reportat CNVs que poden experimentar una modificació addicional (per exemple, l'expansió d'una deleció) quan es transmeten des del progenitor portador a la descendència (437).

- CNVs lligades al cromosoma X (438).

- Mosaic de la CNV: La CNV pot no estar present en tots els teixits, i per tant, poden no manifestar-se totes les característiques clíniques associades amb la CNV (439).

Piotrowski (440) va estudiar 34 mostres de teixits de tres subjectes i, després d'haver-les analitzat va observar almenys sis CNVs que afectaven un o més òrgans o teixits del mateix subjecte. Les CNVs oscil·laven entre 82 i 176 kb i sovint incloïen gens coneguts que potencialment afectaven la funció gènica. Aquests resultats indiquen que els humans són comunament afectats per mosaïcismes somàtics de les CNVs. Les variacions estructurals descrites en els bessons monozigòtics suggereixen que els mosaïcismes somàtics de les CNVs són relativament comuns en cèl·lules humanes normals (441–444).

La interpretació clínica d'algunes d'aquestes CNVs dista avui dia de ser fàcil.

## 1.9 SÍNDROMES DE MICRODELECCIÓ-MICRODUPLICACIÓ

Els trastorns genòmics són malalties que resulten de la pèrdua o guany de material genètic. Els trastorns genòmics més comuns i millor delineats es divideixen en dues categories principals: resultants de pèrdues de nombre de còpies (síndromes de deleció) i resultants de guanys de nombre de còpies (síndromes de duplicació). Una microdeleció es defineix com una deleció submicroscòpica que dóna lloc a una monosomia d'un segment cromosòmic, de mida variable des de megabases a kilobases. Tanmateix, una microduplicació es defineix com una duplicació submicroscòpica que dóna lloc a una trisomia d'un segment cromosòmic. El fenotip de les síndromes de microduplicació sovint està menys definit que per a la síndrome de microdeleció corresponent. A més, algunes síndromes de microduplicació poden heretar-se de progenitors aparentment normals, i plantegen problemes importants a conseqüència de penetràncies incompletes. La mida i la ubicació exactes d'una microdeleció-microduplicació que causa una síndrome poden variar, però una "regió crítica" específica sol estar implicada de forma constant. La majoria dels efectes fenotípics d'aquests trastorns es deuen a canvis en alguns gens sensibles a dosi o, en alguns casos, a un únic gen si l'anomalia dóna lloc a una disrupció del gen.

La deleció 22q11.2 és una de les microdeleccions més habituals. Com també la síndrome d'Angelman o la síndrome de Prader-Willi. La síndrome d'Angelman es caracteritza per discapacitat intel·lectual, absència del llenguatge, atàxia i hiperactivitat. Sovint els pacients presenten microcefàlia i convulsions. La síndrome de Prader-Willi es caracteritza per una hipotonia aguda i dificultats per a l'alimentació en el període neonatal. Els pacients presenten a la infància una gana incontrolada que condueix a l'obesitat, associant-se sovint algun grau de discapacitat intel·lectual, problemes de comportament i hipogonadisme. A l'etiopatogènia de les dues patologies subsisteixen diversos mecanismes genètics que afecten la regió 15q11-q13, sotmesa a "imprinting" genòmic, de manera que només una de les dues còpies dels gens d'aquesta regió serà funcional segons el seu origen parental (445). En els casos de síndrome d'Angelman hi ha absència de l'aportació materna per a una regió del cromosoma 15 i en els casos de la síndrome de Prader-Willi hi ha absència de l'aportació paterna (446–448). La disomia uniparental pot donar lloc a problemes de salut quan els cromosomes implicats contenen gens sotmesos a impròpita genòmica (449–452).

La prevalença general de les síndromes de microdeleció-microduplicació és baixa, d'1/1000 a la població general (453). Entre les deleccions més freqüents destaca la microdeleció 22q11.2, que afecta 1/2000-1/4000 naixements (454). La llista de noves síndromes que s'estan descobrint per array-CGH està en continu creixement. El nombre de síndromes de microdeleció-microduplicacions, sens dubte augmentarà en el futur a causa de l'aplicació clínica cada cop més àmplia de l'array. L'alta resolució de l'array-CGH ha estat utilitzada amb èxit per identificar els punts d'interrupció dels desequilibris genòmics en síndromes de microdeleció-microduplicació conegudes. Els resultats s'utilitzen per correlacionar els diferents elements del fenotip amb els gens dins de la regió genòmica desequilibrada. Generalment s'espera que l'amplitud de les deleccions en gens contigus es correlacioni amb la gravetat del fenotip. La capacitat de l'array-CGH suggereix que també pot servir com una eina eficaç i de gran abast per localitzar gens responsables de malalties i per descobrir la base molecular de les síndromes genètiques (Taula 2).

Taula 2. Síndromes de microdeleció i microduplicació més comunes.

|                                  | Anomalia       | Gen                        | Prevalença            |
|----------------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------|
| <b>Wolf Hirschhorn</b>           | del 4p16.3     | <i>WHSCR</i>               | 1/50 000              |
| <b>Crit du chat</b>              | del 5p15.2     | <i>TERT</i>                | 1/20 000-1/50 000     |
| <b>Sotos</b>                     | del 5q35.3     | <i>NSD1</i> 10%            | 1/14 000              |
| <b>Williams</b>                  | del 7q11.23    | <i>ELN</i> 90-95%          | 1/7 500-1/20 000      |
| <b>Deleció 8p23</b>              | del 8p23       |                            | rara                  |
| <b>Langer-Giedion</b>            | del 8q24 TRPS1 | <i>EXT1</i> i <i>TRPS1</i> | 1/1 000 000           |
| <b>WAGR</b>                      | del 11p13 PAX6 | <i>WT1</i> i <i>PAX6</i>   | 1/500 000-1/1 000 000 |
| <b>Prader-Willi</b>              | del 15q11.2-13 | <i>SNORD116</i>            | 1/10 000-1/25 000     |
| <b>Angelman</b>                  | del 15q11.2-13 | <i>UBE3A</i>               | 1/12 000-1/20 000     |
| <b>Rubinstein-Taybi</b>          | del 16p13.3    | <i>CREBBP</i>              | 1/100 000-1/125 000   |
| <b>Miller-Dieker</b>             | del 17p13.3    | <i>LIS1</i>                | rara                  |
| <b>Smith-Magenis</b>             | del 17p11.2    | <i>RAI1</i>                | 1/15 000-25 000       |
| <b>DiGeorge/velocardiofacial</b> | del 22q11.2    | <i>TBX1</i>                | 1/6 000               |
| <b>Phelan-McDermid</b>           | del 22q13.3    | <i>PASP2 SHANK3</i>        | rara                  |
| <b>Microduplicació 22q11</b>     | dup 22q11.2    |                            | 1/2 000-1/4 000       |
|                                  |                |                            |                       |



## 1.10 INDICACIONS DE L'ARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL

Les societats mèdiques i científiques han definit les indicacions per a l'ús de l'array en diagnòstic prenatal (455,456):

1. Identificació d'un defecte congènit major prenatal. S'estima que en cas de qualsevol malformació la probabilitat d'una troballa relacionada amb el fenotip és superior en el microarray que en el cariotip.
2. Restricció del creixement intrauterí (CIR) precoç (< 24-28 setmanes) i sever (< percentil 3).
3. Translucència nucal augmentada (> 3,5 mm o  $\geq$  percentil 99).
4. Mort fetal intrauterina i avortament de segon trimestre.
5. Presència d'una deleció o duplicació familiar críptica (no detectable pel cariotip), amb risc de transmissió i penetrància significatives, així com de prou rellevància clínica.
6. Antecedent familiar de reordenament cromosòmic (translocació parental recíproca o inversió pericèntrica) en equilibri, per a detectar segregacions desequilibrades potencialment no visibles pel cariotip.
7. Troballa d'una translocació o inversió *de novo* aparentment equilibrada o d'un cromosoma marcador (especialment del tipus anell i marcador no satel·litzat) en el cariotip fetal.

Les indicacions venen condicionades en part per les limitacions d'aquesta tecnologia com la impossibilitat de detectar reordenaments equilibrats, triploïdies i mosaïcismes de baix grau (< 20%) (457).



## **1.11 ASSESSORAMENT GENÈTIC**

La detecció d'una malformació congènita o d'un marcador ecogràfic al llarg de la gestació fa que els professionals hagin de prendre decisions complicades a l'hora de seleccionar quines tècniques de genòmica són més adequades per aquell cas concret i en la determinació de com les troballes de laboratori poden influir en la presa de decisions. No sempre és possible predir a priori la gravetat d'una condició clínica sobre la base d'un genotip. A vegades, la variant no es pot correlacionar de manera fiable amb un fenotip determinat donada la influència de modificadors, genètics, epigenètics, o ambientals, o fin i tot, pot tractar-se d'una variant de significat incert. Els emergents coneixements per als trastorns d'un sol gen venen a complicar aquest paradigma (458). Els clínics ja estan familiaritzats amb aquest problema.

Es necessari un assessorament previ i posterior a la prova. L'assessorament pot ser ofert per part de l'assessor genètic o el genetista clínic.

### **1.11.1 ASSESSORAMENT PRETEST**

Recomanacions abans de realitzar la prova (458,459):

- El diagnòstic genètic s'han de dur a terme amb criteris de pertinència, qualitat, equitat i accessibilitat.
- Davant la possibilitat de transmissió d'una alteració genètica als fills es recomana als pares que accedeixin a un assessorament capaç de facilitar-los informació, tant de les conseqüències de l'alteració genètica en qüestió com de les possibles accions d'assistència mèdica i social.
- El consell genètic en cap cas ha de tenir naturalesa directiva. És fonamental assegurar-se que la informació ha estat ben entesa, per tal que els pares puguin prendre una decisió lliure i informada.
- La realització de les proves de diagnòstic genètic ha de tenir el consentiment informat preceptiu d'acord amb la Llei d'Investigació Biomèdica. Aquestes proves han de tenir validesa sustentada en l'evidència científica, i han de constituir un element essencial per al diagnòstic, pronòstic, selecció i seguiment de tractaments, així com per a prendre decisions reproductives.
- Davant l'eventual detecció durant l'embaràs d'una alteració genètica, els pares han de ser informats de les possibilitats terapèutiques, pal·liatives i legals sense pressions, ni recomanacions degudes a opcions personals de l'assessor. A més, s'haurà de donar informació relativa a quantes prestacions existeixen i a les associacions d'ajuda a les famílies i als malalts amb discapacitats congènites.
- Garantir la protecció dels drets de les persones assessorades tant pel que fa a la decisió que adoptin com al tractament de les dades genètiques.

Cal comentar amb les parelles assessorades prenatalment els següents punts (460)(461):

- Tant el microarray com el cariotip són incapaços de detectar mutacions puntuals de l'ADN.
- El microarray té més capacitat de detecció que el cariotip, però no detecta alteracions equilibrades, triploïdies o mosaïcismes de baix grau (462).
- Només les CNVs patogèniques (o probablement patogèniques) amb prou repercussió per a la salut actual o futura del fetus han de ser considerades en una decisió d'ILE.
- S'ha consensuat com a norma general, que les CNVs de significat incert (VOUS) que no siguin probablement patogèniques poden no ser informades en l'etapa prenatal.
- Es poden detectar malalties de gravetat molt variable i difícils de predir.
- Hi ha CNVs patogèniques de susceptibilitat o amb penetrància incompleta, que impliquen només un risc d'afectació i afegeixen una dificultat addicional al ja difícil assessorament prenatal.
- Es poden identificar CNVs que causin malalties de presentació tardana i si són heretades d'un dels progenitors, poden aparèixer abans fins i tot que en el progenitor.
- Es poden detectar estats de portador sa per algunes malalties. En general no s'informen prenatalment, però idealment s'hauria d'articular un mecanisme per informar a l'individu quan arribi a l'edat reproductiva.
- Es poden demanar mostres dels dos progenitors per tal d'ajudar a comprendre la importància dels resultats.
- L'ús de microarray pot identificar que les relacions biològiques reals no coincideixin amb les reportades per la parella (falses paternitats).
- L'anàlisi de microarray no identificarà en cap cas tots els trastorns genètics.

Per tot l'esmentat, és indispensable disposar en aquestes consultes pretest d'un consentiment informat. Es recomana que hi hagi un consentiment específic de les proves genètiques addicionals al consentiment de la prova invasiva.

### **1.11.2 ASSESSORAMENT POSTTEST**

Cal tenir present diferents aspectes a l'hora d'assessorar a les parelles que han necessitat un estudi genètic prenatal mitjançant array (460)(402):

- En les CNVs patogèniques o VOUS probablement patogèniques s'hauran d'abordar els conceptes de penetrància i variabilitat en l'expressió.

- En les CNVs patogèniques i VOUS amb alguna sospita de patogenicitat que requereixin estudis familiars per a la seva millor classificació, s'hauran de prendre mostres parentals si no s'han pres prèviament.
- S'han de comentar els possibles tractaments i mesures destinades a modificar el pronòstic a llarg termini, en cas que existeixin.

### 1.11.3 L'INFORME PRENATAL

El **contingut dels informes** dels microarray ha d'incloure sempre (460)(402):

- Les especificacions tècniques del microarray utilitzat (tipus de microarray, tipus, distribució de les sondes i resolució mitjana aconseguida en les regions interrogades).
- Els criteris d'inclusió o exclusió dels diferents tipus de CNV (filtratge).
- Les limitacions de la tècnica, com són la impossibilitat de detectar reordenaments equilibrats, les triploïdies i mosaïcismes de baix grau (< 20%) així com mosaics que resultin en una dosi genòmica compensada (mosaic 45, X/47, XXX). A més, el nivell de mosaïcisme detectable variarà segons la mida, la regió del genoma i la qualitat de l'ADN.
- En cas de CNV patogènica o probablement patogènica, en l'informe ha de constar la descripció detallada de les conseqüències fenotípiques descrites i citar les referències bibliogràfiques i les bases de dades consultades. Així com el percentatge de penetrància coneguda i la variabilitat i gravetat dels fenotips associats en les de penetrància incompleta. Si es considera necessària la indicació d'estudis familiars o de proves de confirmació també ha de notificar-se. Les CNVs patogèniques de penetrància incompleta, predictives, d'estat de portador sa o presimptomàtiques només han de ser incloses quan tinguin prou penetrància i gravetat perquè puguin justificar una ILE o quan la seva informació hagi estat sol·licitada en el consentiment informat previ per part de la gestant.
- Les CNVs de significat incert (VOUS que d'entrada no siguin probablement patogèniques) només s'han d'incloure a l'informe prenatal quan l'estudi de segregació familiar pugui facilitar el reconeixement del seu caràcter probablement patogènic. La decisió d'estudiar una CNVs de significat incert en els progenitors durant l'embaràs es basarà en criteris de probable patogenicitat: mida, contingut genètic, funcions conegudes o previsible d'aquests gens i concordança amb el fenotip observat.
- No és necessari incloure les CNVs benignes en els informes.

L'assessorament és també el moment més adequat per a completar el diagnòstic multidisciplinari, comentar els riscos futurs i les opcions reproductives disponibles per a la parella.

#### **1.11.4 COST-BENEFICI**

Estudis destinats a avaluar la relació cost-benefici de l'array en el diagnòstic prenatal conclouen que, en el grup de fetus amb anomalia estructural, l'array-CGH detecta més CNVs clínicament rellevants que el cariotip convencional i això és cost efectiu. Malgrat l'array-CGH també detecta més CNVs en els fetus amb TN augmentada, l'increment diagnòstic quant a variants patogèniques no ha resultat cost efectiu avui dia (463). Això pot anar canviant a mesura que els costos de la realització de l'array-CGH vagin disminuint.

## **1.12 DIAGNÒSTIC GENÈTIC PRENATAL I NOUS ALGORITMES. IRRUPCIÓ DE NOVES TECNOLOGIES EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL.**

A conseqüència dels ràpids avenços tecnològics en el camp de la genètica, l'atenció prenatal ha canviat enormement. Aquest canvi va acompanyat d'alguns debats importants. Tot i que hi ha una explosió de noves tecnologies genòmiques, la disponibilitat d'una tecnologia nova no és un argument suficient per a la seva implementació, sinó que ha de demostrar ser d'utilitat a la pràctica clínica. Cada nova tecnologia necessita una avaluació crítica abans de la seva implementació en l'àmbit assistencial, i més encara en l'àmbit prenatal.

Uns pocs anys després de la introducció de l'anàlisi de matrius en l'entorn prenatal, entra en l'escena prenatal la seqüenciació massiva (464).

En un entorn postnatal, en la seva majoria de les síndromes existeix un fenotip ben definit, segons el qual es poden seqüenciar panells genètics específics, abans d'analitzar l'exoma complet (que és molt més propens a les troballes incidentals). Però en l'àmbit prenatal, definir el fenotip exacte és molt més difícil, ja que no totes les característiques d'una síndrome són prenatalment reconegudes. Per tant, la seqüenciació de l'exoma en comptes de panells genètics seleccionats pot ser l'única possibilitat en determinats casos d'arribar a un diagnòstic, tot i que condueix inevitablement a VOUS i a troballes incidentals que han de ser abordades amb precaució. Si els futurs pares volen utilitzar la informació genètica per prendre una decisió sobre continuar amb un embaràs o no, els temps de resposta també es tornen desafiants. Però en un escenari en el qual considerem la vida fetal i neonatal com un continu, les proves prenatales no només es fan servir per prendre una decisió sobre si es continuarà o no un embaràs, sinó també per millorar l'atenció primer al fetus i després al nounat.

### **1.12.1 SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA**

Amb la velocitat actual d'acumulació de dades, els avenços tecnològics i la bioinformàtica, s'estan generant oportunitats d'utilitzar la seqüenciació en múltiples situacions mèdiques, inclosa la caracterització molecular de malalties (465–467), la individualització del tractament oncològic (468,469), farmacogenòmica (470) i també el diagnòstic prenatal.

La seqüenciació de l'exoma anirà implementant-se en l'atenció prenatal durant els pròxims anys de forma progressiva i individualitzada (461,471). Encara que l'anàlisi de microarray ha augmentat la capacitat diagnòstica respecte al cariotip convencional, molts dels fetus amb anomalies anatòmiques diagnosticades prenatalment per ecografia tenen un cariotip normal i una anàlisi de microarray també normal i, per tant, romanen sense un diagnòstic definitiu. En aquests casos es poden realitzar proves genètiques moleculars addicionals.

La seqüenciació de tot el genoma (WGS: Whole-genome sequencing) analitza tot el genoma, incloent-hi regions no codificants (introns) i regions codificants (exons). No obstant això, com els introns tenen poca rellevància clínica, el cost de la seqüenciació de tot el genoma és elevat i la interpretació dels resultats és molt complexa, hi ha la possibilitat d'examinar regions codificants (exons) del genoma, el que vindria a ser un

exoma clínic (WES: whole-genome sequencing). Els exons tenen major rellevància clínica i aplicabilitat en l'àmbit assistencial. La seqüenciació de tot el genoma i la seqüenciació completa exòmica són considerades tecnologies de seqüenciació de nova generació (NGS: Next-generation sequencing).

La seqüenciació de l'exoma s'ha utilitzat amb èxit en adults i nens per diagnosticar trastorns hereditaris mendelians (472) i per identificar causes de discapacitat intel·lectual (473,474). La seqüenciació total de l'exoma a partir de l'ADN fetal obtingut per amniocentesi, vellositats coriòniques o sang de cordó umbilical per a indicacions clíniques específiques s'anirà desenvolupant en els pròxims anys. Actualment encara les dades publicades sobre les aplicacions prenatales de la seqüenciació de l'exoma complet es limiten a sèries de casos. Tanmateix, aquestes sèries suggereixen que es pot identificar una anomalia genòmica en un 10-57% de fetus amb múltiples anomalies quan els resultats estàndard de les proves genètiques, cariotip i microarray, són normals (471,475-477). Aquests casos mostren que la seqüenciació de l'exoma pot ser utilitzada per proporcionar a les famílies un diagnòstic definitiu, estimacions precises del risc de recurrència, i fins i tot, un millor assessorament reproductiu.

En totes aquestes aplicacions, hi ha el potencial reconeixement de troballes incidentals, resultats no relacionats amb la indicació de la prova. Una considerable quantitat de literatura analitza la utilitat i l'ètica de la informació sobre troballes incidentals descobertes en el curs d'una investigació per una altra causa, i com fer-ho en el context clínic, subratllant la importància dels resultats incidentals en l'assessorament pretest del pacient (478-482). Aquest assessorament haurà d'incloure també la discussió sobre les limitacions de les proves, la probabilitat i les implicacions del diagnòstic, les troballes incidentals i la necessitat potencial d'anàlisis addicionals per facilitar la interpretació clínica, inclosos els estudis realitzats en un entorn de recerca.

La seqüenciació de l'exoma és un enfocament adequat en l'avaluació diagnòstica d'un pacient per al qual hi ha sospita d'una malaltia monogènica significativa associada a un alt grau d'heterogeneïtat genètica o quan no s'han pogut fer proves genètiques específiques proporcionar un diagnòstic (483). S'han de tenir present les seves limitacions tècniques, aquestes limitacions poden incloure una cobertura incompleta, que també pot provocar falsos negatius com la incapacitat actual per avaluar de forma fiable certs mecanismes de malaltia com la variació en elements repetitius (per exemple, expansions de repetició de trinucleòtids) i variants estructurals, en particular amb WES (484).

La seqüenciació de l'exoma és una tècnica prometedora en diagnòstic prenatal, ja que permet augmentar la capacitat de diagnòstic quan el cariotip i els microarray són normals. Tanmateix és menys costosa i més aplicable clínicament que la seqüenciació del genoma sencer.

### 1.12.2 CRIBRATGE PRENATAL NO INVASIU A PARTIR D'ADN FETAL LLIURE EN SANG MATERNA

Tot i que les taxes de pèrdua d'embaràs després d'un procediment invasiu són baixes, del 0,01 al 0,03% segons els darrers estudis (485), és obvi que la introducció del diagnòstic prenatal no invasiu (DPNI) per a la detecció de les trisomies fetals més freqüents es considera un veritable avenç, que fa que l'anàlisi genètica prenatal sigui accessible per a totes les dones embarassades sense risc per a l'embaràs.

L'ADN lliure de cèl·lules d'origen fetal que circula suposa aproximadament el 3-13% del total d'ADN lliure en sang materna després de 10 setmanes de gestació, és detectable ja unes setmanes abans, i es creu que es deriva principalment del trofoblast. El test d'ADN fetal lliure (ADNfl) es recomana que es realitzi avui dia només per les trisomies comunes i, si s'escau, la composició dels cromosomes sexuals.

Alguns laboratoris han validat diferents tècniques per a l'ús de l'ADN fetal lliure però sempre basant-se en les tecnologies de seqüenciació de nova generació i en les anàlisis bioinformàtiques avançades (486–488). Els principals mètodes d'anàlisi de l'ADNfl per la detecció d'aneuploidies són: a) Shotgun Massive Parellel Sequencing, que seqüencia fragments de tots els cromosomes i després determina el nombre de còpies d'uns cromosomes determinats (487); b) Enriquiment mitjançant sondes específiques de regions dels cromosomes d'interès i hibridació en array (489) (Targeted Massive Parallel Sequencing) i c) Seqüenciació de SNPs (polimorfismes de nucleòtid únic), que analitza les distribucions de polimorfismes en els cromosomes estudiats en la mare i el fetus (490). No hi ha evidència científica per decantar-se per un mètode o un altre, amb l'excepció de les gestacions múltiples i l'ovodonació, on la presència d'un tercer genoma dificulta l'estudi de les distribucions de SNPs. Els diferents mètodes disponibles ofereixen sensibilitats similars per a les trisomies autosòmiques i per a les aneuploidies sexuals, i la majoria ofereixen l'estudi opcional d'algunes síndromes de microdeleció. La tècnica basada en SNP es pot realitzar a partir de les 9 setmanes de gestació i la resta, en general, es recomana a partir de les 10 setmanes.

Totes les proves tenen una alta sensibilitat i especificitat per a la trisomia 18 i la trisomia 21, independentment de quina tècnica molecular s'utilitza. Una recent revisió sistemàtica i metanàlisi recull que la taxa de detecció de l'ADNfl és actualment del 99,3% per a la trisomia 21, el 97,4% per a la trisomia 18 i el 97,4% per a la trisomia 13, amb una taxa de falsos positius del 0,1% per a cada una d'aquestes trisomies (491). Les sensibilitats per a la trisomia 13 i les anomalies cromosòmiques sexuals són una mica més baixes, amb una mitjana de 80-90%, però l'especificitat continua sent superior al 99% per a cada condició. L'exactitud de la determinació del sexe generalment supera el 98% (492). Independentment de la tecnologia que s'utilitzi, els resultats solen estar disponibles entre 7 i 10 dies. L'especificitat per a cada condició projectada sol informar-se per separat, de manera que les taxes falses positives són acumulatives i poden acostar-se a l'1%. Una part d'aquests falsos positius podrien explicar-se per causes biològiques com són el mosaïcisme placentari o matern, la presència d'un bessó no evolutiu, i més rarament una neoplàsia materna o un trasplantament de moll d'os o d'un òrgan (493).

El valor predictiu positiu (VPP) o la probabilitat que es confirmi un resultat positiu a una gestant determinada, varia en funció de la prevalença de les trisomies en la població estudiada. Per a la trisomia 21, el VPP és del 91% en població d'alt risc i del 82% en la



població general. Per a la trisomia 18 els VPP són del 84% i el 37% i per la trisomia 13 són del 87% i 49%, respectivament. Ja hi ha estudis que el reporten com a mètode de cribratge en grans mostres clíniques independentment que la població estudiada sigui de baix risc o d'alt risc (494). Actualment és considerat un mètode de cribratge avançat d'aneuploïdia (495), per això requereix confirmació mitjançant una prova diagnòstica invasiva en cas de resultat positiu.

Tot i que la prevalença de les síndromes de microdeleció és baixa (per exemple, 1/2000-1/4000 per a la síndrome de microdeleció 22q11) (454), la seva detecció s'ofereix comercialment des de fa pocs anys. La seva inclusió en el cribratge prenatal a partir de l'ADNfl és actualment controvertida, a causa de la manca d'estudis de validació clínica. Així doncs, les taxes de detecció i els valors predictius positius i negatius reals de les tècniques d'ADNfl en la detecció de microdeleccions no estan massa ben reportats. Respecte a la deleció 22q11.2, la microdeleció més prevalent i de la qual disposem de més informació, malgrat tot hi ha pocs estudis metodològicament correctes (496,497), el valor predictiu positiu s'estima en un 4% en població de baix risc, molt inferior al reportat per a les trisomies. Les síndromes de microduplicació presenten, a més de dificultats per a la seva detecció mitjançant ADNfl, una molt baixa prevalença i per aquests motius no queda clar que s'hagin d'oferir en l'àmbit assistencial avui dia. Aquestes i altres qüestions com ara saber a quines condicions s'ampliarà l'abast del DPNI i si aquest estarà suficientment validat estan encara sotmetent-se a consens. A més, cal adonar-se que el baix valor predictiu d'aquestes opcions de cribratge expandides (a causa de la baixa prevalença de les mateixes) pot donar lloc a procediments invasius innecessaris.

Amb el DPNI, la informació genètica fetal es pot obtenir amb relativa facilitat, i sense risc per a l'embaràs. A més, el seu rendiment supera el de les proves actuals de detecció de sèrum (495). Quan s'ofereix a totes les dones embarassades, els professionals han de garantir un assessorament pretest. Tanmateix els informes de resultats haurien d'incloure la fracció fetal (FF) d'ADNfl, calculada com a percentatge de l'ADNfl sobre el total de l'ADN lliure en circulació materna. La FF està situada al voltant del 10%, augmenta amb l'edat gestacional i disminueix amb el pes matern i amb un baix volum placentari. A mesura que augmenta la FF, augmenta la fiabilitat del resultat i també a la inversa (498,499). Les tècniques d'ADNfl presenten una taxa de no-resultat ("no-call") relativament elevada, que varia entre el 0 i el 12%. Una metanàlisi recent mostra l'existència d'un 4,3% de mostres inadequades que no es processen i un 5,1% addicional de fracassos de laboratori, la meitat de les quals són degudes a una baixa FF i l'altra meitat per una fallida de l'assaig (500). S'ha observat un alt risc d'aneuploïdia (3%-4%) en cas de resultat fallit (501). En aquesta circumstància, es pot optar per la repetició de l'extracció de sang materna en una edat gestacional més avançada o bé per la realització d'un procediment invasiu, opció que està especialment indicada en baixes FF i en gestants amb un alt índex de massa corporal. Si es consideren els no-resultats com a resultats positius, per l'alt risc d'aneuploïdia associat, les taxes de falsos positius augmenten a l'1,9% per la trisomia 21, 1,7% per la trisomia 18 i 1,9% per la trisomia 13 (491).

Pel que fa a les gestacions múltiples, tenen una major fracció fetal d'ADN circulant que els embarassos amb fetus únic (502). No hi ha diferències en la concentració d'ADNfl entre els embarassos múltiples monocoriònics i dicoriònics. Els embarassos dicoriònics compliquen l'anàlisi per la presència d'un genoma addicional (o més en presència de



més de dos fetus) a diferència dels dos genomes de mare i fetus presents en embarassos bessons monocoriònics. No obstant això, es considera que el DPNI és viable i clínicament aplicable per a la detecció d'aneuploidia fetal en aquestes gestacions (503,504), malgrat la taxa de no-resultat és superior a la reportada en gestacions amb fetus únic (505). Tanmateix, es necessita una major quantitat d'estudis clínics per demostrar l'aplicabilitat en altres anomalies cromosòmiques, a més de les trisomies 21 i 18.

Actualment, el DPNI evoluciona cap a cariotips moleculars fetals i els estudis ja mostren la viabilitat de la seqüenciació del genoma fetal sencer (506,507) Com sempre, els problemes tècnics es resoldran en els pròxims anys i l'abast de les tècniques genètiques aplicades a la medicina prenatal serà cada cop major, però els debats ètics i socials es mantindran i seran si més no igual d'importants.





## **2. HIPÒTESI**



## **2. HIPÒTESI DE L'ESTUDI**

- La utilització del microarray aporta informació genètica addicional en fetus amb anomalies de detecció ecogràfica.



### **3. OBJECTIUS**





### **3. OBJECTIUS**

#### **3.1 OBJECTIU PRINCIPAL**

- Analitzar l'ús clínic del microarray en els fetus diagnosticats de creixement intrauterí retingit (CIR) precoç (per sota de la setmana 28 de gestació) o translucència nocal patològica ( $TN \geq p95$  i  $< p99$  i  $TN \geq p99$ ) a l'ecografia del primer trimestre o plec nocal patològic ( $PN > p99$ ) a l'ecografia del segon trimestre o malformacions de detecció ecogràfica en qualsevol trimestre de l'embaràs.

#### **3.2 OBJECTIUS SECUNDARIS**

- Determinar quines alteracions genètiques s'han detectat amb microarray, per tal de comparar el rendiment de la tecnologia de microarray respecte al cariotip convencional en cadascun dels subgrups de l'estudi.

-Correlacionar les troballes ecogràfiques amb els resultats genètics en cadascun dels subgrups de l'estudi.

-Realitzar el seguiment de les gestacions i quantificar les complicacions de les tècniques invasives de diagnòstic prenatal realitzades.

-Realitzar la valoració postnatal dels nounats amb anomalies genètiques detectades per microarray, a excepció dels casos on la pacient sol·licita la interrupció legal de l'embaràs (ILE) en cadascun dels subgrups de l'estudi.



## **4. MATERIAL I MÈTODE**



## **4. MATERIAL I MÈTODE**

### **4.1 DISSENY DE L'ESTUDI**

Estudi observacional prospectiu dels casos prenatals amb criteri d'estudi genètic diagnosticats ecogràficament a la Unitat d'Ecografies Obstètriques de l'Hospital Parc Taulí en el període entre abril de 2013 i juny de 2017.

### **4.2 SELECCIÓ DE CASOS**

Els casos seleccionats han estat fetus amb diagnòstic prenatal d'anomalia ecogràfica i necessitat d'estudi genètic, tenint en compte els criteris d'inclusió i exclusió.

L'edat gestacional es va calcular en tots els casos segons l'últim període menstrual i verificar amb l'ecografia del primer trimestre, davant una discrepància de dates va prevaldre la datació ecogràfica segons longitud crani-caudal de l'embrió.

Els criteris diagnòstics de CIR emprats van ser: pes fetal estimat inferior al percentil 3, o pes fetal estimat situat entre els percentils 3 i 10 amb alteració hemodinàmica del flux fetus-placentari o uterí. Els casos de CIR precoç es van classificar en dos subgrups: CIR aïllat i CIR associat a anomalies ecogràfiques (estructurals / no estructurals).

Tots els exàmens d'ultrasons han estat realitzats per professionals experts utilitzant una màquina Acuson Antares amb un transductor convex de 2-3MHz.

Per valorar el desenvolupament mental i psicomotor dels nens, en els casos que ha estat necessari, s'han emprat les escales de Bayley-III (508) que avaluen diferents dominis mitjançant escales: cognitiva, motora, de llenguatge (receptiu-expressiu), socio-emocional i adaptativa. El quocient de desenvolupament total i per dominis té un format de puntuació estàndard, amb una mitjana de 100 i una desviació estàndard de 15 ( $M=100 / DE=15$ ). Es considera que no hi ha afectació si el quocient total de desenvolupament  $\geq 80$  i el perfil de dominis és homogeni (els dominis tenen també una puntuació  $\geq 80$ ).

### **4.3 MICROARRAY CROMOSÒMIC**

La hibridació genòmica comparada de matrius permet detectar no només aneuploïdies i canvis estructurals importants, submicroscòpics, i reordenaments desequilibrats. Prèviament, cal saber si les mostres corresponen a un fetus masculí o femení, per a això es va aplicar la tècnica de QF-PCR (reacció en cadena de fluorescència quantitativa de la polimerasa) que tanmateix ens permetia, d'una banda diagnosticar anomalies cromosòmiques específiques de cromosomes sencers (cromosomes 13, 18, 21, X i Y) i d'altra banda, reduir els costos.

Per l'anàlisi de microarray s'ha utilitzat l'array d'oligonucleòtids 8x60K de disseny propi (qChip Pre v1.1 Complete, qgenomics). Aquest array conté 60.000 sondes distribuïdes al llarg de tot el genoma amb una cobertura global que permet una resolució pràctica mínima de ~400 Kb al llarg del genoma, de ~100 Kb en regions de reordenament recurrent i elevada cobertura en regions clínicament rellevants (de mitjana 1 sonda/35 Kb) amb una major resolució per a àrees de síndromes de microdeleció i microduplicació, regions telomèriques i centromèriques.

La mostra problema s'ha hibridat amb una mostra control de referència del mateix sexe (es parteix d'1 µg de cada mostra). Es va marcar l'ADN del pacient i l'ADN de referència (del mateix sexe) amb fluoròfors diferents, Cy5 i Cy3 respectivament. Durant el procés d'hibridació les mostres es mantenen en un forn d'hibridació giratori a 65°C durant 24 hores. Posteriorment es renten per eliminar restes de reactius i s'escanegen en un espai lliure d'ozó per evitar la degradació del marcatge. Les dades obtingudes es processen amb el programa Feature Extraction que proporciona una sèrie de valors que permeten establir uns paràmetres de qualitat de l'array com són el DLRS (acrònim de l'anglès, derivative log ratio spread), la reproductibilitat o el soroll de fons. Les dades obtingudes es van analitzar amb el software Genomic Workbench 7.0 seguint l'algoritme de detecció d'aberració 2 (ADM2 ≥ 6:0), considerant CNVs verdaderes quan s'identificava un mínim de 4 sondes consecutives i una log<sub>2</sub> ràtio ≥ 0:25.

Les variants en nombre de còpies identificades s'han comparat amb les anotades a la Database of Genomic Variants i s'han reportat amb l'assemblatge genòmic humà hg19. Aquestes variants s'han classificat com a patogèniques, VOUS (variants de significat clínic incert) i benignes, seguint les recomanacions de l'American College of Medical Genetics and Genomics (402,509–511).

Com a norma general, la pacient no ha rebut informació de variants de significat incert i factors de susceptibilitat sense efecte fenotípic clar (d'acord amb les recomanacions actuals), sempre que la mateixa pacient no demani el contrari en el consentiment informat. Cal tenir en compte que l'estudi de les CNVs de significat incert és un camp actiu de recerca en genètica mèdica, de manera que és possible que amb l'array emprat es detectin variacions de nombre de còpia de significat incert, i que la rellevància clínica de les variants identificades, subjecta a revisions futures, pugui modificar l'assessorament genètic del cas, de ser així el pacient seria informat. En els casos que s'ha considerat necessari s'ha realitzat l'estudi genètic als progenitors.

Les mostres prenatales es van obtenir per biòpsia corial en cas de detecció d'anomalia ecogràfica en primer trimestre o per amniocentesi en cas d'anomalia ecogràfica fetal en segon o tercer trimestre de gestació. En tots els casos la gestant ha signat un consentiment informat específic prèviament a la realització de la prova invasiva prenatal i un altre per la realització de l'array-CGH amb l'assessorament pretest i post-test pertinent.

#### **4.4 ANÀLISI ESTADÍSTICA**

L'anàlisi estadística s'ha realitzat mitjançant el pack d'exploració de dades SPSS 17.0.

Anàlisi descriptiva: Les variables quantitatives han estat descrites per la mitjana, l'interval i la desviació estàndard. Les variables categòriques han estat descrites per les freqüències i percentatges.

Anàlisi comparativa: S'ha realitzat un test t-Student per les variables quantitatives i un chi-quadrat per les qualitatives. En cas de variables quantitatives que no s'han distribuït seguint la llei normal, l'estadístic utilitzat va ser U-MannWhitney.

L'increment del rendiment diagnòstic de l'anàlisi cromosòmic de microarray envers el cariotip convencional es va definir com el rendiment sobre el cariotip per a cada sèrie prenatal. CNVs trobades a l'anàlisi de microarray de  $\geq 7-10$  Mb de mida es van considerar detectable per cariotip convencional depenent de la resolució de bandes G obtinguda. Es va calcular com la proporció dels resultats anormals no detectables per cariotip, dividits pel nombre total de casos amb un cariotip normal (512).

Aquest estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica d'Investigació Institucional (Projecte aprovat CODI CEIC 2013626) del nostre centre i becat per l'Institut de Recerca i Innovació Parc Taulí (BECA CIR 2013/099).

#### **4.5 MOSTRA**

La mostra es va calcular en funció de la prevalença de les malformacions majors fetals i la prevalença de les anomalies cromosòmiques. Sabien que hi hauria un percentatge de casos inclosos on la QF-PCR ja sortiria patològica d'inici, estimàvem que serien aproximadament un 20% dels casos.

La pèrdua de casos per manca de seguiment de l'embaràs o del nounat la vàrem estimar en un 2%. La mostra estimada va ser de 300 dones gestants.

La mostra assolida ha estat de 316 fetus.

#### **4.6 CRITERIS D'INCLUSIÓ**

- Gestants amb diagnòstic ecogràfic prenatal de fetus amb malformació fetal.
- Gestants amb diagnòstic ecogràfic prenatal de fetus amb translucència nugal (TN) patològica a l'ecografia del primer trimestre i/o plec nugal (PN) patològic a l'ecografia del segon trimestre.
- Gestants amb fetus diagnosticats prenatalment de creixement intrauterí restringit de forma precoç (< 28 setmanes de gestació).



#### **4.7 CRITERIS D'EXCLUSIÓ**

- Manca de seguiment després del diagnòstic.
- Pacients gestants que no varen acceptar realitzar-se una tècnica invasiva de diagnòstic prenatal malgrat el diagnòstic prenatal inicial.
- Pacients que no varen donar el seu consentiment per escrit (menors 18 anys, dificultats de lectoescriptura, desig propi).
- Pacients amb diagnòstic de preeclàmpsia en el moment de la inclusió a l'estudi.

#### **4.8 VARIABLES**

##### **4.8.1 VARIABLES PRINCIPALS**

- Resultat Microarray: normal /patològic i diagnòstic.

##### **4.8.2 VARIABLES SECUNDÀRIES**

- Ecografia fetal: normal / patològica.
- CIR precoç i/o malformació i/o TN patològica i/o PN patològic.
- Evolució dels nadons (0-36 mesos): sa / patològic. Descripció del diagnòstic. Valoració del neurodesenvolupament mitjançant Escales del Desenvolupament de Bayley III.

##### **4.8.3 VARIABLES DESCRIPTIVES**

- Edat de la gestant.
- Paritat.
- Antecedent de fill afecte d'anomalies cromosòmiques o malformacions.
- Setmanes gestació al diagnòstic de CIR precoç i/o TN patològica i/o PN patològic i/o malformació.
- Complicacions de la tècnica invasiva: pèrdues gestacionals.
- Interrupció legal de la gestació (si/no).
- Seguiment embaràs.
- Part: tipus.
- Pes nadó i Apgar.





## **5. RESULTATS**



## 5. RESULTATS

Un total de 316 fetus van presentar criteris d'inclusió durant la durada de l'estudi. Es van excloure 9 casos per pèrdues en el seguiment del fetus bé durant l'embaràs bé postpart (9/316, 2,8%). La mostra final va ser de 307 casos.

El seguiment dels nadons es va realitzar durant un total de 36 mesos.

Els casos es van analitzar segons les diferents categories:

- 28 fetus van ser diagnosticats de CIR precoç (abans de les 28 setmanes de gestació).
- 102 fetus van ser diagnosticats de TN  $p \geq 99$  a l'ecografia del I trimestre.
- 30 fetus van presentar una TN  $\geq p95$  i  $< 99$  i un cribratge combinat d'alt risc motiu pel qual van accedir a una tècnica invasiva.
- 24 fetus van presentar un PN  $p > 99$  a l'ecografia de II trimestre motiu pel qual es va realitzar un sonograma genètic i es va modificar el risc inicial del cribratge combinat per aneuploïdies segons likelihood ratio (LR). En els casos en què el cribratge combinat modificat va resultar de risc elevat es va realitzar tècnica invasiva.
- 123 fetus van presentar malformacions estructurals en qualsevol trimestre de l'embaràs.

A continuació procedirem a analitzar els resultats segons les categories establertes descrites.

### 5.1 MICROARRAY EN ELS FETUS DIAGNÒSTICATS PRENATALMENT DE RESTRICCIÓ PRECOÇ DEL CREIXEMENT INTRAUTERÍ (<28 SETMANES DE GESTACIÓ) AMB O SENSE ANOMALIA ECOGRÀFICA

L'estimació ecogràfica del pes fetal l'hem fet a partir de la correcta assignació d'un fetus a la seva edat gestacional, l'estimació del pes a partir de les biometries fetals, i el càlcul del percentil de pes per a l'edat gestacional (387,512–521).

Vàrem descartar el diagnòstic de preeclàmpsia en el moment de la inclusió dels casos a l'estudi.

Es van diagnosticar 29 fetus amb CIR precoç durant els anys de durada de l'estudi: 27 gestacions amb fetus únic i una gestació gemel·lar bicorial-biamniòtica amb els dos fetus afectes. Un cas de gestació amb fetus únic va ser retirat de l'estudi per manca de seguiment del nadó (la pacient a una altra zona geogràfica) (cas 58).

Finalment l'anàlisi en aquest subgrup es va realitzar sobre un total de 28 fetus.

La incidència de CIR precoç va ser del 0,3% sobre el total de 9667 parts durant el període d'estudi.

L'edat materna mitjana de les pacients estudiades va ser de 32,8 anys: 40,7% eren primípare i 59,3% múltipares.

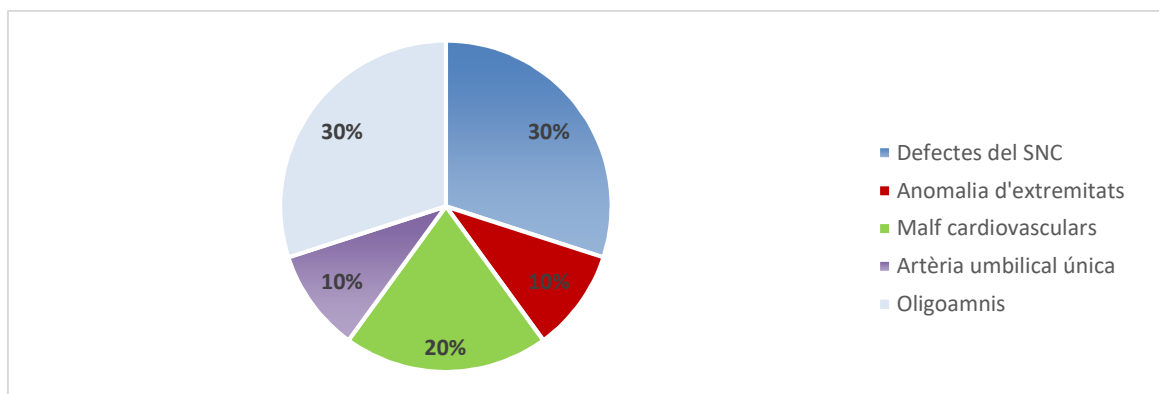
L'edat gestacional mitjana al diagnòstic va ser de 26,0 setmanes.

L'anàlisi dels antecedents obstètrics en aquest grup va mostrar que el 7,4% de les gestants tenien història prèvia d'un fill amb trastorn del neurodesenvolupament. Un cas (3,5%) presentava una recurrència del diagnòstic, el fill previ també havia presentat un CIR i actualment manifestava un retard psicomotor no filiat en seguiment per la unitat de Neurologia Pediàtrica. I una altra embarassada tenia l'antecedent d'una interrupció legal de la gestació per fetus amb trisomia 18.

Els casos de CIR precoç es van classificar en dos subgrups:

- CIR precoç aïllat (18/28, 64,2%)
- CIR precoç associat a altres anomalies ecogràfiques. El 35,7% (10/28) dels casos presentaven alteracions ecogràfiques associades, el 21,4% (6/28) estructurals i l'altre 14,2% (4/28) alteracions no estructurals com oligoamnios (Figura 2).

**Figura 2. Malformacions associades a CIR precoç.**



En analitzar altres variables entre ambdós subgrups. La variable que va mostrar una diferència estadísticament significativa va ser la taxa de nascut viu. Altres variables analitzades: la taxa d'òbit fetal i el risc d'alteració del neurodesenvolupament van mostrar una tendència a la significació estadística. Ho atribuïm a la petita mida de la mostra (Taula 3).

Taula 3. Resultats perinatals. Comparativa de variables analitzades entre ambdós grups.

|  | RCIUp aïllat   | RCIUp associat a altres anomalies ecogràfiques |         |
|--|----------------|--|---------|
| Edat gestacional al part (setmanes)                                    | 32.8 (29.3-41) | 36.4 (33.1-40.4)                               | NS      |
| Nascut viu %   | 100 (18/18)    | 70 (7/10)                                      | P=0.016 |
| Òbit fetal %   | 0              | 20 (2/10)                                      | NS      |
| ILE %  | 0              | 10 (1/10)                                      | NS      |
| Part preterme %  | 22.2 (4/18)    | 28.5 (2/7)                                     | NS      |
| Inducció al part %   | 55.5 (10/18)   | 57.1 (4/7)                                     | NS      |
| Part per cesària %   | 33.3 (6/18)    | 42.8 (3/7)                                     | NS      |
| Cesària per risc de pèrdua benestar fetal (RPBF) %                     | 16.6 (3/18)    | 0  | NS      |
| Pes al naixement (g)   | 1898           | 1835   | NS      |
| Ingrès a la Unitat de Neonatologia %                                   | 44.4 (8/18)    | 57.1 (4/7)                                     | NS      |
| Seguiment postnatal: Risc alteració del neurodesenvolupament postnatal | 11.1 (2/18)    | 42.8 (3/7)                                     | NS      |

En aquest grup de fetus amb CIR precoç es van realitzar altres proves complementàries com la ressonància magnètica fetal (RMf), l'ecocardiografia fetal i l'estudi de infeccions prenatales.

La RMf es va realitzar en un 17,8% dels casos (5/28), tots els casos presentaven anomalies ecogràfiques associades: tres casos de malformació fetal estructural associada al CIR precoç i dos casos amb oligoamnis. La RMf va confirmar el diagnòstic ecogràfic en tots els casos de malformació fetal: una ventriculomegàlia fetal, un quist aracnoïdal i un cas de peu bot. Els altres dos casos on l'anomalia ecogràfica no va ser estructural la RMf va ser normal. L'altre cas de ventriculomegàlia fetal associada a CIR precoç no va arribar a realitzar-se la prova complementària atès que va ser òbit a la setmana 20. Es tractava d'una gestació gemel·lar i l'altre fetus també va presentar un compromís del creixement de forma precoç sense anomalies ecogràfiques estructurals.

L'ecocardiografia fetal es va fer en tots els casos i va ser patològica només en un cas (3,5%), confirmant el diagnòstic de comunicació interventricular (CIV).

L'estudi d'infeccions prenatales va incloure la detecció de toxoplasma, rubèola, parvovirus B19, virus de l'herpes simple (VHS-1 i VHS-2) i citomegalovirus va ser negatiu en tots els casos. En els casos amb IgG positives per CMV, es va descartar la presència d'aquest virus a líquid amniòtic mitjançant PCR-CMV que va ser negativa també en tots els casos.

La síndrome antifosfolipídica (SAF) es va estudiar en aquells casos amb complicacions obstètriques que podríem ser considerades com a criteri clínic: part abans de les 34 setmanes amb preeclàmpsia i/o troballes reconegudes d'insuficiència placentària (estudi Doppler anormal, oligoamnis i baix pes fetal al naixement per sota del percentil 10 per a l'edat gestacional). A la pràctica clínica els anticossos antifosfolipídics (AAF) avaluats han estat els isotips IgG i IgM dels anticossos anticardiolipina i dels anticossos anti  $\beta$ 2-glicoproteïna-I a més de l'anticoagulant lúpic. L'estudi dels AAF es va realitzar en 15 dels 24 casos amb fetus únic. No es va cursar en aquells casos amb anomalies al cariotip



convencional/array ni tampoc en aquells on no hi havia sospita clínica. La SAF es va descartar en tots els casos estudiats.

La patologia obstètrica materna més prevalent va ser la diabetis gestacional en 3 dels 27 casos de gestacions úniques (11,1%).

També es va realitzar l'estudi del Doppler en les gestacions amb fetus únic, l'estudi de l'artèria umbilical (AU), artèria cerebral mitja (ACM), artèries uterines (AUT) i l'índex cerebro-placentari (ICP, IP ACM/IP AU) també es va realitzar. En el moment del diagnòstic del CIR, l'estudi Doppler de les artèries uterines (índex de pulsatilitat, IP UT mig > p95) es trobava alterat en tres casos, del total de gestacions amb fetus únic (11,1%). D'aquestes tres pacients, una va desenvolupar una preeclàmpsia greu al llarg de la gestació (cas 143) i una altra va ser un òbit a la setmana 26 de gestació (cas 4). La tercera va ser una inducció del part a la setmana 37 i no va presentar patologia hipertensiva (cas 257). En aquests tres casos l'estudi d'array va ser normal. En el control evolutiu d'aquestes gestacions, l'estudi Doppler de l'artèria umbilical (IP>p95), que era normal en tots els casos en el moment del diagnòstic, es va alterar en 6/26 gestacions (23%) durant el seguiment, una gestant va sol·licitar una ILE per malformació associada i array amb CNV patogènica. L'estudi Doppler de l'artèria cerebral mitja va ser anòmal en tres casos (11,5%).

Un cas va presentar alterat ambdós paràmetres Doppler durant el seguiment, IP artèria umbilical i IP artèria cerebral mitja (3,8%) (Taula 4).

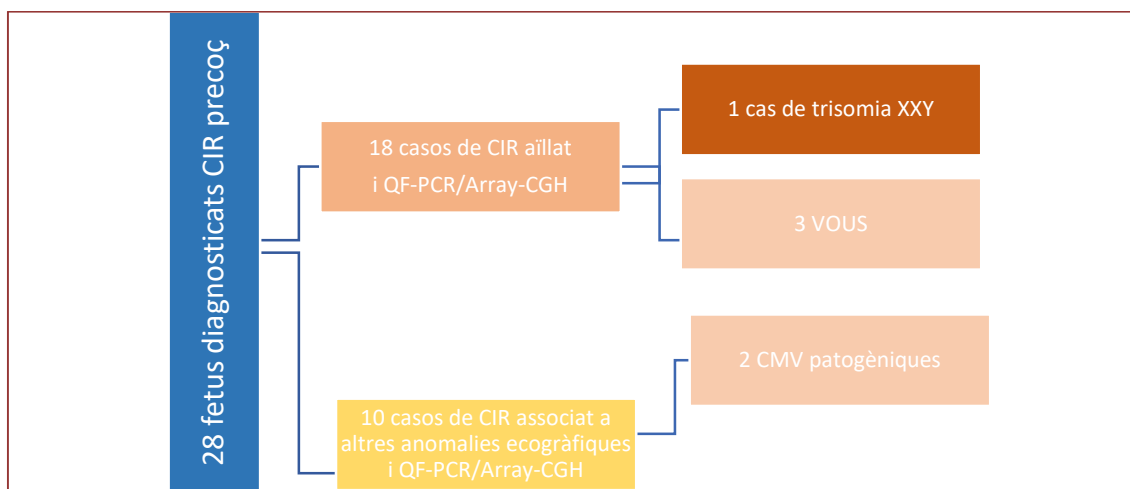
**Taula 4. Estudi de paràmetres del Doppler en els fetus amb CIR precoç.**

|         | <b>Estudi Doppler en el moment del diagnòstic</b> | <b>Estudi Doppler en el control ecogràfic previ al part</b> | <b>CIR aïllat/associat</b> | <b>Part</b>   |
|---------|---|---|----------------------------|---|
| Cas 4   | <b>IPm AUT &gt; p95</b>                           | <b>IP AU &gt; p95</b><br>IP ACM > p5                        | Oligoamnis                 | 26s: Òbit fetal   |
| Cas 45  | IPm AUT < p95                                     | IP AU < p95<br><b>IP ACM &lt; p5</b>                        | -                          | 37s:Inducció x CIR  |
| Cas 143 | <b>IPm AUT &gt; p95</b>                           | <b>IP AU &gt; p95</b><br>IP ACM > p5                        | -                          | 29s:PE greu i DPPNI<br>cesària urgent                         |
| Cas 175 | IPm AUT < p95                                     | <b>IP AU &gt; p95</b><br>IP ACM > p5                        | CIV muscular               | 37s:Inducció x CIR  |
| Cas 241 | IPm AUT < p95                                     | <b>IP AU &gt; p95</b><br>IP ACM > p5                        | -                          | 37s:Finalització x CIR<br>Cesària podàlica                    |
| Cas 246 | IPm AUT < p95                                     | <b>IP AU &gt; p95</b><br><b>IP ACM &lt; p5</b>              | -                          | 35s. Part preterme  |
| Cas 257 | <b>IPm AUT &gt; p95</b>                           | IP AU < p95<br><b>IP ACM &lt; p5</b>                        | -                          | 37s:Inducció x CIR  |
| Cas 292 | IPm AUT < p95                                     | <b>IP AU &gt; p95</b><br>IP ACM > p5                        | Oligoamnis                 | 34s:Finalització x CIR<br>Bradicàrdia fetal<br>Cesària urgent |

La QF-PCR es va realitzar en tots els fetus diagnosticats de CIR precoç, prèvia a l'array-CGH. Es va detectar una síndrome de Klinefelter per QF-PCR (cas 128) que posteriorment va ser confirmada per cariotip convencional (3,5%).

L'anàlisi de microarray realitzat en els 27 fetus restants va permetre detectar 5 casos de CNV (5/27, 18,5%): Tres variants de significació clínica incerta (VOUS) i dos CNV patològiques (Figura 3).

**Figura 3. Diagrama de flux de les troballes cromosòmiques de la QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) i de l'array-CGH en els fetus amb CIR precoç.**



A continuació es descriuen els casos.

Els 3 casos de VOUS (Taula 4):

- ❖ Deleció de 203 kb a la banda cromosòmica 2q31.2. No coincideix amb CNV polimòrfiques descrites i altera l'estructura i la dosi del gen *PDE11A* (Phosphodiesterase 11A) (cas126).
- ❖ Duplicació de 269 kb a la banda cromosòmica Xp22.31, que tampoc coincideix amb CNV polimòrfiques descrites i podria alterar l'estructura o la dosi de gens de referència, com el gen *KAL1* (cas 251).
- ❖ Deleció del braç llarg del cromosoma 5. Aquesta deleció compromet l'estructura de 15 gens i 4 microRNAs (cas 312).

Els 3 casos de VOUS no van ser diagnosticats per cariotip convencional donada la petita mida del defecte cromosòmic.

Les CNVs patogèniques diagnosticades van ser (Taula 5):

- ❖ Duplicació de 25 Mb de les bandes cromosòmiques 1q32.2q42.2, que també va ser confirmada per cariotip convencional, alterava la dosi de més de 300 gens RefSeq, alguns descrits a OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), clarament associada a la patologia (cas 37).
- ❖ Deleció de 2,7 Mb de la banda cromosòmica 21q22.3, que va alterar l'estructura i la dosi de 50 gens de referència, incloent-hi els gens *COL6A1* i *COL6A2*, no detectable per cariotip convencional (cas 280).

Taula 5. CNVs detectades en els casos de CIR precoç.

|   | Mida   | Detectable per cariotip | CMA                        | Anomalies ecogràfiques      | Seguiment |
|---|--------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------|
| arr[hg18]1q32.2q42.2(205,462,090-230,639,499)x3, cas 37 | 25 Mb  | Si                      | CNV Patogènica             | Defecte d'extremitats i CIR | ILE       |
| arr[GRCh37]21q22.3(45390755_48090317)x1, cas 280        | 2.7 Mb | No                      | CNV Patogènica             | Arc aòrtic dret i CIR       | Afectat   |
| arr[hg18]2q31.2(178,278,136178,481,830)x1, cas 126      | 203 kb | No                      | VOUS (progenitor portador) | CIR aïllat                  | Normal    |
| arr[hg19]Xp22.31(8391952_8661109)x2, cas 251            | 269 kb | No                      | VOUS                       | CIR aïllat                  | Normal    |
| arr[GRCh37]5q35.3(178645539_179707778)x1, cas 312       | 1 Mb   | No                      | VOUS                       | CIR aïllat                  | Afectat   |

La interrupció legal de l'embaràs va ser sol·licitada per una de les gestants, dada que va correspondre a un 3,5% de les dones estudiades en aquest subgrup.

Vam tenir 2 casos de mortalitat intrauterina (7,4%).

Respecte als resultats perinatals destacar l'elevada taxa de cesàries, induccions al part i prematuritat en aquest grup, tal com era d'esperar, pel tipus de patologia que estudiàvem (Taula 3). El 48% (12/25) dels naixements van requerir d'ingrés a la unitat neonatal.

Donat el risc incrementat d'anomalies en el neurodesenvolupament, el 28% (7/25) dels nens es troben en control per neurologia pediàtrica. Al cap de 36 mesos de seguiment, tots ells presenten bona evolució i capacitat cognitiva dintre de la normalitat, a excepció de 2 casos (8%, 2/25): un primer cas d'una nena amb microcefàlia i un retard psicomotor de diagnòstic postnatal amb capacitat cognitiva no verbal límit i trastorn de llenguatge receptiu-expressiu i greu afectació en l'àmbit expressiu, array prenatal normal, que donada la clínica es va realitzar un exoma clínic i es va diagnosticar una variant

patogènica c.1042G>A en el gen *DYRK1A*, portadora en heterozigosis (cas 130). Un segon cas de també de retard psicomotor i macrocefàlia amb array prenatal diagnòstic de deleció d'1 Mb en el braç llarg del cromosoma 5 (cas 312), variant de significat incert.

L'array va resultar anòmal en un 18,5% dels casos (5/27). L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional va ser del 15,3% (4/26). Es va detectar un increment del rendiment diagnòstic del 11,1% (1/9) de l'array sobre el cariotip convencional en fetus amb CIR precoç associat a altres malformacions, i un increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip del 17,6% (3/17) en fetus amb CIR precoç aïllat.

**Pel que fa a les variants patogèniques**, dos fetus van ser diagnosticats de CNV patogèniques (7,4 %, 2/27), ambdós pertanyien al grup de CIR precoç i malformacions estructurals. L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip per a variants patogèniques va ser del 3,8% (1/26). **Es va detectar un increment del rendiment diagnòstic de l'11,1% (1/9) de l'array sobre el cariotip en fetus amb CIR precoç associat a altres malformacions.** No va haver-hi increment en el rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip, pel que fa a variants patogèniques, en fetus amb CIR precoç aïllat.

Considerem que és important establir l'associació entre les anomalies cromosòmiques i la restricció precoç del creixement fetal. Mitjançant la millora del diagnòstic d'aquest fetus, millorem el seguiment de l'embaràs, adaptem l'ús d'exàmens complementaris i, sens dubte, proporcionem un assessorament més precís a les famílies.



## 5.2 MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB TRANSLUCÈNCIA NUCAL PATOLÒGICA I/O PLEC NUCAL PATOLÒGIC

### 5.2.1 MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB TRANSLUCÈNCIA NUCAL $\geq$ p99

S'han detectat un total de 102 fetus amb TN  $\geq$  p99. La incidència de TN  $\geq$  p99 a la nostra població d'estudi ha estat de l'1%.

L'edat mitjana materna era de 33,4 anys (rang 21-43), el 49% eren primíparas i el 51% multíparas.

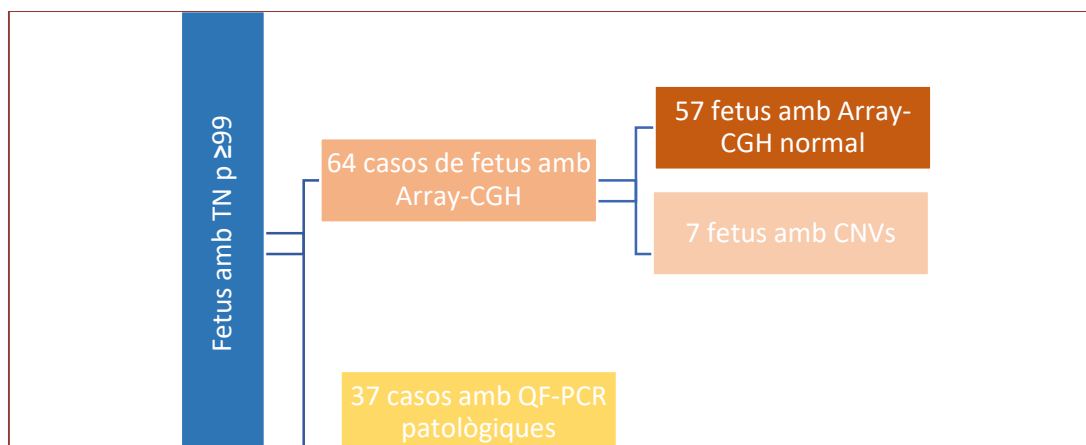
La mitjana d'edat gestacional en el moment del diagnòstic va ser de l'11,8 setmanes.

En analitzar els antecedents obstètrics de la població estudiada, es va observar que el 9,8% tenien història prèvia d'un fill amb un trastorn del neurodesenvolupament o bé d'un embaràs previ amb cromosomopatia. Només un cas va presentar recurrència del diagnòstic: TN  $\geq$  p99 a l'ecografia de I trimestre i hidrops fetal a l'ecografia de segon trimestre amb array normal (cas 314), en tots dos embarassos consecutius, motiu pel qual es va cursar l'exoma clínic de l'ADN fetal obtingut d'aquesta segona gestació trobant-se una variant patogènica en homozigosi de tipus *missense* en el gen *SEC23B* i confirmant-se també en el fetus de la primera gestació. Aquesta variant patogènica explica el fenotip dels fetus afectats.

En dos casos (1,9%), els embarassos van ser gemel·lars, ambdós dizigòtics, però només un dels fetus presentava l'increment de TN  $\geq$  p99.

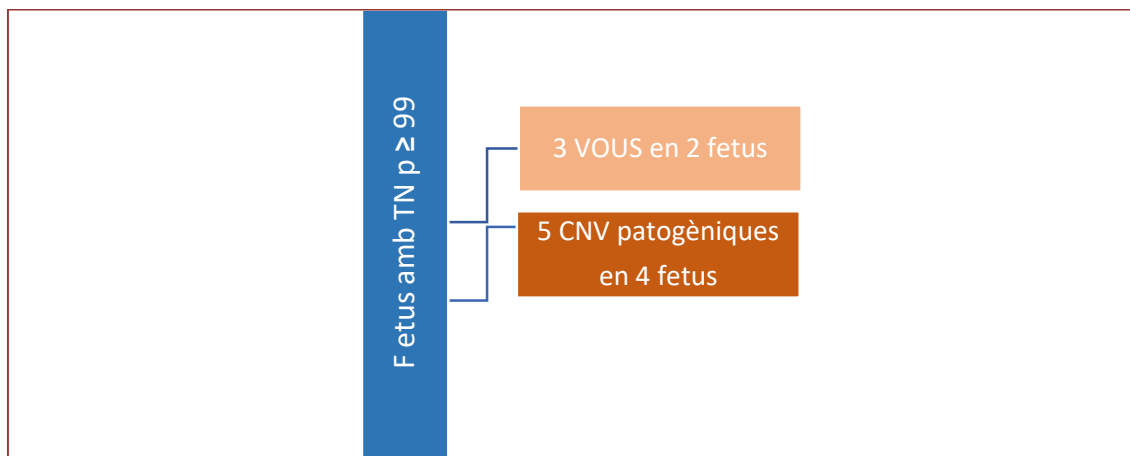
Es va realitzar una QF-PCR en tots els fetus diagnosticats d'augment de la translucència nucal ( $\geq$  percentil 99), el 36,3% (37/102) presentaven un cariotip anòmal: 20 casos de trisomia 21 (54%), 12 casos de trisomia 18 (33%), 1 cas de trisomia 13 (3%) i 4 casos de síndrome de Turner (10%). En tots els casos es va sol·licitar la interrupció legal de l'embaràs. Dels casos restants, en un cas, l'estudi d'array no es va poder realitzar i només es va realitzar un cariotip convencional, amb resultat normal, es tractava d'un avortament post-amniocentesi (Figura 4).

**Figura 4. Diagrama de flux de l'estudi cromosòmic (QF-PCR i/o microarray cromosòmic) en les gestacions amb translucència nucal  $\geq$  percentil 99.**



L'array prenatal es va realitzar en 64 casos (62,7%) i en un 10,9% dels fetus el resultat va ser patològic. S'han detectat 9 CNVs en 7 fetus. Un 10,9% dels fetus eren portadors d'una o més CNVs (7/64, 10,9%): 1 CNV benigna (2p22.22p22.1(27,254.626-39,208,926)x3), 3 variants de significació clínica incerta (1 fetus va presentar 2 VOUS) i 5 CNVs patològiques (1 fetus va presentar 2 CNVs patològiques) (Figura 5).

**Figura 5. Resultats de l'array-CGH (CNVs patològiques i VOUS) en les gestacions amb diagnòstic de translucència nucal  $\geq$  p99.**



Els 2 fetus amb VOUS (2%) diagnosticades van ser:

- ❖ Duplicació de 210 kb a la banda cromosòmica 16q24.1 (16q24.1(86,533,273-86,743,471)x3). Aquest cas va ser un fals positiu de l'ecografia prenatal on no es va diagnosticar una fissura palatina aïllada, sense llavi fes associat. Aquesta duplicació 16q24.1 afectava el gen *FOXF 1* (cas 255).
- ❖ Deleció de 608 kb a la banda cromosòmica 7p21.2 (7p21.2 (15614415\_16222888)x1) i una altra deleció de 165 kb a la banda cromosòmica 2q32.3 (2q32.3(193584775\_193750372)x1) en un mateix fetus, heretada del progenitor (cas 306).

Els casos de CNVs patològiques diagnosticats van ser:

- ❖ Deleció de 13 Mb a la banda cromosòmica 11q24.1q25 (11q24.1q25(121,430,998-134,450,377)x1) juntament amb una duplicació de 15 Mb a la banda cromosòmica 4q34.1q35.2 (4q34.1q35.2 (176,077,869-191,153,672)x3) en un mateix fetus. La deleció terminal del cromosoma 11 coincideix amb la regió de la síndrome de Jacobsen. La coexistència de les dues alteracions identificades en aquest cas és compatible amb la presència d'un cromosoma 11 derivatiu (der(11)t(4;11)(q34.1;q24)) al cariotip convencional que podria suggerir l'existència d'una possible translocació críptica equilibrada en algun dels progenitors, el pare presentava una translocació recíproca sense efecte fenotípic (cas 90).

- ❖ Trisomia del cromosoma 2 en mosaic de baixa proporció (14%) que es va considerar responsable de la cardiopatia congènita detectada en el fetus (cas 313).
- ❖ Deleció de 534 kb a la banda cromosòmica 16p11.2 (16p11.2 (29,256,185-30,098,069)x1) que correspon a la síndrome de microdeleció 16p11.2 (cas 157).
- ❖ Deleció de 15 Mb a la banda cromosòmica 8p23.3p22 (8p23.3p22 (1573676\_16762986)x1), associada a hèrnia diafragmàtica fetal, deleció intersticial que afecta l'estructura i dosi d'alguns gens, entre ells el gen *GATA4*. L'anomalia estructural fetal va ser atribuïda a la microdeleció. En aquest cas es va fer l'estudi dels progenitors: progenitors no portadors (cas 272).

Totes les CNVs patològiques serien diagnosticables per cariotip convencional a excepció de la 16p11.2 (16p11.2 (29,256,185-30,098,069)x1) que per a la seva mida que escapava al límit de resolució del cariotip convencional i no va ser detectada. Les gestants van sol·licitar la ILE en tots aquests casos (Taula 6).

**Taula 6. CNVs detectades en el fetus afectat TN ≥ percentil 99. Anomalies ecogràfiques i cromosòmiques.**

|   | Mida             | CMA                 | Detectable cariotip convencional | Anomalies ecogràfiques           | Seguiment |
|---|------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------|
| arr[hg18]11q24.1q25(121,430,998134,450,377)x1<br>arr[hg18]4q34.1q35.2(176,077,869-191,153,672)x3,<br>cas 90 | 13 Mb<br>15 Mb   | 2 CNV<br>Patològica | SI<br>SI                         | TN ≥ 99 <sup>th</sup>            | ILE       |
| arr(2)x2~3 trisomia mosaicisme cromosoma 2, cas 313   | -                | CNV<br>Patològica   | SI                               | TN +<br>Cardiopatia<br>congènita | ILE       |
| arr[hg18]16p11.2(29,256,185-30,098,069)x1, cas 157  | 534 kb           | CNV<br>Patològica   | No                               | TN ≥ 99 <sup>th</sup>            | ILE       |
| arr[GRCh37]16q24.1(86,533,273-86,743,471)x3,<br>cas 255   | 210 kb           | VOUS                | No                               | TN ≥ 99 <sup>th</sup>            | Afectat   |
| arr[GRCh37]7p21.2(15614415_16222888)x1<br>arr[GRCh37]2q32.3(193584775_193750372)x1,<br>cas 306              | 608 kb<br>165 kb | VOUS<br>VOUS        | No<br>No                         | TN ≥ 99 <sup>th</sup>            | Normal    |
| arr[GRCh37]2p22.2p22.1(27,254,626-39,208,926)x3,<br>cas 1   | 1.6 Mb           | CNV<br>Benigna      | No                               | TN ≥ 99 <sup>th</sup>            | Normal    |
| arr[GRCh37]8p23.3p22(1573676_16762986)x1, cas 272   | 15 Mb            | CNV<br>Patològica   | SI                               | TN +Hèrnia<br>diafragmàtica      | ILE       |

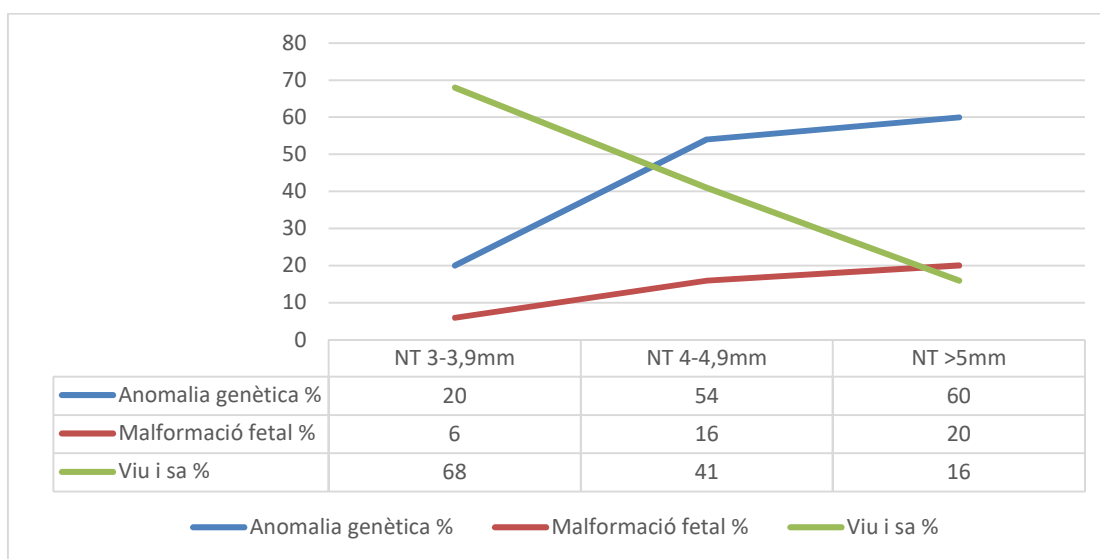


L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional va ser del 7,9% (5/61), en el 6,5% dels fetus (4/61). En els fetus amb TN  $\geq$  p99 sense altres defectes estructurals va ser de l'11,1% (5/45). En el subgrup de fetus amb TN  $\geq$  p99 i altres defectes estructurals no va haver-hi increment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional, totes les CNV eren de gran mida i podien diagnosticar-se per cariotip convencional.

Hem de fer èmfasi en el cas 20, el fetus presentava un cariotip de bandes G (47,XY,+mar[3]/46,XY[57]) amb un cromosoma marcador extra en baix percentatge (5%), no detectat per l'array-CGH i que contenia únicament material heterocromàtic sense repercussió fenotípica. Hem diagnosticat a la nostra sèrie dos casos de mosaïcisme per cariotip convencional (cas 20 i cas 313), dels quals només un ha estat diagnosticat també per l'array-CGH. Vam poder detectar un cas de mosaïcisme del 14%, però, l'altre cas ens va passar desapercebut. L'array-CGH té com a limitacions la no detecció de mosaïcismes de baixa proporció.

Va haver-hi una relació directament proporcional entre la TN i les anomalies cromosòmiques i inversament proporcional respecte als resultats perinatals, a més mida de TN més incidència de cromosomopaties i pitjors resultats perinatals (Figura 6). Aquests resultats van ser estadísticament significatius ( $p < 0,05$ ).

**Figura 6. Relació entre el gruix de la translucència nucal, els defectes genètics, l'avortament involuntari o la mort fetal i les malformacions en els fetus.**



En aquest context, s'han informat 8 casos (7,8%, 8/102) com higroma quístic amb 62,5% (5/8) d'anomalia cromosòmica.

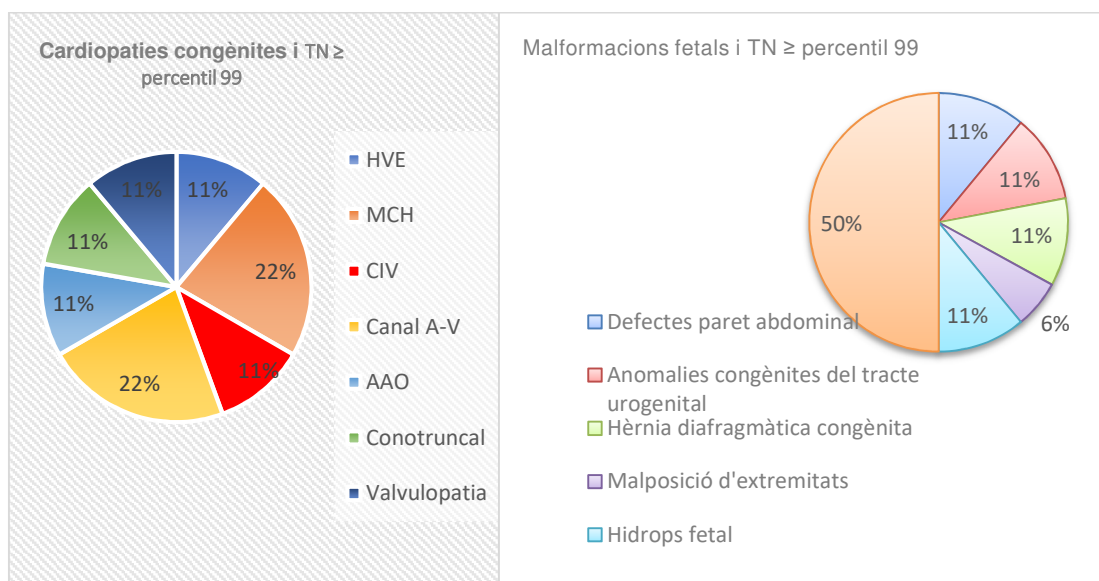
Es va realitzar una ecocardiografia fetal precoç (13-15 setmanes) en els casos de TN  $\geq$  percentil 99, que no van sol·licitar interrupció legal de l'embaràs abans de les 13-15 setmanes, que mostrava patologia en el 13% dels casos (9/69). L'estudi Doppler del DV en aquests 9 casos també es va realitzar, resultant patològic en 4/9 casos (44,4%), bé va ser revers bé va mostrar alteracions de l'ona a. D'aquests 9 casos, 5 van sol·licitar

ILE donat que la cardiopatia congènita s'associava a una anomalia genètica (dos casos de trisomia 18, un cas de trisomia 21 i un cas de trisomia 2 en mosaic) o bé es tractava d'una cardiopatia congènita major de mal pronòstic (un cas d'hipoplàsia de cavitats esquerres).

És important assenyalar la relació entre l'augment de la translucència nucal, la síndrome de Noonan i la cardiopatia congènita. En els dos casos d'hipertròfia del cor dret (miocardiopatia hipertròfica, casos 163 i 302) es van diagnosticar una síndrome de Noonan.

L'estudi ecogràfic morfològic detallat entre les 18 i 22 setmanes de l'embaràs es va realitzar en 64 fetus, en la resta de casos s'havia sol·licitat la ILE i els fetus no van arribar a sotmetre's a aquesta exploració. Es va diagnosticar una malformació fetal associada a l'augment de la translucència nucal en un 28,1% dels casos (18/64). La malformació fetal amb més freqüència diagnosticada va ser la cardiopatia congènita fetal, en un 50% dels casos (Figura 7). No va haver-hi increment del rendiment diagnòstic de l'array en aquest subgrup de fetus amb malformacions estructurals associades (0/15 del total de 18) i TN  $p \geq 99$ . Aquests fetus presentaven anomalies cromosòmiques de mida gran i tots els casos de la nostra sèrie es podien diagnosticar per cariotip convencional.

**Figura 7. TN  $\geq$  percentil 99 i anomalies ecogràfiques fetals.**

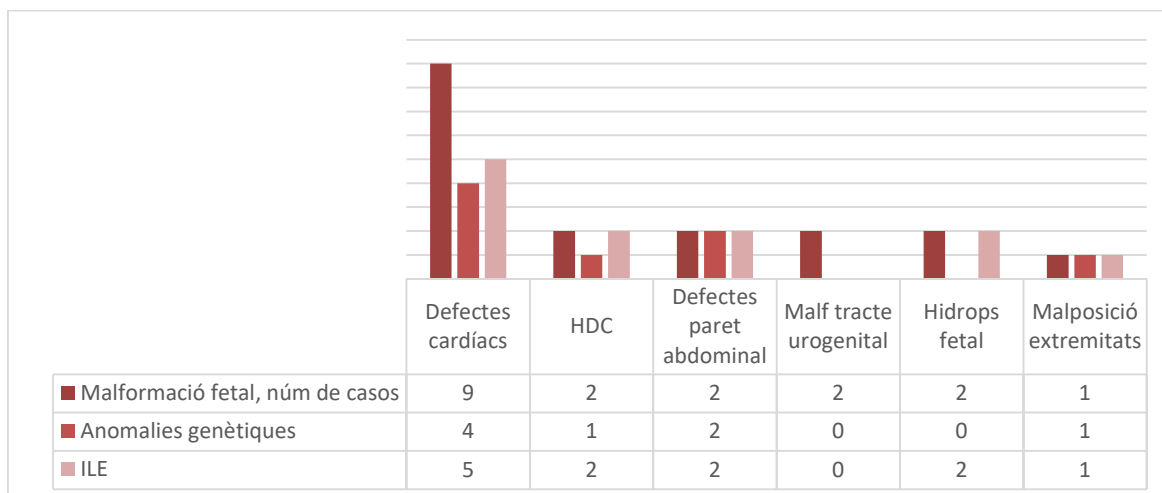


Peu de figura. Comunicació interventricular (CIV), canal atrioventricular (canal A-V), hipoplàsia de ventricles esquerres (HVE), miocardiopatia hipertròfica (MCH) i anomalies de l'arc aòrtic (AAO).

L'associació entre el resultat patològic de l'array/cariotip convencional i la cardiopatia congènita fetal va ser del 33% (1/3) (Figura 8).

En dos fetus (2/64, 3,1%) es van diagnosticar malformacions en més de dos òrgans o sistemes: una era una tetralogia de Fallot associada a una malposició de les extremitats i l'altra una dominància de les cavitats dretes associades a una ventriculomegàlia.

**Figura 8. Malformacions fetals ecogràfiques, anomalies genètiques a la QF-PCR/array-CGH i interrupcions legals de les gestacions en els fetus amb TN  $\geq$  percentil 99.**



Peu de figura. Hèrnia diafragmàtica congènita (HDC).

En 5 casos (7,8%, 5/64) es va detectar una persistència de la translucència nucal durant el segon trimestre de l'embaràs com a PN  $\geq$  percentil 99. En aquest subgrup es va observar un major índex de problemes de neurodesenvolupament i de dismorfies facials (2/5 casos, 40%).

La RMf es va realitzar en un 3,1% dels casos (2/64), ambdós casos van ser hèrnies diafragmàtiques congènites, confirmades també per la RMf.

L'estudi de les infeccions prenatales va ser negatiu en tots els casos, inclosos els casos amb mares que eren immunes a Citomegalovirus (CMV). En aquests casos, es va realitzar l'anàlisi de CMV per PCR en el líquid amniòtic no trobant-se resultats patològics a la nostra sèrie.

Pel que fa a altres troballes ecogràfiques, mencionar que la incidència de macrosomia fetal en fetus amb TN  $\geq$  p99 al nostre treball va ser del 9,4%. Aquest punt el desenvoluparem més endavant a la discussió.

Un total de 47 dones embarassades (46%) van sol·licitar la interrupció de l'embaràs, 46 casos a conseqüència de les troballes en l'estudi del cariotip convencional, la QF-PCR, l'array i/o les anomalies fetals detectades per ecografia i un cas per ruptura prematura de membranes amb anhidramni (després de la realització d'una tècnica invasiva).

A la nostra sèrie s'han produït dos casos d'avortament atribuïbles a la tècnica invasiva (3%), una d'elles va ser una amniocentesi i l'altra una biòpsia corial.

L'estudi anatomopatològic va proporcionar informació addicional en tres casos (3/49, 6,1%) (Taula 7):

- Un cas de defecte de tub neural (no diagnosticat per ecografia) associat a omfalocele i trisomia 18, cas 97.
- un segon cas de malposició d'extremitats inferiors (no diagnosticat per ecografia) associat a cardiopatia congènita, cas 313.
- un tercer cas de ronyó en ferradura només diagnosticat en l'anàlisi anatomopatològic d'un fetus amb una CNV patològica, cas 90.

Va haver-hi també un fals negatiu del diagnòstic ecogràfic:

- un cas en el qual no es va diagnosticar per ecografia una fissura palatina amb llavi íntegre però sí un ronyó ectòpic, en el mateix fetus, portador també d'una CNV patològica (cas 255).

**Taula 7. CNVs detectades en els fetus amb TN  $\geq$  p99. Anomalies ecogràfiques i estudi anatomopatològic.**

|  | Mida             | CMA                              | Anomalies ecogràfiques        | Evolució     | Anatomia Patològica (AP) /Seguiment postnatal                          |
|--|------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------|--|
| arr[hg18]11q24.1q25(121,430,998-134,450,377)x1<br>arr[hg18]4q34.1q35.2(176,077,869-191,153,672)x3,<br>cas 90 | 13 Mb<br>15 Mb   | CNV Patològica<br>CNV Patològica | TN $\geq$ p99                 | ILE          | AP no concordant: Ronyons en ferradura (Fals negatiu del Dx ecogràfic) |
| arr (2)x2 3 trisomia mosaïcisme cromosoma 2,<br>cas 313  | -                | CNV Patològica                   | TN +<br>Cardiopatia congènita | ILE          | AP no concordant   |
| arr[hg18]16p11.2(29,256,185-30,098,069)x1,<br>cas 157  | 534 kb           | CNV Patològica                   | TN $\geq$ p99                 | ILE          | AP Concordant  |
| arr[GRCh37]16q24.1(86,533,273-86,743,471)x3, cas 255   | 210 kb           | VOUS                             | TN $\geq$ p99                 | Nadó afectat | Nadó: fissura palatina i ronyó ectòpic (Fals negatiu dx ecogràfic)     |
| arr[GRCh37]7p21.2(15614415_16222888)x1<br>arr[GRCh37]2q32.3(193584775_193750372)x1,<br>cas 306               | 608 kb<br>165 kb | VOUS<br>VOUS                     | TN $\geq$ p99                 | Nadó normal  | Nadó normal  |
| arr[GRCh37]8p23.3p22(1573676_16762986)x1,<br>cas 272   | 15 Mb            | CNV Patològica                   | TN+<br>Hèrnia diafragmàtica   | ILE          | AP Concordant  |

Pel que fa al seguiment obstètric, 50 embarassos van arribar a terme i 3 van ser parts preterme. Una de les dues bessonades va ser un part preterme, l'altre a terme. Altres variables han estat també analitzades en el subgrup de gestació única (Taula 8).

Vam tenir una taxa de mortalitat neonatal de l'1,8%, un cas. Es tractava d'un nadó amb una Síndrome de Noonan (cas 302) que va morir a conseqüència de complicacions derivades de la miocardiopatia hipertròfica que presentava.

**Taula 8. Resultats perinatals en els casos de TN  $\geq$  p99 i gestació única.**

|                                       | <b>Fetus TN (<math>p \geq 99</math>)</b> |
|---------------------------------------|--|
| <b>Interrupció legal de l'embaràs</b> | 46% (47/102)                             |
| <b>Nadó viu</b>                       | 50.9% (52/102)                           |
| <b>Part preterme</b>                  | 3.9% (2/51)                              |
| <b>Inducció del part</b>              | 33.3% (17/51)                            |
| <b>Part per cesària</b>               | 35% (18/51)                              |
| <b>Pes al naixement</b>               | 3228g                                    |

En relació amb el seguiment postnatal de la resta de nadons, la valoració neuropediàtrica a curt i mitjà termini (0-36 mesos), ha estat patològica en tres casos (5.6%, 3/53): dues síndromes de Noonan i un cas de síndrome de Pierre-Robin amb paladar fes (cas 255). Aquests nens han necessitat atenció neuropediàtrica en presentar alteracions en el neurodesenvolupament lleus o moderades. Altres 5 nounats (5/53, 9.4%) van rebre atenció a la Unitat de Neonatologia per problemes menys greus, bé derivats de la prematuritat bé de la síndrome de destret respiratori neonatal, i actualment presenten un bon estat de salut.

Comentar també en aquest apartat el cas 92, amb sospita de coartació d'aorta prenatal i confirmació postnatal que va requerir correcció quirúrgica i que donada també una icterícia amb estancament ponderal es va diagnosticar amb posterioritat a més d'un dèficit d'arginasa que va requerir d'un trasplantament fetge (pares portadors del dèficit enzimàtic). Neurològicament presenta una evolució correcte.

L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional va ser del 7,9% (5/61). El 6.5% dels fetus (4/61) van presentar anomalies de l'array que no van ser diagnosticades per cariotip convencional. En els fetus amb TN  $\geq$  p99 sense altres defectes estructurals, l'increment diagnòstic de l'array envers el cariotip convencional va ser de l'11,1% (5/45), a diferència del subgrup de fetus amb TN  $\geq$  p99 i defectes estructurals associats on no va haver-hi increment del rendiment diagnòstic de l'array, donat que les anomalies cromosòmiques eren de mida gran.

**Pel que fa a les CNVs patogèniques, l'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional va ser de l'1,6% (1/61).** Aquesta CNV patogènica es van presentar en un fetus amb TN  $\geq$  p99 sense altres anomalies estructurals associades, aquest subgrup va presentar un increment en el rendiment diagnòstic del 2,2% (1/45). No va haver-hi increment en el rendiment diagnòstic en el subgrup de fetus amb TN  $\geq$  p99 associada a altres anomalies estructurals pel que fa a CNV patogèniques.

## **5.2.2 MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB TRANSLUCÈNCIA NUCAL $\geq$ p95 ( $p \geq 95$ i $< 99$ )**

Un total van ser 30 fetus van presentar una TN  $p \geq 95$  i  $< 99$ . Amb motiu d'un cribratge combinat de I trimestre de risc elevat aquestes gestants van optar per realitzar una tècnica invasiva.

L'edat mitjana materna era de 33,7 anys (rang 17-41), el 46,6% eren primíparas. La mitjana d'edat gestacional en el moment del diagnòstic va ser de 12,1 setmanes.

En analitzar els antecedents obstètrics de la població estudiada, es va observar que el 3,3% (un únic cas) tenien història prèvia d'un fill amb un trastorn del neurodesenvolupament. Es tractava d'un cas amb l'antecedent d'una síndrome velocardio-facial.

En un cas (3,3%), l'embaràs va ser gemel·lar, dizigòtic, però només un dels fetus presentava l'increment de TN  $\geq$  p95 i  $<$  p99.

La QF-PCR es va realitzar, prèviament a l'array-CGH, en tots aquests fetus. El 16,6% (5/30) presentaven alteracions genètiques: 3 casos de trisomia 21, 1 cas de trisomia 18, i 1 cas de síndrome de Klinefelter. Tots ells van sol·licitar la interrupció legal de l'embaràs.

L'array prenatal es va realitzar en 25 casos (83,3%) i es va detectar una CNV patogènica en un cas (4%, 1/25): microdeleció *de novo* (progenitors no portadors), d'aproximadament 1.8Mb a la regió distal de la banda cromosòmica 22q11.2(20,138,950-21,973,223)x1 (cas 220). Aquest cas no va ser diagnosticar per cariotip convencional.

**Va haver-hi increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional del 4%.**

L'estudi ecogràfic morfològic detallat realitzat a les 18-22 setmanes d'embaràs va diagnosticar una malformació fetal associada en 4 casos (4/25, 16%): un cas de CIV, un cas d'ARSA (tots dos confirmats per ecocardiografia fetal) i dos casos d'èctasi pièlica bilateral (amb ronyons normals en els controls ecogràfics del tercer trimestre). En cap fetus es va diagnosticar malformacions en més de dos òrgans o sistemes.

L'ecocardiografia fetal va confirmar les troballes en els dos casos anteriorment mencionats: CIV (1/25, 4%) i l'ARSA.

En cap cas vam detectar la presència d'un plec nucal patològic (PN  $>$  percentil 99) durant el segon trimestre de l'embaràs.

En l'ecografia de tercer trimestre es va diagnosticar també un cas de ventriculomegàlia fetal lleu no confirmada per neurosonografia fetal i sense repercussió postnatal i dos casos de fetus grans per l'edat gestacional (2/23, 8%).

Un total de 5 dones embarassades (16,6%) van sol·licitar la interrupció de l'embaràs a conseqüència de les troballes en l'estudi del cariotip convencional, la QF-PCR o l'array.

S'han produït 2 avortaments, atribuïbles a la tècnica invasiva (6,6%), un dels casos va ser el de la CNV patogènica i l'altre un fetus amb resultat d'array normal. L'estudi anatomopatològic no va proporcionar informació addicional en cap d'aquests casos.

En relació amb el seguiment obstètric, no es va tenir en compte per la valoració d'aquests resultats l'embaràs gemel·lar, dels 22 embarassos van arribar a terme 21, va haver-hi un part preterme a la setmana 34. No hi va haver cap cas de mortalitat intrauterina ni tampoc neonatal (Taula 9).

Pel que fa al seguiment postnatal dels nadons, a la valoració a curt i mitjà termini (0-36 mesos), cap cas ha estat patològic.

**Taula 9. Resultats perinatals en els casos de TN  $p \geq 95$  i  $< 99$  i gestació única.**

|                                       | TN ( $p \geq 95$ i $< 99$ ) |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Interrupció legal de l'embaràs</b> | 16,6% (5/30)                |
| <b>Nadó viu</b>                       | 76,6% (23/30)               |
| <b>Òbit intrauterí</b>                | 0                           |
| <b>Part preterme</b>                  | 4.3% (1/22)                 |
| <b>Inducció del part</b>              | 18.8% (4/22)                |
| <b>Part per cesària</b>               | 13.6% (3/22)                |
| <b>Pes al naixement</b>               | 3154g                       |

### 5.2.3. MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB PN PATOLÒGIC ( $p > 99$ ) AL II TRIMESTRE

Pel que fa al PN de II trimestre també s'ha volgut establir la correlació amb entre les troballes de l'array i els resultats perinatals.

En l'apartat 5.2.1. s'han comentat cinc casos (7,8%, 5/64) amb diagnòstic de  $TN \geq p99$  al primer trimestre i un  $PN > p99$  durant el segon trimestre de l'embaràs. En aquest subgrup es va detectar un major índex de problemes de neurodesenvolupament i de dismorfies facials (2/5 casos, 40%). A continuació analitzarem els resultats dels diagnòstics de  $PN > p99$  al II trimestre en aquelles gestacions on l'ecografia del primer trimestre va ser normal, inclosa la valoració de la TN.

En total van ser 24 casos inclosos.

L'edat mitjana materna va ser de 30,6 anys (rang 21-38), el 37,5 % (9/24) eren primíparas i el 62,5% multíparas. La mitjana d'edat gestacional en el moment del diagnòstic va ser de 20,6 setmanes.

Al estudiar els antecedents obstètrics de la població estudiada, es va observar un cas (cas 141, 4,1%) que presentava història prèvia d'un fill amb un trastorn no filiat del neurodesenvolupament i amb bona evolució posterior.

No hi va haver cap cas de gestació gemel·lar.

Tot i que no es recomana l'estudi rutinari dels marcadors de cromosomopatia, en el cas que durant l'exploració anatòmica fetal (18-22 setmanes) es detecti algun d'aquests marcadors, s'ha de realitzar la recerca dirigida de la resta de marcadors a fi de reavaluar el risc previ de síndrome de Down per a la gestant i s'establir un nou risc amb l'aplicació dels quocients de probabilitat (Likelihood Ratio, LHR). Quan el resultat ha estat d'alt risc per trisomies es va indicar una tècnica invasiva.

Els marcadors ecogràfics avaluats han estat:

- Ventriculomegàlia
- **Plec nucal**
- Longitud fèmur
- Longitud húmer
- Focus hiperecogènic intracardíac
- Èctasi pièlica renal
- ARSA
- Os nasal hipoplàsic o absent
- Intestí hiperecogènic



L'array prenatal es va realitzar en els 24 casos, sense diagnosticar-se cap anomalia cromosòmica numèrica. Es van detectar dues VOUS (2/24, 8,3%):

- ❖ Duplicació de 375 kb a la banda cromosòmica 20q13.33(61,973,901-62,331,113)x3 que afecta el gen *SOX18* (cas 49).
- ❖ Duplicació de 304 kb a la banda cromosòmica 16q22.1 (67116261\_67420757)x3, que no coincidien amb CNVs polimòrfiques i podien alterar l'estructura o gens de referència (cas 279).

Aquestes alteracions han estat classificades com a VOUS, ja que no hi ha prou literatura encara per classificar-les com benignes o patogèniques. Aquests casos no es podrien diagnosticar per cariotip convencional (Taula 10).

**Taula 10. CNVs detectades en els fetus amb PN (p >99) durant el II trimestre de gestació. Troballes ecogràfiques i detecció per cariotip convencional.**

|  | Mida   | CMA  | Detectable per cariotip | Anomalies ecogràfiques | Seguiment |
|--|--------|------|-------------------------|------------------------|-----------|
| arr[hg18]20q13.33(61,973,901-62,331,113)x3, cas 49 | 375 kb | VOUS | No                      | PN > p99               | Epilèpsia |
| arr[hg18]16q22.1(67116261_67420757)x3, cas 279     | 304 kb | VOUS | No                      | PN > p99               | Normal    |

L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional va ser del 8,3%. **No vam detectar un increment del rendiment diagnòstic del microarray** sobre el cariotip convencional en els fetus amb PN > p99 i malformacions estructurals, però comentar que només van ser dos casos. Tampoc **per CNVs patogèniques**, donat que en aquest subgrup només vam diagnosticar dos casos de VOUS.

L'estudi ecogràfic morfològic detallat entre les 18-22 setmanes de l'embaràs va diagnosticar dos casos de malformacions fetals associades a l'augment del PN > p99 (2/24,4.1%): un cas d'hidronefrosi congènita bilateral de baix grau (UTD A1, cas 13) i una duplicitat pièlica renal unilateral (cas 176). Durant el tercer trimestre es van diagnosticar un cas de hidronefrosi fetal de d'alt grau (UTD A3, cas 56) i 5 fetus amb un pes estimat superior al percentil 90 per l'edat gestacional (5/24, 20%). En cap fetus es va diagnosticar malformacions en més de dos òrgans o sistemes. No es va realitzar cap altra tècnica d'imatge addicional.

L'estudi d'infeccions prenatales de toxoplasma, rubèola, parvovirus B19, virus de l'herpes simplex (VHS-1 i VHS-2) i citomegalovirus (CMV) va ser negatiu en tots els casos.

Cap dona va sol·licitar la interrupció legal de l'embaràs a conseqüència de les troballes en l'estudi de l'array i/o les anomalies fetals detectades per ecografia.

No es va produir cap avortament en aquest subgrup atribuïble a la tècnica invasiva.

Pel que fa als resultats perinatals, tots els embarassos van arribar a terme. Altres variables han estat també analitzades (Taula 11).

**Taula 11. Resultats perinatals en els casos de PN > p99, exclosos el PN persistents.**

| <b>Setmanes de gestació al part</b> | 39.2         |
|-------------------------------------|--------------|
| <b>Nadó viu</b>                     | 100% (24/24) |
| <b>Òbit intrauterí</b>              | --           |
| <b>Part preterme</b>                | 4.3% (1/24)  |
| <b>Inducció del part</b>            | 20.8% (5/24) |
| <b>Part per cesària</b>             | 12.5% (3/24) |
| <b>Pes al naixement</b>             | 3456g        |

Els resultats perinatals del grup de PN > p99 amb TN ≥ p99 a I trimestre han estat tractats de forma independent (Taula 12).

**Taula 12. Resultats perinatals en els casos de TN ≥ p99 persistent.**

| <b>Interrupció legal de l'embaràs</b> | --         |
|---------------------------------------|------------|
| <b>Setmanes de gestació al part</b>   | 40.2       |
| <b>Nadó viu</b>                       | 100% (5/5) |
| <b>Èxitus postpart</b>                | 20% (1/5)  |
| <b>Part preterme</b>                  | ---        |
| <b>Inducció del part</b>              | 20% (1/5)  |
| <b>Part per cesària</b>               | 20% (1/5)  |
| <b>Pes al naixement</b>               | 3541g      |

Pel que fa al seguiment postnatal i la valoració a curt i mitjà termini (0-36 mesos) dels nadons, que prenatalment havien presentat un PN > p99, només un cas (cas 49) va presentar durant el segon any de vida una epilèpsia focal estructural amb hipoplàsia de l'hipocamp esquerre, actualment en seguiment i tractament per Neurologia pediàtrica, amb un neurodesenvolupament correcte per l'edat.

Ja s'ha comentat prèviament (apartat 5.2.1) que el subgrup PN > p99 a II trimestre amb TN ≥ p99 a I trimestre va presentar un major índex de problemes de neurodesenvolupament i de dismorfies facials (40%).

### 5.3 MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB MALFORMACIONS ESTRUCTURALS

En aquesta sèrie s'han inclòs un total de 154 fetus amb malformacions diagnosticades prenatalment.

Hem analitzat prèviament alguns d'aquests casos de fetus amb malformacions estructurals bé perquè s'havien associat a restricció precoç del creixement intrauterí bé perquè s'havien associat a TN / PN patològics:

- En el grup de fetus amb **CIR/RCIU precoç**, un total de 6 fetus van presentar malformacions estructurals associades (6/27, 22,2%): 2 casos d'anomalia cardiovascular (un cas de CIV muscular i un cas d'arc aòrtic dret), 3 casos d'anomalia dels SNC (2 casos de VMG i un cas de quist aracnoïdal). Hi va haver també un cas de peus bots. Aquest darrer cas es va associar a una CNV patogènica ja descrita (duplicació 1q32.2q42.2) igual que el cas 280 del fetus amb arc aòrtic dret associat a una CNV patogènica (deleció 21q22.3) també descrita prèviament (2/6, 33,3%) (Taula 4).
- En el grup de **TN  $\geq$  p99, els casos diagnosticats d'anomalies ecogràfiques fetals** han estat 18 (18/64, 28,1%). Dels quals 9 van ser fetus amb cardiopatia congènita i els altres 9 van ser: 2 hèrnies diafragmàtiques, 2 casos de defectes de paret abdominal, 2 casos de malformacions renals i 2 fetus amb hidrops. Un cas d'anomalia d'extremitats superiors i inferiors (Figura 7).

En el subgrup de CC i TN  $\geq$  p99 es van identificar 4 casos d'anomalies cromosòmiques (44,4%, 3 aneuploidies i el cas del mosaic de la trisomia 2).

Tres fetus més van ser diagnosticats en aquest subgrup, de TN  $\geq$  p99 i malformacions ecogràfiques, de CNVs: 1 cas de CNV patogènica i diagnòstic prenatal de malformació fetal (cas 272) i 2 casos on l'associació a malformació fetal va establir-se amb posterioritat: un d'ells després de la interrupció legal de l'embaràs (cas 90) i postpart a l'altre (VOUS, cas 255, Síndrome de Pierre-Robin) (Taula 13).

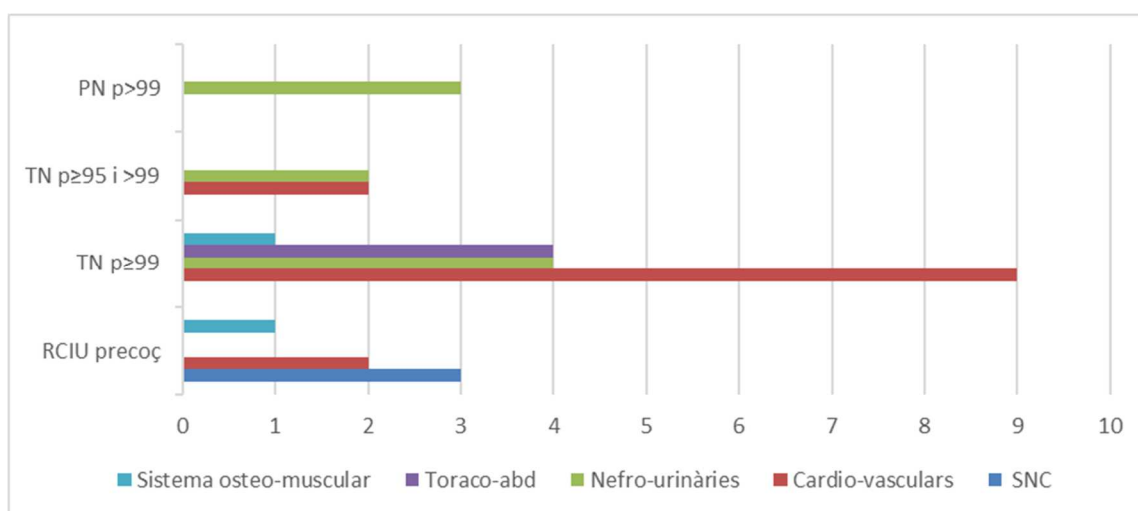
**Taula 13. CNVs detectades en els fetus amb TN  $\geq$  percentil 99 i malformació fetal.**

|  | Mida           | CMA            | Anomalies ecogràfiques     | Evolució     | Anatomia Patològica (AP) /Seguiment nadó              |
|--|----------------|----------------|----------------------------|--------------|---|
| arr[hg18]11(11q24.1q25(121,430,998-134,450,377)x1<br>arr[hg18]4q34.11q35.2(176,077,869-191,153,672)x3,<br>cas 90 | 13 Mb<br>15 Mb | CNV Patogènica | TN $\geq$ 99 <sup>th</sup> | ILE          | AP no concordant: Ronyons en ferradura (Fals negatiu) |
| Arr(2)x2~3 trisomia mosaïcisme cromosoma 2,<br>cas 313   | -              | CNV Patogènica | TN + Cardiopatia congènita | ILE          | AP Concordant   |
| arr[GRCh37]16q24.1(86,533,273-86,743,471)x3,<br>cas 255  | 206 kb         | VOUS           | TN $\geq$ 99 <sup>th</sup> | Nadó afectat | Nadó: fissura palatina i ronyó ectòpic                |
| arr[GRCh37]8p23.3p22(1573676_16762986) x1,<br>cas 272  | 15 Mb          | CNV Patogènica | TN +Hernia diafragmàtica   | ILE          | AP Concordant   |

- **Malformacions associades a TN p95-99** van ser: una CIV muscular, una ARSA i dos casos de HNF congènita de baix grau (UTD A1) (4/25, 16%). No hi va haver cap associació a anomalies del cariotip molecular entre aquests fetus amb TN p95-99 i malformacions estructurals associades (figura 9).
- **Malformacions associades a PN > p99 al II trimestre** van ser: un cas de HNF congènita bilateral de baix grau (UTD A1, cas 13), un cas de HNF congènita unilateral d'alt grau (UTD A3) i un cas amb una duplicitat pièlica renal unilateral (3/24, 12.5%). Tampoc hi va haver associació amb anomalies del cariotip entre aquest fetus amb PN >p99 i malformacions estructurals associades (Figura 9).

L'ecografia del tercer trimestre en aquests casos va resultar útil a l'hora de fer els controls del creixement i realitzar el seguiment evolutiu de la patologia prèviament diagnosticada al I-II trimestre, tan sols un cas de PN > p99 i anomalia renal va ser diagnosticat al tercer trimestre.

**Figura 9. Malformacions associades a CIR, TN (p > 95 i > 99, p ≥ 99) i PN > p99.**



La resta, **un total de 123 casos** inclosos al nostre estudi, no associats als apartats ja anteriorment descrits, on la malformació fetal no es trobava associada ni a CIR ni a TN-PN patològics es descriuran a continuació.

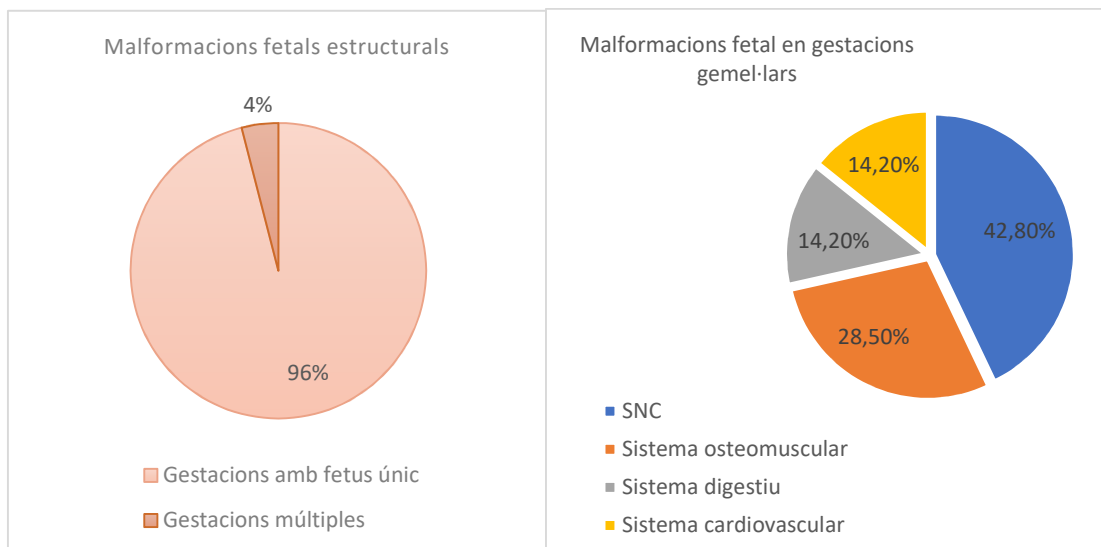
L'edat mitjana materna va ser de 31,9 anys (rang 18-42), el 56% eren primíparaes i el 44% multipares.

La mitjana d'edat gestacional en el moment del diagnòstic va ser de 20,1 setmanes.

L'anàlisi dels antecedents obstètrics d'aquesta població va mostrar que 11 casos (11/123, 8,9%) presentaven història prèvia d'un fill amb malformació congènita i/o alteració del neurodesenvolupament.

Hi va haver 118 gestacions úniques i 6 gestacions gemel·lars dizigòtiques, 5 d'elles amb un únic fetus afectat i una amb ambdós fetus afectats. Cap d'aquestes gestants amb gestació gemel·lar i un fetus amb malformació estructural va sol·licitar la interrupció legal de l'embaràs ni tampoc el feticidi selectiu. La gestant amb gestació gemel·lar i els dos fetus afectes d'una seqüència acrània-exencefàlia-anencefàlia va sol·licitar la interrupció legal de l'embaràs (Figura 10).

**Figura 10. Malformacions estructurals fetals, sense associació a CIR ni TN/PN patològics, en gestacions múltiples.**



Es va realitzar tècnica invasiva en les 123 gestacions. La QF-PCR va resultar patològica en 11 casos (8,9%): dos casos de trisomia 21 associats a cardiopatia congènita amb cribatge combinat de I trimestre d'alt risc per trisomia 21 i TN normal a l'ecografia de I trimestre, sis casos de trisomia 18 (dos casos associats a cardiopatia congènita amb cribatge combinat de I trimestre d'alt risc per trisomia 18 i ecografia de I trimestre normal, tres casos amb altres anomalies a l'ecografia de I trimestre i un cas d'artrogriposi diagnosticat al segon trimestre amb interrupció tardana de la gestació (denegada pel Comitè, la dona va marxar a fer la interrupció de l'embaràs a l'estranger), dos casos de trisomia 13 amb anomalies estructurals fetals majors ja a l'ecografia del I trimestre i un cas de triploïdia. A més vam diagnosticar un cas de pseudomosaïcisme sense significació clínica donat que només es va detectar en un dels cultius cel·lulars en un fetus que presentava una gastròsquisi (cas 252).

Tots ells van sol·licitar la interrupció legal de l'embaràs. El cas de triploïdia (cas 247) va ser un avortament postamniocentesi.

L'array prenatal es va realitzar en 112 casos i es van trobar 8 CNVs en 7 fetus (7/112, 6.2%). Un cas de cardiopatia congènita fetal va ser diagnosticat d'una CNV patològica just en néixer donat que va ser un diagnòstic prenatal en el tercer trimestre. Van ser en total 3 VOUS (1 fetus presentava 2 VOUS) i 5 CNVs patològiques (Taula 14).

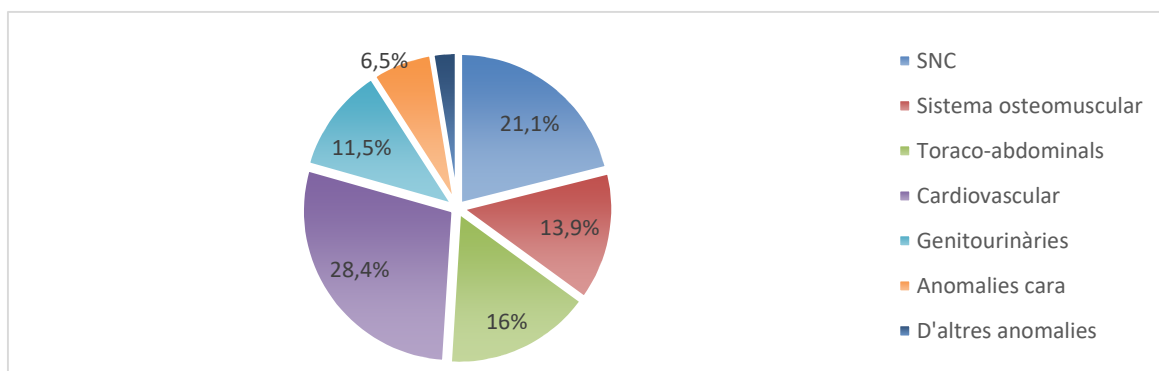
**Taula 14. CNVs i malformacions estructurals fetals aïllades (no associades a CIR ni a TN/PN patològics).**

|   | <b>Mida</b>      | <b>CMA</b>                         | <b>Detectable per cariotip</b> | <b>Anomalies ecogràfia</b> | <b>Seguiment de la gestació</b> | <b>Anatomia Patològica (AP) /Seguiment neuropediàtric postnatal</b> |
|---|------------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| arr[hg18]22q11.21(17,274,835-19,835,417)x1, cas 24  | 2.6 Mb           | CNV Patogènica                     | No                             | Cardiopatia congènita      | ILE                             | AP concordant: Doble sortida de ventricles dret i CIV               |
| arr[hg18]17q21.32q21.33(46,361,999-48,837,400)x1, cas 28  | 2.4 Mb           | CNV Patogènica                     | No                             | Cardiopatia congènita      | Nadó afectat.                   | Dismòrfia facial i discapacitat intel·lectual                       |
| arr[hg18]13q14.11q14.2(41,637,500-48,222,028)x1, cas 136  | 6.5 Mb           | CNV Patogènica                     | No                             | Anomalia EEII              | ILE                             | --  |
| arr[hg18]17q21.31(40,926,210x2, 41,011,530-41,411,804x3, 41, 426, 500-41,494,390x2, 41,544,224-41, 706, 929x3, 41, 983407x2), cas 216 | 400 kb<br>162 kb | CNV Patogènica Progenitor portador | No                             | VMG                        | Nadó a terme                    | Neurologica-ment normal   |
| arr[hg19]3p26.3p26.2(2,724,887-2,993,574)x1, cas 297  | 268 kb           | CNV Patogènica Progenitor portador | No                             | Omfalocèle i anomalia EEII | ILE                             | AP concordant   |
| arr[hg18] 7p15.3(21,714,059-21,994,454)x4, cas 182  | 280 kb           | VOUS                               | No                             | Cardiopatia congènita      | Nadó a terme                    | Dismòrfia facial  |
| arr[hg18]5q23.11q23.2(120,130,212-121,800,740)x3<br>arr[hg18]9p24.3(307,082-878,209)x3, cas 132                                       | 1.6 Mb<br>271 kb | VOUS<br>VOUS Progenitors portadors | No<br>No                       | Arc aòrtic dret            | Nadó a terme                    | Neurologica-ment normal   |

**L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional en els casos dels fetus amb malformacions estructurals va ser del 7,1% (8/112). El 6,2% dels fetus avaluats van presentar alteració de l'array-CGH. L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional per a variants patogèniques va ser del 4,4% (5/112).**

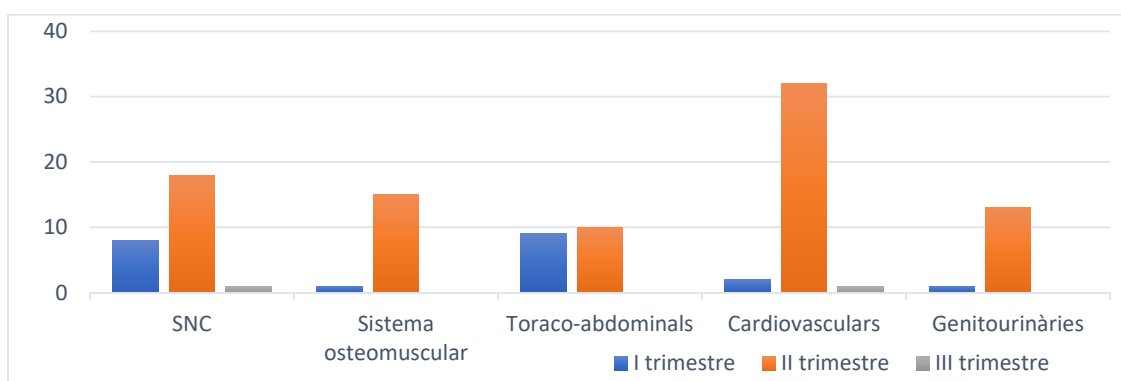
Les anomalies del SNC i les cardiopaties congènites van ser les malformacions fetals diagnosticades amb major freqüència (Figura 11).

**Figura 11. Malformacions estructurals fetals, sense associació a CIR ni TN/PN patològics.**



En analitzar les malformacions i el moment del seu diagnòstic s'observa que és en el segon trimestre on es van diagnosticar més malformacions fetals (Figura 12).

**Figura 12. Malformacions estructurals fetals analitzades per òrgans o sistemes, en fetus sense associació a CIR ni TN/PN patològics, segons el moment del diagnòstic.**



**A continuació s'analitzen les malformacions estructurals fetals per òrgans o sistemes afectats.**

#### **- Malformacions del SNC.**

Pel que fa a les malformacions del SNC, es van diagnosticar un total de 26 casos (26/123, 21,1%): 8 casos al I trimestre i 18 al II trimestre.

Els defectes del tub neural (DTN) i les ventriculomegàlies van ser les malformacions més freqüentment diagnosticades. Els DTN són un grup heterogeni d'anomalies del SNC que abasten des de l'acrània a l'encefalocele passant per la iniencefàlia i l'espina bífida. A l'ecografia del primer trimestre quatre fetus (15,3%) van ser diagnosticats d'acrània-exencefàlia-anencefàlia, dos fetus d'encefalocele i dos d'holoprosencefàlia. En el segon trimestre, la ventriculomegàlia va ser la malformació més freqüentment diagnosticada (57,6%).

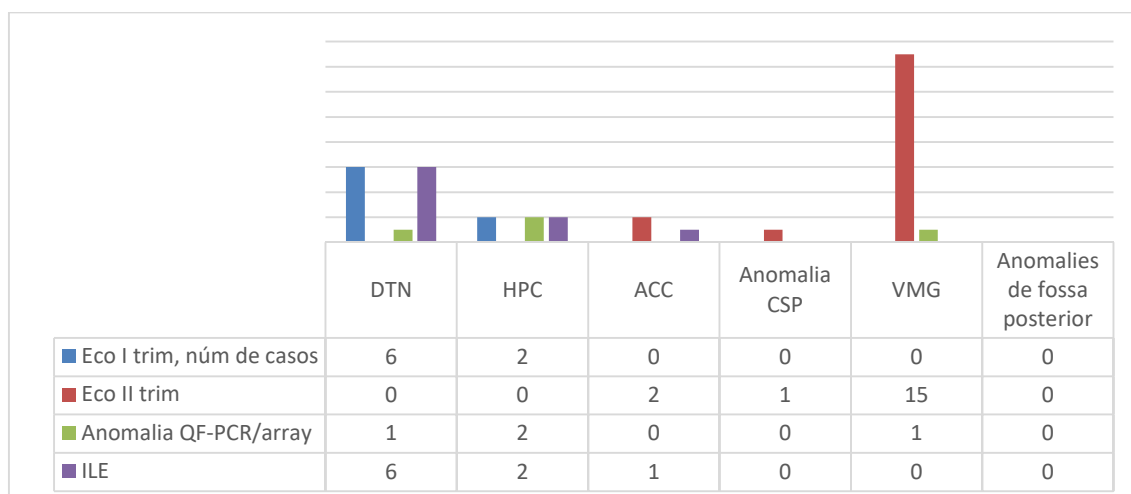


Quatre casos (4/26, 16%) van presentar anomalies en l'array/QF-PCR: dos casos de trisomia 13 associada a holoprosencefàlia, un cas de trisomia 18 en un fetus amb diagnòstic de seqüència acrània-exencefàlia-anencefàlia i un cas d'anomalia a l'array en un fetus amb ventriculomegàlia, concretament una duplicació de la banda cromosòmica 17q21.31 de 400 kb i 162 kb amb un interval de dosi normal que implicava al gen *KANSL1* (cas 216). **L'increment diagnòstic de l'array-CGH per a variants patogèniques va ser del 4,3%.**

Un fetus diagnosticat de VMG i CIV perimembranosa va ser òbit intraúter (cas 311).

En dos fetus (2/26, 7,6%) diagnosticats d'anomalies del SNC hi havien malformacions associades a altres òrgans, concretament en els dos casos (cas 273 i cas 300) es va associar una encefalocèle a una malformació renal, diagnosticant-se ambdós fetus d'una síndrome de Merckel-Gruber (Figura 13).

**Figura 13. Anomalies del SNC diagnosticades al primer i segon trimestre, anomalies de la QF-PCR/array-CGH i ILEs.**



Peu de figura. Defecte del tub neural (DTN), holoprosencefàlia (HPC), agenèsia cos callós (ACC), anomalia del còccum del septum pellucidum (CSP), ventriculomegàlia (VG).

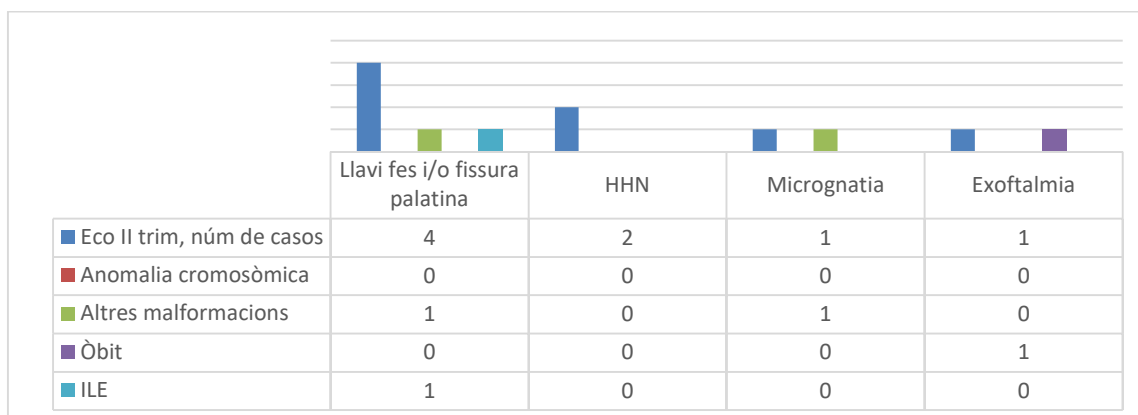
### - Anomalies del macís facial.

En 8 casos es van diagnosticar anomalies del macís facial (8/123, 6.5%), tots a l'ecografia del segon trimestre: quatre fetus amb llavi fes i/o fenedura palatina, dos casos d'hipoplàsia d'os nasal (HHN), un cas de dismòrfia amb exoftàlmia (que va ser òbit intraúter, cas 3) i un cas de seqüència Pierre-Robin (cas 135). Tant el cas de la seqüència Pierre-Robin com el del llavi fes-fenedura palatina, les malformacions van presentar-se associades a anomalies dels genitals (cas 137, síndrome del pterigium popliteal o síndrome facio-gènito-popliti), tots dos casos van presentar malformacions en més d'un òrgan o sistema (2/8,25%).

En tots els casos l'array-CGH prenatal va ser normal (Figura 14). Es van estudiar possibles mutacions responsables dels fenotips fetals en aquests dos últims casos

comentats (cas 135 i 137), però només en el cas 137 es va identificar en el fetus la mutació c.250C>T(p.Arg84Cys) en heterozigosi en el gen *IRF6* que confirmava el diagnòstic de la síndrome pterigium popliteal.

**Figura 14. Anomalies de la cara i associació amb anomalies cromosòmiques.**

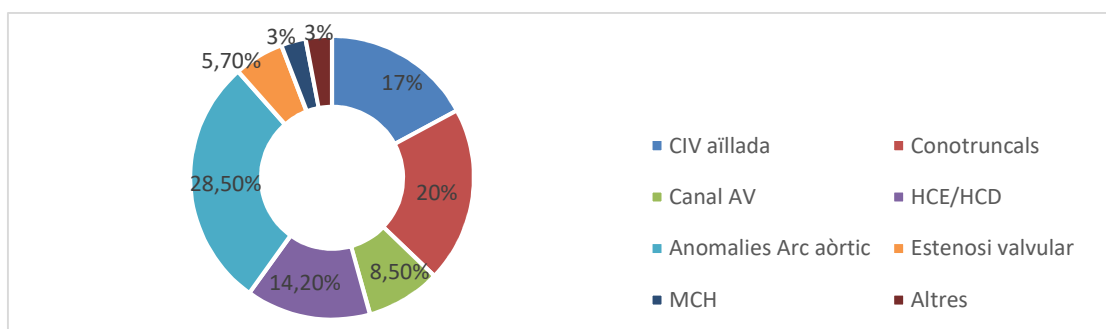


Peu de figura. Hipoplàsia de l'os nasal (HHN).

### - Malformacions cardiovasculars.

Es van diagnosticar un total de 35 fetus amb anomalies cardiovasculars (TN p < 95 a l'ecografia de I trimestre, altrament estarien inclosos en el fetus amb diagnòstic de TN patològica). Les cardiopaties congènites (CC) diagnosticades amb més freqüència van ser les cardiopaties conotruncals en un 20% dels casos i les CIV aïllades en un 17% (6/35) dels casos (Figura 15).

**Figura 15. Diagnòstic prenatal de les malformacions cardiovasculars fetals.**



Peu de figura. Comunicació interventricular (CIV), canal atrioventricular (canal AV), hipoplàsia cavitats esquerres (HCE), hipoplàsia cavitats dretes (HCD).

En 9 casos el fetus (9/35, 25,7%) va ser diagnosticat d'una anomalia genètica associada, bé per alteracions de la QF-PCR o bé per detecció de l'array-CGH: dos casos de trisomies 21, dos casos de trisomia 18, una triploïdia, tres casos de CNVs de significat incert (VOUS) en dos fetus (un fetus va presentar dues VOUS) i dos casos de CNVs patogèniques.

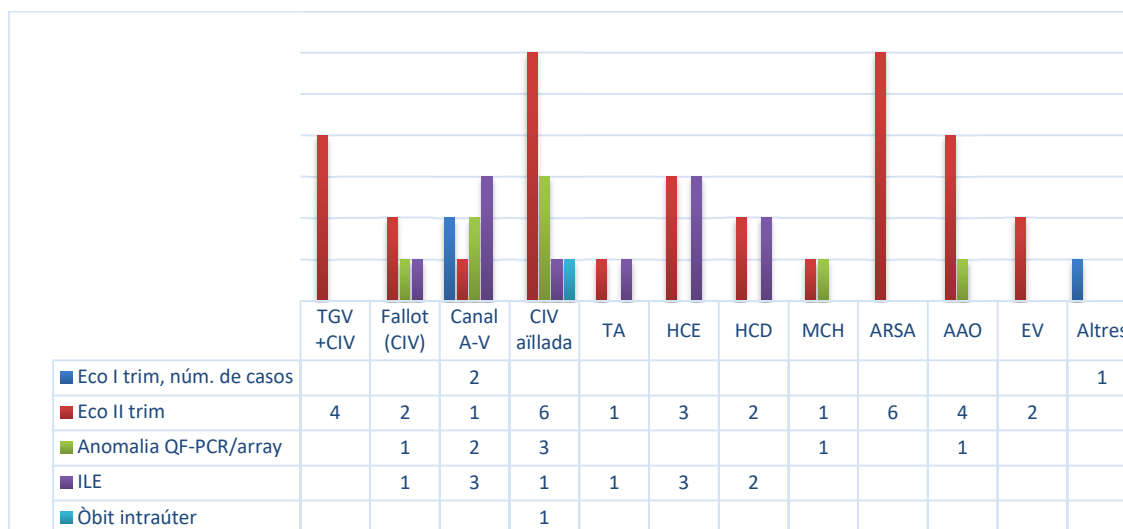
El canal AV (2/3 casos, 66,6%) i la CIV perimembranosa (3/4, 75%) van presentar una alta associació amb anomalies de la QF-PCR i/o array (Taula 15).

**Taula 15. Resultat de l'array en els fetus amb cardiopatia congènita de diagnòstic al II trimestre i TN al I trimestre p < 95.**

|  | Mida              | CMA            | Cardiopatia congènita                        | Seguiment de la gestació | Anatomia Patològica (AP) /Seguiment postnatal |
|--|-------------------|----------------|--|--------------------------|---|
| Deleció 22q11.21(17,274,835-19,835, 417)x1, cas1   | 2.6 Mb            | CNV Patogènica | Fallot vs doble sortida ventricle dret i CIV | ILE                      | Doble sortida de ventricle dret i CIV         |
| Deleció 17q21.32q21.33(46,361,999-48,837,400)x1, cas 28  | 2.4 Mb            | CNV Patogènica | MCH  | Nadó afectat             | --  |
| Duplicació 5q23.1q23.2(120,130,212-121,800,740)x3<br>Duplicació 9p24.3(607,082-878,209)x3, cas 132 | 1.67 Mb<br>271 kb | VOUS<br>VOUS   | Arc aòrtic dret                              | Nadó sa                  | --  |
| Duplicació 7p15.3(21,714,059-21,994, 454)x4, cas 182   | 280 kb            | VOUS           | CIV perimembranosa                           | Dismòrfia                | --  |

Del total de 12 CIVs diagnosticades durant el període d'estudi, 6 van ser CIVs aïllades (3 CIVs musculars i 3 CIVs perimembranoses) i les altres 6 van ser CIVs perimembranoses associades a cardiopatia congènita major (4 casos de TGV i 2 casos de Tetralogia de Fallot). En 3 casos (3/6, 50%) la CIV aïllada es va associar a anomalies genètiques: una trisomia 18, una triploïdia (ambdues diagnosticades per QF-PCR) i un cas de CNV de significat incert (VOUS) diagnosticat a l'array. En tots tres casos la CIV era perimembranosa. L'associació de CIV a una altra cardiopatia i anomalia de l'array només va coincidir en un fetus (cas 24). La CIV perimembranosa ha estat de pitjor pronòstic que la CIV muscular i amb major associació a anomalies cardíques i cromosòmiques (Figura 16).

**Figura 16. Cardiopaties congènites diagnosticades i anomalies del cariotip convencional i/o array prenatal.**



Peu de figura. Transposició de grans vasos (TGV), comunicació interventricular (CIV), canal atrioventricular (canal A-V), truncus arteriós (TA), hipoplàsia cavitats esquerres (HCE), hipoplàsia cavitats dretes (HCD), miocardiopatia hipertròfica (MCH), artèria subclàvia dreta aberrant (ARSA), anomalies d'arc aòrtic (AAO), estenosis valvulars (EV).

La taxa d'associació d'anomalies cardiovasculars a malformacions extracardíaques va ser del 14,6%. Aquests casos no estan analitzats en aquest subgrup sinó en el subgrup de la malformació major diagnosticada a la qual s'han associat (Taula 16).

Un total de 10 fetus van ser diagnosticats d'anomalies de l'arc aòrtic, 6 d'ells eren fetus amb artèria subclàvia dreta aberrant (ARSA).

La interrupció legal de la gestació es va sol·licitar en 11 casos. Durant el seguiment de l'embaràs es va produir un òbit intraúter.

**L'increment diagnòstic de l'array-CGH per aquest subgrup de malformacions amb cariotip aparentment normal ha estat del 16,6% per a CNVs i del 6,6 % per a CNVs patogèniques.**

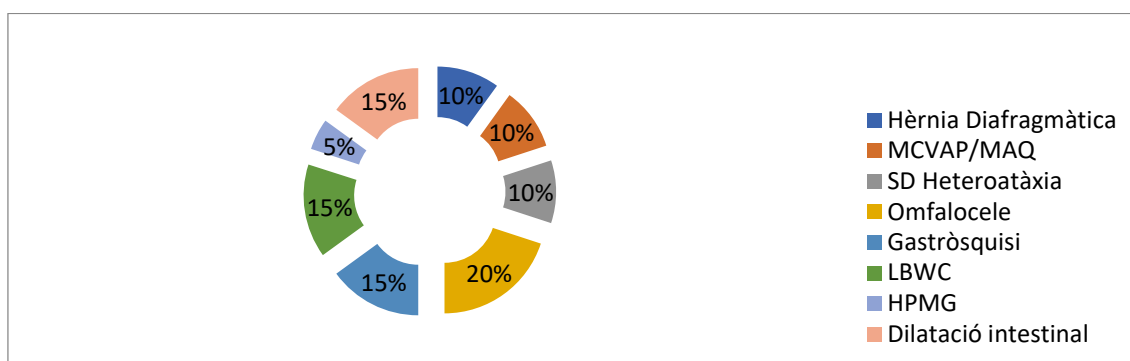
**Taula 16. Casos prenatals d'associació d'anomalies cardiovasculars fetals a altres malformacions estructurals.**

| casos   | Cardiopatia congènita | Altres malformacions                             |
|---------|-----------------------|--|
| Cas 50  | Peu bot               | Persistència vena cava superior esquerra (PVCSE) |
| Cas 178 | Peu bot               | ARSA   |
| Cas 249 | Genitals ambigus      | CIV perimembranosa                               |
| Cas 259 | Ronyó displàsic       | ARSA   |
| Cas 281 | Ronyó multiquístic    | CIV muscular                                     |
| Cas 311 | VMG severa            | CIV perimembranosa                               |

#### - Malformacions toracoabdominals.

Un total de 20 casos van ser diagnosticats de malformacions toracoabdominals. En I trimestre es van diagnosticar 10 casos (50%) i en II trimestre 10 casos més (Figura 17).

**Figura 17. Malformacions toracoabdominals de diagnòstic prenatal.**

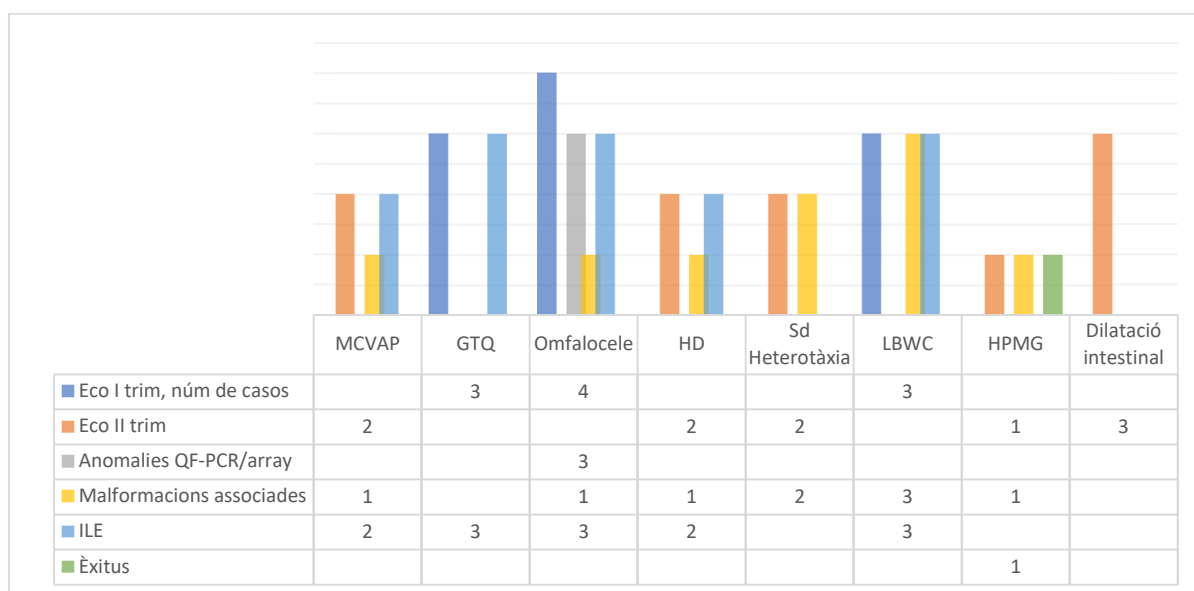


Peu de figura. Malformació congènita de la via aèria pulmonar (MCVAP), Hèrnia diafragmàtica (HD), Limb-body wall complex (LBWC), Hepatomegàlia (HPMG).

Pel que fa a les malformacions toràciques vam diagnosticar dos casos de malformacions congènites de la via aèria pulmonar (MCVAP/MAQ). En un d'aquests casos (cas 162) el fetus presentava a més a més una agenèsia renal. Tots dos casos van tenir un resultat normal de l'array-CGH, però ambdues gestants van sol·licitar la interrupció legal de la gestació.

Pel que fa a la resta de malformacions d'aquest subgrup es van diagnosticar: quatre casos d'omfalocele, tres casos de gastròsquisi, dos casos d'hèrnia diafragmàtica (HDC), dos casos de síndrome d'heterotàxia, tres casos de Limb-body wall complex (LMWC), tres casos de dilatacions intestinals i un cas d'hepatomegàlia (Figura 18).

**Figura 18. Malformacions toracoabdominals de diagnòstic prenatal, anomalies de la QF-PCR/array-CGH i resultat perinatal.**



Peu de figura 16. Malformació congènita de la via aèria pulmonar (MCVAP), Gastròsquisi (GTQ), Hèrnia diafragmàtica (HD), Limb-body wall complex (LBWC), Hepatomegàlia (HPMG).

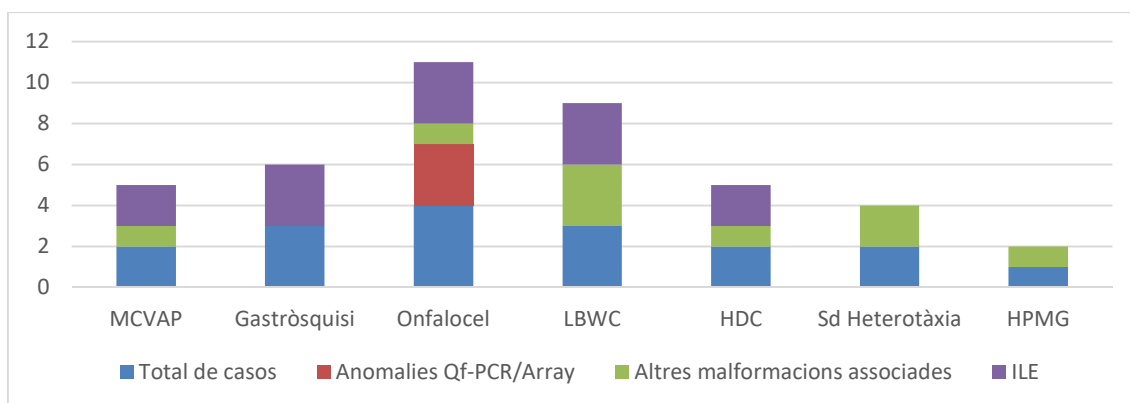
Pel que respecta a les anomalies de la QF-PCR/array-CGH, dels quatre casos d'omfalocele, dos es van associar a una trisomia 18 i un tercer cas va presentar una anomalia a l'array, una deleció terminal en el braç curt del cromosoma 3 (heretada via paterna), no relacionada directament amb l'omfalocele. Vam detectar que aquesta deleció alterava l'estructura del gen de referència *CNTN4*, associat a susceptibilitat per a trastorns del neurodesenvolupament (3/4, 75%). Els 3 casos de gastròsquisi no van presentar associació a alteracions ni de la QF-PCR ni de l'array-CGH. Dos casos de LBWC van tenir lloc en una mateixa gestant (casos 188 i 268), es tractava d'una patologia recurrent motiu pel qual es va cursar un exoma clínic sense resultat conclouent (Taula 17). **L'increment diagnòstic de l'array-CGH per aquest subgrup de malformacions amb cariotip aparentment normal per a CNVs patogèniques ha estat del 5,5%.**

**Taula 17. Anomalies a l'array-CGH en els fetus amb malformacions toracoabdominals.**

|  | Mida   | CMA            | Malformació toraco-abdominal | Seguiment de la gestació | Anatomia Patològica (AP)                              |
|--|--------|----------------|------------------------------|--------------------------|---|
| Deleció3p26.3p26.2(2740059_2962629)x1, cas 297 | 223 kb | CNV patogènica | Omfalocele i anomalia EEII   | ILE                      | Omfalocele, anomalia EEII i agenèsia renal unilateral |

L'associació a altres malformacions fetals en va produir-se en 9 casos (9/20, 45%) (Figura 19).

**Figura 19. Casos prenatals d'associació d'anomalies toracoabdominals fetals a altres malformacions estructurals.**



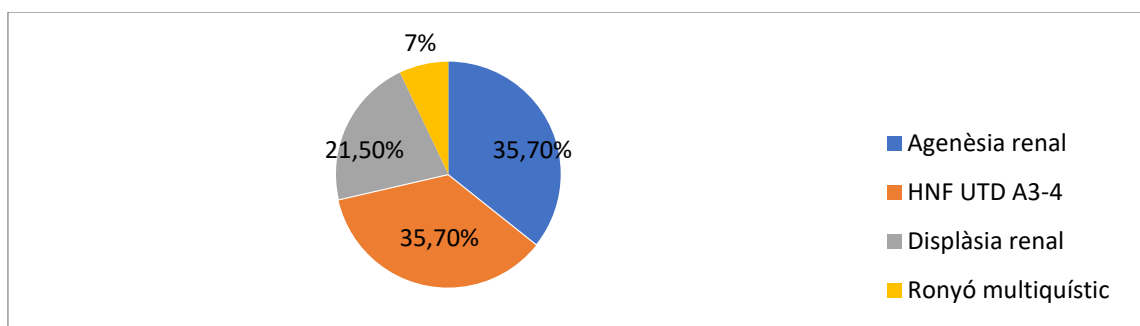
Peu de figura 16. Malformació congènita de la via aèria pulmonar (MCVAP), Hèrnia diafragmàtica (HD), Limb-body wall complex (LBWC), Hepatomegàlia (HPMG).

### - Malformacions nefrourològiques.

Es van diagnosticar 14 casos de malformacions nefrourològiques: 1 cas en I trimestre i 13 casos en II trimestre (Figura 20).

Cap cas va presentar associades anomalies de la QF-PCR/cariotip convencional ni de l'array-CGH.

**Figura 20. Malformacions nefrourològiques de diagnòstic prenatal.**



En tres casos les malformacions nefrourològiques es van associar a altres anomalies estructurals (3/15, 20%): un cas de fetus amb ronyó multiquístic va ser diagnosticat també d'una CIV muscular (cas 281) i un altre cas de fetus amb ronyons displàsic i seqüència de Potter, que va ser èxitus postpart immediat (la gestant no va sol·licitar una ILE, cas 259), va ser diagnosticat prenatalment també d'una artèria subclàvia dreta aberrant (ARSA). Un tercer cas de fetus amb MAQ va presentar una agenèsia renal dreta, aquest cas ja ha estat comentat durant l'anàlisi del subgrup de fetus amb malformacions toracoabdominals.

En aquest subgrup de malformacions es van diagnosticar dos casos de fetus amb displàsia renal bilateral i seqüència de Potter, en un d'aquests casos la gestant va sol·licitar una ILE (1/14, 7,1%) i en l'altre el nounat va ser un èxitus postpart immediat conseqüència d'una displàsia pulmonar severa (7,1%).

#### **- Malformacions d'òrgans genitals.**

S'han diagnosticat dos casos de fetus amb malformacions de l'aparell genital. Tots dos a l'ecografia de II trimestre (cas 59 i cas 249). El cas 59 es tractava d'un fetus amb genitals ambigus i una extròfia vesical com a quadre malformatiu amb array normal. El cas 249 presentava també uns genitals ambigus i una CIV perimembranosa. L'array d'aquest cas també va ser normal.

En tercer cas, el cas 137 ha estat analitzat amb els defectes craniofacials donat que la malformació major diagnosticada va ser un llavi fes, però també va presentar un lleu hipospàdies. L'anatomia patològica d'aquest cas (ILE) va informar d'una síndrome pterigium popliteal com a diagnòstic definitiu comentat anteriorment.

#### **- Malformacions de columna vertebral.**

En aquest apartat només comentar el cas 289 diagnosticat d'un teratoma sacrococcigi sense altres anomalies associades i amb cariotip molecular normal.

#### **- Malformacions musculoesquelètiques.**

S'han diagnosticat 17 casos: 15 casos de malformacions d'extremitats inferiors (3 casos de fetus amb peu bot unilateral i 12 casos amb afectació bilateral) i 2 de superiors (polidactílies). Tots ells van ser diagnosticats a l'ecografia morfològica del segon trimestre. Un cas (cas 136) diagnosticat inicialment com a fetus amb peus bots bilaterals amb CNV patogènica a l'array-CGH que va anar progressant fins a arribar a la setmana 28, moment en què va ser diagnosticat d'artrogriposi múltiple congènita, la gestant va sol·licitar una ILE tardana que es va tramitar segons la normativa vigent i que es va realitzar fora del nostre centre.

Dos casos (2/17, 11,7%) van presentar associacions a altres malformacions estructurals: ARSA i PVCSE.

Comentar que en el grup de fetus amb malformacions toracoabdominals també vam evidenciar quatre casos més de fetus amb malformacions d'extremitats inferiors (6/21, 28,5%): un cas d'omfalocele amb array-CGH patològic (taula 15) i tres casos diagnosticats de Limb-body wall complex (síndrome malformativa paret abdominal-extremitats, LBWC). Aquests casos ja han estat exposats.

Dos casos (2/17, 11,7%) van presentar alteracions associades de la QF-PCR i/o array-CGH: un cas va ser diagnosticat de trisomia 18 i un altre cas d'una microdeleció a les bandes cromosòmiques 13q14.11-q14.2 (cas 136). Aquestes dues gestants van sol·licitar una ILE (Taula 18). **L'increment diagnòstic de l'array-CGH per aquest subgrup de malformacions amb cariotip aparentment normal ha estat del 6,2% per a CNVs patogèniques.**

Un total de 3 casos van sol·licitar ILE (3/17, 17,6%).

**Taula 18. Anomalies a l'array-CGH en els fetus amb malformacions musculoesquelètiques.**

|   | Mida    | CMA            | Malformació musculoesquelètica | Seguiment de la gestació | Anatomia Patològica (AP) |
|---|---------|----------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Deleció 13q14.11q14.2(41,637,500-48,222,028)x1, cas 136 | 6.58 Mb | CNV patogènica | Peus bots bilaterals           | ILE tardana              | --                       |

**- Dues o més malformacions associades en un mateix fetus.**

Hi ha hagut 16 casos de fetus amb dues o més malformacions (16/123, 13,1%) (Taula 19).

**Taula 19. Casos prenatals de fetus amb dos o més malformacions estructurals diagnosticades.**

|         | Array-CGH                                   | Malformació major   | Altres malformacions | Seguiment de la gestació |
|---------|---|---------------------|----------------------|--------------------------|
| Cas 50  | Normal                                      | Peu bot             | PVCSE                | Part                     |
| Cas 134 | Normal                                      | HNF                 | VMG                  | Part                     |
| Cas 135 | Normal                                      | Retrognàtia         | Ronyó displàsic      | Part                     |
| Cas 137 | Normal (Mutació per Sd Pterigium popliteal) | Llavi i paladar fes | Hipospàdies          | ILE                      |
| Cas 162 | Normal                                      | MAQ                 | Agenèsia renal dreta | ILE                      |
| Cas 178 | Normal                                      | Peu bot             | ARSA                 | ILE                      |
| Cas 188 | Normal                                      | LBWC                | Anomalies EEII       | ILE                      |
| Cas 233 | Normal                                      | LBWC                | Anomalies EEII       | ILE                      |
| Cas 249 | Normal                                      | Genitals ambigus    | CIV perimembranosa   | Part                     |
| Cas 256 | Normal                                      | HPTMG               | Vessament pleural    | Òbit fetal               |
| Cas 259 | Normal                                      | Ronyó displàsic     | ARSA                 | Èxit postpart            |
| Cas 267 | Trisomia 18                                 | Anencèfalia         | Omfalocele           | ILE                      |
| Cas 268 | Normal                                      | LBWC                | Anomalies EEII       | ILE                      |
| Cas 281 | Normal                                      | Ronyó multiquístic  | CIV muscular         | Part                     |
| Cas 297 | CNV patogènica                              | Omfalocele          | Anomalies EEII       | ILE                      |
| Cas 311 | Normal                                      | VMG severa          | CIV perimembranosa   | Òbit fetal               |



Tots aquests casos ja han estat estudiats prèviament segons la malformació fetal major diagnosticada.

**L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional en els casos de fetus amb dues o més malformacions estructurals ha estat del 6,2%.**

Analitzat l'increment diagnòstic de l'array-CGH en les diferents malformacions fetals, ens queda encara aprofundir en alguns altres aspectes. Subratllar que en determinats casos ha estat necessari realitzar exploracions complementàries, com la ressonància magnètica fetal. Del **conjunt total dels 123 fetus amb malformacions estructurals**, la ressonància magnètica es va realitzar en 69 casos (69/123, 56%). En 9 d'aquests casos, casos de cardiopatia congènita, es va realitzar al III trimestre per a valorar el neurodesenvolupament, sense troballes significatives. El resultat ha estat congruent en el 94,2% dels casos. En 5 casos (7,2%) la ressonància magnètica fetal va aportar informació addicional (65/69).

L'estudi d'infeccions prenatales (Toxoplasma, rubèola, parvovirus B19, virus de l'herpes simple (VHS-1 i VHS-2) i citomegalovirus) va ser negatiu en tots els casos. Es va realitzar amb indicació d'anomalia del SNC (VMG, megacisterna magna) o presència d'indicadors de risc d'infecció (hiperretrngències intestinals o intrabdominals).

Un total de 37 gestants (30.8%) van sol·licitar la interrupció de l'embaràs a conseqüència de les troballes en l'estudi del cariotip convencional, la QF-PCR, l'array o el mal pronòstic de les malformacions que presentava el fetus (37 gestants però 38 fetus amb estudi anatomopatològic, donat que una dona amb una gestació gemel·lar va sol·licitar la interrupció legal de la gestació donat que tots dos fetus estaven afectes d'una seqüència acrània-exencefàlia-anencefàlia). L'estudi anatomopatològic va aportar informació addicional en un 5,4% dels casos.

Hem detectat un cas d'avortament atribuïble a la tècnica invasiva (1/123, 0,8%), el cas ja comentat de la triploïdia on igualment el pronòstic de la gestació era inviable.

Pel que fa als resultats perinatals, la durada de l'embaràs en les gestacions amb un únic fetus van ser de 38,4 setmanes (rang 27-41) (un cop eliminades les gestacions que van interrompre o van ser òbit i les gestacions múltiples): 66 embarassos van arribar a terme i 9 van ser parts preterme.

Vam tenir una taxa de mortalitat perinatal global del 5,9% (5/84). Un cas d'èxitus postpart immediat que comentarem a la discussió (VACTER, cas 259) i 4 casos d'òbit avantpart.

Altres variables han estat també analitzades pel subgrup de gestació única (Taula 20).

**Taula 20. Resultats perinatals de fetus únic amb malformacions estructurals.**

|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
|                                       |               |
| <b>Interrupció legal de l'embaràs</b> | 30.8 (38/123) |
| <b>Setmanes de gestació al part</b>   | 38.4          |
| <b>Nadó viu</b>                       | 93.6% (74/79) |
| <b>Èxitus postpart</b>                | 1.2% (1/79)   |
| <b>Part preterme</b>                  | 12.1% (9/75)  |
| <b>Inducció del part</b>              | 32.4% (24/75) |
| <b>Part per cesària</b>               | 34.6% (26/75) |
| <b>Pes al naixement (g)</b>           | 3125g         |

Pel que fa al seguiment postnatal dels nadons:

- 16 dels nens del grup prenatal de malformacions del SNC, només un ha estat donat d'alta per Neurologia Pediàtrica (6.2%). Un cas d'agenèsia de cos callós presenta alteració lleu del neurodesenvolupament (1/16, 6,2%). La resta continuen en control anual i amb bona evolució en el seguiment a 36 mesos.

- 4 dels 6 nadons amb malformacions del macís facial han necessitat una o més intervencions quirúrgiques donat que eren nens amb llavi i/o paladar fes. Neurològicament l'evolució (0-36 mesos) ha estat correcte en tots ells. El cas 3 amb fetus afecte d'exoftàlmia bilateral va ser òbit avantpart, sense altres troballes ni a l'estudi anatomopatològic ni a la resta de l'estudi protocol·litzat d'òbit fetal (Rx fetus, estudi trombofília i síndrome antifosfolípídica, estudi infeccions prenatales, TSH i T4 van ser normals).

- Els 23 dels nounats diagnosticats prenatalment d'una cardiopatia congènita han continuat controls per Cardiologia Pediàtrica. Han estat donats d'alta 2 dels 3 casos dels de CIV muscular aïllada que han tancat espontàniament al control ecocardiogràfic postnatal. Neurològicament només un cas (cas 28) d'una miocardiopatia hipertròfica amb CNV patogènica a l'array ha presentat alteració del neurodesenvolupament (1/23, 4,3%). En la valoració a curt i mitjà termini la nena presenta discapacitat intel·lectual moderada amb important afectació de la comunicació i dismòrfia (Bayley-III a l'edat cronològica de 36 mesos: cognitiu 70/100, llenguatge 71/100, comunicació receptiva 7/10 i comunicació expressiva 3/10).

- Un total de 10 nounats més també van rebre atenció a la Unitat de Neonatologia per problemes menys greus i actualment presenten un bon estat de salut.



## **6. DISCUSSIÓ**



## 6. DISCUSSIÓ

Els resultats del nostre estudi ens porten a continuació a la valoració i comparació d'aquests, segons els apartats descrits prèviament. En la mesura que sigui possible, relacionarem les nostres troballes amb estudis previs de la mateixa àrea científica i explorarem les implicacions teòriques i pràctiques.

### 6.1. L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN ELS FETUS DIAGNOSTICATS PRENATALMENT DE RESTRICCIÓ PRECOÇ DEL CREIXEMENT INTRAUTERÍ (<28 SETMANES DE GESTACIÓ) AMB O SENSE ANOMALIA ECOGRÀFICA.

**Discussió (objectiu principal): Estudiar l'ús clínic del microarray en els fetus amb restricció precoç del creixement intrauterí.**

Quan l'examen d'ecogràfic diagnostica una restricció del creixement fetal (CIR/RCIU), l'atenció prenatal implica confirmar el diagnòstic, determinar la causa i la severitat de l'alteració del creixement fetal, assessorar els pares, controlar de prop el creixement i el benestar fetal i optimitzar tant el maneig com la finalització de la gestació en els casos que sigui necessari. El creixement intrauterí restringit derivat de factors fetals intrínsecs, com les cromosomopaties, les malformacions congènites o la infecció prenatal, sovint s'associa a un mal pronòstic per la gestació i el fetus.

L'estudi de la història natural del CIR té algunes peculiaritats que dificulten establir la seva prevalença. D'una banda, els defectes en el creixement fetal sovint no s'identifiquen amb prou antelació abans del naixement, tampoc ajuda el fet que l'ecografia té una sensibilitat baixa pel càlcul estimat del pes fetal (522,523). D'altra banda, els estudis científics sovint han generalitzat l'ús de fetus petit per a l'edat gestacional i CIR com a sinònims. El fetus petit per edat gestacional (PEG) es refereix al fetus que simplement té un pes per sota del llindar esperat per les setmanes d'embaràs, però que no presenta un compromís vital i conserva els paràmetres del Doppler dintre de la normalitat, a diferència del que succeeix en el fetus amb un defecte de creixement. Tot això fa difícil establir la prevalença del CIR i, encara més, del CIR precoç, que està menys estudiat per la comunitat científica.

No hi ha a la literatura gaires treballs que parlin de la incidència del CIR precoç. Temming (397) troba que la restricció del creixement fetal en etapes precoces de la gestació pot ocórrer en aproximadament el 2,8% dels casos, però el seu estudi retrospectiu inclou gestants des de setmanes molt precoces, entre les 17-22 setmanes, això justificaria que la seva incidència sigui superior a la de la nostra sèrie. Malgrat això, trobem que la incidència publicada per Temming és lleument elevada. Nosaltres hem detectat en la nostra sèrie una prevalença del 0,3%, inferior a la que reporten autors com Temming, amb setmanes de gestació més avançades on ja de per si és més prevalent aquesta patologia. Estem d'acord amb Dall'Asta et al.(524) en el comentari sobre Temming, que defineix la restricció del creixement fetal com la circumferència abdominal fetal menor del percentil 10 i l'índex de pulsatilitat (IP) de l'artèria umbilical major del percentil 95. Recentment, un grup internacional d'experts (Delphi consensus) (525) en medicina fetal ha definit la restricció prematura del creixement fetal com a paràmetres biomètrics fetals inferiors al tercer percentil o un Doppler severament anormal de l'artèria umbilical, o dos de les tres de les biometries inferiors al percentil 10 i un índex de pulsatilitat de l'artèria umbilical o arterial uterina superior al percentil 95. Per tant, és probable que la majoria dels casos inclosos per Temming et al. hagin estat fetus constitucionalment petits i no

amb una restricció precoç del creixement, d'aquí que la seva prevalença sigui superior a la de la nostra sèrie.

S'han associat diversos factors amb un major risc de CIR i CIR precoç. L'aportació genètica a les causes del CIR s'ha establert en un 20% (512)(520). La incidència de microdeleccions i microduplicacions o mutacions d'un gen en fetus amb defectes del creixement intrauterí i cariotip convencional normal no està ben establerta. Zhu et al.(513) descriuen alteracions cromosòmiques en el 9,3% dels casos de CIR precoç, mentre que amb l'array detecten anomalies en el 18,8% dels casos. L'array aconseguí per aquest autor una taxa de detecció d'anomalies genètiques de l'11,4% entre casos de CIR precoç amb un cariotip convencional normal i per a variants patogèniques del 5,7%. Es tracta d'un treball retrospectiu però els criteris d'inclusió de les gestants han estat similars als que nosaltres hem fet servir al nostre estudi, fet difícil donat que a la literatura no hi ha massa treballs al respecte i hi ha molta variabilitat respecte a les setmanes de gestació de les gestants incloses o els criteris diagnòstics utilitzats. Els resultats que publica aquest darrer autor s'assemblen als que nosaltres hem obtingut després d'analitzar la nostra casuística. A la nostra sèrie hem obtingut un rendiment diagnòstic de l'array cromosòmic en fetus amb CIR precoç molt semblant, del 18,5% però l'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional va ser superior per a les CNVs però inferior per a les CNVs patogèniques, del 15,3% i del 3,8% respectivament.

Borrell et al. en la seva metanàlisi descriuen un increment diagnòstic per l'array envers el cariotip convencional del 6,8% per a variants patogèniques (512). Aquests autors publiquen un estudi multicèntric on troben que l'anàlisi de microarray produeix un increment del rendiment diagnòstic del 6,8% respecte al cariotip convencional en fetus amb restricció de creixement precoç i, quan estratifiquen d'acord amb les anomalies associades, aquesta taxa va ser del 4,8% pel CIR precoç aïllat i del 10,5% pel CIR precoç amb anomalies estructurals associades (526). Malgrat van incloure gestants fins a les 32 setmanes, nosaltres només fins a la 28, trobem paral·lelismes amb aquest últim treball referenciat.

En el nostre estudi s'ha detectat un increment del rendiment diagnòstic de l'anàlisi de microarray sobre el cariotip convencional en fetus amb una restricció de creixement precoç, menys de 28 setmanes de gestació, del 3,8% per a variants patogèniques, inferior al del grup de Borell. Quan vàrem estratificar d'acord amb les anomalies associades, aquesta taxa va ser del 17,6% pel CIR precoç aïllat pel que fa a CNVs però no hi va haver increment en el rendiment diagnòstic dins d'aquest subgrup pel que fa a variants patogèniques, tots els casos diagnosticats van ser VOUS, a diferència de Borrell (526) que va trobar un 4,8% i de Zhu (513) que troba fins a un 15%. La taxa de CNVs patogèniques en el subgrup de CIR precoç amb anomalies estructurals ha estat de l'11,1%, lleument superior a les publicades fins ara per altres autors. El grup de fetus amb CIR precoç i malformacions ecogràfiques associades ha estat el que ha rebut un major impacte diagnòstic a l'hora d'implementar l'array cromosòmic.

## Discussió (objectius secundaris):

### **Determinar quines alteracions s'han detectat amb el microarray, a priori no diagnosticables per cariotip en fetus amb CIR precoç.**

L'array-CGH i la QF-PCR es van realitzar en tots els fetus diagnosticats de CIR de <28 setmanes de gestació. Es va detectar una síndrome de Klinefelter per QF-PCR, posteriorment confirmada per cariotip convencional (3,5%). L'anàlisi de microarray va permetre detectar 5 casos de CNVs (18,5%): Tres van ser variants de significació clínica incerta o VOUS i dues CNVs patogèniques (cas 37 i cas 280).

Les CNVs patogèniques diagnosticades van ser (Taula 4):

- ❖ Cas 37: Duplicació de 25 Mb de les bandes cromosòmiques 1q32.2q42.2, que també es va detectar per cariotip convencional, alterava la dosi de més de 300 gens RefSeq, alguns descrits a OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), clarament associada a la patologia. Duplicacions parcials del cromosoma 1 s'han descrit a la literatura associades amb fenotips variables que inclouen estatura baixa, macrocefàlia, pont nasal ample, orelles d'implantació baixa, micro o retrognàtia, defectes cardíacs, anomalies urogenitals i discapacitat intel·lectual (527). En l'àmbit prenatal, s'han detectat anomalies del cromosoma 1 en el primer trimestre, amb un augment de la translucència nucal i en el segon trimestre amb anomalies com ventriculomegàlia i/o omfalocèle, entre altres. En el nostre cas el fetus presentava, a més del defecte de creixement, la malposició de les extremitats inferiors.
  
- ❖ Cas 280: Deleció de la banda cromosòmica 21q22.3, que va alterar l'estructura i la dosi de 50 gens de referència, incloent-hi els gens *COL6A1* i *COL6A2*. Aquestes mutacions s'han associat amb la miopatia de Bethlem amb un patró d'herència autosòmic dominant i amb la distròfia muscular congènita d'Ullrich, més severa i amb herència autosòmica recessiva (528,529). Les miopaties relacionades a col·lagen VI (M-COLVI) són causades per mutacions en alguns dels tres gens (*COL6A1*, *COL6A2* i *COL6A3*) que codifiquen les cadenes alfa principals del col·lagen tipus VI (530). El col·lagen VI és un dels components principals de la matriu extracel·lular, formant una xarxa microfibril·lar estretament relacionada amb la cèl·lula i la membrana basal de múltiples teixits, inclosos músculs, pell, tendons, cartílags, discos intervertebrals i vasos sanguinis. Fisiopatològicament, aquestes mutacions generen disfunció mitocondrial i fenòmens apoptòtics de la fibra muscular. Clínicament, es caracteritzen per presentar una gran variabilitat (531,532). El nostre cas es tractava d'una mutació *de novo* i el fetus presentava una anomalia cardiovascular, un arc aòrtic dret. El seguiment neurològic i neuromuscular de la nena els primers 36 mesos ha estat correcte.

Els altres 3 casos de CNVs classificades com a VOUS tampoc podien ser diagnosticats per cariotip convencional donat la mida de la microdeleció-microduplicació (Taula 4).



- ❖ Cas 126: Deleció de 203 kb a la banda cromosòmica 2q31.2. No coincideix amb CNVs polimòrfiques descrites i altera l'estructura i la dosi del gen *PDE11A* (Phosphodiesterase 11A; OMIM \*604961) (533). Aquesta variant s'ha descrit com a variant de predisposició associada a la hiperplàsia adrenocortical pigmentada nodular (534) i la malaltia de Cushing (535,536). Treballs més recents apunten que la *PDE11A* podria influir directament en la plasticitat sinàptica i es necessita la seva expressió per a la consolidació i recuperació de la memòria (537), vinculant-se d'aquesta manera a canvis en la funció social de l'individu (538), i afavorint l'aparició de trastorns depressius greus (539). En aquest cas la deleció va ser heretada via paterna.
  
- ❖ Cas 251: Un altre de les VOUS identificades va ser una duplicació de 269 kb a la banda cromosòmica Xp22.31, que tampoc coincideix amb CNVs polimòrfiques descrites i podria alterar l'estructura o la dosi de gens de referència, com ara el gen *KAL1*. El gen *KAL1* codifica una proteïna, anosmin-1, que juga un paper clau en la migració de les neurones GNRH (OMIM \*152760) (540) i dels nervis olfactors a l'hipotàlem. Aquest gen s'ha vinculat a la síndrome de Kallmann (OMIM # 308700). La síndrome de Kallmann és una malaltia genètica del desenvolupament que es caracteritza per l'associació d'un hipogonadisme hipogonadotrópic congènit per dèficit d'hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH) i anòsmia o hipoòsmia (amb hipoplàsia o aplàsia dels bulbs olfactors) (541). S'han identificat mutacions en cinc gens en la síndrome de Kallmann: *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2* i *KAL1* (542). S'han descrit tres formes de transmissió, lligada al cromosoma X, autosòmica recessiva i autosòmica dominant. El gen *KAL1* és responsable de la forma vinculada al cromosoma X de la malaltia.
  
- ❖ Cas 312: El cas de la deleció del braç llarg del cromosoma 5. Aquesta deleció afecta l'estructura de 15 gens i 4 microRNAs. Entre ells, s'inclouen tres mòrbids: *ADAMTS2* (OMIM \*604539) associat a una forma autosòmica recessiva de la síndrome d'Ehlers-Danlos (anomenada clàssicament EDS tipus VII C) (543); *LTC4S* (OMIM \*246530) associat a una deficiència autosòmica recessiva de leucotrieno C4 sintasa (OMIM 614037) (544); i *SQSTM1* (OMIM \*601530) associat a una malaltia dominant autosòmica de Paget (OMIM #602080) (545) i a un tipus autosòmic recessiu de neurodegeneració, atàxia i distonia (OMIM #617145) (546). Recentment a la literatura, es publica un cas amb afectació neuromuscular i deterior cognitiu que es descriu com a una nova síndrome: síndrome de supressió subtelo mèrica 5q35.3 (547). L'autor proposa aquesta síndrome i defensa que s'ha de tenir en compte en lactants amb una hipotonia muscular pronunciada, estatura curta i tòrax en forma de campana amb pectus carinatum. En el nostre cas el nen postnatalment va desenvolupar una ventriculomegàlia moderada durant els primers mesos de vida i està sota seguiment per neuropediatria presentant bona evolució amb un neurodesenvolupament correcte en el seguiment a 36 mesos.

Hi ha la possibilitat de requalificar una variant de significat incert com una CNV patògena si l'evidència científica així ho suggereix.

## **Correlacionar les troballes ecogràfiques amb els resultats genètics en els fetus amb CIR precoç.**

El 35,7% dels nostres casos presentaven alteracions ecogràfiques associades, el 21,4% (6/28) eren estructurals i l'altre 14,2% (4/28) alteracions no estructurals. Entre les alteracions estructurals: una CIV, un arc aòrtic dret, dues ventriculomegàlies (VMG), un quist aracnoïdal i un cas de malposició d'extremitats inferiors (EEII). Dins d'aquest subgrup, l'array va resultar patològic en el cas del fetus amb malposició de les EEII amb una duplicació de 25Mb de les bandes cromosòmiques 1q32.2q42.2 (CNV patogènica) que comportava risc de trastorns del desenvolupament neurològic. L'anomalia en la posició de les EEII pot ser una manifestació prenatal d'aquesta alteració del neurodesenvolupament. Els altres casos amb malformacions estructurals tenien un cariotip molecular normal inclòs el cas de l'òbit antenatal amb VMG progressiva, a excepció de l'arc aòrtic dret. En aquest darrer cas l'array va diagnosticar CNV patogènica, el seguiment neuropediàtric de la nena és subòptim. Borrell en el seu treball reporta una taxa d'anomalies estructurals fetal del 14,2% (526), lleument inferior a la nostra sèrie.

Les anomalies no estructurals diagnosticades van ser: 3 casos d'oligoamnies (un d'ells va ser diagnosticat a terme), i un cas d'artèria umbilical única (AUU). Aquest últim cas presentava un array prenatal normal, però en néixer va evidenciar-se una hipertonia neonatal important motiu pel qual es va realitzar un seguiment acurat. Donat que hi havia un retard psicomotor, ja des dels primers mesos de vida, es va cursar un exoma clínic des de genètica clínica diagnosticant-se una mutació del gen *DYRK1A* (cas 130). En el seguiment neuropediàtric durant els primers 36 mesos, la nena ha presentat una capacitat cognitiva límit, dificultats d'organització visual-perceptiva, important retard del llenguatge expressiu, en un context d'alteració genètica (portadora en heterozigosis de la variant patogènica c.1042G>A en el gen *DYRK1A*, responsable de la seva malaltia). Mutacions de pèrdua de funció en el gen *DYRK1A* (localitzat 21q22.13) són responsables d'una síndrome que es caracteritza per microcefàlia congènita, discapacitat intel·lectual, dificultats importants en l'adquisició de la parla, talla baixa i fenotip característic. El gen *DYRK1A* ha estat investigat intensivament, principalment a causa de la seva localització cromosòmica, dins de la regió crítica de la síndrome de Down (DSCR [MIM 190685]) en el cromosoma 21. La "regió crítica de la síndrome de Down" del cromosoma 21 s'ha definit basant-se en l'anàlisi de casos rars de trisomia 21. El gen *DYRK1A*, un dels 20 gens localitzats en aquesta regió, està implicat en les alteracions neurobiològiques de la síndrome de Down. Tant l'estructura del gen *DYRK1A* com la seqüència de la proteïna cinasa codificada són importants. Diverses línies de recerca, tant en humans com en animals, suggereixen que *DYRK1A* està implicat en processos de neurogènesi (548,549). Diferents autors han demostrat el paper del gen *DYRK1A* en el desenvolupament del cervell humà i que l'haploinsuficiència de *DYRK1A* pot causar una síndrome clínica diferenciada amb discapacitat intel·lectual, microcefàlia primària, creixement intrauterí restringit, dismòrfia facial, retard en el desenvolupament psicomotor i problemes conductuals (550–552).

### **Seguiment de les gestacions i quantificar les complicacions de les tècniques invasives de diagnòstic prenatal realitzades.**

La realització de tècniques invasives durant l'embaràs comporta un risc de pèrdua fetal. Clàssicament s'estableix que la taxa d'avortament espontani després d'una amniocentesi és d'aproximadament un 1% i després d'una biòpsia corial de l'1-2% (553). Wilson et al. (554) assenyalen el fet que el risc de la pèrdua de l'embaràs després de l'amniocentesi s'ha d'ajustar per a l'individu i està influenciat per múltiples variables, oscil·lant entre el 0,19% i l'1,53%.

Revisions recents suggereixen que hi ha una gran variabilitat en els estudis publicats sobre la taxa de pèrdua de l'embaràs i altres complicacions després d'una tècnica invasiva. Aquestes disparitats es relacionen no només amb el disseny de l'estudi, també hi ha una gran variabilitat respecte a les setmanes de realització del procediment, el moment de la detecció de la complicació i la tècnica realitzada. Alguns estudis reporten les complicacions fins a la fi de l'embaràs, al contrari altres només reporten les complicacions esdevingudes pocs dies després del procediment (555).

Articles més recents apunten taxes inferiors a les descrites clàssicament, i semblants a les publicades per Wilson, del 0,35% per l'amniocentesi i 0,35 per la biòpsia (485)(556).

En el nostre grup no es va produir cap pèrdua gestacional durant les setmanes posteriors a la tècnica invasiva, però es van diagnosticar dos òbits avantpart (setmanes 34 i 26) atribuïbles al diagnòstic de CIR sever.

### **Valoració postnatal dels nounats amb anomalies detectades al microarray, a excepció dels casos on la pacient sol·licita la interrupció legal de l'embaràs (ILE).**

Segons la literatura, el CIR és un factor de risc important quan s'estudia la mortalitat intrauterina, la mortalitat neonatal, el part prematur, l'encefalopatia isquèmica, la paràlisi cerebral, els trastorns del neurodesenvolupament i, fins i tot, altres malalties en la vida adulta (557). La restricció de creixement fetal està associada a una remodelació arterial cardíaca i a un estat subclínic de disfunció cardiovascular durant la vida intrauterina. Els efectes cardiovasculars que es produeixen en la vida fetal, inclouen canvis de la morfologia cardíaca, disfunció miocàrdica subclínica, remodelació arterial i deteriorament de la funció endotelial, persisteixen a la infància i l'adolescència (558,559). La restricció del creixement fetal dona lloc a una programació metabòlica que pot augmentar el risc de síndrome metabòlica i, en conseqüència, de morbiditat cardiovascular en l'adult. La hipòtesi dels orígens fetals de les malalties adultes proposa que els trastorns crònics metabòlics, incloses les malalties cardiovasculars, la diabetis i la hipertensió, tenen l'origen en insults intrauterins (560).

Pel que fa als resultats perinatals, és difícil trobar una població d'estudi similar a la nostra, donada la gran diversitat d'estudis i la manca d'homogeneïtat entre ells. Els fetus amb CIR, i molt especialment aquells amb CIR precoç, presenten un risc de mortalitat fetal major que els fetus amb creixement correcte a qualsevol edat gestacional.

Destaquem l'estudi aleatoritzat multicèntric prospectiu de la restricció del creixement fetal (Trial of Array Umbilical and Fetal Flow in Europe, TRUFFLE) realitzat en 20 centres perinatals europeus entre 2005 i 2010, que incloïa dones amb un fetus únic entre les 26-32 setmanes de gestació, amb circumferència abdominal < percentil 10 i artèria umbilical amb l'índex de pulsatilitat Doppler > percentil 95 (395). Aquest estudi demostra que el 2,4% d'aquests fetus moren intraúter, aquesta taxa és inferior a la que va publicar el grup Story (396). Pel que fa als criteris d'inclusió, especialment quan es fa referència a les setmanes de gestació al diagnòstic, els embarassos presentaven una edat gestacional més avançada en el TRUFFLE trial que a l'estudi de Story, i la mida de la mostra també era més gran, això explicaria les diferències en els resultats. En el nostre estudi, es va documentar un 7,4% de morts fetals, dada similar a la que es va obtenir l'estudi TRUFFLE, que va ser del 8%. La taxa de supervivència va ser del 92,8%. La taxa de nascut viu en el nostre treball pel grup de fetus amb CIR precoç i anomalies associades que va ser del 70% respecte al grup de fetus amb CIR precoç aïllat que va ser del 100%, aquesta diferència va ser estadísticament significativa. Existeixen poques dades sobre l'assessorament i el maneig perinatal de les dones després d'un diagnòstic prenatal de restricció del creixement fetal precoç. A més, la poca homogeneïtat en els treballs continua sent una limitació.

En relació amb el neurodesenvolupament dels nascuts vius, tots ells presenten bona evolució i capacitat cognitiva dintre de la normalitat, a excepció de dos casos (8%). Un primer cas (cas 130) d'una nena amb microcefàlia i un retard psicomotor de diagnòstic postnatal amb capacitat cognitiva no verbal límit i trastorn de llenguatge receptiu-expressiu amb afectació important en l'àmbit expressiu (Bayley-III a l'edat cronològica de 36 mesos: cognitiu 70/100, llenguatge 71/100), amb array prenatal normal, que donada la clínica es va realitzar un exoma i es va diagnosticar una variant patogènica c.1042G>A en el gen *DYRK1A*, portadora en heterozigosis, responsable d'una síndrome que es caracteritza per microcefàlia congènita, discapacitat intel·lectual, dificultats importants en l'adquisició de la parla, talla baixa i fenotip característic (DSCR [OMIM #190685]), coment i referenciat prèviament. I un segon cas (cas 312) amb macrocefàlia i retard psicomotor, però amb afectació més lleu, on l'array prenatal va detectar una deleció d'1 Mb en el braç llarg del cromosoma 5. Postnatalment, aquest nen va desenvolupar una ventriculomegàlia moderada durant els primers mesos de vida i està sota seguiment per neuropediatria amb bona evolució (Bayley-III a l'edat cronològica de 36 mesos: cognitiu 79/100, llenguatge 80/100).

Els nostres resultats són concordants amb els que publiquen autors com De Wit (561) que reporta alteracions del neurodesenvolupament en el 8,2% dels fetus amb defectes del creixement. Són molts els grups que reporten uns pitjors resultats pel que fa a morbiditats neurològiques relacionades amb dèficits motors, incloses la paràlisi cerebral, problemes de conducta i deteriorament cognitiu (562–565). Estem d'acord, la restricció en el creixement fetal, i molt especialment la restricció precoç, és condició afavoridora per a comorbiditats neurològiques.



## **6.2 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB TRANSLUCÈNCIA NUCAL PATOLÒGICA I/O PLEC NUCAL PATOLÒGIC**

### **6.2.1 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB TN $p \geq 99$**

**Discussió (objectiu principal):** Estudiar l'ús clínic del microarray en el diagnòstic prenatal dels fetus amb translucència nucal patològica ( $p \geq 99$ ) en el primer trimestre de gestació.

El gruix de translucència nucal fetal (TN) entre les 11 i les 14 setmanes de gestació és una expressió fenotípica freqüent d'anomalies cromosòmiques, inclosa la trisomia 21. Aquest diagnòstic, fins i tot en absència d'aneuploïdies, és clínicament rellevant perquè està associat a una varietat de malformacions fetals i síndromes genètiques (345)(566). Entre els mecanismes descrits associats amb l'augment de la TN hi ha la disfunció cardíaca amb anomalies del cor i artèries principals (567,568), l'alteració en la composició de la matriu extracel·lular, la fallida del drenatge limfàtic causada per anomalies o retard en el desenvolupament del mateix sistema limfàtic (569,570), l'anèmia o hipoproteïnèmia fetals i la infecció congènita (571–573).

El terme "higroma quístic" en el primer període de l'embaràs es refereix a la visualització simultània de tabicacions i augment de TN. No obstant això, no existeix un consens general sobre com definir amb precisió l'higroma quístic, o si l'higroma quístic és un factor independent de la TN. Malone (321) defineix l'higroma quístic com un augment en l'espai hipoecoic a la part posterior del coll del fetus, que s'estén al llarg de la part posterior del fetus, i on la septació és clarament visible. Kharrat (322) proposa que el terme "higroma quístic" s'utilitzi per descriure els sacs limfàtics jugulars bilaterals del coll fetal, entitat que ell considera independent de TN. Segons aquest últim autor, l'associació amb TN augmentada li afegeix un pitjor pronòstic. Tanmateix descriu que la prevalença de l'higroma quístic a la població general és del 0,62%.

L'estudi FASTER (323) realitzat en 15 centres als Estats Units, dissenyat per a determinar la visualització dels septes en fetus amb TN augmentada a l'examen ecogràfic en el primer trimestre d'embaràs, conclou que la visualització de les tabicacions en els fetus amb TN incrementada depèn de si l'examen ecogràfic es fa en condicions òptimes, en el pla transvers suboccipital i mitjançant l'ús d'ecògrafs d'alta resolució. No obstant això, en l'estudi FASTER, els fetus inicialment informats com higroma quístic es van analitzar per separat d'aquells amb TN augmentada i van obtenir resultats significativament pitjors. En publicacions posteriors, diferents autors arriben a conclusions similars, els septes s'observen en tots els fetus amb TN patològica sempre que la metodologia utilitzada sigui l'adequada. En aquesta mateixa línia, un estudi retrospectiu de cohorts (325) que va incloure 944 fetus amb higroma quístic informa que el gruix de TN ja era significativament major en aquests fetus, així com les probabilitats d'un cariotip anòmal o d'una anomalia congènita.

Els nostres resultats estan en consonància amb aquests darrers autors. A la nostra sèrie, s'han informat 8 casos (8%, 8/102) com higroma quístic amb 62,5% d'anomalia cromosòmica, essent la TN > 4 mm en tots ells. L'higroma quístic va obtenir resultats pitjors, ja que la TN va ser notablement superior en aquests casos. Era d'esperar que els resultats fossin pitjors, donada la relació entre la mida de la TN i l'empitjorament del pronòstic. La prevalença a la nostra població ha estat del 0,07%, inferior a la reportada per Kharrat (322).

Estudis previs on s'ha investigat la utilitat de l'anàlisi del microarray en els fetus amb augment de la TN i cariotip normal mostren que proporciona informació addicional clínicament rellevant sobre el cariotip convencional en un 1-12% dels casos, un cop les aneuploïdies han estat descartades (320,355,357,574). A la nostra sèrie clínica d'embarassos amb augment de la TN  $\geq$  p99, es van diagnosticar un 36% d'aneuploïdies. L'array va proporcionar un increment diagnòstic addicional sobre el cariotip convencional del 7,9%. Els nostres resultats han estat concordants amb els publicats a la literatura fins ara (354). Però no hem pogut corroborar els resultats publicats per Maya et al.(575), el rendiment diagnòstic per CMA no ha estat tan important a la nostra sèrie, cal dir que la mostra a la nostra sèrie ha estat menor i que nosaltres hem exclòs aquells casos amb QF-PCR patològica per motius de cost-efectivitat. Aquesta autora en el seu treball relaciona la mida de la TN (va dividir els casos en tres grups:  $\leq$  2,9 mm, 3,0-3,4 mm i  $\geq$  3,5 mm) amb la taxa de diagnòstic per array: 462 casos de TN  $\leq$  2,9 mm, 170 de TN de 3,0-3,4 mm i 138 de TN  $\geq$  3,5 mm. Descriu CNV patogèniques en 1,7%, 6,5% i 13,8%, respectivament. Tanmateix, si analitzem els seus resultats amb major deteniment podem comprovar per exemple que en el grup de TN entre 3,0-3,4 mm dels 19 casos amb array patològic, 16 tenien cariotips convencionals també patològics i només 3 presentaven array patològic amb cariotip normal, fet que també passa en els altres subgrups de TN. L'increment diagnòstic de l'array sobre el cariotip en el treball d'aquesta autora és inclús inferior al de la nostra sèrie un cop es revisen les dades amb exhaustivitat, i per exemple seria tan sols del 2,2% per a TN entre 3,0-3,4 mm. Coincidim amb aquesta autora en el fet de mantenir la TN com a criteri a dia d'avui vigent per un diagnòstic invasiu, en concret els casos de TN  $\geq$  p99, però entenem i compartim la crítica de Cuckle (576) envers el paper de mantenir aquesta indicació al llarg del temps, donat el paper cada cop més rellevant del diagnòstic de l'ADN fetal no invasiu.

A la nostra sèrie, la taxa de defectes cardíacs congènits va ser del 6% per TN en el rang de 3-3,9 mm i del 20% en els casos de TN  $>$  5 mm. Ghi (339) descriu una prevalença de defectes cardíacs majors en fetus amb un gruix de translucència nucal en el rang de 2,5-3,4 mm del 2,5% i en aquells amb un gruix de translucència nucal  $\geq$  3,5 mm del 7%. Galindo (340) reporta un 24% de fetus amb cardiopaties congènites quan el gruix de la TN  $\geq$  6 mm. Trobem clars paral·lelismes entre el nostre treball i el d'aquests autors. Tal com hem pogut demostrar amb els nostres resultats, com més gran és la TN, major és el risc d'aneuploïdia i també de cardiopatia congènita.

Destacar la relació entre les rasopaties i l'increment de la TN. La síndrome de Noonan és la síndrome genètica més freqüentment relacionada amb l'augment de la translucència nucal, amb una incidència del 25%. Es tracta d'una rasopatia autosòmica dominant, i en aproximadament el 50% dels casos està causada per una mutació en el gen *PTPN11* (577). Mutacions als gens *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1/2*, *NRAS* i *SHOC2* representen un petit percentatge dels casos de síndrome de Noonan (578,579). En fetus cromosòmicament normals amb translucència nucal patològica, la prevalença de la síndrome de Noonan provada per *PTPN11* sembla variar del 6 al 10% (579,580). A la nostra casuística ha estat del 3,8%, lleument inferior a la publicada a la literatura, creiem que degut en part a la petita mida mostral de la nostra sèrie i en part a què només s'ha anat a confirmar o descartar en els casos d'alta sospita.



## Discussió (objectius secundaris):

**Determinar quines alteracions s'han detectat amb microarray, a priori no diagnosticables per cariotip en fetus amb translucència nucal patològica ( $p \geq 99$ ).**

L'array-CGH es va aplicar en 64 casos.

En el 62,7% (64/102) dels fetus amb QF-PCR normal es va realitzar l'array-CGH. L'array va ser patològic en un 10,9% d'aquests fetus. Vam detectar 9 CNVs en 7 fetus, 5 CNVs patogèniques. En tres d'aquest fetus el cariotip convencional també va ser patològic però cap de les VOUS van ser detectades per cariotip convencional ni tampoc una de les CNVs patogèniques.

Els 2 casos de fetus amb VOUS (2%) van ser:

- ❖ Cas 255: Duplicació de 210 kb a la banda cromosòmica 16q24.1. Aquest cas va ser en part un fals negatiu de l'ecografia prenatal donat que no es va diagnosticar la fissura palatina, sense llavi fes associat, fet que dificulta el diagnòstic per ultrasons. Es va necessitar reparar el defecte quirúrgicament en vida postnatal. En l'actualitat, aquest nen necessita seguiment per neuropediatria a causa del trastorn en el neurodesenvolupament que pateix. Aquesta duplicació 16q24.1 afectava el gen *FOXF1*. Recentment un article documenta 4 casos de nens amb duplicacions 16q24.1 i retard psicomotor (581). Sembla que hi podria haver una relació de delecions d'aquest gen amb problemes de desenvolupament neurològic, pulmonar i digestiu (582,583). No obstant això, la relació de la sobreexpressió o duplicació del gen amb la discapacitat intel·lectual no està encara ben establerta malgrat que comença a aparèixer evidència a la literatura que així ho demostra (584). En aquesta variant també es va veure afectat el gen *FOXC2*, mutacions en aquest gen s'han relacionat amb el limfedema, l'hidrops fetal i els defectes del paladar (585–587) com va ser el nostre cas. Els VOUS comporten un pronòstic incert i també la possibilitat de requalificar com a CNV patogènica si la nova evidència científica així ho permet. Aquesta alteració es va classificar com a VOUS, ja que no hi ha prou literatura fins al moment que permeti classificar-la com a patogènica.
  
- ❖ Cas 306: Deleció de 608 kb a la banda cromosòmica 7p21.2 i deleció de 165 kb a la banda cromosòmica 2q32.3. Heretades cada variant d'un dels progenitors. Aquesta darrera variant afecta al gen *PCGEM1* que està implicat en la patogènesi de les distròfies muscular, concretament en les distroglicanopaties (588–590). Reben aquest nom a causa de les alteracions relacionades amb la glicosilació de la proteïna de membrana alfa-distroglicà. La deficient glicosilació d'aquesta proteïna provoca que no pugui unir-se a les proteïnes de la matriu extracel·lular, posant en compromís l'arquitectura cel·lular i tissular, donant com a conseqüència malalties i síndromes com la síndrome de Walker-Warburg, la Síndrome Múscul-Ull-Cervell o la distròfia muscular congènita tipus Fukuyama (591). En aquest cas el nen no ha presentat cap tipus de clínica en el seguiment de 36 mesos, no obstant això, les manifestacions en aquest tipus d'entitats són sovint tardanes.



Els casos amb CNVs patogèniques diagnosticats van ser:

- ❖ Cas 90: Deleció de 13 Mb a la banda cromosòmica 11q24.1q25 i duplicació de 15 Mb a la banda cromosòmica 4q34.1q35.2. La deleció terminal del cromosoma 11 coincideix amb la regió de la síndrome de Jacobsen, que es caracteritza per una expressivitat fenotípica variable que inclou en l'àmbit prenatal el creixement intrauterí restringit, defectes renal o cardíacs i en l'àmbit postnatal anomalies plaquetàries entre altres manifestacions (OMIM #147791) (592–595). Pel que fa a la duplicació d'15 Mb de l'extrem distal del braç llarg del cromosoma 4, a la literatura s'han descrit una trentena de pacients amb duplicacions pures, que tot i les diferents mides dels segments duplicats, comparteixen característiques fenotípiques que inclouen els trastorns del desenvolupament, la discapacitat intel·lectual, la microcefàlia i la dismòrfia facial. Així com altres menys freqüents com les malformacions cardíques (OMIM \*602407) (596,597). La coexistència de les dues alteracions identificades en aquest cas és compatible amb la presència d'un cromosoma 11 derivatiu (der(11)t(4;11)(q34.1;q24)) al cariotip convencional que podria suggerir l'existència d'una possible translocació críptica equilibrada en algun dels progenitors, motiu pel qual es va cursar el cariotip d'ambdós progenitors, trobant que el pare presentava una translocació recíproca sense efecte fenotípic (46,XY,t(4;11)(q34.1;q24)). Un cop analitzat el progenitor es va determinar que aquesta variant en el fetus era la conseqüència d'una segregació desequilibrada.
  
- ❖ Cas 313: Trisomia del cromosoma 2 en mosaic de grau baix (14%). Aquesta trisomia es va considerar responsable de la cardiopatia congènita trobada en aquest fetus (598). El diagnòstic d'una trisomia 2 ens obliga a descartar anomalies ecogràfiques en el fetus. Les més freqüentment associades són: defectes de creixement fetal, oligoamnios, cardiopaties congènites, defectes del tub neural, fissura palatina i llavi fes, ventriculomegàlia, hèrnia diafragmàtica i dismòrfia (599–601). No obstant això, hi ha algun cas publicat a la literatura de fetus amb trisomia 2 en mosaic sense anomalia ecogràfica associada i evolució favorable (602).
  
- ❖ Cas 157: Deleció de 534 kb a la banda cromosòmica 16p11.2 que coincideix amb una regió de reordenament recurrent, síndrome de microdeleció 16p11.2 (OMIM \*611913) (603–606). Aquesta microdeleció no seria diagnosticable per cariotip convencional donada la seva petita mida. Es va determinar que la variant era *de novo*.
  
- ❖ Cas 272: Deleció de 15 Mb a la banda cromosòmica 8p23.3p22 associada a una hèrnia diafragmàtica fetal, deleció intersticial que afecta l'estructura i dosi d'alguns gens descrits a l'OMIM associats a patologia, entre ells el gen *GATA4* (OMIM \*600576)(607) relacionat amb l'embriogènesi i la diferenciació miocàrdica. La síndrome de microdeleció 8p23.1 inclou fenotips variables amb anomalies cardíques, hèrnia diafragmàtica, discapacitat intel·lectual i dismòrfia (608–610). L'hèrnia diafragmàtica detectada per ecografia prenatal va ser atribuïda a la microdeleció. L'estudi en els progenitors va determinar que la variant era *de novo*.

Totes les CNVs patogèniques serien diagnosticables per cariotip convencional a excepció de la deleció 16p11.2, que no ho va ser, donada la menor resolució del cariotip.

Comentar el cas 20, on es va diagnosticar un cromosoma marcador en mosaic, de baixa freqüència (5%), malgrat que el resultat de l'array va ser informat de normal, el cariotip convencional de bandes G va mostrar un mosaic amb un cromosoma marcador 47,XY[3]/46,XY[57]. El fet que l'array fos normal es va atribuir a què el mosaïcisme va ser de baixa freqüència i al fet que el cromosoma marcador detectat contenia únicament material heterocromàtic, sense repercussió fenotípica. De fet, el nounat no presentava alteracions en el moment de néixer ni en els controls posteriors.

### **Correlacionar les troballes ecogràfiques amb els resultats genètics en fetus amb translucència nucal patològica ( $p \geq 99$ ).**

L'estudi morfològic detallat entre les 18 i 22 setmanes de l'embaràs va diagnosticar una malformació fetal associada a l'augment de la translucència nucal  $p \geq 99$ , una vegada que es va descartar l'anomalia numèrica cromosòmica, en un 28,1% dels casos (18/64). La malformació fetal amb més freqüència diagnosticada va ser la cardiopatia congènita fetal, en un 50% dels casos. Estem d'acord amb autors com Sotiriadis (611) en què aquesta relació està ben reportada, aquest autor en la seva sèrie informa d'un 19,5% de casos de fetus cromosòmicament normals amb cardiopatia congènita i TN augmentada. Alanen (612) manté que la TN superior a 3-3,5 mm en l'ecografia del primer trimestre és una indicació per sospitar un defecte cardíac fetal, malgrat que la sensibilitat és baixa, en la seva sèrie de 79 casos va ser del 17,7%. L'associació entre ambdues anomalies ecogràfiques, translucència nucal i cardiopatia congènita està descrita també per altres autors com Makrydimas (613) que reporta un 22,9%, Müller (614) un 18% o Minnella (615) un 21,3%. A la nostra casuística aquesta associació ha estat similar a la reportada per aquests autors, un cop han estat descartades les anomalies genètiques, d'un 14,8%, i va augmentar significativament en els fetus amb TN > 5 mm fins a arribar al 20%.

Cal assenyalar la relació entre l'augment de la translucència nucal, la síndrome de Noonan i la cardiopatia congènita. A la nostra casuística, en els dos casos de miocardiopatia hipertròfica (cas 163 i 302) es va diagnosticar una síndrome de Noonan utilitzant tecnologia de seqüenciació d'ADN (616–618).

Pel que fa al pronòstic i neurodesenvolupament dels fetus amb TN  $p \geq 99$  està descrit a la literatura que aquest fetus tenen pitjors resultats perinatals, però un cop descartada la cardiopatia congènita i l'anomalia genètica, s'ha vist que els resultats perinatals són similars a la població general, a excepció d'aquells casos on s'evidencia una persistència de la translucència nucal a mesura que progressen les setmanes d'embaràs (567,619). A la nostra sèrie, en 5 casos (7,8%) vam detectar la presència d'un plec nucal patològic durant el segon trimestre de l'embaràs en fetus que ja havien estat diagnosticats de TN augmentada per sobre del percentil 99 al primer trimestre. En aquest subgrup es va observar un major índex de problemes de neurodesenvolupament i de dismorfies facials, de fins al 40%. A la literatura, Lushan Li (375) reporta pitjors resultats perinatals en la seva sèrie, semblant a la nostra, d'un 37,5%. Vigneswaran (620) també informa de resultats perinatals desfavorables amb major taxa de mortalitat perinatal.

En relació amb el tercer trimestre, els fetus amb una translucència nucal augmentada tendeixen a tenir pesos al naixement més alts. Poon et al. (621) mostra que la predicció de la macrosomia està relacionada amb les característiques maternes (per exemple, ètnia, alçada materna i pes, part previ d'un nadó macrosòmic, tabaquisme i història de diabetis), i també amb les característiques fetals. Els seus resultats demostren que una major translucència nucal està associada amb un major risc d'un nadó macrosòmic. Aquests resultats van ser confirmats per Timmerman et al. (622) que conclou que els fetus normals amb una translucència nucal augmentada tenen un major risc de ser macrosòmics en néixer en comparació amb els fetus amb una translucència nucal normal. En la mateixa línia es troben els resultats de Weissmann-Brenner (623), aquests autors també van demostrar la relació entre la translucència nucal i el pes del naixement en individus de mares no diabètiques. Aquesta correlació era no tan sols independent de la glicèmia materna sinó també del gènere fetal.

El terme "macrosomia" s'utilitza per descriure un fetus o nounat molt gran. Però no hi ha una definició precisa de la macrosomia sobre la qual tots els obstetres i investigadors coincideixin. Les definicions comunes utilitzen percentils de pes de naixement (per exemple, percentil 90 o percentil 97) o punts de tall de pes de naixement (per exemple, 4000 grams, 4500 grams) (624,625). La literatura més recent suggereix que el terme macrosomia s'hauria de definir com un pes de naixement superior a 4500 grams, independentment de l'edat gestacional o més gran que el percentil 97 en el pes de naixement per a l'edat gestacional (626). Segons el criteri predefinit (OR = 2 com a punt de tall) per identificar la macrosomia clínicament rellevant, fins i tot el percentil 97 no podria complir amb aquest criteri (627). Clàssicament la macrosomia fetal com a pes de naixement superior als 4.000 grams o en el percentil > 90 per edat gestacional i afecta aproximadament al 6% dels nounats (628–631). Cap no obstant això, es va establir a partir d'evidències clíniques i científiques clares que incloguin un ampli rang de resultats perinatals.

El diagnòstic de macrosomia fetal és encara avui dia imprecís i l'ecografia com eina diagnòstica del fetus macrosoma té una baixa sensibilitat, aproximadament del 60%, fins i tot sembla no ser superior a l'estimació clínica per maniobres (632–635). Malgrat la dificultat a l'hora d'establir un criteri uniforme per a la "macrosomia" saben que hi poden influenciar múltiples factors. Hi ha una forta evidència científica que relaciona la macrosomia fetal amb els nivells de glicèmia materns (636,637), major taxa de complicacions peripart (638) i també un major risc de desenvolupar hipertensió, obesitat o diabetis mellitus tipus 2 en l'edat adulta (639,640).

A la nostra sèrie, la incidència macrosomia fetal en fetus amb TN  $p \geq 99$  va ser del 9,4%, entenen la macrosomia fetal com a pes al néixer > 4000 grams. Si comparem aquests resultats amb la taxa de macrosomia en el nostre centre en gestacions a terme, amb fetus de > 4000 grams al part, que va ser del 5,2% d'un total de 2252 parts durant el 2017 i del 4,6% durant el 2016 d'un total de 2356 parts, trobem que aquesta dada presenta diferències que són estadísticament significatives.

Pel que fa a resultats genètics, destaquem:

- ❖ Cas 163: Síndrome de Noonan amb array normal. Arran del diagnòstic prenatal de quilotòrax, plec nucal augmentat i asimetria de cavitats cardíques, amb hipertròfia ventricular esquerra i obstrucció del tracte de sortida, es cursa panell de rasopaties, detectant-se una mutació *de novo* en el gen *SHOC2*. Els pacients amb variant a *SHOC2* presenten trets facials similars als observats a la síndrome de Noonan, incloent-hi l'hipertelorisme, la ptosi, la reducció de les fissures palpebrals, les orelles posteriors angulars baixes i les celles superpoblades. A més, d'una alçada baixa, amb freqüència associada a una deficiència d'hormona del creixement, dèficits cognitius i defectes cardíacs (641,642).

En el nostre cas el pacient presenta fenotip característic de la síndrome de Noonan amb cardiopatia congènita. Controlat pels serveis de Genètica i Cardiologia Pediàtrica, actualment presenta estancament ponderal i precisa d'alimentació per sonda nasogàstrica.

- ❖ Cas 302: Síndrome de Noonan amb array normal. Cursat panell de rasopaties donada la miocardiopatia hipertròfica que va presentar aquest fetus. L'estudi va mostrar la variant patogènica c.770C>T del gen *RAF1*, *de novo*. La síndrome de Noonan-5 (OMIM #611553) pot ser causada per una variant en heterozigosi en el gen *RAF1* (643). Les mutacions dels gens *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *BRAF*, *RIT1* i *HRAS* causen fins al 80-95% dels casos de síndrome de Noonan (644-646). Les mutacions del gen *PTPN11* en 12q24.1, que codifica una fosfatasa SHP2, són les primeres alteracions documentades a la literatura i estan presents en aproximadament un 50% dels pacients (647). Posteriorment es va detectar que alguns pacients *PTPN11* negatius (2-5%) presentaven mutació en *KRAS7*, el que va posar en evidència que les alteracions de la via RAS / MAPK podien donar lloc a la síndrome. Aquesta via reguladora, inicialment coneguda per la seva implicació en processos tumorals (648-650), controla l'equilibri proliferació/apoptosi i migració cel·lular (651-653) i, per tant, la morfogènesi. A diferència de les mutacions oncogèniques que són de tipus somàtic, l'alteració en la síndrome dismòrfica ocorre en línia germinal i és compatible amb la viabilitat de l'individu.

S'han identificat mutacions diferents en el gen *RAF1* en individus amb síndrome de Noonan. Les mutacions en *RAF1* s'han observat més freqüentment en els pacients amb miocardiopatia hipertròfica (654-657).

El nouat va ser èxitus pocs dies després a conseqüència de les complicacions derivades de la cardiopatia.

- ❖ Cas 255: Seqüència de Pierre-Robin amb array normal, fetus amb defecte de paladar i sense llavi fes. Ecografia de segon trimestre va ser normal però amb presència de polihidramnis motiu pel qual es va sol·licitar la RMf, que va ser normal. No va ser diagnosticat intraúter sinó postnatalment de la síndrome de Pierre-Robin. Va ser un fals negatiu de l'ecografia prenatal malgrat ja es coneguda la dificultat de l'ecografia tradicional per a diagnosticar aquesta entitat. La sensibilitat de l'ecografia fetal per identificar aquestes anomalies és baixa, amb una tendència general a diagnosticar les malformacions facials associades

a altres anomalies, i perdre les aïllades. Alguns autors reporten taxes de detecció similars per al diagnòstic del llavi fes amb o sense anomalia de paladar, en el rang del 20% (658,659). Altres presenten millors taxes diagnòstiques per al llavi fes, de fins al 31-88% però especifiquen que quan l'anomalia del paladar es presenta de forma aïllada és molt difícil el diagnòstic (660–662). Sohan (663) és del pocs autors que diferencia entre el diagnòstic de llavi fes amb i sense anomalia del paladar i el diagnòstic de l'anomalia de paladar aïllada, en el seu estudi cap dels 14 defectes de paladar va ser diagnosticat prenatalment. Maarse (660) i Offerdal (662) en els seus treballs sobre diagnòstic ecogràfic de defectes orofacials també deixen constància de la dificultat per a diagnosticar els casos de defecte de paladar aïllat prenatalment.

El diagnòstic d'aquests casos podria millorar-se amb ecografia 3D. Sembla que la taxa de detecció no es veuria sensiblement incrementada, donat que habitualment s'associen altres malformacions, com el llavi fes. Però no tothom estaria d'acord en aquest punt, no obstant això, sembla que si hi hauria prou consens pel que fa a la seva utilitat a l'hora de planificar estratègies potsnats (658).

Hi ha alguns autors que defensen la seva utilització i reporten taxes de diagnòstic més elevades per a l'ecografia 3D especialment en casos de defectes aïllats de paladar (664).

- ❖ Cas 314: Hidrops amb array normal. Aquesta gestant ja havia presentat un cas d'hidrops fetal amb anterioritat en un altre centre motiu pel qual es va cursar la sol·licitud per participar en l'estudi de recerca de l'exoma clínic del que som centre col·laborador (BECA FIS IP17/01153). L'exoma va detectar una variant patogènica en homozigosi de tipus *missense* c.716A>G en el gen *SEC23B*. Aquest gen està reportat a la literatura com causant d'anèmia diseritropoiètica congènita tipus II, possible causant dels hidrops. Aquesta variant comporta la substitució d'un àcid aspàrtic per una glicina en la posició 239 de la proteïna (p.Asp239Gly). El gen *SEC23B* està descrit a la literatura científica com a causant d'anèmia diseritropoiètica congènita tipus II (OMIM #224100), amb un model d'herència autosòmic recessiu (665,666) i com a causant de la síndrome de Cowden (OMIM #616858)(667), amb un model d'herència autosòmic dominant. Els pacients amb anèmia diseritropoiètica congènita tipus II presenten una eritropoesi ineficient amb precursors eritroides displàsics a la medulla òssia. La majoria de pacients amb aquesta malaltia presenten anèmia de lleu a moderada, esplenomegàlia variable i sobrecàrrega de ferro. Aquesta sobrecàrrega és deguda a un recanvi de glòbuls vermells augmentat, causat per una eritropoesi ineficaç i una hemòlisi perifèrica. S'han descrit alguns casos d'anèmia diseritropoiètica congènita tipus II que s'han presentat de forma prenatal amb hidrops fetal i que han requerit transfusions intrauterines, el que ha portat alguns autors a suggerir que la presentació antenatal podria ser un esdeveniment freqüent en l'anèmia diseritropoiètica congènita tipus II (668–670).

La presència de la variant en el fetus ha estat confirmada mitjançant seqüenciació Sanger i s'ha demostrat la variant en els progenitors en heterozigosi. En cas de produir-se una nova gestació seria recomanable fer una biòpsia corial donat el risc de recurrència del 25%.

- ❖ Cas 92: Cas prenatal d'asimetria de cavitats cardíques amb alt risc de coartació d'aorta i array normal. En néixer va requerir cirurgia al confirmar-se la coartació d'aorta. Posteriorment va ser diagnosticat d'una metabolopatia, un dèficit d'arginasa que li va comportar una hepatopatia i va necessitar un trasplantament de fetge. En tot moment aquest nen ha presentat un neurodesenvolupament normal. El cribratge genètic sembla que faria possible la identificació i el tractament precoç dels pacients amb insuficiència arginasa asimptomàtica amb la idea d'evitar les seqüeles neurològiques. Es desconeix encara si la intervenció primerenca evita insults neurològics, però així semblaria, basant-nos en casos com el nostre. Està descrit a la literatura un cas semblant amb intervenció primerenca i bona evolució neurològica en un seguiment a 6 anys (671).

### **Seguiment de les gestacions i quantificar les complicacions de les tècniques invasives de diagnòstic prenatal realitzades.**

A la nostra sèrie es va detectar una taxa de pèrdua fetal atribuïble a la tècnica invasiva del 30% (dos casos d'avortament, cas 232 i cas 203), un dels avortaments va ser després d'una amniocentesi amb una ruptura prematura de membranes i un anhidramnis posterior, on la dona finalment va decidir una ILE a conseqüència d'aquest anhidramnis persistent i l'altre una biòpsia amb un avortament espontani posterior a la realització de la tècnica i AP compatible amb corioamnionitis.

Existeix una gran variabilitat en els estudis publicats quant a la taxa de pèrdua de l'embaràs i altres complicacions després d'una tècnica invasiva. Aquests procediments invasius es realitzen per al diagnòstic prenatal, però en lloc d'estimacions precises i recents de riscos d'operadors experts, a la literatura trobem més aviat estimacions històriques. La recerca de quantificar amb precisió els riscos relacionats amb els procediments invasius és rellevant per a la pràctica clínica però a l'hora difícil.

Salomon (672) estima en la seva metanàlisi, l'any 2019, el risc d'avortament involuntari relacionat amb procediments invasius. Aquest autor realitza una anàlisi de subgrups segons els nivells de risc de similitud i ho compara amb un grup control. Amb aquest objectiu analitza i selecciona 20 estudis metodològicament correctes amb la intenció d'estimar el risc d'avortament involuntari segons el tipus i la indicació del procediment invasiu. Reporta un total de 580 avortaments involuntaris procedents de 63 273 procediments d'amniocentesi amb un risc ponderat de pèrdua d'embaràs del 0,91%. En el grup control es van produir 1726 avortaments involuntaris en 330 469 embarassos amb una taxa de pèrdua del 0,58%. El risc d'avortament involuntari relacionat amb el procediment ponderat va ser del 0,30%. Hi va haver un total de 163 avortaments involuntaris procedents de 13 011 biòpsies corials amb un risc de pèrdua d'embaràs de l'1,39%. Al grup control es van produir 1946 avortaments involuntaris en 232 680 embarassos amb una taxa de pèrdua de l'1,23%. El risc relacionat amb el procediment ponderat d'avortament espontani després de la biòpsia corial va ser del 0,20%. No obstant això, quan aquest autor només va considerar estudis amb perfils de risc similars entre els grups d'intervenció i el control, el risc per a l'amniocentesi va ser del 0,12% i no va haver-hi risc per a la biòpsia corial.

Bakker (556) estableix uns riscos semblants a Salomon (672), en el cas de la biòpsia corial transcervical amb fórceps el risc de pèrdua gestacional del 0,27% i per l'amniocentesi del 0,48%.



Cada cop hi ha més evidència a la literatura dels riscos relacionats amb el procediment d'avortament involuntari després de l'amniocentesi o biòpsia corial que indiquen que són inferiors al que clàssicament es pensava. El risc sembla insignificant quan es comparen aquestes intervencions amb grups de control del mateix perfil de risc.

A la nostra experiència la taxa d'avortament en aquest subgrup és similar a la global del total de tècniques invasives realitzades en el nostre centre, no hem trobat diferències estadísticament significatives. La taxa d'avortament involuntari del total de tècniques invasives en el nostre centre va ser del 2% durant els anys 2013-2014, del 1,5% l'any 2015 i del 2,8% durant els anys 2016-2017. Aquest increment creiem que és atribuïble a l'atzar i no a la manca d'entrenament per part del personal, donat que els professionals que fem les tècniques invasives des de fa anys som facultatius experimentats. Però no ho descartem com a hipòtesi pel fet que el nombre de tècniques invasives va en disminució en aquests darrers anys, donada la implementació del cribratge combinat de primer trimestre i la irrupció de l'ADN fetal en sang materna en el camp del diagnòstic prenatal. S'haurà de veure la tendència en anys successius.

A la nostra sèrie, el grup de gestants amb indicació de tècnica invasiva per TN  $p \geq 99$  no presenta major taxa d'avortament que aquelles altres gestants que accedeixen al diagnòstic prenatal invasiu a conseqüència d'altres Indicacions. Així i tot les nostres dades són superiors a les publicades per autors com Bakker o Salomon (556,672).

### **Valoració postnatal dels nounats amb anomalies detectades al microarray, a excepció dels casos on la pacient sol·licita la interrupció legal de l'embaràs (ILE).**

Fins i tot en absència d'aneuploïdia i cardiopatia congènita, el gruix de la translucència nucal va ser clínicament rellevant perquè es va associar amb un augment dels casos amb resultat perinatal advers a conseqüència d'una àmplia varietat de malformacions fetals i síndromes genètiques. La prevalença de trastorns genètics quan TN  $> 3,5$  mm o  $>$  percentil 99 pot ser tan baixa com 0,5% o tan alta com 6,6%. S'han descrit més de 50 trastorns genètics associats amb augment de TN. L'augment de TN en general es resol, però en alguns casos, pot persistir en el temps, el que indubtablement empitjora el seu pronòstic. L'absència d'anomalies cromosòmiques i ecogràfiques (especialment ecocardiogràfiques) si es produeix la normalització de la TN, ens permet garantir que les probabilitats de què el nadó no presenti problemes greus sigui del 95%. L'assessorament genètic en aquests casos ha d'informar que el risc de donar a llum a un nadó amb una anomalia en el desenvolupament neurològic no ha de ser més gran que el de la població general en aquests casos (673). No obstant això, la persistència de l'augment inexplicable de TN en l'ecografia de 16-18 setmanes, o l'evolució a edema nucal o hidrops fetal a les 20-22 setmanes, planteja la possibilitat d'una infecció congènita o d'una síndrome genètica, mort perinatal i el risc d'alteracions en el neurodesenvolupament. En algunes sèries, el risc de trastorns del neurodesenvolupament va ser del 18,2% (674).

Houweling et al. (675) consideren que, atesa la gran incidència de la síndrome de Noonan en els fetus amb major translucència nucal i cariotip normal, s'hauria d'oferir consell genètic i detecció de variants relacionades amb les rasopaties en tots els casos. No obstant això, és discutible si la mesura de la translucència nucal s'ha d'utilitzar com única eina de selecció. La síndrome de Noonan té una expressió molt variable i la majoria dels casos només presenten disfuncions prenatales lleus i poden, fins i tot, tenir un neurodesenvolupament normal. Per això la qüestió clínica important és protocol·litzar

en quins casos s'han d'oferir el diagnòstic de les rasopaties. El nostre grup, com altres (676), proposa una selecció de casos més rendible, potser també condicionats per l'entorn o centre on desenvolupem la nostra professió. S'haurà de sospitar prenatalment, especialment en fetus amb translucència nucal > p99 i una o més de les següents característiques: plec nucal > p99, hidrops fetal, vessament pleural, anomalies cardíaques, polihidramnis o dismòrfia. En aquests fetus s'hauria d'oferir l'estudi d'un panell genètic per tal de descartar específicament la síndrome de Noonan i altres rasopaties. Autors com Croonen (579) i Stuurman (677) també hi estan d'acord.

Hem observat un empitjorament del pronòstic postnatal en els cinc casos (7,8%, 5/64) en els quals vam detectar una persistència de la translucència nucal a les 16-18 setmanes. En aquest subgrup es va observar un major índex de problemes de neurodesenvolupament de fins al 40% (2/5 casos), superior al publicat per altres autors com Souka (674). Dintre d'aquests cinc casos destacar: dues síndromes de Noonan (un cas èxitus) i una seqüència Pierre-Robin.

A la nostra sèrie l'evolució dels dos casos de Noonan ha estat desfavorable. El cas 302 va ser èxitus i el cas 163 va néixer amb fenotip característic. Actualment controlat per Pediatria, Genètica, Cardiologia Pediàtrica i Neurologia presenta estancament ponderal amb necessitat de suport nutricional, alimentació per sonda nasogàstrica. Precisa també de tractament mèdic amb atenolol donada la hipertròfia ventricular esquerra concèntrica amb obstrucció al tracte de sortida esquerra i arc aòrtic distal que pateix. Neurològicament, en el seguiment a 36 mesos, ha presentat una capacitat cognitiva subòptima amb retard del llenguatge receptiu-expressiu i manca d'atenció (Bayley-III a l'edat cronològica 36 mesos: escala cognitiva 80/100, escala del llenguatge 80/100, escales socio-emocional i adaptativa 70/100).

Respecte al cas 255, nena diagnosticada d'una seqüència de Pierre-Robin amb microretrognàtia, fissura palatina, laringomalàcia, fenotip dismòrfic (baixa implantació d'orelles, quart dit en martell a dues mans), ronyó ectòpic (ronyó dret pèlvic) i estancament pondoestatural amb dificultats per a l'alimentació que va requerir sonda nasogàstrica fins a la intervenció de la fissura palatina als cinc mesos de vida, amb pes i talla en p3. Aquesta nena ha presentat una mala evolució pel que fa al creixement amb marcat estancament de pes i un dèficit neurològic lleu amb retard en l'adquisició de la parla (Bayley-III a l'edat cronològica 36 mesos: escala cognitiva 80/100, escala del llenguatge 70/100, escales socio-emocional i adaptativa 78/100). Coincidim amb el publicat per altres autors (678) en el fet que el pronòstic dels fetus amb seqüència de Pierre Robin pot ser favorable especialment per als fetus sense altres troballes associades i anàlisi cromosòmica normal. Tanmateix, el diagnòstic prenatal d'una micrognàtia és sovint un indicador de patologia fetal i justificaria un maneig multidisciplinari. L'ús de seqüenciació de gens d'alt rendiment en període prenatal podria millorar el rendiment diagnòstic, l'assessorament prenatal i l'atenció postnatal.

Axt-Fliedner (567) reporta una taxa de trastorns del neurodesenvolupament en fetus amb increment de la translucència nucal amb cariotip normal, un cop descartades les malformacions estructurals majors i després de la normalització de la translucència nucal durant el segon trimestre, de l'1,1%. Malgrat que els nostres resultats han estat superiors, del 5,6%, estem d'acord amb aquest autor en què si l'array cromosòmic és normal i no hi ha malformacions estructurals associades amb la normalització a l'ecografia del segon trimestre, el pronòstic neurològic a llarg termini d'aquests nens és



bo, donat que quedarien excloses moltes de les síndromes genètiques que nosaltres hem comptabilitzat com a seguiments desfavorables.

## 6.2.2 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB $TN \geq p95$ I $< p99$ .

**Discussió (objectiu principal):** Estudiar l'ús clínic del microarray en el diagnòstic prenatal dels fetus amb  $TN \geq p95$  i  $< p99$

Es va realitzar l'array-CGH i/o QF-PCR en tots aquest fetus, el 16,6% (5/30) presentaven un cariotip anormal: tres casos de trisomia 21, un cas de trisomia 18 i un cas de síndrome de Klinefelter. Tots ells van sol·licitar la interrupció legal de l'embaràs.

L'array prenatal es va realitzar en 25 casos (83,3%) i en un cas (4%) dels casos el resultat va ser patològic.

Es va detectar una CNV patogènica (cas 220), corresponia a una microdeleció *de novo*, d'aproximadament 1,8 Mb a la regió distal de la banda cromosòmica 22q11.2 (OMIM #611867), flanquejada per duplicacions segmentàries, i que s'ha reportat a la literatura associada a fenotips variables (679).

Els canvis en el nombre de còpies recurrents que es produeixen en tot el genoma sovint estan flanquejats per seqüències d'ADN repetitives anomenades duplicacions segmentàries o repeticions de còpies (low copy repeats, LCRs) (680,681). El braç llarg proximal del cromosoma 22 conté un grup de LCRs (LCR22A-H) que predispesa a diverses CNVs recurrents (682). El mecanisme de deleció es veu afavorit per aquestes regions inestables (LCRs). La microdeleció 22q11.2 es produeix en humans en aproximadament 1:4000-1:6000 naixements vius (683,684). La síndrome de deleció 22q11.2 està ben caracteritzada i s'associa amb una àmplia gamma de fenotips clínics inclosos la síndrome velocardiofacial (VCFS) [OMIM #192430](685) i la síndrome de DiGeorge (DGS [OMIM #188400])(686). La deleció 22q11.2 pot cursar amb una gran varietat de troballes, incloent-hi malformacions cardiovasculars que consisteixen principalment en anomalies del cor conotruncals, anomalies del paladar, fenotips dismòrfics, dificultats d'aprenentatge, deficiència immune, hipocalcèmia congènita i anomalies urogenitals (687). De fet, el terme alternatiu CATCH22 (acrònim de Cardiac abnormality/Abnormal facies, T cell deficit, Cleft palate and Hypocalcemia) intenta englobar aquesta variabilitat clínica.

Aquestes microdeleccions a la porció proximal de la regió 22q11.2 són les microdeleccions patogèniques recurrents més freqüents i inclouen la síndrome de DGS / VCFS. Recentment s'han descrit deleccions distals a la regió de deleció comuna en pacients amb característiques clíniques relacionades amb DGS / VCFS però no exactament iguals (688). Fins ara, les microdeleccions 22q11.2 s'han agrupat com una única entitat clínica tot i que aquestes deleccions són variables en grandària i posició (689). No obstant això, no tots els autors ho consideren així. Mikhail et al.(690) defensen que no representen una sola entitat clínica, i fins i tot, han proposat un sistema de categorització per a les microdeleccions distals: pacients amb microdeleció flanquejada per LCR22-D i -E, amb fenotip concordant amb casos prèviament reportats de microdeleccions distals 22q11.2. Pacients amb microdeleció flanquejada per LCR22-D i -F, també amb un fenotip similar i pacients amb microdeleció flanquejada per LCR22-E i -F, que presenten una alteració del fenotip lleu sense restriccions de creixement ni defectes cardiovasculars.

L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional per a variants patogèniques va ser del 4,1%.

## **Discussió (objectius secundaris):**

**Determinar quines alteracions s'han detectat amb microarray, a priori no diagnosticables per cariotip en fetus amb translucència nucal en  $p \geq 95$  i  $p < 99$ .**

L'array-CGH es va aplicar en 25 casos. L'array va ser patològic en un cas (cas 220). Es va detectar una CNV patogènica: microdeleció distal 22q11.2, ja comentada. Aquesta pacient va patir una amniorrèxi espontània post-tècnica invasiva i un avortament posterior.

**Correlacionar les troballes ecogràfiques amb els resultats genètics en fetus amb translucència nucal en  $p \geq 95$  i  $p < 99$ .**

L'estudi morfològic detallat entre les 18 i 22 setmanes de l'embaràs va diagnosticar quatre casos d'anomalia ecogràfica estructural fetal (28,1%), un cop descartada l'anomalia cromosòmica numèrica: un fetus amb una comunicació interventricular muscular de mida petita, un altre fetus amb una artèria subclàvia aberrant dreta i dos casos de dilatació pièlica bilateral lleu (UTD A1)(691). En cap fetus es van diagnosticar malformacions en més de dos òrgans o sistemes.

L'ecografia de tercer trimestre va diagnosticar també un cas de ventriculomegàlia fetal lleu no confirmada per neurosonografia fetal i sense repercussió postnatal i dos casos de fetus grans per l'edat gestacional (2/23, 8%). No es van observar altres troballes en controls ecogràfics posteriors. L'evolució de les anomalies renals va ser òptima i en els dos casos es va resoldre de forma espontània avantpart.

**Seguiment de les gestacions i quantificar les complicacions de les tècniques invasives de diagnòstic prenatal realitzades.**

Hem detectat en total dos casos d'avortament atribuïbles a la tècnica invasiva. El cas 220 amb CNV patogènica (la gestant havia sol·licitat ILE però es va produir l'avortament abans) i el cas 218, els dos van ser biòpsies corials. Això suposa una taxa de pèrdua de gestació en aquest subgrup del 8%, superior a l'esperada (556,672). Considerem aquestes diferències atribuïbles a l'atzar donada la petita mostra d'aquest subgrup de pacients.

**Valoració postnatal dels nounats amb anomalies detectades al microarray, a excepció dels casos on la pacient sol·licita la interrupció legal de l'embaràs (ILE) en aquest subgrup d'estudi.**

En el seguiment postnatal (0-36 mesos) aquests infants han presentat un neurodesenvolupament correcte per l'edat. Comparativament amb la població general, aquest subgrup de fetus amb TN  $p \geq 95$  i  $p < 99$  ha patit major nombre d'anomalies cromosòmiques (20%) i també d'anomalies ecogràfiques (28,1%), especialment cardíaques i renals. Cal dir que han estat anomalies estructurals menors sense impacte en el neurodesenvolupament.

### 6.2.3. L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB PN PATOLÒGIC (> p99) AL II TRIMESTRE

#### Discussió Objectiu Principal: Estudiar l'ús clínic del microarray en el diagnòstic prenatal dels fetus amb PN > p99

L'array prenatal es va realitzar en els 24 casos. Es van detectar dues VOUS (2/24, 8,3%). Els casos de VOUS diagnosticats van ser:

- ❖ Cas 49: Duplicació de 375 kb a la banda cromosòmica 20q13.33 que afectava el gen *SOX18* (OMIM \*601618)(692,693), gen que participa en el desenvolupament del cabell, vasos sanguinis i vasos limfàtics. Els gens *SOX* codifiquen un grup de factors de transcripció definit per la presència d'un domini d'unió a ADN anomenat "grup conservat d'alta mobilitat" (HMG-box). Els gens *SOX* són definits com a gens que contenen la "HMG-box" d'un gen involucrat en la determinació sexual i que es diu gen *SRY*, que es troba en el cromosoma Y del genoma humà i que és responsable de la iniciació del procés de determinació del sexe masculí en humans. Estan descrites mutacions d'aquest gen *SOX18* associades a una síndrome poc freqüent d'hipotricosi-linfedema-telangiectàsia (694,695). També amb associació a anomalies renals (696) i dilatació de l'aorta ascendent (697). Darrerament ha aparegut evidència de la implicació del gen *KCNQ2* en l'epilèpsia, aquest gen localitzat a 20q13.3, sembla tenir una implicació en quadres convulsius (698,699). En l'actualitat es coneixen diferents gens que codifiquen per a aquests canals iònics i poden explicar la patologia epilèptica donada l'alteració de l'excitabilitat neuronal pel funcionament erroni d'aquests canals. Aquest gen podria estar relacionat amb les manifestacions clíniques del nostre cas. Malgrat tot, encara no hi ha prou evidència per considerar aquesta variant com patogènica.
- ❖ Cas 279: Duplicació de 304 kb a la banda cromosòmica que no coincidien amb CNVs polimòrfiques i podien alterar l'estructura o la dosi dels gens *CBFB* i *HSF4*. Aquestes alteracions avui dia només es poden classificar com VOUS, ja que no hi ha prou literatura encara per classificar-les com benignes o patogèniques.

Aquests casos no es podrien diagnosticar per cariotip convencional.

#### Discussió (objectius secundaris):

##### **Determinar quines alteracions s'han detectat amb microarray, a priori no diagnosticables per cariotip en fetus amb PN patològic (> p99).**

Els 2 VOUS (cas 49 i cas 279) anteriorment descrits. L'increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional va ser del 8,3%, no ha estat així per a les CNVs patogèniques. No hem diagnosticat cap CVN patogènica dins d'aquest subgrup.

### **Correlacionar les troballes ecogràfiques amb els resultats genètics en fetus amb PN > p99.**

L'estudi morfològic detallat entre les 18 i 22 setmanes de l'embaràs va diagnosticar dos casos de malformacions fetals associades a l'augment del PN > p99 (2/24, 4.1%): un cas d'hidronefrosi congènita bilateral de baix grau (UTD A1, cas 13) i una duplictat pièlica renal unilateral (cas 176).

Durant el tercer trimestre vam diagnosticar un cas d'hidronefrosi fetal d'alt grau (UTD A3, cas 56) i cinc fetus amb pes estimat > p90 per l'edat gestacional (5/24, 20%).

En cap fetus es va diagnosticar malformacions en més de dos òrgans o sistemes.

### **Seguiment de les gestacions i quantificar les complicacions de les tècniques invasives de diagnòstic prenatal realitzades.**

S'han realitzat 24 amniocentesis. No s'ha produït cap avortament. Creiem que això es deu a fet que la mostra d'aquest grup ha estat petita i les setmanes de gestació més avançades.

### **Valoració postnatal dels nounats amb anomalies detectades al microarray, a excepció dels casos on la pacient sol·licita la interrupció legal de l'embaràs (ILE) en aquest subgrup d'estudi.**

En el seguiment postnatal (0-36 mesos) aquests infants han presentat un neurodesenvolupament correcte per l'edat. El cas 49 no ha presentat clínica fins al moment de la síndrome d'hipotricosi-linfedema-telangiectàsia, val a dir que té tres anys però si va presentar durant el segon any de vida una epilèpsia focal estructural amb hipoplàsia de l'hipocamp esquerre, actualment en seguiment i tractament per Neurologia pediàtrica, amb un neurodesenvolupament correcte per l'edat.

Destacar els 5 casos amb diagnòstic de TN  $\geq$  p99 (7,8%, 5/64) al primer trimestre que van presentar un PN  $\geq$  p99 durant el segon trimestre de l'embaràs. En aquest subgrup es va observar un major índex de problemes de neurodesenvolupament i de dismorfies facials (2/5 casos, 40%).

Pel que fa a les anomalies renals: el cas 13 amb hidronefrosi congènita bilateral de baix grau (UTD A1) es va resoldre intraúter i el cas 176 amb duplictat pièlica renal unilateral manté encara els controls amb Nefrologia pediàtrica.

Durant el tercer trimestre vam diagnosticar un cas d'hidronefrosi fetal de d'alt grau (UTD A3, cas 56) que ha normalitzar-se postpart.

### **6.3 L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY EN EL DIAGNÒSTIC PRENATAL DELS FETUS AMB MALFORMACIONS ESTRUCTURALS.**

**Discussió (objectiu principal): Estudiar l'ús clínic del microarray en el diagnòstic prenatal dels fetus amb malformacions estructurals.**

Estem obligats a descartar anomalies genètiques davant el diagnòstic de malformacions estructurals fetals (153). Malgrat tot, la majoria dels embarassos amb anomalies a l'examen ecogràfic mostren un cariotip convencional normal i per tant són susceptibles de beneficiar-se d'anàlisi d'array (160).

En general, la major part d'estudis sobre l'ús de l'array-CGH prenatal aplicat a poblacions d'alt risc estableixen el percentatge de detecció d'alteracions cromosòmiques al voltant del 6% (5,8-7,6%) (14,15,161–163). Aquesta taxa de detecció augmenta quan s'analitzen aquells fetus amb malformacions estructurals ecogràfiques arribant a ser del 8% (5,2-13,3%) segons alguns autors (15,162–167), a diferència del que succeeix amb les gestacions de baix risc on l'increment diagnòstic de l'array és del 0,4% (700).

Pel que fa a l'anàlisi de les dades globals dels fetus amb malformacions estructurals, a la nostra sèrie, hem trobat un increment diagnòstic de l'array-CGH sobre el cariotip convencional del 7,1%. Aquesta dada és superposable a l'evidència que hi ha a la literatura al respecte, ja referenciada prèviament. Tanmateix, creiem necessari aprofundir en l'estudi de les diferents malformacions, de les malformacions dels diferents òrgans i/o sistemes, donat que en aquest camp no hi ha massa literatura al respecte.

#### **- Malformacions dels SNC.**

Els estudis publicats demostren que les malformacions del SNC detectades per ecografia estan fortament associades amb anomalies cromosòmiques, especialment la trisomia 13 i 18 (242–244). Sun L (273) detecta un 10,9% de CNVs patogèniques en fetus que presentaven malformacions del SNC i cariotip aparentment normal i Shaffer (171) reporta una taxa de detecció de CNVs significatives del 6,5% en els fetus amb una anomalia SNC i de fins a l'11% en els casos amb malformacions del SNC associades a altres defectes. A la nostra sèrie, un 11,5% (3/26) dels casos estaven associats a aneuploidia i un 3,8% a array-CGH patològic. Hem identificat un 15,3% d'associació entre malformacions del SNC i cariotip anòmal, bé anomalies cromosòmiques numèriques bé microdeleccions-microduplicacions.

L'increment diagnòstic de l'array-CGH per aquest subgrup de malformacions, malformacions del SNC amb cariotip convencional normal) ha estat del 4,5% (1 cas de CNV patogènica), lleument inferior al publicat per autors com SUN L (273) i Shaffer (171).

Per classificar i estudiar les malformacions del SNC hem d'analitzar en un primer moment quina és la millor classificació a utilitzar. Hi ha diverses classificacions publicades a la literatura científica quant a malformacions dels SNC, algunes com la classificació de Sarnat (701) fan una anàlisi més etiopatogènica, altres com la de Barkovich (702) es centren principalment en les malformacions corticals. La més útil clínicament és la classificació de Pascual-Castroviejo (703). En general, hem de saber que quan les anomalies es produeixen pel fracàs de la inducció dorsal sorgeixen els

defectes de tancament del tub neural (cranial i/o caudal) que donen origen als disrafismes (comunicació persistent entre el neuroectoderma posterior i l'ectoderma cutani): Disrafismes cranials (SEAE) i disrafismes espinals. I quan fracassa la inducció ventral, implicant a les tres capes germinals, s'afecta primordialment la divisió i expansió lateral de la vesícula cerebral primària, freqüentment s'associen a alteracions de la línia mitjana craniofacial, produint-se defectes com l'holoprosencefàlia. Altres anomalies descrites són les anomalies de fossa posterior o de la migració neuronal.

Autors com Sun L (273) descriuen la malformació de Dandy-Walker i l'holoprosencefàlia com les malformacions del SNC amb major risc d'associació a CNVs patogèniques: la malformació de Dandy-Walker (33,3%) i l'holoprosencefàlia (28,6%). No ha estat així en el nostre cas, donat que en el període d'estudi, els 2 casos d'holoprosencefàlia han estat trisomies 13.

Pel que fa a la ventriculomegàlia (VMG), la VMG lleu aïllada no progressiva és una troballa bastant comuna. El pronòstic dels fetus amb VMG pot variar depenent de l'etiologia, el grau de dilatació ventricular, les anomalies associades i la presència d'alteracions cromosòmiques. Així, es considera que només el 3% de fetus amb ventriculomegàlia aïllada enfront del 36% d'aquells amb malformacions addicionals presenten defectes cromosòmics (285). A la nostra sèrie, un 57,6% de les malformacions del SNC diagnosticades han estat VMG (15/26). D'aquestes el 53,3% (8/15) han estat unilaterals i el 93,3% (14/15) lleus. No hem trobat cap associació a aneuploidia entre els casos prenatals de VMG durant el període d'estudi, malgrat el descrit a la literatura per autors com Gezer et al. (704) que troben una associació positiva en el 4,2-6,8% dels casos. En canvi si hem establert una associació significativa amb l'array-CGH alterat, amb un increment diagnòstic per a CNVs patogèniques del 6,6% (1/15), però inferior a la descrita per autors com Hu et al. que va ha publicar una sèrie de 154 casos de VMG aïllada amb una taxa de CNVs patogèniques del 9% (277), però superior a la trobada per Dual et al. en el seu treball realitzat sobre 101 fetus també amb VMG aïllada amb un 3% de CNVs (705).

Alguna cosa semblant succeeix amb l'agenèsia de cos callós (ACC), on la detecció de CNVs és del 12% per autors com Sherr (286). Schumann (275) suggereix la implicació dels gens: *CNTN6* i *KLHL15* en l'etiologia de l'agenèsia del cos callós, *RASD1* i *PTPRD* en la malformació de Dandy-Walker i *ERMARD* en ventriculomegàlia. En la nostra sèrie els dos casos d'agenèsia de cos callós van presentar arrays normals.

Pel que fa als disrafismes espinals, no hi ha hagut cap cas a la nostra sèrie durant el període d'estudi.

L'anàlisi de microarray permet avaluar els desequilibris genòmics submicroscòpics que causen anomalies neurològiques fetals, especialment en holoprosencefàlia, lissencefàlia, i agenèsia del cos callós. Per tant, pot ajudar en el diagnòstic, la intervenció neonatal primerenca i l'assessorament genètic, proporcionant informació addicional en els fetus amb malformacions del sistema nerviós central i cariotip normal. L'array ha de considerar-se com a part de l'estudi de diagnòstic prenatal en aquests fetus.



## - Cardiopaties Congènites.

Les cardiopaties congènites (CC) constitueixen les malformacions congènites severes més freqüents. Afecten aproximadament al 0,8-1% (179) dels nadons i en la meitat dels casos corresponen a defectes severes. A la nostra sèrie la CC ha representat el 28,4% del total de malformacions fetals diagnosticades durant el període d'estudi. En aquest subapartat analitzem aquelles cardiopaties congènites en fetus amb TN < p95 a l'ecografia del primer trimestre, els altres casos han estat analitzats i discutits prèviament.

La presència d'una CC incrementa el risc de presentar una altra malformació, entre un 11,7%-31,2% (193,206–208). Les CC que s'associen amb més freqüència a anomalies extracardíaques són: l'heterotàxia, l'atrèsia tricuspídia, la síndrome del cor esquerre hipoplàsic i la tetralogia de Fallot (189). Les malformacions descrites a la literatura més freqüentment associades a la CC són les urinàries i gastrointestinals (706). A la nostra sèrie, del total de fetus amb dues o més malformacions, un 37,5% presentaven associada una anomalia cardiovascular a una altra malformació estructural. Les més freqüentment associades van ser les nefrourinàries (33,3%, 2/6) i les anomalies EEII (33,3%). Les CC més freqüentment implicades han estat l'ARSA i la CIV (Taula 15).

Hem trobat una prevalença d'anomalies cromosòmiques associades a les CC fetals del 22,8 % amb un 14,2% d'aneuploïdies, similar a la publicada per autors com Song i Wang, d'entre 28-40% (189,707). Quan la CC s'ha associat a altres malformacions la taxa d'anomalies cromosòmiques no ha variat a la nostra sèrie. El canal AV (2/3 casos, 66.6%) i la CIV perimembranosa (3/4, 75%) han estat les CC amb una major associació amb anomalies de la QF-PCR i/o array (Taula 14).

Jansen (179) en la seva metanàlisi va comprovar que existia un rendiment diagnòstic incrementat del 7,0% per a la detecció de CNVs utilitzant l'array-CGH, excloent els casos de microdeleció 22q11 i aneuploïdia, amb un 3,4% de rendiment incrementat en els casos de CC aïllades, i un 9,3% quan s'hi detectaven malformacions extracardíaques associades. A la nostra sèrie, l'increment del rendiment diagnòstic per a CNVs, excloent els casos d'aneuploïdia, ha estat del 16,6%. Del 6,6% per a CNVs patogèniques i del 10% per a variants de significat incert, resultats comparativament superiors als publicats per autors com Wang (707) però similars als publicats per autors com Jansen (179) i Yan (213).

## - Malformacions toracoabdominals.

A la nostra sèrie ni els casos de MAQ ni de gastròsquisi s'han associat amb anomalies de l'array-CGH.

Han estat els casos diagnosticats d'omfalocele els que han presentat major associació, amb un 50% de casos, amb anomalia cromosòmica numèrica (2/4 casos, 50% T18) i 25% de casos (1/4 casos) amb alteració de l'array-CGH (1 cas de CNV patogènica, cas 297): una deleció terminal en el braç curt del cromosoma 3 (heretada via paterna), no relacionada directament amb l'omfalocele, que altera l'estructura de gen de referència *CNTN4*, que està associat a susceptibilitat de trastorns del neurodesenvolupament (708,709). Xu (710) reporta en el seu treball un cariotip patològic en un 66% (31/47) de casos d'omfalocele associada a altres malformacions i en un 1,7% (1/60) de casos d'omfalocele aïllada. No detecta cap CNV patogènica en 59 casos amb omfalocele



aïllada i cariotip normal. No ha estat així a la nostra petita sèrie on l'increment del rendiment diagnòstic per l'array-CGH en els casos d'omfalocèle per a CNVs ha estat del 50% (1/2 casos), aquest fetus que ha presentat la CNV patia a més altres anomalies associades. Tot i l'alta associació de l'omfalocèle a la cromosomopatia el fet de presentar-se com a malformació aïllada, un cop descartada l'aneuploïdia, i en això sí que coincidim amb aquest darrer autor, dona a aquesta malformació un millor pronòstic.

Una altra entitat que mereix una especial atenció és l'hèrnia diafragmàtica congènita (HDC). Aquesta malformació és fenotípica i genèticament un trastorn heterogeni. Es dona en aproximadament en 1/4000 naixements (711). S'han detectat desequilibris genòmics associats amb HDC en pacients amb HDC aïllats en un 4-10% dels casos identificats de forma prenatal. S'identifiquen sovint amb aneuploïdies (302,303). Es pot produir com una anomalia aïllada, associada a múltiples defectes o com a part d'una síndrome definida. Tot i que l'etiologia exacta de la majoria dels casos de HDC és desconeguda, hi ha una evidència creixent de què els factors genètics tenen un paper important en el desenvolupament de la HDC. Amb l'aparició de noves tècniques moleculars, un nombre creixent d'anomalies cromosòmiques submicroscòpiques estructurals han estat descrites en associació amb aquesta malformació. Les principals regions crítiques relacionades amb els casos de HDC descrites a la literatura són 15q26.2, 15q24, 15q22, 1q41-q42, 8p23.1 i 4p16.3 (304,305), que inclouen els gens candidats *NR2F2* i *CHD2*, que contribueixen a una via alterada de senyalització de l'àcid retinoic implicada en el desenvolupament del pulmó i el diafragma (304,306,307).

A la nostra sèrie s'han diagnosticat un total de 4 casos, 2 casos d'hèrnia diafragmàtica congènita a l trimestre associats a una TN > p99, aquest subgrup ja ha estat comentat amb anterioritat, però destacar que un 50% (1/2) presentaven anomalies de la QF-PCR i/o de l'array-CGH, concretament el cas 272. Quan l'hèrnia diafragmàtica congènita s'ha presentat sense associació a translucència nucal patològica i de forma aïllada, en total 2 casos més, el diagnòstic ha estat més tardà i no hem trobat associació a anomalies cromosòmiques. Autors com Stark (712) reporten fins a un 25% de CNVs que poden contribuir a la patogènesi de HDC, incloent-hi la microdeleció de 9q22.31q22.32, microdeleccions atípiques de 22q11.21, microdeleció de 2q35q36.1 i microdeleció de 15q11.2. Zhu (713) publica una freqüència estimada de possibles CNVs causants d'aquesta malformació inferior, del voltant del 9,7%. A la nostra sèrie, i d'entre les HDC diagnosticades a l trimestre associades a TN > p99, es va diagnosticar un cas de microdeleció de la banda cromosòmica 8p23.3p22 (cas 272), variant patogènica amb clara implicació en la patogènesi de l'hèrnia diafragmàtica (608).

#### **- Malformacions genitourinàries.**

Els defectes congènits del tracte urinari presenten elevades taxes de detecció prenatal (84%) (269), malgrat això estimar la prevalença d'anomalies genètiques responsables no és tasca fàcil. Variacions del nombre de còpies (CNVs) s'han detectat en un 10,1% dels pacients, el 3,9% eren de patogènica coneguda i el 6,2% de significació desconeguda. El pocs estudis presents a la literatura manifesten que els pacients diagnosticats amb ronyó displàsic multiquístic i aquells afectes de valves uretrals posteriors són els que presentaven una major incidència de CNVs (299). La displàsia multiquística renal malgrat no ser una entitat massa prevalent (1/4300 naixements) sembla que presenta associació amb CNVs fins en un 13% dels casos (300). Les variants genètiques responsables de la majoria dels casos continuen sent desconegudes. La duplicació 22q11.1, la microdeleció 4q35.2, la duplicació 22q13.33 i

la duplicació de 1p33 s'han associat amb la displàsia multiquística renal fetal. Variants en els gens *PEX26*, *ELN*, *HNF1B*, *ALG12*, *FRG1*, *FRG2* i *CYP4A11* semblen estar implicades en l'etiopatogènia d'aquesta patologia (301,714)

Malgrat ser una de les malformacions estructurals fetals més diagnosticades en la vida prenatal quan es presenten de forma aïllada, a la nostra sèrie no han presentat associació a anomalies de l'array. Caruana (299) reporta fins a un 10,1% de CNVs en nens diagnosticats de patologia de l'espectre d'anomalies estructurals associades a anomalies congènites del ronyó i el tracte urinari (*CAKUT*, *congenital anomalies of the kidney and urinary tract*), però el seu estudi cromosòmic és realitzat de forma postnatal en nens amb patologia renal coneguda. A la nostra casuística hem diagnosticat 14 casos de malformacions nefrourològiques (UTD, A2-3) tots ells amb array prenatal normal. Coincidim amb Levy et al. (715) en l'afirmació que en les anomalies cardíques aïllades l'array mostra un rendiment alt però discrepem quant a les anomalies renals, aquest autor reporta fins a un 10,6% d'increment diagnòstic de l'array respecte al cariotipatge convencional, fet que nosaltres no hem pogut evidenciar.

Hem diagnosticat també tres casos amb malformacions de l'aparell genital, en dos casos l'anomalia de l'aparell genital va ser la malformació major diagnosticada i en un tercer cas va formar part de la síndrome Pterigium popliteal i va ser possible trobar la mutació responsable mitjançant anàlisi de seqüenciació de la regió codificant incloent els axons 3-9 del gen *IRF-6* detectant-se una mutació en heterozigosi c.250C>T(p.Arg84Cys), aquest canvi *missense* provoca un canvi d'una arginina per una cisteïna en posició 84 ja reportat a la literatura per autors com Houweling i Ghassibe (716,717). L'associació de les anomalies de l'aparell genital a altres malformacions segons alguns autors arriba a ser del 22,9% i del 9,8% per a defectes genètics (718), a la nostra sèrie ha estat fins i tot superior.

#### **- Malformacions musculoesquelètiques.**

S'han diagnosticat 17 casos: 15 casos de malformacions d'extremitats inferiors (3 casos de fetus amb peu bot unilateral i 12 casos amb afectació bilateral) i 2 de superiors (polidactílies).

Dos casos (2/17, 11,7%) van presentar alteracions associades de la QF-PCR i/o array-CGH: un cas va ser diagnosticat de trisomia 18 i un altre cas d'una microdeleció de 6,5 Mb a les bandes cromosòmiques 13q14.11-q14.2 (cas 136) que alterava la dosi de més de 30 gens RefSeq, alguns d'ells mòrbids a OMIM, a destacar entre ells el gen supressor de tumors *RB1* (retinoblastoma 1, OMIM 614041) (719).

A la nostra sèrie, l'increment del rendiment diagnòstic per a CNVs en aquests casos ha estat del 6,2%, lleument inferior al que publiquen autors com Shaffer (7,9%) (171) o Vestergaard (15%) (720).

## - Dues o més malformacions associades.

El 13,1% dels fetus durant el període d'estudi varen presentar malformacions de dos o més òrgans o sistemes. Aquesta proporció és semblant a la que presenten altres autors (171). Tots aquest casos ja han estat estudiats prèviament segons la malformació fetal major diagnosticada però ara els analitzarem també com a grup de fetus amb dos o més malformacions estructurals ecogràfiques.

Hem diagnosticat a la nostra casuística, dins d'aquest grup de fetus, una anomalia cromosòmica numèrica i una síndrome de microduplicació-microdeleció, això suposa un increment del rendiment diagnòstic de l'array sobre el cariotip convencional del 6,6% (1/15), discretament inferior al que reporten autors com Levy (13.6%) (715), Donnelly (13%) (721) o Shaffer (10%) (171).

Del conjunt d'aquests resultats sembla obtenir-se cada cop una major evidència sobre la viabilitat d'introduir l'array-CGH en el diagnòstic prenatal com a prova de primera línia en indicacions seleccionades tal i com recomana l'ACOG (159)(172).

## Discussió (objectius secundaris):

### **Determinar quines alteracions s'han detectat amb microarray, a priori no diagnosticables per cariotip en fetus amb malformacions majors.**

L'array prenatal es va realitzar en 112 fetus. S'han diagnosticat 9 CNVs en 7 fetus (7/112, 6.2%): 3 VOUS en 2 fetus (1 fetus va presentar 2 VOUS) i 5 CNVs patogèniques.

Els casos de VOUS diagnosticats van ser:

- ❖ Cas 132: Duplicació d'aproximadament 1,67 Mb a 5q23.1q23.2 que alterava la dosi de 5 gens RefSeq (entre ells: *FTMT*, *SRF*) i duplicació de 271 kb a 9p24.3 que podria alterar la dosi i/o estructura del gen *KANK1* (OMIM 607704) (722) i del gen *DMRT1*, l'haploinsuficiència del qual s'ha descrit associada a disgenèsia gonadal 46,XY (723–726) i trastorns de l'espectre autista (727). D'acord amb les troballes i els coneixements actuals aquestes dues alteracions s'han classificat com a VOUS. Es creu que les variants de nombre de còpia que inclouen el gen *KANK1*, podrien tenir impacte en el neurodesenvolupament (728,729). No obstant això, hi ha treballs que posen en dubte el fet que les variants del gen *KANK1* puguin ser clínicament significatives, i més aviat les tracten com a benignes (730). El fetus presentava dues VOUS, heretada cadascuna d'elles d'un dels progenitors. Actualment aquest nen no presenta alteracions en el neurodesenvolupament.
- ❖ Cas 182: Triplicació de 280 kb a la banda cromosòmica 7p15.3 que afectava el gen *DNAH11* (gestant portadora). S'ha descrit la implicació d'aquest gen en la disquisició ciliar primària (PCD) que és un trastorn hereditari que causa una morbiditat significativa de les vies respiratòries i una disminució de la fertilitat. La meitat dels pacients amb PCD presenten un situs anòmal i freqüentment simptomatologia compatible amb rinitis greu, sinusitis i otitis mitjana (731–733).

Cap d'aquests casos no es podria diagnosticar per cariotip convencional. Aquestes alteracions es poden classificar com VOUS, ja que no hi ha prou literatura encara per classificar-les com benignes o patogèniques.

Les CNVs patogèniques diagnosticades van ser:

- ❖ Cas 24: Deleció intersticial de 2,6 Mb a 22q11.21 que alterava la dosi de 50 gens RefSeq, alguns d'ells descrits a OMIM (OMIM #188400) i associats a patologia. Aquesta deleció coincideix amb una regió de reordenament recurrent: síndrome de microdeleció 22q11.21, reportada a la literatura i associada a fenotips variables. L'espectre fenotípic engloba diverses síndromes entre les quals destaca la síndrome de DiGeorge. En la síndrome de DiGeorge (DGS) és característic que els pacients presentin hipocalcèmia derivada de la hipoplàsia de les paratiroides, hipoplàsia del timus i defectes del cor (734). L'alteració de la migració cel·lular de la cresta neuronal cervical cap a les derivades dels arcs faringis pot explicar el fenotip. La majoria dels casos resulten d'una deleció del cromosoma 22q11.2 (735)(736). Aquesta deleció pot presentar-se amb diversos fenotips: síndrome velocardiofacial (VCFS)(OMIM #192430)(737), síndrome de Takao, i defectes aïllats dels tractes de sortida del cor incloent tetralogia de Fallot, truncus arteriosus i interrupció de l'arc aòrtic. S'han proposat les sigles CATCH22 per a englobar aquestes diferents presentacions. Un petit nombre de casos de DGS tenen defectes en altres cromosomes, especialment 10p13 (OMIM 601362)(738). Burn (739) proposa que el terme síndrome de DiGeorge quedi reservat per a aquells casos amb presentació neonatal, especialment amb hipoplàsia tímica i hipocalcèmia, i que la designació VCFS sigui utilitzada per a nens amb una presentació dominada per la insuficiència palatina. Finalment, el mateix Burn proposa que s'utilitzi el terme "fenotip CATCH" en lloc de CATCH22 i que les sigles siguin representatives d'anomalia cardíaca, dèficit de cèl·lules T i hipocalcèmia. La majoria de pacients afectes d'aquesta microdeleció presenten defectes cardíacs conotruncals, immunodeficiència moderada, hipocalcèmia neonatal transitòria, anomalies del paladar, trets dismòrfics, trastorns del neurodesenvolupament, així com epilèpsia i trastorns psiquiàtrics (740).
  
- ❖ Cas 28: Deleció de 2,4 Mb a 17q21.32q21.33, diagnosticant-se d'una síndrome de Koolen-de Vries (KdV) (microdelecció de 17q21,31; OMIM: 610443) (741) que es caracteritza per hipotonia, dificultat d'alimentació, afectació moderada del desenvolupament (específicament psicomotor i de parla), convulsions, característiques facials que inclouen un nas amb punta bulbosa i plecs epicàntics. Aquesta síndrome es presenta en 1 de cada 16 000 nascuts i el pronòstic és molt variable. Poden presentar també debilitat muscular (hipotonia) a la infància, epilèpsia, anomalies cardíques, problemes renals i anomalies esquelètiques com deformitats dels peus (741). Aquesta síndrome, poc comuna, és causada per delecions en el gen *KANSL1* (742–744). L'herència és majoritàriament autosòmica dominant, però en el nostre cas els pares no eren portadors. En aquesta regió cromosòmica també es troba el gen *CACNA1G* que ha estat reportat a la literatura en un pacient amb discapacitat intel·lectual i dismòrfia (745) i el gen *COL1A1* (OMIM 120150)(746) associat a les síndromes d'Ehlers-Danlos i osteogènesi imperfecta. A la nostra pacient s'ha confirmat genèticament el diagnòstic d'osteogènesi imperfecta amb escleròtides blaves

(tipus I vs tipus VII), no obstant això, no ha presentat clínica al respecte. Tanmateix presenta, a més de la cardiopatia congènita i un retard psicomotor moderat amb hipotonia, una síndrome nefròtica.

- ❖ Cas 136: Deleció intersticial de 6,5 Mb a 13q14.11q14.2 que alterava la dosi de més de 30 gens RefSeq, entre els gens afectats destacava l'afectació del gen supressor de tumors *RB1* (retinoblastoma 1, OMIM \*614041)(719). En alguns casos aquestes deleccions s'han descrit associades a altres manifestacions clíniques: restricció del creixement intrauterí, dismòrfia, retard psicomotor, hipotonia, anomalies en mans i peus. El fetus d'aquest cas presentava uns peus bots i la gestant va sol·licitar la ILE.
  
- ❖ Cas 216: Duplicació atípica a 17q21.31 de 400 kb i 162 kb, amb un interval intermedi de dosi normal, que corresponia a un reordenament complex. Aquestes variants s'han descrit associades a la síndrome de microduplicació 17q21.31 (OMIM #613533)(747), en pacients amb fenotips variables que poden incloure: microcefàlia, alteracions del neurodesenvolupament, tendència a l'obesitat i dismòrfia lleu. A l'estudi dels progenitors es va confirmar que la gestant era portadora de la mateixa duplicació sense afectació fenotípica important motiu pel qual aquesta gestant va continuar l'embaràs i actualment la nena, en el seguiment a 36 mesos, ha presentat un neurodesenvolupament en tot moment adequat a la seva edat.
  
- ❖ Cas 297: Deleció terminal de 268 kb a 3p26.3p26.2. Aquesta variant no semblava relacionar-se directament amb l'omfalocèle que presentava d'aquest fetus, que també presentava anomalia en les extremitats inferiors. Aquesta deleció afectava des de l'intró 4 fins a l'intró 13 del gen *CNTN4*. Les contactines són un grup de proteïnes que tenen un paper crucial en les xarxes neuronals i glials (708). La *CNTN4* participa en els processos de mielinització i promou a més l'arborització d'axons específics objectiu d'un subconjunt de cèl·lules ganglionars de la retina i tracte òptic (748,749). Està documentat que les molècules d'adhesió i reconeixement cel·lulars de la superfamília d'immunoglobulines tenen un paper crucial en la formació i el manteniment del sistema nerviós. La percepció, la cognició i el comportament es deriven de patrons de connectivitat molt precisos entre conjunts de neurones especialitzades funcionalment. A la literatura hi ha evidència que dóna suport a l'associació de la disrupció *CNTN4* amb el fenotip de la síndrome de deleció 3p i altres problemes del neurodesenvolupament, suggerint fortament una relació causal (750–752).

Cap d'aquests casos no es podria diagnosticar per cariotip convencional.

### **Correlacionar les troballes ecogràfiques amb els resultats genètics en fetus amb malformacions majors.**

En relació amb les troballes ecogràfiques i anomalies genètiques hem de destacar dos casos, els cas 135 i el cas 137. El cas 135, seqüència Pierre-Robin, aquesta pacient va presentar una recurrència posterior del quadre en una segona gestació amb array també normal motiu pel qual es va practicar un exoma clínic sense identificar cap variant patogènica que, d'acord amb el coneixement actual, pugui explicar el fenotip d'aquest fetus.

Pel que fa al cas 137, pterigium popliteal va ser possible trobar la mutació responsable mitjançant anàlisi de seqüenciació de la regió codificant incloent els axons 3-9 del gen *IRF-6* detectant-se una mutació en heterozigosi c.250C>T(p.Arg84Cys), aquest canvi *missense* provoca un canvi d'una arginina per una cisteïna en posició 84 ja reportat a la literatura per alguns autors (716). Mutacions en gen *IRF6* (factor regulador d'interferó 6) (753,754), localitzat al cromosoma 1(1q32), són responsables de síndromes com la síndrome de Van der Woude (VWS) (OMIM 119300) (755,756) i la síndrome de pterigerium popliti (PPS) (OMIM 119500) (757-759), dos trastorns relacionats amb la presència de fissures orofacials.

### **Realitzar el seguiment de les gestacions i quantificar les complicacions de les tècniques invasives de diagnòstic prenatal realitzades.**

S'ha detectat en total un cas d'avortament atribuïble a la tècnica invasiva (1/123, 0,8%), el cas ja comentat de la triploïdia on igualment el pronòstic de la gestació era inviable. A la nostra sèrie, el grup de gestants amb indicació de tècnica invasiva per malformació fetal estructural no ha presentat major taxa d'avortament que aquelles altres gestants que han accedit al diagnòstic prenatal invasiu a conseqüència d'altres indicacions (672).

### **Realitzar la valoració postnatal dels nounats amb anomalies detectades a l'array, a excepció dels casos on la pacient sol·licita la interrupció legal de l'embaràs (ILE) en fetus amb malformacions majors.**

Vam tenir una taxa de mortalitat perinatal global del 5,9% (5/84). Un cas d'èxit postpart que vam comentar prèviament (VACTER, cas 259) i 4 casos d'òbit avantpart.

Quant al seguiment postnatal dels nadons i especialment fixant-nos en el neurodesenvolupament hem de destacar:

- 16 dels nens del grup prenatal de malformacions del SNC. Excepte un cas d'agenèsia de cos callós que va presentar una alteració moderada del neurodesenvolupament (1/16,6.2%), la resta continuen en control anual i amb bona evolució en el seguiment a 36 mesos.
- 4 dels 6 nadons amb malformacions del macís facial han necessitat una o més intervencions quirúrgiques donat que eren nens amb llavi i/o paladar fes. Neurològicament l'evolució (0-36 mesos) ha estat òptima en tots ells.

- Els 23 dels nounats diagnosticats prenatalment d'una cardiopatia congènita han continuat controls per Cardiologia Pediàtrica. Han estat donats d'alta 2 dels 3 casos de CIV muscular aïllada que han tancat espontàniament al control ecocardiogràfic postnatal. Neurològicament només un cas (cas 28) d'una miocardiopatia hipertròfica amb CNV patogènica (deleció 17q21.32q21.33) a l'array ha presentat alteració del neurodesenvolupament (1/23, 4.3%). En la valoració a curt i mitjà termini (36 mesos), la nena presenta discapacitat intel·lectual moderada i dismòrfia.







## **7. CONCLUSIONS**



## 7. CONCLUSIONS

1. L'aplicació del microarray cromosòmic aporta un increment en el rendiment diagnòstic, respecte al cariotip convencional pel que fa a variants patogèniques, en els fetus amb CIR precoç i malformacions estructurals associades.
2. L'aplicació del microarray cromosòmic proporciona un increment en el rendiment diagnòstic, respecte al cariotip convencional, també en fetus amb una TN patològica  $p \geq 99$  i TN  $p \geq 95$  i  $< 99$ . A major TN pitjor pronòstic, major risc de cromosomopatia i de cardiopatia congènita.
3. L'aplicació del microarray cromosòmic proporciona un major increment en el rendiment diagnòstic, respecte al cariotip convencional, en fetus amb malformacions estructurals.
4. Les malformacions urinàries, quan s'han diagnosticat de forma aïllada, no han presentat associació amb anomalies de l'array-CGH. Tampoc els casos de MAQ ni de gastròsquisi.
5. L'anàlisi de microarray no presenta increment en el rendiment diagnòstic, respecte al cariotip convencional pel que fa a variants patogèniques, en els fetus amb PN patològic de segon trimestre.
6. La incorporació de l'array al diagnòstic prenatal ens permet millorar algunes de les limitacions del cariotip convencional i oferir un assessorament prenatal més acurat a les parelles progenitores.
7. La introducció de l'exoma prenatal i els panells multigènics ens han ajudat en casos on l'array ha estat normal amb resultat concloent en 7/9 casos realitzats. Considerem l'exoma prenatal una aposta de futur immediat, un cop descartades les aneuploïdies i les síndromes de microduplicació-microdeleció.



## **8. APLICABILITAT I LIMITACIONS**



## 8. APLICABILITAT I LIMITACIONS DE L'ESTUDI

Els nostres resultats reforcen la premissa de què l'array-CGH ha de constituir-se com a prova diagnòstica de primer nivell, necessària a la pràctica clínica diària, per a l'avaluació prenatal dels fetus amb anomalies ecogràfiques donat el seu rendiment diagnòstic.

Aquesta tècnica genètica ens permet millorar l'assessorament a les gestants i a les seves parelles i planificar millor el maneig tant de la gestació com del nou-nat. Així com aprofundir en el consell reproductiu.

Hem de comentar alguns aspectes que podrien haver estat limitats:

-Som conscients que el petit nombre de casos del nostre estudi, especialment quan hem treballat els diferents subgrups, pot fer difícil establir associacions i pot limitar els nostres resultats.

-Tanmateix comentar que hem depès en tot moment de la incidència de l'aparició de les troballes ecogràfiques a la nostra població durant el període d'estudi.

-En el context prenatal, pot ser difícil interpretar la rellevància clínica d'una VOUS donada la manca d'informació disponible actualment per a correlacionar les VOUS prenatales amb els fenotips postnats. Esperem que l'aplicació de l'array de forma majoritària i l'augment en el coneixement de les VOUS millori l'assessorament genètic de les gestants, donant lloc a una actitud encara més positiva cap a la incorporació de noves tecnologies en diagnòstic prenatal en els pròxims anys.





## **9. ABREVIACIONS I TERMINOLOGIA**



## 9. ABREVIACIONS I TERMINOLOGIA

**CMA:** chromosomal microarray analysis, array cromosòmic; **CNV:** copy number variations, variants en nombre de còpies, **CIR:** creixement intrauterí restringit; **RCIUp:** restricció de creixement intrauterí precoç, **TN:** translucència nual, **VOUS:** Variants of unknown significance, variants de significat incert. **ILE:** interrupció legal de la gestació.

**Heterogeneïtat genètica:** l'aparició de fenotips similars o idèntics com a conseqüència de la disrupció de diferents gens.

**Condició monogènica (mendeliana):** condició genètica resultant de la funció alterada d'un sol gen / locus.

**Herència multifactorial:** herència no monogènica de trets específics determinats per l'acció combinada de múltiples factors genètics i ambientals.

**NGS:** tecnologies de seqüenciació massivament paral·leles que produeixen molts centenars de milers o milions de lectures alhora.

**Seqüenciació de panells multigènics:** als efectes d'aquest document, la seqüenciació de panells multigens es referirà a la seqüenciació específica, principalment per NGS, d'una selecció de gens associats a una presentació clínica específica. Els gens inclosos en els panells solen tenir una profunditat de cobertura suficient per minimitzar els falsos negatius.

**Seqüenciació de tot el genoma (WGS):** procés utilitzat per determinar la seqüència de la major part del contingut de DNA que abasta tot el genoma d'un individu.

**Seqüenciació exòmica completa (WES):** procés utilitzat per determinar la seqüència d'ADN de la majoria dels exons de codificació de proteïnes que es troben en el genoma d'un individu.

**Detecció incidental:** variants genètiques identificades sense relació amb la indicació primària de la prova.

**Haploinsuficiència:** una còpia simple (haploide) del gen és insuficient per a mantenir la funcionalitat.

**Recursos Web:** Bases de dades consultades: PubMed, Ovid Medline, ISI Web of Knowledge (Web of Science) databases.

També:

- Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/>
- GEO omnibus main page, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/are.uab.cat/projects/geo/>
- Human Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>
- Linnaeus Centre for Bioinformatics (LCB) environment for microarray-data management, <http://www.lcb.uu.se/lcbdw.php>
- Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/are.uab.cat/Omim>
- DECIPHER database <https://decipher.sanger.ac.uk/>
- ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).
- ECARUCA, <http://www.ecaruca.net/>
- EUROCAT, <http://www.eurocat-network.eu/>





## **10. BIBLIOGRAFIA**





## BIBLIOGRAFIA

1. Khoshnood B, Greenlees R, Loane M, Dolk H. Paper 2: EUROCAT public health indicators for congenital anomalies in Europe [Internet]. Vol. 91, Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology. In: *Inserm*; 2011 [cited 2020 Aug 31]. p. S16. Available from: [/pmc/articles/PMC3320858/?report=abstract](#)
2. Morris JK, Springett AL, Greenlees R, Loane M, Addor MC, Arriola L, et al. Trends in congenital anomalies in Europe from 1980 to 2012 [Internet]. Vol. 13, PLoS ONE. Public Library of Science; 2018 [cited 2020 Aug 31]. Available from: [/pmc/articles/PMC5886482/?report=abstract](#)
3. Atta CAM, Fiest KM, Frolkis AD, Jette N, Pringsheim T, St Germaine-Smith C, et al. Global birth prevalence of spina bifida by folic acid fortification status: A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 106, American Journal of Public Health. American Public Health Association Inc.; 2016 [cited 2020 Aug 31]. p. e24–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26562127/>
4. Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Guía de práctica clínica: Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. *Diagnostico Prenat* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2020 Aug 31];24(2):57–72. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-diagnostico-prenatal-327-articulo-guia-practica-clinica-diagnostico-prenatal-S2173412712001059>
5. Steele M. CHROMOSOME ANALYSIS OF HUMAN AMNIOTIC-FLUID CELLS. Vol. 304, *The Lancet*. 1974. p. 1210.
6. Jacobson CB, Barter RH. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1967 Nov 15 [cited 2016 Jul 19];99(6):796–807. Available from: <http://www.ajog.org/article/000293786790395X/fulltext>
7. de Klein A, Tibboel D. Genetics. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2010 [cited 2020 Aug 31];19(3):234–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610197/>
8. Mansfield ES. Diagnosis of down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 1993 Jan;2(1):43–50.
9. Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. Vol. 17, *Prenatal Diagnosis*. 1997. p. 1299–311.
10. Diane Van Opstal<sup>1,3</sup>, Marjan Boter<sup>1,3</sup> D de J. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet*. 2009;17((1)):112–21.
11. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet*. 2001;358(9287):1057–61.

12. Grimshaw GM, Szczepura A, Hulten M, MacDonald F, Nevin NC, Sutton F, et al. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol Assess (Rockv)* [Internet]. 2003 [cited 2016 Oct 11];7(10). Available from: <http://www.journalslibrary.nihr.ac.uk/hta/volume-7/issue-10>
13. Nielsen J. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet*. 1991;May;87(1):81-3.
14. Armengol L, Nevado J, Serra-Juh?? C, Plaja A, Mediano C, Garc??a-Santiago FA, et al. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet*. 2012;131(3):513–23.
15. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D GW, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA B, AL, Ledbetter DH, Shaffer LG JL. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*. 2012;Dec 6;367((23):):2175-84.
16. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (80- )*. 1992;258(5083):818–21.
17. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, T Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med* 200911(3)139 –146.
18. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86(5):749–64.
19. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet*. 2009;52(4):161–9.
20. Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, et al. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013;17(6):589–99.
21. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM, Working Group for the American College of Medical Genetics A, et al. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med*. 2013;15(11):901–9.
22. Gross SJ, Bajaj K, Garry D, Klugman S, Karpel BM, Roe AM, et al. Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes. *Prenat Diagn* [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 Oct 11];31(3):259–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21207408>
23. Sahoo T, Cheung SW, Ward P, Darilek S, Patel A, Del Gaudio D, et al. Prenatal diagnosis

- of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization.
24. Hillman S, McMullan DJ, Maher ER, Kilby MD. ACOG Committee Opinion No. 446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2009;114(5):1161–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tog.12007>
  25. Manning M, Hudgins L, Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* [Internet]. 2010 Nov 18 [cited 2018 Feb 6];12(11):742–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1097/GIM.0b013e3181f8baad>
  26. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*. 2008;13(17–18):760–70.
  27. Bruce S, Leinonen R, Lindgren CM, Kivinen K, Dahlman-Wright K, Lipsanen-Nyman M, et al. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet* [Internet]. 2005 Nov [cited 2017 Mar 29];42(11):847–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879501>
  28. Schroeder C, Sturm M, Dufke A, Mau-Holzmann U, Eggermann T, Poths S, et al. UPDtool: a tool for detection of iso- and heterodisomy in parent-child trios using SNP microarrays. *Bioinformatics* [Internet]. 2013 Jun 15 [cited 2017 Mar 29];29(12):1562–4. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btt174>
  29. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(3):182–92.
  30. Liang J-S, Shimojima K, Yamamoto T. Application of Array-based Comparative Genome Hybridization in Children with Developmental Delay or Mental Retardation. *Pediatr Neonatol*. 2008;49(6):213–7.
  31. Saldarriaga W, García-Perdomo HA, Arango-Pineda J, Fonseca J. Karyotype versus genomic hybridization for the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities: A metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2020 Sep 1];212(3):330.e1-330.e10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2014.10.011>
  32. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* [Internet]. 2004;36(9):949–51. Available from: <http://www.nature.com/ng/journal/v36/n9/pdf/ng1416.pdf%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/ng1416>
  33. Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* [Internet]. 2011 Feb 3 [cited 2016 Oct 18];470(7332):59–65. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09708>
  34. McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH SP. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* . 2006;Jan;38((1):):86–92.
  35. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH AT. Global variation in copy number in

- the human genome. *Nature*. 2006;Nov 23(444(7118)):444–54.
36. Horsthemke B, Dittrich B, Buiting K. Imprinting mutations on human chromosome 15 [Internet]. Vol. 10, *Human Mutation*. Hum Mutat; 1997 [cited 2020 Sep 1]. p. 329–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9375847/>
  37. Monk D, Mackay DJG, Eggermann T, Maher ER, Riccio A. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact [Internet]. Vol. 20, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Sep 1]. p. 235–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30647469/>
  38. Pinkel D, Albertson DG. COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2005 Sep [cited 2016 Nov 15];6(1):331–54. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.6.080604.162140>
  39. Donna G. Albertson DP. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2003;12(145–152). Available from: <https://www.mendeley.com/library/>
  40. Wolf M, Edgren H, Muggenud A, Kilpinen S, Huusko P, Sørliie T, et al. NMD microarray analysis for rapid genome-wide screen of mutated genes in cancer. *Cell Oncol* [Internet]. 2005 [cited 2016 Nov 22];27(3):169–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037637>
  41. Lisitsyn NA, Lisitsina NM, Dalbagni G, Barker P, Sanchez CA, Gnarra J, et al. Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1995 Jan 3 [cited 2016 Nov 22];92(1):151–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/short/92/1/151>
  42. Michels E DPK. Detection of DNA copy number alterations in cancer by array comparative genomic hybridization. *Genet Med*. 2007;Sept;(9(9)):574–84.
  43. Leonard H WX. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8117–34.
  44. M. Shevell, MD; S. Ashwal, MD; D. Donley, MD; J. Flint M. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay. *Neurology* [Internet]. 2006;Feb 11;(60(3)):367-80. Available from: <https://www.mendeley.com/library/>
  45. Moeschler JB, Shevell M, Saul RA, Chen E, Freedenberg DL, Hamid R, et al. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2020 Sep 2];134(3):e903–18. Available from: [www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-1839](http://www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-1839)
  46. Schalock RL, Luckasson RA, Shogren KA, Borthwick-Duffy S, Bradley V, Buntinx WHE, et al. The renaming of mental retardation: Understanding the change to the term intellectual disability [Internet]. Vol. 45, *Intellectual and Developmental Disabilities*. Intellect Dev Disabil; 2007 [cited 2020 Sep 2]. p. 116–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17428134/>
  47. Raynham H, Gibbons R, Flint J, Higgs D. The genetic basis for mental retardation. *QJ Med*. 1996;89:169–75.
  48. John B. Moeschler, MD, Michael Shevell, MD and the C on G. *Clinical Genetic*

- Evaluation of the Child With Mental Retardation or Developmental Delays. *Pediatrics*.
49. C. A. Joyce · N. R. Dennis · S. Cooper · C. E. Browne. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet* 109 440–451.
  50. Martin CL, Waggoner DJ, Wong A, Uhrig S, Roseberry JA, Hedrick JF, et al. “Molecular rulers” for calibrating phenotypic effects of telomere imbalance. *J Med Genet* [Internet]. 2002 Oct [cited 2016 Dec 7];39(10):734–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12362030>
  51. Ravnan JB. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2016 Nov 29];43(6):478–89. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2005.036350>
  52. Anderlid B-M, Schoumans J, Annerén G, Sahlén S, Kyllerman M, Vujic M, et al. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2016 Dec 7];107(4):275–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.10029>
  53. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*. 1999;354(9191):1676–81.
  54. Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen BH, Janssen I, Merx G, van Cleef B, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2002 May [cited 2016 Nov 29];70(5):1269–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11951177>
  55. Vissers LELM, De Vries BBA, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. Array-Based Comparative Genomic Hybridization for the Genomewide Detection of Submicroscopic Chromosomal Abnormalities. *Am J Hum Genet*. 2003;73:1261–70.
  56. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*. 2004;41:241–8.
  57. Guitart-Feliubadaló M, Brunet-Vega A, Villatoro-Gómez S, Baena-Díez N, Gabau-Vila E. [Chromosomal causes that produce mental retardation: chromosome disorders that can be diagnosed in the patient]. *Rev Neurol* [Internet]. 2006 Jan 7 [cited 2018 Mar 6];42 Suppl 1:S21-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506128>
  58. Thuresson A-C, Bondeson M-L, Edeby C, Ellis P, Langford C, Dumanski JP, et al. Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2007 [cited 2016 Dec 13];118:1–7. Available from: [www.karger.com](http://www.karger.com)
  59. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid B, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by

- array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet*. 2005;42:699–705.
60. Vasudevan P, Suri M. A clinical approach to developmental delay and intellectual disability. *Clin Med J R Coll Physicians London* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Sep 2];17(6):558–61. Available from: [/pmc/articles/PMC6297696/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/)
  61. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Prampero T, Gimelli S, Messa J, et al. Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Feb 7];44(12):750–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17766364>
  62. Resta N, Memo L. Chromosomal microarray (CMA) analysis in infants with congenital anomalies: when is it really helpful? *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2012 Oct 8 [cited 2016 Dec 13];25(sup4):116–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2012.715004>
  63. Scott SA, Cohen N, Brandt T, Toruner G, Desnick RJ, Edelman L. Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization.
  64. Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2017 Mar 29];19(7):1263–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20053666>
  65. First MB. Paradigm Shifts and the Development of the Diagnostic and Statistical. *Can J Psychiatry*. 2010;55(11).
  66. Muhle R, Trentacoste S V., Rapin I. The Genetics of Autism. *Pediatrics*. 2004;113(5).
  67. Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA, Boyle CA, Perrin JM, Ghandour RM, et al. Prevalence of Parent-Reported Diagnosis of Autism Spectrum Disorder Among Children in the US, 2007. *Pediatrics*. 2009;124(5).
  68. Kim YS, Leventhal BL, Koh Y-J, Fombonne E, Laska E, Lim E-C, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample. *Am J Psychiatry* [Internet]. 2011 Sep [cited 2016 Dec 20];168(9):904–12. Available from: <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/appi.ajp.2011.10101532>
  69. Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med* [Internet]. 2015 Feb 11 [cited 2016 Dec 20];45(3):601–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108395>
  70. Posserud M, Lundervold AJ, Lie SA, Gillberg C. The prevalence of autism spectrum disorders: impact of diagnostic instrument and non-response bias. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* [Internet]. 2010 Mar 24 [cited 2016 Dec 20];45(3):319–27. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00127-009-0087-4>
  71. Baird G, Simonoff E, Pickles A, Chandler S, Loucas T, Meldrum D, et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Lancet*. 2006;368(9531):210–5.



72. Matson JL, Kozlowski AM. The increasing prevalence of autism spectrum disorders. *Res Autism Spectr Disord*. 5:418–25.
73. Fombonne E. Epidemiology of Autistic Disorder and Other Pervasive Developmental Disorders. *J Clin Psychiatry*. 2005;66(suppl 10):3–8.
74. Chakrabarti S, Fombonne MRCPE, Psych FRC. Pervasive Developmental Disorders in Preschool Children: Confirmation of High Prevalence. *Am J Psychiatry* [Internet]. 2005 [cited 2016 Dec 20];1626. Available from: <http://ajp.psychiatryonline.org>
75. Wing L, Potter D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* [Internet]. 2002 [cited 2017 Jan 10];8(3):151–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrdd.10029>
76. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4 ed, text revision (DSM-IV-TR)*. Washington DC: American Psychiatric Publishing; 2000.
77. Williams JG. Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch Dis Child* [Internet]. 2005 May 10 [cited 2017 Jan 10];91(1):8–15. Available from: <http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/adc.2004.062083>
78. WAZANA A, BRESNAHAN M, KLINE J. The Autism Epidemic: Fact or Artifact? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2007;46(6):721–30.
79. Grant R, Nozyce M. Proposed Changes to the American Psychiatric Association Diagnostic Criteria for Autism Spectrum Disorder: Implications for Young Children and Their Families. *Matern Child Health J* [Internet]. 2013 May 2 [cited 2017 Jan 10];17(4):586–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10995-013-1250-9>
80. Blaxill MF. What’s going on? The question of time trends in autism. *Public Health Rep* [Internet]. 2004 [cited 2017 Jan 10];119(6):536–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504445>
81. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A, et al. The Familial Risk of Autism. *JAMA* [Internet]. 2014 May 7 [cited 2017 Jan 10];311(17):1770. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2014.4144>
82. Bailey A1, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E RM. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* [0033-2917] Bailey, A Any1995 vol25 núm1 Pàg63 -77 [Internet]. [cited 2017 Jan 24]; Available from: <http://sfx.cbuc.cat/uab?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:7792363#.Wlb1TIXhDIU>
83. C.P. Lawler, L.A. Croen, J.K. Grether, J. Van de Water Identifying environmental contributions to autism: provocative clues and false leads *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 10 (4) (2004), pp. 292–302.
84. Trasande L. *Environmental Contributors to Autism: The Pediatrician’s Role*. Vol. 44, *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2014.
85. Surén P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D, et al. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *JAMA* [Internet]. 2013 Feb 13 [cited 2017 Mar 30];309(6):570–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23403681>



86. Etzel RA. Foreword: Environmental Chemical Exposures and Autism Spectrum Disorders: A Review of the Epidemiological Evidence. Vol. 44, *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2014. p. 275–6.
87. S. Chess Autism in children with congenital rubella *J Autism Child Schizophr*, 1 (1) (1971), pp. 33–47.
88. Taylor LE, Swerdfeger AL, Eslick GD. Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine*. 2014;32(29):3623–9.
89. Herbert MR, Russo JP, Yang S, Roohi J, Blaxill M, Kahler SG, et al. Autism and environmental genomics. *Neurotoxicology*. 2006;27(5):671–84.
90. J.L. Ingram, S.M. Peckham, B. Tisdale, P.M. Rodier Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism *Neurotoxicol Teratol*, 22 (3) (2000), pp. 319–32.
91. R.F. Palmer, S. Blanchard, Z. Stein, D. Mandell, C. Miller Environmental mercury release, special education rates, and autism disorder: an ecological study of Texas Health Place (2005).
92. G. Williams, J. King, M. Cunningham, M. Stephan, B. Kerr, J.H. Hersh Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association *Dev Med Child Neurol*, 43 (3) (2001), pp. 202–206.
93. K. Stromland, V. Nordin, M. Miller, B. Akerstrom, C. Gillberg Autism in thalidomide embryopathy: a population study *Dev Med Child Neurol*, 36 (4) (1994), pp. 351–356.
94. Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, et al. Essential versus complex autism: Definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet Part A [Internet]*. 2005 Jun 1 [cited 2017 Jan 17];135A(2):171–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.30590>
95. Craig J. Newschaffer,<sup>1</sup> Lisa A. Croen,<sup>2</sup> Julie Daniels,<sup>3</sup> Ellen Giarelli<sup>4</sup> Judith K. Grether. The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Heal* 2007;28:235–58 [Internet]. [cited 2017 Jan 24]; Available from: <https://translate.google.es/?hl=ca#en/ca/utism%2520is%2520a%2520complex%2520%2520behaviorally%2520defined%2520%2520static%2520disorder%2520of%2520the%2520immature%2520brain%2520that%2520is%2520of%2520great%2520concern%2520to%2520the%2520practicing%2520pediatrician%2520because%2520of%2520an%2520astonishing%25>
96. Liao H-M, Gau SS-F, Tsai W-C, Fang J-S, Su Y-C, Chou M-C, et al. Chromosomal Abnormalities in Patients With Autism Spectrum Disorders From Taiwan. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet [Internet]*. 2013 Oct [cited 2016 Dec 20];162(7):734–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.32153>
97. Hutcheson HB, Bradford Y, Folstein SE, Gardiner MB, Santangelo SL, Sutcliffe JS, et al. Defining the autism minimum candidate gene region on chromosome 7. *Am J Med Genet [Internet]*. 2003 Feb 15 [cited 2017 Jan 17];117B(1):90–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.10033>
98. Vorstman J, Staal W, Van Daalen E, Van Engeland H, Hochstenbach P, Franke L.

Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism.

99. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, et al. Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder.
100. Carter M, Scherer S. Autism spectrum disorder in the genetics clinic: a review. *Clin Genet* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Mar 30];83(5):399–407. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cge.12101>
101. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22:229–37.
102. Eriksson MA, Liedén A, Westerlund J, Bremer A, Wincent J, Sahlin E, et al. Rare copy number variants are common in young children with autism spectrum disorder. *Acta Paediatr* [Internet]. 2015 Jun [cited 2017 Jan 31];104(6):610–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apa.12969>
103. Tammimies K, Marshall CR, Walker S, Kaur G, Thiruvahindrapuram B, Lionel AC, et al. Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2017 Jan 31];314(9):895. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2015.10078>
104. Jacquemont M-L, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, et al. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jan 17];43(11):843–9. Available from: <http://jmg.bmj.com/content/43/11/843>
105. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Publ Gr*. 2015;16.
106. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* [Internet]. 2007 Apr 20 [cited 2017 Jan 24];316(5823):445–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363630>
107. J. Lejeune, M. Gautier RT. Etudes des chromosomes somatique de neuf enfants mongoliens. *C R Hebd Seances Acad Sci, Ser D*, 248 (1959), pp 1721–1722.
108. FORD C. A SEX-CHROMOSOME ANOMALY IN A CASE OF GONADAL DYSGENESIS (TURNER'S SYNDROME). *Lancet* [Internet]. 1959 Apr [cited 2017 Feb 14];273(7075):711–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673659918938>
109. JACOBS PA, STRONG JA. A Case of Human Intersexuality Having a Possible XXY Sex-Determining Mechanism. *Nature* [Internet]. 1959 Jan 31 [cited 2017 Feb 14];183(4657):302–3. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/183302a0>
110. J.H. Edwards, D.G. Harnden, A.H. Cameron, V.M. Crosse OHW. A new trisomic syndrome. *Lancet*, 9 (1960), pp 787–789.

111. Patau K, Smith D, Therman E, Inhorn S, Wagner H. MULTIPLE CONGENITAL ANOMALY CAUSED BY AN EXTRA AUTOSOME. *Lancet* [Internet]. 1960 Apr [cited 2017 Feb 14];275(7128):790–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673660906760>
112. Hardy K, Hardy PJ. 1(st) trimester miscarriage: four decades of study. *Transl Pediatr* [Internet]. 2015 [cited 2020 Sep 2];4(2):189–200. Available from: </pmc/articles/PMC4729087/?report=abstract>
113. Carr D. CHROMOSOME STUDIES IN ABORTUSES AND STILLBORN INFANTS. *Lancet*. 1963;282(7308):603–6.
114. Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* [Internet]. 1998 Apr 1 [cited 2017 Feb 14];13(4):805–9. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/13.4.805>
115. Warburton D, Susser M, Stein Z KJ. Genetic and epidemiologic investigation of spontaneous abortion: relevance to clinical practice. *Birth Defects Orig Artic Ser* . 1979;15:127–136.
116. Dhillon RK, Hillman SC, Morris RK, McMullan D, Williams D, Coomarasamy A, et al. Additional information from chromosomal microarray analysis (CMA) over conventional karyotyping when diagnosing chromosomal abnormalities in miscarriage: A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 121, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Blackwell Publishing Ltd; 2014 [cited 2020 Sep 2]. p. 11–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23859082/>
117. Gueneri S, Bettio D, Simoni G, Brambati B, Lanzani A, Fraccaro M. Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Hum Reprod* [Internet]. 1987 Nov [cited 2017 Feb 21];2(8):735–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3325524>
118. Gao J, Liu C, Yao F, Hao N, Zhou J, Zhou Q, et al. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. *Mol Cytogenet* [Internet]. 2012 Jul 16 [cited 2017 Feb 14];5(1):33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22794168>
119. Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Lese Martin C. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2004 Jun [cited 2017 Feb 14];74(6):1168–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127362>
120. Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi M, Tachdjian G, Demiroglu A, et al. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn* [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 Feb 14];25(10):894–900. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.1230>
121. Shimokawa O, Harada N, Miyake N, Satoh K, Mizuguchi T, Niikawa N, et al. Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions

- with 'normal' karyotypes. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2017 Feb 14];140A(18):1931–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.31421>
122. Tan Y-Q, Hu L, Lin G, Sham JST, Gong F, Guan X-Y, et al. Genetic Changes in Human Fetuses from Spontaneous Abortion after In Vitro Fertilization Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Biol Reprod* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2017 Feb 21];70(2):495–9. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.103.022343>
  123. Fan MJ, Tian C, Chang L, Wang XY, Li R. [Analysis of clinical factors on early pregnancy loss during in vitro fertilization-embryo transfer treatment and natural pregnancy]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 2];53(11):755–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30453422/>
  124. Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2000 May [cited 2017 Feb 21];66(5):1516–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741955>
  125. Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)—Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2001 Jul [cited 2017 Feb 14];9(7):539–47. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ejhg.5200669>
  126. Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2017 Feb 21];25(11):2913–22. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/deq202>
  127. Zhang Y-X, Zhang Y-P, Gu Y, Guan F-J, Li S-L, Xie J-S, et al. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and arrayCGH. *Clin Genet* [Internet]. 2009 Feb [cited 2017 Mar 30];75(2):133–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.2008.01131.x>
  128. Levy B, Sigurjonsson S, Pettersen B, Maisenbacher MK, Hall MP, Demko Z, et al. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Feb 21];124(2 Pt 1):202–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006250-201408000-00002%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25004334%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25004334>
  129. Wen J, Hanna CW, Martell S, Leung PC, Lewis SM, Robinson WP, et al. Functional consequences of copy number variants in miscarriage. *Mol Cytogenet* [Internet]. 2015 [cited 2017 Feb 21];8:6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25674159>
  130. Viaggi CD, Cavani S, Malacarne M, Floriddia F, Zerega G, Baldo C, et al. First-trimester

- euploid miscarriages analysed by array-CGH. *J Appl Genet* [Internet]. 2013 Aug 19 [cited 2017 Feb 21];54(3):353–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13353-013-0157-x>
131. Nagirnaja L, Palta P, Kasak L, Rull K, Christiansen OB, Nielsen HS, et al. Structural Genomic Variation as Risk Factor for Idiopathic Recurrent Miscarriage. *Hum Mutat* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Feb 21];35(8):972–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827138>
  132. STEPHENSON M, KUTTEH W. Evaluation and Management of Recurrent Early Pregnancy Loss. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2017 Mar 30];50(1):132–45. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003081-200703000-00013>
  133. Vaiman D. Genetic regulation of recurrent spontaneous abortion in humans. *Biomed J* [Internet]. 2015 [cited 2017 Feb 21];38(1):11. Available from: [http://biomedj.cgu.edu.tw/pdfs/2015/38/1/images/BiomedJ\\_2015\\_38\\_1\\_11\\_133777.pdf](http://biomedj.cgu.edu.tw/pdfs/2015/38/1/images/BiomedJ_2015_38_1_11_133777.pdf)
  134. Robberecht C, Pexsters A, Deprest J, Fryns J-P, D’Hooghe T, Vermeesch JR. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 Feb 21];32(10):933–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.3936>
  135. Zhang H, Liu W, Chen M, Li Z, Sun X, Wang C. Implementation of a High-Resolution Single-Nucleotide Polymorphism Array in Analyzing the Products of Conception. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2016 Jul [cited 2017 Feb 28];20(7):352–8. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2016.0035>
  136. GBD 2015 Child Mortality Collaborators G 2015 CM. Global, regional, national, and selected subnational levels of stillbirths, neonatal, infant, and under-5 mortality, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2016 Oct 8 [cited 2017 Mar 7];388(10053):1725–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733285>
  137. Lawn JE, Blencowe H, Pattinson R, Cousens S, Kumar R, Ibiebele I, et al. Stillbirths: Where? When? Why? How to make the data count? *Lancet* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Mar 7];377(9775):1448–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610621873>
  138. Macdorman MF, Gregory ECW. National Vital Statistics Reports, Volume 64, Number 8, 07/23/2015. 2013 [cited 2017 Apr 18]; Available from: [https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr64/nvsr64\\_08.pdf](https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr64/nvsr64_08.pdf)
  139. Silver RM, Varner MW, Reddy U, Goldenberg R, Pinar H, Conway D, et al. WORK-UP OF STILLBIRTH: A REVIEW OF THE EVIDENCE. *Am J Obs Gynecol* [Internet]. 2007 [cited 2017 Mar 7];196(5):433–44. Available from: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.are.uab.cat/pmc/articles/PMC2699761/pdf/nihms22729.pdf>
  140. Di Mario S, Say L, Lincetto O. Risk Factors for Stillbirth in Developing Countries: A Systematic Review of the Literature. *Sex Transm Dis* [Internet]. 2007 Jul [cited 2017 Mar

- 7];34(Supplement):S11–21. Available from:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007435-200707001-00004>
141. Chibber R. Unexplained antepartum fetal deaths: what are the determinants? *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2005 Apr 7 [cited 2017 Mar 7];271(4):286–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00404-004-0606-1>
  142. Huang DY. Determinants of unexplained antepartum fetal deaths. *Obstet Gynecol*. 2000;vol.-95(núm.-2):Pàg.:215-221.
  143. Frøen JF, Arnestad M, Frey K, Vege Å, Saugstad OD, Stray-Pedersen B. Risk factors for sudden intrauterine unexplained death: Epidemiologic characteristics of singleton cases in Oslo, Norway, 1986-1995. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2001 Mar [cited 2017 Mar 7];184(4):694–702. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937801992531>
  144. Man J, Hutchinson JC, Heazell AE, Ashworth M, Levine S, Sebire NJ. Stillbirth and intrauterine fetal death: factors affecting determination of cause of death at autopsy. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Nov [cited 2017 Mar 7];48(5):566–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.16016>
  145. Gardosi J, Kady SM, McGeown P, Francis A, Tonks A. Classification of stillbirth by relevant condition at death (ReCoDe): population based cohort study. *BMJ* [Internet]. 2005 Nov 12 [cited 2017 Mar 7];331(7525):1113–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236774>
  146. Angell RR, Sandisont A, Bain AD. Chromosome variation in perinatal mortality: a survey of 500 cases. *J Med Genet* [Internet]. 1984 [cited 2017 Mar 7];21:39–44. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/are.uab.cat/pmc/articles/PMC1049204/pdf/jmedgene00099-0045.pdf>
  147. Korteweg FJ, Bouman K, Erwich JJHM, Timmer A, Veeger NJGM, Ravisé JM, et al. Cytogenetic Analysis After Evaluation of 750 Fetal Deaths. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2017 Mar 7];111(4):865–74. Available from:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006250-200804000-00010>
  148. Raca G, Artzer A, Thorson L, Huber S, Modaff P, Laffin J, et al. Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in the genetic evaluation of stillbirth. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Mar 14];149A(11):2437–43. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.33083>
  149. Rosenfeld JA, Tucker ME, Escobar LF, Neill NJ, Torchia BS, McDaniel LD, et al. Diagnostic utility of microarray testing in pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Oct [cited 2017 Mar 14];46(4):478–86. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/uog.14866>
  150. Pinar H, Carpenter M, Martin BJ, Tantravahi U. Utility of fetal karyotype in the evaluation of phenotypically abnormal stillbirths. *PediatrDevPathol* [Internet]. 2009 May [cited 2017 Mar 14];12(1093-5266 (Print)):217–21. Available from:  
<http://www.pedpath.org/doi/abs/10.2350/07-07-0307.1>



151. Harris RA, Ferrari F, Ben-Shachar S, Wang X, Saade G, Van Den Veyver I, et al. Genome-wide array-based copy number profiling in human placentas from unexplained stillbirths. *Prenat Diagn* [Internet]. 2011 Oct [cited 2017 Mar 14];31(10):932–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21732394>
152. Reddy UM, Page GP, Saade GR, Silver RM, Thorsten VR, Parker CB, et al. Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Dec 6 [cited 2017 Mar 28];367(23):2185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23215556>
153. Holmes LB. Congenital Malformations. *N Engl J Med* [Internet]. 1976 Jul 22 [cited 2017 Apr 18];295(4):204–7. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197607222950406>
154. Egbe. Effect of Race on the Prevalence of Congenital Malformations among Newborns in the United States. *Ethn Dis* [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 18];25(2):226–31. Available from: <http://sfx.cbuc.cat/uab?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:26118153#.WPXYc4iLTIU>
155. Tyreman M, Abbott KM, Willatt LR, Nash R, Lees C, Whittaker J, et al. High resolution array analysis: diagnosing pregnancies with abnormal ultrasound findings. *J Med Genet* [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Feb 7];46(8):531–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451135>
156. Faas BHW, van der Burgt I, Kooper AJA, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Smits APT, et al. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *J Med Genet* [Internet]. 2010 Sep [cited 2017 Feb 7];47(9):586–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577003>
157. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset J-M, Sukno S, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2009 [cited 2017 Apr 18];52:291–6. Available from: [http://ac.els-cdn.com.are.uab.cat/S1769721209000688/1-s2.0-S1769721209000688-main.pdf?\\_tid=a7bb5bae-241c-11e7-b684-00000aab0f26&acdnat=1492509295\\_47f1f3c15df3bd1d6135363a5dbf1fb7](http://ac.els-cdn.com/are.uab.cat/S1769721209000688/1-s2.0-S1769721209000688-main.pdf?_tid=a7bb5bae-241c-11e7-b684-00000aab0f26&acdnat=1492509295_47f1f3c15df3bd1d6135363a5dbf1fb7)
158. Duncan A, Langlois S, Wilson RD, Audibert F, Brock J-A, Carroll J, et al. Use of Array Genomic Hybridization Technology in Prenatal Diagnosis in Canada. *J Obstet Gynaecol Canada* [Internet]. 2011 Dec [cited 2017 Mar 28];33(12):1256–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S170121631635112X>
159. Hay SB, Sahoo T, Travis MK, Hovanes K, Dzidic N, Doherty C, et al. ACOG and SMFM guidelines for prenatal diagnosis: Is karyotyping really sufficient? *Prenat Diagn*. 2018 Feb 1;38(3):184–9.
160. Bodurtha J, Strauss JF, III. Genomics and perinatal care. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Jan 5 [cited 2017 Apr 25];366(1):64–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22216843>
161. Fiorentino F, Napoletano S, Caiazzo F, Sessa M, Bono S, Spizzichino L, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk

- for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2013 Jul [cited 2017 May 9];21(7):725–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211699>
162. Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Apr 25];32(4):351–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.3861>
  163. Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 May 9];32(10):976–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22865506>
  164. Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan DJ, Davison E V., Maher ER, et al. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet & Gynecol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Apr 25];37(1):6–14. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.7754/abstract;jsessionid=B06DBB688FC68614AA32954353424CAF.f03t03>
  165. Vetro A, Bouman K, Hastings R, McMullan DJ, Vermeesch JR, Miller K, et al. The introduction of arrays in prenatal diagnosis: A special challenge. *Hum Mutat* [Internet]. 2012 Jun [cited 2017 May 9];33(6):923–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22050>
  166. Mori M de los Á, Mansilla E, García-Santiago F, Vallespín E, Palomares M, Martín R, et al. Diagnóstico prenatal y array-hibridación genómica comparada (CGH) (I). Gestaciones de elevado riesgo. *Diagnóstico Prenat* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Apr 25];23(2):34–48. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173412712000339>
  167. Daniel Brady P, Delle Chiaie B, Christenhusz G, Dierickx K, Van Den Bogaert K, Menten B, et al. A prospective study of the clinical utility of prenatal chromosomal microarray analysis in fetuses with ultrasound abnormalities and an exploration of a framework for reporting unclassified variants and risk factors. 2013 [cited 2017 May 15]; Available from: <http://www.nature.com/are.uab.cat/gim/journal/v16/n6/pdf/gim2013168a.pdf>
  168. Papoulidis I, Sotiriadis A, Siomou E, Papageorgiou E, Eleftheriades M, Papadopoulos V, et al. Routine use of array comparative genomic hybridization (aCGH) as standard approach for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. Clinical experience of 1763 prenatal cases. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 May 9];35(13):1269–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.4685>
  169. Konialis C, Pangalos C, InterGenetics . Dilemmas in Prenatal Chromosomal Diagnosis Revealed Through a Single Center’s 30 Years’ Experience and 90,000 Cases. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2015 [cited 2017 May 9];38(3):218–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659342>
  170. Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, Togneri FS, James N, Maher EJ, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Apr 25];41(6):610–



20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.12464>
171. Shaffer LG, Rosenfeld JA, Dabell MP, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 May 9];32(10):986–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847778>
172. Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(4).
173. Querejeta ME, Nieva B, Navajas J, Cigudosa JC, Suela J. Diagnóstico prenatal y array-CGH II: gestaciones de bajo riesgo. *Diagnóstico Prenat* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Apr 25];23(2):49–55. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S217341271200025X>
174. Srebniak MI, Diderich KE, Joosten M, Govaerts LC, Knijnenburg J, de Vries FA, et al. Prenatal SNP array testing in 1000 fetuses with ultrasound anomalies: causative, unexpected and susceptibility CNVs. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2016 May [cited 2017 May 15];24(5):645–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26328504>
175. Faas BH, Feenstra I, Eggink AJ, Kooper AJ, Pfundt R, Vugt JM, et al. Non-targeted whole genome 250K SNP array analysis as replacement for karyotyping in fetuses with structural ultrasound anomalies: evaluation of a one-year experience. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 May 15];32(4):362–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2948>
176. Srebniak MI, Knapen MFCM, Polak M, Joosten M, Diderich KEM, Govaerts LCP, et al. The influence of SNP-based chromosomal microarray and NIPT on the diagnostic yield in 10,000 fetuses with and without fetal ultrasound anomalies. *Hum Mutat* [Internet]. 2017 Apr [cited 2017 May 15]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.23232>
177. Kleeman L, Bianchi DW, Shaffer LG, Rorem E, Cowan J, Craigo SD, et al. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn* [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 May 15];29(13):1213–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2367>
178. Charan P, Woodrow N, Walker SP, Ganesamoorthy D, McGillivray G, Palma-Dias R. High-resolution microarray in the assessment of fetal anomalies detected by ultrasound. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2017 May 15];54(1):46–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajo.12170>
179. Jansen FAR, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, et al. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 May 15];45(1):27–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.14695>
180. MITCHELL SC, KORONES SB, BERENDES HW. Congenital Heart Disease in 56,109 Births Incidence and Natural History. *Circulation* [Internet]. 1971 [cited 2017 May 16];43(3). Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/43/3/323>

181. Hoffman J. Congenital heart disease in a cohort of 19,502 births with long-term follow-up. *Am J Cardiol* [Internet]. 1978 [cited 2017 May 16];42(4):641–7. Available from: <http://sfx.cbuc.cat/uab?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:696646#.WRqsC2iLTIU>
182. KIDD SA, LANCASTER PAL, McCREDIE RM. The incidence of congenital heart defects in the first year of life. *J Paediatr Child Health* [Internet]. 1993 Oct [cited 2017 May 16];29(5):344–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1754.1993.tb00531.x>
183. Garne E, Stoll C, Clementi M. Evaluation of prenatal diagnosis of congenital heart diseases by ultrasound: experience from 20 European registries. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2001 May [cited 2017 May 16];17(5):386–91. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1469-0705.2001.00385.x>
184. Hoffman JL, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2002 [cited 2017 May 16];39(12):1890–900. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109702018867>
185. Grandjean H, Larroque D, Levi S. The performance of routine ultrasonographic screening of pregnancies in the Eurofetus Study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1999 [cited 2017 May 16];181(2):446–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002937899705776>
186. Šamánek M, Slavík Z, Zbořilová B, Hroboňová V, Voříšková M, Škovránek J. Prevalence, treatment, and outcome of heart disease in live-born children: A prospective analysis of 91,823 live-born children. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 1989 Sep [cited 2017 May 16];10(4):205–11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02083294>
187. Roguin N, Du Z-D, Barak M, Nasser N, Hershkowitz S, Milgram E. High prevalence of muscular ventricular septal defect in neonates. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1995 Nov [cited 2017 May 16];26(6):1545–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0735109795003584>
188. Carlgren LE, Ericson A, Källén B. Monitoring of congenital cardiac defects. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 1987 Dec [cited 2017 May 16];8(4):247–56. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02427537>
189. Song MS, Hu A, Dyhamenahali U, Chitayat D, Winsor EJT, Ryan G, et al. Extracardiac lesions and chromosomal abnormalities associated with major fetal heart defects: comparison of intrauterine, postnatal and postmortem diagnoses. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 May [cited 2017 May 22];33(5):552–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.6309>
190. Chaoui R1, Körner H, Bommer C, Göldner B, Bierlich A BR. Prenatal diagnosis of heart defects and associated chromosomal aberrations. *Ultraschall Med*. 1999;20((5)):177–84.
191. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, et al. The Contribution of Chromosomal Abnormalities to Congenital Heart Defects: A Population-Based Study. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 2011 Dec 5 [cited 2017 May 22];32(8):1147–57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00246-011-0034-5>

192. Stoll C, Garne E, Clementi M. Evaluation of prenatal diagnosis of associated congenital heart diseases by fetal ultrasonographic examination in Europe. *Prenat Diagn* [Internet]. 2001 Apr [cited 2017 May 16];21(4):243–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.34>
193. Bensemlali M, Bajolle F, Ladouceur M, Fermont L, Lévy M, Le Bidois J, et al. Associated genetic syndromes and extracardiac malformations strongly influence outcomes of fetuses with congenital heart diseases. *Arch Cardiovasc Dis* [Internet]. 2016 [cited 2017 May 23];109(5):330–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S1875213616300250>
194. Mlynarski EE, Xie M, Taylor D, Sheridan MB, Guo T, Racedo SE, et al. Rare copy number variants and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Genet* [Internet]. 2016 Mar [cited 2017 May 23];135(3):273–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742502>
195. Robin NH, Shprintzen RJ. Defining the Clinical Spectrum of Deletion 22q11.2. *J Pediatr* [Internet]. 2005 [cited 2017 May 23];147(1):90–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S002234760500199X>
196. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet* [Internet]. 2007 [cited 2017 May 23];370(9596):1443–52. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0140673607616018>
197. Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, et al. Practical Guidelines for Managing Patients with 22q11.2 Deletion Syndrome. *J Pediatr* [Internet]. 2011 [cited 2017 May 23];159(2):332–339.e1. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0022347611002447>
198. Khalil A, Suff N, Thilaganathan B, Hurrell A, Cooper D, Carvalho JS. Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 May 22];43(1):14–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.12526>
199. Masoller N, Martínez JM, Gómez O, Bennasar M, Crispi F, Sanz-Cortés M, et al. Evidence of second-trimester changes in head biometry and brain perfusion in fetuses with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 May 22];44(2):182–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.13373>
200. Matos SM, Sarmiento S, Moreira S, Pereira MM, Quintas J, Peixoto B, et al. Impact of Fetal Development on Neurocognitive Performance of Adolescents with Cyanotic and Acyanotic Congenital Heart Disease. *Congenit Heart Dis* [Internet]. 2014 Sep [cited 2017 May 22];9(5):373–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/chd.12152>
201. Williams IA, Tarullo AR, Grieve PG, Wilpers A, Vignola EF, Myers MM, et al. Fetal cerebrovascular resistance and neonatal EEG predict 18-month neurodevelopmental outcome in infants with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2017 May 22];40(3):304–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.11144>
202. van Batenburg-Eddes T, de Groot L, Steegers EAP, Hofman A, Jaddoe VW V, Verhulst FC, et al. Fetal Programming of Infant Neuromotor Development: The Generation R Study.

- Pediatr Res [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 May 22];67(2):132–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/PDR.0b013e3181c2dc76>
203. Williams IA, Fifer C, Jaeggi E, Levine JC, Michelfelder EC, Szwaast AL. The association of fetal cerebrovascular resistance with early neurodevelopment in single ventricle congenital heart disease. *Am Heart J* [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 May 22];165(4):544-550.e1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537971>
  204. Divanovic A, Bowers K, Michelfelder E, Jaekle R, Newman T, Marcotte M, et al. Intrauterine fetal demise after prenatal diagnosis of congenital heart disease: assessment of risk. *Prenat Diagn* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 May 22];36(2):142–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.4755>
  205. Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hornberger LK, Copel JA, Sklansky MS, Abuhamad A, et al. Diagnosis and Treatment of Fetal Cardiac Disease. *Circulation* [Internet]. 2014 [cited 2017 May 22];129(21). Available from: <http://circ.ahajournals.org.az.ub.cat/content/129/21/2183.long>
  206. Marek J, Tomek V, Skovranek J, Povysilova V, Samanek M. Prenatal ultrasound screening of congenital heart disease in an unselected national population: a 21-year experience. *Heart* [Internet]. 2011 Jan 15 [cited 2017 May 23];97(2):124–30. Available from: <http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/hrt.2010.206623>
  207. Egbe A, Uppu S, Lee S, Ho D, Srivastava S. Prevalence of Associated Extracardiac Malformations in the Congenital Heart Disease Population. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 2014 Oct 14 [cited 2017 May 22];35(7):1239–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00246-014-0922-6>
  208. Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, Martínez-Crespo JM, Shen Y, Margarit E, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings: evaluation of chromosomal microarray-based analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 May 22];41(4):375–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.12372>
  209. van Velzen CL, Clur SA, Rijlaarsdam MEB, Pajkrt E, Bax CJ, Hruda J, et al. Prenatal diagnosis of congenital heart defects: accuracy and discrepancies in a multicenter cohort. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 May [cited 2017 May 23];47(5):616–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.15742>
  210. Trento LU, Pruetz JD, Chang RK, Detterich J, Sklansky MS. Prenatal diagnosis of congenital heart disease: impact of mode of delivery on neonatal outcome. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Dec [cited 2017 May 16];32(13):1250–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.3991>
  211. Hunter LE, Simpson JM. Prenatal screening for structural congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(6).
  212. Coelho Molck M, Simioni M, Paiva Vieira T, Sgardioli IC, Paoli Monteiro F, Souza J, et al. Genomic imbalances in syndromic congenital heart disease. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 6]; Available from: <http://www.sciencedirect.com.az.ub.cat/science/article/pii/S0021755717302188>

213. Yan Y, Wu Q, Zhang L, Wang X, Dan S, Deng D, et al. Detection of submicroscopic chromosomal aberrations by array-based comparative genomic hybridization in fetuses with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 May 23];43(4):404–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.13236>
214. Schmid M, Stary S, Blaicher W, Gollinger M, Husslein P, Streubel B. Prenatal genetic diagnosis using microarray analysis in fetuses with congenital heart defects. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 May 23];32(4):376–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2862>
215. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* [Internet]. 2007 Oct 17 [cited 2017 May 22];28(22):2778–84. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehl560>
216. Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, et al. Genetic Basis for Congenital Heart Defects: Current Knowledge. *Circulation* [Internet]. 2007 [cited 2017 May 22];115(23). Available from: [http://circ.ahajournals.org.are.uab.cat/content/115/23/3015?ijkey=21113e6b3cb8c7a11bf4fd22ae8615c5300f62b3&keytype=tf\\_ipsecsha](http://circ.ahajournals.org.are.uab.cat/content/115/23/3015?ijkey=21113e6b3cb8c7a11bf4fd22ae8615c5300f62b3&keytype=tf_ipsecsha)
217. Muncke N, Jung C, Rüdiger H, Ulmer H, Roeth R, Hubert A, et al. Missense Mutations and Gene Interruption in PROSIT240, a Novel TRAP240-Like Gene, in Patients With Congenital Heart Defect (Transposition of the Great Arteries). *Circulation* [Internet]. 2003 [cited 2017 May 22];108(23). Available from: <http://circ.ahajournals.org.are.uab.cat/content/108/23/2843.long>
218. Agopian AJ, Goldmuntz E, Hakonarson H, Sewda A, Taylor D, Mitchell LE. Genome-Wide Association Studies and Meta-Analyses for Congenital Heart DefectsCLINICAL PERSPECTIVE. *Circ Cardiovasc Genet* [Internet]. 2017 [cited 2017 May 16];10(3). Available from: <http://circgenetics.ahajournals.org/content/10/3/e001449.long>
219. Onkar D, Onkar P, Mitra K. Evaluation of Fetal Central Nervous System Anomalies by Ultrasound and Its Anatomical Co-relation. *J Clin Diagn Res* [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 May 30];8(6):AC05-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120962>
220. Chitty LS, Pilu G. The challenge of imaging the fetal central nervous system: an aid to prenatal diagnosis, management and prognosis. *Prenat Diagn* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2017 Aug 29];29(4):301–2. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2242>
221. Li J, Shen J, Qin L. Effects of Levothyroxine on Pregnancy Outcomes in Women With Thyroid Dysfunction: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Altern Ther Health Med* [Internet]. 2017 Mar [cited 2017 Jun 20];23(2):49–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28323629>
222. Kuehn D, Aros S, Cassorla F, Avaria M, Unanue N, Henriquez C, et al. A prospective cohort study of the prevalence of growth, facial, and central nervous system abnormalities in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 Jun 20];36(10):1811–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22823161>

223. Hallene KL, Oby E, Lee BJ, Santaguida S, Bassanini S, Cipolla M, et al. Prenatal exposure to thalidomide, altered vasculogenesis, and CNS malformations. *Neuroscience* [Internet]. 2006 Sep 29 [cited 2017 Jun 20];142(1):267–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859833>
224. Sharif U, Kuban K. Prenatal Intracranial Hemorrhage and Neurologic Complications in Alloimmune Thrombocytopenia. *J Child Neurol* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2017 Jun 20];16(11):838–42. Available from: <http://jcn.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/08830738010160111001>
225. Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Jun 2 [cited 2017 Jun 6];374(22):2142–51. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1601824>
226. Dhombres F, Friszer S, Maurice P, Gonzales M, Kieffer F, Garel C, et al. Prognosis of Fetal Parenchymal Cerebral Lesions without Ventriculomegaly in Congenital Toxoplasmosis Infection. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 6];41(1):8–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27093552>
227. Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 6];33(4):842–52. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0161813X11002051>
228. McLone DG. The etiology of neural tube defects: the role of folic acid. *Child's Nerv Syst* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2017 Jun 6];19(7–8):537–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00381-003-0793-2>
229. RORMAN E, ZAMIR C, RILKIS I, BENDAVID H. Congenital toxoplasmosis? prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2006 May [cited 2017 Jun 20];21(4):458–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623805002303>
230. Paquet C, Yudin MH, Yudin MH, Allen VM, Bouchard C, Boucher M, et al. Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment. *J Obstet Gynaecol Canada* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Jun 20];35(1):78–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1701216315310537>
231. Hampton MM. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal Netw* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2017 Jun 20];34(5):274–8. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0730-0832&volume=34&issue=5&spage=274>
232. Leruez-Ville M, Ville Y. Fetal cytomegalovirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 20];38:97–107. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S1521693416301092>
233. Leruez-Ville M, Ghout I, Bussi?res L, Stirnemann J, Magny J-F, Couderc S, et al. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Oct [cited 2017 Jun 20];215(4):462.e1-462.e10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937816300448>



234. Hughes BL, Gyamfi-Bannerman C. Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Jun [cited 2017 Jun 20];214(6):B5–11. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937816003422>
235. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovi? M, Polj?ak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Mar 10 [cited 2017 Jun 20];374(10):951–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1600651>
236. Alvarado MG, Schwartz DA. Zika Virus Infection in Pregnancy, Microcephaly, and Maternal and Fetal Health: What We Think, What We Know, and What We Think We Know. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2017 Jan 16 [cited 2017 Jun 20];141(1):26–32. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2016-0382-RA>
237. Meaney-delman D, Rasmussen SA, Staples JE, Oduyebo T, Ellington SR, Petersen EE, et al. Zika Virus and Pregnancy: What Obstetric Health Care Providers Need to Know. *Obstet & Gynecol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2017 Jun 20];127(4):642–8. Available from: <https://insights-ovid-com.are.uab.cat/pubmed?pmid=26889662>
238. Eloundou S, Sheffield J. Prenatal Effects of Zika Virus and Management of the Pregnant Woman. *Semin Reprod Med* [Internet]. 2016 Sep 9 [cited 2017 Jun 20];34(05):280–4. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1592073>
239. Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, Davi HPF, Iglezias SD, Kanamura CT, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Jun 20];388(10047):898–904. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616308832>
240. Silasi M, Cardenas I, Kwon J-Y, Racicot K, Aldo P, Mor G. Viral Infections During Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2017 Jun 20];73(3):199–213. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/aji.12355>
241. Huang J, Wah IYM, Pooh RK, Choy KW. Molecular genetics in fetal neurology. *Semin Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 6];17(6):341–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S1744165X12000893>
242. Papp C, Beke A, Ban Z, Szigeti Z, Toth-Pal E, Papp Z. Prenatal Diagnosis of Trisomy 13. *J Ultrasound Med* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2017 Jun 20];25(4):429–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.7863/jum.2006.25.4.429>
243. Papp C, Ban Z, Szigeti Z, Csaba A, Beke A, Papp Z. Role of second trimester sonography in detecting trisomy 18: A review of 70 cases. *J Clin Ultrasound* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2017 Jun 20];35(2):68–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcu.20290>
244. Watson WJ, Miller RC, Wax JR, Hansen WF, Yamamura Y, Polzin WJ. Sonographic Detection of Trisomy 13 in the First and Second Trimesters of Pregnancy. *J Ultrasound Med* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2017 Jun 20];26(9):1209–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.7863/jum.2007.26.9.1209>
245. ISUOG Practice Guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Jun 6];41(1):102–13.

Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.12342>

246. Nicolaides KH. Turning the pyramid of prenatal care. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 6];29(3):183–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21389681>
247. Mieghem T Van, Hindryckx A, Calsteren K Van. Early fetal anatomy screening: who, what, when and why? *Curr Opin Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 6];27(2):143–50. Available from: <https://insights-ovid-com.are.uab.cat/pubmed?pmid=25689240>
248. Rossi AC, Prefumo F. Accuracy of Ultrasonography at 11–14 Weeks of Gestation for Detection of Fetal Structural Anomalies: A Systematic Review. *Obstet & [Internet]*. 2013 [cited 2017 Jun 6];122(6):1160–7. Available from: <https://insights-ovid-com.are.uab.cat/pubmed?pmid=24201688>
249. Chaoui R, Benoit B, Mitkowska-Wozniak H, Heling KS, Nicolaides KH. Assessment of intracranial translucency (IT) in the detection of spina bifida at the 11-13-week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Jun 6];34(3):249–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.7329>
250. Meller C, Aiello H, Otaño L. Sonographic detection of open spina bifida in the first trimester: review of the literature. *Child’s Nerv Syst* [Internet]. 2017 May 16 [cited 2017 Jun 6];1–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00381-017-3443-9>
251. Blaas H-GK, Eik-Nes SH. Sonoembryology and early prenatal diagnosis of neural anomalies. *Prenat Diagn* [Internet]. 2009 Apr [cited 2017 Jun 6];29(4):312–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2170>
252. Tulipan N, Wellons JC, Thom EA, Gupta N, Sutton LN, Burrows PK, et al. Prenatal surgery for myelomeningocele and the need for cerebrospinal fluid shunt placement. *J Neurosurg Pediatr* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Jun 6];16(6):613–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26369371>
253. Johnson MP, Bennett KA, Rand L, Burrows PK, Thom EA, Howell LJ, et al. The Management of Myelomeningocele Study: obstetrical outcomes and risk factors for obstetrical complications following prenatal surgery. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Jun 6];215(6):778.e1-778.e9. Available from: <http://www.sciencedirect.com.are.uab.cat/science/article/pii/S0002937816305269>
254. Elbabaa SK, Gildehaus AM, Pierson MJ, Albers JA, Vlastos EJ. First 60 fetal in-utero myelomeningocele repairs at Saint Louis Fetal Care Institute in the post-MOMS trial era: hydrocephalus treatment outcomes (endoscopic third ventriculostomy versus ventriculo-peritoneal shunt). *Child’s Nerv Syst* [Internet]. 2017 May 3 [cited 2017 Jun 6];1–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00381-017-3428-8>
255. Moldenhauer JS, Soni S, Rintoul NE, Spinner SS, Khalek N, Martinez-Poyer J, et al. Fetal myelomeningocele repair: the post-MOMS experience at the Children’s Hospital of Philadelphia. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 6];37(3):235–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25138132>
256. Pedreira DAL, Zanon N, Nishikuni K, Moreira de Sá RA, Acacio GL, Chmait RH, et al. Endoscopic surgery for the antenatal treatment of myelomeningocele: the CECAM trial.



- Am J Obstet Gynecol [Internet]. 2016 [cited 2017 Jun 6];214(1):111.e1-111.e11.  
Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0002937815011047>
257. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, Brock JW, Burrows PK, Johnson MP, et al. A Randomized Trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Mar 17 [cited 2017 Jun 6];364(11):993–1004. Available from:  
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1014379>
  258. van Doorn M, Oude Rengerink K, Newsum EA, Reneman L, Majoie CB, Pajkrt E. Added value of fetal MRI in fetuses with suspected brain abnormalities on neurosonography: a systematic review and meta-analysis. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2015 Nov 23 [cited 2017 Jun 6];1–13. Available from:  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2015.1109621>
  259. Griffiths PD, Porteous M, Mason G, Russell S, Morris J, Fanou EM, et al. The use of in utero MRI to supplement ultrasound in the foetus at high risk of developmental brain or spine abnormality. *Br J Radiol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2017 Jun 6];85(1019):e1038-45. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763035>
  260. Rossi AC, Prefumo F. Additional value of fetal magnetic resonance imaging in the prenatal diagnosis of central nervous system anomalies: a systematic review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Oct [cited 2017 Jun 6];44(4):388–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.13429>
  261. Salomon LJ, Garel C. Magnetic resonance imaging examination of the fetal brain. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Jun 6];30(7):1019–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.5176>
  262. Gonçalves LF, Lee W, Mody S, Shetty A, Sangi-Haghpeykar H, Romero R. Diagnostic accuracy of ultrasonography and magnetic resonance imaging for the detection of fetal anomalies: a blinded case-control study. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Jun 6];48(2):185–92. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/uog.15774>
  263. Herman-Sucharska I, Bekiesińska-Figatowska M, Urbanik A. Fetal central nervous system malformations on MR images. *Brain Dev* [Internet]. 2009 Mar [cited 2017 Jun 20];31(3):185–99. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760408001721>
  264. Levine D. Obstetric MRI. *J Magn Reson Imaging* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2017 Jun 20];24(1):1–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.20608>
  265. Reddy UM, Abuhamad AZ, Levine D, Saade GR. Fetal Imaging. *J Ultrasound Med* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2017 Jun 20];33(5):745–57. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.7863/ultra.33.5.745>
  266. Malinger G, Paladini D, Pilu G, Timor IE. Fetal cerebral magnetic resonance, neurosonography, the multiverse and the brave new world of fetal medicine. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 May 31 [cited 2017 Jun 20]; Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/uog.17538>

267. M. H. B. Carvalho\*, M. L. Brizot, L. M. Lopes CHC. Detection of fetal structural abnormalities at the 11–14 week ultrasound scan. *Prenat Diagn.* 2002;22:1–4.
268. Carrera JM, Torrents M, Mortera C, Cusi V, Munoz A. Routine prenatal ultrasound screening for fetal abnormalities: 22 years' experience. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 1995 Mar [cited 2017 May 30];5(3):174–9. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1469-0705.1995.05030174.x>
269. GRANDJEAN H, LARROQUE D, LEVI S. Sensitivity of Routine Ultrasound Screening of Pregnancies in the Eurofetus Database. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1998 Jun [cited 2017 May 30];847(1 ULTRASOUND SC):118–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08932.x>
270. Hernádi L, Töröcsik M. Screening for Fetal Anomalies in the 12th week of Pregnancy by Transvaginal Sonography in an Unselected Population. *Prenat Diagn* [Internet]. 1997 Aug [cited 2017 May 30];17(8):753–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0223%28199708%2917%3A8%3C753%3A%3AAID-PD148%3E3.0.CO%3B2-P>
271. Cedergren M, Selbing A. Detection of fetal structural abnormalities by an 11–14-week ultrasound dating scan in an unselected Swedish population. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2006 Jan [cited 2017 May 30];85(8):912–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1080/00016340500448438>
272. Taipale P, Ammälä M, Salonen R H V. Learning curve in ultrasonographic screening for selected fetal structural anomalies in early pregnancy. *Obs Gynecol* 2003 Feb; 101((2):):273–8.
273. Sun L, Wu Q, Jiang S-W, Yan Y, Wang X, Zhang J, et al. Prenatal Diagnosis of Central Nervous System Anomalies by High-Resolution Chromosomal Microarray Analysis. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 6];2015:426379. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064910>
274. Mimaki M, Shiihara T, Watanabe M, Hirakata K, Sakazume S, Ishiguro A, et al. Holoprosencephaly with cerebellar vermis hypoplasia in 13q deletion syndrome: Critical region for cerebellar dysgenesis within 13q32.2q34. *Brain Dev* [Internet]. 2015 Aug [cited 2017 Jun 6];37(7):714–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760414002575>
275. Schumann M, Hofmann A, Krutzke SK, Hilger AC, Marsch F, Stienen D, et al. Array-based molecular karyotyping in fetuses with isolated brain malformations identifies disease-causing CNVs. *J Neurodev Disord* [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul 11];8:11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087860>
276. Krutzke SK, Engels H, Hofmann A, Schumann MM, Cremer K, Zink AM, et al. Array-based molecular karyotyping in fetal brain malformations: Identification of novel candidate genes and chromosomal regions. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2017 Aug 29];106(1):16–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bdra.23458>
277. Hu P, Wang Y, Sun R, Cao L, Chen X, Liu C, et al. Copy Number Variations with Isolated Fetal Ventriculomegaly. *Curr Mol Med* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2017 Jul 11];17(2). Available from: <http://www.eurekaselect.com/150610/article>

278. D'Addario V, Pinto V, di cagno L, Pintucci A. Sonographic diagnosis of fetal cerebral ventriculomegaly: An update. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2007 Jan 7 [cited 2017 Jul 11];20(1):7–14. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14767050601036188>
279. Gaglioti P, Danelon D, Bontempo S, Mombrò M, Cardaropoli S, Todros T. Fetal cerebral ventriculomegaly: outcome in 176 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2017 Jul 11];25(4):372–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.1857>
280. Laskin MD, Kingdom J, Toi A, Chitayat D, Ohlsson A. Perinatal and neurodevelopmental outcome with isolated fetal ventriculomegaly: A systematic review. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2005 Jan 7 [cited 2017 Jul 11];18(5):289–98. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14767050500329775>
281. Pilu G. Sonographic evaluation of the normal developmental anatomy of the fetal cerebral ventricles: II. The atria. *Obstet Gynecol*. 1989;vol: 73 (2):250–6.
282. Monteagudo A, Timor-Tritsch IE, Moomjy M. Nomograms of the fetal lateral ventricles using transvaginal sonography. *J Ultrasound Med* [Internet]. 1993 May 1 [cited 2017 Jul 11];12(5):265–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.7863/jum.1993.12.5.265>
283. Sonographic examination of the fetal central nervous system: guidelines for performing the 'basic examination' and the 'fetal neurosonogram.' *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2017 Jul 11];29(1):109–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.3909>
284. Wilhelm C, Keck C, Hess S, Korinthenberg R, Breckwoldt M. Ventriculomegaly diagnosed by prenatal ultrasound and mental development of the children. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. [cited 2017 Jul 11];13(3):162–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9708439>
285. Nicolaides KH, Berry S, Snijders RJ, Thorpe-Beeston JG, Gosden C. Fetal lateral cerebral ventriculomegaly: associated malformations and chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 1990 [cited 2017 Jul 11];5(1):5–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2101011>
286. Sherr EH, Owen R, Albertson DG, Pinkel D, Cotter PD, Slavotinek AM, et al. Genomic microarray analysis identifies candidate loci in patients with corpus callosum anomalies. *Neurology* [Internet]. 2005 Nov 8 [cited 2017 Aug 29];65(9):1496–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16275846>
287. Kennedy D, Chitayat D, Winsor EJT, Silver M, Toi A. Prenatally diagnosed neural tube defects: Ultrasound, chromosome, and autopsy or postnatal findings in 212 cases. *Am J Med Genet* [Internet]. 1998 May 26 [cited 2017 Aug 29];77(4):317–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291096-8628%2819980526%2977%3A4%3C317%3A%3AAID-AJMG13%3E3.0.CO%3B2-L>
288. Harmon JP. Prenatal ultrasound detection of isolated neural tube defects: is cytogenetic evaluation warranted? *Obstet Gynecol* [Internet]. 1995 [cited 2017 Aug 29];86(4):595–9. Available from: <http://sfx.cbuc.cat/uab?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:7675386#.WaVHushJbIU>

289. Sepulveda W, Corral E, Ayala C, Be C, Gutierrez J, Vasquez P. Chromosomal abnormalities in fetuses with open neural tube defects: prenatal identification with ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2017 Aug 29];23(4):352–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.964>
290. Chen C-P. Chromosomal Abnormalities Associated with Neural Tube Defects (I): Full Aneuploidy. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Aug 29];46(4):325–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1028455908600029>
291. Preiksaitiene E, Benušienė E, Ciuladaite Z, Šliužas V, Mikštienė V, Kučinskas V. Recurrent fetal syndromic spina bifida associated with 3q26.1-qter duplication and 5p13.33-pter deletion due to familial balanced rearrangement. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Jun [cited 2017 Aug 29];55(3):410–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1028455916300407>
292. Ouyang S, Li Y, Liu Z, Chang H, Wu J. Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: A meta-analysis. *Gene* [Internet]. 2013 [cited 2017 Aug 29];515(2):308–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0378111912015223>
293. Kibar Z, Bosoi CM, Kooistra M, Salem S, Finnell RH, De Marco P, et al. Novel mutations in *VANGL1* in neural tube defects. *Hum Mutat* [Internet]. 2009 Jul [cited 2017 Aug 29];30(7):E706-15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19319979>
294. Lei Y-P, Zhang T, Li H, Wu B-L, Jin L, Wang H-Y. *VANGL2* Mutations in Human Cranial Neural-Tube Defects. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Jun 10 [cited 2017 Aug 29];362(23):2232–5. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMc0910820>
295. ACOG Practice Bulletin No. 101: Ultrasonography in Pregnancy. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2017 Sep 12];113(2, Part 1):451–61. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006250-200902000-00033>
296. Antenatal care | Guidance and guidelines | NICE. [cited 2017 Sep 12]; Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/qs22>
297. Cargill Y, Morin L. No. 223-Content of a Complete Routine Second Trimester Obstetrical Ultrasound Examination and Report. *J Obstet Gynaecol Canada* [Internet]. 2017 Aug [cited 2017 Sep 12];39(8):e144–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1701216317304620>
298. Salomon LJ, Alfrevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, et al. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Sep 12];37(1):116–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.8831>
299. Caruana G, Wong MN, Walker A, Heloury Y, Webb N, Johnstone L, et al. Copy-number variation associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2017 Sep 12];30(3):487–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-014-2962-9>

300. Xi Q, Zhu X, Wang Y, Ru T, Dai C, Wang Z, et al. Copy number variations in multicystic dysplastic kidney: update for prenatal diagnosis and genetic counseling. *Prenat Diagn* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2017 Sep 12];36(5):463–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.4807>
301. Fu F, Chen F, Li R, Zhang Y, Pan M, Li D, et al. Prenatal diagnosis of fetal multicystic dysplastic kidney via high-resolution whole-genome array. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2017 Sep 26];31(10):1693–8. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfv465>
302. Marlow J, Thomas J. A review of congenital diaphragmatic hernia. *Australas J ultrasound Med* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Sep 26];16(1):16–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28191167>
303. Witters I, Legius E, Moerman P, Deprest J, Van Schoubroeck D, Timmerman D, et al. Associated malformations and chromosomal anomalies in 42 cases of prenatally diagnosed diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2017 Sep 26];103(4):278–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1564>
304. Slavotinek AM, Moshrefi A, Davis R, Leeth E, Schaeffer GB, Burchard GE, et al. Array comparative genomic hybridization in patients with congenital diaphragmatic hernia: mapping of four CDH-critical regions and sequencing of candidate genes at 15q26.1–15q26.2. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2006 Sep [cited 2017 Sep 26];14(9):999–1008. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ejhg.5201652>
305. Srisupundit K, Brady PD, Devriendt K, Fryns J-P, Cruz-Martinez R, Gratacos E, et al. Targeted array comparative genomic hybridisation (array CGH) identifies genomic imbalances associated with isolated congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Prenat Diagn* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2017 Sep 26];30(12–13):1198–206. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2651>
306. Biggio JR, Descartes MD, Carroll AJ, Holt RL. Congenital diaphragmatic hernia: Is 15q26.1-26.2 a candidate locus? *Am J Med Genet* [Internet]. 2004 Apr 15 [cited 2017 Sep 26];126A(2):183–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.20464>
307. Klaassens M, van Dooren M, Eussen HJ, Douben H, den Dekker AT, Lee C, et al. Congenital Diaphragmatic Hernia and Chromosome 15q26: Determination of a Candidate Region by Use of Fluorescent In Situ Hybridization and Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2005 May [cited 2017 Sep 26];76(5):877–82. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707607332>
308. Snijders RJ. Maternal age and gestational age-specific risk for chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 1995 [cited 2017 Oct 3];10(6):356–67. Available from: <http://sfx.cbuc.cat/uab?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:8579773#.WdMwVGiOPIU>
309. Cuckle HSA. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* [Internet]. 1987 [cited 2017 Oct 3];94(5):387–402. Available from: <http://sfx.cbuc.cat/uab?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:2437951#.WdMohWiOPIU>
310. Cuckle HS, Wald NJ LR. MATERNAL SERUM ALPHA-FETOPROTEIN MEASUREMENT: A SCREENING TEST FOR DOWN SYNDROME. *Lancet* [Internet]. 1984 Apr 28 [cited 2017

- Oct 3];323(8383):926–9. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0140673684923894?via%3Dihub>
311. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* [Internet]. 1988 Oct 8 [cited 2017 Oct 3];297(6653):883–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460174>
  312. Spencer K, Coombes EJ, Mallard AS, Ward AM. Free Beta Human Choriogonadotropin in Down's Syndrome Screening: A Multicentre Study of its Role Compared with other Biochemical Markers. *Ann Clin Biochem An Int J Biochem Lab Med* [Internet]. 1992 Sep 1 [cited 2017 Oct 3];29(5):506–18. Available from:  
<http://acb.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/000456329202900504>
  313. JP N. Assessment of fetal nuchal translucency test for Down's syndrome. *Lancet* [Internet]. 1997 Sep 13 [cited 2017 Oct 3];350(9080):754–5. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0140673605625627>
  314. Snijders RJM, Johnson S, Sebire NJ, Noble PL, Nicolaides KH. First-trimester ultrasound screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 1996 Mar [cited 2017 Oct 3];7(3):216. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/rd.asp?issn=1469-0705&vol=7&page=216&goto=abstract>
  315. Souka AP, Nicolaides KH. Diagnosis of fetal abnormalities at the 10-14-week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 1997 Dec [cited 2017 Jun 6];10(6):429–42. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1469-0705.1997.10060429.x>
  316. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* [Internet]. 1992 Apr 4 [cited 2017 Oct 3];304(6831):867–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1392745>
  317. J Szabó JG. Nuchal fluid accumulation in trisomy-21 detected by vaginosonography in first trimester. *Lancet* [Internet]. 1990 Nov 3 [cited 2017 Oct 3];336(8723):1133. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/014067369092614N>
  318. Pandya PP, Brizot ML, Kuhn P, Snijders RJ, Nicolaides KH. First-trimester fetal nuchal translucency thickness and risk for trisomies. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1994 Sep [cited 2017 Oct 24];84(3):420–3. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8058241>
  319. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A NK. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Lancet* [Internet]. 1998 Aug 1 [cited 2017 Oct 24];352(9125):343–6. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0140673697112806?via%3Dihub>
  320. Souka A. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2017 Oct 31];192(4):1005–21. Available from:



<http://www.sciencedirect.com.arenab.cat/science/article/pii/S0002937805001183?via%3Dihub>

321. Malone. First-trimester septated cystic hygroma: prevalence, natural history, and pediatric outcome. *Obs Gynecol* 2005 Aug;106(2):288-94.
322. Kharrat R, Yamamoto M, Roume J, Couderc S, Vialard F, Hillion Y, et al. Karyotype and outcome of fetuses diagnosed with cystic hygroma in the first trimester in relation to nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2017 Oct 31];26(4):369–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.1423>
323. D'Alton ME, Cleary-Goldman J, Lambert-Messerlian G, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, et al. Maintaining quality assurance for sonographic nuchal translucency measurement: lessons from the FASTER Trial. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2018 Jul 31];33(2):142–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.6265>
324. Molina. Cystic hygromas, nuchal edema, and nuchal translucency at 11-14 weeks of gestation. *Obs Gynecol* 2006 Mar;107(3):678-83.
325. Scholl J, Durfee SM, Russell MA, Heard AJ, Iyer C, Alammari R, et al. First-trimester Cystic Hygroma: Relationship of Nuchal Translucency Thickness and Outcomes. *Obstet &* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2017 Oct 31];120(3):551–9. Available from: <https://insights-ovid-com.arenab.cat/pubmed?pmid=22872145>
326. Mack LM, Lee W, Mastrobattista JM, Belfort MA, Van den Veyver IB, Shamshirsaz AA, et al. Are First Trimester Nuchal Septations Independent Risk Factors for Chromosomal Anomalies? *J Ultrasound Med* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2017 Oct 24];36(1):155–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.7863/ultra.16.01066>
327. Cuckle H, Platt LD, Thornburg LL, Bromley B, Fuchs K, Abuhamad A, et al. Nuchal Translucency Quality Review (NTQR) program: first one and half million results. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2017 Oct 3];45(2):199–204. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.13390>
328. Carmichael JB, Liu H-P, Janik D, Hallahan TW, Nicolaides KH, Krantz DA. Expanded conventional first trimester screening. *Prenat Diagn* [Internet]. 2017 Aug [cited 2017 Oct 31];37(8):802–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613385>
329. Maiz N, Plasencia W, Dagklis T, Faros E, Nicolaides K. Ductus venosus Doppler in fetuses with cardiac defects and increased nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2017 Oct 17];31(3):256–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.5262>
330. Pereira S, Ganapathy R, Syngelaki A, Maiz N, Nicolaides KH. Contribution of Fetal Tricuspid Regurgitation in First-trimester Screening for Major Cardiac Defects. *Obstet &* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2017 Oct 17];117(6):1384–91. Available from: <https://insights-ovid-com.arenab.cat/pubmed?pmid=21606749>
331. Makrydimas G. Screening performance of first-trimester nuchal translucency for major cardiac defects: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2017 Oct 17];189(5):1330–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com.arenab.cat/science/article/pii/S0002937803006458?via%3Dihub>

%3Dihub

332. Scala C, Morlando M, Familiari A, Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S, D'Antonio F, et al. Fetal Tricuspid Regurgitation in the First Trimester as a Screening Marker for Congenital Heart Defects: Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 17];42(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28482343>
333. Abele H, Wagner P, Sonek J, Hoopmann M, Brucker S, Artunc-Ulkumen B, et al. First trimester ultrasound screening for Down syndrome based on maternal age, fetal nuchal translucency and different combinations of the additional markers nasal bone, tricuspid and ductus venosus flow. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2017 Oct 17];35(12):1182–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.4664>
334. Oh C, Harman C, Baschat AA. Abnormal first-trimester ductus venosus blood flow: a risk factor for adverse outcome in fetuses with normal nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2017 Oct 17];30(2):192–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.4034>
335. Martínez JM, Comas M, Borrell A, Bennasar M, Gómez O, Puerto B, et al. Abnormal first-trimester ductus venosus blood flow: a marker of cardiac defects in fetuses with normal karyotype and nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2017 Oct 17];35(3):267–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.7544>
336. Prats P, Ferrer Q, Comas C, Rodríguez I. Is the addition of the ductus venosus useful when screening for aneuploidy and congenital heart disease in fetuses with normal nuchal translucency? *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 17];32(1–2):138–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22585666>
337. Karadzov-Orlic N, Egic A, Filimonovic D, Damjanovic-Pazin B, Milovanovic Z, Lukic R, et al. Screening performances of abnormal first-trimester ductus venosus blood flow and increased nuchal translucency thickness in detection of major heart defects. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2017 Oct 17];35(13):1308–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.4693>
338. Wiechec M, Nocun A, Matyszkiewicz A, Wiercinska E, Latała E. First trimester severe ductus venosus flow abnormalities in isolation or combination with other markers of aneuploidy and fetal anomalies. *J Perinat Med* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2017 Oct 17];44(2):201–9. Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/jpme.2016.44.issue-2/jpm-2014-0323/jpm-2014-0323.xml>
339. Ghi T, Huggon IC, Zosmer N, Nicolaides KH. Incidence of major structural cardiac defects associated with increased nuchal translucency but normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2017 Nov 7];18(6):610–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0960-7692.2001.00584.x>
340. Galindo A, Comas C, Martínez JM, Gutiérrez-Larraya F, Carrera JM, Puerto B, et al. Cardiac defects in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency at 10–14 weeks of gestation. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2003 Jan 7 [cited 2017 Nov 7];13(3):163–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820838>



341. Hyett JA, Sebire NJ, Snijders RJM, Nicolaidis KH. Intrauterine lethality of trisomy 21 fetuses with increased nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 1996 Feb 1 [cited 2017 Oct 24];7(2):101–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-0705.1996.07020101.x>
342. Vimercati A, Panzarino M, Totaro I, Chincoli A, Selvaggi L. Increased nuchal translucency and short femur length as possible early signs of osteogenesis imperfecta type III. *J Prenat Med* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Oct 24];7(1):5–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741540>
343. Senat M V., De Keersmaecker B, Audibert F, Montchamont G, Frydman R, Ville Y. Pregnancy outcome in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat Diagn* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2017 Nov 7];22(5):345–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.321>
344. de Graaf IM, Pajkrt E, Keessen M, Leschot NJ, Bilardo CM. Enlarged nuchal translucency and low serum protein concentrations as possible markers for Zellweger syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 1999 Apr [cited 2017 Nov 7];13(4):268–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10341407>
345. Souka AP, Snijders RJM, Novakov A, Soares W, Nicolaidis KH. Defects and syndromes in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2017 Nov 7];11(6):391–400. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-0705.1998.11060391.x>
346. Vimercati A, Panzarino M, Totaro I, Chincoli A, Selvaggi L. Increased nuchal translucency and short femur length as possible early signs of osteogenesis imperfecta type III. *J Prenat Med* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Nov 7];7(1):5–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741540>
347. Bilardo CM, Pajkrt E, de Graaf I, Mol BW, Bleker OP. Outcome of fetuses with enlarged nuchal translucency and normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2017 Nov 7];11(6):401–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674085>
348. Lithner CU, Kublickas M, Ek S. Pregnancy outcome for fetuses with increased nuchal translucency but normal karyotype. *J Med Screen* [Internet]. 2016 Mar 20 [cited 2017 Nov 7];23(1):1–6. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0969141315595826>
349. De Domenico R, Faraci M, Hyseni E, Di Prima FAF, Valenti O, Monte S, et al. Increased nuchal traslucency in normal karyotype fetuses. *J Prenat Med* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Nov 7];5(2):23–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439071>
350. Maymon R, Dreazen E, Tovbin Y, Weinraub Z, Herman A. [Pregnancy outcome in fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of pregnancy]. *Harefuah* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2017 Nov 7];136(11):851–5, 916, 915. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10955127>
351. Hellmuth SG, Pedersen LH, Miltoft CB, Petersen OB, Kjaergaard S, Ekelund C, et al. Increased nuchal translucency thickness and risk of neurodevelopmental disorders.

- Ultrasound Obstet Gynecol [Internet]. 2017 May 1 [cited 2017 Nov 7];49(5):592–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.15961>
352. Bilardo CM. Re: Increased nuchal translucency thickness and risk of neurodevelopmental disorders. S. G. Hellmuth, L. H. Pedersen, C. B. Miltoft, O. B. Petersen, S. Kjaergaard, C. Ekelund and A. Tabor. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 49: 592-598. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 May [cited 2017 Dec 12];49(5):564–564. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28471024>
  353. Baer RJ, Norton ME, Shaw GM, Flessel MC, Goldman S, Currier RJ, et al. Risk of selected structural abnormalities in infants after increased nuchal translucency measurement. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2017 Nov 7];211(6):675.e1-19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24949541>
  354. Grande M, Jansen FAR, Blumenfeld YJ, Fisher A, Odibo AO, Haak MC, et al. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Nov 7];46(6):650–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.14880>
  355. Yang X, Li R, Fu F, Zhang Y, Li D, Liao C. Submicroscopic chromosomal abnormalities in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2017 Jan 17 [cited 2017 Nov 7];30(2):194–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2016.1168394>
  356. Pan M, Han J, Zhen L, Yang X, Li R LC. Prenatal diagnosis of fetuses with increased nuchal translucency using an approach based on quantitative fluorescent polymerase chain reaction and genomic microarray. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2017 Nov 7];197:164–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0301211515004923?via%3Dihub>
  357. Lund ICB, Christensen R, Petersen OB, Vogel I, Vestergaard EM. Chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Jun 12];45(1):95–100. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.14726>
  358. International Society for Twin Studies. Twin research and human genetics : the official journal of the International Society for Twin Studies. [Internet]. Published for the ISTS by Australian Academic Press; 2005 [cited 2017 Oct 24]. Available from: <http://resolver.ebscohost.com/are.uab.cat/openurl?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A10918616&site=ftf-live>
  359. Edlow AG, Reiss R, Benson CB, Gerrol P, Wilkins-Haug L. Monochorionic diamniotic twin gestations discordant for markedly enlarged nuchal translucency. *Prenat Diagn* [Internet]. 2011 Mar [cited 2017 Nov 7];31(3):299–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21234973>
  360. Stagnati V, Zanardini C, Fichera A, Pagani G, Quintero RA, Bellocco R, et al. Early prediction of twin-to-twin transfusion syndrome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2017 Nov 7];49(5):573–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.15989>

361. Uysal F, Coşar E, Yücesoy K, Gencer M, Cevizci S, Güngör A, et al. Is there any relationship between adverse pregnancy outcome and first trimester nuchal translucency measurements in normal karyotype fetuses? *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2015 Mar 24 [cited 2017 Nov 7];28(5):531–4. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2014.923396>
362. Santorum M, Wright D, Syngelaki A, Karagioti N, Nicolaides KH. Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2020 Sep 11];49(6):714–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27549925/>
363. ACOG. ACOG practice bulletin no. 77: Screening for fetal chromosomal abnormalities [Internet]. Vol. 109, *Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2007 [cited 2020 Sep 11]. p. 217–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17197615/>
364. Aagaard-Tillery KM, Malone FD, Nyberg DA, Porter TF, Cuckle HS, Fuchs K, et al. Role of second-trimester genetic sonography after Down syndrome screening. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Dec 5];114(6):1189–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935018>
365. Chitayat D, Langlois S, Douglas Wilson R, Douglas Wilson R, Audibert F, Blight C, et al. Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy in Singleton Pregnancies. *J Obstet Gynaecol Canada* [Internet]. 2011 [cited 2020 Sep 11];33(7):736–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21749752/>
366. Krantz DA, Hallahan TW, Macri VJ, Macri JN. Genetic sonography after first-trimester Down syndrome screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2017 Dec 5];29(6):666–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.4029>
367. Benacerraf BR, Neuberger D, Bromley B, Frigoletto FD. Sonographic scoring index for prenatal detection of chromosomal abnormalities. *J Ultrasound Med* [Internet]. 1992 Sep [cited 2017 Dec 5];11(9):449–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1283415>
368. Agathokleous M, Chaveeva P, Poon LCY, Kosinski P, Nicolaides KH. Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2017 Dec 5];41(3):247–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.12364>
369. Miguelez J, De Lourdes Brizot M, Liao AW, De Carvalho MHB, Zugaib M. Second-trimester soft markers: Relation to first-trimester nuchal translucency in unaffected pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012 Mar;39(3):274–8.
370. Benacerraf BR, Barss VA, Laboda LA. A sonographic sign for the detection in the second trimester of the fetus with Down's syndrome. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1985 Apr 15 [cited 2017 Dec 5];151(8):1078–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3157321>
371. Ginsberg N, Cadkin A, Pergament E, Verlinsky Y. Ultrasonographic detection of the second-trimester fetus with trisomy 18 and trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1990 Oct [cited 2017 Dec 5];163(4 Pt 1):1186–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2145768>

372. Crane JP, Gray DL. Sonographically measured nuchal skinfold thickness as a screening tool for Down syndrome: results of a prospective clinical trial. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1991 Apr [cited 2017 Dec 5];77(4):533–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1825865>
373. Bromley B, Shipp TD, Lyons J, Groszmann Y, Navathe RS, Benacerraf BR. What Is the Importance of Second-Trimester “Soft Markers” for Trisomy 21 After an 11- to 14-Week Aneuploidy Screening Scan? *J Ultrasound Med* [Internet]. 2014 Oct [cited 2017 Dec 12];33(10):1747–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253820>
374. Smith-Bindman R, Chu P, Goldberg JD. Second trimester prenatal ultrasound for the detection of pregnancies at increased risk of Down syndrome. *Prenat Diagn* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 Oct 29];27(6):535–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367102>
375. Li L, Fu F, Li R, Liu Z, Liao C. Prenatal diagnosis and pregnancy outcome analysis of thickened nuchal fold in the second trimester. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018 Nov [cited 2019 Oct 29];97(46):e13334. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30431620>
376. van der Burgt I. Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2007 Jan 14 [cited 2017 Dec 12];2(1):4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222357>
377. Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements—A prospective study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1985 Feb 1 [cited 2017 Dec 12];151(3):333–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/are.uab.cat/science/article/pii/S0002937885902984?via%3Dihub>
378. Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Dec 12];204(4):288–300. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937810011105>
379. Grantz KL, Grewal J, Albert PS, Wapner R, D’Alton ME, Sciscione A, et al. Dichorionic twin trajectories: the NICHD Fetal Growth Studies. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Dec 12];215(2):221.e1–221.e16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143399>
380. ACOG committee opinion. Utility of antepartum umbilical artery Doppler velocimetry in intrauterine growth restriction. Number 188, October 1997 (replaces no. 116, November 1992). Committee on Obstetric Practice. American College of Obstetricians and Gynec. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 1997 Dec [cited 2017 Dec 19];59(3):269–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486523>
381. Aditya I, Tat V, Sawana A, Mohamed A, Tuffner R, Mondal T. Use of Doppler velocimetry in diagnosis and prognosis of intrauterine growth restriction (IUGR): A Review. *J Neonatal Perinatal Med* [Internet]. 2016 Jun 22 [cited 2017 Dec 12];9(2):117–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27197939>
382. Tanis JC, Boelen MR, Schmitz DM, Casarella L, van der Laan ME, Bos AF, et al. Correlation between Doppler flow patterns in growth-restricted fetuses and neonatal circulation. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Dec

- 12];48(2):210–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358663>
383. Damron DP. A Practical Approach to Fetal Growth Restriction. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Dec 12];124(2, PART 1):380. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050764>
384. Kaponis A, Harada T, Makrydimas G, Kiyama T, Arata K, Adonakis G, et al. The importance of venous Doppler velocimetry for evaluation of intrauterine growth restriction. *J Ultrasound Med* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Dec 12];30(4):529–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460154>
385. Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, O’Donoghue K, et al. Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: the multicenter prospective PORTO Study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 Dec 19];208(4):290.e1-6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937813001439>
386. M. Kady S, Gardosi J. Perinatal mortality and fetal growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2004 Jun [cited 2017 Dec 19];18(3):397–410. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183135>
387. Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new standards for assessing adverse outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2018 Mar 20];23(6):741–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152169340900114X>
388. Gardosi J, Francis A. Adverse pregnancy outcome and association with small for gestational age birthweight by customized and population-based percentiles. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2017 Dec 19];201(1):28.e1-8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937809004281>
389. Sovio U, White IR, Dacey A, Pasupathy D, Smith GCS. Screening for fetal growth restriction with universal third trimester ultrasonography in nulliparous women in the Pregnancy Outcome Prediction (POP) study: a prospective cohort study. *Lancet* [Internet]. 2015 Nov 21 [cited 2017 Dec 19];386(10008):2089–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26360240>
390. Henrichs J, Verfaillie V, Jellema P, Viester L, Pajkt E, Wilschut J, et al. Effectiveness of routine third trimester ultrasonography to reduce adverse perinatal outcomes in low risk pregnancy (the IRIS study): nationwide, pragmatic, multicentre, stepped wedge cluster randomised trial. *BMJ*. 2019 Oct 15;367:l5517.
391. Ewigman BG, Crane JP, Frigoletto FD, LeFevre ML, Bain RP, McNellis D. Effect of prenatal ultrasound screening on perinatal outcome. RADIUS Study Group. *N Engl J Med* [Internet]. 1993 Sep 16 [cited 2017 Dec 19];329(12):821–7. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199309163291201>
392. Kesavan K, Devaskar SU. Intrauterine Growth Restriction: Postnatal Monitoring and Outcomes. Vol. 66, *Pediatric Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2019. p. 403–23.
393. Demirci O, Selçuk S, Kumru P, Asoğlu MR, Mahmutoğlu D, Boza B, et al. Maternal and fetal risk factors affecting perinatal mortality in early and late fetal growth restriction. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Dec 19];54(6):700–4.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700988>

394. Bartholmot C, Mousty E, Grosjean F, Petrov Y, Khau Van Kien P, Chiesa J, et al. Apport de l'analyse chromosomique par puce à ADN dans un centre de diagnostic prénatal pluridisciplinaire. *Gynecol Obstet Fertil Senol*. 2017 Jul 1;45(7–8):400–7.
395. Bilardo CM, Hecher K, Visser GHA, Papageorghiou AT, Marlow N, Thilaganathan B, et al. Severe fetal growth restriction at 26–32 weeks: key messages from the TRUFFLE study. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Sep [cited 2017 Dec 19];50(3):285–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28938063>
396. Story L, Sankaran S, Mullins E, Tan S, Russell G, Kumar S, et al. Survival of pregnancies with small for gestational age detected before 24 weeks gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2015 May [cited 2017 Dec 19];188:100–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801725>
397. Temming LA, Dicke JM, Stout MJ, Rampersad RM, Macones GA, Tuuli MG, et al. Early Second-Trimester Fetal Growth Restriction and Adverse Perinatal Outcomes. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Oct [cited 2017 Dec 19];130(4):865–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28885423>
398. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2018 Jan 9];16(8):949–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809666>
399. Human Genome Sequencing Consortium I. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* [Internet]. 2004 Oct 21 [cited 2018 Jan 16];431(7011):931–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496913>
400. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2018 Jan 9];36(9):949–51. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng1416>
401. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2018 Jan 9];7(2):85–97. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1767>
402. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011;
403. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The Influence of CCL3L1 Gene-Containing Segmental Duplications on HIV-1/AIDS Susceptibility. *Science (80- )* [Internet]. 2005 Mar 4 [cited 2018 Jan 9];307(5714):1434–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637236>
404. Nakajima T, Kaur G, Mehra N, Kimura A. HIV-1/AIDS susceptibility and copy number variation in <i>CCL3L1</i>, a gene encoding a natural ligand for HIV-1 co-receptor CCR5. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2008 [cited 2018 Jan 9];123(1–4):156–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287150>
405. McKinney C, Merriman ME, Chapman PT, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, et al. Evidence for an influence of chemokine ligand 3-like 1 (CCL3L1) gene copy number on



- susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2007 Oct 29 [cited 2018 Jan 9];67(3):409–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604289>
406. Thabet MM, Huizinga TWJ, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Bakker AM, Kurreeman FA, et al. Contribution of Fc receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2018 Jan 9];68(11):1775–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019892>
407. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* [Internet]. 2006 Feb 16 [cited 2018 Jan 9];439(7078):851–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature04489>
408. Aramaki M, Udaka T, Kosaki R, Makita Y, Okamoto N, Yoshihashi H, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *J Pediatr* [Internet]. 2006 Mar [cited 2018 Jan 9];148(3):410–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16615981>
409. Sanlaville D, Etchevers HC, Gonzales M, Martinovic J, Clément-Ziza M, Delezoide A-L, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with CHD7 truncating mutations correlates with expression during human development. *J Med Genet* [Internet]. 2005 Aug 23 [cited 2018 Jan 9];43(3):211–317. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169932>
410. De Arriba Muñoz A, Monge Galindo L, López Pisón J, Lafuente Hidalgo M, Pérez Delgado R, Domínguez Cajal M, et al. Síndrome de CHARGE y mutación en el gen CHD7 [Internet]. Vol. 26, *Neurología*. Elsevier; 2011 [cited 2020 Sep 11]. p. 255. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-articulo-sindrome-charge-mutacion-el-gen-S0213485310003233>
411. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson’s Disease. *Science* (80- ) [Internet]. 2003 Oct 31 [cited 2018 Jan 9];302(5646):841–841. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593171>
412. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Meur N Le, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Jan 20 [cited 2018 Jan 9];38(1):24–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369530>
413. Sleegers K, Brouwers N, Gijselinck I, Theuns J, Goossens D, Wauters J, et al. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer’s dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain* [Internet]. 2006 Sep 29 [cited 2018 Jan 9];129(11):2977–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921174>
414. Walker LC, Pearson JF, Wiggins GAR, Giles GG, Hopper JL, Southey MC. Increased genomic burden of germline copy number variants is associated with early onset breast cancer: Australian breast cancer family registry. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2017 Mar 16 [cited 2020 Sep 11];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28302160/>

415. Tonini GP, Capasso M. Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma [Internet]. Vol. 39, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer; 2020 [cited 2020 Sep 11]. p. 275–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31927719/>
416. Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, et al. A Comprehensive Analysis of Common Copy-Number Variations in the Human Genome. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2007 Jan [cited 2018 Jan 16];80(1):91–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160897>
417. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* [Internet]. 2010 Apr 7 [cited 2018 Jan 16];464(7289):704–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812545>
418. Bragin E, Chatzimichali EA, Wright CF, Hurles ME, Firth H V., Bevan AP, et al. DECIPHER: database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan [cited 2018 Jan 9];42(D1):D993–1000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24150940>
419. Chatzimichali EA, Brent S, Hutton B, Perrett D, Wright CF, Bevan AP, et al. Facilitating Collaboration in Rare Genetic Disorders Through Effective Matchmaking in DECIPHER. *Hum Mutat* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Jan 9];36(10):941–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220709>
420. Pérez-Palma E, Gramm M, Nürnberg P, May P, Lal D. Simple ClinVar: an interactive web server to explore and retrieve gene and disease variants aggregated in ClinVar database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2020 Sep 12];47(W1):W99–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31114901/>
421. Wain KE, Palen E, Savatt JM, Shuman D, Finucane B, Seeley A, et al. The value of genomic variant ClinVar submissions from clinical providers: Beyond the addition of novel variants. *Hum Mutat* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2020 Sep 12];39(11):1660–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30311381/>
422. Shah N, Hou YCC, Yu HC, Sainger R, Caskey CT, Venter JC, et al. Identification of Misclassified ClinVar Variants via Disease Population Prevalence. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2018 Apr 5 [cited 2020 Sep 12];102(4):609–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29625023/>
423. Lauer S, Gresham D. An evolving view of copy number variants [Internet]. Vol. 65, *Current Genetics*. Springer Verlag; 2019 [cited 2020 Sep 12]. p. 1287–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31076843/>
424. Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2009 Apr 26 [cited 2018 Jan 16];66(7):1178–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-008-8401-y>
425. Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, Vu TH, et al. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. Orr HT, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 2011 Nov 10 [cited 2018 Jan 16];7(11):e1002334. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002334>



426. Stankiewicz P, Inoue K, Bi W, Walz K, Park SS, Kurotaki N, et al. Genomic disorders: genome architecture results in susceptibility to DNA rearrangements causing common human traits. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* [Internet]. 2003 [cited 2018 Jan 16];68:445–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338647>
427. Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-Revenga L, Tran CW, et al. The Fine-Scale and Complex Architecture of Human Copy-Number Variation. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2008 Mar [cited 2018 Jan 23];82(3):685–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304495>
428. Tsuchiya KD, Shaffer LG, Aradhya S, Gastier-Foster JM, Patel A, Rudd MK, et al. Variability in interpreting and reporting copy number changes detected by array-based technology in clinical laboratories. *Genet Med* [Internet]. 2009 Dec 6 [cited 2018 Jan 16];11(12):866–73. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1097/GIM.0b013e3181c0c3b0>
429. Hollenbeck D, Williams CL, Drazba K, Descartes M, Korf BR, Rutledge SL, et al. Clinical relevance of small copy-number variants in chromosomal microarray clinical testing. *Genet Med* [Internet]. 2017 Apr 15 [cited 2018 Jan 16];19(4):377–85. Available from: <http://www.nature.com/articles/gim2016132>
430. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Jan 28 [cited 2018 Jan 16];43(D1):D789–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428349>
431. Shaikh TH, Gai X, Perin JC, Glessner JT, Xie H, Murphy K, et al. High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications. *Genome Res* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2018 Jan 16];19(9):1682–90. Available from: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.083501.108>
432. Chen J, Coppola G. Bioinformatics and genomic databases. In: *Handbook of clinical neurology* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jan 16]. p. 75–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29325629>
433. Li J, Shi L, Zhang K, Zhang Y, Hu S, Zhao T, et al. VarCards: an integrated genetic and clinical database for coding variants in the human genome. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2018 Jan 23];46(D1):D1039–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29112736>
434. Ingason A, Kirov G, Giegling I, Hansen T, Isles AR, Jakobsen KD, et al. Maternally Derived Microduplications at 15q11-q13: Implication of Imprinted Genes in Psychotic Illness. *Am J Psychiatry* [Internet]. 2011 Apr [cited 2018 Jan 23];168(4):408–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324950>
435. Liu S, Zhang K, Song F, Yang Y, Lv Y, Gao M, et al. Uniparental Disomy of Chromosome 15 in Two Cases by Chromosome Microarray: A Lesson Worth Thinking. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 23];152(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28647735>
436. Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Uniparental disomy and human disease: An overview [Internet]. Vol. 154, *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in*

- Medical Genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*; 2010 [cited 2020 Sep 12]. p. 329–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20803655/>
437. South ST, Rope AF, Lamb AN, Aston E, Glaus N, Whitby H, et al. Expansion in size of a terminal deletion: a paradigm shift for parental follow-up studies. *J Med Genet* [Internet]. 2008 Jun 30 [cited 2018 Jan 16];45(6):391–5. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2008.057315>
  438. Domingo A, Westenberger A, Lee L V, Brænne I, Liu T, Vater I, et al. New insights into the genetics of X-linked dystonia-parkinsonism (XDP, DYT3). *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Jan 23];23(10):1334–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25604858>
  439. Mkrtychyan H, Gross M, Hinreiner S, Polytiko A, Manvelyan M, Mrasek K, et al. The human genome puzzle - the role of copy number variation in somatic mosaicism. *Curr Genomics* [Internet]. 2010 Sep [cited 2018 Jan 23];11(6):426–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21358987>
  440. Piotrowski A, Bruder CEG, Andersson R, de Ståhl TD, Menzel U, Sandgren J, et al. Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. *Hum Mutat* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2018 Jan 23];29(9):1118–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20815>
  441. Gringras P, Chen W. Mechanisms for differences in monozygous twins. *Early Hum Dev* [Internet]. 2001 Sep [cited 2018 Jan 23];64(2):105–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440823>
  442. Czyz W, Morahan JM, Ebers GC, Ramagopalan S V. Genetic, environmental and stochastic factors in monozygotic twin discordance with a focus on epigenetic differences. *BMC Med* [Internet]. 2012 Aug 17 [cited 2018 Jan 23];10:93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898292>
  443. Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Bell JT. Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Med* [Internet]. 2014 [cited 2018 Jan 23];6(7):60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25484923>
  444. Bruder CEG, Piotrowski A, Gijsbers AACJ, Andersson R, Erickson S, Diaz de Ståhl T, et al. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2008 Mar [cited 2018 Jan 23];82(3):763–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304490>
  445. Úbeda F. Evolution of Genomic Imprinting with Biparental Care: Implications for Prader-Willi and Angelman Syndromes. Haig D, editor. *PLoS Biol* [Internet]. 2008 Aug 26 [cited 2018 Jan 30];6(8):e208. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752349>
  446. Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Lalande M, Latt SA, et al. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* [Internet]. 1989 Feb [cited 2018 Jan 30];32(2):285–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1320320235>
  447. Butler MG. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2009 Oct 21 [cited 2018 Jan 30];26(9–10):477–86. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844787>

448. Aref-Eshghi E, Schenkel LC, Lin H, Skinner C, Ainsworth P, Paré G, et al. Clinical Validation of a Genome-Wide DNA Methylation Assay for Molecular Diagnosis of Imprinting Disorders. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2017 Nov [cited 2018 Jan 30];19(6):848–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28807811>
449. Brioude F, Kalish JM, Mussa A, Foster AC, Bliiek J, Ferrero GB, et al. Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith–Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018 Jan 29 [cited 2018 Jan 30]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29377879>
450. Hoffmann K, Heller R. Uniparental disomies 7 and 14. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2011 Feb [cited 2018 Jan 30];25(1):77–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396576>
451. Solter D. Relevance of genomic imprinting to human diseases. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 1992 Dec [cited 2018 Jan 30];3(6):632–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369119>
452. Nicholls RD. New insights reveal complex mechanisms involved in genomic imprinting. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1994 May [cited 2018 Jan 30];54(5):733–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8178814>
453. Goldenberg P. An update on common chromosome microdeletion and microduplication syndromes. *Pediatr Ann*. 2018 May 1;47(5):e198–203.
454. Mcdonald-mcginn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (digeorge Syndrome/velocardiofacial Syndrome). *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2018 Feb 27];90(1):1–18. Available from: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=21200182>
455. Dugoff L, Norton ME, Kuller JA, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Oct [cited 2018 Feb 6];215(4):B2–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27427470>
456. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 581. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2018 Feb 6];122(6):1374–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24264715>
457. Carey L, Scott F, Murphy K, Mansfield N, Barahona P, Leigh D, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal mosaicism in over 1600 cases using array comparative genomic hybridization as a first line test. *Prenat Diagn* [Internet]. 2014 May [cited 2018 Feb 6];34(5):478–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453008>
458. Committee on Ethics, American College of Obstetricians and Gynecologists, Committee on Genetics, American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee Opinion No. 410: Ethical Issues in Genetic Testing. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2018 Feb 6];111(6):1495–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515541>
459. Mikhaelian M, Veach PM, MacFarlane I, LeRoy BS, Bower M. Prenatal chromosomal microarray analysis: a survey of prenatal genetic counselors’ experiences and attitudes.

- Prenat Diagn [Internet]. 2013 Feb [cited 2018 Feb 13];33(4):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450520>
460. Suela J, López-Expósito I, Querejeta ME, Martorell R, Cuatrecasas E, Armengol L, et al. Recomendaciones para el uso de microarrays en el diagnóstico prenatal. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2017 Apr 7 [cited 2018 Feb 13];148(7):328.e1-328.e8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233562>
  461. Medicine C on G and the S for M-F. Committee Opinion No.682. Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Feb 20];128(6):e262–8. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00006250-201612000-00055>
  462. Hoang S, Ahn J, Mann K, Bint S, Mansour S, Homfray T, et al. Detection of mosaicism for genome imbalance in a cohort of 3,042 clinical cases using an oligonucleotide array CGH platform. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Feb 13];54(2):121–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056703>
  463. Robson SC, Chitty LS, Morris S, Verhoef T, Ambler G, Wellesley DG, et al. EFFICACY AND MECHANISM EVALUATION Evaluation of Array Comparative genomic Hybridisation in prenatal diagnosis of fetal anomalies: a multicentre cohort study with cost analysis and assessment of patient, health professional and commissioner preferences for. 2017 [cited 2018 Feb 13];2050–4365. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/are.uab.cat/books/NBK423961/pdf/Bookshelf\\_NBK423961.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/are.uab.cat/books/NBK423961/pdf/Bookshelf_NBK423961.pdf)
  464. Faas BHW. Prenatal genetic care: debates and considerations of the past, present and future. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2015 Aug 3 [cited 2018 Feb 13];15(8):1101–5. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2015.1045873>
  465. Cirino AL, Lakdawala NK, McDonough B, Conner L, Adler D, Weinfeld M, et al. A Comparison of Whole Genome Sequencing to Multigene Panel Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy PatientsCLINICAL PERSPECTIVE. *Circ Cardiovasc Genet* [Internet]. 2017 Oct 13 [cited 2018 Feb 20];10(5):e001768. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29030401>
  466. Romasko EJ, Devkota B, Biswas S, Jayaraman V, Rajagopalan R, Dulik MC, et al. Utility and limitations of exome sequencing in the molecular diagnosis of pediatric inherited platelet disorders. *Am J Hematol* [Internet]. 2018 Jan [cited 2018 Feb 20];93(1):8–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28960434>
  467. Johnson SR, Leo PJ, McInerney-Leo AM, Anderson LK, Marshall M, McGown I, et al. Whole-exome sequencing for mutation detection in pediatric disorders of insulin secretion: Maturity onset diabetes of the young and congenital hyperinsulinism. *Pediatr Diabetes* [Internet]. 2018 Feb 8 [cited 2018 Feb 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29417725>
  468. Nakagawa H, Fujita M. Whole Genome Sequencing Analysis for Cancer Genomics and Precision Medicine. *Cancer Sci* [Internet]. 2018 Jan 18 [cited 2018 Feb 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29345757>
  469. Low S-K, Zembutsu H, Nakamura Y. Breast cancer: The translation of big genomic data

- to cancer precision medicine. *Cancer Sci* [Internet]. 2017 Dec 30 [cited 2018 Feb 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29215763>
470. Weinshilboum RM, Wang L. Pharmacogenomics: Precision Medicine and Drug Response. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2017 Nov [cited 2018 Feb 20];92(11):1711–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29101939>
  471. Drury S, Williams H, Trump N, Boustred C, Lench N, Scott RH, et al. Exome sequencing for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic abnormalities. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Feb 20];35(10):1010–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26275891>
  472. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Oct 17 [cited 2018 Feb 20];369(16):1502–11. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1306555>
  473. Cukier HN, Dueker ND, Slifer SH, Lee JM, Whitehead PL, Lalanne E, et al. Exome sequencing of extended families with autism reveals genes shared across neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Mol Autism* [Internet]. 2014 Jan 10 [cited 2018 Feb 20];5(1):1. Available from: <http://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-2392-5-1>
  474. American College of Medical Genetics and. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genet Med* [Internet]. 2012 Aug 3 [cited 2018 Feb 20];14(8):759–61. Available from: <http://www.nature.com/articles/gim201274>
  475. Vora NL, Powell B, Brandt A, Strande N, Hardisty E, Gilmore K, et al. Prenatal Exome Sequencing in Anomalous Fetuses: New Opportunities and Challenges. [cited 2018 Feb 20]; Available from: [http://www.nature.com/authors/editorial\\_policies/license.html#terms](http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms)
  476. Hillman SC, Williams D, Carss KJ, McMullan DJ, Hurles ME, Kilby MD. Prenatal exome sequencing for fetuses with structural abnormalities: the next step. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Feb 20];45(1):4–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.14653>
  477. Alamillo CL, Powis Z, Farwell K, Shahmirzadi L, Weltmer EC, Turocy J, et al. Exome sequencing positively identified relevant alterations in more than half of cases with an indication of prenatal ultrasound anomalies. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Nov [cited 2018 Feb 20];35(11):1073–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.4648>
  478. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, et al. ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. [cited 2018 Feb 20]; Available from: [http://www.acmg.net/docs/ACMG\\_Releases\\_Highly-Anticipated\\_Recommendations\\_on\\_Incidental\\_Findings\\_in\\_Clinical\\_Exome\\_and\\_Genome\\_Sequencing.pdf](http://www.acmg.net/docs/ACMG_Releases_Highly-Anticipated_Recommendations_on_Incidental_Findings_in_Clinical_Exome_and_Genome_Sequencing.pdf)
  479. Appelbaum PS, Waldman CR, Fyer A, Klitzman R, Parens E, Martinez J, et al. Informed consent for return of incidental findings in genomic research. *Genet Med* [Internet]. 2014 May 24 [cited 2018 Feb 20];16(5):367–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24158054>

480. Knoppers BM, Deschênes M, Zawati MH, Tassé AM. Population studies: return of research results and incidental findings Policy Statement. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2013 Mar 11 [cited 2018 Feb 20];21(3):245–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22781095>
481. Green RC, Berg JS, Berry GT, Biesecker LG, Dimmock DP, Evans JP, et al. Exploring concordance and discordance for return of incidental findings from clinical sequencing. *Genet Med* [Internet]. 2012 Apr 15 [cited 2018 Feb 20];14(4):405–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/gim201221>
482. May T. On the Justifiability of ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *J Law, Med Ethics* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2018 Feb 20];43(1):134–42. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1111/jlme.12201>
483. Boycott K, Hartley T, Adam S, Bernier F, Chong K, Fernandez BA, et al. The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: Position Statement of the Canadian College of Medical Geneticists. *J Med Genet* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2018 Feb 20];52(7):431–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951830>
484. Best S, Wou K, Vora N, Van der Veyver IB, Wapner R, Chitty LS. Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenat Diagn* [Internet]. 2017 Jul 25 [cited 2018 Feb 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28654730>
485. Beta J, Lesmes-Heredia C, Bedetti C, Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review of the literature. *Minerva Ginecol* [Internet]. 2018 Apr [cited 2018 Feb 27];70(2):215–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29161799>
486. Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2018 Feb 27];207(2):137.e1-8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937812005844>
487. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genet Med* [Internet]. 2011 Nov [cited 2018 Feb 27];13(11):913–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005709>
488. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Jan [cited 2018 Feb 27];32(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223233>
489. Stokowski R, Wang E, White K, Batey A, Jacobsson B, Brar H, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Feb 27];35(12):1243–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26332378>
490. Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, et al. Clinical experience and



- follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism–based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2018 Feb 27];211(5):527.e1-527.e17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111587>
491. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* [Internet]. 2016 Jan 18 [cited 2018 Feb 27];6(1):e010002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781507>
  492. Nicolaides KH, Musci TJ, Struble CA, Syngelaki A, Gil MM. Assessment of Fetal Sex Chromosome Aneuploidy Using Directed Cell-Free DNA Analysis. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2013 Dec 11 [cited 2018 Feb 27];35(1):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335155>
  493. Gao Y, Stejskal D, Jiang F, Wang W. False-negative trisomy 18 non-invasive prenatal test result due to 48,XXX,+18 placental mosaicism. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2018 Oct 16];43(4):477–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.13240>
  494. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 May [cited 2018 Oct 16];45(5):530–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598039>
  495. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Feb 27 [cited 2018 Feb 27];370(9):799–808. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1311037>
  496. Gross SJ, Stosic M, McDonald-McGinn DM, Bassett AS, Norvez A, Dhamankar R, et al. Clinical experience with single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal screening for 22q11.2 deletion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2018 Feb 27];47(2):177–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26396068>
  497. Martin K, Iyengar S, Kalyan A, Lan C, Simon AL, Stosic M, et al. Clinical experience with a single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal test for five clinically significant microdeletions. *Clin Genet* [Internet]. 2018 Feb [cited 2018 Feb 27];93(2):293–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28696552>
  498. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Jun [cited 2018 Feb 27];47(6):698–704. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.15851>
  499. Takoudes T, Hamar B. Performance of non-invasive prenatal testing when fetal cell-free DNA is absent. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Feb 27];45(1):112. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.14715>
  500. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound*

- Obstet Gynecol [Internet]. 2017 Sep [cited 2018 Feb 27];50(3):302–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28397325>
501. Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Oròsz G, Nicolaidis KH. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Feb 27];45(1):36–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.14664>
  502. Badeau M, Lindsay C, Blais J, Nshimyumukiza L, Takwoingi Y, Langlois S, et al. Genomics-based non-invasive prenatal testing for detection of fetal chromosomal aneuploidy in pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2017 Nov 10 [cited 2018 Oct 16];11:CD011767. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29125628>
  503. Yang J, Qi Y, Hou Y, Guo F, Peng H, Wang D, et al. Performance of non-invasive prenatal testing for trisomies 21 and 18 in twin pregnancies. *Mol Cytogenet* [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 16];11:47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30166996>
  504. Fosler L, Winters P, Jones KW, Curnow KJ, Sehnert AJ, Bhatt S, et al. Aneuploidy screening by non-invasive prenatal testing in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Apr [cited 2018 Oct 16];49(4):470–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27194226>
  505. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaidis KH. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2018 Oct 16];47(6):705–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.15913>
  506. Kølvråa S, Singh R, Normand EA, Qdaisat S, van den Veyver IB, Jackson L, et al. Genome-wide copy number analysis on DNA from fetal cells isolated from the blood of pregnant women. *Prenat Diagn* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Oct 16];36(12):1127–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27761919>
  507. Lau TK, Cheung SW, Lo PSS, Pursley AN, Chan MK, Jiang F, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2018 Oct 16];43(3):254–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24339153>
  508. Bayley N. *Manual for the Bayley Scales of Infant and Toddler Development*. 2006.
  509. de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth H V, et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat* [Internet]. 2012 Jun [cited 2018 Mar 13];33(6):930–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26285306>
  510. Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, et al. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2012 Feb 21 [cited 2018 Mar 13];20(2):161–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/ejhg2011174>



511. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2020 Sep 15];22(2):245–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31690835/>
512. Borrell A, Grande M, Pauta M, Rodriguez-Reventa L, Figueras F. Chromosomal Microarray Analysis in Fetuses with Growth Restriction and Normal Karyotype: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2017 Sep 9 [cited 2017 Dec 19]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28889126>
513. Zhu H, Lin S, Huang L, He Z, Huang X, Zhou Y, et al. Application of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis of fetal growth restriction. *Prenat Diagn* [Internet]. 2016 Jul [cited 2017 Dec 19];36(7):686–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.4844>
514. Salomon LJ, Pizzi C, Gasparrini A, Bernard J-P, Ville Y. Prediction of the date of delivery based on first trimester ultrasound measurements: an independent method from estimated date of conception. *J Matern Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2010 Jan 11 [cited 2018 Mar 13];23(1):1–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767050903078672>
515. Dakwar Shaheen J, HersHKovitz R, Mastrolia SA, Charach R, Eshel R, Tirosh D, et al. Estimation of fetal weight using Hadlock’s formulas: Is head circumference an essential parameter? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019 Dec 1;243:87–92.
516. Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, O’Donoghue K, et al. Definition and management of fetal growth restriction: a survey of contemporary attitudes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2018 Mar 20];174:41–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211513005988>
517. Lawn JE, Blencowe H, Pattinson R, Cousens S, Kumar R, Ibiebele I, et al. Stillbirths: Where? When? Why? How to make the data count? *Lancet* (London, England) [Internet]. 2011 Apr 23 [cited 2018 Mar 20];377(9775):1448–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610621873>
518. Unterscheider J, O’Donoghue K, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, et al. Fetal growth restriction and the risk of perinatal mortality—case studies from the multicentre PORTO study. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2014 Dec 11 [cited 2018 Mar 20];14(1):63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24517273>
519. Demirci O, Selçuk S, Kumru P, Asoğlu MR, Mahmutoğlu D, Boza B, et al. Maternal and fetal risk factors affecting perinatal mortality in early and late fetal growth restriction. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Mar 20];54(6):700–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700988>
520. Ders RSJ, Sherrod C, Gosden CM, Nicolaidis KH. Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1993 Feb [cited 2018 Apr 3];168(2):547–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8438926>

521. Snijders RJ, Sherrod C, Gosden CM, Nicolaides KH. Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1993 Feb [cited 2018 Apr 3];168(2):547–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8438926>
522. Gabbay-Benziv R, Aviram A, Bardin R, Ashwal E, Melamed N, Hirsch L, et al. Prediction of Small for Gestational Age: Accuracy of Different Sonographic Fetal Weight Estimation Formulas. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 3];40(3):205–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26942906>
523. Barel O, Maymon R, Vaknin Z, Tovbin J, Smorgick N. Sonographic fetal weight estimation - is there more to it than just fetal measurements? *Prenat Diagn* [Internet]. 2014 Jan [cited 2018 Apr 3];34(1):50–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122854>
524. Dall&#39;A, Lees C. Early Second-trimester Fetal Growth Restriction and Adverse Perinatal Outcomes. *Obstet &* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2018 May 15];131(4):739–40. Available from: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=29578967>
525. Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, Papageorgiou A, Baschat AA, Baker PN, et al. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Sep [cited 2018 May 29];48(3):333–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26909664>
526. Borrell A, Grande M, Meler E, Sabrià J, Mazarico E, Muñoz A, et al. Genomic Microarray in Fetuses with Early Growth Restriction: A Multicenter Study. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 3];42(3):174–80. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/452217>
527. Kulikowski LD, Bellucco FTS, Nogueira SI, Christofolini DM, Smith M de AC, de Mello CB, et al. Pure duplication 1q41-qter: further delineation of trisomy 1q syndromes. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2008 Oct 15 [cited 2018 Apr 3];146A(20):2663–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.32510>
528. Park Y, Park MS, Sung DH, Sohn JY, Ki C-S, Kim D-H. Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Possibly Related With COL6A1 p.Gly302Arg Variant. *Ann Rehabil Med* [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Jun 5];38(2):292–6. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5535/arm.2014.38.2.292>
529. Paco S, Casserras T, Rodríguez MA, Jou C, Puigdelloses M, Ortez CI, et al. Transcriptome Analysis of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts Reveals a Disease Extracellular Matrix Signature and Key Molecular Regulators. *Artero R, editor. PLoS One* [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2018 Jun 5];10(12):e0145107. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145107>
530. Baker NL, Mö Rgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, et al. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. [cited 2020 May 23]; Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/14/2/279/634448>
531. Deconinck N, Richard P, Allamand V, Behin A, Lafôret P, Ferreiro A, et al. Bethlem myopathy: Long-term follow-up identifies COL6 mutations predicting severe clinical evolution. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Dec 1;86(12):1337–46.

532. Peat RA, Baker NL, Jones KJ, North KN, Lamandé SR. Variable penetrance of COL6A1 null mutations: Implications for prenatal diagnosis and genetic counselling in Ullrich congenital muscular dystrophy families. *Neuromuscul Disord*. 2007 Jul;17(7):547–57.
533. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, et al. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Jul 11 [cited 2018 Apr 3];38(7):794–800. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng1809>
534. Hannah-Shmouni F, Stratakis CA. A Gene-Based Classification of Primary Adrenocortical Hyperplasias [Internet]. Vol. 52, *Hormone and Metabolic Research*. Georg Thieme Verlag; 2020 [cited 2020 Jun 20]. p. 133–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32215884/>
535. Carney JA, Gaillard RC, Bertherat J, Stratakis CA. Familial micronodular adrenocortical disease, cushing syndrome, and mutations of the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A). *Am J Surg Pathol*. 2010 Apr;34(4):547–55.
536. Boikos SA, Horvath A, Heyerdahl S, Stein E, Robinson-White A, Bossis I, et al. Phosphodiesterase 11A expression in the adrenal cortex, primary pigmented nodular adrenocortical disease, and other corticotropin-independent lesions. *Horm Metab Res*. 2008 May;40(5):347–53.
537. Pilarzyk K, Klett J, Pena EA, Porcher L, Smith AJ, Kelly MP. Loss of Function of Phosphodiesterase 11A4 Shows that Recent and Remote Long-Term Memories Can Be Uncoupled. *Curr Biol* [Internet]. 2019 Jul 22 [cited 2020 Jun 20];29(14):2307–2321.e5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31303492>
538. Hegde S, Capell WR, Ibrahim BA, Klett J, Patel NS, Sougiannis AT, et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A), enriched in ventral hippocampus neurons, is required for consolidation of social but not nonsocial memories in mice. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2020 Jun 20];41(12):2920–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27339393/>
539. Kelly MP, Logue SF, Brennan J, Day JP, Lakkaraju S, Jiang L, et al. Phosphodiesterase 11A in brain is enriched in ventral hippocampus and deletion causes psychiatric disease-related phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 May 4 [cited 2020 Jun 20];107(18):8457–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404172>
540. Cariboni A, Pimpinelli F, Colamarino S, Zaninetti R, Piccolella M, Rumio C, et al. The product of X-linked Kallmann’s syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2004 Nov 15 [cited 2018 Apr 3];13(22):2781–91. Available from: <http://academic.oup.com/hmg/article/13/22/2781/610271/The-product-of-Xlinked-Kallmanns-syndrome-gene>
541. Massin N, Pêcheux C, Eloit C, Bensimon JL, Galey J, Kuttenn F, et al. X chromosome-linked Kallmann syndrome: Clinical heterogeneity in three siblings carrying an intragenic deletion of the KAL-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 May 1;88(5):2003–8.
542. Hardelin JP, Dodé C. The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8,

- PROKR2, PROK2, et al. In: Sexual Development. Sex Dev; 2008. p. 181–93.
543. Colige A, Nuytinck L, Hausser I, van Essen AJ, Thiry M, Herens C, et al. Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2018 Jun 5];123(4):656–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15309702>
544. Mayatepek E, Zelezny R, Lehmann WD, Hammond JW, Hoffmann GF. Defects in the synthesis of cysteinyl leukotrienes: a new group of inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* [Internet]. 2000 Jun [cited 2018 Jun 5];23(4):404–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10896305>
545. Laurin N, Brown JP, Lemainque A, Duchesne A, Huot D, Lacourcière Y, et al. Paget disease of bone: mapping of two loci at 5q35-qter and 5q31. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2001 Sep [cited 2018 Jun 5];69(3):528–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707611641>
546. Haack TB, Ignatius E, Calvo-Garrido J, Iuso A, Isohanni P, Maffezzini C, et al. Absence of the Autophagy Adaptor SQSTM1/p62 Causes Childhood-Onset Neurodegeneration with Ataxia, Dystonia, and Gaze Palsy. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2018 Jun 5];99(3):735–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929716302300>
547. Rauch A, Beese M, Mayatepek E, Dörr HG, Wenzel D, Reis A, et al. A novel 5q35.3 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Med Genet* [Internet]. 2003 Aug 15 [cited 2020 Jun 20];121 A(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12900893/>
548. Tejedor F, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, et al. minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* [Internet]. 1995 Feb [cited 2018 Oct 11];14(2):287–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7857639>
549. Galceran J, de Graaf K, Tejedor FJ, Becker W. The MNB/DYRK1A protein kinase: genetic and biochemical properties. *J Neural Transm Suppl* [Internet]. 2003 [cited 2018 Oct 11];(67):139–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068246>
550. van Bon BWM, Hoischen A, Hehir-Kwa J, de Brouwer APM, Ruivenkamp C, Gijsbers ACJ, et al. Intragenic deletion in DYRK1A leads to mental retardation and primary microcephaly. *Clin Genet* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Oct 11];79(3):296–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.2010.01544.x>
551. Courcet J-B, Faivre L, Malzac P, Masurel-Paulet A, Lopez E, Callier P, et al. The DYRK1A gene is a cause of syndromic intellectual disability with severe microcephaly and epilepsy. *J Med Genet* [Internet]. 2012 Dec [cited 2018 Oct 11];49(12):731–6. Available from: <http://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2012-101251>
552. Møller RS, Kübart S, Hoeltzenbein M, Heye B, Vogel I, Hansen CP, et al. Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2008 May [cited 2018 Oct 11];82(5):1165–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929708002103>
553. Alfirovic Z, Mujezinovic F, Sundberg K. Amniocentesis and chorionic villus sampling for

- prenatal diagnosis. In: Alfirevic Z, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2003 [cited 2018 Sep 25]. p. CD003252. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917956>
554. Wilson RD, Langlois S, Johnson J-A, SOGC GENETICS COMMITTEE RD, CCMG PRENATAL DIAGNOSIS COMMITTEE V, Audibert F, et al. Mid-trimester amniocentesis fetal loss rate. *J Obstet Gynaecol Can* [Internet]. 2007 Jul [cited 2018 Sep 25];29(7):586–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1701216316325014>
  555. Tabor A, Vestergaard CHF, Lidegaard Ø. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2018 Sep 25];34(1):19–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19504504>
  556. Bakker M, Birnie E, Robles de Medina P, Sollie KM, Pajkrt E, Bilardo CM. Total pregnancy loss after chorionic villus sampling and amniocentesis: a cohort study. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 May [cited 2018 Sep 25];49(5):599–606. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27255564>
  557. Magalhães ESDS, Méio MDBB, Moreira MEL. Hormonal Biomarkers for Evaluating the Impact of Fetal Growth Restriction on the Development of Chronic Adult Disease. Vol. 41, *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. Georg Thieme Verlag; 2019. p. 256–63.
  558. Crispi F, Miranda J, Gratacós E. Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease. Vol. 218, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2018. p. S869–79.
  559. Crispi F, Crovetto F, Gratacos E. Intrauterine growth restriction and later cardiovascular function. *Early Hum Dev*. 2018 Nov 1;126:23–7.
  560. Alsaied T, Omar K, James JF, Hinton RB, Crombleholme TM, Habli M. Fetal origins of adult cardiac disease: A novel approach to prevent fetal growth restriction induced cardiac dysfunction using insulin like growth factor. In: *Pediatric Research*. Nature Publishing Group; 2017. p. 919–25.
  561. de Wit MC, Srebniak MI, Joosten M, Govaerts LCP, Kornelisse RF, Papatsonis DNM, et al. Prenatal and postnatal findings in small-for-gestational-age fetuses without structural ultrasound anomalies at 18-24 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Mar [cited 2019 Nov 26];49(3):342–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.15949>
  562. Lees CC, Marlow N, Van Wassenaer-Leemhuis A, Arabin B, Bilardo CM, Brezinka C, et al. 2 year neurodevelopmental and intermediate perinatal outcomes in infants with very preterm fetal growth restriction (TRUFFLE): A randomised trial. *Lancet*. 2015;
  563. Malhotra A, Allison BJ, Castillo-Melendez M, Jenkin G, Polglase GR, Miller SL. Neonatal morbidities of fetal growth restriction: Pathophysiology and impact. Vol. 10, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
  564. Sehgal A, Crispi F, Skilton MR, De Boode WP. Clinician performed ultrasound in fetal growth restriction: Fetal, neonatal and pediatric aspects. *J Perinatol*. 2017 Dec

1;37(12):1251–8.

565. Sacchi C, Marino C, Nosarti C, Vieno A, Visentin S, Simonelli A. Association of Intrauterine Growth Restriction and Small for Gestational Age Status with Childhood Cognitive Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 20]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32453414/>
566. Pergament E, Alamillo C, Sak K, Fiddler M. Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat Diagn*. 2011 Mar;31(3):307–10.
567. Axt-Fliedner R, Hartge D, Chiriack A, Krapp M, Berg C, Geipel A, et al. Long-term outcome for children born after a first-trimester measurement of increased nuchal translucency with a normal karyotype: A retrospective analysis. *Ultraschall der Medizin*. 2009;30(6):558–63.
568. Carvalho JS. The fetal heart or the lymphatic system or ...? The quest for the etiology of increased nuchal translucency. Vol. 25, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005. p. 215–20.
569. Bekker MN, Haak MC, Rekoert-Hollander M, Twisk J, Van Vugt JMG. Increased nuchal translucency and distended jugular lymphatic sacs on first-trimester ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005 Mar;25(3):239–45.
570. Bekker MN, Twisk JWR, Bartelings MM, Gittenberger-De Groot AC, Van Vugt JMG. Temporal relationship between increased nuchal translucency and enlarged jugular lymphatic sac. *Obstet Gynecol*. 2006 Sep;108(4):846–53.
571. Fayyaz H, Rafi J. TORCH screening in polyhydramnios: An observational study. Vol. 25, *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. *J Matern Fetal Neonatal Med*; 2012. p. 1069–72.
572. O G, FN H, Z N, L B. Maternal Parvovirus B19 Infection Causing First-Trimester Increased Nuchal Translucency and Fetal Hydrops. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2019;2019.
573. Carraca T, Matias A, Brandão O, Montenegro N. Early signs of cardiac failure: A clue for parvovirus infection screening in the first trimester? *Fetal Diagn Ther*. 2011 Sep;30(2):150–2.
574. Leung TY, Vogel I, Lau TK, Chong W, Hyett JA, Petersen OB, et al. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011 Sep;38(3):314–9.
575. Maya I, Yacobson S, Kahana S, Yeshaya J, Tenne T, Agmon-Fishman I, et al. Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal microarray analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Sep [cited 2019 Jan 29];50(3):332–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.17421>
576. Cuckle H. Re: Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal microarray analysis. I. Maya, S. Yacobson, S. Kahana, J. Yeshaya, T. Tenne, I. Agmon-Fishman, L. Cohen-Vig, M. Shohat, L. Basel-Vanagaite and R. Sharony. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2019 Jan 29];50(3):293–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.18814>
577. Lee K, Williams B, Roza K, Ferguson H, David K, Eddleman K, et al. *PTPN11* analysis for



- the prenatal diagnosis of Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Clin Genet* [Internet]. 2009 Feb [cited 2018 Jul 31];75(2):190–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759865>
578. Jorge AAL, Malaquias AC, Arnhold IJP, Mendonca BB. Noonan Syndrome and Related Disorders: A Review of Clinical Features and Mutations in Genes of the RAS/MAPK Pathway. *Horm Res Paediatr* [Internet]. 2009 [cited 2018 Jul 31];71(4):185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258709>
  579. Croonen EA, Nillesen WM, Stuurman KE, Oudesluijs G, van de Laar IMBM, Martens L, et al. Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2013 Sep 16 [cited 2019 Jan 17];21(9):936–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321623>
  580. Matyášová M, Dobšáková Z, Hiemerová M, Kadlecová J, Nikulenkov Grochová D, Popelínská E, et al. Prenatal diagnosis of noonan syndrome in fetuses with increased nuchal translucency and a normal karyotype. *Ces Gynekol*. 2019;84(3):195–200.
  581. Dharmadhikari A V, Gambin T, Szafranski P, Cao W, Probst FJ, Jin W, et al. Molecular and clinical analyses of 16q24.1 duplications involving FOXF1 identify an evolutionarily unstable large minisatellite. *BMC Med Genet* [Internet]. 2014 Dec 4 [cited 2018 Nov 6];15(1):128. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25472632>
  582. Dharmadhikari A V., Szafranski P, V. Kalinichenko V, Stankiewicz P. Genomic and Epigenetic Complexity of the FOXF1 Locus in 16q24.1: Implications for Development and Disease. *Curr Genomics* [Internet]. 2015 Mar 18 [cited 2020 Jun 20];16(2):107–16. Available from: [/pmc/articles/PMC4467301/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4467301/?report=abstract)
  583. Handrigan GR, Chitayat D, Lionel AC, Pinsk M, Vaags AK, Marshall CR, et al. Deletions in 16q24.2 are associated with autism spectrum disorder, intellectual disability and congenital renal malformation. *J Med Genet* [Internet]. 2013 [cited 2020 Jun 20];50(3):163–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23335808/>
  584. Quéméner-Redon S, Bénech C, Audebert-Bellanger S, Friocourt G, Planes M, Parent P, et al. A small de novo 16q24.1 duplication in a woman with severe clinical features. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2013 Apr [cited 2020 Jun 20];56(4):211–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23333879/>
  585. Erickson RP, Nelson CC, Witte M, Glover TW, Dagenais SL, Caulder MS, et al. Clinical heterogeneity in lymphoedema-distichiasis with FOXC2 truncating mutations. *J Med Genet* [Internet]. 2001 [cited 2020 Jun 20];38(11):761–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11694548/>
  586. Bahau M, Houdayer C, Tredano M, Soupre V, Couderc R, Vazquez MP. FOXC2 truncating mutation in distichiasis, lymphedema, and cleft palate [Internet]. Vol. 62, *Clinical Genetics*. *Clin Genet*; 2002 [cited 2020 Jun 20]. p. 470–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12485195/>
  587. Brice G, Mansour S, Bell R, Collin JRO, Child AH, Brady AF, et al. Analysis of the phenotypic abnormalities in lymphoedema-distichiasis syndrome in 74 patients with FOXC2 mutations or linkage to 16q24. *J Med Genet* [Internet]. 2002 [cited 2020 Jun 20];39(7):478–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12114478/>

588. Nickolls AR, Bönemann CG. The roles of dystroglycan in the nervous system: insights from animal models of muscular dystrophy. *Dis Model Mech* [Internet]. 2018 Dec 19 [cited 2020 Jun 20];11(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30578246>
589. Belaya K, Rodríguez Cruz PM, Liu WW, Maxwell S, McGowan S, Farrugia ME, et al. Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain*. 2015 Sep 1;138(9):2493–504.
590. Rodríguez Cruz PM, Belaya K, Basiri K, Sedghi M, Farrugia ME, Holton JL, et al. Clinical features of the myasthenic syndrome arising from mutations in GMPPB. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2016 Jan 8 [cited 2020 Jun 20];87(8):802–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27147698/>
591. Erazo-Torricelli R. [Updates in muscular dystrophies]. *Rev Neurol* [Internet]. 2004 [cited 2020 Jun 20];39(9):860–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543503>
592. Fryns JP, Kleczkowska A, Buttiens M, Marien P, van den Berghe H. Distal 11q monosomy. The typical 11q monosomy syndrome is due to deletion of subband 11q24.1. *Clin Genet* [Internet]. 1986 Oct [cited 2018 Nov 6];30(4):255–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3791674>
593. Yamamoto T, Shimada S, Shimojima K, Sangu N, Ninomiya S, Kubota M. Leukoencephalopathy associated with 11q24 deletion involving the gene encoding hepatic and glial cell adhesion molecule in two patients. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2018 Nov 6];58(9):492–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1769721215001160?via%3Dihub>
594. Tassano E, Janis S, Canepa A, Zanotto E, Torello C, Gimelli G, et al. Interstitial 11q24 deletion: a new case and review of the literature. *J Appl Genet* [Internet]. 2016 Aug 28 [cited 2018 Nov 6];57(3):357–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020790>
595. So J, Stockley T, Stavropoulos DJ. Periventricular nodular heterotopia and transverse limb reduction defect in a woman with interstitial 11q24 deletion in the Jacobsen syndrome region. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2014 Feb [cited 2018 Nov 6];164(2):511–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24311471>
596. Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet* [Internet]. 1997 Jun 1 [cited 2018 Nov 6];16(2):154–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9171826>
597. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* [Internet]. 2005 Jul 14 [cited 2018 Nov 6];436(7048):214–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951802>
598. Marlet L, Alix E, Till M, Raskin-Champion F, Attia J, Boggio D, et al. Prenatal Diagnosis of Trisomy 2p due to Terminal 2p Duplication including Interstitial Telomeric Sequences. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2017 [cited 2018 Nov 6];153(3):117–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29268249>



599. Chen CP, Chen YY, Chern SR, Wu PS, Su JW, Chen YT, et al. Prenatal diagnosis of mosaic trisomy 2 associated with abnormal maternal serum screening, oligohydramnios, intrauterine growth restriction, ventricular septal defect, preaxial polydactyly, and facial dysmorphism. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2020 Aug 1];52(3):395–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24075380/>
600. Tuğ E, Karcaaltincaba D, Yirmibeş Karaoğuz M, Saat H, Özek A. Confirmation of the prenatal mosaic trisomy 2 via fetal USG and cytogenetic analyses. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2017 Jul 3 [cited 2020 Aug 1];30(13):1579–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27431726/>
601. Mihci E, Velagaleti GVN, Ensenauer R, Babovic-Vuksanovic D. The phenotypic spectrum of trisomy 2: Report of two new cases. *Clin Dysmorphol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2020 Aug 1];18(4):201–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19474704/>
602. Chen CP, Huang JP, Chern SR, Chen SW, Lai ST, Wu PS, et al. Prenatal diagnosis of mosaicism for trisomy 2 in a single colony at amniocentesis in a pregnancy with a favorable outcome. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2020 Aug 1];56(4):569–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28805623/>
603. Crepel A, Steyaert J, De la Marche W, De Wolf V, Fryns J-P, Noens I, et al. Narrowing the critical deletion region for autism spectrum disorders on 16p11.2. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Nov 6];156(2):243–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21302354>
604. Bijlsma EK, Gijsbers ACJ, Schuurs-Hoeijmakers JHM, van Haeringen A, Franssen van de Putte DE, Anderlid B-M, et al. Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: Deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2009 Mar [cited 2018 Nov 6];52(2–3):77–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306953>
605. Barnby G, Abbott A, Sykes N, Morris A, Weeks DE, Mott R, et al. Candidate-Gene Screening and Association Analysis at the Autism-Susceptibility Locus on Chromosome 16p: Evidence of Association at GRIN2A and ABAT. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2005 Jun [cited 2018 Nov 6];76(6):950–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15830322>
606. Battaglia A, Novelli A, Bernardini L, Iglizzi R, Parrini B. Further characterization of the new microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2009 Jun [cited 2018 Nov 6];149A(6):1200–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19449418>
607. Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* [Internet]. 2003 Jul 6 [cited 2018 Nov 13];424(6947):443–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12845333>
608. Faivre L, Morichon-Delvallez N, Viot G, Nancy F, Loison S, Mandelbrot L, et al. Prenatal diagnosis of an 8p23.1 deletion in a fetus with a diaphragmatic hernia and review of the literature. *Prenat Diagn* [Internet]. 1998 Oct [cited 2018 Nov 13];18(10):1055–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826897>
609. Shimokawa O, Miyake N, Yoshimura T, Sosonkina N, Harada N, Mizuguchi T, et al.

- Molecular characterization of del(8)(p23.1p23.1) in a case of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2018 Nov 13];136A(1):49–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937941>
610. Borys D, Taxy JB. Congenital Diaphragmatic Hernia and Chromosomal Anomalies: Autopsy Study. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2004 Feb 4 [cited 2018 Nov 13];7(1):35–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255033>
  611. Sotiriadis A, Papatheodorou S, Eleftheriades M, Makrydimas G. Nuchal translucency and major congenital heart defects in fetuses with normal karyotype: A meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Oct;42(4):383–9.
  612. Alanen J, Leskinen M, Sairanen M, Korpimäki T, Kouru H, Gissler M, et al. Fetal nuchal translucency in severe congenital heart defects: experiences in Northern Finland. *J Matern Neonatal Med*. 2019 May 3;32(9):1454–60.
  613. Makrydimas G, Sotiriadis A, Huggon IC, Simpson J, Sharland G, Carvalho JS, et al. Nuchal translucency and fetal cardiac defects: A pooled analysis of major fetal echocardiography centers. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Jan;192(1):89–95.
  614. Müller MA, Clur SA, Timmerman E, Bilardo CM. Nuchal translucency measurement and congenital heart defects: Modest association in low-risk pregnancies. *Prenat Diagn*. 2007 Feb;27(2):164–9.
  615. Minnella GP, Crupano FM, Syngelaki A, Zidere V, Akolekar R, Nicolaides KH. Diagnosis of major heart defects by routine first-trimester ultrasound examination: association with increased nuchal translucency, tricuspid regurgitation and abnormal flow in ductus venosus. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020 May;55(5):637–44.
  616. Myers A, Bernstein JA, Brennan ML, Curry C, Esplin ED, Fisher J, Homeyer M, Manning MA, Muller EA, Niemi AK, Seaver LH, Hintz SR HL. Perinatal features of the RASopathies: Noonan syndrome, cardiofaciocutaneous syndrome and Costello syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014;Nov;164A((11):):2814-21.
  617. Zhen L, Zhang Y LD. Prenatal DNA diagnosis of Noonan syndrome in a fetus with increased nuchal translucency using next-generation sequencing. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol*. 2016;Jun;(201):):229-30.
  618. Ali MM, Chasen ST, Norton ME. Testing for Noonan syndrome after increased nuchal translucency. *Prenat Diagn* [Internet]. 2017 Aug [cited 2018 Nov 13];37(8):750–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28569377>
  619. Bilardo CM, Müller MA, Pajkrt E, Clur SA, Van Zalen MM, Bijlsma EK. Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: Time for parental reassurance. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007 Jul;30(1):11–8.
  620. Vigneswaran T V., Homfray T, Allan LD, Simpson JM, Zidere V. Persistently elevated nuchal translucency and the fetal heart. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2017 Jul 3;1–5.
  621. Poon LC, Karagiannis G, Stratieva V, Syngelaki A NK. First-trimester prediction of macrosomia. *Fetal Diagn Ther*. 2011;29((2):):139-47.
  622. Timmerman E, Pajkrt E, Snijders RJ BC. High macrosomia rate in healthy fetuses after

- enlarged nuchal translucency. *Prenat Diagn.* 2014;Feb;(34(2):):103-8.
623. Weissmann-Brenner A, Weisz B, Lerner-Geva L, Gindes L AR. Increased nuchal translucency is associated with large for gestational age neonates in singleton pregnancies. *J Perinat Med.* 2011;May;(39(3):):305–9.
624. Koyanagi A, Zhang J, Dagvadorj A, Hirayama F, Shibuya K, Souza JP, et al. Macrosomia in 23 developing countries: an analysis of a multicountry, facility-based, cross-sectional survey. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2013 Feb 9 [cited 2018 Dec 11];381(9865):476–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673612616055>
625. Zhang X, Decker A, Platt RW, Kramer MS. How big is too big? The perinatal consequences of fetal macrosomia. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 May [cited 2018 Dec 11];198(5):517.e1-6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937807022703>
626. Ye J, Zhang L, Chen Y, Fang F, Luo Z, Zhang J. Searching for the definition of macrosomia through an outcome-based approach. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2018 Dec 11];9(6):e100192. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24941024>
627. Boulet SL, Alexander GR, Salihu HM, Kirby RS, Carlo WA. Fetal growth risk curves: defining levels of fetal growth restriction by neonatal death risk. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2018 Dec 11];195(6):1571–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293780600456X>
628. Surkan PJ, Hsieh C-C, Johansson ALV, Dickman PW, Cnattingius S. Reasons for Increasing Trends in Large for Gestational Age Births. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2018 Dec 11];104(4):720–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15458892>
629. Usta A, usta CS, Yildiz A, Ozcaglayan R, Dalkiran E Sen, Savkli A, et al. Frequency of fetal macrosomia and the associated risk factors in pregnancies without gestational diabetes mellitus. *Pan Afr Med J* [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 11];26:62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28451039>
630. Schwartz R, Teramo KA. What is the significance of macrosomia? *Diabetes Care* [Internet]. 1999 Jul [cited 2018 Dec 11];22(7):1201–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388990>
631. Li G, Kong L, Li Z, Zhang L, Fan L, Zou L, et al. Prevalence of Macrosomia and Its Risk Factors in China: A Multicentre Survey Based on Birth Data Involving 101 723 Singleton Term Infants. *Paediatr Perinat Epidemiol* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2018 Dec 11];28(4):345–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ppe.12133>
632. Deter RL, Hadlock FP. Use of ultrasound in the detection of macrosomia: a review. *J Clin Ultrasound* [Internet]. 1985 Oct [cited 2018 Dec 11];13(8):519–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934213>
633. Coomarasamy A, Connock M, Thornton J, Khan KS. Accuracy of ultrasound biometry in the prediction of macrosomia: a systematic quantitative review. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2018 Dec 11];112(11):1461–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225563>

634. Melamed N, Yogev Y, Meizner I, Mashiach R, Pardo J, Ben-Haroush A. Prediction of fetal macrosomia: effect of sonographic fetal weight-estimation model and threshold used. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2018 Dec 11];38(1):74–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21229567>
635. O'Reilly-Green C, Divon M. Sonographic and clinical methods in the diagnosis of macrosomia. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 2000 Jun [cited 2018 Dec 11];43(2):309–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863628>
636. Group THSCR. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 May 8 [cited 2018 Dec 11];358(19):1991–2002. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0707943>
637. Jovanovic-Peterson L, Peterson CM, Reed GF, Metzger BE, Mills JL, Knopp RH, et al. Maternal postprandial glucose levels and infant birth weight: the Diabetes in Early Pregnancy Study. The National Institute of Child Health and Human Development--Diabetes in Early Pregnancy Study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1991 Jan [cited 2018 Dec 11];164(1 Pt 1):103–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986596>
638. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. Practice Bulletin No. 173. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Nov [cited 2018 Dec 11];128(5):e195–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27776071>
639. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. *Pediatrics* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2018 Dec 11];115(3):e290–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741354>
640. Weiner Z, Ben-Shlomo I, Beck-Fruchter R, Goldberg Y, Shalev E. Clinical and ultrasonographic weight estimation in large for gestational age fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2002 Oct 10 [cited 2018 Dec 11];105(1):20–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270559>
641. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* [Internet]. 2009 Sep 16 [cited 2019 Jan 8];41(9):1022–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684605>
642. Hoban R, Roberts AE, Demmer L, Jethva R, Shephard B. Noonan syndrome due to a SHOC2 mutation presenting with fetal distress and fatal hypertrophic cardiomyopathy in a premature infant. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 Jan 8];158A(6):1411–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528146>
643. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2019 Jan 8];39(8):1007–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603483>
644. El Bouchikhi I, Belhassan K, Moufid FZ, Iraqui Houssaini M, Bouguenouch L, Samri I, et al. Noonan syndrome-causing genes: Molecular update and an assessment of the mutation rate. *Int J Pediatr Adolesc Med*. 2016 Dec;3(4):133–42.

645. Ezquieta B, Santomé JL, Carcavilla A, Guillén-Navarro E, Pérez-Aytés A, Sánchez Del Pozo J, et al. Alteraciones de los genes de la vía RAS-MAPK en 200 pacientes españoles con síndrome de Noonan y otros síndromes neurocardiofaciocutáneos. Genotipo y cardiopatía. *Rev Esp Cardiol*. 2012 May;65(5):447–55.
646. Čizmarová M, Hlinková K, Bertok S, Kotnik P, Duba HC, Bertalan R, et al. New Mutations Associated with Rasopathies in a Central European Population and Genotype-Phenotype Correlations. *Ann Hum Genet* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2020 Jun 1];80(1):50–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607044>
647. Chen H, Li X, Liu X, Wang J, Zhang Z, Wu J, et al. Clinical and mutation profile of pediatric patients with RASopathy-associated hypertrophic cardiomyopathy: results from a Chinese cohort. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2019 Feb 7 [cited 2020 Jun 1];14(1):29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30732632>
648. Smpokou P, Zand DJ, Rosenbaum KN, Summar ML. Malignancy in Noonan syndrome and related disorders. Vol. 88, *Clinical Genetics*. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 516–22.
649. Masliah-Planchon J, Garinet S, Pasmant E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: MiRNAs in action. *Oncotarget*. 2016;7(25):38892–907.
650. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*. 2020 Jan 13;9(1):198.
651. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: Rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. Vol. 2, *Oncotarget*. Impact Journals LLC; 2011. p. 135–64.
652. Steelman LS, Abrams SL, Shelton JG, Chappell WH, Bäsecke J, Stivala F, et al. Dominant roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell cycle progression, prevention of apoptosis and sensitivity to chemotherapeutic drugs. *Cell Cycle*. 2010 Apr 15;9(8):1629–38.
653. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Vol. 1773, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. NIH Public Access; 2007. p. 1263–84.
654. Pierpont ME, Digilio MC. Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jun 1];30(5):601–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30024444>
655. Liu XH, Ding WW, Han L, Liu XR, Xiao YY, Yang J, et al. Gene mutation and clinical phenotype analysis of patients with Noonan syndrome and hypertrophic cardiomyopathy. *Zhonghua er ke za zhi = Chinese J Pediatr* [Internet]. 2017 Oct 2 [cited 2020 Jun 1];55(10):780–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29050118>
656. Karnik R, Geiger M. Cardiac Manifestations of Noonan Syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2019 May 1;16(Suppl 2):471–6.
657. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* [Internet]. 2007 Aug

- 1 [cited 2019 Jan 8];39(8):1013–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603482>
658. Ghi T, Perolo A, Banzi C, Contratti G, Valeri B, Savelli L, et al. Two-dimensional ultrasound is accurate in the diagnosis of fetal craniofacial malformation. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2002 Jun [cited 2018 Dec 18];19(6):543–51. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-0705.2002.00721.x>
659. Clementi M, Tenconi R, Bianchi F, Stoll C. Evaluation of prenatal diagnosis of cleft lip with or without cleft palate and cleft palate by ultrasound: experience from 20 European registries. EUROSCAN study group. *Prenat Diagn* [Internet]. 2000 Nov [cited 2018 Dec 18];20(11):870–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113886>
660. Maarse W, Pistorius LR, Van Eeten WK, Breugem CC, Kon M, Van den Boogaard MJH, et al. Prenatal ultrasound screening for orofacial clefts. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Dec 18];38(4):434–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21113916>
661. Berggren H, Hansson E, Uvemark A, Svensson H, Sladkevicius P, Becker M. Prenatal ultrasound detection of cleft lip, or cleft palate, or both, in southern Sweden, 2006–2010. *J Plast Surg Hand Surg* [Internet]. 2012 Apr 3 [cited 2018 Dec 18];46(2):69–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22471252>
662. Offerdal K, Jebens N, Syvertsen T, Blaas H-GK, Johansen OJ, Eik-Nes SH. Prenatal ultrasound detection of facial clefts: a prospective study of 49 314 deliveries in a non-selected population in Norway. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2018 Dec 18];31(6):639–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18381773>
663. Sohan K, Freer M, Mercer N, Soothill P, Kyle P. Prenatal Detection of Facial Clefts. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2001 [cited 2018 Dec 18];16(4):196–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399877>
664. Campbell S, Lees C, Moscoso G, Hall P. Ultrasound antenatal diagnosis of cleft palate by a new technique: the 3D ‘reverse face’ view. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2018 Dec 18];25(1):12–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15619313>
665. Schwarz K, Iolascon A, Verissimo F, Trede NS, Horsley W, Chen W, et al. Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. *Nat Genet* [Internet]. 2009 Aug 28 [cited 2018 Dec 18];41(8):936–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561605>
666. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Boschetti C, Barcellini W, Iurlo A, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II (CDAll) is caused by mutations in the *SEC23B* gene. *Hum Mutat* [Internet]. 2009 Sep [cited 2018 Dec 18];30(9):1292–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19621418>
667. Yehia L, Niazi F, Ni Y, Ngeow J, Sankunny M, Liu Z, et al. Germline Heterozygous Variants in SEC23B Are Associated with Cowden Syndrome and Enriched in Apparently Sporadic Thyroid Cancer. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2015 Nov 5 [cited 2018 Dec 18];97(5):661–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522472>



668. Remacha AF, Badell I, Pujol-Moix N, Parra J, Muñiz-Diaz E, Ginovart G, et al. Hydrops fetalis-associated congenital dyserythropoietic anemia treated with intrauterine transfusions and bone marrow transplantation. *Blood* [Internet]. 2002 Jul 1 [cited 2018 Dec 18];100(1):356–8. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2001-12-0351>
669. Braun M, Wölfl M, Wiegering V, Winkler B, Ertan K, Bald R, et al. Successful treatment of an infant with CDA type II by intrauterine transfusions and postnatal stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Dec 18];61(4):743–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.24786>
670. Fermo E, Bianchi P, Notarangelo LD, Binda S, Vercellati C, Marcello AP, et al. CDAll presenting as hydrops foetalis: molecular characterization of two cases. *Blood Cells Mol Dis* [Internet]. 2010 Jun 15 [cited 2018 Dec 18];45(1):20–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979610001075>
671. Edwards RL, Moseley K, Watanabe Y, Wong LJ, Ottina J, Yano S. Long-term neurodevelopmental effects of early detection and treatment in a 6-year-old patient with argininaemia diagnosed by newborn screening. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2009 Dec 27 [cited 2019 Jan 17];32(S1):197–200. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-009-1148-2>
672. Salomon LJ, Sotiriadis A, Wulff CB, Odibo A, Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of the literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2019 May 23 [cited 2019 Jul 23];uog.20353. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/uog.20353>
673. Senat MV, Bussi eres L, Couderc S, Roume J, Rozenberg P, Bouyer J, et al. Long-term outcome of children born after a first-trimester measurement of nuchal translucency at the 99th percentile or greater with normal karyotype: A prospective study. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(1):53.e1-53.e6.
674. Souka AP, Krampl E, Bakalis S, Heath V, Nicolaides KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2001 Jul [cited 2019 Oct 15];18(1):9–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489218>
675. Houweling AC, de Mooij YM, van der Burgt I, Yntema HG, Lachmeijer AMA, Go ATJJ. Prenatal detection of Noonan syndrome by mutation analysis of the *PTPN11* and the *KRAS* genes. *Prenat Diagn* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2019 Jan 17];30(3):n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2458>
676. Baldassarre G, Mussa A, Dotta A, Banaudi E, Forzano S, Marinosci A, et al. Prenatal features of Noonan syndrome: prevalence and prognostic value. *Prenat Diagn* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 Jan 17];31(10):949–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744363>
677. Stuurman KE, Joosten M, Van Der Burgt I, Elting M, Yntema HG, Meijers-Heijboer H, et al. Prenatal ultrasound findings of rasopathies in a cohort of 424 fetuses: Update on genetic testing in the NGS era. *J Med Genet*. 2019 Oct 1;56(10):654–61.
678. Mouthon L, Busa T, Bretelle F, Karmous-Benailly H, Missirian C, Philip N, et al. Prenatal

- diagnosis of micrognathia in 41 fetuses: Retrospective analysis of outcome and genetic etiologies. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2019 Sep 11 [cited 2019 Oct 15];ajmg.a.61359. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31509347>
679. Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, Belmont JW, Patel MS, Hummel M, et al. 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2008 Jan 10 [cited 2018 Dec 5];82(1):214–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18179902>
  680. Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O’Hare AM, Hu P, Roe BA, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2018 Dec 5];9(4):489–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699172>
  681. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular Mechanisms for Constitutional Chromosomal Rearrangements in Humans. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2000 Dec [cited 2018 Dec 5];34(1):297–329. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092830>
  682. Shaikh TH, O’Connor RJ, Pierpont ME, McGrath J, Hacker AM, Nimmakayalu M, et al. Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: Sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res*. 2007 Apr;17(4):482–91.
  683. Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. Vol. 176, *American Journal of Medical Genetics, Part A*. Wiley-Liss Inc.; 2018. p. 2070–81.
  684. Li S, Han X, Ye M, Chen S, Shen Y, Niu J, et al. Prenatal diagnosis of microdeletions or microduplications in the proximal, central, and distal regions of chromosome 22q11.2: Ultrasound findings and pregnancy outcome. *Front Genet*. 2019;10(AUG).
  685. Gothelf D, Presburger G, Levy D, Nahmani A, Burg M, Berant M, et al. Genetic, developmental, and physical factors associated with attention deficit hyperactivity disorder in patients with velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2018 Dec 5];126B(1):116–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15048660>
  686. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* [Internet]. 1997 Oct [cited 2018 Dec 5];34(10):798–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350810>
  687. Rozas MF, Benavides F, León L, Repetto GM. Association between phenotype and deletion size in 22q11.2 microdeletion syndrome: systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2019 Dec 9 [cited 2020 Jun 6];14(1):195. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-019-1170-x>
  688. Fernández L, Nevado J, Santos F, Heine-Suñer D, Martínez-Glez V, García-Miñaur S, et al. A deletion and a duplication in distal 22q11.2 deletion syndrome region. Clinical implications and review. *BMC Med Genet* [Internet]. 2009 Dec 2 [cited 2018 Dec 5];10(1):48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490635>
  689. Bittel DC, Yu S, Newkirk H, Kibiryeva N, Holt A, Butler MG, et al. Refining the 22q11.2 deletion breakpoints in DiGeorge syndrome by aCGH. *Cytogenet Genome Res*. 2009



May;124(2):113–20.

690. Mikhail FM, Burnside RD, Rush B, Ibrahim J, Godshalk R, Rutledge SL, et al. The recurrent distal 22q11.2 microdeletions are often de novo and do not represent a single clinical entity: a proposed categorization system. *Genet Med [Internet]*. 2014 Jan 13 [cited 2018 Dec 5];16(1):92–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765049>
691. Chow JS, Koning JL, Back SJ, Nguyen HT, Phelps A, Darge K. Classification of pediatric urinary tract dilation: the new language. *Pediatr Radiol [Internet]*. 2017 Aug 4 [cited 2019 Jan 22];47(9):1109–15. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00247-017-3883-0>
692. Azuma T, Seki N, Yoshikawa T, Saito T, Masuho Y, Muramatsu M. cDNA cloning, tissue expression, and chromosome mapping of human homolog of SOX18. *J Hum Genet [Internet]*. 2000 May 1 [cited 2019 Feb 12];45(3):192–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807548>
693. Pennisi DJ, James KM, Hosking B, Muscat GE, Koopman P. Structure, mapping, and expression of human SOX18. *Mamm Genome [Internet]*. 2000 Dec [cited 2019 Feb 12];11(12):1147–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130989>
694. Irrthum A, Devriendt K, Chitayat D, Matthijs G, Glade C, Steijlen PM, et al. Mutations in the Transcription Factor Gene SOX18 Underlie Recessive and Dominant Forms of Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia. *Am J Hum Genet [Internet]*. 2003 Jun [cited 2019 Jan 8];72(6):1470–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740761>
695. Moalem S, Brouillard P, Kuypers D, Legius E, Harvey E, Taylor G, et al. Hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia-renal defect associated with a truncating mutation in the SOX18 gene. *Clin Genet [Internet]*. 2015 Apr [cited 2019 Feb 12];87(4):378–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24697860>
696. Proesmans W, Legius E, Van Herck K, Van Damme B. Cutaneous telangiectasia, sparse hair and membranoproliferative glomerulonephritis. A new case of a newly recognized entity. *Pediatr Nephrol [Internet]*. 1989 Apr [cited 2019 Feb 12];3(2):162–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2484451>
697. Wünnemann F, Kokta V, Leclerc S, Thibeault M, McCuaig C, Hatami A, et al. Aortic Dilatation Associated With a De Novo Mutation in the SOX18 Gene: Expanding the Clinical Spectrum of Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia Syndrome. *Can J Cardiol [Internet]*. 2016 Jan [cited 2019 Feb 12];32(1):135.e1-135.e7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26148450>
698. Prole DL, Lima PA, Marrion N V. Mechanisms Underlying Modulation of Neuronal KCNQ2/KCNQ3 Potassium Channels by Extracellular Protons. *J Gen Physiol [Internet]*. 2003 Dec [cited 2020 Jun 24];122(6):775–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14638935/>
699. Barro-Soria R. Epilepsy-associated mutations in the voltage sensor of KCNQ3 affect voltage dependence of channel opening. *J Gen Physiol [Internet]*. 2019 Feb 1 [cited 2020 Jun 24];151(2):247–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30578330/>

700. Bornstein E, Berger S, Cheung SW, Maliszewski KT, Patel A, Pursley AN, et al. Universal Prenatal Chromosomal Microarray Analysis: Additive Value and Clinical Dilemmas in Fetuses with a Normal Karyotype. *Am J Perinatol*. 2017 Mar 1;34(4):340–8.
701. Sarnat HB. [A proposal for a molecular genetic classification of the malformations of the nervous system]. *Rev Neurol [Internet]*. [cited 2019 May 13];33(1):68–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562863>
702. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology [Internet]*. 2001 Dec 26 [cited 2019 May 13];57(12):2168–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785496>
703. Pascual Castroviejo I, Pascual Pascual SI, Via o J, Martinez V, Palencia R. [Malformations of cortical development and their clinical repercussions in a series of 144 cases]. *Rev Neurol [Internet]*. [cited 2019 May 13];37(4):327–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14533110>
704. Gezer C, Ekin A, Ozeren M, Taner CE, Ozer O, Koc A, et al. Chromosome abnormality incidence in fetuses with cerebral ventriculomegaly. *J Obstet Gynaecol (Lahore) [Internet]*. 2014 Jul 28 [cited 2019 May 13];34(5):387–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678817>
705. Duan H-L, Zhu X-Y, Zhu Y-J, Wu X, Zhao G-F, Wang W-J, et al. The application of chromosomal microarray analysis to the prenatal diagnosis of isolated mild ventriculomegaly. *Taiwan J Obstet Gynecol [Internet]*. 2019 Mar [cited 2019 May 13];58(2):251–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30910148>
706. Copel JA, Pihu G, Kleinman CS. Congenital heart disease and extracardiac anomalies: Associations and indications for fetal echocardiography. *Am J Obstet Gynecol [Internet]*. 1986 May [cited 2019 Jun 18];154(5):1121–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2939723>
707. Wang Y, Cao L, Liang D, Meng L, Wu Y, Qiao F, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in fetuses with congenital heart disease: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2018 Feb 1;218(2):244.e1-244.e17.
708. Guo H, Xun G, Peng Y, Xiang X, Xiong Z, Zhang L, et al. Disruption of Contactin 4 in two subjects with autism in Chinese population. *Gene [Internet]*. 2012 Sep 1 [cited 2019 Jun 5];505(2):201–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111912007615>
709. Oguro-Ando A, Zuko A, Kleijer KTE, Burbach JPH. A current view on contactin-4, -5, and -6: Implications in neurodevelopmental disorders. Vol. 81, *Molecular and Cellular Neuroscience*. Academic Press Inc.; 2017. p. 72–83.
710. Xu LL, Zhen L, Lou JW, Tang HS, Pan M, Han J, et al. Can cell-free DNA testing be used in pregnancies with isolated fetal omphalocele? Preliminary evidence from cytogenetic results of prenatal cases. *J Matern Neonatal Med*. 2019;
711. Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: A meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg [Internet]*. 2000 [cited 2020 Aug 4];35(8):1187–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10945692/>

712. Stark Z, Behrsin J, Burgess T, Ritchie A, Yeung A, Tan TY, et al. SNP microarray abnormalities in a cohort of 28 infants with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet Part A*. 2015 Oct 1;167(10):2319–26.
713. Zhu Q, High FA, Zhang C, Cerveira E, Russell MK, Longoni M, et al. Systematic analysis of copy number variation associated with congenital diaphragmatic hernia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 15;115(20):5247–52.
714. Siomou E, Mitsioni AG, Giapros V, Bouba I, Noutsopoulos D, Georgiou I. Copy-number variation analysis in familial nonsyndromic congenital anomalies of the kidney and urinary tract: Evidence for the causative role of a transposable element-associated genomic rearrangement. *Mol Med Rep*. 2017 Jun 1;15(6):3631–6.
715. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. Vol. 109, *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2018. p. 201–12.
716. Houweling AC, Gille JJP, Baart JA, Van Hagen JM, Lachmeijer AM. Variable phenotypic manifestation of IRF6 mutations in the Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome: Implications for genetic counseling. *Clin Dysmorphol*. 2009 Oct;18(4):225–7.
717. Ghassibe M, Revencu N, Bayet B, Gillerot Y, Vanwijck R, Verellen-Dumoulin C, et al. Gene symbol IRF6. Disease: Van der Woude syndrome and popliteal pterygium. *Hum Genet [Internet]*. 2003 Nov [cited 2020 Jan 5];113(6):558. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640121>
718. Fuchs F, Borrego P, Amouroux C, Antoine B, Ollivier M, Faure JM, et al. Prenatal imaging of genital defects: clinical spectrum and predictive factors for severe forms. *BJU Int*. 2019 Nov 1;124(5):876–82.
719. Bookstein R, Lee EY, To H, Young LJ, Sery TW, Hayes RC, et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 1988 Apr 1 [cited 2019 Jun 5];85(7):2210–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2895471>
720. Vestergaard EM, Christensen R, Petersen OB, Vogel I. Prenatal diagnosis: array comparative genomic hybridization in fetuses with abnormal sonographic findings. *Acta Obstet Gynecol Scand [Internet]*. 2013 Jul [cited 2020 Jan 13];92(7):762–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/aogs.12146>
721. Donnelly JC, Platt LD, Rebarber A, Zachary J, Grobman WA, Wapner RJ. Association of copy number variants with specific ultrasonographically detected fetal anomalies. In: *Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 83–90.
722. Kakinuma N, Zhu Y, Wang Y, Roy BC, Kiyama R. Kank proteins: structure, functions and diseases. *Cell Mol Life Sci [Internet]*. 2009 Aug 12 [cited 2019 Jun 4];66(16):2651–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19554261>
723. Buonocore F, Clifford-Mobley O, King TFJ, Striglioni N, Man E, Suntharalingham JP, et al. Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genetic Variants (SRY, DMRT1, NR5A1, DHH, DHX37) in Adults With 46,XY DSD. *J Endocr Soc [Internet]*. 2019 Dec 1 [cited 2020 Jun 27];3(12):2341–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31745530/>
724. Tewes A-C, Ledig S, Tüttelmann F, Kliesch S, Wieacker P. DMRT1 mutations are rarely

- associated with male infertility. *Fertil Steril* [Internet]. 2014 Sep [cited 2019 Jun 4];102(3):816-820.e3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934491>
725. Machado AZ, da Silva TE, Frade Costa EM, dos Santos MG, Nishi MY, Brito VN, et al. Absence of inactivating mutations and deletions in the DMRT1 and FGF9 genes in a large cohort of 46,XY patients with gonadal dysgenesis. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2012 Dec [cited 2020 Jun 27];55(12):690–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22939835/>
  726. Eser M, Ayaz A. Haploinsufficiency of the dmrt gene cluster in a case with 46,xy ovotesticular disorder of sexual development. *Balkan Med J* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jun 27];35(3):272–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29219112/>
  727. Vinci G, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Lortat-Jacob S, Brauner R, McElreavey K. Association of deletion 9p, 46,XY gonadal dysgenesis and autistic spectrum disorder. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2020 Jun 27];13(9):685–9. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article/13/9/685/985995>
  728. Vanzo RJ, Twede H, Ho KS, Prasad A, Martin MM, South ST, et al. Clinical significance of copy number variants involving KANK1 in patients with neurodevelopmental disorders. *Eur J Med Genet*. 2019 Jan 1;62(1):15–20.
  729. Glessner JT, Li J, Wang D, March M, Lima L, Desai A, et al. Copy number variation meta-analysis reveals a novel duplication at 9p24 associated with multiple neurodevelopmental disorders. *Genome Med* [Internet]. 2017 Nov 30 [cited 2020 Jun 27];9(1):106. Available from: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-017-0494-1>
  730. Wallis MJ, Boys A, Tassano E, Delatycki MB. Small interstitial 9p24.3 deletions principally involving KANK1 are likely benign copy number variants. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2020 Jun 27];63(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30684669/>
  731. Lucas JS, Adam EC, Goggin PM, Jackson CL, Powles-Glover N, Patel SH, et al. Static respiratory cilia associated with mutations in Dnahc11/DNAH11: A mouse model of PCD. *Hum Mutat* [Internet]. 2012 Mar [cited 2019 Jun 4];33(3):495–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22102620>
  732. Bartoloni L, Blouin J-L, Pan Y, Gehrig C, Maiti AK, Scamuffa N, et al. Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Aug 6 [cited 2019 Jun 4];99(16):10282–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142464>
  733. Liu S, Chen W, Zhan Y, Li S, Ma X, Ma D, et al. DNAH11 variants and its association with congenital heart disease and heterotaxy syndrome. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Jun 27];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31040315/>
  734. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* [Internet]. 1997 Oct 1 [cited 2019 Jun 5];34(10):798–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350810>

735. de la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet* [Internet]. 1981 [cited 2019 Jun 5];57(3):253–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7250965>
736. Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1992 May [cited 2019 Jun 5];50(5):924–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1349199>
737. Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, et al. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* [Internet]. 1992 Sep 15 [cited 2019 Jun 5];44(2):261–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1360769>
738. Schuffenhauer S, Lichtner P, Peykar-Derakhshandeh P, Murken J, Haas OA, Back E, et al. Deletion mapping on chromosome 10p and definition of a critical region for the second DiGeorge syndrome locus (DGS2). *Eur J Hum Genet* [Internet]. 1998 May 29 [cited 2019 Jun 5];6(3):213–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781025>
739. Burn J. Closing time for CATCH22. *J Med Genet* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2019 Jun 5];36(10):737–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528851>
740. Dunham I, Collins J, Wadey R, Scambler P. Possible role for COMT in psychosis associated with velo-cardio-facial syndrome. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1992 Nov 28 [cited 2019 Jun 5];340(8831):1361–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1360084>
741. Ciaccio C, Dordoni C, Ritelli M, Colombi M. Koolen-de Vries Syndrome: Clinical Report of an Adult and Literature Review. *Cytogenet Genome Res.* 2017 Jan 1;150(1):40–5.
742. Moreno-Igoa M, Hernández-Charro B, Bengoa-Alonso A, Pérez-Juana-del-Casal A, Romero-Ibarra C, Nieva-Echebarria B, et al. KANSL1 gene disruption associated with the full clinical spectrum of 17q21.31 microdeletion syndrome. *BMC Med Genet* [Internet]. 2015 Aug 22 [cited 2020 Jul 1];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26293599/>
743. Zollino M, Orteschi D, Murdolo M, Lattante S, Battaglia D, Stefanini C, et al. Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nat Genet* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Jul 1];44(6):636–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22544367/>
744. Koolen DA, Kramer JM, Neveling K, Nillesen WM, Moore-Barton HL, Elmslie F V., et al. Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat Genet* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Jul 1];44(6):639–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22544363/>
745. Preiksaitiene E, Männik K, Dirse V, Utkus A, Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, et al. A novel de novo 1.8 Mb microdeletion of 17q21.33 associated with intellectual disability and dysmorphic features. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2012 Nov [cited 2019 Jun 5];55(11):656–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842074>
746. Körkkö J, Ala-Kokko L, De Paepe A, Nuytinck L, Earley J, Prockop DJ. Analysis of the COL1A1 and COL1A2 Genes by PCR Amplification and Scanning by Conformation-

- Sensitive Gel Electrophoresis Identifies Only COL1A1 Mutations in 15 Patients with Osteogenesis Imperfecta Type I: Identification of Common Sequences of Null-Allele . *Am J Hum Genet* [Internet]. 1998 Jan [cited 2019 Jun 5];62(1):98–110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9443882>
747. Grisart B, Willatt L, Destree A, Fryns J-P, Rack K, de Ravel T, et al. 17q21.31 microduplication patients are characterised by behavioural problems and poor social interaction. *J Med Genet* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2019 Jun 5];46(8):524–30. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2008.065367>
  748. Falk J, Bonnon C, Girault JA, Faivre-Sarrailh C. F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol Cell*. 2002;94(6):327–34.
  749. Osterhout JA, Stafford BK, Nguyen PL, Yoshihara Y, Huberman AD. Contactin-4 Mediates Axon-Target Specificity and Functional Development of the Accessory Optic System. *Neuron*. 2015 May 20;86(4):985–99.
  750. Fernandez T, Morgan T, Davis N, Klin A, Morris A, Farhi A, et al. Disruption of contactin 4 (CNTN4) results in developmental delay and other features of 3p deletion syndrome. *Am J Hum Genet*. 2004;74(6):1286–93.
  751. Roohi J, Montagna C, Tegay DH, Palmer LE, DeVincent C, Pomeroy JC, et al. Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *J Med Genet*. 2009 Mar;46(3):176–82.
  752. Zuko A, Bouyain S, Van Der Zwaag B, Burbach JPH. Contactins: Structural aspects in relation to developmental functions in brain disease. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Academic Press Inc.; 2011. p. 143–80.
  753. Schutte BC, Saal HM, Goudy S, Leslie E. IRF6-Related Disorders [Internet]. *GeneReviews*®. 1993 [cited 2020 Feb 4]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301581>
  754. Fakhouri WD, Rahimov F, Attanasio C, Kouwenhoven EN, Ferreira de Lima RL, Felix TM, et al. An etiologic regulatory mutation in IRF6 with loss- and gain-of-function effects. *Hum Mol Genet*. 2014;23(10):2711–20.
  755. De Medeiros F, Hansen L, Mawlad E, Eiberg H, Asklund C, Tommerup N, et al. A novel mutation in IRF6 resulting in VWS-PPS spectrum disorder with renal aplasia. *Am J Med Genet Part A*. 2008 Jun 15;146(12):1605–8.
  756. Charzewska A, Obersztyn E, Hoffman-Zacharska D, Lenart J, Poznański J, Bal J. Novel mutations in the IRF6 gene on the background of known polymorphisms in Polish patients with orofacial clefting. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 2015 Sep 1;52(5):e161–7.
  757. Birnbaum S, Reutter H, Lauster C, Scheer M, Schmidt G, Saffar M, et al. Mutation screening in the IRF6-gene in patients with apparently nonsyndromic orofacial clefts and a positive family history suggestive of autosomal-dominant inheritance. Vol. 146, *American Journal of Medical Genetics, Part A*. 2008. p. 787–90.
  758. Bixler D, Poland C, Nance WE. Phenotypic variation in the popliteal pterygium syndrome. *Clin Genet*. 1973;4(3):220–8.
  759. Leslie EJ, O’Sullivan J, Cunningham ML, Singh A, Goudy SL, Ababneh F, et al. Expanding

the genetic and phenotypic spectrum of popliteal pterygium disorders. *Am J Med Genet Part A*. 2015 Mar 1;167(3):545–52.