



Bases genètiques en la malformació de Chiari tipus I

Aintzane Urbizu Serrano

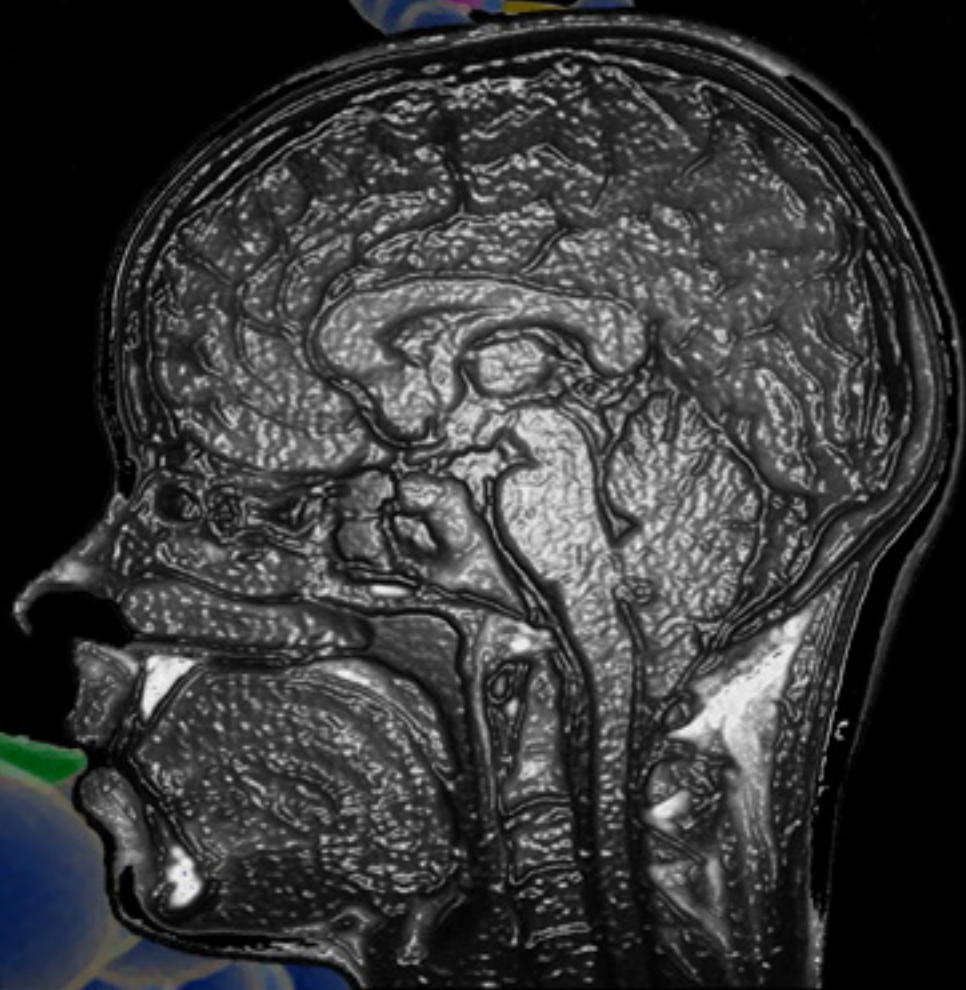
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Bases genètiques de la malformació de Chiari tipus I

Aintzane Urbizu Serrano





Universitat
de Barcelona



BASES GENÈTIQUES EN LA MALFORMACIÓ DE CHIARI TIPUS I

Memòria presentada per Aintzane Urbizu Serrano
per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Alfons Macaya Ruíz, al grup de Recerca de Neurologia Pediàtrica de Vall d'Hebron Institut de Recerca i del Dr. Bru Cormand i Rifà del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona

Aintzane Urbizu Serrano
Barcelona 2013

Vist i plau del Director de Tesi

Vist i plau del Co-director i Tutor de Tesi

Dr. Alfons Macaya Ruíz

Dr. Bru Cormand i Rifà

Programa de Doctorat: Genètica

La vida és com un camí que recorrem, en el que anem trobant constantment persones amb les que compartim trams més o menys llargs. Gent que ens aporta alegries, noves maneres de veure la vida, preocupacions, amistat, amor...

Al llarg d'aquesta Tèsi, per sort o per desgràcia, m'he trobat amb molta gent. Com saben tots els que estan a prop meu, aquesta Tèsi ha estat molt dura, molt més del que m'havia arribat a imaginar quan la vaig començar; i són molt plors i nervis els que han marcat aquest període. Per aquest motiu, de tota la gent que he conegut o coincidit, m'agradaria donar les gràcies a aquells (que no sou pocs) que m'heu recolzat i animat a seguir endavant, i m'heu demostrat el vostre carinyo, comprensió i paciència:

En primer lloc, vull agrair a l'Alfons, director de la Tèsi, l'oportunitat que em va donar al deixar-me entrar al seu grup; i al meu tutor i bé, finalment i a corre-cuita també, director, Bru, pel suport incondicional que sempre m'ha demostrat i el gran esforç que ha fet per donar l'empenta final de la Tèsi. Al Miquel Marín-Padilla pel seu assessorament i col·laboració. A la Francina, pels seus consells i poemes d'ànim que em va donar sempre que em va veure desanimada; als Neurocirurgians per fer-me un lloc a la seva agenda, sempre tan ocupada, i ajudar-me amb els pacients; i al Xavier Vidal per aconsellar-me sempre que l'he necessitat i ensenyar-me molta de l'estadística que he utilitzat en aquest treball.

En segon lloc, vull agrair a la meua família tot el que han fet per mi. Sobretot als meus pares, per haver-me recolzat sempre que ho he necessitat, i haver-me encoratjat a realitzar els meus somnis i fer-los realitat, per molt sacrificats i increïbles que fossin. I tot i que aquesta Tèsi el meu pare no l'ha arribat a conèixer, vull dedica'ls-hi a tots dos perquè ells van ensenyar-me a ser com sóc, a ser una persona que lluita per uns ideals i s'esforça per aconseguir allò que vol. Mama, moltíssimes gràcies, t'estimo molt, ja ho saps.

Y Gemma, que decírte a tí, que siempre estás ahí, preocupándote por todo en cada momento...como una segunda mamá. ¡Muchísimas gracias! ¡Eres increíble!

Gran part d'aquesta tesi també va dedicada a tu, Nú, que tot i estar a la llunyania actualment, realitzant els teus somnis també, van ser molts anys els que vam compartir junts, incloent moltes alegries, però també, malahuradament, moltes tristeses. Sent la vida injusta, et va tocar viure gran part del patiment que vaig

passar realitzant aquesta tesi...i no et mereixes menys, que un trosset d'ella. No oblidaré mai el que em vas ensenyar i el que vam aprendre tots dos plegats.

A tots els meus amics de Vall d'Hebron (Jordí, Laia, Marc, Marcos, Damir, Ana, Ari, Eli) per la seva alegria i vitalitat que transmeten en tot allò que fan. Evidentment, per tot el suport, ànim i força que m'han donat i els grans moments que hem compartit.

Al grup d'hepatiques per haver-me acollit tan bé en les hores dels dinars i haver-me fet partícip de totes les vostres bogeries. Jordí, que t'haig de dir a tu, que has estat clau en la meua vida, tant en l'àmbit laboral com en el personal, escoltant-me i aconsellant-me sempre que ho he necessitat. Cuidant de mi i aportant sempre aquest humor i picardia que tant et caracteritza. I a tu Laïeta, per ser sempre tan positiva i alegre! Marquitos, por ser como eres, me encantas!! (¡¡¡estoy segura que algún día correremos juntos la Maratón de alta montaña en Zegama!!!).

I als meus atletes preferits: Marc, Damir, Eli, Jordí i Marcos, per tots els entrenaments que vam arribar a fer i les hores de rallades que m'heu hagut d'aguantar.

Nenes del lab (Marta Vila, Cris, Marta Ribasés, Iris, Marian, Alba, Mario, Alex, Ingrid, Toni, Solange, Marta Rebull) per la seva alegria i vitalitat, brometes contínues (i no assenyalo a ningú, Cris ;p), i tantes hores divertides que hem compartit al lab o al despatxet.

A l'Olga i l'Eli, per haver-me ajudat a aconseguir les sangs dels pacients. Sense vosaltres, no hagués pogut realitzar la Tesi!

A la gent de la UB: Cèlia, Noe, Bárbara, per les estones que hem coincidit aquí o allà, i haver-me deixat un trosset del vostre lab per acabar el darrer experiment. Y a tí, Claudio, por enseñarme tantas cosas de genética y escucharme y aconsejarme siempre que lo he necesitado. Eres un solete.

Als companys de ressos: Dani, Xavi, Núria, Joaquín i Miriam. Per la quantitat de nits que heu cuidat de mi mentre mesurava les IRMs. Per haver-me mantingut desperta donant-me conversa a altes hores de la nit/matinada, quan veieu que ja no podia més. Gràcies per la vostra confiança i ànims, i per ser com sou: genials!

Als compis i amics d'anglès: l'Elena, el Gustavo, el Robert i el Ramon, per tot el seu suport moral que m'han donat en aquests dos darrers anys, acompanyats de cafetons infinits, sopars freakis i milers d'històries i moments divertidíssims.

Als meus amics biòlegs (grup M3 forever!) i tecnòlegs dels aliments, en especial, a la Gemma Vila, qui ha estat sempre un referent per mi.

Als caminantes: Carlos, Pep, Cris, Fer, Paco i Mariajo, amb els que per efecte del destí va fer que ens trobéssim fent el Camino de Santiago i després de molts mesos, encara mantinguem una molt bonica amistat i des de cada ciutat, m'hagin animat en aquest tram final de la tesi. Gràcies per les tantíssimes i estupendes hores, dies i setmanes que vau compartir amb mi, ja fos rient, xerrant, compartint preocupacions, mals...en fi, lluitant tots per aconseguir el mateix objectiu cada dia, que era acabar una nova etapa. Vau ser el millor del camino sense dubte!

A les meves nenes "ludòpates" (Anna i Marga) per les hores tan divertides i emocionants que hem passat juntes. No canviem mai, si us plau!

A l'Edu i la Cris per recolzar-me sempre en tot el que he fet (Etedutu, vitales los cafés de terapia!!!!jajajajjaa), al Nacho, per cuidar-me i preocupar-se per mi (a la seva manera), i al David Miñana i l'Albert pel seu suport.

A la família Vila-Grajales-Gaforio per haver-me acollit tan bé i haver-me fet sentir com un membre més des del primer dia. Gràcies per tots aquests mesos de confiança, preocupació i amor.

I a tu, guapíssim i estimat meu, que tot i que ens hem trobat en la part final d'aquesta Tesi, no són poques les coses que hem viscut i compartit. Tu m'has donat la força i energia que necessitava per poder tirar endavant aquest tram final tan llarg i desesperant. Per aquest motiu, conjuntament amb tot el que m'has ajudat i has hagut de patir (que no ha estat poc), tens, com no, un gran lloc en aquesta Tesi. Gràcies per la paciència i amor que m'has demostrat en tot aquest temps, cada dia, cada minut, en cada moment. Sense dubte, has estat fonamental en aquests mesos. T'estimo moltíssim vida meva.



**Agur laguna, Agur betiko
Gregorio maitagarria
Bainan gurekin geratzen dituk
hire farre ta irria
gaurdik aurrera Aikzorrik
badik
beste Artzai bat berria
ondo zaindu itzak
Zegamatarrak
ta Zegamako Herria**

Adiós amigo, Adiós para siempre
querido Gregorio
con nosotros quedarán
tu risa y tu sonrisa
en adelante Aizkorri tendrá
un nuevo pastor
guía bien a los Zegamatarras
y al pueblo de Zegama

Índex

Glossari.....	I
Llistat d'abreviacions.....	VII
Llistat de taules i figures.....	IX
Introducció.....	1
1. Característiques de la malformació de Chiari tipus I	3
1.1. Definició i història.....	3
1.2. Tipus de malformació de Chiari.....	4
1.3. Característiques clíniques generals de la malformació de Chiari tipus I... 6	
1.3.1. Presentació clínica.....	6
1.3.2. Síntomes i síndrome clínica.....	7
1.3.3. Signes.....	8
1.4. Complicacions associades.....	9
1.5. Diagnòstic.....	15
1.6. Epidemiologia.....	19
1.6.1. Prevalença de la MCI.....	19
1.6.2. Distribució de la MCI per edat i sexe.....	19
1.7. Fisiopatologia de la malformació de Chiari tipus I.....	20
1.7.1. Recorregut per les diferents teories proposades.....	20
1.7.2. Teoria del dèficit de desenvolupament basioccipital.....	21
1.7.3. Possibles causes de la MCI amb FCP petita.....	23
1.8. Tractament.....	24
1.9. Comorbiditat.....	28
1.10 Impacte socioeconòmic.....	29
2. Bases genètiques de la malformació de Chiari tipus I.....	30
2.1. Heretabilitat de la malformació de Chiari tipus I.....	30
2.1.1. Evidències genètiques en la MCI.....	30
2.1.1.1. Agregació familiar.....	31
2.1.1.2. Estudis de bessons	31
2.1.1.3. Associació amb trastorns de base genètica coneguda.....	32

2.1.1.4. Model de transmissió genètica.....	38
2.2. Estudis genètics en la malformació de Chiari tipus I.....	38
2.2.1. Estudis de lligament genètic en la MCI.....	38
2.2.1.1. Estudis de lligament genètic a escala genòmica.....	39
2.2.2. Anàlisi mutacional de gens candidats.....	42
2.2.3. Identificació de variants de susceptibilitat: estudis d'associació.....	42
2.2.4. Seqüenciació massiva.....	44
2.3. Models animals en la malformació de Chiari tipus I	45
3. Gens candidats.....	46
3.1. Gens implicats en el desenvolupament de l'os occipital.....	47
3.1.1. Formació del mesoderma paraxial.....	47
3.1.2. Formació de les somites occipitals.....	49
3.1.3. Desenvolupament de l'os occipital.....	52
3.2. Gens causants de trastorns associats amb la malformació de Chiari tipus I	52
3.2.2. Gens implicats en el creixement axial del mesoderma	52
3.2.3. Gens situats en regions cromosòmiques d'interès.....	53
Objectius.....	55
Resultats.....	59
Informe sobre la participació de la doctoranda en els articles presentats.....	61
Article 1. MRI-based Morphometric Analysis of Posterior Cranial Fossa in the Diagnosis of Chiari Malformation Type I.....	63
Article 2. Cephalometric oropharynx analysis in Chiari malformation type I....	73
Article 3. Chiari Malformation Type I: A Case-Control Association Study of 58 Developmental Genes.....	93
Article 4. Analysis of the Polycomb gene <i>SUZ12</i> in patients with Chiari malformation type I or II.....	119
Annex: Seqüenciació d'exomes en una família amb la malformació de Chiari tipus I.....	133

Discussió.....	141
1. Característiques de la mostra reclutada.....	143
1.1. Els pacients amb malformació de Chiari tipus I.....	143
1.1.1. Logística de la recollida de casos amb MCI.....	143
1.1.2. Característiques clíniques dels pacients.....	144
1.2. La població control.....	147
2. Estudis morfomètrics.....	149
2.1. Consideracions generals sobre els estudis amb IRM.....	149
2.1.1. Elecció de la imatge i el tall adient.....	149
2.1.2. Selecció dels individus per a l'estudi.....	151
2.1.3. Dificultats afegides en els estudis d'IRM retrospectius.....	151
2.1.4. Tests de consistència.....	152
2.1.5. Tests d'anàlisi de dades i correccions.....	153
2.2. Estudi morfomètric de la FCP.....	154
2.2.1. Característiques de la FCP en pacients amb MCI.....	155
2.2.2. Avantatges d'aquest estudi morfomètric respecte d'altres realitzats prèviament.....	156
2.2.3. Nou criteri de diagnòstic proposat.....	157
2.3. Estudi de la cavitat orofaríngia.....	160
2.3.1. Fortalesa de l'estudi.....	161
2.3.2. Característiques de la cavitat orofaríngia en pacients amb MCI.....	161
2.3.3. Relació de la morfologia observada amb els símptomes en pacients amb MCI.....	163
2.3.4. Possible relació entre la FCP subdesenvolupada i la cavitat orofaríngia alterada en pacients amb MCI.....	165
3. Identificació de variants genètiques de susceptibilitat en pacients amb malformació de Chiari tipus I: selecció de gens candidats i estudi d'associació genètica cas-control poblacional.....	166
3.1. Consideracions generals sobre els estudis d'associació.....	166
3.1.1. Selecció de gens candidats i polimorfismes.....	166
3.1.2. Determinació del fenotip en una malaltia complexa.....	169
3.1.3. Errors de genotipació.....	169

3.1.4. Estratificació poblacional.....	170
3.1.5. Anàlisi de marcadors individuals.....	171
3.1.6. Anàlisi de marcadors múltiples: estimació d'haplotips.....	172
3.1.7. Correccions per múltiples comparacions.....	172
3.1.8. Estudis de rèplica	174
3.1.9. Poder estadístic.....	174
3.2. Resultats obtinguts en l'estudi d'associació genètica cas-control en la malformació de Chiari tipus I.....	175
3.2.1. Estudi d'associació genètica cas-control.....	175
3.2.2. Anàlisi de la relació entre la morfometria de la FCP i les variants genètiques	180
3.2.3. Possible relació entre la MCI i la MCII.....	180
3.2.4. Possible relació entre la MCI i la MC0.....	184
4. Anàlisi genètica de formes monogèniques en la malformació de Chiari tipus I: anàlisi mutacional del gen <i>SUZ12</i> i seqüenciació d'exomes.....	185
4.1. Consideracions generals sobre els estudis de criatge mutacional.....	185
4.1.1. Metodologies de criatge mutacional.....	186
4.1.2. Anàlisi de la variant identificada.....	187
4.1.2.1. Exclusivitat de la mutació en el pacient.....	187
4.1.2.2. Predicció de l'efecte patogènic de la variant.....	188
4.2. Anàlisi de gens candidats: <i>SUZ12</i>	189
4.2.1. El gen <i>SUZ12</i> com a candidat.....	189
4.2.2. Consideracions metodològiques: especificitat dels encebadors.....	190
4.2.3. Resultats de l'anàlisi mutacional del gen <i>SUZ12</i> en pacients amb malformació de Chiari tipus I i II.....	191
4.3. Seqüenciació massiva.....	194
Conclusions.....	199
Bibliografia.....	203

Glossari

Acondroplàsia. Defecte congènit i hereditari caracteritzat per una manca de creixement dels ossos en longitud, conjuntament amb un engruiximent del periosti.

Amígdales cerebel·loses. Part caudal del cerebel.

Amiotròfia. Atròfia muscular caracteritzada per una disminució del volum dels músculs, amb pèrdua de força, produïda per lesions hereditàries, congènites o inflamatòries de la fibra muscular, dels nervis perifèrics, de la medul·la espinal o de l'encèfal.

Anàlisi de lligament multipuntual. Variant de l'anàlisi de lligament genètica que consisteix a analitzar simultàniament diversos *loci*.

Bloc haplotípic. Conjunt de marcadors genètics que estan en desequilibri de lligament.

Conducte ependimari. Ventricle de la medul·la espinal, que conté líquid cefaloraquidi.

Desequilibri de lligament. Associació no aleatòria entre al·lels de dos o més *loci* del genoma.

Diplopia. Visió doble.

Disàrtia. Trastorn de la parla caracteritzat per la dificultat en l'articulació de les paraules produït per lesions que afecten la innervació de la musculatura articulatòria, sense alteració de les funcions superiors de comprensió o d'ideació.

Disfonia. Trastorn consistent en una pèrdua del timbre normal de la veu produït, habitualment, per alteracions de la laringe.

Disfàgia. Trastorn consistent en una deglució difícil produït per una alteració del pas dels aliments en un punt situat entre la cavitat oral i l'estómac.

Dismetria. Alteració motora caracteritzada per la manca de control de l'amplitud del moviment muscular a causa d'una incapacitat de mesurar adequadament les distàncies.

Disrafisme espinal. Manca de tancament del tub neural. La medul·la no queda coberta pel canal vertebral.

Efèlide. Piga clara.

Encefalocele occipital. Estructura que sobresurt cap enfora a la part posterior del cap o del coll i que conté matèria cerebral. La coberta del cervell o de la medul·la espinal també poden sobresortir per un orifici anormal a l'esquena o el crani.

Epèndima. Capa que recobreix la cavitat dels ventricles cerebrals i del conducte central de la medul·la espinal.

Equilibri Hardy-Weinberg. Principi pel qual les freqüències genotípiques en una població romanen constants o estan en equilibri de generació en generació llevat que s'introdueixin influències pertorbadores específiques com l'aparellament no aleatori, les mutacions o la selecció natural.

Error de tipus I. També anomenat error de tipus α o fals positiu. És l'error que es dona quan l'observador rebutja la hipòtesi nul·la (H_0), essent aquest vertadera (s'estima en probabilitat).

Error de tipus II. També anomenat error de tipus β o fals negatiu. És l'error que es dona quan l'investigador accepta la H_0 , essent aquesta falsa (s'estima en probabilitat).

Esclerotoma. Part de la somita que finalment es diferencia en vèrtebres i crani.

Espasticitat. És un símptoma que reflexa un trastorn motor del sistema nerviós, en què alguns músculs es mantenen permanentment contrets. Aquesta contracció provoca la rigidesa i escurçament dels músculs, i interfereix en els seus diferents moviments i funcions, com passejar, manipular, mantenir l'equilibri, parlar o deglutir.

Especificitat. Probabilitat d'obtenir un resultat negatiu en un test diagnòstic quan l'individu no té la malaltia. Mesura la capacitat per descartar la malaltia quan no està present.

Espina bífida oculta. Afecció en la qual els ossos de la columna no es tanquen però la medul·la espinal i les meninges romanen al seu lloc i la pell generalment cobreix el defecte.

Exactitud. Capacitat d'una prova diagnòstica per classificar correctament als individus en subgrups clínicament rellevants.

Fenocòpia. Fenotip que, per causes externes, ha canviat fins a assemblar-se a un fenotip produït per una mutació genètica.

Fossa cranial posterior. Espai dins del crani on es troben situats el tronc encefàlic i el cerebel, delimitat per l'os occipital, el tentori, el cos callós, i la cadira turca.

Haplotip. Combinació d'al·lels en diferents marcadors que s'hereten en bloc.

Hidrocefàlia. Embassament de líquid cefaloraquidi en el sistema ventricular de l'encèfal que provoca dilatació d'aquest sistema i compressió del teixit nerviós adjacent.

Hidromièlia. Dilatació marcada del canal central de la medul·la espinal, amb acumulació anòmala de líquid cefaloraquidi.

Hipercàpnia. Excés de diòxid de carboni a la sang.

Homeòtic (gen). Que determina el patró corporal d'un ésser viu. Els gens homeòtics regulen la morfogènesi i la diferenciació cel·lular durant el desenvolupament embrionari. Un exemple són els gens HOX.

Incidència. És una mesura del nombre de casos nous d'una malaltia en un període de temps determinat.

LOD score. Estimació estadística del lligament (logaritme de l'*Odds ratio*). Indica la probabilitat que dos *loci* estiguin lligats, és a dir, que estiguin tan propers en el genoma que tendeixin a heretar-se junts.

Malaltia de Ménière. Malaltia que afecta el laberint membranós produïda per hidropesia endolimfàtica, que es caracteritza per crisis de vertigen, sordesa i acúfens.

Maniobra de Valsalva. Qualsevol intent d'exhalar aire amb la glotis tancada o amb la boca i el nas tancats.

Mielografia. Tècnica radiològica que consisteix en la injecció d'una substància iodada al canal medul·lar mitjançant una punció lumbar. Aquesta substància impedeix el pas dels raigs X, de manera que en fer una radiografia convencional es veu tot allò que conté contrast. S'utilitza per visualitzar el canal espinal i l'espai subaracnoïdal. És una tècnica dolorosa i comporta risc d'infecció i d'al·lèrgia al contrast.

Mielomeningocele o espina bífida. Defecte en el tancament del tub neural que produeix una protuberància a l'esquena constituït per la medul·la espinal i la seva membrana protectora. Aquest orifici s'origina abans del naixement com a conseqüència d'un tancament deficient del canal espinal i la columna. Una

mielomeningocele dona normalment com a resultat una paràlisi parcial o completa de l'àrea inferior de l'orifici espinal.

Neurofibroma. Tumor benigne que sorgeix de qualsevol nervi perifèric.

Neuràlgia del trigemin. Dolor viu al llarg del nervi trigemin (cinquè nervi cranial) i les seves ramificacions.

Nistagme. Espasme clònic dels músculs motors del globus ocular que produeix moviments involuntaris d'aquest en diferents sentits: horitzontal, vertical, oscil·latori, rotatori, mixt, etc.

Notocorda. Estructura embrionària que presenten tots els cordats que s'estén al llarg de tot el cos, dorsalment respecte al tub digestiu i ventralment respecte al cordó nerviós, i serveix com a esquelet axial de l'embrió fins que altres elements, com les vèrtebres, es formen.

Oportunitat relativa. Indicador del risc associat a cada genotip. És la raó entre la incidència de la malaltia en un grup exposat i la incidència en un grup no exposat.

Oscil·lòpsia. Sensació d'oscil·lació de petita amplitud de l'entorn o del propi cos.

Papil·ledema. Tumefacció no inflamatòria de la papil·la del nervi òptic produïda per un augment de la pressió intracranial i l'obstrucció del flux venós de l'òrbita.

Parells cranials o nervis cranials. Són els dotze parells de nervis que parteixen de la base del cervell a nivell del tronc de l'encèfal i emergeixen pels forats de la base del crani, distribuint-se pel cap, el coll, el tòrax i l'abdomen.

Parèsia. Paràlisi incompleta que afecta els moviments però no la sensació.

Parestèsia. Sensació anòmala dels sentits o de la sensibilitat general que es tradueix en una sensació de formigueig, adormiment, produïda per una patologia en les estructures del sistema nerviós perifèric.

Penetrància. Freqüència, expressada en tant per cent, amb què un gen present en un conjunt d'individus es manifesta fenotípicament.

Plec neural. Cadascun dels dos plecs ectodèrmics de la placa medul·lar que, en unir-se, formen el tub neural.

Prevalença. En epidemiologia es defineix com la proporció d'individus d'un grup o una població que presenten una característica o esdeveniment en un moment o període de temps ("prevalença de període") determinat. La prevalença d'una malaltia es calcula com el nombre de casos que presenten la

malaltia, dividit pel nombre d'individus que componen el grup o la població en un determinat moment.

Sensibilitat. Probabilitat d'obtenir un resultat positiu en un test diagnòstic quan l'individu té la malaltia. Mesura la capacitat per detectar la malaltia quan està present.

Signe de Babinski. Reflex cutani plantar que consisteix en l'extensió del dit gros del peu, sovint acompanyada de la separació de la resta de dits, en estimular aferències sensorials de la part externa de la planta del peu.

Sincondrosi. Unió de dos ossos mitjançant una sutura de tipus cartilaginosa.

Siringohidromièlia. Terme que engloba la hidromièlia i la siringomièlia.

Siringomièlia. Presència de cavitats plenes de líquid a l'interior de la medulla espinal com a conseqüència d'anomalies del desenvolupament i, més rarament, de tumors intramedul·lars o d'inflamacions medul·lars.

Somita. Cos de forma cúbica o prismàtica situat en parells a un costat i l'altre del tub neural que es genera per la condensació de cèl·lules del mesoderma paraxial.

TAC. Tomografia axial computeritzada, en què es realitzen moltes radiografies al mateix temps i des de diferents angles. Posteriorment, un ordinador reuneix totes les imatges i les transforma en una sola. A més de mostrar els ossos, permet veure els teixits tous, que per la seva poca consistència, deixen passar gran part dels raigs X i no es visualitzen bé en la radiografia convencional. L'escàner no és dolorós, però exposa el pacient a una radiació considerable, equivalent a diverses radiografies simultànies.

TagSNP. SNP representatiu d'una regió del genoma que està en elevat desequilibri de lligament amb diversos SNPs propers. Permet identificar la variació genètica sense haver de genotipar tots els polimorfismes d'una regió cromosòmica.

Tinnitus. Fenomen perceptiu que consisteix en notar cops o sons a l'oïda que no procedeixen de cap font externa.

Tomografia computeritzada. També anomenada escàner, és una tècnica d'imatge que utilitza radiació X per obtenir talls o seccions d'objectes anatòmics amb finalitats diagnòstiques.

Urent. Que produeix coïssor, cremor, sensació de cremada.

Abreviacions

ADN: àcid desoxiribonucleic

AR: àcid retinoic

ARN: àcid ribonucleic

BMP: proteïnes morfogèniques de l'os (de *Bone Morphogenetic Proteins*)

CAP: centre d'atenció primària

CCI: coeficient de correlació intraclasse

CDRV: malaltia comuna, variant rara (de *Common Disease-Rare Variant*)

CDCV: malaltia comuna, variant comuna (de *Common Disease-Common Variant*)

CKCS: *Cavalier King Charles Spaniels*

chr: cromosoma

cM: centiMorgans

DA: descens amígdals cerebel·loses

dpc: dies post coit

DZ: dizigòtics

FBN: fibrilina

FCP: fossa cranial posterior

FDR: taxa de falsos descobriments (de *False Discovery Rate*)

FGF: factor de creixement de fibroblasts (de *Fibroblast Growth Factor*)

FI: factor d'impacte

GB: *Griffon Bruxellois*

GWAS: estudi d'associació del genoma sencer (de *Genome-Wide Association Studies*)

HWE: equilibri de Hardy-Weinberg (de *Hardy-Weinberg Equilibrium*)

IB: impressió basilar

IBD: idèntics per descendència

IC: interval de confiança

Indels: insercions-deleccions

IRM: imatge per ressonància magnètica

LCR: líquid cefaloraquidi

LD: desequilibri de lligament (de *Linkage Disequilibrium*)

MAF: freqüència al·lèlica mínima (de *Minor Allele Frequency*)

mARN: àcid ribonucleic missatger

Mb: Megabases

MC0: malformació de Chiari tipus 0

MCI: malformació de Chiari tipus I

MCII: ,malformació de Chiari tipus II

MZ: monozigòtics

NF1: neurofibromatosi tipus 1

NGS: seqüenciació de nova generació (de *Next Generation Sequencing*)

OR: oportunitat relativa (d'*Odds Ratio*)

PAX: *Paired box*

pb: parells de bases

PCR: reacció en cadena de la polimerasa (de *Polymerase chain reaction*)

PRC: complex repressor policomb (de *Policomb Repressor Complex*)

TAC: tomografia axial computeritzada

TC: tomografia computeritzada

RARE: elements de resposta a l'àcid retinoic (de *Retinoic Acid Response Element*)

RFP: reconstrucció fossa posterior

ROC: característica operativa del receptor (de *Receiver Operating Characteristic*)

SAOS: Síndrome de l'Apnea obstructiva de la son

SHH: *Sonic Hedgehog*

SNP: polimorfisme d'un sol nucleòtid (de *Single Nucleotide Polymorphism*)

SNV: variant d'un únic nucleòtid (de *Single nucleotide variation*)

UTR: regió no traduïda (de *Untranslated Region*)

VEGF: factor de creixement de l'endoteli vascular (de *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VNTR: nombre variable de repeticions en tàndem (de *Variable Number Tandem Repeat*)

Llistat de taules i figures

Listat de taules

Taula 1. Criteris radiològics basats en el DA suggerits per al diagnòstic de la MCI al llarg dels anys.....	17
Taula 2. Posició de les amígdales cerebel·loso per sota del forat magne en funció de l'edat de diagnòstic de la MCI segons Mikulis i col·laboradors.....	17
Taula 3. Resum de la morfologia de la FCP en pacients amb MCI segons l'etiologia.....	23
Taula 4. Trastorns associats amb la malformació de Chiari tipus I.....	34
Taula 5. Característiques dels encebadors utilitzats en la validació de les variants genètiques candidates.....	137
Taula 6. Condicions experimentals de les reaccions de PCR utilitzades en la validació de variants candidates a causar MCI.....	137
Taula 7. Variants genètiques identificades en els dos exomes estudiats.....	140
Taula 8. Dades clíniques dels pacients amb MCI reclutats.....	149
Taula 9. Visualització dels diferents teixits en funció dels temps de relaxació potenciats (T1 o T2).....	152
Taula 10. Estudis morfomètrics de la MCI realitzats fins ara.....	159
Taula 11. Gens del desenvolupament embrionari prèviament estudiats per la seva possible implicació en el tancament del tub neural i seleccionats per a l'estudi d'associació realitzat en aquest treball.....	184
Taula 12. Evolució del coneixement del genoma humà (2009-2012) exemplificada a través de l'avaluació de les variants identificades en el gen <i>SUZ12</i> en pacients amb MCI i MCII.....	195

Llistat de figures

Figura 1. Fossa cranial posterior.....	3
Figura 2. Diferents tipus de malformació de Chiari.....	5
Figura 3. Mecanismes que produeixen els símptomes en la malformació de Chiari tipus I.	6

Figura 4. Representació gràfica de lairingomièlia en un pacient amb malformació de Chiari tipus I.....	10
Figura 5. Formació de quists siringomièlics.....	10
Figura 6. Hidrocefàlia.....	11
Figura 7. Base del crani amb l'angle de Boogard.....	12
Figura 8. Impressió basilar.....	13
Figura 9. Retrocés de la dent de l'axis.....	14
Figura 10. Aracnoïditis.....	15
Figura 11. Imatges de ressonància magnètica de: A) control, B) MCI i C) MC0.	18.
Figura 12. Fossa cranial posterior (polígon a-b-d-e-f) representat en A) control, B) MCI i C) MC0.....	22
Figura 13. Os occipital, os esfenoide i sincondrosis occipitals.....	24
Figura 14. IRM d'abans (A) i després (B) de la reconstrucció de la FCP	26.
Figura 15. Esquema d'una derivació ventriculoperitoneal.....	26
Figura 16. Algoritme en què exposa el maneig dels pacients amb MCI al servei de Neurocirurgia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebro.....	27
Figura 17. Arbres genealògics de les famílies utilitzades en l'únic estudi de lligament genètic a escala genòmica en MCI publicat fins ara.....	40
Figura 18. Anàlisi de lligament genètic realitzada en una família amb 12 individus amb MCI.....	41
Figura 19. Esquema de la formació de l'os occipital.....	49
Figura 20. Principals vies gèniques implicades en la formació de les somites occipitals.....	51
Figura 21. Estructura de la família estudiada amb els haplotips de la regió genòmica que conté la variant identificada al gen <i>DDX52</i>	138
Figura 22. Segregació de la variant p.Gly302Asp identificada al gen <i>GP1BA</i>	139
Figura 23. Arbres genealògics de les famílies amb quatre o més individus amb MCI que es van reclutar.....	146
Figura 24. Origen dels pacients amb MCI.....	147
Figura 25. Via de senyalització de l'àcid retinoic.....	179
Figura 26. Esquema del tancament del tub neural.....	183
Figura 27. Arbre genealògic d'una família amb individus amb MCI i MC0.....	186
Figura 28. El gen <i>SUZ12</i>	191

Figura 29. Estructura i funció del complex repressor policomb 2.....	192
Figura 30. Arbres genealògics i electroferogrames de les dues variants més destacades identificades en l'estudi mutacional del gen <i>SUZ12</i>	194

Introducció

1. Característiques de la malformació de Chiari tipus I

1.1. Definició i història

Les malformacions de Chiari són un grup de malformacions congènites caracteritzades per l'herniació caudal del contingut de la fossa cranial posterior (FCP) a través del forat magne cap el canal espinal (Chiari, 1987) (Figura 1).

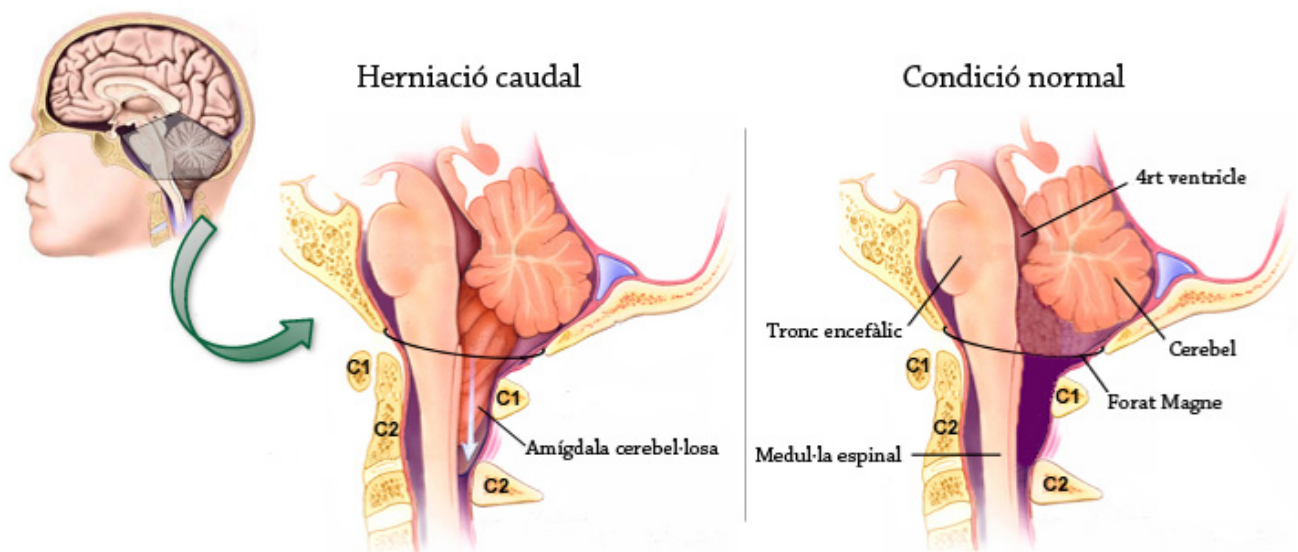


Figura 1. Fossa cranial posterior. En petit, es mostra un cap humà on se situa la FCP ombrejada en gris. Ampliat, es mostra la fossa cranial posterior: a l'esquerra, amb l'herniació caudal de les amígdales cerebel·loses; a la dreta, en situació normal amb el seu contingut (cerebel, tronc encefàlic, quart ventricle) i la medul·la espinal.

El concepte d'aquestes malformacions va sorgir a finals del segle XIX, a partir de les descripcions que el patòleg austríac Hans Chiari (1851-1916) va realitzar en diverses autòpsies; on va observar els canvis que es produïen al cerebel (descens cerebel·lós) com a conseqüència de la hidrocefàlia. Va descriure fins a tres tipus de canvis patològics en funció de la severitat del desplaçament de les estructures romboencefàliques (cerebel, quart ventricle i pons) (Bejjani, 2001). Anys més tard, a partir de 4.276 cadàvers estudiats entre els anys 1889 i 1892, la classificació es va ampliar amb un quart tipus, basat en la hipoplàsia del cerebel sense extensió cap al canal espinal.

Donat que en la mateixa època, però de manera independent, les troballes pròpies del segon tipus que havia descrit Chiari van ser observades també per altres autors, com Cleland i Arnold, alguns autors procedents dels seus grups van començar a anomenar a aquest tipus d'anomalia com a "Malformació d'Arnold-Chiari" i van designar la "Deformitat de Chiari" al primer tipus d'anomalia descrita pel patòleg austríac.

Al llarg del segle XX, es van anar descrivint casos aïllats o petites sèries en què s'anava aportant nova informació sobre aquestes malformacions (edat, símptomes, etc...), però no va ser fins els anys 70 que el terme *malformació de Chiari* va guanyar popularitat i es van publicar llargues sèries. Aquesta tendència va augmentar considerablement en les següents dècades gràcies a l'aparició de tècniques de diagnòstic millors (Bejjani, 2001; Koehler, 1991).

1.2. Tipus de malformació de Chiari

Actualment, podem distingir fins a sis tipus de malformació de Chiari:

- **Tipus I:** Malformació donada pel desplaçament caudal de les amígdales cerebel·loses a través del forat magne. Actualment es considera malformació de Chiari tipus I (MCI) aquella en què l'herniació amigdalària iguala o supera els 3 mm. Sovint està associada a la siringohidromièlia. És el tipus de malformació de Chiari més freqüent (Figura 2a).
- **Tipus II, també coneguda com a malformació d'Arnold-Chiari:** Malformació caracteritzada pel descens de les amígdales cerebel·loses (DA), bulb raquídi i quart ventricle a través del forat magne. S'acompanya típicament de mielomeningocele i hidrocefàlia. Els pacients presenten dèficits motors i sensitius com a conseqüència del disrafisme espinal (Figura 2b).
- **Tipus III:** Malformació produïda per l'herniació del cerebel i el tronc encefàlic cap a un encefalocèle occipital. És incompatible amb la vida (Figura 2c).
- **Tipus IV:** A diferència dels tres primers tipus, no és deguda a una herniació del cerebel ni de cap estructura romboencefàlica, sinó a una hipoplàsia o aplàsia del cerebel (Figura 2d).

- **Tipus 0:** Fou descrit per primer cop l'any 1998. Caracteritzada per una FCP plena, que condiciona l'alteració del flux de líquid cefaloraquídi (LCR) a nivell del forat magne. En aquest cas no hi ha una herniació cerebel·losa o si n'hi ha, no arriba als 3mm (Figura 2e) (Iskandar et al., 1998).
- **Tipus 1.5:** Malformació amb descens de les amígdals cerebel·loses junt amb una elongació del tronc encefàlic i el quart ventricle, tot produint-se una anomalia de gravetat intermèdia entre els tipus I i II (Figura 2f) (Capra et al., 2009; Kim et al., 2010; Snyder, 2008).

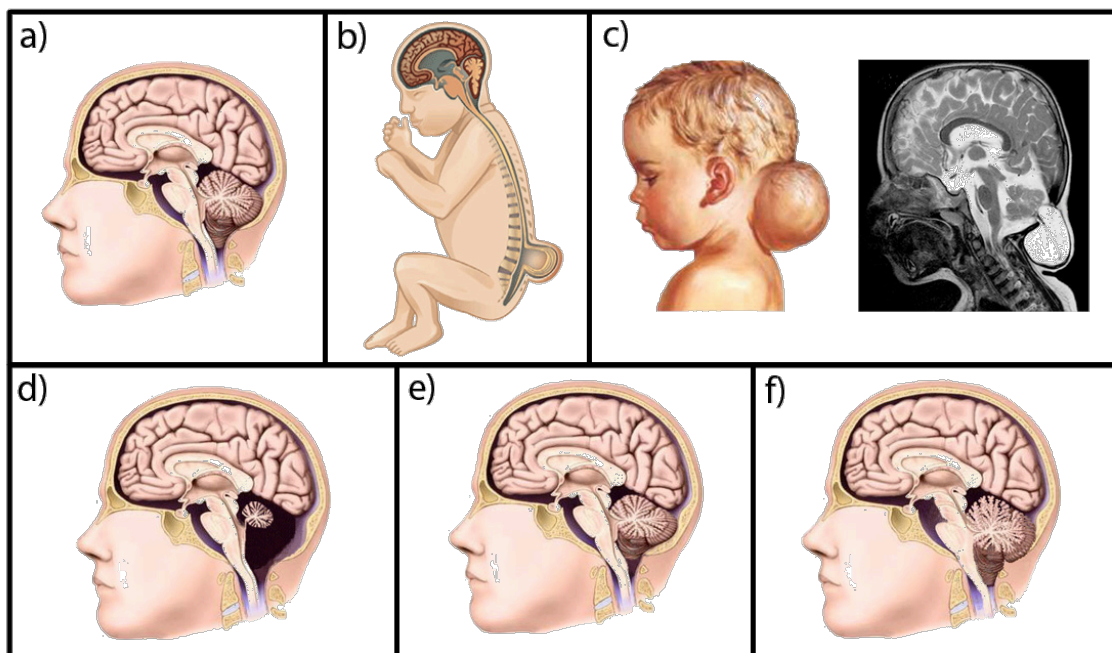


Figura 2. Diferents tipus de malformació de Chiari. En a) es mostra la malformació de Chiari tipus I; en b) la malformació de Chiari tipus II amb mielomeningocele sacral; en c) malformació de Chiari tipus III amb encefalocele occipital; en d) malformació de Chiari tipus IV; en e) malformació de Chiari tipus 0 i en f) malformació de Chiari tipus 1.5.

Aquest treball se centra bàsicament en la MCI, tot i que en algun dels apartats s'han inclòs casos amb malformació de Chiari tipus II (MCII).

1.3. Característiques clíniques generals de la malformació de Chiari tipus I

1.3.1. Presentació clínica

La definició de la MCI es basa en el DA, però fins ara no sembla haver-hi correlació entre la severitat de la simptomatologia i el grau d'ectòpia (Duddy and Williams, 1991; Elster and Chen, 1992; McGirt et al., 2005; Milhorat et al., 1999; Nash et al., 2002; Sekula et al., 2005; Tubbs et al., 2001b; Ventureyra et al., 2003). Això es deu al fet que hi ha diferents mecanismes que produeixen la simptomatologia de la MCI. Com a conseqüència d'aquesta divergència de mecanismes, el ventall de manifestacions clíniques que poden presentar els pacients és molt ampli, fent molt difícil definir la MCI per la simptomatologia: hi ha pacients que no presenten cap tipus de símptoma (asimptomàtics), i pacients que en presenten, els quals descriuen un quadre clínic que pot variar tant en gravetat com en la combinació de símptomes.

Es tracta de símptomes que van augmentant amb el pas del temps i sempre estan associats a una disfunció neurològica (del cerebel, tronc encefàlic o medul·la espinal) causada principalment per la compressió directa del teixit neural a la unió craniovertebral, i de manera secundària, per les alteracions en la circulació del LCR (que poden produir hidrocefàlia i/o siringomièlia) (Figura 3). Sovint, els

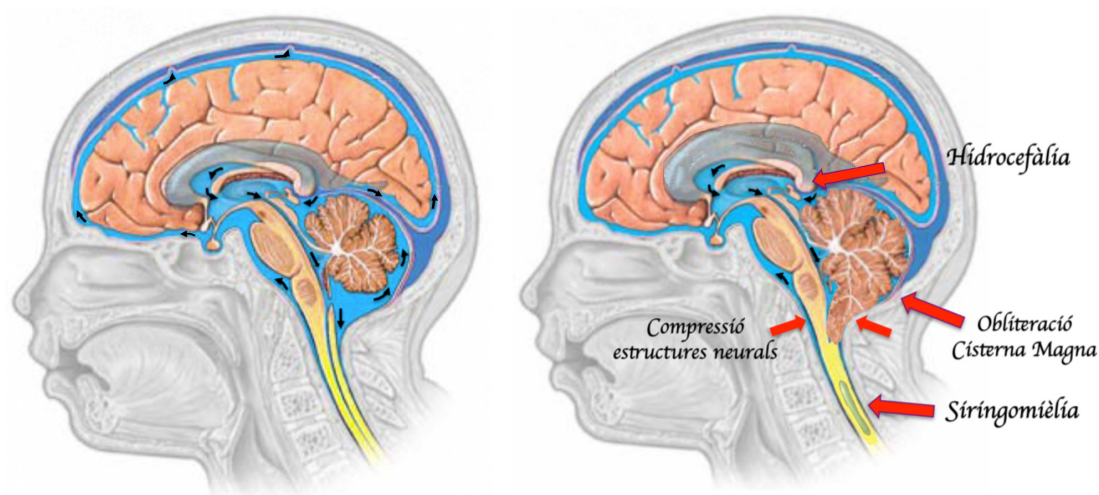


Figura 3. Mecanismes que produeixen els símptomes en la malformació de Chiari tipus I. En el dibuix de la dreta es mostra la compressió de les estructures neuronals a la unió craniovertebral i l'alteració de la circulació del líquid cefaloraquídi per manca d'espai, desencadenant hidrocefàlia i/o siringomièlia. A l'esquerra es mostra un individu sa.

síntomes són produïts/magnificats per altres síndromes que es donen conjuntament amb la MCI, com són l'aracnoïditis, les malformacions òssies de la xarnera craniocervical i l'escoliosi (veure Apartat 1.4 de la Introducció). En alguns casos, aquests símptomes han arribat a produir la mort del pacient (Martinot et al., 1993).

1.3.2. Síntomes i síndrome clínica

Les manifestacions clíniques de la MCI comprenen diferents àrees del sistema nerviós central, incloent el sistema visual, el sistema neuro-auditiu, els parells cranials baixos, el cerebel i les vies motores i sensibles, entre d'altres.

➤ Síntomes secundaris a l'alteració de la dinàmica de flux del LCR:

El símptoma més comú és el mal de cap suboccipital (81%). Els pacients el descriuen com una sensació de pesadesa, aixafament o pressió a la part posterior del cap que s'irradia cap amunt, darrera els ulls i cap a la part inferior del coll i les espatlles. Els mals de cap s'accentuen quan es realitza un esforç físic, maniobres de Valsalva (com riure, esternudar o tossir) i canvis de postura. Les pacients en edat menstrual tendeixen a experimentar una accentuació dels símptomes durant la setmana anterior a la menstruació.

➤ Síntomes produïts per la compressió de la medul·la o el bulb raquidi:

En els casos en què es produeix compressió medul·lar o bulbar, apareixen símptomes de compromís de vies motores, sensibles o de parells cranials baixos que es manifesten produint: debilitat i espasticitat en les extremitats (en les superiors apareixen en un 44% dels casos i en les inferiors, en un 39%); alteracions sensibles en extremitats superiors, sobretot, parestèsies (61%); alteracions esfinterianes; apnea; disàrtria, disfonia i disfàgia; neuràlgia del trigemin; sordesa neurosensorial; bradicàrdia sinusal o palpitations; síndrome cerebel·losa (inestabilitat i dismetria en les extremitats), i en els casos associats a siringomièlia, a més, síndrome centromedul·lar (debilitat segmentària, atròfia de les mans i pèrdua de la sensibilitat per a la temperatura i el dolor) (Fernández Cornejo, 2007).

Per altra banda, hi ha una sèrie de símptomes que poden originar-se tant per l'alteració del LCR com per la compressió de la medul·la. Les cervicàlgies, també

molt freqüents en els pacients amb MCI, solen anar acompanyades de molèsties contínues, urents i profundes, localitzades a les espatlles, clatell, pit i extremitats superiors, que també augmenten amb maniobres de Valsalva. També, com a conseqüència de l'alteració del LCR i/o de la compressió de la medul·la, es poden donar alteracions visuals: dolor o pressió retro-orbitària, fenòmens visuals com llums intermitents, visió borrosa, fotofòbia, diplopia, nistagmes i reducció del camp visual; i símptomes relacionats amb alteracions otoneurològiques semblants als de la malaltia de Ménière (74%): marejos, desequilibri, pressió a les oïdes, pèrdua d'audició, tinnitus, vertigen i oscilòpsia. La disfàgia, l'apnea de la son, disàrtria, tremolors, palpitations i falta de coordinació són altres símptomes que sovint presenten els pacients i que poden ser produïts per una d'aquestes causes. La major part d'aquests símptomes també poden accentuar-se pels mateixos factors que ho fan amb les cefalees suboccipitals (Fernández Cornejo, 2007).

S'ha vist que hi ha pacients amb MCI que presenten anomalies en la funció orofaríngia: manifesten símptomes com tos, estridor, disfàgia, moviment anormal de les cordes vocals, reflux gastroesofàgic, aspiració, infeccions respiratòries recurrents, intolerància a l'alimentació o retràs del creixement (Greenlee et al., 2002).

També es descriuen símptomes com la fatiga crònica (57%), problemes de memòria (39%), dolor lumbar, nàusees o vòmits episòdics (Milhorat et al., 1999).

El quadre clínic és molt semblant en adults i en nens: només varia en la freqüència d'ocurrència d'apnees de la son i problemes en l'alimentació, que són més elevades en nens que en adults (Greenlee et al., 2002).

1.3.3. Signes

Des del punt de vista fenotípic, fins el 25% dels pacients amb MCI poden tenir un coll curt amb posició baixa dels pavellons auriculars, i en els casos en què hi ha associada siringomièlia, a més, es pot donar levoescoliosi. Aquests pacients, a més, poden presentar diferents combinacions de signes neurològics, derivats de l'afectació de diferents estructures nervioses (Fernández et al., 2009; Fernández Cornejo, 2007):

- Primera motoneurona: hiperreflèxia generalitzada i espasticitat predominant en les extremitats inferiors, i signe de Babinski.
- Segona motoneurona: atròfia, debilitat, fasciculacions i areflèxia. Sobretot, en les extremitats superiors.
- Sistema sensitiu: síndrome centromedul·lar característic de la siringomièlia.
- Ocular: papil·ledema, absència del pols venós, visió borrosa i parèsia oculomotora.
- Auditiu: hipoacúsia neurosensorial.
- Cerebel·lós: nistagme, atàxia i dismetria.
- Parells cranials baixos: paràlisi de les cordes vocals, debilitat del paladar tou, atròfia lingual amb fasciculacions i absència del reflex nauseós. Afecten a un 15-25% dels casos.

Tot i haver-hi un criteri de diagnòstic (veure Apartat 1.5 de la Introducció) i els signes indicatius esmentats, a causa del desconeixement de la malaltia (considerada inicialment com a malaltia rara) i a que els símptomes de presentació de MCI són imprecisos i comuns als d'altres malalties, sovint els diagnòstics són erronis i es confonen amb els de la fibromiàlgia, l'esclerosi múltiple, l'esclerosi lateral amiotròfica, migranyes i trastorns psiquiàtrics (Milhorat et al., 1999; Paulig and Prosiegel, 2002).

1.4. Complicacions associades

La MCI es pot associar amb una freqüència variable, a les següents anomalies:

➤ **Siringomièlia:** Es defineix com una cavitat intramedul·lar que conté LCR que obstrueix i degenera la medul·la espinal, produint pèrdua dissociada de la sensibilitat i amiotròfia (Roth, 1981) (Figura 4).

Es creu que la seva formació és deguda a l'obstrucció del flux del LCR a nivell del forat magne. Com a conseqüència, és magnífica l'onada del pols sistòlic a l'espai subaracnoïdal espinal i condueix el LCR a través dels espais intersticials i perivasculars anatòmicament continus cap al canal central de la medul·la espinal (Fischbein et al., 1999; Oldfield et al., 1994)(Figura 5).

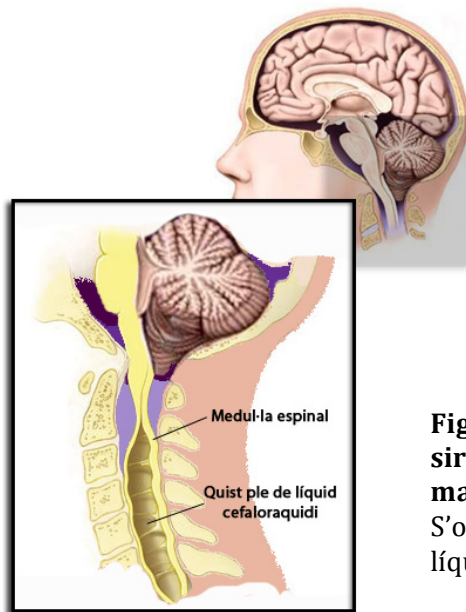


Figura 5. Representació gràfica de la siringomièlia en un pacient amb malformació de Chiari tipus I. S'observa la cavitat intramedul·lar amb líquid cefaloraquidi.

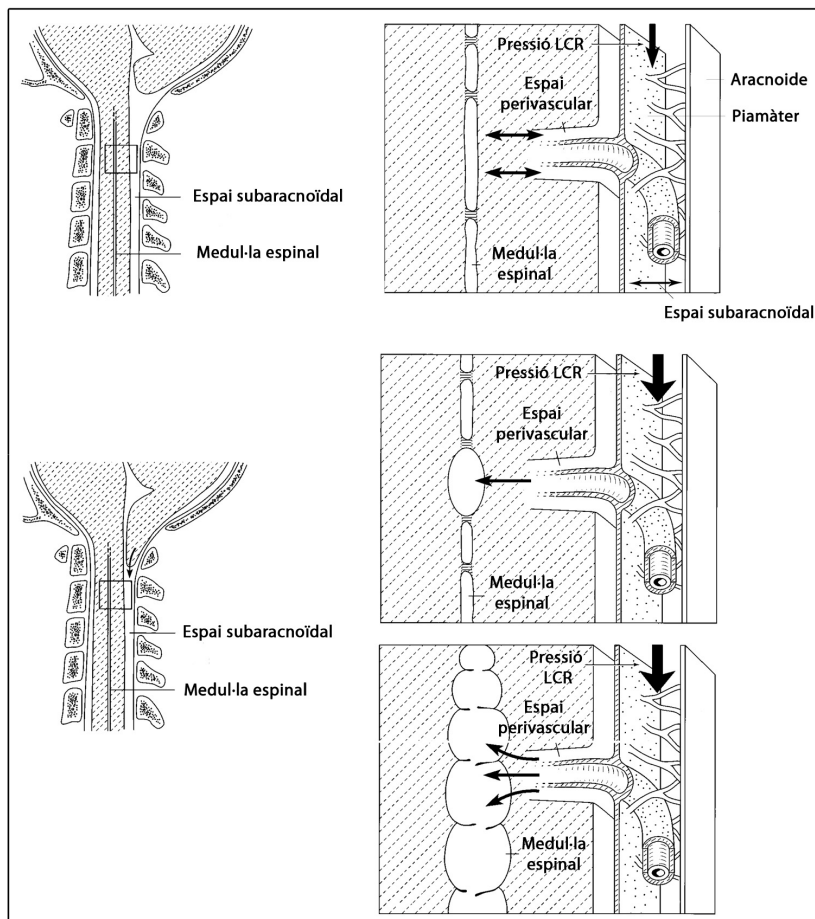


Figura 4. Formació de quists siringomièlics. A la part superior es mostra l'estat normal. A la part inferior, la formació dels quists en passar el LCR cap al canal central, degut a l'augment de pressió que origina el DA en el forat magne. (Dibuix adaptat de Fischbein et al., 1999; Wittler et al., 2007).

Clàssicament, s'ha diferenciat entre siringomièlia i hidromièlia. La siringomièlia definiria aquelles cavitats que es formen a la medulla espinal i es troben separades del conducte endimari central i revestides de cèl·lules glials (Batzdorf, 1991). La hidromièlia, en canvi, es caracteritza fonamentalment per una dilatació del conducte central, i està revestida, almenys parcialment, de cèl·lules endimàries (Batzdorf, 1991). La dificultat per diferenciar ambdós tipus de lesions i el solapament entre elles, van conduir a introduir el terme siringohidromièlia per agrupar ambdós tipus, que s'utilitza habitualment.

La siringomièlia és la patologia associada a MCI més freqüent. S'ha arribat a considerar que entre un 30-75% dels pacients amb MCI presenta una siringomièlia/hidromièlia associada (Karagoz et al., 2002; Milhorat et al., 1999; Sahuquillo and Poca, 1998), i quan existeix, és la causant de la major part de la simptomatologia en els pacients de MCI.

➤ **Hidrocefàlia:** És una alteració caracteritzada principalment per l'acumulació d'un excés de LCR al cervell que produeix una dilatació anòmala dels ventricles. Com a conseqüència, es genera una compressió del teixit cerebral contra el crani i origina problemes neurològics seriosos (Figura 6).

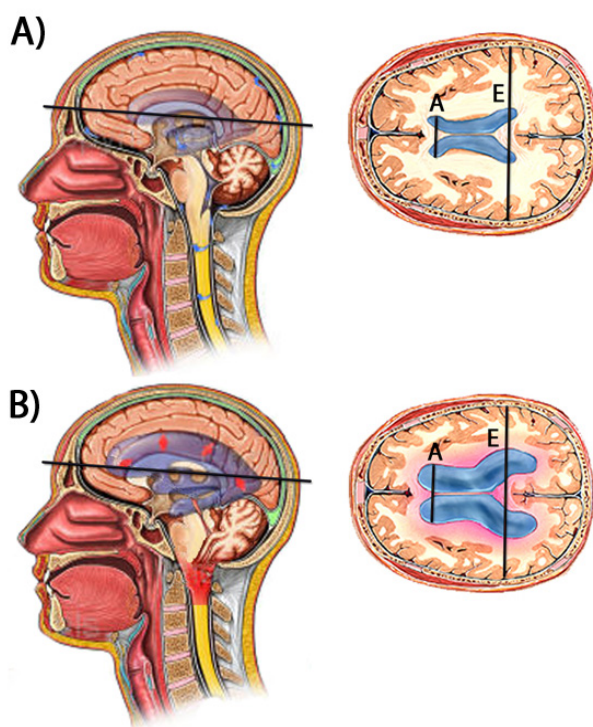


Figura 6. Hidrocefàlia. Tall sagital i axial del crani. En: A) estat normal; en B) amb hidrocefàlia on es veuen els ventricles dilatats. A i E fan referència als paràmetres morfomètrics utilitzats per calcular l'Índex d'Evans (veure text).

Per saber si hi ha dilatació del sistema ventricular supratentorial, es fa servir l'Índex d'Evans, que s'obté del quocient entre la distància màxima existent entre les dues banyes frontals dels ventricles laterals (A) i la distància màxima entre les dues parets internes del crani en el mateix tall en el que s'ha avaluat el paràmetre anterior (E) (Evans, 1942) (Figura 6). Els índexs superiors a 0,30 indiquen dilatació ventricular. En la MCII, la hidrocefàlia és constant; en canvi, la prevalença en MCI és sensiblement inferior (Sahuquillo and Poca, 1998).

➤ **Malformacions òssies de la xarxera craniocervical:** Són aquelles alteracions òssies que es donen en la zona d'inserció entre la columna vertebral i la base del crani i afecten els moviments de la columna cervical. Poden afectar l'os occipital o les dues primeres vèrtebres cervicals, alterant el forat magne i disminuint l'espai ocupat pel tronc encefàlic i la medul·la espinal. Les més freqüents en la MCI són:

- Platibàsia: Anomalia òssia consistent en l'aplanament de la base del crani. El diagnòstic es realitza amb imatge per ressonància magnètica (IRM) o radiografia, i es basa en la mesura de l'obertura de l'angle basal de Boogard, que té com a valor normal entre 115-140°. Quan supera els 140° es considera que hi ha platibàsia (Royo-Salvador, 1996)(Figura 7).

La platibàsia en si no dona símptomes, però normalment està acompanyada d'altres malformacions.

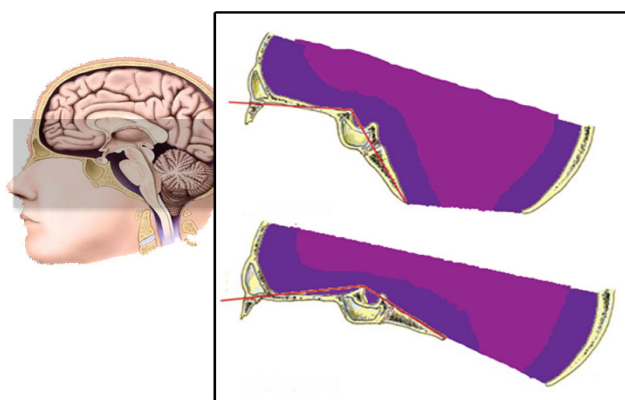


Figura 7. Base del crani amb l'angle de Boogard. A la part superior amb obertura <140° (estat normal) i a la part inferior amb obertura >140° (platibàsia).

- Invaginació o impressió basilar (IB): Aquest terme s'aplica a qualsevol desplaçament cap amunt de la base cranial. Hi ha diferents criteris morfomètrics observats en radiografies o IRM que permeten determinar quan hi ha impressió basilar. Es parla d'IB quan la punta de la dent de l'axis sobrepassa en 5mm la línia de McGregor, 2,5mm en el cas de la línia de Chamberlain, o simplement quan se sobrepassa la línia de Mc Rae (Pang and Thompson, 2011) (Figura 8).

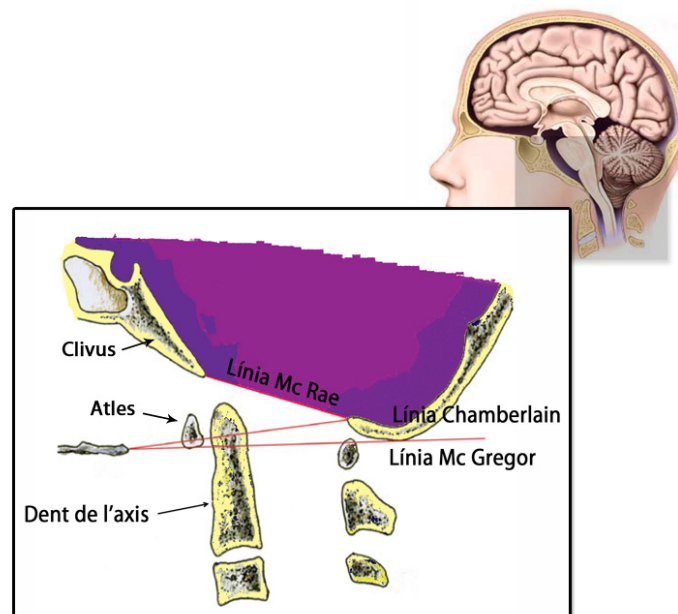


Figura 8. Impressió basilar. A la figura es mostren les línies que s'utilitzen en els diferents criteris morfològics que poden ser aplicats per avaluar aquesta malformació de la xarxa craniocervical.

Quan hi ha IB s'observa un forat magne (línia de Mc Rae) més petit, deformat i desplaçat cap amunt dins la cavitat cranial. El clivus està elevat, l'atles poc desenvolupat i la dent de l'axis es projecta cap endavant i amunt, envaint el canal espinal. Aquests pacients pateixen sobretot torticolis, limitacions dels moviments cervicals i dolors cervicodorsals constants. Les manifestacions neurològiques que presenten són les pròpies d'una compressió a la medulla cervical superior. Es pot donar conjuntament amb la siringomièlia i la hidrocefàlia (Royo-Salvador, 1996).

- Retrocés de la dent de l'axis: És una malformació de la porció superior de la columna cervical consistent en la basculació cap enrere de l'apòfisi de la dent de l'axis (odontoide retrocorva), arribant a desplaçar i comprimir les estructures

nervioses adjacents. El diagnòstic és radiològic, i es pot determinar mesurant l'angle que forma la punta de la dent de l'axis amb la seva base (Tubbs et al., 2003) (Figura 9).

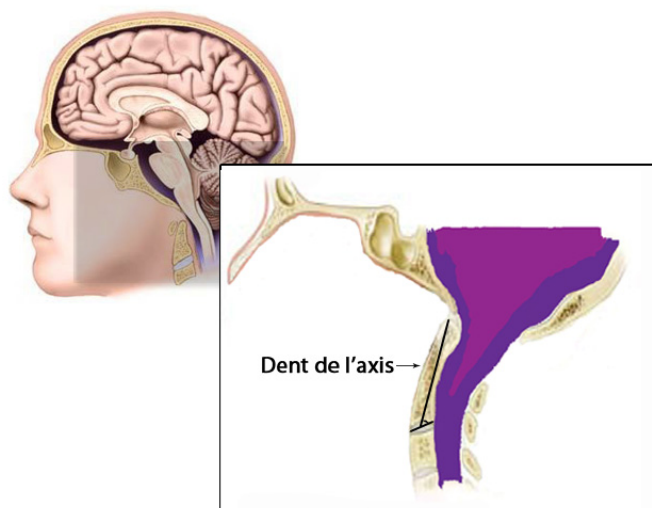


Figura 9. Retrocés de la dent de l'axis. La figura mostra l'angle que forma la punta de la dent de l'axis amb la seva base.

La simptomatologia és conseqüència de la compressió de l'apòfisi de la dent de l'axis sobre el tronc cerebral i les estructures vasculares immediates.

Donat que aquestes alteracions no es detecten si no es fa un estudi rigorós dirigit específicament a l'estudi ossi de la xarnera craniocervical, és difícil establir una prevalença exacta d'aquestes alteracions de la xarnera craniocervical en pacients amb la MCI. En diversos estudis realitzats s'ha descrit que entre un 11 i un 14% de casos amb MCI presentaven IB (Karagoz et al., 2002; Milhorat et al., 2007; Milhorat et al., 1999), un 14% platibàsia (Karagoz et al., 2002) i un 26,4%, retrocés de la dent de l'axis (Milhorat et al., 1999).

➤ **Aracnoïditis:** Fa referència a la inflamació de la membrana aracnoïdal, que pot arribar a provocar la unió parcial de les membranes de les meninges produint, aleshores, un deteriorament de la circulació del LCR i diversos trastorns neurològics (Figura 10).

En els pacients amb MCI es creu que és secundària i no congènita, produïda per la fricció repetida entre les amígdals del cerebel herniades contra les

leptomeninges i la duramàter en la regió del forat magne (Banerji and Millar, 1974). Per aquest motiu, l'aracnoïditis és més freqüent en els pacients amb més temps d'evolució amb MCI.

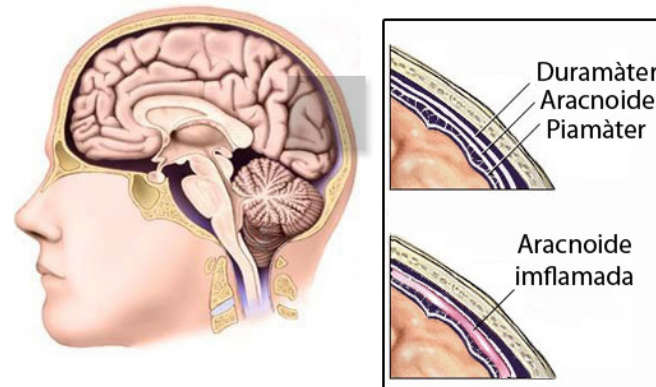


Figura 10. Aracnoïditis. Es mostren les diferents membranes de la meninge: duramàter, aracnoide i piamàter. En inflamar-se l'aracnoide (meninge intermitja), les membranes poden entrar en contacte entre elles i dificultar el pas del LCR i produir diversos trastorns neurològics.

➤ **Escoliosi:** Fa referència a la curvatura anòmala de la columna vertebral, superior a 10° segons el mètode de medició de Cobb, associada a la rotació vertebral (Kane and Moe, 1970). En general, l'escoliosi que presenten els pacients amb la MCI sol ser dolorosa, de ràpida progressió i de curvatura toràcica esquerra (Anson et al., 1997). En aquests individus es creu que podria ser produïda per l'alteració progressiva de la motoneurona, amb la conseqüent denervació dels músculs paravertebrals.

La seva freqüència en adults amb MCI és del 40-70% (Anson et al., 1997; Milhorat et al., 1999); en canvi, en MCI pediàtrica sol ser un dels símptomes més comuns (Greenlee et al., 2002; Tubbs et al., 2011a).

A més, s'ha vist que l'escoliosi és freqüent en aquells casos amb siringomièlia associada: prop del 16% en adults, i 82% en casos amb edats inferior als 20 anys (Isu et al., 1990).

1.5. Diagnòstic

A causa de la gran variabilitat en la manifestació clínica i a la seva prevalença (Apartats 1.3.2 i 1.6.1 de la Introducció, respectivament), i a que cap símptoma és

específic i únic de la malaltia, realitzar el diagnòstic en funció dels símptomes no és fàcil. Per aquest motiu, al llarg del temps s'han definit diversos criteris radiològics per tal de diagnosticar la MCI, la major part dels quals es basen en els mm de descens de les amígdales cerebel·loses cap el canal espinal cervical.

➤ Diagnòstic en l'era pre-IRM

Cap al 1970, abans que sorgís la IRM, alguns autors com Baker, O'Connor i Bloch, van intentar determinar i definir mitjançant mielogrames quina era la posició normal de les amígdales cerebel·loses i a partir de quin punt un descens podia considerar-se patològic. Tot i que van coincidir en situar la seva posició normal per sobre de la línia de Mc Rae (que va de l'opístion al bàsion) (Figura 11) i la patològica per sota, el fet que observessin que altres malalties del sistema nerviós central podien produir també ectòpia de les amígdales, i que es trobés també, de manera incidental, en individus sans, va fer que no aconseguissin establir un criteri definit per diagnosticar la MCI (Bejjani, 2001).

Amb el temps, aquesta tècnica es va anar substituint per la tomografia computeritzada (TC) (TAC i mielo-TAC), ja que era menys dolorosa, el pacient requeria menys temps d'exposició a la radiació i s'evitaven o, en el cas de les mielo-TAC es reduïen, les reaccions adverses produïdes pels medis de contrast utilitzats en la mielografia.

➤ Diagnòstic en l'era IRM

Donat que en la TAC no es visualitzen bé els teixits tous, i en la mielo-TAC cal la injecció d'un contrast, en els darrers anys, aquestes tècniques han anat sent substituïdes pel diagnòstic per IRM, que permet realitzar estudis estructurals cerebrals d'alta resolució.

Amb la IRM s'ha seguit intentant definir un criteri definit basat en el DA per diagnosticar la MCI radiològicament. A partir de 1985 es van realitzar diferents estudis per mesurar la posició de les amígdales en població control i en població amb MCI, però cada autor va proposar un punt de tall diferent per establir el descens patològic (Taula 1) (Aboulezz et al., 1985; Barkovich et al., 1986; Ishikawa et al., 2004). Es van arribar a proposar diferents punts de tall en funció de si el descens es presentava en una o en les dues amígdales (Elster and Chen,

1992) o, fins i tot, es van proposar diferents punts de tall en funció de l'edat del pacient (Mikulis et al., 1992)(Taula 2).

Taula 1. Criteris radiològics basats en el DA suggerits per al diagnòstic de la MCI al llarg dels anys. S'indica l'any de publicació de l'estudi, el nombre d'IRM que es van estudiar, la conclusió de cada estudi i la referència. També es mostren els primers estudis que qüestionen el criteri basat en el DA.

Any	Població control		Població MCI		Conclusió	Referència
	nº IRM	Posició AC*	nº IRM	Posició AC*		
1985	82	de -20mm a 2.8mm	11	de 5.2mm a 17.7mm	Els controls poden tenir fins a 3 mm; es considera MCI si >5mm.	(Aboulez et al., 1985)
1986	200	de -8mm a 5mm	25	de 3mm a 29mm	Es considerar MCI si >2mm	(Barkovich et al., 1986)
1988	50	Sempre per sobre forat magne	6		En controls, les amígdales cerebel·loses estan situades per sobre del forat magne.	(Ishikawa et al., 1988)
1992	-	-	68		>5mm quan només baixa una amígdala, i >3mm quan baixen les dues	(Elster and Chen, 1992)
1992	-	-	220		La posició de les amígdales varia amb l'edat	(Mikulis et al., 1992)
1998	-	-	5	No DA	Estableix concepte de MC0	(Iskandar et al., 1998)
2001	50		6	No DA	Confirma conclusió Iskandar	(Tubbs et al., 2001b)
1999	50		364	32 (9%) amb <5mm però amb compressió espais LCR	Qüestiona el límit patològic en 5mm quan hi ha compressió espai LCR	(Milhorat et al., 1999)
2000	Estudi retrospectiu de 22.591 IRM on 0,77% presentaven >5mm, dels quals 14% eren asimptomàtics				El diagnòstic basat en l'ectòpia amigdalària és limitat	(Meadows et al., 2000)

AC= amígdales cerebel·loses. Els valors negatius, fan referència a les AC situades per sobre de la línia de Mc Rae; en valors positius, quan es van trobar per sota.

Taula 2. Posició de les amígdales cerebel·loses per sota del forat magne en funció de l'edat de diagnòstic de la MCI segons Mikulis i col·laboradors.

Edat	Límit posició amígdales cerebel·loses
1 ^a dècada	6mm
2 ^a -3 ^a dècada	5mm
4 ^a -8 ^a dècada	4mm
9 ^a dècada	3mm

Actualment, s'ha establert que un pacient es diagnostica amb MCI quan radiològicament presenta almenys 3 mm de DA, independentment de la seva simptomatologia (Figura 11).

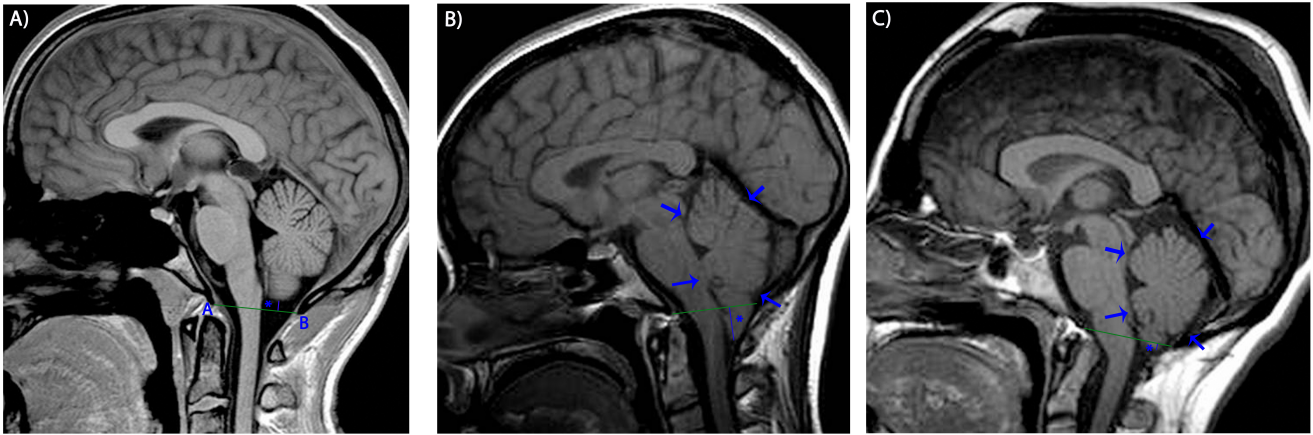


Figura 11. Imatges de ressonància magnètica de: A) control, B) MCI i C) MC0. L'actual criteri de diagnòstic basat en el DA s'ha assenyalat amb (*), que es determina marcant una línia perpendicular a la línia de Mc Rae (que va del bàsion (A) a l'opístion (B)) fins la punta de l'amígdala cerebel·losa. Les fletxes marquen els espais del LCR comprimits.

Però aquest criteri basat únicament en el DA s'ha posat en dubte ja que s'ha observat que no hi ha correlació entre el grau de DA i la gravetat dels símptomes que presenten els malalts (Trigylidas et al., 2008): Meadows i col·laboradors van identificar casos asimptomàtics amb més de 5 mm d'herniació amigdalar (Meadows et al., 2000); per altra banda, s'han descrit pacients amb els mateixos símptomes que els d'un pacient amb MCI, amb compressió dels espais del LCR i siringomièlia, que no presenten DA (Iskandar et al., 1998; Tubbs et al., 2001b), i que, seguint el criteri més comunament acceptat, no es poden considerar com a pacients amb MCI (són els actualment classificats com a pacients amb Malformació de Chiari tipus 0 (MC0)) (Figura 11).

Com s'ha comentat anteriorment (veure Apartat 1.3 de la Introducció), la MCI presenta símptomes comuns a d'altres malalties, i malgrat haver-hi un criteri de diagnòstic radiològic, el desconeixement per part de molts professionals, ha conduït a un infradiagnòstic durant molt de temps.

1.6. Epidemiologia

1.6.1. Prevalença de la MCI

Parlar de prevalença i incidència en MCI és força complicat, ja que fins fa relativament poc era una malaltia pràcticament desconeguda que tan sols uns pocs metges eren capaços d'identificar i diagnosticar correctament.

No hi ha massa dades sobre la incidència i prevalença d'aquesta malaltia: l'any 2000 es va realitzar un estudi retrospectiu a Baltimore basat en l'anàlisi de 22.591 IRM cranials, en què es va estimar una prevalença (considerant MCI quan es presentés DA de $\geq 5\text{mm}$) de 1/1280 (0,77%) i 0,11% de casos asimptomàtics (Meadows et al., 2000); i l'any 2003, Speer i col·laboradors, van estimar que uns 215.000 americans presentaven MCI amb o sense siringomièlia (Speer et al., 2003).

Diferents estudis van determinar la prevalença de MCI en troballes incidentals, analitzant IRMs de "població general sana" i van estimar-la entre un 0,24% i 0,9% (Furuya et al., 1998; Morris et al., 2009; Vernooij et al., 2007).

Però considerant que Meadows va utilitzar un criteri de definició de MCI estricta, i que no tots els individus asimptomàtics són identificats, es pot afirmar que la prevalença és superior a la descrita fins ara.

Respecte a la incidència, s'ha establert que en la MCI es troba entre el 0,56% i el 0,77%, essent asimptomàtics un 15-30% d'aquests casos (Fernández Cornejo, 2007).

1.6.2. Distribució de la MCI per edat i sexe

La distribució de MCI varia també amb l'edat i el sexe.

Pel que fa a l'edat, la MCI es caracteritza perquè els primers símptomes es presenten generalment durant la segona-tercera dècada de vida (Milhorat et al., 1999; Nishikawa et al., 1997; Schady et al., 1987; Stovner et al., 1993). En els darrers anys, però, s'han descrit casos de MCI en persones d'edat avançada (Geroldi et al., 1999; Halpin et al., 1990), i ha augmentat el nombre de nens

diagnosticats amb aquest tipus de malformació (Aitken et al., 2009; Greenlee et al., 2002; Sgouros et al., 2007; Tubbs et al., 2011b; Tubbs et al., 2007),.

Respecte al sexe, diversos estudis (realitzats tant amb pacients simptomàtics com pacients asimptomàtics) semblen mostrar un predomini en dones, en proporcions que van des de 1.3 a 3.1 (Elster and Chen, 1992; Furuya et al., 1998; Meadows et al., 2000; Milhorat et al., 1999; Saez et al., 1976).

1.7. Fisiopatologia de la malformació de Chiari tipus I

1.7.1. Recorregut per les diferents teories proposades

➤ Hidrocefàlia com a desencadenant: La hipòtesi que és la hidrocefàlia el factor desencadenant va ser proposada pel mateix Chiari l'any 1891. Segons aquesta teoria, la hidrocefàlia conduiria a una desproporció entre el continent cranial, en especial de l'espai infratentorial, i el contingut neural, situació que provocaria una herniació de part del cerebel i/o tronc de l'encèfal cap al canal cervical (Chiari, 1987). Va ser descartada en observar-se que no hi havia correlació entre el grau d'hidrocefàlia i la magnitud de l'ectòpia amigdal·lar i actualment, la hidrocefàlia es considera un fenomen secundari en la MCI.

➤ Teoria de la tracció medul·lar: Va ser introduïda per Penfield i Coburn al 1938 per explicar la MCII en observar de manera freqüent en aquests pacients la medul·la ancorada en la mielomeningocele. Posteriorment, i per extensió, es va aplicar també per justificar l'herniació amigdal·lar existent en la MCI. La teoria consistia en que aquesta medul·la ancorada, juntament amb la posició anòmala dels parells cranials i les arrels cervicals, provocaven una tracció anòmala del tronc de l'encèfal i del cerebel en sentit descendent. La hidrocefàlia existent en la major part dels pacients ajudava al desenvolupament del procés, generant un vector de força que actuaria també en aquest sentit (Penfield and Coburn, 1938). Posteriorment, s'han descrit diversos estudis clínics i experimentals que contradiuen aquesta teoria (Goldstein and Kepes, 1966).

➤ Teoria de la hipertròfia focal del sistema nerviós central: va ser introduïda per Barry i els seus col·laboradors al 1957, i es basava en el creixement anòmal del sistema nerviós central que s'iniciaria aproximadament

durant la 4^a setmana del desenvolupament embrionari. L'encèfal s'hipertrofiaria d'una manera anormal, tot provocant un descens del tentori que condicionaria un espai infratentorial de dimensions reduïdes. El creixement anòmal del romboencèfal i del cerebel, i la reducció volumètrica del compartiment infratentorial, provocaria l'herniació de les estructures anatòmiques de la FCP a través del forat magne. Segons aquesta teoria, el bloqueig de les cisternes i del forat magne explicarien la hidrocefàlia (Barry et al., 1957).

➤ Altres teories: Hi ha altres teories que assenyalen l'escoliosi idiopàtica com a factor etiològic comú de la MCI, la platibàsia, l'IB i lairingomièlia. L'escoliosi idiopàtica associada a una desproporció entre el creixement raquidi i el medul·lar provocaria secundàriament una tracció en sentit descendent del tronc encefàlic i les amígdals del cerebel (Royo-Salvador, 1996; Royo-Salvador, 1997).

1.7.2. Teoria del dèficit de desenvolupament basioccipital

Actualment es creu que la patogènesi de la MCI és el resultat d'una insuficiència primària del mesoderma paraxial que es dona en l'etapa de desenvolupament embrionari immediatament posterior al tancament dels plects neurals. Aquesta insuficiència del mesoderma dona lloc a un os basioccipital més petit que forma una FCP subdesenvolupada dins de la qual se situen les estructures romboencèfals (cerebel, el pont de Varoli i el bulb raquidi) de mida normal. Aquestes, per tal d'adaptar-se a un espai significativament reduït, queden comprimides entre elles, i s'hernien a través de l'únic forat per on poden sortir (el forat magne) (Figura 12) (Marin-Padilla, 1966; Marin-Padilla, 1979; Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981).

Les observacions experimentals de Marín-Padilla han estat recolzades posteriorment per un gran nombre d'estudis morfomètrics realitzats en talls sagitals cranials en IRM, on demostren que els pacients de MCI (i MC0) presenten una FCP significativament més petita, degut a la hipoplàsia de l'os occipital (Aydin et al., 2005; Badie et al., 1995; Karagoz et al., 2002; Milhorat et al., 1999; Nishikawa et al., 1997; Noudel et al., 2009; Schady et al., 1987; Vega et al., 1990) (Figura 12). Hi ha controvèrsia sobre quina part de l'os occipital és la que està

escurçada: la gran majoria d'estudis mostren un clivus i un os basioccipital més curt (Aydin et al., 2005; Dagtekin et al., 2011; Dufton et al., 2011; Karagoz et al., 2002; Khan et al., 2010; Milhorat et al., 1999; Noudel et al., 2009; Schady et al., 1987; Sekula et al., 2005; Vega et al., 1990), mentre d'altres mostren un escurçament de l'escama o part supraoccipital o d'ambdues (Dagtekin et al., 2011; Karagoz et al., 2002; Khan et al., 2010; Milhorat et al., 2009; Milhorat et al., 1999; Milhorat et al., 2010; Nishikawa et al., 1997)(Figura 12). Hi ha controvèrsia respecte a aquesta teoria, ja que alguns autors han descrit un volum de FCP normal (Nishikawa et al., 1997) o, fins i tot, incrementat en pacients amb MCI (Stovner et al., 1993).

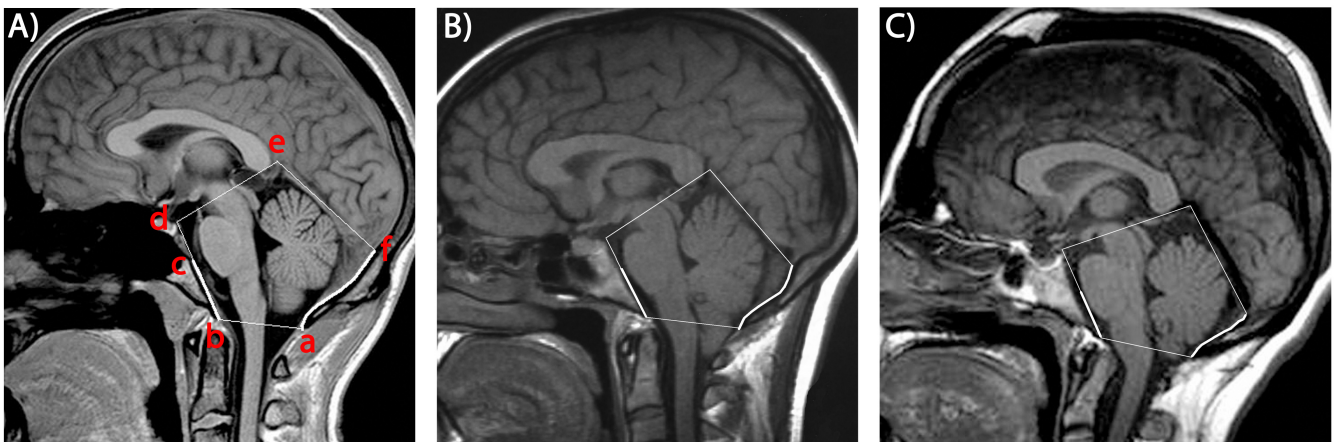


Figura 12. Fossa cranial posterior (polígon a-b-d-e-f) representat en A) control, B) MCI i C) MC0. Amb una línia més gruixuda es mostra l'os occipital: supraoccipital (a-f) i basioccipital (b-c); (b-d) representa el clivus.

L'any 2010, Milhorat i els seus col·laboradors, després d'avaluar 3.318 pacients amb MCI i observar, també, que alguns d'ells presentaven una FCP i un os occipital de mida normal, van suggerir que el DA podria ser degut a altres causes diferents a la hipoplàsia de la FCP. Només els casos produïts per un escurçament de l'os occipital serien els que donarien lloc a una FCP petita amb un volum reduït (parlaríem de casos de MCI congènits) (Taula 3). En canvi, els casos de MCI produïts per altres causes, normalment trastorns associats (com la inestabilitat del complex occipito-atlanto-axial, l'assentament cranial, la síndrome de la medul·la ancorada, les lesions intracranials que ocupen espai o el *shunt* lumboperitoneal) presentarien un DA conjuntament amb una morfometria de la FCP normal (parlaríem aleshores de casos de MCI adquirits) (Taula 3).

Taula 3. Resum de la morfologia de la FCP en pacients amb MCI segons l'etiologia.
(Adaptat de Milhorat et al., 2010).

Etiologia	Mida os occipital	Volum FCP	Forat magne
MCI "clàssica"	Petit	Petit	Petit
MCI/craniosinostosi	Petit	Petit	Petit
MCI/síndrome de la medul·la ancorada	Normal	Normal	Llarg
MCI/assentament cranial	Normal	Normal	Normal
MCI/lesions ocupen espais intracranials	Normal	Normal	Normal
MCI/shunt lumboperitoneal	Normal	Normal	Normal

1.7.3. Possibles causes de la MCI amb FCP petita

Bàsicament, la part òssia de la FCP està constituïda per l'os occipital (basioccipital i supraoccipital). Així doncs, les possibles causes que podrien ser responsables de l'escurçament de l'os són:

1- Insuficiència del mesoderma paraxial: Durant en el desenvolupament embrionari, el nombre de cèl·lules inicials que constituïran el mesoderma paraxial o les somites és inferior al normal. D'aquesta manera, tot i que els passos posteriors del desenvolupament es produeixin correctament, l'os occipital que es formarà a partir d'aquest mesoderma o somites serà de mida més petita. Aquesta insuficiència es donaria durant la tercera setmana de gestació (Marin-Padilla, 1991; Noudel et al., 2009).

2- Tancament prematur d'alguna de les sincondrosis: Fins a l'edat adulta, l'os occipital continua creixent fins que es tanquen les sincondrosis que el limiten (Shapiro and Robinson, 1976). Si aquestes sincondrosis es tanquen abans del temps corresponent, els ossos queden més petits (en aquest cas parlariem de craniosinostosi).

En l'os occipital, existeixen dos tipus de sincondrosis:

- Sincondrosi intraoccipital (anterior i posterior): La sincondrosi posterior es dona entre l'os supraoccipital i l'os exoccipital i acaba als primers anys de vida; la sincondrosi anterior es dona entre l'os basioccipital i l'os exoccipital i acaba uns anys després que la posterior (als 7-10 anys) (Figura 13).

- Sincondrosi esfenooccipital: Es dona entre l'os basioccipital i l'os esfenoide i està activa fins el final de la segona dècada de vida (ocasionalment roman oberta en adults també) (Figura 13).

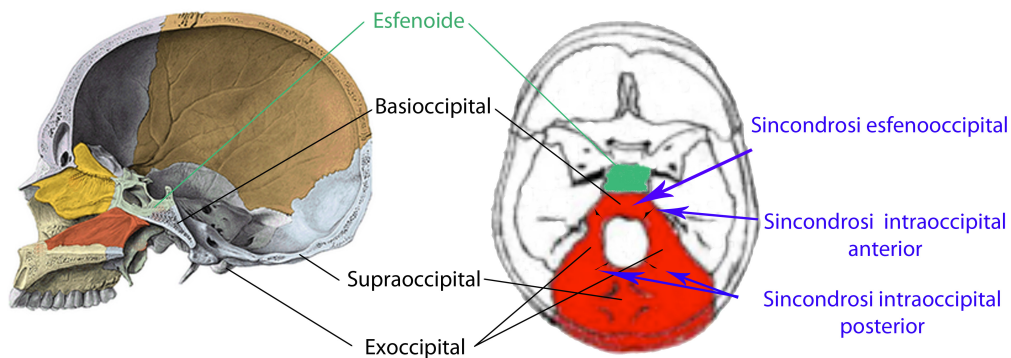


Figura 13. Os occipital, os esfenoide i sincondrosis occipitals. Dibuix del tall sagital i axial del crani humà on s'assenyalen les diferents parts de l'os occipital i l'os esfenoide. Es mostren també les diferents sincondrosis que es donen en l'os occipital.

Per diferenciar els casos amb MCI produïts per l'escurçament de l'os occipital, Milhorat i col·laboradors van anomenar "MCI clàssica" aquells casos en que no es produïa craniosinostosi (Milhorat et al., 2010) (Taula 3).

1.8. Tractament

El tractament de MCI és principalment quirúrgic. La decisió de tractar a un pacient amb MCI quirúrgicament es pren a partir de l'avaluació de la severitat i progressió dels símptomes, conjuntament amb la IRM i el flux del LCR.

Independentment de les teories implicades, el tractament quirúrgic va dirigit a desbloquejar de manera efectiva els espais subaracnoïdals del forat magne, i sobretot, de la cisterna magna (Sahuquillo and Poca, 1998). El tractament quirúrgic pot incloure tractament d'anomalies òssies associades, siringomièlia i hidrocefàlia.

Els objectius del tractament quirúrgic han de ser: a) millorar o anul·lar el gradient de pressió crani-espinal existent al forat magne; b) restaurar l'anatomia normal dels espais aracnoïdals; c) eliminar la cavitat siringomièlica en els casos en què coexisteixi amb la MCI, i d) alleugerir la compressió sobre el tronc encefàlic (Batzdorf, 1991).

Per aquest motiu, el tractament quirúrgic més generalment acceptat en aquesta malformació és la descompressió de la FCP o del forat magne. No obstant, les variacions en la tècnica quirúrgica bàsica són considerables i sovint, motiu d'importants controvèrsies. En la forma tradicional, la descompressió de la FCP es basa en la pràctica d'una craniectomia suboccipital, amb resecció del forat magne i les làmines cervicals de la primera, i sovint de la segona, vèrtebra cervical. Després de realitzar la descompressió, la majoria d'autors són partidaris d'obrir la duramàter i realitzar una plàstia dural. Les grans discrepàncies en la tècnica quirúrgica es troben en la mida proposada de la craniectomia, el tipus de plàstia utilitzada i en la major o menor manipulació aconsellada de les estructures neurals.

Els neurocirurgians de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, van desenvolupar una tècnica l'any 1994 que van anomenar "reconstrucció de la fossa posterior" (RFP). Aquesta consisteix en augmentar el volum de la FCP per resoldre el conflicte existent entre aquesta i el cerebel; recrear una cisterna magna (reexpansió aracnoïdal) capaç de restaurar, almenys parcialment, la dinàmica normal del LCR al forat magne; provocar l'ascens de les amígdals del cerebel; evitar l'enfonsament del cerebel en la zona de la craniectomia; i aconseguir el col·lapse de la cavitat siringomèlica, intentant que persisteixi en el temps, i es mantingui de forma permanent (Figura 14). Utilitzen empelts de duramàter liofilitzada homologada per realitzar la plàstia de duramàter i, abans de la cirurgia, es descarten anomalies òssies de la xarnera craniocervical (Sahuquillo and Poca, 1998; Sahuquillo et al., 1994).

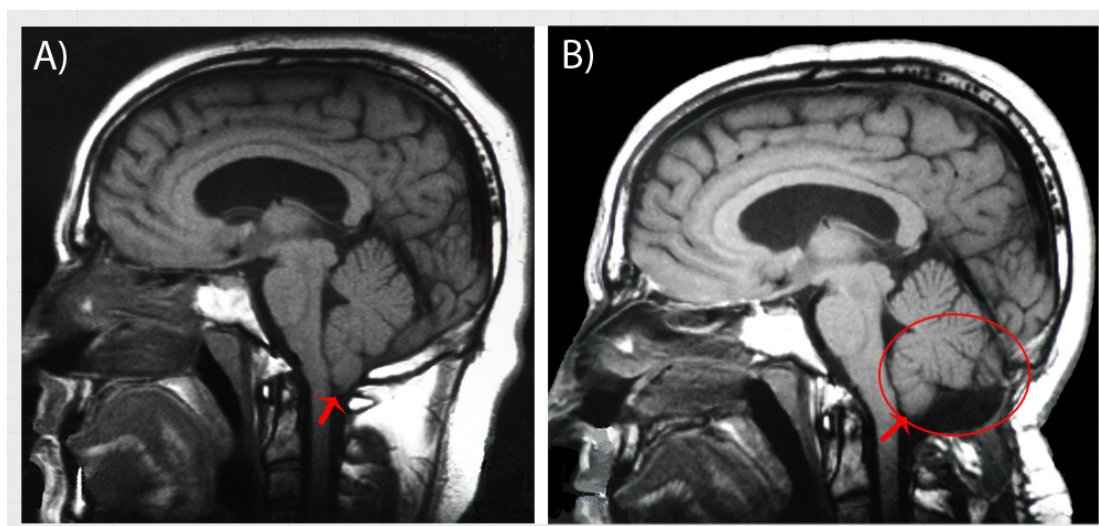


Figura 14. IRM d'abans (A) i després (B) de la reconstrucció de la FCP. En el cercle s'aprecia la craniectomia suboccipital amb la cisterna magna reconstruïda. Les fletxes assenyalen la punta de les amígdals cerebel·loques que, a causa de la reconstrucció, es troben molt més amunt.

Com hem vist, la hidrocefàlia i la siringomièlia desenvolupen un paper important en la fisiopatologia de la malaltia. Per aquest motiu, el seu control en els pacients amb MCI és un objectiu prioritari. La detecció de la hidrocefàlia i el seu tractament precoç són fonamentals ja que, en alguns casos, la implantació d'una derivació ventriculoperitoneal (*shunt* cerebral mitjançant una vàlvula unidireccional que drena l'excés de LCR del cervell a altres parts del cos) pot millorar la clínica del pacient i evitar problemes que apareixen sovint després de la RFP (Figura 15).

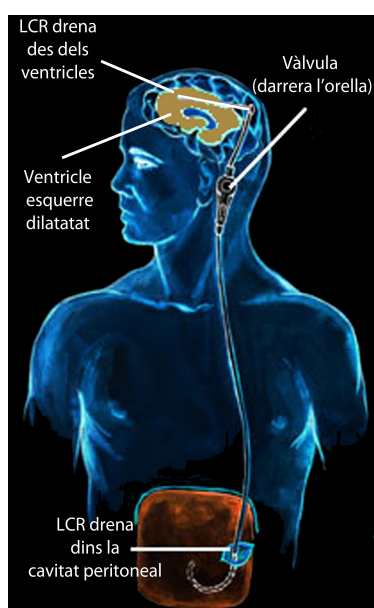


Figura 15. Esquema d'una derivació ventriculoperitoneal. Quan hi ha pressió addicional al voltant del cervell, la vàlvula introduïda sota la pell, darrera l'orella, s'obre i el líquid excedent surt del ventricle del cervell drenant cap l'abdomen a través d'un catèter.

El seguiment de lairingomièlia en els pacients amb MCI és clau, ja que la reversibilitat de la clínica després de la RFP dependrà, en gran mesura, del grau d'afectació neurològica que lairingomièlia hagi produït en el moment d'instaurar el tractament quirúrgic.

A l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, centre de referència del Sistema Nacional de la Salut pel tractament de la MCI (CSUR), se segueix l'algoritme representat a la Figura 16 a l'hora de definir el tractament.

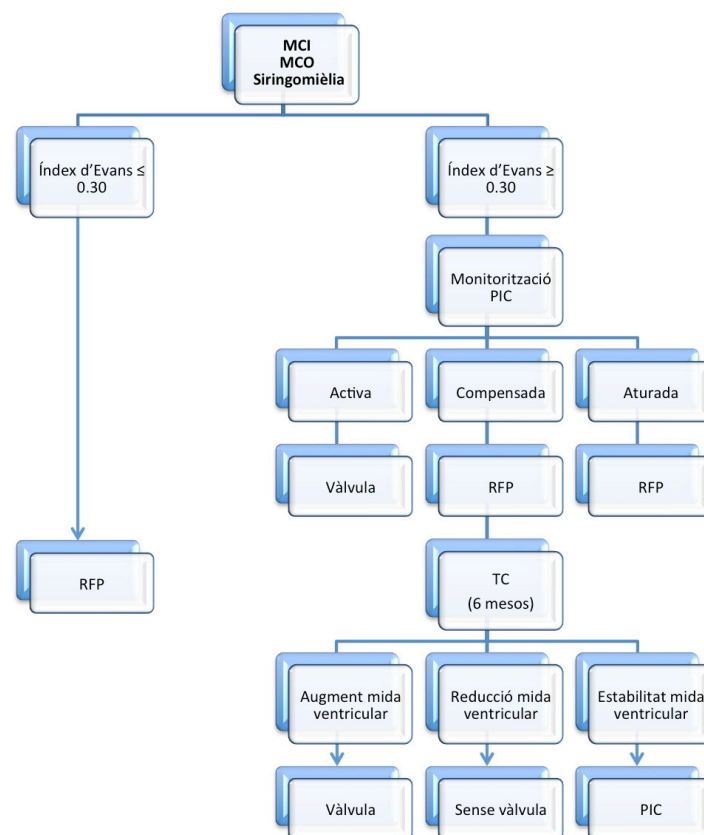


Figura 16. Algoritme en què exposa el maneig dels pacients amb MCI al servei de Neurocirurgia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron. TC: tomografia computeritzada, RFP: reconstrucció de la fossa posterior, PIC: pressió intracranial (adaptat de Sahuquillo and Poca, 1998).

En general, lairingomièlia associada amb la MCI sol respondre de forma ràpida en aquells casos en què la cirurgia és capaç de restaurar d'una forma efectiva la mida de la FCP. En els casos, poc freqüents, en què lairingomièlia no se soluciona després de la RFP, el Servei de Neurocirurgia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron realitza la derivació siringopleural o la siringoperitoneal

sempre que no hi hagi hidrocefàlia. Si això succeeix s'implanta una derivació ventriculoperitoneal. En aquests casos, la cirurgia definitiva sobre la FCP sol endarrerir-se entre un i dos mesos després de la implantació de la vàlvula.

En general, els pacients toleren bé la tècnica i el quadre clínic reverteix (mals de cap i cervicals, i aquells relacionats amb la compressió directa del cerebel). En canvi, la cirurgia aporta poc a la millora funcional dels pacients que es troben en les fases avançades de la malaltia i en què predomina la síndrome siringomièlica (Fernández et al., 2009; Sahuquillo and Poca, 1998). L'objectiu en aquests casos és aturar la progressió de la malaltia, però sense que retrogradin els dèficits neurològics ja instaurats. És per aquest motiu que la selecció dels pacients pel tractament quirúrgic ha de realitzar-se aviat i abans que existeixin dèficits neurològics importants.

En els casos asimptomàtics s'estudia la dinàmica del LCR mitjançant tècniques de RM de contrast de fase. Aquestes tècniques avaluen l'existència de compromisos significatius en la circulació del LCR en el forat magne. Si presenten una cavitat siringomièlica associada, han de ser intervinguts precoçment, sobretot, si són joves.

1.9. Comorbiditat

Es parla de comorbiditat quan dues condicions mèdiques estan presents de forma simultània en una mateixa persona de forma més freqüent que allò que s'esperaria per atzar. És un terme que té dues accepcions que es diferencien en funció de la relació de les dues condicions mèdiques que es donen: d'una banda, es considera comorbiditat quan aquestes dues condicions es produeixen de forma simultània, però de manera independent (no tenen relació en el mecanisme causant); o en canvi, es pot considerar comorbiditat quan aquestes condicions mèdiques poden ser causades, o bé estar relacionades, per una altra condició comuna.

Així doncs, si fem cas de la primera accepció, es podria dir que la fibromiàlgia, la fatiga crònica, l'artritis, la migranya, el còlon irritable o la depressió són

comòrbides amb la MCI (Nash et al., 2002). Per exemple, s'ha vist que entre el 4-20% de pacients amb fibromiàlgia tenen MCI (Watson et al., 2011).

Però en canvi, si fem referència a la segona accepció, en la MCI es podria dir que lairingomièlia és el trastorn que presenta major comorbiditat, ja que es tracta de la patologia més freqüentment associada amb la MCI. S'ha estimat que un 80% dels pacients amb MCI presenten comorbiditat amb siringomièlia i que el 90% de les siringomièlies presenten MCI (Fernández et al., 2009; Milhorat et al., 1999; Watson et al., 2011). Altres condicions que presenten elevada comorbiditat amb la MCI d'acord amb la segona accepció són la hidrocefàlia i l'escoliosi (Attenello et al., 2008). Quan es tracta de casos pediàtrics, els trastorns que presenten major comorbiditat són també la siringomièlia i l'escoliosi, tot i que també podrien incloure's els síndromes cranio-facials, l'epilèpsia i el disrafisme amb espina oculta (Greenlee et al., 2002).

1.10. Impacte socioeconòmic

En considerar el cost d'una malaltia s'ha de tenir en compte els costos directes com la prevenció, el diagnòstic i el tractament, els costos indirectes conseqüència de la pèrdua de producció o disminució de la productivitat, així com els costos intangibles patits pels afectats com el dolor, el patiment psicològic i l'alteració de les activitats quotidianes (Andlin-Sobocki et al., 2005).

A causa del desconeixement d'aquesta malaltia i al fet que fins ara es considerava una malaltia rara, l'impacte socioeconòmic no està ben quantificat. És un paràmetre difícil d'establir ja que s'ha de tenir en compte que hi ha molts pacients que en les seves manifestacions clíniques inicials no acuden al metge o si ho fan, sovint són diagnosticats erròniament i no es té constància que siguin pacients amb MCI.

La MCI, tot i ser diagnosticada i tractada correctament des d'un inici, té un cost sanitari elevat, ja que s'ha de tenir en compte que el diagnòstic correcte de la MCI es realitza mitjançant l'IRM, que no es pot fer en un centre d'atenció primària (CAP). És el metge de família qui ha de dirigir el pacient al neuròleg o neurocirurgià perquè aquest demani l'estudi d'IRM. Després cal realitzar proves complementàries per avaluar si hi ha siringomièlia o altres afectacions, dur a

terme el tractament i fer un seguiment periòdic de l'evolució del pacients amb les proves mèdiques pertinents.

Donat que els signes solen ser poc específics, el metge del CAP es pot confondre i dirigir el pacient a l'especialista equivocadament. El fet que un pacient sigui diagnosticat erròniament comporta un augment de costos sanitaris tant en nombre de visites al metge com en canvis de tractaments perquè cap d'ells acaba resolent el problema (Fernández et al., 2009).

La MCI produeix moltes pèrdues laborals, ja sigui per incapacitat laboral temporal o definitiva. Sovint els pacients intenten buscar altres feines més ergonòmiques per la seva condició o flexibilitzar els horaris per afrontar l'activitat laboral, però el fet que presentin símptomes crònics i aquests vagin augmentant a mesura que passa el temps fa que el propi pacient acabi abandonant la feina. Els símptomes també acaben impossibilitant poder dur a terme una vida amb normalitat (Fernández et al., 2009). A més, el fet que molts professionals desconeguin la malaltia fa que els propis familiars i amics dels pacients adquireixin una actitud escèptica, que genera alteracions afectives en el pacient, a més de malestar general en l'entorn (Fernández Cornejo, 2007).

2. Bases genètiques de la malformació de Chiari tipus I

2.1. Heretabilitat de la malformació de Chiari tipus I

L'heretabilitat és la proporció de la variabilitat fenotípica d'una població que és deguda a diferències genètiques. Els càlculs d'heretabilitat permeten avaluar l'existència de factors genètics i/o ambientals de risc, així com estimar la seva importància relativa.

2.1.1. Evidències genètiques en la MCI

En general, les malformacions de Chiari s'han considerat com a casos esporàdics, però diversos estudis realitzats fins ara evidencien que, almenys en un subgrup de pacients amb MCI, tenen una base genètica. Són estudis que descriuen casos

d'agregació familiar, estudis de bessons i casos en què la MCI s'associa amb síndromes genètiques conegudes.

2.1.1.1. Agregació familiar

Els estudis d'agregació familiar es basen en determinar la freqüència de la malaltia en familiars d'individus afectats i familiars d'individus no afectats. A partir d'aquests estudis s'estima el risc relatiu de desenvolupar la malaltia en familiars de primer grau d'individus afectats.

S'han descrit diferents casos d'agregació familiar en la MCI (Andlin-Sobocki et al., 2005; Atkinson et al., 1998; Cavender and Schmidt, 1995; Colombo and Cislighi, 1993; Coria et al., 1983; George and Page, 2006; Gripp et al., 1997; Mavinkurve et al., 2005; Milhorat et al., 1999; Miller et al., 2008a; Schanker et al., 2011; Solth et al., 2010; Stovner, 1992; Stovner et al., 1992; Stovner and Sjaastad, 1995; Szewka et al., 2006; Tubbs et al., 2008; Turgut, 2001; Weisfeld-Adams et al., 2007). Tot i així, l'existència d'història familiar positiva en la MCI és una dada imprecisa, segurament subestimada, ja que molts dels pacients no saben que presenten la MCI, ja sigui perquè presenten símptomes lleus que no els porten al metge o bé perquè han estat diagnosticats erròniament.

Un estudi publicat l'any 1999, realitzat amb 364 pacients amb MCI, va calcular que el 12% dels pacients tenien un familiar amb MCI i/o siringomièlia (Milhorat et al., 1999), i recentment, en un estudi retrospectiu basant en 500 casos pediàtrics recollits en els darrers 20 anys, es va estimar una prevalença familiar de MCI del 3% (Tubbs et al., 2011a).

Cal remarcar que l'agrupació familiar d'un tret és indicatiu de l'existència d'una contribució genètica però no conclouent, ja que també es podria atribuir a una exposició ambiental comú.

2.1.1.2. Estudis de bessons

Els estudis de bessons poden ser un component valuós per determinar la contribució genètica d'un tret. Aquesta aproximació considera que les parelles de bessons monozigòtics comparteixen el 100% del genoma, mentre que les parelles de bessons dizigòtics, igual que qualsevol parella de germans,

comparteixen un 50% del material genètic. Quan un tret és genètic, s'espera que aquest sigui concordant amb més freqüència en bessons monozigòtics (MZ) que en bessons dizigòtics (DZ).

A la literatura s'han descrit diversos parells o triplets de bessons amb MCI (Atkinson et al., 1998; Cavender and Schmidt, 1995; Gripp et al., 1997; Miller et al., 2008a; Solth et al., 2010; Stovner et al., 1993; Szewka et al., 2006; Tubbs et al., 2004c). Tots ells, menys un, eren bessons o trigèmings MZ, i només un dels casos de bessons MZ va resultar ser discordant per la MCI. L'any 2003, Speer *et al.* van examinar 6 parelles addicionals de bessons MZ i DZ, i de manera similar, van trobar una major concordança entre bessons MZ que en DZ (Speer et al., 2003). La concordança substancial en els bessons MZ i la manca d'informes de casos de bessons DZ dóna suport a que la MCI té una base genètica. La reduïda mida mostral d'aquests estudis fa necessària la realització de nous treballs de bessons.

2.1.1.3. Associació amb trastorns de base genètica coneguda

La MCI es pot donar com a malformació primària, aïllada o acompanyada d'altres síndromes. La identificació d'un trastorn genètic subjacent entre els membres d'una família amb MCI és crucial per determinar-ne l'etiologia, i també per avaluar els riscos i el potencial de les proves de predicció. S'han descrit casos de pacients amb MCI associats a múltiples trastorns mendelians coneguts (no arriben a l'1% dels casos totals amb MCI) (Speer et al., 2000). A la Taula 4 es recullen alguns dels trastorns que s'associen d'alguna manera amb la MCI.

Aquests trastorns inclouen:

- Anomalies òssies: normalment situades a la base del crani, donen lloc a una FCP petita. Es produeixen majoritàriament per síndromes originades per craniosinostosis (com la Síndrome de Crouzon, la Síndrome d'Apert, o de la sutura metòpica, on s'ha descrit fins a un 30% d'incidència amb la MCI) (Loukas et al., 2011; Tubbs et al., 2001a). La MCI s'ha relacionat també amb síndromes que afecten la columna vertebral i que acaben perturbant la circulació del LCR, com la Síndrome de Klippel-Feil o l'assimilació atlanto-axial.

- Anomalies dermatològiques: la neurofibromatosi de tipus 1 (NF1), que es troba en un 5,4% dels pacients amb MCI (Tubbs et al., 2004a), n'és un exemple.
- Trastorns hormonals: s'ha associat la MCI tant amb el dèficit d'hormona de creixement (en un 5-20%), com amb diversos trastorns que produeixen hiperostosi (com la malaltia de Paget, la displàsia craniometafisària, o l'osteopetrosi), en què es dona un excés de creixement de l'os (ossos més gruixuts) per un excés d'hormona de creixement. En tots dos casos, el resultat també és una FCP reduïda (Loukas et al., 2011).
- Trastorns immunològics: per exemple, la Síndrome d'Hiper-Immunoglobulina E (Hiper-IgE).
- Alteracions cromosòmiques: per exemple, la Síndrome de Williams.

Per a molts d'aquests trastorns s'ha identificat el gen responsable (Taula 4). La hipòtesi és que aquests tindrien efectes pleiotròpics que influeixen en l'herniació de les amígdales del cerebel, hipoplàsia occipital,iringomièlia, i altres fenotips (Speer et al., 2000). Donat que algunes d'aquestes síndromes poden conduir a anomalies en els ossos, alterar les vies involucrades en el creixement axial del mesoderma i a la seva diferenciació (per exemple la síndrome de Williams i la síndrome de Shprintzen-Goldberg), la comorbiditat de la MCI amb aquestes síndromes reforça la hipòtesi de l'origen mesodèrmic de la malformació.

Taula 4. Trastorns associats amb la malformació de Chiari tipus I.

Associat a	Desordre o Síndrome	Característiques clíniques	Loci coneguts	Número referència OMIM	Model de transmissió	Referència MCI/desordre
Alteració tancament sincondrosi	Displàsia Cleidocranial	Baixa estatura, cap gran, braquicefàlia, hipoplàsia mig facial i retard en l'erupció de les dents	Mutacions gen <i>CBFA1</i> (6p21)	#119600	Autosòmica dominant	(Vari et al., 1996)
Alteració cromosòmica	Síndrome de Williams	Retard mental, estenosi aòrtica, hipercalcèmia	Deleció en el cromosoma 7 que conté 28 gens aprox (7q11.23)	#194050	Autosòmica dominant	(Grimm and Wesselhoeft, 1980; Mercuri et al., 1997; Pober and Filiano, 1995);
Craniosinostosi	Síndrome Crouzon	Crani deformat, maxilar superior massa petit, exoftàlmia, hipertelorisme, estrabisme	Mutacions gen <i>FGFR2</i> (10q26)	#123500	Autosòmica dominant	(Cinalli et al., 1995; Cinalli et al., 1996; Cinalli et al., 2005a; Cohen and Kreiborg, 1992; de Jong et al., 2012; Fujisawa et al., 2002)
Craniosinostosi	Síndrome d'Apert (acrocefalsindactília tipus I)	Deformitats esquelètiques en les extremitats, exoftàlmia, maloclusió dental, retard mental, pèrdua audició, baixa estatura	Mutacions al gen <i>FGF2</i> (10q26)	#101200	Autosòmica dominant	(Cinalli et al., 1995; de Jong et al., 2012)
Craniosinostosi	Síndrome Shprintzen-Goldberg	Hàbit marfanoide, craniosinostosi, proptosi ocular, hipertelorisme, paladar alt, escoliosi	Mutacions al gen <i>FBN1</i> (15q21.1)	#182212	Esporàdic	(Greally et al., 1998)

Defecte columna vertebral	Displàsia espòndil-epifisària tardana	Baixa estatura, associada a braços i tronc curts, escoliosi, hiperlordosi, artrosis, hipoplàsia dent de l'axis, vèrtebres aplanades	Desconegut	#271600	Autosòmica dominant, autosòmica recessiva i lligada al cromosoma X	(Gripp et al., 1997)
Defecte columna vertebral	Impressió basilar primària	Malformació cervico-occipital (escurçament del coll amb tendència a inclinar-lo cap endavant; limitacions moviment cap)	Desconegut	%109500	Autosòmica dominant	(Caetano de Barros et al., 1968; Iglesias-Osma et al., 1997; Milhorat et al., 1999; Nishikawa et al., 1997)
Defecte columna vertebral	Síndrome Klippel-Feil	Caracteritzat per fusió vertebral	Mutacions gen <i>PAX1</i> (20p11.2), gen <i>GDF3</i> (12p13.1) i inversió del gen <i>GDF6</i> (8q22.1)	#118100	Autosòmica dominant i esporàdica	(Milhorat et al., 1999; Nishikawa et al., 1997; Ritterbusch et al., 1991)
Deficiència mineral òssia	Raquitisme hipofosfatèmic	Diferents símptomes imprecisos: dolor a les articulacions, flegmons dentals	Mutacions gen <i>PHEX</i> (Xp22.2-p22.1)	#307800	Lligat al cromosoma X	(Caldemeyer et al., 1995)
Trastorn neurocutani	Neurofibromatosi tipus I	Discromies cutànies, macrocefàlia, retard, displàsia ascular, neurofibromes, tumors	Deleccions parcials del gen <i>NF1</i> (17q11.2)	#162200	Autosòmica dominant	(Affi et al., 1988; Dooley et al., 1993; Hara and Arakawa, 2005; Lazaro et al., 1994; Parkinson and Hay, 1986; Santos-Garcia et al., 2009; Tubbs et al., 2004a)
Trastorn endocrí	Acondroplàsia	Forma més comuna de nanisme	Mutacions gen <i>FGFR3</i> (4p16.3)	# 100800	Autosòmica dominant i esporàdica	(Nakai et al., 1995; Orioli et al., 1986)

Associat a	Desordre o Síndrome	Característiques clíniques	Loci coneguts	Número referència OMIM	Model de transmissió	Referència MCI/desordre
Trastorn endocrí	Deficiència hormona del creixement	Dreixement/desenvolupament lent	17q22-q24, o mutacions gen <i>GH1</i> (17q24.2)	#173100	Autosòmica dominant	(Hamilton et al., 1998; Lindsay et al., 1994; Murphy et al., 2006)
Trastorn endocrí	Osteodistròfia hereditària d'Albright (pseudohipoparatiroidisme tipus 1A)	Baixa estatura, dits curts, cara rodona, calcificacions subcutànies i alts nivells d'hormona paratiroidal.	Mutacions gen <i>GNAS</i> (20q13.2)	#103580	Autosòmica dominant	(Martinez-Lage et al., 2011)
Hiperostosi	Displàsia craneometafisària	Prominència òssia sobre el pont nasal, hipertelorisme, respiració bucal, paràlisi facial, pèrdua de visió i audició	Mutacions gen <i>ANK</i> (5p15.2)	#123000, %218400	Autosòmica dominant i autosòmica recessiva	(Cai et al., 2008)
Hiperostosi	Displàsia craniofrontonasal	Anomalies craneofacials (ulls separats, front ampli, punta nas bífida)	Mutacions gen <i>EFNB1</i> (Xq12)	#304110	Lligat al cromosoma X	(Mahore et al., 2010)
Hiperostosi	Malaltia de Paget de l'os	Remodelació de la base del crani causada per excés d'hormona de creixement	Mutacions gens <i>PDB4</i> (5q31), <i>SQSTM1</i> (5q35), <i>TNFRSF11A</i> (18q21.33)	#602080	Autosòmica recessiva	(Iglesias-Osma et al., 1997; Richards et al., 2001b)
Hiperostosi	Osteopetrosi	Ossos massa densos	Mutacions gen <i>CLCN7</i> (16p13.3)	#166600, #611490	Autosòmica dominant, autosòmica recessiva i lligat al cromosoma X	(Dlouhy and Menezes, 2011; Jamjoom et al., 2009; Kulkarni et al., 2007)

Hipertensió intracranial	Estenosi aqüeductal	Estenosi congènita de l'aqüeducte de Silvi, impressió basilar, polzes hipoplàstics i paraplegia espàstica	Mutacions gen <i>L1CAM</i> (Xq28)	#307000	Lligat al cromosoma X	(Hayhurst et al., 2008; Little et al., 1975)
Immunodeficiència	Síndrome Hiper-IgE	Abscessos cutanis, infeccions a les vies aèries i nivells elevats d'immunoglobulina E	Mutacions gen <i>STAT3</i> (17q21.2)	#147060	Autosòmica dominant	(Freeman et al., 2007; Freeman and Holland, 2009)
Trastorn del teixit connectiu	Síndrome Marfan	Augment longitud extremitats	Mutacions al gen <i>FBN1</i> (15q21.1)	#154700	Autosòmica dominant, autosòmica recessiva i esporàdica	(Puget et al., 2007)
Altres	Cadira turca buida primària amb displàsia generalitzada	Osteosclerosi amb anomalies del sistema nerviós central i meninges	Duplicació de Xq13.3-q21.2, mutació gen <i>LHX4</i> (1q25.2)	#130720	Lligat al cromosoma X; autosòmica dominant i esporàdica	(Machinis et al., 2001; Milhorat et al., 1999; Tajima et al., 2007; Yokoyama et al., 1992)
Altres	Blefarofimosi	Reducció general de l'obertura de les parpelles	Mutacions gen <i>FOXL2</i> (3q23)	#110100	Autosòmica dominant	(Paquis et al., 1998)
Altres	Fibrosi quística	Retard del creixement, malaltia pulmonar i pancreàtica	Mutacions gen <i>CFTR</i> (7q31.2)	#219700	Autosòmica recessiva	(Needleman et al., 2000; Patel et al., 2011; Rakheja et al., 2003; Rusakow et al., 1995; Steinberg and Brown, 1960)
Altres	Síndrome Kabuki	Retard mental, fissures palpebrals amples i inclinades cap a dalt, grans globus oculars, escoliosi, dits petits reduïts	Mutacions gen <i>MLL2</i> (12q13.12)	#147920	Autosòmica dominant	(McGaughan et al., 2001; Niikawa et al., 1988)
Altres	Síndrome renal-coloboma (síndrome papilo-renal)	Defectes oculars (coloboma) i urogenitals	Mutació gen <i>PAX2</i> (10q24.3)	#120330	Autosòmica dominant	(Schimmenti et al., 1999)

2.1.1.4. Model de transmissió genètica

El model d'herència de la MCI no està clar. Tot i que diversos estudis genealògics de la MCI han trobat evidències consistents amb la transmissió vertical i patrons d'herència autosòmica dominant amb penetrància variable (Boyles et al., 2006; Speer et al., 2000), també s'han descrit patrons d'herència autosòmica recessiva (Milhorat et al., 1999). Àdhuc s'ha suggerit que podria ser degut a gens relacionats amb el sexe, on els estrògens jugarien un paper important en el creixement ossi i la seva remodelació (Schanker et al., 2011).

2.2. Estudis genètics en la malformació de Chiari tipus I

El model clàssic d'herència mendeliana ha permès identificar gens implicats en malalties monogèniques. Aquestes són produïdes per l'alteració o alteracions situades en únic gen, que generalment es troben en baixa freqüència en la majoria de les poblacions i presenten una elevada penetrància, amb una repercussió directa sobre el fenotip. Les malalties complexes, en canvi, no mostren una herència mendeliana atribuïble a un únic *locus*, sinó que estan causades per l'acció de múltiples *loci*, cadascun amb un efecte menor, però que poden interaccionar entre ells i/o, al mateix temps, amb factors ambientals.

Es poden utilitzar diferents aproximacions per tal d'identificar la/es variant/s causant/s d'una malaltia. La utilització d'una metodologia o altra en un estudi genètic dependrà, bàsicament, del supòsit que la malaltia en qüestió sigui produïda per un o més gens.

2.2.1. Estudis de lligament genètic en la MCI

Els estudis de lligament genètic aplicats al mapatge de *loci* responsables de malalties s'utilitzen sobretot en formes mendelianes (tot i que també es poden aplicar a malalties complexes) quan no es disposa d'informació de quin tipus de gens poden estar implicats en la patologia. Es tracta d'una estratègia sense hipòtesi prèvia.

Es basa en la cosegregació entre variacions genètiques físicament properes en un mateix cromosoma (*chr*) que es transmeten en famílies de la mateixa manera

que el fenotip patològic (Strachan and Read, 2005). En cas de no disposar de famílies extenses es poden utilitzar parelles de germans per realitzar estudis de lligament genètic. Per calcular el grau de lligament entre dos *loci*, com ara un marcador polimòrfic de posició coneguda i el gen responsable d'una malaltia, s'aplica un test basat en el LOD *score* (logaritme de probabilitats), que correspon al logaritme del quocient entre la probabilitat que dos *loci* estiguin lligats a una determinada fracció de recombinació i la probabilitat que no ho estiguin. El llindar de significació per a cribatges genòmics correspon a un valor de LOD *score* de 2 mentre que el llindar d'exclusió correspon a valors inferiors a -2. Per valors $\geq 1,86$ que no arriben a ser significatius es parla de lligament "suggestiu" (Lander and Kruglyak, 1995).

Hi ha dos mètodes principals per a l'anàlisi de lligament genètic: el paramètric, en què cal assumir un determinat model d'herència, i el no paramètric, en què no s'assumeix cap tipus d'herència concret. En els estudis de parelles de germans, aquest últim mètode avalua si parelles d'afectats comparteixen més marcadors idèntics per descendència (IBD), és a dir, heretats del mateix progenitor, del que s'esperaria per atzar (Barnette et al., 2005). Els mètodes no paramètrics es poden aplicar també a famílies amb un elevat nombre d'afectats. Sovint els mètodes no paramètrics es consideren els més adients per a l'estudi de malalties complexes (Strachan and Read, 2005).

En aquest tipus d'anàlisi és molt important la mida mostral i, sobretot, determinar correctament el fenotip, tant el dels individus sans com el dels afectats.

Sovint els estudis de lligament no tenen suficient poder estadístic per assignar gens implicats a regions genòmiques concretes i fins que no es duu a terme l'anàlisi mutacional dels gens posicionalment candidats no es pot confirmar la identificació del *locus* de la malaltia.

2.2.1.1. Estudis de lligament genètic a escala genòmica

En la MCI només s'han realitzat dos estudis de lligament genètic a escala genòmica:

- En el primer, publicat al 2006, es van analitzar 10.000 SNPs al llarg de tot el genoma en 23 famílies diferents, amb 71 individus afectats en total, en què cada família tenia dos individus afectats com a mínim (Figura 17).

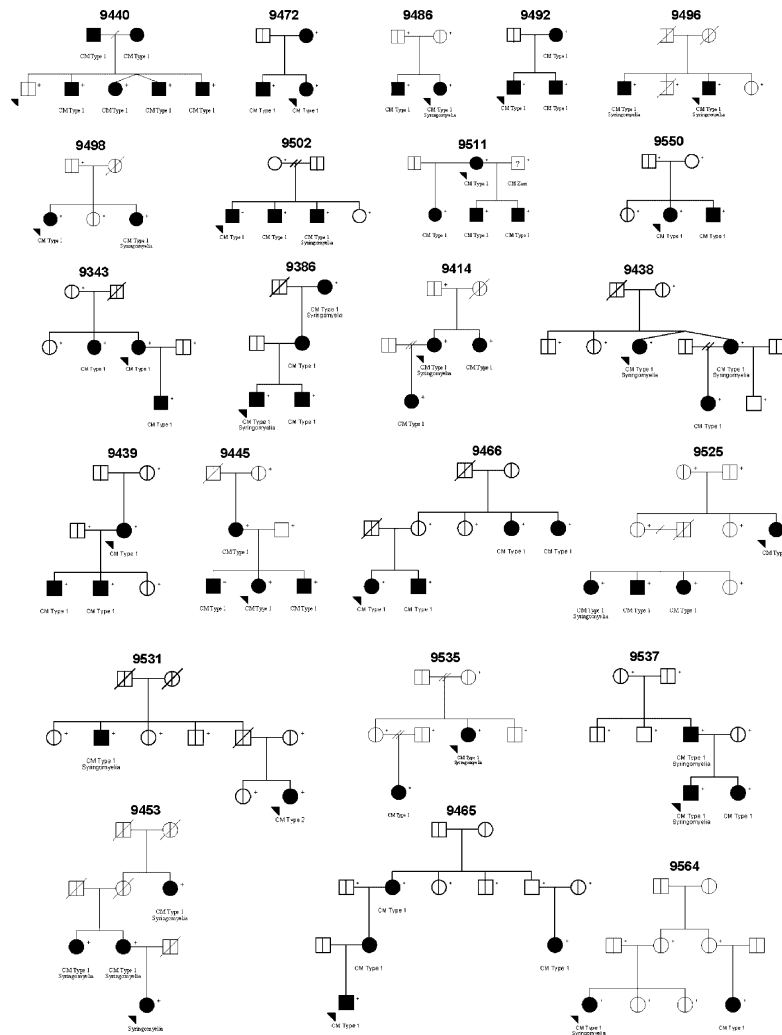


Figura 17. Arbres genealògics de les famílies utilitzades en l'únic estudi de lligament genètic a escala genòmica en MCI publicat fins ara. En total, 71 afectats pertanyents a 23 famílies no relacionades (Boyles et al., 2006).

Utilitzant tant el model paramètric (assumint una herència autosòmica dominant amb una penetrància del 80%) com el no paramètric, van identificar dos *loci* candidats: un al chr 9, de 40 cM (9q21.33-33.1) amb un LOD score de 3,05 que comprenia 193 gens; i un segon, al chr 15, d'una regió de 13 cM (15q21.1-22.3) i 71 gens, amb un LOD score de 3,3. Van suggerir el gen de la fibrilina-1 (*FBN1*), situat dins el *locus* del chr 15, com el millor candidat, ja que és causant de

síndromes que donen a lloc a craniosinostosi (Síndrome de Marfan i Síndrome de Shprintzen–Goldberg) i que s’han trobat associats a la MCI (Taula 4)(Boyles et al., 2006).

- Un segon estudi, realitzat pel nostre grup l’any 2008 (no publicat encara), es va basar en una única família multigeneracional de la qual es van recollir mostres de 29 individus, 12 dels quals eren afectats (Figura 18). Es van analitzar 6.008 SNPs i 14 marcadors de tipus microsatèl·lit i, assumint un model d’herència autosòmica dominant amb una penetrància del 99% i una taxa de fenocòpies de l’1%, es va obtenir un *locus* candidat al chr 17, amb un LOD score màxim de 2,4 en considerar els 10 primers individus afectats amb material genètic disponible (veure Figura 18) i de 3,29 en considerar els 29 individus disponibles.

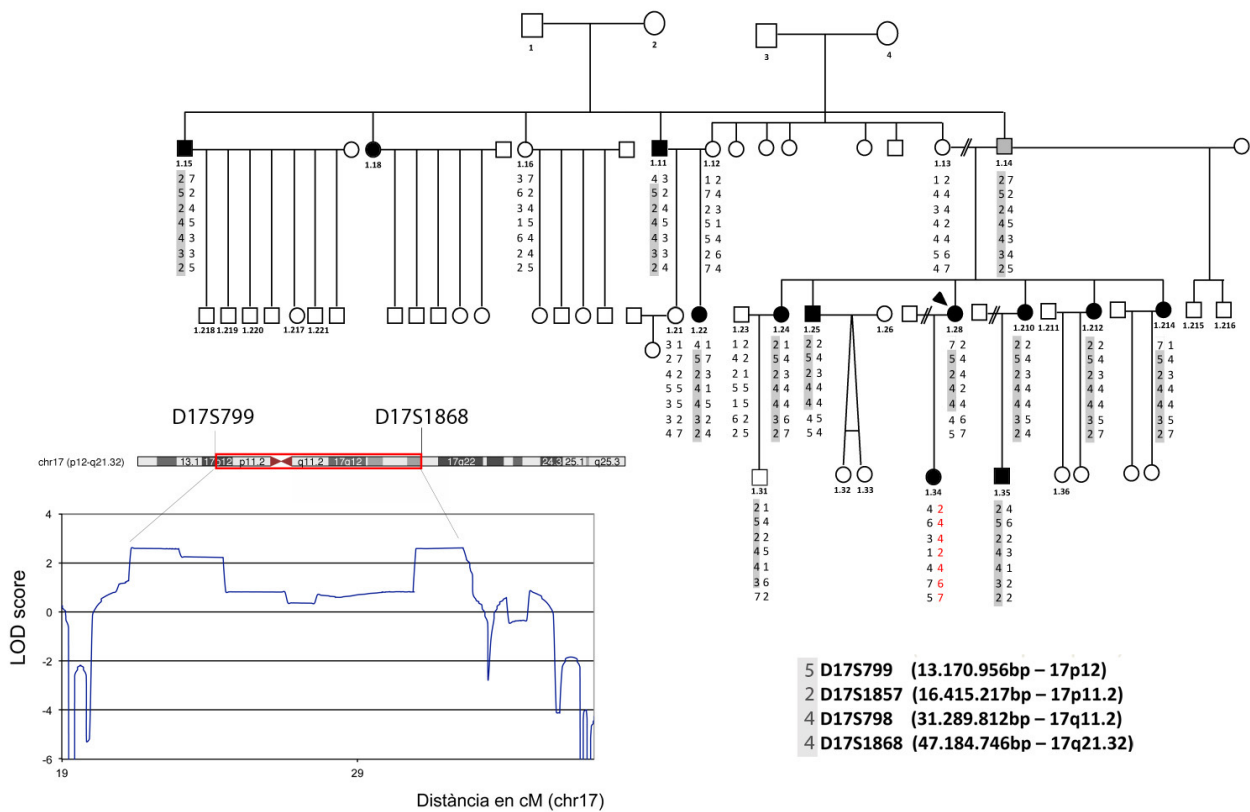


Figura 18. Anàlisi de lligament genètic realitzada en una família amb 12 individus amb MCI. Es mostra l’arbre genealògic de la família amb els haplotips obtinguts per a la regió cromosòmica en què es obtenir valors de LOD més elevats. En negre, els individus amb descens amigdalari (DA)>3mm, i en gris, els que presenten símptomes però no compleixen el criteri del DA. En dos individus no encaixa el fenotip amb l’haplotip (en un cas podria tractar-se d’una fenocòpia, i en l’altre, que la variant causant de la MCI no presentés una penetrància del 100%; no obstant, no es pot descartar del tot que es tracti d’un fals positiu). A la part inferior esquerra es mostra un esquema de la regió genòmica, amb els valors de LOD multipuntuals obtinguts en l’anàlisi de lligament realitzada sobre 10 individus afectats. A la part inferior dreta, els marcadors que cobreixen la regió cromosòmica crítica amb l’al·lel que forma part de l’haplotip de risc.

Aquesta regió comprenia 34,01 Mb, amb més de 200 gens, raó per la qual es va descartar la possibilitat d'identificar el gen causant de la malaltia mitjançant cribratge mutacional per seqüenciació directa utilitzant el mètode de Sanger.

2.2.2. Anàlisi mutacional de gens candidats

En la MCI, tot i haver-se suggerit possibles gens candidats (veure Apartat 3 de la Introducció), només s'ha estudiat el gen *Noggin* (*NOG*) en 33 casos amb MCI no sindròmics. Es van seqüenciar 696 pb de la regió codificant, 365 pb de l'extrem 5' de la regió no traduïda (*untranslated region*, UTR) i 20 pb de l'extrem 3' UTR, però no es va identificar cap variant, tot suggerint que mutacions a *NOG* no són comunes en els pacients amb MCI no sindròmics (Speer et al., 2003).

2.2.3. Identificació de variants de susceptibilitat: estudis d'associació

Aquesta aproximació s'utilitza habitualment en malalties complexes per identificar variants genètiques o polimorfismes que confereixen susceptibilitat al fenotip estudiat.

La cerca de variants genètiques implicades en malalties complexes comunes és difícil perquè cadascuna de les variants de predisposició és tan sols un dels múltiples factors causals, i es combina habitualment amb d'altres factors genètics i ambientals per determinar el desenvolupament de la patologia. Cadascun d'ells no és per si sol ni necessari ni suficient per causar-la. Tot i que aquestes variants d'efecte menor poden suposar tan sols un petit augment de risc global, és important identificar-les per determinar finalment el panorama genètic complet de predisposició a la patologia, i per la seva potencial rellevància a nivell de salut pública.

Hi ha dos tipus principals d'estudis d'associació genètica: els estudis de tipus cas-control poblacionals, basats en l'anàlisi d'individus no emparentats, i els estudis cas-control familiars, basats en famílies. En els estudis d'associació de tipus cas-control poblacionals, en oposició als familiars, l'estratègia es basa en la comparació de les freqüències al·lèliques i/o genotípiques d'un determinat marcador entre un grup d'individus afectats i un grup d'individus control o població general.

En els estudis d'associació és essencial tenir molta cura d'aspectes clau com ara la correcta assignació del fenotip dels pacients, la selecció dels controls adients, la mida de la mostra, la tria de les variants genètiques a estudiar així com la metodologia estadística utilitzada i les correccions corresponents (Balding, 2006; Cardon and Bell, 2001; Zondervan and Cardon, 2007).

La selecció de marcadors genètics a estudiar es basa en la hipòtesi que el marcador és funcionalment rellevant (associació directa) o que està en desequilibri de lligament (LD) amb la variant funcionalment rellevant (associació indirecta) (Zondervan and Cardon, 2004; Zondervan and Cardon, 2007). Es poden estudiar molts tipus diferents de variants genètiques, com ara repeticions en tàndem o insercions-deleccions (indels), però actualment els més utilitzats són els polimorfismes d'un únic nucleòtid o SNPs, l'abundància dels quals en el genoma humà s'estima en 10 milions. A més, el coneixement que tenim actualment dels patrons de LD del genoma en diferents poblacions permeten seleccionar col·leccions de SNPs que capturen la major part de la variabilitat genètica comuna a la població, evitant redundàncies i identificant aquelles variacions que "arrosseguen" SNPs relacionats, o tagSNPs (Balding, 2006). El LD es quantifica entre altres mètodes, amb els paràmetres D' i r^2 , que prenen valors entre 0 i 1. Valors de 0 impliquen independència (o equilibri) de les variacions que es comparen, mentre que valors de 1 impliquen l'existència d'una relació màxima de desequilibri. Per un marcador bial·lèlic, que $D'=1$ o $r^2=1$ implica que totes les còpies d'un dels dos al·lells es donen exclusivament amb un dels dos possibles al·lells de l'altre marcador, mentre que per r^2 a més els dos marcadors considerats tenen idèntiques freqüències al·lèliques. En aquest darrer cas, el genotip d'un marcador es prediu perfectament a partir de l'altre en els dos sentits, i per tant, la redundància genètica seria total (Zondervan and Cardon, 2004).

El projecte internacional HapMap (www.hapmap.org) va posar a disposició pública la informació detallada dels genotips de 1,6 milions de SNPs per a 1.184 individus d'11 poblacions diferents en la seva fase III (Altshuler et al., 2010). Aquesta informació permet la selecció més acurada de marcadors no redundants que identifiquen grups de SNPs.

Els estudis d'associació es poden centrar en l'anàlisi de gens candidats per la seva potencial (o coneguda) relació amb la fisiopatologia o la farmacologia de la malaltia, o bé, analitzar tot el genoma (*Genome-Wide Association Studies* o GWAS) utilitzant sèries molt àmplies de marcadors distribuïts per cobrir la major part de la variabilitat genètica humana (Eberle et al., 2007).

Fins ara, no s'han realitzat estudis d'associació genètica en MCI, ni seguint l'estratègia d'analitzar gens candidats concrets ni de tipus GWAS.”

2.2.4. Seqüenciació massiva

El fort avenç tecnològic que s'ha produït en els darrers 5 anys ha conduït al desenvolupament de noves tècniques de seqüenciació, conegudes com a seqüenciació de nova generació (*Next Generation Sequencing*, NGS), que permeten seqüenciar simultàniament milions de fragments d'ADN en un període de temps relativament curt en comparació amb les tècniques de seqüenciació convencionals.

Aquesta tècnica es basa en la fragmentació del genoma, el lligament a un únic xip dels milions de fragments d'ADN obtinguts i la seva posterior amplificació química i seqüenciació. La seqüenciació massiva i simultània dels fragments d'ADN de cada pacient proporciona gigabases de dades que poden ser processades mitjançant programes bioinformàtics adients amb una fidelitat superior al 99% (Medvedev et al., 2009). Aquestes seqüències obtingudes es localitzen sobre un genoma humà de referència (mapatge) i a continuació s'identifiquen les variants genètiques per comparació amb seqüències genòmiques de referència, per filtrar les variants i seleccionar aquelles que són candidates a estar relacionades amb la malaltia.

La NGS s'ha utilitzat fins ara bàsicament en l'estudi de malalties monogèniques (d'herència mendeliana) (Ng et al., 2010; Ng et al., 2009). Es tracta d'una tècnica reproducible, robusta, sensible i específica (Ng et al., 2009) que té com a inconvenients haver de confirmar posteriorment les variacions d'interès mitjançant la tècnica tradicional de Sanger (per descartar falsos positius) i la impossibilitat de corregir els falsos negatius corresponents a variacions

desconegudes fins ara.

Es poden seguir diferents estratègies: dirigir la NGS a *loci* específics candidats a contenir el gen responsable de la malaltia (per exemple acotat prèviament mitjançant anàlisi de lligament genètic), seqüenciar els exons de tots els gens del genoma (exoma) o seqüenciar el genoma sencer.

La seqüenciació del genoma complet és cada cop més útil, però el cost del procés és encara molt elevat. L'exoma, tot i que representa tan sols l'1% del genoma humà (unes 30 Mb), és el que té una major contribució al fenotip final de l'organisme, i és on s'ha vist que resideixen més del 85% de les mutacions descrites en malalties rares (Ng et al., 2009). La seqüenciació de l'exoma és molt més econòmica, i és un mètode més eficient i exhaustiu que el tradicional cribratge mutacional de gens candidats, molt més lent, car i limitat.

Fins ara, no s'ha publicat cap estudi en què s'hagi aplicat aquesta tècnica a la MCI.

2.3. Models animals en la malformació de Chiari tipus I

Als anys 60-80, Marín-Padilla va utilitzar hámsters com a model animal per estudiar la MCI. La teoria que actualment s'accepta per explicar la patogènesi de la MCI amb una FCP reduïda fou proposada per ell després que observés, en hámsters nascuts de mares prenyades a les quals havia subministrat prèviament elevades dosis de vitamina A, malformacions molt similars a les que presentaven els pacients amb MCI i MCII (basicondrocrani reduït que produïa una FCP petita, amb una capacitat volumètrica també reduïda)(Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981).

L'any 2009, el grup de Miró i col·laboradors, van suggerir el gen repressor *SUZ12* com a possible causant de la MCI i MCII en observar diverses malformacions del cervell i el tub neural en ratolins amb haploinsuficiència d'aquest gen (ratolins heterozigots pel *knock-out* del gen *SUZ12*). Van observar malformacions com l'herniació de les amígdals cerebel·loses dins el forat magne amb una FCP atestada, i en els casos més severes, una protuberància a l'esquena, corresponent a la mielomeningocele amb paraplegia a les potes posteriors, similar a MCII (Miro et al., 2009).

Actualment, s'utilitzen gossos de les races *Cavalier King Charles Spaniels* (CKCS) i *Griffon Bruxellois* (GB) com a models animals per a l'estudi de la MCI. Són races que presenten predisposició a la condició que en gossos s'anomena "Chiari-like malformation", en la que presenten disparitat en la mida del cervell (massa gran) i la FCP (massa petita). D'aquesta manera, es produeix l'herniació del cerebel i el tronc cefàlic a través del forat magne i siringomièlia, ja que es produeix l'obstrucció de la circulació del LCR. S'han realitzat estudis morfomètrics i s'ha vist que és degut a l'escurçament de la base del crani i l'os supraoccipital, amb la compensació de l'allargament de l'os parietal (Rusbridge et al., 2009).

Donat que és un model en què la malformació es dona de manera natural, és un bon candidat per a l'estudi de la seva base genètica. Tot i que encara no s'ha publicat, l'any 2011, el grup de Zoha Kibar van presentar en forma de pòster al Congrés Americà de Genètica Humana organitzat a Montreal un GWAS amb 56 GB afectats i van trobar 6 *loci* candidats a contenir el gen causant de la malaltia. Amb una família de gossos amb 35 individus afectats i 19 sans, van corroborar un d'aquests *loci*, que comprèn una regió genòmica de 1,7 Mb. El seu objectiu en aquests moments és acotar al màxim aquesta regió i posteriorment identificar el seu equivalent en humans (Lemay et al., 2011).

3. Gens candidats

Davant l'evidència d'una base genètica en la MCI, es presenta a continuació una selecció de gens amb funció i/o posició cromosòmica d'interès, útils per abordar posteriorment estudis genètics.

Tenint en compte la teoria actual de la insuficiència mesodèrmica com a principal causant (Marin-Padilla, 1966; Marin-Padilla, 1979; Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981), els gens candidats a ser estudiats serien aquells implicats en el desenvolupament de l'os occipital o aquells que produeixen síndromes que s'associen a la MCI i que juguen un paper en el creixement del mesoderma paraxial i la seva diferenciació, i/o produeixen anomalies en els ossos de la base del crani. D'altra banda, també cal considerar com a candidats a ser estudiats

aquells gens responsables de síndromes que s'associen amb la MCI ubicats dins la regió identificada a l'anàlisi de lligament.

3.1. Gens implicats en el desenvolupament de l'os occipital

L'os occipital presenta dos orígens embrionaris diferents: una part, del cartílag paracordal (provinent de les cèl·lules de la cresta neural, localitzades als dos costats de l'extremitat cefàlica de la notocorda, que formaran la part del mig de l'os basioccipital) i l'altra part, dels cossos dels esclerotomes occipitals (provinents de les quatre primeres somites originades a partir del mesoderma paraxial a la tercera setmana de gestació), les quals es fusionen i donen lloc a l'estructura precursora de la major part de l'os occipital (els laterals de l'os basioccipital, i tot l'os supraoccipital i exoccipital) (Muller and O'Rahilly, 1994; Muller and O'Rahilly, 2003) (Figura 19). Posteriorment es dona el procés d'ossificació i finalment, el tancament de les diferents sincondrosis. La formació de l'os occipital, doncs, no acaba fins als 18 anys d'edat aproximadament, període en què es tanca la darrera sincondrosi.

Donat que aquest treball es va basar en la hipòtesi d'una insuficiència mesodèrmica com a causa d'un os occipital més petit de l'habitual, es van estudiar els gens relacionats amb la formació de la part de l'os occipital d'origen mesodèrmic. D'altra banda, donat el llarg període de temps que dura la formació de l'os i el gran nombre de gens implicats, l'estudi es va centrar en els gens que intervenen en el desenvolupament del mesoderma paraxial i les somites occipitals, que és el període més crític per a la formació de l'os occipital.

3.1.1. Formació del mesoderma paraxial

La formació del mesoderma paraxial es dona en el procés anomenat gastrulació, en què es formen les tres capes germinals primàries (ectoderma, mesoderma i endoderma). La gastrulació s'inicia cap al dia 17 de l'embrió, quan aquest s'ha implantat i és un disc format per dues capes de cèl·lules: l'epiblast i l'hipoblast. En aquest moment es forma la **línia primitiva**, una banda gruixuda a la superfície dorsal de l'epiblast resultat de l'acumulació de cèl·lules que proliferen i migren cap al centre del disc embrionari. Aquesta línia s'estendrà un 75-80% de la llargada de l'embrió. Mentre la línia prolifera, a la part anterior s'acumulen

cèl·lules i es forma el node **primitiu**, que permetrà que part de les cèl·lules s'invaginin a través d'ell per arribar al blastocel.

Quan la línia primitiva ha crescut suficientment, es forma dins seu el solc primitiu, lloc per on les cèl·lules de l'epiblast es desplacen i s'introdueixen també cap al blastocel. En funció de l'origen i el moment en què es desplacen, les cèl·lules de l'epiblast migren en diverses direccions per sota d'aquest: les cèl·lules epiblastiques que no migren donen lloc a l'ectoderma, quedant-se a la part dorsal de l'embrió; les primeres cèl·lules que entren a través del node i el solc primitiu substitueixen la capa de l'hipoblast i formen l'endoblast definitiu que donarà lloc al futur intestí i els seus derivats. Al mateix temps, degut a la migració de cèl·lules en direcció cranial a través del node primitiu, es formen dues estructures: la placa precordial i el procés notocordal. La majoria de les cèl·lules que migren formen la tercera capa germinal, entre l'endoblast i l'epiblast, anomenada mesoblast intraembrionari o mesoderma. Aquestes cèl·lules es multipliquen als dos costats de la línia primitiva i es diferencien en mesoderma paraxial, mesoderma intermedi i mesoderma lateral (Figura 19).

Tot aquest moviment i diferenciació cel·lular està estretament regulat. Així, per exemple, el reclutament de les cèl·lules cap al solc primitiu, que donaran lloc al mesoderma paraxial naixent, depèn de la **via de senyalització de les proteïnes morfogèniques de l'os (BMP)** (Miura et al., 2006), i la migració de les cèl·lules des del solc primitiu, de la **via de senyalització dels factors de creixement de fibroblasts (FGF)** (Ciruna et al., 1997; Sun et al., 1999). Per l'especificació de la identitat del mesoderma paraxial és necessària l'expressió de **TBX6**, regulat *upstream* per la via de senyalització dels FGF (Chapman et al., 2003; Ciruna and Rossant, 2001). Un altre gen que sembla jugar també un paper important en la regulació del mesoderma és **WNT3** (Alexander et al., 2009; Yoshikawa et al., 1997).

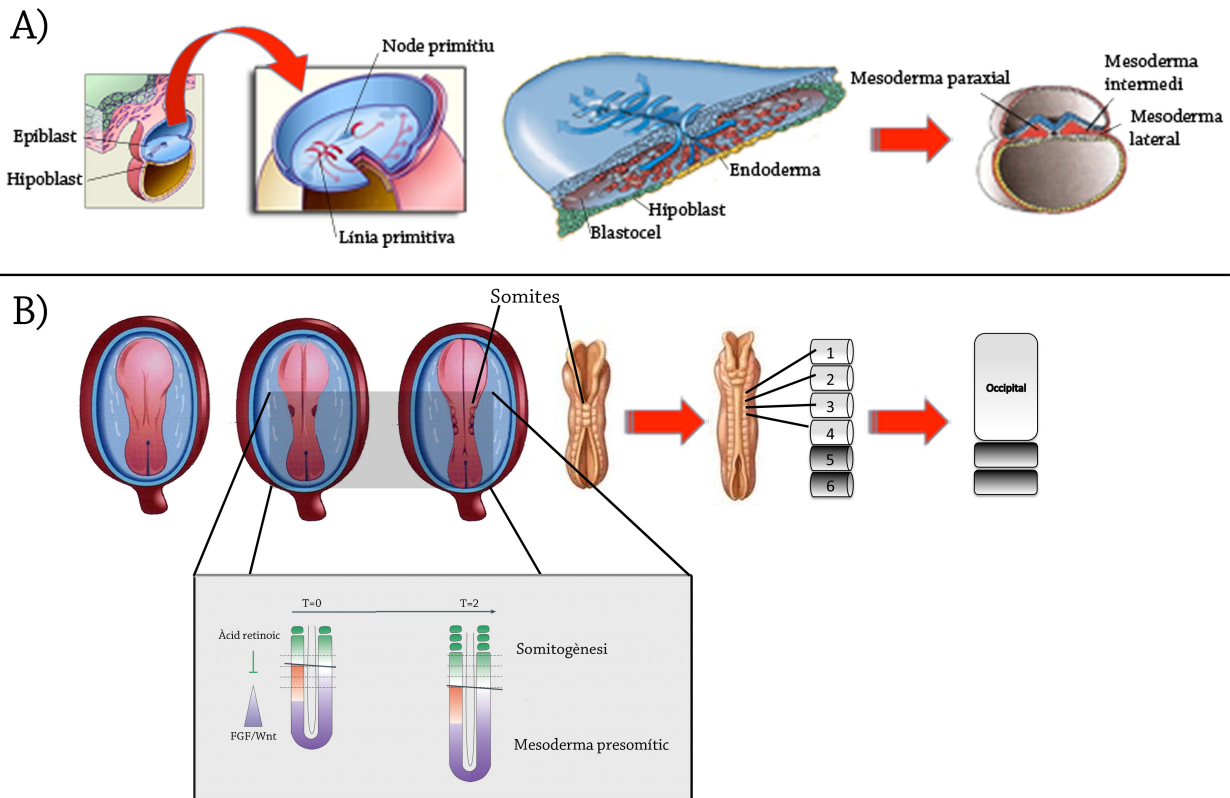


Figura 19. Esquema de la formació de l'os occipital. En A) es mostra la formació del mesoderma paraxial, que s'inicia un cop l'embrió s'ha implantat i s'ha format la línia primitiva i el node primitiu. Les cèl·lules que migren des de l'epiblast donen lloc a diferents estructures en funció de la direcció en què es desplacin: algunes substitueixen les cèl·lules de l'hipoblast per donar lloc a l'endoderma, i la gran majoria formen el mesoderma paraxial, intermedi o lateral en funció d'on es disposin. En B) es mostra l'esquema de la formació de les somites i com els quatre primers es fusionen donant lloc a l'os occipital. En el requadre se senyalen els diferents gradients que es formen en l'embrió per tal de regular la somitogènesi.

3.1.2. Formació de les somites occipitals

Aquest mesoderma paraxial, a la part posterior de l'embrió, roman en estat indiferenciat (mesoderma presomític). En canvi, la part anterior s'anirà segmentant i s'hi formaran blocs de cèl·lules anomenats somitòmers que formaran les anomenades somites. Les somites es formen en parelles de manera seqüencial, essent la primera la situada a la part més anterior de l'embrió, i la darrera, a la part més posterior (Figura 19). La formació de les somites es dona de manera rítmica i periòdica (cada 4-5h en humans). Les primeres quatre parelles de somites (formades el dia 21dpc) seran les que donaran lloc a l'os occipital a la base del crani (Figura 19), mentre que la resta de somites formaran la columna vertebral (cada somita una vèrtebra) (Dequeant and Pourquie, 2008).

Perquè la segmentació del mesoderma paraxial es produeixi correctament i es formin les somites amb una mida i orientació també correcta, hi ha un mecanisme de senyalització que de moment no es coneix amb exactitud. Es tracta d'un mecanisme oscil·latori (de rellotge), caracteritzat per una activitat transcripcional cíclica que es manifesta en onades d'expressió gènica a través del mesoderma, acoblat a un gradient d'expressió (front d'ona) (Dequeant and Pourquie, 2008):

- Gradient d'expressió: al mesoderma paraxial hi ha diferents gradients d'expressió a les **vies de senyalització de l'àcid retinoic (AR), FGF i WNT/ β -catenina** que, en funció de la seva combinació, afavoreixen el manteniment de les cèl·lules en l'estat indiferenciat (es dona a la part posterior del mesoderma paraxial) o per contra, la seva diferenciació (a la part anterior). Les vies de senyalització de FGF i WNT/ β -catenina formen un gradient d'expressió posterior-anterior, afavorint l'estat indiferenciat cel·lular; en canvi, la via de senyalització de l'AR estableix un gradient d'expressió oposat, activant la diferenciació cel·lular en la part anterior. D'aquesta manera, quan una cèl·lula entra per formar part del mesoderma paraxial (entra per la regió posterior), té una expressió elevada de FGF (FGF8 i el seu receptor FGF1R), WNT3A (que activa la via WNT/ β -catenina) i de l'enzim CYP26A1 (enzim que degrada l'AR), i es troba en estat indiferenciat. A mesura que la cèl·lula va migrant i es va situant cap a la part més anterior del mesoderma, l'expressió d'aquests gens va disminuint, i els seus transcrits es van degradant. Per contra, l'expressió de l'enzim RALDH2 (enzim que sintetitza AR) augmenta tant en la part anterior del mesoderma com en les somites (Aulehla and Pourquie, 2010) i la cèl·lula es diferencia.

- Relotge molecular: controla el temps de formació de les somites. Sembla que es controla per les vies de senyalització de WNT i FGF, les quals generen polsos periòdics d'activitat a la part posterior del mesoderma paraxial, i es creu que es regulen per retroalimentació negativa. La via de senyalització **NOTCH** sembla que també hi està involucrada ja que presenta activitat de forma periòdica (Aulehla and Pourquie, 2010).

Aquest rellotge molecular també té influència sobre el control temporal de la diferenciació cel·lular activant gens com **MESP2** (que controla la posició dels límits de la somita) i regulant l'expressió gradual d'altres gens com **T**, **TBX6**, **NKD1**, **NKD2**, **SNAI1** i **MSGN1** (Aulehla and Pourquie, 2010; William et al, 2007; Wittler et al., 2007).

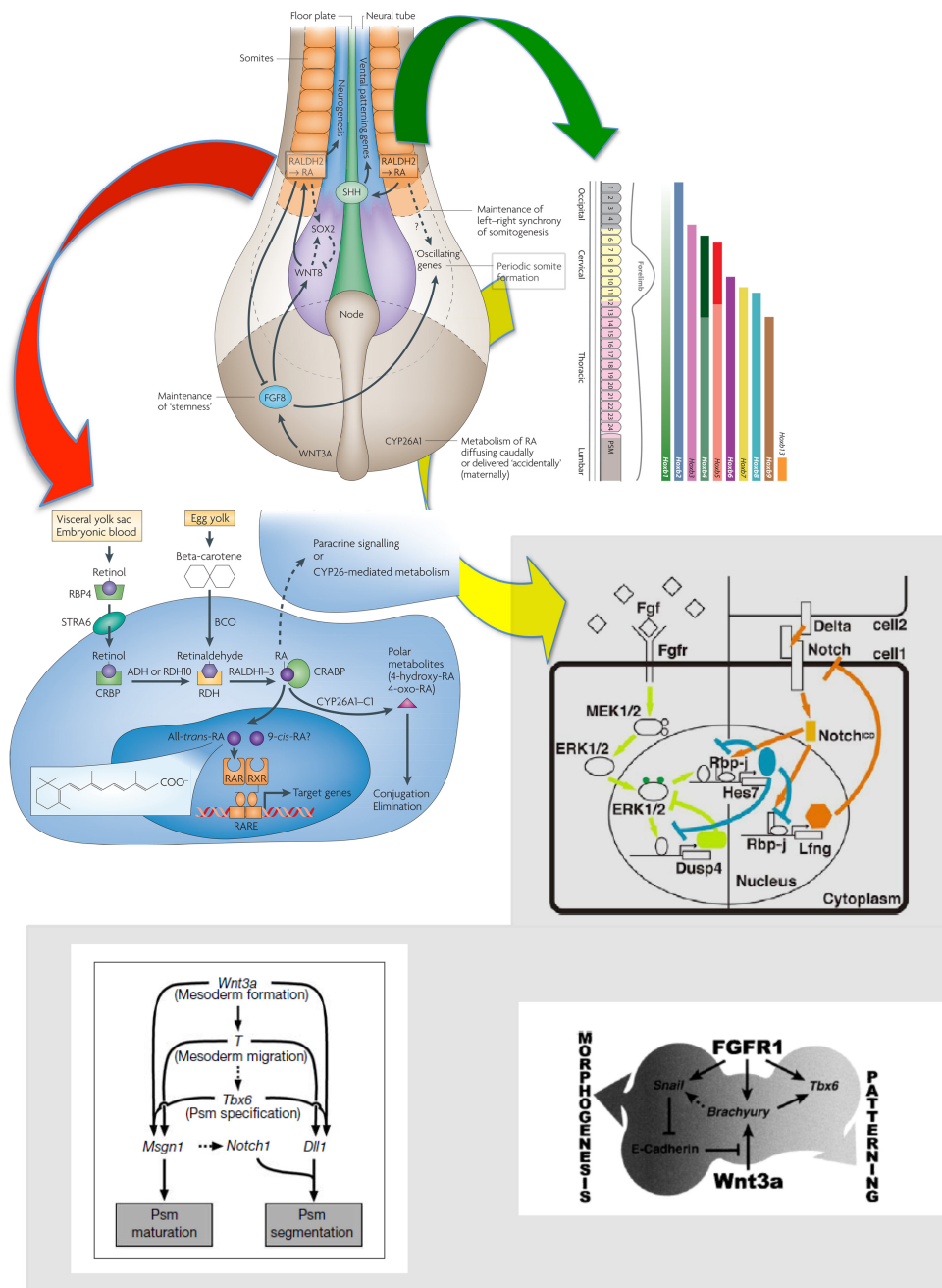


Figura 20. Principals vies gèniques implicades en la formació de les somites occipitals. Es remarquen les vies de senyalització de l'AR, FGF, WNT i NOTCH. També es mostren els gens *HOX* implicats en l'orientació axial. (Esquemes adaptats de Ciruna and Rossant, 2001; Niederreither and Dolle, 2008; Wittler et al., 2007; Alexander et al., 2009; Kageyama et al., 2009; Margueron and Reinberg, 2011).

A més, el sistema de gradients de les vies de senyalització de WNT, FGF i AR, coordinat amb els **gens HOX** a través dels **gens CDX**, sembla estar involucrat en el procés que especifica la identitat axial de les futures somites (Aulehla and Pourquie, 2010) (Figura 20).

De manera simultània a la formació de les quatre primeres parelles de somites, es dona un canvi en la nutrició embrionària. Al final de la segona setmana, l'embrió obté els nutrients per difusió a través del trofoblast, mitjançant la sang materna (les substàncies passen pel celoma extraembrionari i el sac vitel·lí cap a l'embrió). Donat que a la tercera setmana s'inicia un ràpid desenvolupament embrionari, cal un nou sistema de nutrició: es comencen a desenvolupar els vasos i les cèl·lules sanguínies. S'ha vist que les cèl·lules endotelials deriven del mesoderma, igual que les cèl·lules sanguínies. Els **factors de creixement vascular endotelial (VEGFs) i els seus receptors** són els principals involucrats en la seva formació (Demir et al., 2007), i aquests són regulats per *NOTCH* (Funahashi et al., 2010), *FGF2*, *BMP4*, AR i *TGFB1* (Goldie et al., 2008).

3.1.3. Desenvolupament de l'os occipital

Les somites formades es diferencien en esclerotomes i es converteixen en cartílag. Els principals senyals que indueixen la formació de l'esclerotoma vénen donats pels gens **Sonic Hedgehog (SHH)** i **Noggin (NOG)**, provinents de la notocorda i la placa del sòl, necessaris per l'expressió de marcadors moleculars com *PAX1*, *NKX3.1* i *NKX3.2* (Monsoro-Burq, 2005). SHH, a més, sembla ser que origina cèl·lules esclerotòmiques capaces de respondre a les **BMP** i diferenciar-se en condròcits (Olsen et al., 2000).

3.2. Gens causants de trastorns associats amb la malformació de Chiari tipus I

3.2.2. Gens implicats en el creixement axial del mesoderma

A l'Apartat 2.1.1.3 de la Introducció s'han descrit alguns dels trastorns genètics que s'associen amb la MCI. Alguns dels gens causants d'aquests trastorns estan

implicats en la formació i/o desenvolupament del mesoderma paraxial, somites occipitals i os occipital, i són candidats potencials per aquest estudi.

Així, per exemple, la família de **gens PAX** seria una bona candidata, ja que està formada per gens que codifiquen factors de transcripció que juguen un paper important en l'embriogènesi dels vertebrats. En aquest sentit, *PAX1* és un gen molt conservat que, com s'ha comentat en l'apartat anterior, està implicat en la diferenciació de les cèl·lules esclerotòmiques. Està regulat per un balanç complex de factors de senyalització durant el desenvolupament i mutacions en aquest gen estan implicades en la síndrome de Klippel-Feil (produeix un error en la segmentació de les vèrtebres cervicals). Diversos estudis han implicat també les mutacions en *PAX2* com a causants potencials de la MCI (Schimmenti et al., 1999). *PAX3* i *PAX6* també estan implicats en diverses anomalies del desenvolupament i tot i que la seva relació directa amb la MCI és limitada, també s'han proposat com a gens candidats (Schanker et al., 2011).

La família de **gens FGF** també pot ser una bona candidata: mutacions en el gen *FGFR3* donen a lloc a acondroplàxies (Laederich and Horton, 2010) i mutacions en *FGF2* i *FGFR2* a craniosinostosis (de Jong et al., 2012).

Mutacions en el gen *FBN1* també semblen produir craniosinostosis i problemes en el teixit connectiu (Greally et al., 1998; Puget et al., 2007), de manera que també s'ha suggerit aquest gen com a candidat (Boyles et al., 2006). La displàsia craniofrontonasal, una síndrome lligada al cromosoma X i produïda per una mutació en heterozigosi en el gen de l'**efrina B1** (*EFNB1*), situat al cromosoma Xq12, també s'ha associat amb la MCI. La pèrdua de funció de la proteïna produeix hiperostosi difusa i engruïment de la base del crani (Mahore et al., 2010).

3.2.3. Gens situats en regions cromosòmiques d'interès

Alguns dels trastorns associats amb la MCI, estan causats per gens situats dins de les regions cromosòmiques identificades en els dos estudis de lligament a escala genòmica realitzats fins ara en la MCI, als cromosomes 15 i 17 (veure Apartat 2.2.1 de la Introducció).

Un exemple són les síndromes de Shprintzen-Goldberg i de Marfan, totes dues produïdes per mutacions en el gen ***FBN1***, situat al cromosoma 15, que com s'ha explicat en l'apartat anterior, juga un paper important en el creixement axial del mesoderma a nivell de l'os i del teixit connectiu.

La NF1, en canvi, és un trastorn neurocutani, que es caracteritza per l'aparició de taques de color cafè amb llet, efèlides i neurofibromes a la pell. També hi ha retard mental i lesions òssies com la displàsia de l'ala de l'esfenoide i la displàsia de la tibia. El 5-20% dels pacients amb NF1 presenta una deleció en heterozigosi de 1,5 Mb que inclou el gen ***NF1*** i diversos gens situats en regions flanquejants (Jenne et al., 2001; Venturin et al., 2004). El gen ***NF1*** es troba situat al cromosoma 17.

El gen ***STAT3*** és un altre bon candidat, ja que es troba situat també dins la regió candidata del cromosoma 17. Alteracions en aquest gen produeixen la síndrome Hiper-IgE, una immunodeficiència primària de fagòcits que es manifesta amb abscessos cutanis recurrents per *Staphylococcus aureus*, pneumònies i concentracions sèriques elevades d'immunoglobulina E (Freeman and Holland, 2009). Tot i que es considera una malaltia rara, s'ha vist que un 18% dels casos presenten MCI (Angurana and Angurana, 2011).

Objectius

L'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron és centre de referència del Sistema Nacional de la Salut pel tractament de la malformació de Chiari tipus I.

Donat que es desconeix l'etiologia de la MCI però, per contra, hi ha evidències d'una component genètica que podria estar a la base d'almenys un subgrup de pacients (agregació familiar, estudis de bessons i associació amb trastorns de base genètica coneguda), l'objectiu global que es va plantejar en aquest estudi va ser investigar les bases genètiques que produeixen la MCI.

Per assolir aquesta fita es van marcar els següents objectius específics:

- Creació d'un banc de mostres d'ADN de pacients amb MCI caracteritzats clínicament i radiològica, i un banc de mostres d'ADN d'individus control.
- Caracterització de la fossa cranial posterior en un grup de pacients amb MCI mitjançant estudi morfomètric per imatge per ressonància magnètica i identificació de noves variables que permetin millorar el diagnòstic de la MCI.
- Caracterització de l'alteració de la cavitat orofaríngea en pacients amb MCI mitjançant estudi morfomètric d'IRM.
- Identificació de gens implicats en la MCI mitjançant estratègies d'estudi de malalties complexes (1) i malalties mendelianes (2):
 - Aproximació 1: Identificació de variants genètiques de susceptibilitat en pacients amb MCI mitjançant estudi d'associació cas-control poblacional amb gens candidats.
 - Estratègia 2: Seqüenciació de gens candidats en pacients no emparentats i seqüenciació de l'exoma en pacients d'una família multigeneracional en què s'ha realitzat prèviament anàlisi de lligament genètic.

Resultats

Informe sobre la participació de la doctoranda en els articles presentants

La memòria de la Tesi doctoral "Bases genètiques en la malformació de Chiari tipus I" es presenta com a compendi de 4 publicacions. La participació de la doctoranda Aintzane Urbizu Serrano en cada treball és la que es detalla a continuació:

ARTICLE 1:

Urbizu et al. (2013) MRI-based Morphometric Analysis of Posterior Cranial Fossa in the Diagnosis of Chiari Malformation Type I. *J. Neuroimaging*. doi: 10.1111/jon.12007.

La doctoranda ha realitzat la cerca bibliogràfica necessària per realitzar l'estudi i ha dut a terme tota la part experimental del treball. Ha efectuat totes les mesures de totes les variants anatòmiques seleccionades amb instruments morfomètrics aplicats a IRM cranial. Ha efectuat les repeticions necessàries per obtenir una consistència correcta intraobservador i intermètode. S'ha encarregat de l'anàlisi estadística de les dades obtingudes, en aquest cas sota la supervisió del Dr. Xavier Vidal, estadístic a la Fundació Institut Català de Farmacologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. Finalment, la doctoranda ha redactat el manuscrit en la seva primera versió i ha participat activament en les successives discussions i revisions, sota la nostra supervisió.

Índexs de qualitat: IF2011=1,509, 3r quartil de la categoria CLINICAL NEUROLOGY

ARTICLE 2:

Urbizu et al. (en preparació) Cephalometric oropharynx analysis in Chiari malformation type I. Enviat a la revista *Clinical Otolaryngology*.

La doctoranda ha seleccionat els pacients i controls inclosos en aquest estudi morfomètric. Ha efectuat totes les mesures sobre IRM cranials. Ha procedit a l'anàlisi estadística de les dades, inclosa la comparació entre casos i controls i la correlació amb les dades procedents dels estudis polisomnogràfics (fets a la Unitat de Son de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron). Finalment, ha redactat el manuscrit sota la nostra supervisió.

Índexs de qualitat: IF2011=2,393, 1r quartil de la categoria OTORHINOLARINGOLOGY

ARTICLE 3:

Urbizu et al (2013) Chiari Malformation Type I: A Case-Control Association Study of 58 Developmental Genes. *PLOS ONE* 2013; 8:e57241. doi:10.1371/journal.pone.0057241

La doctoranda ha realitzat la cerca bibliogràfica necessària per seleccionar els gens candidats, per a la qual cosa ha hagut d'aprofundir en l'embriologia i genètica del desenvolupament esquelètic humà. Ha dut a terme tota la part experimental del treball: contacte amb els pacients i obtenció de mostres i consentiments informats, extracció de l'ADN de les mostres (pacients i controls), preparació de les plaques i mesures de les variables morfològiques en IRM. Ha participat en el disseny de l'experiment (selecció final de gens candidats i SNPs corresponents). Ha analitzat els resultats de la genotipació en col·laboració amb el Dr. Claudio Toma. Ha redactat el manuscrit sota la nostra supervisió.

Índexs de qualitat: IF2011=4,092, 1r quartil de la categoria BIOLOGY

ARTICLE 4:

Urbizu et al. (en preparació) Analysis of the Polycomb gene *SUZ12* in patients with Chiari malformation type I or II. S'enviarà a una revista internacional.

La doctoranda ha participat en la selecció de pacients i obtenció de mostres biològiques, així com en la recollida de les dades clíniques. Ha portat la terme les extraccions d'ADN i tots els experiments de PCR i Sanger seqüenciació necessaris per a obtenir els resultats; això va comportar una tasca prèvia bastant laboriosa per tal d'optimitzar els encebadors i les condicions de PCR, donada l'existència de dos pseudogens. Sota la nostra supervisió ha preparat el manuscrit, que en el moment de presentar aquesta memòria de tesi es troba en la fase de pre-submissió.

Dr. Alfons Macaya Ruíz
Director de Tesi

Dr. Bru Cormand i Rifà
Co-director i Tutor de Tesi

MRI-based Morphometric Analysis of Posterior Cranial Fossa in the Diagnosis of Chiari Malformation Type I

Aintzane Urbizu, Maria-Antonia Poca¹, Xavier Vidal², Alex Rovira³, Juan Sahuquillo¹, Alfons Macaya.

From the Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain, and ¹Department of Neurosurgery and Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit, ²Servei de Medicina Preventiva, ³Magnetic Resonance Unit (IDI), Department of Radiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

El diagnòstic actual de la malformació de Chiari tipus I (MCI) es basa en la identificació del descens de les amígdales cerebel·loses (DA) a través del forat magne, reflectint compressió de les estructures neurològiques contingudes dins d'una fossa cranial posterior (FCP) subdesenvolupada. Darrerament, però, s'ha observat DA en pacients amb FCP normal i també pacients sense DA o amb DA al límit de la normalitat que tenen la FCP petita. L'objectiu d'aquest estudi ha consistit a identificar un conjunt de mesures que permetin caracteritzar la FCP i millorar el diagnòstic de la MCI.

Per tal d'assolir aquest objectiu es van realitzar 19 mesures diferents en 100 pacients amb MCI (DA>5 mm) i 50 individus control, es van comparar les mitges dels valors de les dues poblacions i es va obtenir un model, basat en una regressió logística, per predir si un individu és sa o afecte en funció de la seva FCP i no del DA.

Els resultats mostren valors significativament més petits en els pacients respecte els controls, que en ser combinades donen lloc a un model predictiu del diagnòstic amb un 93% de sensibilitat i un 92% d'especificitat. En conseqüència, la utilització d'aquestes variables pot facilitar i millorar el diagnòstic radiològic dels pacients amb MCI originats per una FCP petita, la qual cosa permetria, a més, una millora en la classificació dels pacients, necessària tant per l'elecció del tractament més adient, com per a futurs estudis sobre la MCI.

Journal of Neuroimaging. Gener 2013. DOI: 10.1111/jon.120

MRI-based Morphometric Analysis of Posterior Cranial Fossa in the Diagnosis of Chiari Malformation Type I

Aintzane Urbizu, BSc, Maria-Antonia Poca, MD, Xavier Vidal, MD, Alex Rovira, MD, Juan Sahuquillo, MD, Alfons Macaya, MD

From the Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona (AU, AM); Department of Neurosurgery and Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona (M-AP, JS); Servei de Medicina Preventiva, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona (XV); and Magnetic Resonance Unit (IDI), Department of Radiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona (AR).

ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE

The diagnosis of Chiari malformation type I (CMI) relies on MRI identification of a tonsillar descent (TD) through the foramen magnum, reflecting the overcrowding of an underdeveloped posterior cranial fossa (PCF). However, TD occurs in some patients with normal-sized PCF and, conversely, some patients with borderline or no TD have small PCF. We thus sought to identify a set of prototypic PCF measures for the diagnosis of CMI.

METHODS

We performed nineteen measurements of the PCF on sagittal MRI of 100 cases with cerebellar TD ≥ 5 mm and 50 control individuals, compared the average values in both cohorts and used logistic regression to devise a probability model to predict CMI status.

RESULTS

Significant decrements were detected for several PCF-related measures in the patients' cohort. We developed a probability model that combined seven of these parameters to predict diagnosis with 93% sensitivity and 92% specificity.

CONCLUSIONS

The addition of simple morphometric measurements in the diagnostic work-up of patients with suspected CMI may facilitate radiological diagnosis. Moreover, identification of the subset of CMI that arise from basichondrocranium underdevelopment is important for both, selection of the most appropriate therapeutic approach as well as proper CMI categorization in research studies.

Keywords: Chiari malformation type I, MRI, morphometry, ROC.

Acceptance: Received July 17, 2012, and in revised form October 12, 2012. Accepted for publication October 28, 2012.

Correspondence: Address correspondence to Dr. Alfons Macaya, Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain, Tel: +34 934893890, Fax: +34 932746837. E-mail: amacaya@vhebron.net.

Funding sources: This work was supported by grants of Instituto de Salud Carlos III, Spain, grant PI061606, Fundació La Marató TV3, Spain, grant 062710 and Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Spain, grant 2009SGR-0078. A.U. is the recipient of a scholarship from AGAUR (Spain).

Conflict of interest: We declare that we have no conflict of interest.

J Neuroimaging 2012;1-7.
DOI: 10.1111/jon.12007

Introduction

CMI is characterized by underdevelopment and overcrowding of the PCF and the associated neurological dysfunction secondary to hindbrain compression and hydrosyringomyelia. Since the advent of MRI, CMI has been defined by the chronic herniation of the cerebellar tonsils of at least 3 mm below the foramen magnum (FM).¹

The etiology of CMI is unclear and appears to be multifactorial. Pathogenic hypotheses invoking a primary neural defect²⁻⁴ gave way to the current notion that CMI is primarily a mesodermal developmental anomaly, based on experimental observations of vitamin A-induced occipital bone undergrowth and cerebellum displacement in rodents.^{5,6} Morphometric studies in CMI patients corroborated the overcrowding of a normally developed hindbrain within a hypoplastic PCF.⁷⁻¹⁶

"Acquired" CMI may differ mechanistically and encompass conditions such as cranial settling, growth hormone deficiency, cerebrospinal fluid (CSF) leaks, lumboperitoneal shunts and intracranial space-occupying lesions.^{14,17-19} In this work we will use the term "classical CMI" for referring to CMI produced by an underdeveloped PCF, as proposed by Milhorat et al.¹⁹

Since both age at presentation and symptoms show great variability in CMI, radiological diagnosis becomes paramount. However, some limitations are evident when using the standard definition of CMI based on tonsillar herniation. The prevalence of CMI is estimated to be in the range of 1 per 1,000 to 1 per 5,000 individuals²⁰ but TD may constitute an incidental finding.²¹⁻²³ Conversely, there is increasing evidence that many patients with an overcrowded PCF and typical CMI signs, such

as hydrosyringomyelia, do not show TD; many authors refer to these cases as Chiari malformation “type 0.”^{10,24}

A number of morphometric studies have provided evidence of occipital bone hypoplasia in CMI, lending support to the theory of paraaxial mesoderm insufficiency, as originally introduced by Marín-Padilla.⁶ These studies have demonstrated a selective shortness of the basioccipital^{8,10,13,25,26} the clivus^{7,9,12,14,16,19,26} or the basioccipital and the posterior supraoccipital-exoccipital.^{14,19,25,26} In contrast, volumetric PCF analyses have provided less consistent results and reduced,^{8,12} normal²⁵ or even increased¹¹ PCF volumes have been described.

In view of the limitations of solely using TD greater than 3¹ or 5 mm²⁷ to establish CMI diagnosis, the main goal of this study was to devise a mathematical model to help identifying, based on morphometric findings and irrespective of TD, symptomatic hypoplastic PCF.

Patients and Methods

Patients

This retrospective study was conducted on a prospective registry started in 1989 at our institution, which includes 307 patients admitted for surgical evaluation of CMI. From this cohort we selected 100 consecutive adult patients diagnosed with symptomatic CMI in the period 2004-2010. All patients received a complete clinical evaluation and a cranial and spinal MRI study and all displayed a cerebellar TD ≥ 5 mm on mid-sagittal T1W1 MRI. Sixty-two cases were female and the mean age was 42.6 ± 12.2 years (median 42, range 19-71 years). The most frequent signs and symptoms in the 100 cases that underwent the morphometric analysis are depicted in Table 1. Patients had been symptomatic for a median period of 36 months prior to diagnosis. The most common symptom in this cohort was headache (69%), which often featured neck irradiation (68% of those with headache). Other common symptoms were cough headaches (45%), upper limb paresthesia (39%) and dizziness (26%). Seven patients, presenting with papilledema in the absence of hydrocephalus, had intracranial hypertension when intracranial pressure was monitored. No patient displayed tethered cord. Other, less common signs and symptoms, as well as associated comorbidity were typical for CMI. Brain and spinal MRI documented hydrocephalus and syringomyelia in 23% and 45% of cases, respectively. Hydrocephalus was defined as an Evans index, or the maximal frontal horn ventricular width divided by the transverse inner diameter of the skull $>.30$.²⁸ Associated findings were retrocurved odontoid in 12 patients, basilar invagination and platybasia in 5 and Klippel-Feil malformation in a single patient (Table 1). Surgical PCF reconstruction was performed in 50% of patients.

As a control group, we included 50 individuals (31 female, mean age 35.6 ± 7.6 years) that underwent a brain MRI after presenting with a clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis, and who were presumed to reflect the normal population in terms of PCF morphology. All patients and control subjects gave informed consent to participate in the study, which was approved by the local Ethics Committee.

Table 1. Clinical Findings in 100 Patients with CMI

	CMI (TD ≥ 5 mm)
Number of patients	100
Sex (M/F)	38/62
Age (y)	45.5 ± 12.2 (20–71)
Age at diagnosis	$35.7 \pm 12.12/88^*$
Hydrocephalus	23/100 (23%)
Hydrosyringomyelia	45/100 (45%)
Pseudotumor cerebri	7/100 (7%)
Complex craniocervical malformation	6/100 (6%)
Klippel-Feil malformation	1/100 (1%)
Retrocurved odontoid	12/89 (13.5%)
SIGNS AND SYMPTOMS	
Time elapsed from onset (mo)	$67.2 \pm 68.1/88$
Headaches	67/97 (69.1%)
Occipital headache/cervicalgia	46/97 (47.4%)
Cough headaches	44/96 (45.8%)
Dizziness	26/99 (26.3%)
Vertigo	8/99 (8%)
Visual alterations	9/99 (9%)
Nystagmus	11/63 (17.5%)
Kyphoscoliosis	12/66 (18.2%)
Fatigue	7/98 (7.1%)
Instability	20/98 (20.4%)
Sensory loss	23/98 (20.4%)
Motor weakness	23/99 (23.5%)
Dysphagia	19/99 (19.2%)
Dysphonia	10/99 (10.1%)
Gait disturbances	13/99 (13.1%)
Paresthesia/pain upper limbs	39/99 (39.4%)
Paresthesia/pain lower limbs	14/99 (14.1%)
Other symptoms:	
Anxiety	16/97 (16.5%)
Depression	14/98 (14.3%)
THERAPEUTIC PROCEDURES	
Surgical treatment	50/100 (50%)

*Except for sex ratios, the figure after the slash indicates, for each variable, the number of subjects for which information was available.

Morphometric Analysis of the PCF

Brain MRI Protocol

MR data were acquired using a 1.5 T scanner (MAGNETOM Symphony or MAGNETOM Vision, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a circular polarized receiver head array coil. In all patients sagittal, transverse and coronal conventional spin-echo T1-weighted sequences were obtained (repetition time [TR] /echo time [TE]/acquisitions 450-600 ms/12-20 ms/2). In addition and for clinical purposes transverse T2-weighted fast spin-echo (TR 4300 ms/TE 96 ms/acquisitions 1-2) and fast-FLAIR (TR 8500 ms/ TE 104 ms/ inversion time 2500 ms/acquisitions1) were also performed. All sequences were obtained with 4-5-mm section thickness and .1-.3 interslice gap, 144-256 \times 256-384 matrix, and 196 \times 230 mm field of view.

Brain MRI of all patients and controls were analyzed using the digital picture archiving and communication system (PACS) on a NUMARIS/4 syngo[®] post-processing workstation, version MR 2004A, (Siemens AG, Erlangen, GE) and image J processing package version 1.41 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

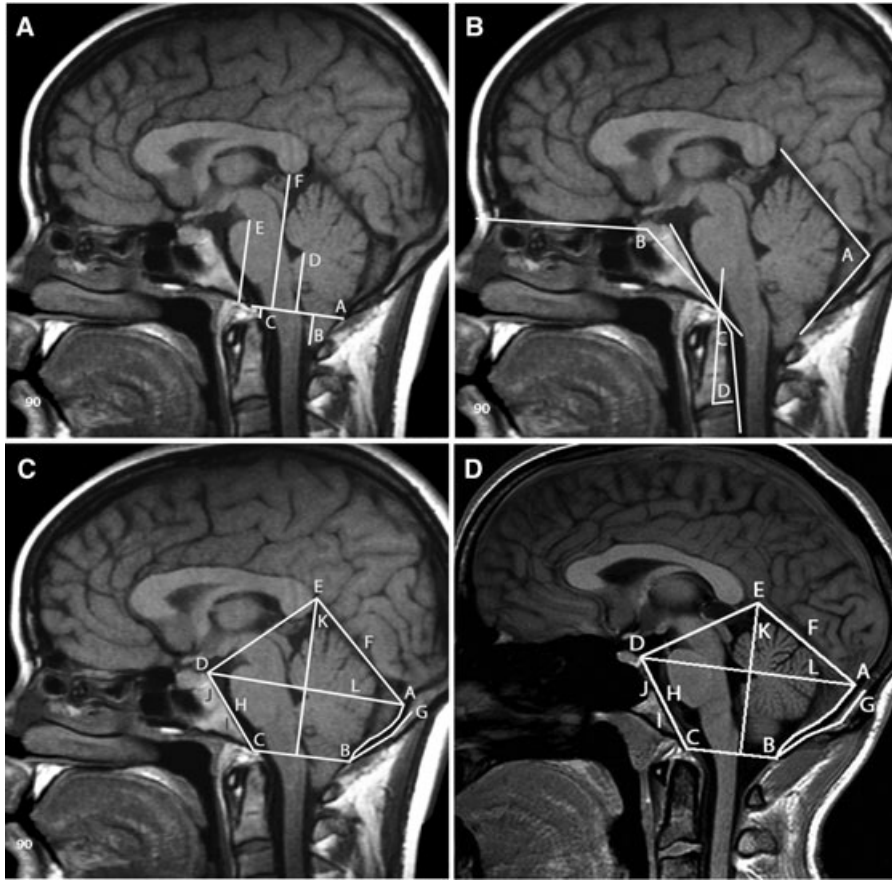


Fig 1. Morphometric measurements made on mid-sagittal T1WI of a CMI case (A,B,C) and a control subject (D). A) A number of measurements were taken in reference to the FM planum and assessed the shallowness of the PCF: FM (A), TD (B), basilar impression (C) and distance from fastigium, pons and corpus callosum to FM (D-E, respectively). B) Angular measurements were used to assess the degree of basicranium dysplasia and suboccipital shortening: tentorium angle (A), basal angulation (B), Wackenheim angle (C) and odontoid angle (D). C, D): Landmarks and linear measurements used to assess PCF dimensions and estimate areas: The height of PCF (K) was estimated by drawing the line from the upper tentorial end (E) to the basion (C)-opisthion (B) line. The anteroposterior diameter of PCF (L) was inferred from a line running from the internal occipital protuberance (A) to top of the dorsum sellae (D). The PCF area was estimated as the polygon delimited by (A) (B) (C) (D) and (E) and the osseous PCF area as the one delimited by (A) (B) (C) and (D). Length of tentorium (F), supraoccipital (G) and clivus (H), including the basioccipital (I) and basisphenoid (J) lengths when the spheno-occipital synchondrosis was discernible, were also measured.

Morphometric Methodology

The following measurements, including linear, surface and angular parameters were made in mid-sagittal T1WI from 100 patients with untreated, classical CMI and 50 control subjects (Fig 1):

Cerebellar TD

The degree of TD was measured as previously described.^{27,29,30} In summary, the line between the basion and opisthion (ie, McRae's line) was assumed to represent the planum of the FM. TD was then evaluated by measuring the distance to the most caudal aspect of the tonsils on a line running perpendicular to the opisthion-basion line. Tonsillar position above the FM was assigned a negative value.

Morphological Features of PCF

The PCF area was estimated from a single MRI sagittal slice and the surface delimited by the following boundaries: tentorium,

supraoccipital portion of the occipital bone, FM and clivus. The area of the osseous PCF was estimated from a polygon bounded by the following edges: occipital bone (basioccipital portion of the clivus and supraoccipital portion of the occipital bone to the insertion of the tentorium), basisphenoid and a line from the upper basisphenoid to the internal occipital protuberance.³¹ All the edges of the PCF polygon were also measured: FM, the distance from basion to opisthion along the McRae's line,^{19,24} the length of supraoccipital^{8,19,25} and the clivus length.^{8,19,25} The height of PCF was calculated as a perpendicular line from the highest point of the fossa to the basion-opisthion line, and its anteroposterior diameter as a line from the highest point of the sella turcica to the internal occipital protuberance (ie, Twining's line).⁷

To Assess the Degree of PCF Overcrowding

We measured the length of three lines, which have proven to be reliable indicators of the presence of a cranioencephalic disproportion: the distance from corpus callosum to FM⁷, the

distance from the fastigium to FM and the distance from the pons to the FM.

Odontoid Process

To assess the presence/absence of basilar impression, the distance from the tip of the odontoid process to the McRae's line was measured. Values can be negative (below McRae's line) or positive (above McRae's line). In addition, we measured the odontoid angle formed by a horizontal line along the base of C2 body and another bisecting the odontoid process.³²

Angular Measurements

Three measurements were taken: (1) the tentorium angle (formed by the tentorium and supraoccipital),^{8,33} (2) the angle formed by a line from the basion to the center of the sella turcica and a second line drawn from the center of the sella turcica to the nasion³³ and (3) the Wackenheim's angle, formed by a line drawn along the clivus prolonged downwards to meet a line tangential to the posterior aspect of the odontoid process.

A single observer, blinded to the clinical diagnosis, obtained the above-referred 19 measures from a midsagittal T1WI slice. In order to evaluate intraobserver agreement for each morphometric method and consistence of measurements between the two methods, we performed two-way mixed intraclass correlation coefficients (ICC) (95% confidence interval) on repeated measures for all measurements in 15 randomly selected cases. In both instances, high intraobserver reliability was found (ICC > .7, range .69-.99, $P < .01$).

Statistical Analysis

Data are presented as percentages for categorical variables and mean values with their standard deviations for continuous variables. Parametric (ANOVA) or nonparametric (Mann-Whitney U) tests were used to compare continuous variables between patient and control groups. Statistical significance, initially set at $P < .05$, was modified to $P < .0025$ after applying the Bonferroni correction for multiple comparisons. The statistical analyses were performed with JMP[®] 7.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) and SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

In order to identify the most robust measures to differentiate patients' from controls' PCF, a predictive model was developed using the *Screening* module of the JMP Software, which ranks the variable effects in a similar way to a forward stepwise regression. Next, a logistic regression model with the variables that maximized the classification properties (sensitivity and specificity) was fitted using the SPSS software. The corresponding ROC curve was calculated to determine the accuracy of the model and the cut-off value above which an individual can be predicted to suffer classical CMI malformation.

Results

MRI Morphometric Data

Table 2 shows the average values of the PCF measurements in both cohorts. Patients showed statistically significant differences ($P < .0025$) with respect to controls in several PCF-related measurements. The most remarkable were observed

Table 2. Morphometric PCF Analysis in Patients and Control Subjects. Average Values (mean \pm SD) are Indicated for the 19 Performed Measurements

Variable	Patients (n = 100)	Controls (n = 50)	P
Age (y)	42.6 \pm 12.2	35.6 \pm 7.6	
Sex (M/F)	38/62	19/31	
Measurements			
TD (mm)	10.8 \pm 4.5	-4.9 \pm 3.7	4.97E-41
Tentorium (mm)	50.1 \pm 5.5	53.1 \pm 4.8	.001
Supraoccipital (mm)	41.3 \pm 5.1	43.8 \pm 5.1	.004
FM (mm)	34.7 \pm 3.4	35.4 \pm 3.0	.229
Clivus (mm)	42.2 \pm 4.0	47.0 \pm 3.3	2.17E-11
PCF area (cm ²)	33.7 \pm 3.7	37.8 \pm 3.5	1.56E-09
Osseous PCF area (cm ²)	20.3 \pm 2.5	23.7 \pm 2.8	1.98E-12
Corpus callosum to FM (mm)	56.0 \pm 4.2	63.3 \pm 3.2	2.4E-20
Height PCF (mm)	62.6 \pm 6.1	68.5 \pm 4.9	1.84E-08
Width PCF (mm)	85.5 \pm 5.0	85.7 \pm 4.2	.821
Fastigium to FM (mm)	26.1 \pm 3.7	31.6 \pm 2.2	5.69E-18
Pons to FM (mm)	35.8 \pm 4.5	43.2 \pm 3.2	3.46E-20
Basal angulation (°)	133.7 \pm 6.7	127.8 \pm 4.2	3.36E-08
Tentorium angle (°)	90.1 \pm 8.0	93.2 \pm 7.1	.022
Wackenheim angle (°)	153.5 \pm 11.4	154.2 \pm 7.2	.971
Basilar impression (mm)	-4.3 \pm 2.3	-4.2 \pm 2.2	.823
Odontoid angle (°)	67.3 \pm 5.6	66.9 \pm 5.0	.726
Clivus to basiesphenoid (mm)	11.5 \pm 4.5	14.0 \pm 6.7	.211
Clivus to basioccipital (mm)	24.3 \pm 4.3	26.0 \pm 5.2	.315

in the parameters measuring the distance from several neural structures (corpus callosum, pons and fastigium) to the FM, which were considerably reduced and reflected the shallowness of the PCF. We also observed a marked reduction in PCF areas and a reduced length of the clivus. Patients showed significantly increased basal angle and reduced tentorium's length. In contrast, the average length of the supraoccipital, the anteroposterior diameter of the FM and the anteroposterior diameter of the PCF, as well as the tentorium, Wackenheim and odontoid angles showed no significant differences between the two groups (Fig 2). In the subgroups of 23 cases and 11 controls where we were able to discern basioccipital from basiesphenoid, their mean length values showed no significant differences.

Twenty-three CMI patients showed hydrocephalus. Because inclusion of patients with this complication could conceivably introduce a bias in our morphometric data, we compared, for all the parameters measured, the average values in the 23 cases with hydrocephalus and the 77 without hydrocephalus and found no significant differences (not shown). In addition, the distance from corpus callosum to FM, the fundamental variable for our probability model (see below), was significantly reduced in CMI cases as compared to controls irrespective of the presence ($P = 4,06E-14$) or absence ($P = 2,41E10-17$) of hydrocephalus.

Development of a Probability Model

A logistic regression model with the variables that maximized the classification properties was fitted. The resulting model included up to seven variables that provided a high probability of accurate control/case classification according to the equation $P(\text{case}) = 1/(1 + \exp(-z))$, where $z = -1.533 - 2.666 * \text{corpus}$

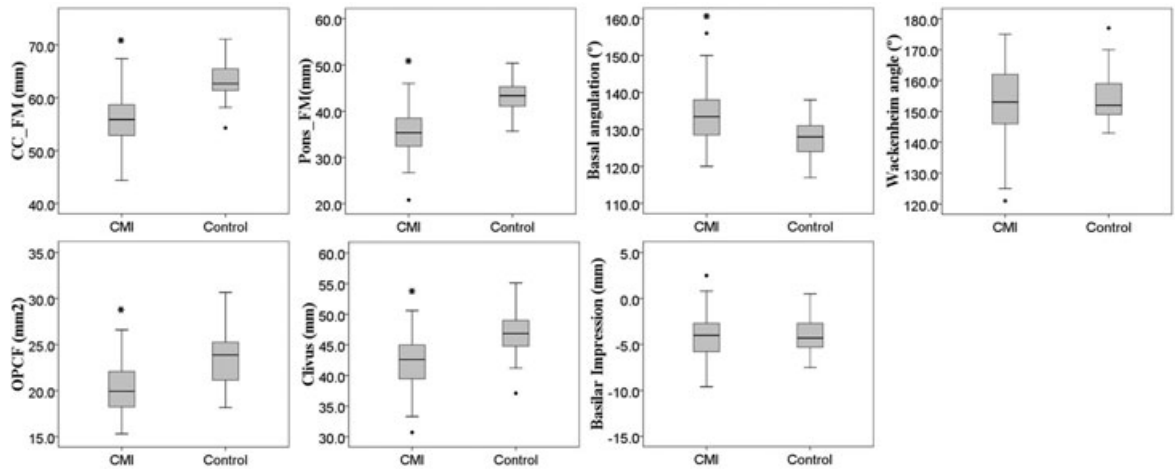


Fig 2. Differences in PCF measurements between cases and controls. The boxplot denotes the ranges in seven illustrative measures, those included in the probability model. Significant differences were detected for osseous PCF area (OPCF), length of the clivus, distance corpus callosum to FM (CC_FM), distance from pons to FM and basal angulation, between the cases and the control groups. No significant differences were detected for the Wackenheim angle or basilar impression. Boxes indicate ± 1 SD and include the mean value (thick line); whiskers indicate ± 2 SD. Dots depict subjects with measurements greater than 2 SD. * $P < .0025$.

$$\text{callosum_FM} - 3.785 * \text{pons_FM} + .109 * \text{Wackenheim angle} + .124 * \text{basal angle} - .252 * \text{osseous PCF area} + .813 * \text{McRae} + 1.377 * \text{clivus}.$$

This model revealed a sensitivity of 93% (95% CI, 86.3%-96.6%) and a specificity of 92%, (95% CI, 81.2%-96.8%) when applied to our cohorts using a cut-off point of $P = .55$. The area under the curve of the associated ROC was .955 (95% CI, .923-.988) (Fig 3).

Discussion

In this study we analyzed the PCF morphology of 100 adult CMI patients and 50 control subjects and used the data to generate a mathematical model that predicted, with high sensitivity and specificity, the diagnosis of CMI regardless of the degree of TD.

Evidences of Cranioencephalic Disproportion from Mesodermic Origin in CMI

The occurrence of hypoplastic PCF in CMI patients is widely accepted. Previous morphometric studies found small PCF both in children and adults with classical CMI.^{7-9,12,14,16,19,25,34} These observations led to the consensus that the radiological findings of overcrowded PCF along with demonstration of altered CSF dynamics, are highly suggestive of CMI, although patients without TD are actually referred to as Chiari malformation “type 0.”²⁴ Some studies, however, acknowledge that a subset of CMI patients display low-lying cerebellar tonsils with normal-sized PCF.¹⁹ In addition, whether the label CMI should be applied to patients with TD resulting from intracranial masses or insertion of lumboperitoneal shunts remains a matter of debate.

PCF morphometry in our patients further supports the role of hypoplastic PCF in CMI. Analyses revealed significant differences in 10 out of 19 selected measurements that, in the aggregate, indicated smaller PCF and osseous PCF in CMI. The

most significant differences between cases and controls were found in the height of the PCF, as measured by means of the distance from the McRae’s line to three different anatomical landmarks (corpus callosum, fastigium and pons), as well as the clivus length, both being much shorter in the patients group. Previous morphometric studies showed underdeveloped bony parts of the PCF in both adult^{8,9,11,12,21,25,26} and pediatric patients.²⁴ Our results revealed that the underdevelopment of the bony structures of the PCF in the CMI group was only significant for the clivus, whereas the differences found for the supraoccipital did not reach statistical significance, in line with some studies^{7,10,13} but in contrast with others.^{7,8,10,13,14,19,25} Of note, we drew a curved line following the occipital squama to better measure the distance between the internal occipital protuberance and the opisthion. This differs from previous studies, which measured a straight line between these two landmarks, but it avoids the error derived from not considering the varying degrees of occipital bulging present in both patients and controls. The fact that we found differences in the length of the clivus but not in the chondrocranium-derived basioccipital might be due to the limited number of patients ($n = 22$) where a clear visualization of the spheno-occipital synchondrosis was possible. The length of the tentorium was also shorter in CMI patients, but no significant increments were found in the tentorial angle, at variance with other authors.^{8,10,13,16,25} Although we observed a smaller FM in our cases, the difference did not reach statistical significance, in contrast with studies conducted in classical CMI patients by Milhorat et al.^{7,19}

We did not attempt to measure the PCF volume, despite its potential to better define the actual dimensions of the PCF compartment. A volumetric analysis would not have been possible in this retrospective study, since not all the sequences were obtained with the same slice thickness and interslice gap, preventing volume estimation using the Cavalieri principle.³⁵

Thus, our data add to the accumulating evidences that CMI is a disorder of the paraxial mesoderm characterized by the

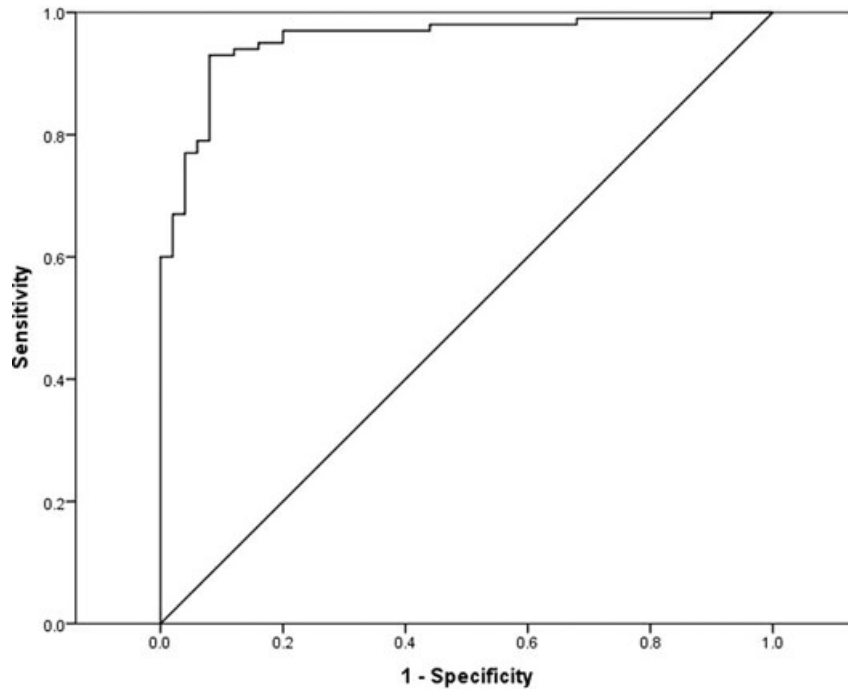


Fig 3. ROC curve illustrating high sensitivity and specificity of the application of the morphometry-based CMI probability model to case and control cohorts. Using the cutoff point of $P = .55$, the area under the curve was .955 (95%, CI [.923-.988]).

underdevelopment and overcrowding of the PCF. Of note, the statistical power of our study was enhanced by using a sample bigger than those in previous reports, with the exception of the recent work of Milhorat et al.¹⁹ Furthermore, we excluded patients younger than 18 years to minimize age-related changes in the size of skull and brain structures and used case and control cohorts with identical male/female ratio.

Proposed Criteria for Diagnosis of CMI: Identification of Cranioencephalic Disproportion

The current gold standard for the diagnosis of CMI is the observation of TD on a sagittal MRI. However, it has become progressively evident that TD may result from an array of disorders^{14,36-40} that very often do not entail occipital underdevelopment, for which the label CMI might not be appropriate. Following a pathophysiological approach, Milhorat et al classified patients with Chiari malformations as possibly caused by five distinct mechanisms of cerebellar tonsil herniation and compared their respective PCF morphology, including occipital bone size, PCF volume and FM dimensions.¹⁹ Only patients with Chiari malformation of the classical type or those associated with craniosynostosis, displayed occipital bone hypoplasia and reduced PCF volume and FM. Patients with TD associated with tethered cord syndrome, cranial settling, intracranial space-occupying lesions or lumboperitoneal shunts showed normal occipital bone size, PCF volume and FM or even enlarged FM in the former case. Our view is that the term CMI should be reserved for those cases arising from occipital bone undergrowth, that is, those designated “classical” in the study by Milhorat et al.¹⁹ Such distinction will prove fundamental in future research addressing the genetic basis of the

Chiari malformations. In this regard, a limitation of our study resided in the patient sample composition: use of the standard TD criteria for selection of cases, which were used to model the CMI prototypic PCF, inevitably resulted in the inclusion of a few patients without underdeveloped PCF.

Our data show that a combination of seven straightforward PCF measures, regardless of TD, correctly predicts the probability of an affected CMI status with a 93% probability. We propose that this logistic regression model, based on reliable markers of the characteristic CMI craniocephalic disproportion, may prove useful for diagnosis of symptomatic borderline CMI or Chiari malformation “type 0” patients, thus reducing the uncertainty associated with the application of the current, somewhat restrictive radiological criteria. Inclusion of additional measures assessing CSF flow or CSF spaces could potentially lead to a further improvement in the detection of patients with classical CMI. Since disappearance of retrocerebellar CSF spaces is a constant radiological finding in CMI,^{13,19} the analysis of cardiac-gated phase-contrast cine-MRI sequences should be considered an important aid in early diagnosis of CMI-related CSF flow abnormalities.^{10,41}

Conclusion

Definition of CMI based uniquely on tonsillar ectopia has limitations. In the absence of other specific biomarkers, such as genetic tests or complex functional studies, our results suggest that the use of standard PCF measures may facilitate MRI diagnosis of CMI.

We thank Ester Cuenca-Leon for her help in image analysis.

References

1. Barkovich AJ, Wippold FJ, Sherman JL, et al. Significance of cerebellar tonsillar position on MR. *AJNR Am J Neuroradiol* 1986;7(5):795-799.
2. Barry A, Patten BM, Stewart BH. Possible factors in the development of the Arnold-Chiari malformation. *J Neurosurg* 1957;14(3):285-301.
3. Gardner WJ, Goodall RJ. The surgical treatment of Arnold-Chiari malformation in adults: an explanation of its mechanism and importance of encephalography in diagnosis. *J Neurosurg* 1950;7(3):199-206.
4. McLone DG, Knepper PA. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci* 1989;15(1):1-12.
5. Marin-Padilla M. Notochordal-basichondrocranium relationships: abnormalities in experimental axial skeletal (dysraphic) disorders. *J Embryol Exp Morphol* 1979;53:15-38.
6. Marin-Padilla M, Marin-Padilla TM. Morphogenesis of experimentally induced Arnold-Chiari malformation. *J Neurol Sci* 1981;50(1):29-55.
7. Aydin S, Hanimoglu H, Tanriverdi T, et al. Chiari type I malformations in adults: a morphometric analysis of the posterior cranial fossa. *Surg Neurol* 2005;64(3):237-241.
8. Milhorat TH, Chou MW, Trinidad EM, et al. Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery* 1999;44(5):1005-1017.
9. Schady W, Metcalfe RA, Butler P. The incidence of craniocervical bony anomalies in the adult Chiari malformation. *J Neurol Sci* 1987;82(1-3):193-203.
10. Sekula RF, Jr., Jannetta PJ, Casey KF, et al. Dimensions of the posterior fossa in patients symptomatic for Chiari I malformation but without cerebellar tonsillar descent. *Cerebrospinal Fluid Res* 2005;2:11.
11. Stovner LJ, Bergan U, Nilsen G, et al. Posterior cranial fossa dimensions in the Chiari I malformation: relation to pathogenesis and clinical presentation. *Neuroradiology* 1993;35(2):113-118.
12. Vega A, Quintana F, Berciano J. Basichondrocranium anomalies in adult Chiari type I malformation: a morphometric study. *J Neurol Sci* 1990;99(2-3):137-145.
13. Noudel R, Jovenin N, Eap C, et al. Incidence of basioccipital hypoplasia in Chiari malformation type I: comparative morphometric study of the posterior cranial fossa. Clinical article. *J Neurosurg* 2009;111(5):1046-1052.
14. Milhorat TH, Bolognese PA, Nishikawa M, et al. Association of Chiari malformation type I and tethered cord syndrome: preliminary results of sectioning filum terminale. *Surg Neurol* 2009;72(1):20-35.
15. Nyland H, Krogness KG. Size of posterior fossa in Chiari type I malformation in adults. *Acta Neurochir (Wien)* 1978;40(3-4):233-242.
16. Karagoz F, Izgi N, Kapicijoglu Sencer S. Morphometric measurements of the cranium in patients with Chiari type I malformation and comparison with the normal population. *Acta Neurochir (Wien)* 2002;144(2):165-171.
17. Atkinson JL, Weinshenker BG, Miller GM, et al. Acquired Chiari I malformation secondary to spontaneous spinal cerebrospinal fluid leakage and chronic intracranial hypotension syndrome in seven cases. *J Neurosurg* 1998;88(2):237-242.
18. Murphy RL, Tubbs RS, Grabb PA, et al. Chiari I malformation and idiopathic growth hormone deficiency in siblings: report of three cases. *Childs Nerv Syst* 2007;23(10):1221-1223.
19. Milhorat TH, Nishikawa M, Kula RW, et al. Mechanisms of cerebellar tonsil herniation in patients with Chiari malformations as guide to clinical management. *Acta Neurochir (Wien)* 2010;152(7):1117-1127.
20. Speer MC, George TM, Enterline DS, et al. A genetic hypothesis for Chiari I malformation with or without syringomyelia. *Neurosurg Focus* 2000;8(3):1-4.
21. Meadows J, Kraut M, Guarnieri M, et al. Asymptomatic Chiari Type I malformations identified on magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 2000;92(6):920-926.
22. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, et al. Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med* 2007;357(18):1821-1828.
23. Morris Z, Whiteley WN, Longstreth WT, Jr., et al. Incidental findings on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009;339:b3016.
24. Tubbs RS, Elton S, Grabb P, et al. Analysis of the posterior fossa in children with the Chiari 0 malformation. *Neurosurgery* 2001;48(5):1050-1054.
25. Nishikawa M, Sakamoto H, Hakuba A, et al. Pathogenesis of Chiari malformation: a morphometric study of the posterior cranial fossa. *J Neurosurg* 1997;86(1):40-47.
26. Dagtekin A, Avci E, Kara E, et al. Posterior cranial fossa morphology in symptomatic adult Chiari I malformation patients: comparative clinical and anatomical study. *Clin Neurol Neurosurg* 2011;113(5):399-403.
27. Aboulez AO, Sartor K, Geyer CA, et al. Position of cerebellar tonsils in the normal population and in patients with Chiari malformation: a quantitative approach with MR imaging. *J Comput Assist Tomogr* 1985;9(6):1033-1036.
28. Evans WAJ. An encephalographic ratio for estimating ventricular enlargement and cerebral atrophy. *Arch Neurol Psychiatry* 1942;47(6):931-937.
29. Mikulis DJ, Diaz O, Eggin TK, et al. Variance of the position of the cerebellar tonsils with age: preliminary report. *Radiology* 1992;183(3):725-728.
30. O'Connor S, du Boulay G, Logue V. The normal position of the cerebellar tonsils as demonstrated by myelography. *J Neurosurg* 1973;39(3):387-389.
31. Tubbs RS, Hill M, Loukas M, et al. Volumetric analysis of the posterior cranial fossa in a family with four generations of the Chiari malformation Type I. *J Neurosurg Pediatr* 2008;1(1):21-24.
32. Tubbs RS, Wellons JC, Blount JP, et al. Inclination of the odontoid process in the pediatric Chiari I malformation. 3rd ed. *J Neurosurg* 2003;98(1 Suppl):43-49.
33. Boyles AL, Enterline DS, Hammock PH, et al. Phenotypic definition of Chiari type I malformation coupled with high-density SNP genome screen shows significant evidence for linkage to regions on chromosomes 9 and 15. *Am J Med Genet A* 2006;140(24):2776-2785.
34. Trigylidas T, Baronia B, Vassilyadi M, et al. Posterior fossa dimension and volume estimates in pediatric patients with Chiari I malformations. *Childs Nerv Syst* 2008;24(3):329-336.
35. Mayhew TM, Olsen DR. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. *J Anat* 1991;178:133-144.
36. Milhorat TH, Bolognese PA, Nishikawa M, et al. Syndrome of occipitoatlantoaxial hypermobility, cranial settling, and chiari malformation type I in patients with hereditary disorders of connective tissue. *J Neurosurg Spine* 2007;7(6):601-609.
37. Cinalli G, Spennato P, Sainte-Rose C et al. Chiari malformation in craniosynostosis. *Childs Nerv Syst* 2005;21(10):889-901.
38. Lemar HJ, Jr., Perloff JJ, Merenich JA. Symptomatic Chiari-I malformation in a patient with acromegaly. *South Med J* 1994;87(2):284-285.
39. Richards PS, Bargiota A, Corral RJ. Paget's disease causing an Arnold-Chiari Type 1 malformation: radiographic findings. *AJR Am J Roentgenol* 2001;176(3):816-817.
40. Chumas PD, Armstrong DC, Drake JM, et al. Tonsillar herniation: the rule rather than the exception after lumboperitoneal shunting in the pediatric population. *J Neurosurg* 1993;78(4):568-573.
41. Armonda RA, Citrin CM, Foley KT, et al. Quantitative cine-mode magnetic resonance imaging of Chiari I malformations: an analysis of cerebrospinal fluid dynamics. *Neurosurgery* 1994;35(2):214-223.

Cephalometric oropharynx analysis in Chiari malformation type I

Aintzane Urbizu, Alex Ferré Masó¹, Maria-Antonia Poca², Alex Rovira³, Juan Sahuquillo², Alfons Macaya.

From the Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain, and ¹Sleep Unit, Department of Clinical Neurophysiology ²Department of Neurosurgery and Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit, ³Magnetic Resonance Unit (IDI), Department of Radiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

La malformació de Chiari tipus I (MCI) es caracteritza per símptomes i complicacions associades causats per la compressió del teixit nerviós i per les alteracions del líquid cefaloraquidi, on el mal de cap occipital, dolor cervical, hidrocefàlia i siringomièlia són els més comuns. Però hi ha altres símptomes, com la disfàgia, vòmits, l'obstrucció natural de la respiració, alteracions de la son i problemes en la intubació d'aquests pacients que estan relacionats amb la disfunció de la cavitat orofaríngia, i sovint no es tenen en compte. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar la morfologia de la cavitat orofaríngia de pacients amb la MCI mitjançant un estudi morfomètric basat en imatge per ressonància magnètica per tal d'entendre millor els símptomes i problemes produïts en aquests pacients. Es va mesurar i comparar la morfometria de la cavitat orofaríngia de 80 pacients amb MCI amb més de 5mm de descens amigdalari i una fossa cranial posterior (FCP) petita i 49 individus control. Es van mesurar 12 variables, de les quals cinc van mostrar diferències estadísticament significatives entre casos i controls, de les quals cal destacar les relacionades amb la morfologia del vel del paladar. Es va observar també una correlació moderada entre algunes d'aquestes variables amb paràmetres que valoren les alteracions de la son.

Els resultats obtinguts en aquest estudi confirmen l'existència d'anomalies a la cavitat orofaríngia en pacients amb MCI, a més de tenir una FCP hipoplàstica, les quals poden contribuir a les complicacions respiratòries i de deglució que pateixen aquests pacients.

Aquest article s'ha enviat a la revista *Clinical Otolaryngology*.

Cephalometric oropharynx analysis in Chiari malformation type I

Aintzane Urbizu, Alex Ferré-Masó¹, Maria-Antonia Poca², Alex Rovira³, Juan Sahuquillo², Alfons Macaya.

From the Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain, and ¹Sleep Unit, Department of Clinical Neurophysiology
²Department of Neurosurgery and Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit, ³Magnetic Resonance Unit (IDI), Department of Radiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Correspondence:

Dr. Alfons Macaya
Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica
Vall d'Hebron Institut de Recerca
Pg Vall d'Hebron 119-129
08035, Barcelona, Spain

Tel +34 934893890

Fax +34 932746837

Email: amacaya@vhebron.net

Abstract

Objectives: Some common symptoms in Chiari malformation type I (CMI) are related to pharyngeal dysfunction and include choking, regurgitation, dysphagia, aspiration, chronic cough and sleep disorders. In addition, tracheal intubation is often difficult in these patients. The purpose of this study was to analyse the morphological features of the oropharynx in CMI, in order to identify the possible underlying anatomical anomalies leading to these debilitating symptoms.

Design: Case-control, MRI-based morphometric study.

Setting: Tertiary hospital

Participants: 80 CMI patients with cerebellar tonsillar descent greater than 5mm and a small posterior cranial fossa and 49 sex-matched controls.

Main outcome measures: We performed twelve linear, areal and angular measurements of the oropharyngeal cavity on mid-sagittal T1W1 MRI and compared the average values between cases and control cohorts. We sought to find correlations between some variables showing or approaching statistical significance and polysomnogram parameters obtained in a subset of patients.

Results: Significant differences were detected for several oropharynx measures in the patients' cohort, mainly involving soft palate morphology. We observed a moderate correlation between some of these variables and parameters indicative of obstructive apnoea syndrome.

Conclusions: We confirmed the existence of structural oropharyngeal anomalies in CMI, which may contribute to the frequent occurrence of respiratory and deglutitory complications in this syndrome.

Introduction

Chiari malformation type I (CMI) is a cranial malformation causing neurological dysfunction, currently defined by the observation, on midsagittal Magnetic Resonance Imaging (MRI), of a descent of the cerebellar tonsils across the foramen magnum of at least 3 mm.¹

Experimental work ² and morphometric studies ³⁻⁶ proved that CMI results mainly from a small posterior cranial fossa (PCF) due to a short occipital bone, which in turn is the consequence of an early paraxial mesodermal underdevelopment. Patients with tonsillar descent (TD) associated to PCF underdevelopment have been labeled as suffering of “classical CMI” ⁵ and they may present with a complex clinical picture, with highly variable symptoms that occur in multiple combinations. CMI most common symptoms and related complications are occipital headaches, cervical pain, weakness, dizziness, hydrosyringomyelia and hydrocephalus, related to direct compression of nervous tissue and cerebrospinal fluid disturbances. Other manifestations such as aspiration, regurgitation, choking, dysphagia, abnormal vocal cord function, chronic cough or sleep disorders, are presumed to result from impaired oropharyngeal function or upper airway obstruction and are often neglected, despite being debilitating conditions that may even become life-threatening.^{7,8}

Surgical PCF reconstruction is the most effective treatment for CMI. However intubation is often a laborious process in these patients, which compounds the risk for complications of this or other surgical procedures in CMI patients. Studying and understanding the oropharyngeal defects should help neurosurgeons and anaesthesiologists to use a better approach for endotracheal intubation and PCF decompression.

The aim of this study was to analyse the less well-recognized secondary defects of the facial skeleton (viscerocranium) and subsequent anomalies of the nasal, buccal, pharyngeal, and laryngeal regions by performing a MRI-based morphometric study in a cohort of adult CMI that was compared with a control group. We also tried to correlate any significant morphological anomalies with the polysomnographic data, available in a subset of patients.

Patients and methods

The population for this retrospective study was selected from a database of 430 unrelated patients with CMI included in a prospective registry started in 1989 at our institution. We selected 80 consecutive adult patients that were evaluated at the Department of Neurosurgery, Vall d'Hebron Hospital of Barcelona (Spain) in the period 2004-2010 by two of the investigators (M-AP, JS) and received a CMI diagnosis after undergoing a cranial and spinal MRI study. Inclusion criteria were observation of a TD greater than 5mm on midsagittal T1-weighted MRI and verification of hypoplastic PCF using a mathematical model as previously reported ⁹ in order to select patients with classical CMI. This group included forty-nine females and the mean age for this cohort was 42.0±12.2 years (range 20-71 years). The most frequent signs and symptoms are depicted in Table 1. Patients had been symptomatic for a median period of 79 months prior to diagnosis. The most common symptom in this cohort was headache (65%), which often featured neck irradiation (48% of those with headache). Other common symptoms were upper limb paresthesia (45%), cough headaches (41%) and dizziness (35%). Associated findings were hydrosyringomelia (51%), hydrocephalus (27%), basilar impression (5%) and retrocurved odontoid (13%). No patient displayed tethered cord. Four patients were asymptomatic at the time of diagnosis.

The control group was composed of 49 individuals (30 female, mean age 35.6±6.8 years) that underwent a brain MRI after presenting with a clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis, and who were presumed to reflect the normal population in terms of PCF and oropharynx morphology.

Ethical considerations

All patients and control subjects provided informed consent to participate in the study, which was approved by the local Ethics Committee.

Morphological measurements

Brain MRI protocol

MRI data were acquired using a 1.5 T scanner (MAGNETOM Symphony or MAGNETOM Vision, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a circular polarized receiver head array coil. In all patients sagittal, transverse and coronal conventional spin-echo T1-weighted sequences were obtained (repetition time [TR] /echo time [TE]/acquisitions 450-600 ms /12-20 ms/2). All sequences were obtained with 4-5-mm section thickness and 0.1-0.3 interslice gap, 144-256 x 256-384 matrix, and 196 x 230 mm field of view.

Pharynx MRI of all patients and controls were analyzed using the digital picture archiving and communication system (PACS) on a NUMARIS/4 syngo® post-processing workstation, version MR 2004A, (Siemens AG, Erlangen, GE).

Morphometric methodology

The following measurements, including linear, surface and angular parameters were made in mid-sagittal T1WI:

Cerebellar TD. The degree of TD was measured as previously described.¹⁰

Oropharynx analysis (Figure 1):

Buccal cavity area: It was estimated from a single MRI sagittal slice and the surface delimited by the following boundaries: the tip of the central incisor (IT), following the maxilla and soft palate, the epiglottis (E), the vallecula (V), the most anterior and superior point on the body of the hyoid bone (AH, representing the inferior part of the tongue), base of tongue and the genial tubercle (GE, representing the most posterior point of the mandibular symphysis and the anteroinferior part of the tongue).

Tongue area: It was estimated following the contour of the tongue where the boundaries are defined by the following points: tip of the tongue (T), soft-tissue menton (H), V, AH and GE.¹¹

Tongue length: Defined as a straight line running from T to V.¹¹

Anterior-posterior pharyngeal cavity diameter. A straight line from upper IT to the posterior pharyngeal wall (PPW), at the level of the tip of the E.

Vertical airway length. This was considered to reflect the length of the pharyngeal cavity and was defined as a line from the posterior nasal spine (PNS) to V.¹²

Length of soft palate: The distance from PNS to uvula (U).¹¹

Thickness of soft palate: Calculated on a line measuring the maximal thickness of the soft palate drawn perpendicular the PNS-uvula-line.¹¹

Narrowest upper pharyngeal airway diameter: The narrowest post-palatal airway diameter. A distance measured on a perpendicular line running from the U to the PPW line.¹¹

Narrowest middle pharyngeal airway diameter: Measured as a perpendicular line from the most external point of the outline of tongue to the PPW.¹³

Narrowest lower pharyngeal airway diameter: Estimated with a perpendicular line running from the most external point of E to PPW.

Level of epiglottis: Vertical distance from the tip of E to the base of the odontoid process (OP). The levels of E and the OP were established by perpendicular lines running from these structures to the PPW.

Wackenheim's angle: Formed by a line drawn along the clivus prolonged downwards to meet a line tangential to the posterior aspect of the odontoid process.

A single observer, blinded to the clinical diagnosis, obtained the above-referred 12 oropharynx measures. In order to evaluate intraobserver agreement for each morphometric method we performed two-way mixed intraclass correlation coefficients (ICC) (95% confidence interval) on repeated measures for all measurements in 15 randomly selected control and cases. The high intraobserver reliability was found (ICC > 0.7, range 0.69-0.99, $P < 0.01$).

Sleep disorder study

A polysomnographic evaluation was performed in 41 of the 80 CMI patients. Polysomnography (PSG) was performed with the E-Series digital System (Compumedics, Abbotsford, Australia) and included conventional parameters (electroencephalogram, bilateral electroculogram, submental electromyogram, diaphragmatic, oronasal airflow, thoracic and abdominal movements with respiratory inductance pletismography sensors, arterial oxygen saturation

(SaO₂), snoring, electrocardiogram, leg movements and body position recordings). Sleep stages were scored using the American Academy of Sleep Medicine standard criteria.¹⁴ Apnea was defined as a decrease in airflow amplitude (nasal cannula) to below 10% for at least 10 seconds and hypopnea as a $\geq 30\%$ reduction in flow amplitude of the surrounding baseline with a duration of at least 10 seconds associated with a cyclical dip in SaO₂ $\geq 3\%$ or an arousal. The respiratory disturbance index (RDI) was calculated as the number of apnea and hypopnea events plus respiratory effort-related arousals divided by total sleep time. RDI was calculated for REM and not REM sleep and in the supine and lateral posture.

Statistical analysis

Statistical analysis of data are presented as percentages for categorical variables and mean values with their standard deviations for continuous variables. Parametric (ANOVA) or non-parametric (Mann-Whitney U) tests were used to compare continuous variables between patient and control groups. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Spearman's rank correlations were employed for comparison of morphometric variables and parameters of sleep disorder. In the inferential analysis, mean comparison tests and discriminant analysis were performed. All tests were two-tailed, and the level of statistical significance was set at 0.05. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago IL, USA).

Results

Table 2 shows the average values of the oropharynx measurements in both cohorts. Patients showed statistical significant differences ($P < 0.05$) with respect to controls in two measures, involving the soft palate, which was longer and thinner in patients. We also observed an incremented Wackenheim's angle and a marked reduction in the buccal cavity, but not in the diameter or the length of the pharyngeal cavity (taken as a measure of the vertical airway length). The level of epiglottis was also lower in CMI patients and below the base of the OP.

No differences were found in the pharyngeal airway diameters at their narrowest points.

In the correlation analysis between morphometric variables and sleep apnea parameters we observed a moderate positive correlation between the Wackenheim's angle and RDI, RDI in not REM sleep and RDI in supine posture and between the thickness of the soft palate and rem-RDI sleep (Table 3).

Discussion

New findings

CMI is a disorder characterized by hindbrain overcrowding into an underdeveloped posterior cranial fossa (PCF), but in this study we provide evidence that the oropharyngeal cavity is also abnormal. This is relevant as an additional mechanism to explain the respiratory complications and sleep disorders in these patients as well as the occasional difficulties encountered during tracheal intubation.

Strengths of the study

Number and homogeneity of patients studied: 80 cases, with a conservative definition of CMI, TD>5mm and documented FCP hypoplasia.

In this study we excluded individuals younger than 18 years to minimize age-related changes in the size of skull and oropharyngeal structures and used case and control cohorts with identical male/female ratio.

Comparisons with other studies

That oropharyngeal difficulties commonly occur in patients with Chiari malformation type II is well-known,¹⁵⁻¹⁸ but their incidence in CMI has been often neglected. Only the work of Marin-Padilla, noting the alterations present in his anatomical studies and that of Greenlee et al. reporting dysphagia as the leading presenting symptom in children younger than 6 years,^{7,8} have addressed the issue of oropharyngeal dysfunction in CMI. One previous study has

measured the PPW thickness in relation to the risk of obstructive sleep apnea (OSA).¹⁹

In contrast with other morphometric studies carried out in CMI patients, which have focused on obtaining a variety of craniospinal measures, we studied the anatomy of the oropharyngeal cavity in order to gain some insight into the origin of the symptoms related with upper airway obstruction and the difficulty in the tracheal intubation that are so often encountered in CMI patients.

We agree with Marin-Padilla ⁷ that CMI patients have a small buccal cavity and a longer and compressed soft palate. However, the different size of tongue that is apparently bigger in patients is not statistically significant and we did not observe elevation of the larynx or the epiglottis. These differences could be explained by the morphological changes occurring in pharynx between child and adult life. For example, the larynx in the infant is located higher in the neck at the level of C3-4 than in the adult, where the larynx is at C4-5. As a result, the tongue is located more superiorly or closer to the palate and more easily apposes the palate. The infant tongue is larger in proportion to the size of the mouth than the adult tongue and the epiglottis in the infant airway is often described as relatively larger and stiffer than the adult epiglottis.²⁰

Craniofacial morphology is an important determinant of airway pathology.²¹ It is known that an increase in the soft palate thickness and length predisposes to a partial or complete upper airway obstruction, and may be related to the duration of the snoring or development of OSA ²² or a lower position of the larynx may result in a longer collapsed segment of the upper airway and thus greater risk for OSA.²³

In fact, sleep disorders and nocturnal respiratory abnormalities are frequent symptoms in CMI patients²⁴. The pathophysiological mechanism of these disorders in CMI is unknown but it could relate to compression of the neural structures (cranial nerves) within an attested PCF, to the syringomyelia that is often associated with dysphagia and dysphonia, or to the accompanying hypercapnia.²⁴ Our results suggest that they could also be produced by a small oral cavity that needs to accommodate a normal-sized tongue, a longer soft

palate and a lower epiglottis. Analysis of data from 41 of our non-operated CMI cases disclosed that both pharyngeal (soft palate thickness) and osseous (Wackenheim's angle) deformities correlated with several PSG parameters and may thus play a role in the CMI predisposition to OSA. The Wackenheim's angle relates to the clivus slant, the clivus being the central component of the basichondrocranium and a critically underdeveloped structure in CMI. In a recent genetic association study, this angle showed, among a series of PCF morphometric measures, the best correlation with the single nucleotide polymorphisms showing association with the CMI classical phenotype²⁵.

Why the soft palate was thinner in the patient group is difficult to explain, but it is conceivable that the smaller buccal cavity may force the tongue against the soft palate, which thus might find trouble developing in its full thickness.

Often, the anatomical features that predispose to difficult intubation also predispose to upper airway obstruction during sleep. The pharyngeal muscle tone that protects the airway is diminished both during sleep or anaesthesia, as a result of decreased cortical influences and chemoreceptor drive, together with modulation of mechanoreceptor input. These changes predispose to partial or complete upper airway obstruction, particularly in those with already narrow, compliant upper airways.²⁶ We did not observe changes in the upper airway diameter but if a long soft palate can indeed facilitate OSA, one should also expect respiratory problems during anaesthesia. Assessment of difficult airway in patients begins with a comprehensive history and physical examination. Knowledge of the complications associated with the diagnosis of CMI can help anaesthetists to approach intubation cautiously and be ready to use a long blade laryngoscope, stillette, or small size endotracheal tubes during the procedure.

On the other hand, we observed a lower epiglottis in CMI, which could reflect a lower larynx position in patients. However, since no differences were found in the length of the vertical airway, this finding may be better explained by an abnormal position of the base of the dens, and/or a reduced size of epiglottis.

The soft palate serves as a mobile flap to prevent food and water from entering the nasal passages during swallowing, so if the soft palate is elongated will either hang in front of the airway or will fall into the larynx during inhalation.

Tubbs et al found that the midline superior pharyngeal constrictor muscle is thinner in CMI patients with an absent gag reflex, and theorized that this was due to the compression of the vagus nerve caused by the tonsillar ectopia, which would inhibit the nerve's motor contribution to the gag reflex. Our measures of the pharyngeal airway diameter did not reflect significant differences. We favour that the longer soft palate is the main cause of dysphagia and respiratory manifestations in CMI.

According to Marin-Padilla, the oropharyngeal defects in the Chiari malformations are secondary deformities that result from the adaptation of the facial skeleton to a primarily short and lordotic axial basicranium.⁷ However, the face, the palate, and the superior structures of the oral cavity are cartilaginous structures that derive from the branchial arches, which begin to form at day 22 of human embryonic development.²⁷ This is the stage at which the cranial somites that will give rise to the occipital bone, begin to develop.²⁸ Therefore, a genetic defect or environmental insult occurring at this developmental stage could impinge in both the development of the occipital somites and the facial structures that derive from the branchial arches.

Conclusion

In summary, in this cephalometric analysis we have shown that patients with CMI display several differences with respect to a control population. The most significant, leading to a longer and thinner soft palate, may explain at least in part the respiratory complications so often encountered in CMI.

Conflict of Interest

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants of Instituto de Salud Carlos III, Spain, grant PI061606, Fundació La Marató TV3, Spain, grant 062710 and Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Spain, grant 2009SGR -0078. A.U. is the recipient of a scholarship from AGAUR (Spain).

Bibliography

1. Barkovich, A.J., Wippold, F.J., Sherman, J.L. & Citrin, C.M. Significance of cerebellar tonsillar position on MR. *AJNR Am J Neuroradiol* **7**, 795-799 (1986).
2. Marin-Padilla, M. & Marin-Padilla, T.M. Morphogenesis of experimentally induced Arnold--Chiari malformation. *J Neurol Sci* **50**, 29-55 (1981).
3. Milhorat, T.H., *et al.* Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery* **44**, 1005-1017 (1999).
4. Noudel, R., *et al.* Incidence of basioccipital hypoplasia in Chiari malformation type I: comparative morphometric study of the posterior cranial fossa. Clinical article. *J Neurosurg* **111**, 1046-1052 (2009).
5. Milhorat, T.H., Nishikawa, M., Kula, R.W. & Dlugacz, Y.D. Mechanisms of cerebellar tonsil herniation in patients with Chiari malformations as guide to clinical management. *Acta Neurochir (Wien)* **152**, 1117-1127 (2010).
6. Aydin, S., Hanimoglu, H., Tanriverdi, T., Yentur, E. & Kaynar, M.Y. Chiari type I malformations in adults: a morphometric analysis of the posterior cranial fossa. *Surg Neurol* **64**, 237-241; discussion 241 (2005).
7. Marin-Padilla, M. Cephalic axial skeletal-neural dysraphic disorders: embryology and pathology. *Can J Neurol Sci* **18**, 153-169 (1991).
8. Greenlee, J.D., Donovan, K.A., Hasan, D.M. & Menezes, A.H. Chiari I malformation in the very young child: the spectrum of presentations and experience in 31 children under age 6 years. *Pediatrics* **110**, 1212-1219 (2002).
9. Urbizu, A., *et al.* MRI-based Morphometric Analysis of Posterior Cranial Fossa in the Diagnosis of Chiari Malformation Type I. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging* (2013).
10. Aboulezz, A.O., Sartor, K., Geyer, C.A. & Gado, M.H. Position of cerebellar tonsils in the normal population and in patients with Chiari malformation: a quantitative approach with MR imaging. *J Comput Assist Tomogr* **9**, 1033-1036 (1985).

11. Sittitavornwong, S., *et al.* Evaluation of Obstructive Sleep Apnea Syndrome by Computational Fluid Dynamics. *Seminars in Orthodontics* **15**, 105-131 (2009).
12. Meredith, G.M. The airway and dentofacial development. *Ear, nose, & throat journal* **66**, 190-195 (1987).
13. McNamara, P.J., *et al.* Influence of tablet dissolution on furosemide bioavailability: a bioequivalence study. *Pharmaceutical research* **4**, 150-153 (1987).
14. Berry, R.B., *et al.* Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine* **8**, 597-619 (2012).
15. Bell, W.O., Charney, E.B., Bruce, D.A., Sutton, L.N. & Schut, L. Symptomatic Arnold-Chiari malformation: review of experience with 22 cases. *Journal of neurosurgery* **66**, 812-816 (1987).
16. Cai, C. & Oakes, W.J. Hindbrain herniation syndromes: the Chiari malformations (I and II). *Semin Pediatr Neurol* **4**, 179-191 (1997).
17. Choi, S.S., Tran, L.P. & Zalzal, G.H. Airway abnormalities in patients with Arnold-Chiari malformation. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* **121**, 720-724 (1999).
18. Papasozomenos, S. & Roessmann, U. Respiratory distress and Arnold-Chiari malformation. *Neurology* **31**, 97-100 (1981).
19. Tubbs, R.S., Webb, D., Smyth, M.D. & Oakes, W.J. Magnetic resonance imaging evidence of posterior pharynx denervation in pediatric patients with Chiari I malformation and absent gag reflex. *Journal of neurosurgery* **101**, 21-24 (2004).
20. Infosino, A. Pediatric upper airway and congenital anomalies. *Anesthesiology clinics of North America* **20**, 747-766 (2002).
21. McNamara, J.A. Influence of respiratory pattern on craniofacial growth. *The Angle orthodontist* **51**, 269-300 (1981).
22. Akpinar, M.E., Celikoyar, M.M., Altundag, A. & Kocak, I. The comparison of cephalometric characteristics in nonobese obstructive sleep apnea subjects and primary snorers cephalometric measures in nonobese OSA and primary snorers. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* **268**, 1053-1059 (2011).
23. Yamashiro, Y. & Kryger, M. Is laryngeal descent associated with increased risk for obstructive sleep apnea? *Chest* **141**, 1407-1413 (2012).
24. Ferre Maso, A., *et al.* Sleep disturbance: a forgotten syndrome in patients with Chiari I malformation. *Neurologia* (2011).
25. Urbizu, A., *et al.* Chiari Malformation Type I: A Case-Control Association Study of 58 Developmental Genes. *PLoS ONE* **8**, e57241 (2013).
26. Hillman, D.R., Platt, P.R. & Eastwood, P.R. The upper airway during anaesthesia. *British journal of anaesthesia* **91**, 31-39 (2003).
27. German, R.Z. & Palmer, J.B. Anatomy and development of oral cavity and pharynx. in *GI Motility online* (2006).

28. O'Rahilly, R. & Muller, F. The early development of the hypoglossal nerve and occipital somites in staged human embryos. *The American journal of anatomy* **169**, 237-257 (1984).

Tables

Table 1. Clinical findings in 80 patients with CMI.

	CMI
Number of patients	80
Sex (M/F)	31/49
Age (y)	42.0±12.2
Age at diagnosis	34.9±12.3/71
Hydrocephalus	21/77 (27.3%)
Hydrosyringomyelia	39/77 (50.6%)
Basilar impression	4/77 (5.2%)
Platibasia	1/77 (1.3%)
Retrocurved Odontoid	9/69 (13.0%)
Complex Craniocervical Malformation	4/77 (5.2%)
Pseudotumor Cerebri	3/77 (3.9%)
Klippel-Feil Malformation	1/77 (1.3%)
Neurofibromatosis type I	13/77 (16.9%)
SIGNS AND SYMPTOMS	
Asymptomatic	4/77 (5.2%)
Time elapsed from onset (mo)	78.9±75.0/71
Headache	48/74 (64.9%)
Occipital Headache/ cervicalgia	33/68 (48.5%)
Cough Headache	31/75 (41.3%)
Dizziness	27/76 (35.5%)
Vertigo	5/76 (6.6%)
Visual Alterations	8/76 (10.5%)
Nystagmus	8/58 (13.8%)
Kyphoscoliosis	11/54 (20.4%)
Fatigue	10/74 (13.5%)
Instability	21/75 (28.0%)
Sensory Loss	29/75 (38.7%)
Motor Weakness	23/76 (30.3%)
Dysphagia	17/76 (22.4%)
Dysphonia	7/76 (9.2%)
Gait Disturbances	11/76 (14.5%)
Paresthesia Upper Limbs	34/76 (44.7%)
Paresthesia Lower Limbs	11/76 (14.5%)
Upper Limb Pain	13/76 (17.1%)
Lower Limb Pain	5/76 (6.6%)
Neck Pain	27/76 (35.5%)
Difficulty Swallowing	12/76 (15.8%)
Anxiety	12/73 (16.4%)
Depression	13/75 (17.3%)
THERAPEUTIC PROCEDURES	
Surgical Treatment	42/77 (54.5%)

Except for sex ratios, the figure after the slash indicates, for each variable, the number of subjects for which information was available.

Table 2. Cephalometric oropharynx analysis in patients and control subjects. Average values (mean \pm SD) are indicated for the 12 performed measurements.

Variable	Patients (n=80)	Controls (n=49)	P
Age (y)	42.0 \pm 12.2	35.2 \pm 6.8	
Sex (M/F)	31/49	19/30	
TD (mm)	11.0 \pm 4.5	-5.0 \pm 3.7	
Buccal cavity (cm ²)	29.2 \pm 4.0	30.7 \pm 3.8	0.037
Tongue area (cm ²)	26.7 \pm 3.6	27.9 \pm 3.2	0.066
Length tongue (mm)	70.7 \pm 6.5	69.6 \pm 5.5	0.361
Diameter anterior-posterior pharyngeal cavity (mm)	82.8 \pm 6.4	83.0 \pm 6.3	0.840
Vertical airway length (mm)	63.1 \pm 7.9	62.1 \pm 6.9	0.500
Length soft palate (mm)	35.7 \pm 4.8	32.6 \pm 4.3	2.11E-04
Thickness soft palate (mm)	10.4 \pm 2.1	11.4 \pm 1.7	6.14E-03
Narrowest upper pharyngeal airway diameter (mm)	7.8 \pm 2.7	7.7 \pm 2.3	0.828
Narrowest middle pharyngeal airway diameter (mm)	8.7 \pm 2.9	9.4 \pm 3.1	0.247
Narrowest lower pharyngeal airway diameter (mm)	4.6 \pm 2.0	4.8 \pm 2.3	0.698
Level of epiglottis (mm)	9.9 \pm 9.3	6.3 \pm 7.5	0.010
Wackenheim's angle (°)	161.2 \pm 9.7	157.6 \pm 6.9	0.025

Table 3. Spearman's correlation coefficients between the most significant morphometric differences found in the oropharynx cavity and the sleep apnea parameters in CMI patients.

		RDI	RDI Not REM	RDI REM	RDI Supine	RDI lateral
Buccal cavity	Correlation Coefficient	0.145	0.088	0.205	0.199	-0.060
	Sig. (2-tailed)	0.366	0.595	0.210	0.219	0.729
	N	41	39	39	40	36
Length soft palate	Correlation Coefficient	0.177	0.156	0.112	0.293	-0.191
	Sig. (2-tailed)	0.267	0.343	0.497	0.066	0.265
	N	41	39	39	40	36
Thickness soft palate	Correlation Coefficient	0.258	0.140	0.387*	0.275	0.118
	Sig. (2-tailed)	0.103	0.395	0.015	0.086	0.492
	N	41	39	39	40	36
Wackenheim's angle	Correlation Coefficient	0.330*	0.432**	0.123	0.401*	0.137
	Sig. (2-tailed)	0.035	0.006	0.455	0.010	0.425
	N	41	39	39	40	36
Level of epiglottis	Correlation Coefficient	0.228	0.197	0.245	0.293	-0.003
	Sig. (2-tailed)	0.151	0.230	0.133	0.067	0.986
	N	41	39	39	40	36

* p< 0.05 level (2-tailed); ** p< 0.01 level (2-tailed).

Figures:

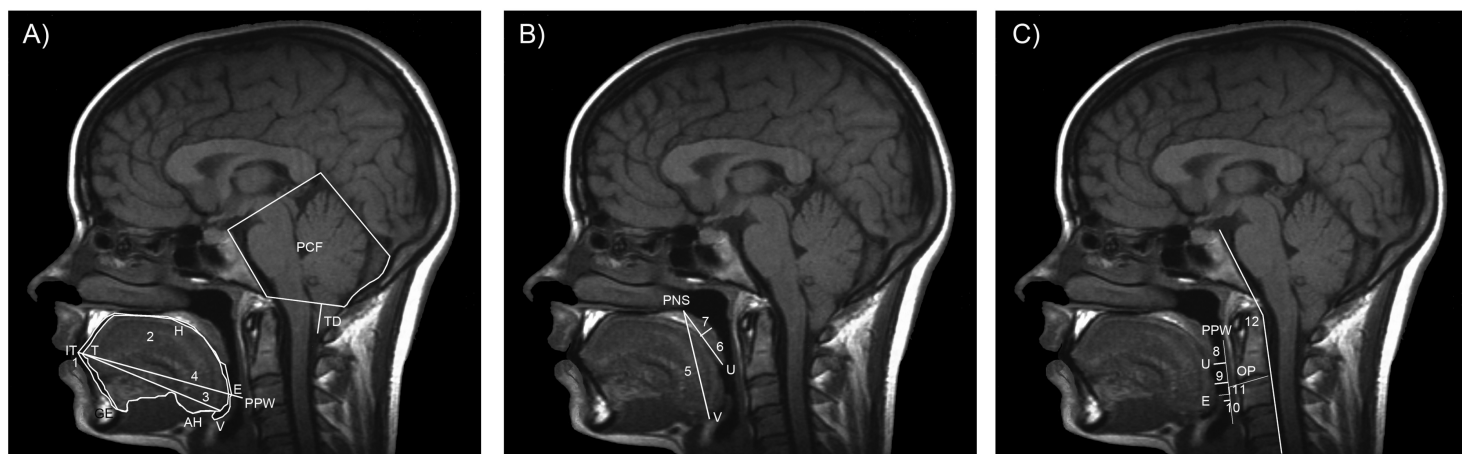


Figure 1. Morphometric measurements made on mid-sagittal T1WI of a CMI case and inclusion criteria to select patients.

A) Top: TD and hypoplastic PCF were used as inclusion criteria. Bottom: buccal cavity area (1) was estimated as the polygon delimited by central incisor (IT), maxilla, soft palate, epiglottis tip (E), valeculia (V), the most anterior and superior point on the body of the hyoid bone (AH), base of tongue and the genial tubercle; the tongue area (2) was inferred from a surface delimited by tip of the tongue (T), soft-tissue menton (H), V, AH and GE; the tongue length (3) was inferred from a line running from T to V; and the anterior-posterior pharyngeal cavity diameter (4) from a line from IT to PPW at the level of the tip of the epiglottis.

B) The vertical airway length (5) was estimated as the distance from the posterior nasal spine (PNS) to V. Soft palate measurements: length (6) from PNS to uvula (U) and thickness (7) as the length of perpendicular line to PNS-U line.

C) Pharyngeal airway diameter: upper (8) from U to PPW, middle (9) from the most external point of tongue to PPW, and lower (10) from E to PPW; level of E (11) estimated as a distance from E to the base of the odontoid process and Wackenheim's angle (12).

Chiari Malformation Type I: A Case-Control Association Study of 58 Developmental Genes

Aintzane Urbizu, Claudio Toma^{3,4}, Maria A. Poca^{1,2}, Juan Sahuquillo^{1,2}, Ester Cuenca-León, Bru Cormand^{3,4,5}, Alfons Macaya

From the Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ¹Department of Neurosurgery and ²Neurosurgery and Neurotraumatology Research Unit (UNINN), Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ³Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain, ⁴Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Spain and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain

L'etiologia de la malformació de Chiari tipus I (MCI) és desconeguda, tot i que alguns models experimentals i estudis morfològics en humans suggereixen una insuficiència del mesoderma paraxial com a causa principal. Estudis de bessons i casos d'agregació familiar semblen indicar que hi ha, almenys, un cert component genètic. Es va realitzar un estudi d'associació cas-control poblacional per tal d'identificar variants genètiques de susceptibilitat a la MCI. Es van analitzar 303 tagSNPs pertanyents a 58 gens candidats implicats en la formació del mesoderma paraxial, de les somites que donen lloc a l'os occipital, de les cèl·lules endotelials i gens implicats en alguns dels trastorns genètics coneguts que presenten associació clínica amb la MCI. L'anàlisi es va realitzar primerament en 415 pacients amb MCI aparellats per sexe amb 524 individus control; i posteriorment, en una segona anàlisi, únicament es van seleccionar aquells pacients que presentaven una fossa cranial posterior (FCP) petita (n=186).

De tots els SNPs que presentaven associació nominal amb la MCI, només 4, situats als gens *CDX1*, *FLT1* i *ALDH1A2*, van passar les correccions per comparacions múltiples. Es van detectar també haplotips de risc en els gens *CDX1* i *ALDH1A2*. Alguns dels SNPs amb associació més forta semblen contribuir als trets morfològics d'una FCP petita.

Aquests resultats indicarien que certes variants implicades en la somitogènesi i el desenvolupament vascular fetal poden conferir susceptibilitat a la MCI.

PLOS ONE. Febrer 2013; 8:e57241. DOI:10.1371/journal.pone.0057241

Chiari Malformation Type I: A Case-Control Association Study of 58 Developmental Genes

Aintzane Urbizu¹, Claudio Toma^{4,5}, Maria A. Poca^{2,3}, Juan Sahuquillo^{2,3}, Ester Cuenca-León¹, Bru Cormand^{4,5,6}, Alfons Macaya^{1*}

1 Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Department of Neurosurgery, Research Unit Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Neurosurgery and Neurotraumatology, Research Unit Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **5** Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases, Barcelona, Spain, **6** Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Chiari malformation type I (CMI) is a disorder characterized by hindbrain overcrowding into an underdeveloped posterior cranial fossa (PCF), often causing progressive neurological symptoms. The etiology of CMI remains unclear and is most likely multifactorial. A putative genetic contribution to CMI is suggested by familial aggregation and twin studies. Experimental models and human morphometric studies have suggested an underlying paraxial mesoderm insufficiency. We performed a case-control association study of 303 tag single nucleotide polymorphisms (SNP) across 58 candidate genes involved in early paraxial mesoderm development in a sample of 415 CMI patients and 524 sex-matched controls. A subgroup of patients diagnosed with classical, small-PCF CMI by means of MRI-based PCF morphometry ($n = 186$), underwent additional analysis. The genes selected are involved in signalling gradients occurring during segmental patterning of the occipital somites (FGF8, Wnt, and retinoic acid pathways and from bone morphogenetic proteins or BMP, Notch, Cdx and Hox pathways) or in placental angiogenesis, sclerotome development or CMI-associated syndromes. Single-marker analysis identified nominal associations with 18 SNPs in 14 genes (*CDX1*, *FLT1*, *RARG*, *NKD2*, *MSGN1*, *RBPJ1*, *FGFR1*, *RDH10*, *NOG*, *RARA*, *LFNG*, *KDR*, *ALDH1A2*, *BMPR1A*) considering the whole CMI sample. None of these overcame corrections for multiple comparisons, in contrast with four SNPs in *CDX1*, *FLT1* and *ALDH1A2* in the classical CMI group. Multiple marker analysis identified a risk haplotype for classical CMI in *ALDH1A2* and *CDX1*. Furthermore, we analyzed the possible contributions of the most significantly associated SNPs to different PCF morphometric traits. These findings suggest that common variants in genes involved in somitogenesis and fetal vascular development may confer susceptibility to CMI.

Citation: Urbizu A, Toma C, Poca MA, Sahuquillo J, Cuenca-León E, et al. (2013) Chiari Malformation Type I: A Case-Control Association Study of 58 Developmental Genes. PLoS ONE 8(2): e57241. doi:10.1371/journal.pone.0057241

Editor: Joerg-Christian Tonn, Universität München, Germany

Received: October 29, 2012; **Accepted:** January 18, 2013; **Published:** February 21, 2013

Copyright: © 2013 Urbizu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Work supported by Instituto de Salud Carlos III, Spain, grant PI061606; Fundació La Marató TV3, Spain, grant 062710; and Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Spain, grant 2009SGR-0078. A.U. is the recipient of a scholarship from AGAUR (Spain). C.T. was supported by the European Union (Marie Curie, PIEF-GA-2009-254930). Funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: A.M received honoraria from Novartis Europe as a member of the TOSCA (tuberous sclerosis) Scientific Advisory Board. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: amacaya@vhebron.net

Introduction

The Chiari malformations, first described in 1895 [1], are a group of disorders sharing the common feature of ectopia of the cerebellar tonsils, which are downwardly displaced through the foramen magnum. Chiari malformation type I (CMI) is currently defined by the observation, on cranial midsagittal magnetic resonance imaging (MRI), of a descent of the cerebellar tonsils across the foramen magnum of at least 3 mm [2]. In contrast with Chiari II and III malformations, in CMI the rest of hindbrain structures remain within the posterior fossa.

CMI causes neurological dysfunction by direct compression of the neural tissue at the craniovertebral junction or cerebrospinal fluid disturbances that give rise to syringomyelia or hydrocephalus. The most frequent symptoms are headache, ocular disturbances, vertigo, sleep apnea and lower cranial nerve signs, including tongue fasciculation, dysphagia or dysarthria. Motor and sensory symptoms derived from spinal cord disturbances associated with syringomyelia or scoliosis, [3,4] as well as signs and symptoms

mimicking pseudotumor cerebri are also often encountered. Although presentation typically occurs in middle age, it may start in childhood or infancy, where it is a cause of sudden infantile death syndrome [5,6]. Conversely, cases of CMI can often be asymptomatic and tonsillar descent is often regarded as an incidental neuroradiological finding [7,8]. The prevalence of CMI is estimated to be in the 1/1,000 to 1/5,000 range [9]. A retrospective analysis of 22,591 serial cranial MRI studies, using a conservative definition of cerebellar tonsillar herniation of ≥ 5 mm, showed the presence of CMI in 0.77% of the subjects and asymptomatic CMI in 0.11%, with an estimated prevalence of 1/1,280 [10].

Regarding pathogenesis, different mechanisms are to be distinguished. In the classical form, a shallow posterior cranial fossa (PCF) is unable to house a normal hindbrain and hence the tonsillar herniation occurs (Figure 1A). Seminal experimental work by Marin-Padilla and Marin-Padilla [11] demonstrated that underdevelopment of the occipital bone and overcrowding of the cerebellum in a small posterior fossa are the fundamental defects

in CMI [12,13,14]. This has been underscored by several radiological morphometric studies [3,15,16,17,18,19]. However, cerebellar herniation may also occur in conditions such as cranial settling associated with connective tissue disorders, intraspinal hypotension following CSF leaks or lumboperitoneal shunting, cord traction in tethered cord syndrome and intracranial hypertension caused by space-occupying lesions or hydrocephalus [20], where the PCF has a normal size and the term “secondary” CMI is preferred. In the classical form of CMI there is shortness of the basichondrocranium [3,15,16,17,19,20,21,22], suggesting underdevelopment of occipital somites and pointing at insufficiency of the paraxial mesoderm as the central event in CMI pathogenesis [23].

Whether CMI mesodermal insufficiency is a primary (genetic) condition or occurs as the result of early gestational injuries, or even post-natal osseous growth disturbances [16] is unknown. However, a number of evidences suggest that, at least in a subset of CMI cases, genetic factors may play an important role, including CMI familial aggregation [9,24], higher degree of concordance in monozygotic twins and CMI occurrence as part of Mendelian syndromes [25,26,27]. In the instance of Crouzon syndrome, a specific *FGFR2* mutation has been associated with CMI and syringomyelia in a small series of cases [28] and a *PAX2* mutation was found in two siblings with CMI and coloboma [29]. The only reported genome-wide linkage screen, performed in 23 CMI multiplex families, uncovered two loci on chromosomes 9 and 15, with maximal two-point LOD (logarithm of the odds) score of 3.3 on 15q [30]. To date, no single gene has been identified as causing CMI.

If heredity does indeed play a role in CMI, it is also possible that this may occur via a polygenic mechanism. Common genetic variants in genes involved in growth and shaping of the PCF should be among the first to be explored. A similar approach has been used in association studies performed in patients with Chiari malformation type II, where screening of genes critical for neurulation and neural tube closure disclosed some risk factors but no major causative gene (reviewed in [31]). In contrast, no previous association study has been carried out in CMI. We here sought to identify common variants associated with development of CMI among critical genes expressed during occipital somite, sclerotome and placental development.

Subjects and Methods

Ethics Statement

The present investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Vall d’Hebron University Hospital. All participants signed an informed consent prior to their participation in the study.

Subjects

A total of 415 patients (42.2 ± 5.9 years) with symptomatic CMI were recruited between 2004 and 2010. Three hundred and thirty seven patients were diagnosed and treated at the Division of Neurosurgery and the Pediatric Neurology Service of the Vall d’Hebron University Hospital in Barcelona. In all of them evaluation included direct anamnesis, physical exam, neurophysiological studies (somatosensory evoked potentials, brain auditory evoked potentials and polysomnography) and a cranial and spinal MRI study. For an additional 78 cases that were referred from two Spanish CMI patient associations, review of clinical summaries, radiological reports and telephone interviews were used to confirm the diagnosis, but direct review of the MRI studies was not always possible. Diagnosis of CMI was based on MRI demonstration of downward herniation ≥ 3 mm of the cerebellar tonsils on a midsagittal T1-weighted image in the presence of signs or symptoms indicating neural compression at the craniovertebral junction, syringohydromyelia, cerebellar dysfunction or intracranial hypertension

Since recent studies have clearly demonstrated that various mechanisms may lead to tonsillar herniation, we tried to identify the subset of patients with small PCF in an attempt to increase sample homogeneity. To this end we performed a morphometric PCF analysis in 211 cases with available digital MRI studies (Figure 1B). After applying a previously described logistic regression model based on several PCF measurements performed in CMI cases and a control population [32] we identified a subgroup of 186 patients representative of classical CMI, i.e., with underdeveloped PCF.

Clinical data was retrieved from an in-house patient database devoted to Chiari malformations and related disorders, a clinical research repository that included detailed information about the medical history, family history, symptoms and signs, treatment and any relevant associated conditions.

The control sample was composed of 524 healthy blood donors (42.6 ± 14.4 years), sex-matched with the case sample and recruited at Vall d’Hebron University Hospital in Barcelona. To minimize

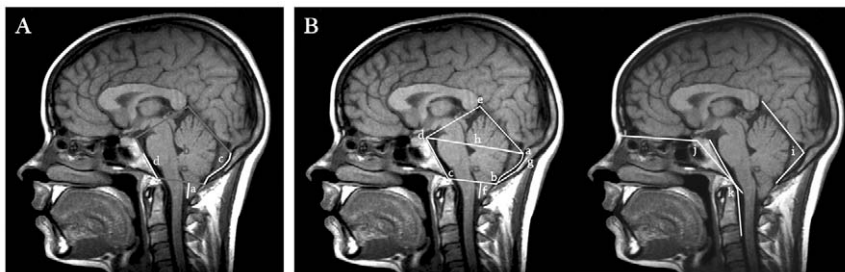


Figure 1. Typical neuroradiological findings in CMI. A) T1-weighted mid-sagittal MR image showing downward herniation of the cerebellar tonsils (a) and hypoplasia of the occipital components of the posterior cranial fossa (b): the supraocciput (c) and the basiocciput (d). B) Morphological measurements performed: length of tonsillar descent (f), supraocciput (g-b) and clivus (c-d) and foramen magnum diameter (b-c). The antero-posterior diameter of PCF (h) was inferred from a line running from the internal occipital protuberance (a) to top of the dorsum sellae (d). The PCF area was estimated as the polygon delimited by (a) (b) (c) (d) and (e) and the osseous PCF area as the one delimited by (a) (b) (c) and (d). Angular measurements: tentorium angle (i), basal angulation (j) and Wackenheim angle (k).
doi:10.1371/journal.pone.0057241.g001

ethnic heterogeneity only Caucasian subjects of Spanish origin were included in this study.

DNA isolation and Quantification

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by the salting-out method [33] and from saliva with Oragen DNA Self-Collection kit according to the manufacturer's recommendations (Genotek Inc. Ottawa, Ontario, Canada). DNA concentrations of all samples were determined on a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE).

Selection of genes and SNPs

We selected 58 functional candidate genes. Most belonged to gene pathways involved in the early paraxial mesoderm development, leading to formation of the occipital somites, such as retinoic acid (*RBP4*, *RBP1*, *STRA6*, *ADH4*, *RDH10*, *CRABP1*, *CYP26A1*, *CYP26C1*, *RARG*, *RARA*, *RXRRA*, *ALDH1A2*) reviewed in [34], FGF8 (*FGF8*, *FGFR1*, *DUSP4*, *HES7*, *SNAI1*, *SNAI2*, *CDH1*) [35,36,37], Wnt (*WNT3A*, *CTNNT1*, *Axin2*, *T*, *TBX6*, *MSGN1*, *NKD1*, *NKD2*) [38,39,40], Notch (*DLL1*, *RBPJ*, *LFNG*, *NOTCH1*, *MESP2*, *IDI1*, *ID2*) [37,40], bone morphogenetic proteins (*BMPRI1A*, *BMP2*) [41], Cdx (*CDX1*) [39,42] and Hox pathways (*HOXA1*, *HOXA2*, *HOXA3*, *HOXA4*, *HOXB1*, *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB4*, *HOXC4*, *HOXD1*, *HOXD3*, *HOXD4*) reviewed in [42]. In addition, genes involved in sclerotome development, chondrogenesis and osteogenesis (*NOG*, *SHH*, *NKX3-2*, *PRRX1*) [43,44,45,46], genes from the VEGF family crucial for placental angiogenesis (*VEGFA*, *KDR*, *FLT1*) [47,48] and genes responsible for two conditions frequently associated with CMI, *NFI* (neurofibromatosis) and *STAT3* (Hyper-IgE Syndrome), were also included [49,50].

The SNP selection was based on genetic coverage criteria, by considering linkage disequilibrium (LD) patterns within the candidate genes [51]. SNPs covering each gene plus 5 Kb flanking sequences were picked from the CEU panel of the HapMap database (www.hapmap.org, phases 1+2+3, release 27) [52,53]. We used the LD-select software (droog.gs.washington.edu/ldSelect.html) to evaluate LD of the genomic regions in order to minimize redundancy between the selected SNPs [54,55]. TagSNPs were selected with the following criteria: $r^2 < 0.85$ from any other SNP according to CEU HapMap data and a minor allele frequency (MAF) > 0.10 for genes with less than 20 tag SNPs and MAF > 0.25 for those genes with more than 20 tag SNPs (*FLT1*, *KDR*, *NOTCH1*, *RXRRA*).

Plex design, genotyping and quality control

A total of 384 tagSNPs were initially selected in our study (Table S1): 77 SNPs for the retinoic acid pathway, 44 SNPs for the FGF8 pathway, 55 SNPs for the Wnt pathway, 44 SNPs for the Notch pathway, 24 SNPs for BMP, 6 SNPs for *CDX*, 38 SNPs for Hox pathways, 30 SNPs for genes involved in sclerotome development, 51 SNPs for the VEGF pathway and 15 SNPs for *NFI* and *STAT3*.

Genotyping was performed at the Barcelona node of the National Genotyping Center (CeGen, www.cegen.org) using the VeraCode technology (Illumina, San Diego, CA, USA) [56]. A total of 9 HapMap individuals were included as controls in the genotyping assay, obtaining a 100% concordance rate with HapMap genotype data. In addition, no differences were found in the genotypes of thirteen replicates.

Statistical analysis

The analysis of minimal statistical power was performed *a priori* with the CaTS Power Calculator software (sph.umich.edu/csg/

abecasis/CaTS) [57], assuming an odds ratio (OR) of 1.5, estimated disease prevalence of 0.008 [7,10,24], significance level of 0.05 (α) and MAF of 0.10, under the additive model.

All individuals with genotyping rates under 80% were excluded from the study. From 384 SNPs genotyped in our study, 303 passed quality controls filters and were included in the analysis, whereas 81 (21%) were excluded for the following reasons: more than 15% missing genotypes, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE threshold set at $p = 0.01$ in our control population), monomorphism, MAF < 0.10 or MAF < 0.25 and $r^2 > 0.85$ from any other studied SNP in our control sample. The evaluation of LD patterns and r^2 were performed from the genotype data of controls using Haploview v4.2 [58].

Single-marker analysis. The analysis of HWE and the case-control association study were performed with the SNPAssoc R package [59]. For the case-control study we analysed all single markers under the additive model using the Cochran-Armitage Trend Test (ATT) (Table S1). A quantile-quantile plot (Q-Q plot) was generated with the ggplot2 R library [60]. The correction for multiple testing was performed using the Q-value R library assuming a 10% False Discovery Rate (FDR) [61] and the Bonferroni correction.

Multiple-marker analysis. To minimize multiple testing and type I (α) errors, we restricted the haplotype-based association study to only those LD blocks that included the SNPs overcoming the 10% FDR correction.

The linkage disequilibrium patterns for *CDX1*, *ALDH1A2* and *FLT1* were constructed from the genotyping data of our control individuals, using Haploview v4.2 software [58]. The haplotype-based analysis was performed using the same software [58]. To obtain a measure of significance for multiple testing in haplotype analysis, a total of 10,000 permutations were performed. Haplotypes with frequencies < 0.05 were excluded.

PCF morphometric traits and risk genotypes. We used the Scheffé's post hoc test to evaluate whether common variants contributed to variation in any specific parameters as measured in PCF morphometric analyses, including cerebellar tonsillar descent, length of supraocciput, length of the clivus, foramen magnum diameter, PCF area, osseous PCF area, antero-posterior diameter of the PCF (PCF length), tentorium angle, basal angulation and Wackenheim angle, as previously described [32]. The analysis was carried out only in the 186 patients where the PCF morphometry confirmed the diagnosis of classical CMI and was limited to markers overcoming 10% FDR corrections for multiple testing in the single-marker analysis. The Kruskal-Wallis nonparametric test was used for variables not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test $P < 0.05$) or showing no homogeneity of variances (Levene's test $P < 0.05$).

Results

The most common signs and symptoms in the 415 cases included in the study are listed in Table 1. Headache was the most prevalent symptom (69.1%), often featuring neck irradiation (43.3% of those with headache), followed by dizziness (35.1%), motor weakness (33.6%), instability (32.1%), upper limb paresthesias (30.7%), sensory loss (29.7%) and fatigue (28.1%). Syringomyelia was present in 35.1% of cases. Hydrocephalus (15.1%) required specific management. Other, less common manifestations, as well as co-morbid conditions, were typical for CMI (Table 1). Positive CMI family history, defined as at least one MRI-confirmed CMI first relative, was present in only 6% of the cases. Surgical PCF reconstruction was performed in 55.8% of patients.

Table 1. Clinical findings in 415 patients with Chiari malformation type I.

	CMI
Number of patients	415
Sex (M/F)	122/293
Age (y)	42.2±50.9
Age at diagnosis	30.6±58.7/323
Hydrocephalus	57/377 (15.1%)
Syringomyelia	133/379 (35.1%)
Intracranial Hypertension	20/376 (5.3%)
Retrocurved Odontoid	40/352 (11.4%)
Basilar impression	11/382 (2.3%)
Platibasia	8/382 (2.1%)
Klippel-Feil Malformation	3/377 (0.8%)
Other Craniocervical Malformations	24/377 (6.4%)
SIGNS AND SYMPTOMS	
Time elapsed from onset (mo)	113.3±59.4/323
Headache	246/356 (69.1%)
Occipital Headache/Cervicalgia	97/224 (43.3%)
Cough Headache	87/358 (24.3%)
Dizziness	128/365 (35.1%)
Vertigo	82/365 (22.5%)
Visual Alterations	71/364 (19.5%)
Nystagmus	41/276 (14.8%)
Kyphoscoliosis	30/160 (18.7%)
Fatigue	102/363 (28.1%)
Instability	117/364 (32.1%)
Sensory Loss	108/364 (29.7%)
Motor Weakness	123/366 (33.6%)
Dysphagia	67/365 (18.3%)
Dysphonia	16/365 (4.4%)
Gait Disturbances	73/364 (20.0%)
Paresthesia Upper Limbs	112/365 (30.7%)
Paresthesia Lower Limbs	47/366 (12.9%)
Upper Limb Pain	47/365 (12.9%)
Lower Limb Pain	16/365 (4.4%)
Neck Pain	169/366 (46.2%)
Difficulty Swallowing	66/365 (18.1%)
Anxiety	38/360 (10.5%)
Depression	33/361 (9.1%)
Neurofibromatosis type 1	45/382 (11.8%)
TREATMENT	
Posterior fossa reconstruction	210/376 (55.8%)

doi:10.1371/journal.pone.0057241.t001

Criteria for surgery were a >3 mm descent of the cerebellar tonsils in i) symptomatic patients, ii) oligosymptomatic patients with sleep apnea syndrome predominantly of the central type, and iii) patients with syringomyelia. Posterior fossa reconstruction was carried out in all patients to restore the volumetric capacity of the posterior fossa and to restore normal CSF dynamics at the craniovertebral junction. In summary, the technique consisted of

the removal of a large amount of occipital bone and the posterior arch of the atlas. The dura mater was opened and in most cases an extra-arachnoidal technique was used. An extensive dural graft secured with tenting sutures to the cervical fascia was used to avoid arachnoid scarring and to allow for the expansion of the compressed cisterna magna or the creation of a pseudocisterna magna

Initially, 384 SNPs from 58 candidate genes were genotyped (Table S1). Eighty-one SNPs were excluded from statistical analysis after data filtering: 40 SNPs had a genotyping rate below 85%, 4 SNPs showed deviation from HWE, 20 SNPs were monomorphic or had $MAF < 0.10$ (or $MAF < 0.25$) and 17 had a $r^2 > 0.85$ with other SNPs in the same candidate gene (Table S1).

All individuals with genotyping rates below 80% were excluded from the study, resulting in a range of genotyping efficiency of 94–97%. Thus, 303 SNPs were finally assessed in the association study in a total of 404 patients (286 female) and 519 sex-matched controls. The minimal statistical power of our sample, under the additive model, was 78% for the whole sample and 53% after subgrouping into classical CMI.

Single Marker Analysis

We used a two-tiered single marker analysis. The first step comprised the whole patient sample while the second one included the more homogeneous subset of morphometry-proven classical CMI patients. In both we used the same control population.

The case-control association study with the whole CMI sample (404 patients and 519 controls) found nominal associations (P -values < 0.05) for 18 SNPs located in 14 genes (Table S1). Only 5 SNPs, located in three different genes, displayed P -values < 0.01 : *CDX1* (rs887343, rs2282809), *FLT1* (rs17086609) and *ARG* (rs1554753, rs6580936) (P -values and genotype counts are shown in Table 2 and Figure 2A, and P -values for the remaining SNPs are shown in Table S1). However, no marker remained significant after applying 10% FDR or the Bonferroni correction (P value = $1.6E-04$ (= $0.05/303$ SNPs)).

The second analysis considered 186 classical CMI patients (patients with MRI morphometry-confirmed small PCF) and the 519 controls. Nominal associations (P -values < 0.05) were found under the additive model for 26 SNPs located in 13 genes (Table S1). The following 10 SNPs, located in 6 different genes, displayed P -values < 0.01 : *ALDH1A2* (rs2899611, rs6493979, rs2067062), *BMPRIA* (rs12415784), *CDX1* (rs887343, rs2282809), *FLT1* (rs17086609, rs9554320), *MSGN1* (rs11689375) and *RDH10* (rs16938610) (Table 2 and Figure 2B). P -values for the remaining SNPs are shown in Table S1.

After applying a 10% FDR correction ($P < 2.09E-03$) four associations did remain significant: rs887343 ($P = 4.4E-04$) in *CDX1*, rs17086609 ($P = 1.37E-03$) in *FLT1*, rs2899611 ($P = 2.01E-03$) and rs6493979 ($P = 2.09E-03$) in the *ALDH1A2* gene. Under the more strict Bonferroni correction no SNP reached significance.

Multiple Marker Analysis

The haplotype analysis was addressed only for those genes containing SNPs that passed 10% FDR in the single marker analysis. The pairwise linkage disequilibrium map of *ALDH1A2*, *CDX1* and *FLT1* genes was calculated in the sample under study (Figure 3). LD patterns across the *FLT1* gene defined five blocks (block 1 of <1 kb: rs9551462, rs9554325; block 2 of 6 kb: rs17086617, rs9508021 and rs2104330; block 3 of 1 kb: rs11149523 and rs8002446; block 4 of 22 kb: rs9513112, rs9513114 and rs7330109; block5 of 5 kb: rs12858139 and rs677471); two blocks were defined in *ALDH1A2* (block 1 of 11 kb: rs3784264, rs3784260, rs4646615; block 2 of 17 kb:

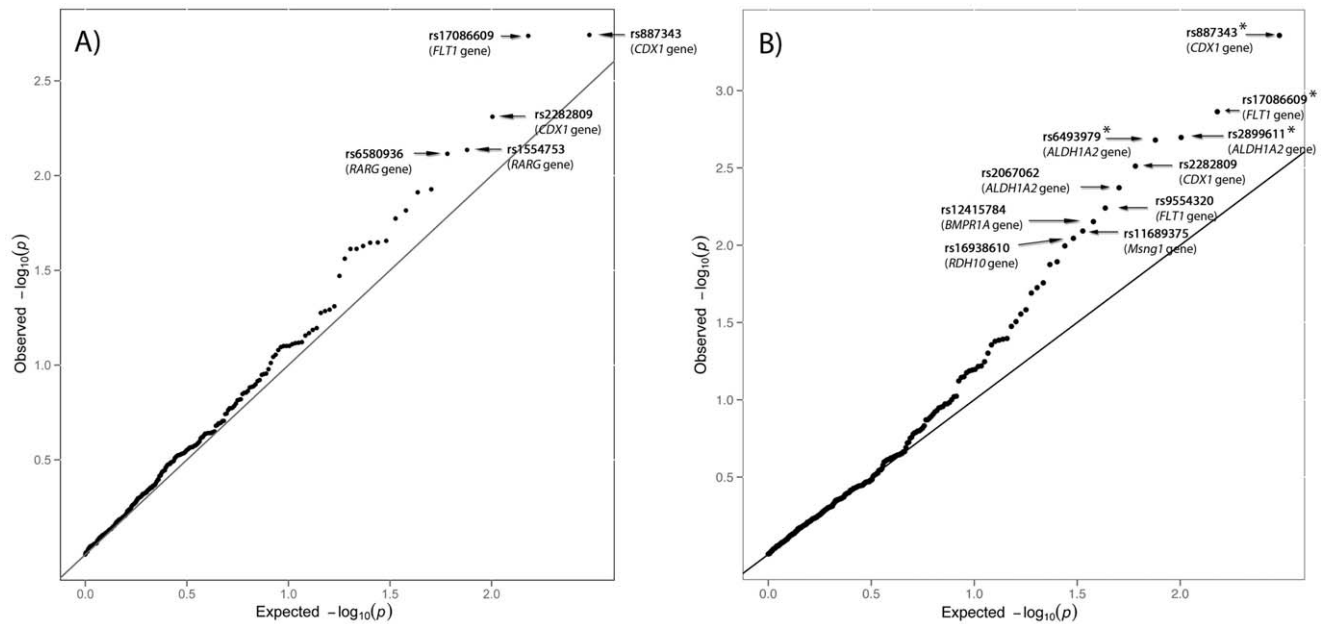


Figure 2. Quantile-quantile plot of the 303 P -values obtained in the association study under the additive model. 404 CMI patients versus 519 controls (A), and 186 small-PCF CMI versus 519 controls (B). SNPs with P -value <0.01 are indicated. Asterisks denote SNPs displaying association after 10% FDR correction for multiple testing ($P<2.09E-03$). doi:10.1371/journal.pone.0057241.g002

rs4238326, rs6493979, rs4238328, rs2067062 and rs7169439) and only one block in *CDX1* (block 1 of 2 kb: rs887343 and rs2282809). The haplotype analysis was assessed only for those blocks containing SNPs significantly associated (block2 of *ALDH1A2* and the only block of *CDX1*) (Figure 3). The SNPs rs2899611 (in *ALDH1A2*) and rs17086609 (in *FLT1*) were singletons (Figure 3). The results in the *CDX1* gene identified a risk haplotype constituted of G-G allelic combination (Permutated P -value = 9.4×10^{-3} ; OR = 1.54, 95% CI = 1.19–2.01) (Table 3). The results in the *ALDH1A2* gene identified an over-representation of the C-A-G-C-G haplotype in cases (Permutated P -value = 0.0179; OR = 1.53, 95% CI = 1.16–2.02).

PCF morphometric traits and risk genotypes

We sought to identify a possible relationship between genotypes of the four SNPs in three genes that passed 10% FDR correction (rs2899611, rs6493979 (*ALDH1A2*), rs887343 (*CDX1*), rs17086609 (*FLT1*)) and any of the PCF morphological measurements performed on the MRI studies of 211 patients (Table 4). A modest association was found between the two SNPs in *ALDH1A2* and the Wackenheimer angle and the degree of basal angulation (P -value <0.05).

Discussion

In the present association study performed in a sample of CMI patients from the Spanish population we found nominal association for SNPs in several genes involved in the early development of paraxial mesoderm and vascular development of the placenta. After corrections for multiple testing, only associations with four SNPs within *CDX1*, *FLT1* and *ALDH1A2* remained significant in the subsample where MRI morphometric analysis documented a reduced PCF. Considering these four SNPs, we also found a modest correlation between the two in *ALDH1A2* and specific morphometric data of the PCF.

The Chiari malformations have long been considered sporadic conditions, without a heritable etiology. However, there have been a number of case reports identifying familial aggregation and clustering of CMI, suggesting a genetic basis [9,25] although the involved genes and even type of inheritance are presently unknown. Given the predominance of apparently sporadic patients and the relatively high prevalence of the disorder, a polygenic model of inheritance seems plausible in a majority of CMI cases. To our knowledge, however, this is the first genetic association study ever to be carried out in CMI.

The contribution of common genetic variants has been examined in Chiari malformation type II (CMII), where several studies failed to demonstrate consistent associations with developmental genes such as *CRABP1*, *CRABP2*, *ALDH1A2*, *RALDH2*, *CYP26*, *HOX*, *NOG*, *SHH* and *TBX6* (reviewed in [62,63,64]). Mutational screens of some of these genes did not find definitive evidence for disease-causing mutations [63]. Since the most accepted pathogenic hypothesis in CMI is that of insufficiency of paraxial mesoderm in the third and fourth week of gestation, we decided to explore whether variants in genes expressed during somitogenesis could be associated with the milder and more frequent CMI phenotype.

Association study results

A number of nominal associations were found in the whole CMI sample. Despite none of them overcoming corrections for multiple testing, three of the selected candidate genes, *CDX1*, *FLT1* and *RARG*, contained SNPs that showed association with P -values <0.01 , thus suggesting that these genes are worth of scrutiny in further samples. However, our cohort was selected according to the radiographic standard criterion for diagnosis of CMI, a cerebellar tonsillar descent exceeding 3 mm on midsagittal MRI. Application of this single criterion may have resulted in clinical (and presumably genetic) heterogeneity, as in fact is suggested by the PCF morphometric data we obtained in the subgroup of cases where digitized MRI studies were available. Thus, it is not

Table 2. Case-control association study of 404 Spanish CMI patients and 519 sex-matched controls.

Gene	SNP (<i>P</i> <0.01)	Control Genotypes N (%)			All CMI Genotypes N (%)			Classical CMI Genotypes N (%)			<i>P</i> -val
		11	12	22	11	12	22	11	12	22	
<i>ALDH1A2</i>	rs2899611	110 (21)	264 (51)	145 (28)				59 (32)	90 (48)	37 (20)	0.00201*
	rs6493979	78 (15)	273 (53)	168 (32)	84 (21)	207 (51)	113 (28)	46 (25)	95 (51)	45 (24)	0.00209*
	rs2067062	148 (29)	258(50)	105 (21)				35 (20)	93 (52)	51 (28)	0.00425
<i>BMPRIA</i>	rs12415784	5 (1)	135 (26)	379 (73)	5 (1)	76 (19)	323 (80)	2 (1)	29 (16)	155 (83)	0.00704
	rs887343	85 (16)	252 (49)	180 (35)	43 (11)	187 (46)	174 (43)	16 (9)	82 (44)	88 (47)	0.00044*
<i>CDX1</i>	rs2282809	71 (14)	240 (46)	206 (40)	37 (9)	174 (43)	193 (48)	15 (8)	76 (41)	95 (51)	0.00308
	rs17086609	242 (47)	222 (43)	50 (10)	149 (37)	196 (49)	55 (14)	67 (37)	83 (45)	33 (18)	0.00137*
<i>MSGN1</i>	rs9554320	104 (20)	261 (50)	153 (30)				25 (14)	88 (47)	73 (39)	0.00575
	rs11689375	117 (23)	245 (47)	156 (30)	60 (15)	203 (51)	137 (34)	21 (11)	98 (53)	64 (36)	0.00810
<i>RARG</i>	rs1554753	310 (60)	182 (35)	27 (5)	272 (67)	121 (30)	11 (3)	0.00732	146 (79)	4 (2)	0.01752
	rs6580936	358 (69)	146 (28)	15 (3)	310 (77)	87 (21)	7 (2)	0.00767	36 (19)	4 (2)	NS
<i>RDH10</i>	rs16938610	305 (59)	178 (34)	36 (7)	262 (64)	126 (31)	16 (4)	0.02209	127 (68)	6 (3)	0.00903

An additional study analyzed 186 classical CMI patients and the same control population. Only markers with *P*-value<0.01 (Cochran-Armitage trend test) are shown.

*Significant associations after applying 10% FDR
doi:10.1371/journal.pone.0057241.t002

surprising that statistical significance of the association was higher in the group of 186 patients with underdeveloped PCF. Among the 26 nominally associated SNPs within 13 genes, in this “classical CMI” subsample, association with *P*-values<0.01 were found for SNPs within six genes: *ALDH1A2*, *RDH10*, *CDX1*, *BMPRIA*, *MSGN1* and *FLT1*. The association remained significant after a 10% FDR correction for SNPs within three genes: rs887343 in *CDX1*, rs17086609 in *FLT1* and rs2899611 plus rs6493979 in the *ALDH1A2* gene.

Regarding the potential functional relevance of the identified variants, four of the genes with the best association signals (*P*<0.01 in the single marker analysis of either CMI or classical CMI), *ALDH1A2*, *RDH10*, *RARG* and *CDX1*, are directly or indirectly related with retinoic acid (RA) signalling during somitogenesis. RA is a transcription factor needed for elongation of the embryonic body axis, acting as a molecular oscillator in the somitic precursors of the paraxial mesoderm [39] and promoting somite differentiation through regulation of the Hox genes [42]. Expression of RA synthetic enzyme, RALDH2, encoded by *ALDH1A2*, is crucial at these presomitic or early somatic stages. Avian or mouse RA-deficient embryos develop abnormally small somites (reviewed in [34]), while exposure to teratogenic RA levels give rise to congenital dysraphism in humans [65]. *RDH10* encodes a retinol dehydrogenase critical for embryonic vitamin A metabolism. Murine *Rdh10* mutants display lethal abnormalities characteristic of a RA-deficiency phenotype [66]. *RARG* binds to DNA after heterodimerization with any of the retinoid X receptors, leading to activation of RA response elements (RAREs), which displace transcriptional corepressors and recruits coactivators [67]. Through this pathway, RA regulates specific Hox expression in paraxial mesoderm, determining embryonic anterior-posterior patterning throughout somitogenesis (reviewed in [34,67]). This may origin spinal column defects such as scoliosis [68], present in nearly 20% of our CMI patients. A third RA-related gene showing association is *CDX1*. *Cdx* genes encode homeodomain transcription factors containing atypical RARE [69,70]. In the mouse embryo primitive streak, expression of *Cdx1* begins at postconceptional day 7.5 in concurrence with onset of RA signalling and Hox expression. Of note, *Cdx1*-null mutants display alterations in the basioccipital bone [69].

The other three listed genes, *BMPRIA*, *MSGN1* and *FLT1*, belong to less interrelated pathways. *BMPRIA* has been found to regulate the recruitment of prospective paraxial mesoderm cells in the mouse epiblast. Mutant embryos have a shorter primitive streak, a more proximal node and a defective extension of the primitive streak [41]. *MSGN1* is a direct target of *Wnt* and *TBX6* during the specification, maturation and segmentation of the paraxial mesoderm in the mouse [38]. *FLT1* encodes VEGFR-1, a vascular endothelial growth factor receptor expressed in the endothelium of blood vessels [71]. Vasculogenesis at the chorionic villi tree is evident by post conceptional day 21, during the four-somite embryonic stage (reviewed in [72]). A *FLT1* mutation resulted in endothelial disorganization and abnormal vessel formation during early embryo development [73]. During the fourth week of life the human embryo switches from the exchange of nutrients and wastes by simple diffusion to establishment of utero-placental circulation. It is conceivable that failure to properly transition through these two stages could impair critical processes as mesodermal proliferation or neurulation.

Finally, the four variants associated with classical CMI (rs887343 in *CDX1*, rs17086609 in *FLT1* and rs2899611 plus rs6493979 in *ALDH1A2*) are intronic, with no direct effect on the protein sequence. It could be that the identified risk variants may produce by themselves functional alterations or they might lie in

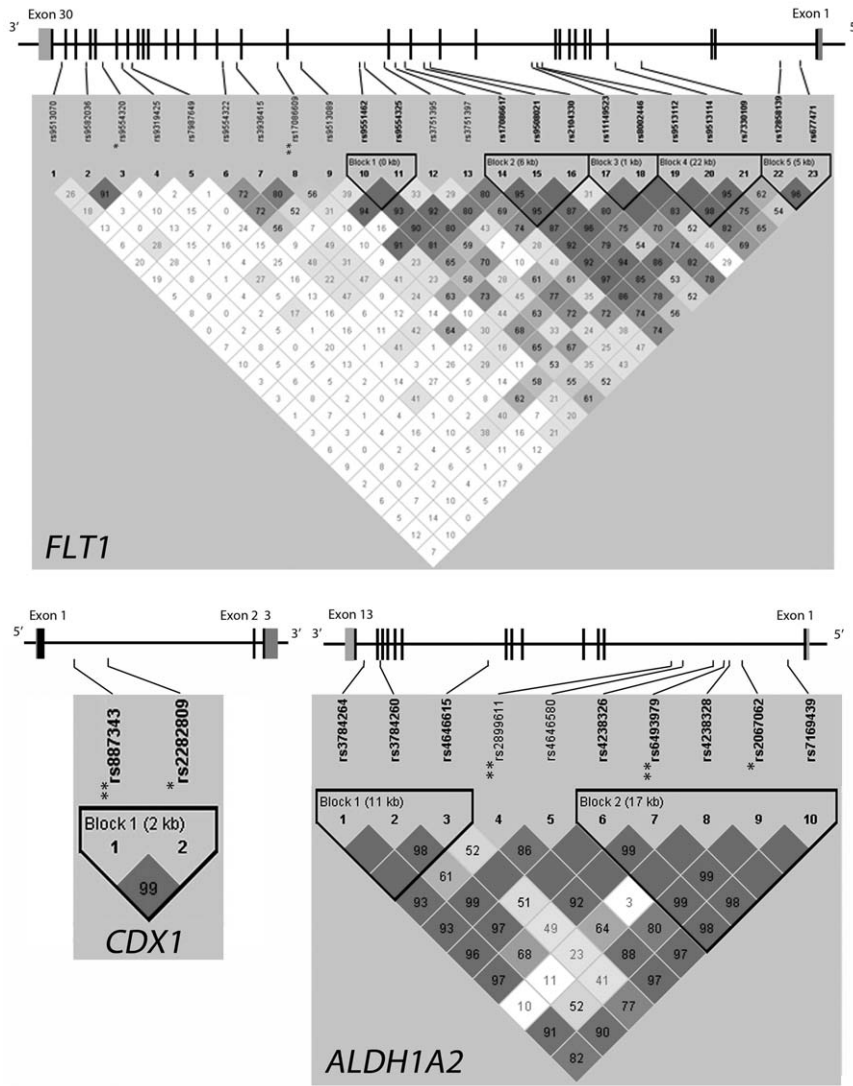


Figure 3. Haplotypes graphs showing the markers tested and haplotype blocks constructed for *ALDH1A2*, *CDX1* and *FLT1*. D' values are indicated (tones from white to dark grey indicate D' values from 0 to 1, respectively). The genomic structures of *ALDH1A2*, *CDX1* and *FLT1* genes are drawn with coding exons indicated as black boxes. The SNPs with P-value<0.01 are indicated with an asterisk (*); the SNPs showing association after 10% FDR correction for multiple testing (P<2.09E-03) are indicated with a double asterisk (**).
doi:10.1371/journal.pone.0057241.g003

Table 3. Haplotype analysis for the linkage disequilibrium blocks containing SNPs that showed significant associations in the single marker analysis (Haploview v4.2 software).

Population	Gene	LD block: SNPs	Haplotype	Cases %	Controls %	P-value (permP) ^a	Odds Ratio [95% CI]
Classical CMI	<i>CDX1</i>	Block 1: rs887343-rs2282809	GG	255 (71)	614 (62)	0.0014 (0.0094)	1.54 [1.19–2.01]
			CA	103 (29)	384 (38)	0.0012 (0.0092)	0.65 [0.50–0.84]
Classical CMI	<i>ALDH1A2</i>	Block 2: rs4238326-rs6493979-rs4238328-rs2067062-rs7169439	TGGAG	99 (28)	328 (33)	0.0732 (0.3975)	0.79 [0.60–1.02]
			CAGCG	100 (28)	201 (20)	0.0025 (0.0179)	1.53 [1.16–2.02]
			TGAAG	66 (19)	233 (24)	0.0563 (0.3233)	0.75 [0.55–1.01]
			CAGCA	49 (14)	140 (14)	0.882 (1.0000)	0.97 [0.69–1.38]
			TAGCG	38 (11)	87 (9)	0.2624 (0.8997)	1.24 [0.83–1.86]

^aA total of 10,000 permutations were performed using Haploview v4.2 to obtain a measure of significance corrected for multiple testing.
doi:10.1371/journal.pone.0057241.t003

Table 4. Association between risk genotypes and PCF morphometric traits in 211 patients with CMI.

	<i>ALDH1A2</i>	<i>ALDH1A2</i>	<i>CDX1</i>	<i>FLT1</i>
Measures	rs2899611	rs6493979	rs887343	rs17086609
TD	0.105	0.684	0.226	0.328
Supraocciput	0.477	0.352	0.777	0.829
Clivus	0.922	0.976	0.593	0.769
FM	0.080	0.595	0.227	0.933
PCF area	0.248	0.560	0.556	0.459
OPCF area	0.367	0.636	0.532	0.356
PCF length*	0.750	0.300	0.094	0.983
Tentorium angle	0.456	0.836	0.410	0.118
Basal angulation	0.016	0.067	0.800	0.228
Wackenheim angle	0.006	0.039	0.824	0.146

Data presented are *P*-values (Scheffé's post-hoc and Kruskal-Wallis tests).
 *Assessed as the distance from the dorsum sellae to the internal occipital protuberance; in bold, *P*<0.05. TD: tonsillar descent; OPCF: osseous PCF, FM: foramen magnum.
 doi:10.1371/journal.pone.0057241.t004

LD with other susceptibility loci, in the case of an indirect association. Since all these SNPs are tagSNPs, we analyzed these variants and those in LD with them by means of the web utility SNP Function Prediction [74]. The predictions of functional effects for transcription factor binding sites, exonic splicing enhancers or silencers, changing of splicing pattern or efficiency by disrupting splice sites, regulation of protein translation by affecting microRNA binding sites and conservation scores were all negative.

Genetic-morphometric analysis

We also investigated whether any specific PCF morphological feature might relate to any of the gene variants showing association with CMI. A short anteroposterior diameter of the PCF and an increased basal angle have been described in some CMI morphometric studies [17,19]. However, no correlation was found among genotypes and any of the previously considered more typical features of CMI, such as clivus or supraocciput length, PCF area or tentorial angle [15]. In our study, two SNPs in *ALDH1A2* displayed a correlation with the Wackenheim angle and one of them with the basal angulation, in keeping with previous evidence pointing at basiocciput, rather than supraocciput, abnormalities in CMI. Whether an abnormal clivus slope does constitute a marker of genetically-determined CMI deserves further investigation.

References

- Chiari H (1987) Concerning alterations in the cerebellum resulting from cerebral hydrocephalus. 1891. *Pediatr Neurosci* 13: 3–8.
- Barkovich AJ, Wippold EJ, Sherman JL, Citrin CM (1986) Significance of cerebellar tonsillar position on MR. *AJNR Am J Neuroradiol* 7: 795–799.
- Milhorat TH, Chou MW, Trinidad EM, Kula RW, Mandell M, et al. (1999) Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery* 44: 1005–1017.
- Tubbs RS, Beckman J, Naftel RP, Chern JJ, Wellons JC 3rd, et al. (2011) Institutional experience with 500 cases of surgically treated pediatric Chiari malformation Type I. *J Neurosurg Pediatr* 7: 248–256.
- Greenlee JD, Donovan KA, Hasan DM, Menezes AH (2002) Chiari I malformation in the very young child: the spectrum of presentations and experience in 31 children under age 6 years. *Pediatrics* 110: 1212–1219.
- Martinot A, Hue V, Leclerc F, Vallee L, Closset M, et al. (1993) Sudden death revealing Chiari type 1 malformation in two children. *Intensive care medicine* 19: 73–74.
- Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJ, Hofman A, et al. (2007) Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med* 357: 1821–1828.
- Morris Z, Whiteley WN, Longstreth WT Jr, Weber F, Lee YC, et al. (2009) Incidental findings on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 339: b3016.

Methodological issues

The present case-control association study raises several methodological questions. First, the modest sample size (404 patients and 519 controls) may have prevented from detecting subtle phenotypic effects, as the statistical power calculated for this cohort is close to 80% when an OR of 1.5 is assumed. Second, we do not present a replication study of our findings in an independent cohort. This notwithstanding, ours was a relatively large sample considering the low prevalence of CMI (1:1000 to 1:5000), bordering that of rare diseases. It was also the first CMI sample being explored for association with a large set of candidate genes. Third, although the SNP selection was designed to cover the 58 candidate genes on the basis of existing linkage disequilibrium patterns, gaps still exist in 12 genes due to experimental constraints, and 21% of the 384 SNPs could not be studied. Last, lack of MRI study of the control population may have resulted in inclusion of some asymptomatic CMI cases, although given the estimated low prevalence of tonsillar descent, this should not be expected to influence the validity of our findings.

In conclusion our genetic data give support to the hypothesis that variants in genes involved in paraxial mesoderm may determine PCF size to the extent of the development of the CMI. Specifically, our results point to a putative role for defective RA signalling and fetal vasculogenesis in causing hypoplasia of the basichondrocranium. Although confirmatory studies are needed, these are among the first genetic susceptibility factors to be defined in CMI. Given the limitations of the current radiographic diagnostic criteria, understanding of the genetic underpinnings of CMI should have important clinical implications, including earlier recognition of subjects at risk of becoming symptomatic and the timely indication of the surgical reconstruction of the PCF.

Supporting Information

Table S1 Description of the 384 SNPs initially selected for the genotyping assay using the VeraCode technology. (DOCX)

Acknowledgments

We thank the Spanish Chiari Malformation associations, Asenchi and ANAC, and all the patients for their valuable contribution to this study. We thank Elizabeth Solana and Olga Mestre for assistance in recruiting the patient cohort and obtaining samples.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EC-L MAP JS AM. Performed the experiments: AU EC-L CT. Analyzed the data: AU CT EC-L BC AM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CT MAP. Wrote the paper: AU CT MAP JS EC-L BC AM.

9. Speer MC, George TM, Enterline DS, Franklin A, Wolpert CM, et al. (2000) A genetic hypothesis for Chiari I malformation with or without syringomyelia. *Neurosurg Focus* 8: E12.
10. Meadows J, Kraut M, Guarneri M, Haroun RI, Carson BS (2000) Asymptomatic Chiari Type I malformations identified on magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 92: 920–926.
11. Marin-Padilla M, Marin-Padilla TM (1981) Morphogenesis of experimentally induced Arnold-Chiari malformation. *J Neurol Sci* 50: 29–55.
12. Barry A, Patten BM, Stewart BH (1957) Possible factors in the development of the Arnold-Chiari malformation. *J Neurosurg* 14: 285–301.
13. Gardner WJ, Goodall RJ (1950) The surgical treatment of Arnold-Chiari malformation in adults; an explanation of its mechanism and importance of encephalography in diagnosis. *J Neurosurg* 7: 199–206.
14. McLone DG, Knepper PA (1989) The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci* 15: 1–12.
15. Nishikawa M, Sakamoto H, Hakuba A, Nakanishi N, Inoue Y (1997) Pathogenesis of Chiari malformation: a morphometric study of the posterior cranial fossa. *J Neurosurg* 86: 40–47.
16. Noudel R, Jovenin N, Eap C, Scherpereel B, Pierot L, et al. (2009) Incidence of basioccipital hypoplasia in Chiari malformation type I: comparative morphometric study of the posterior cranial fossa. *Clinical article. J Neurosurg* 111: 1046–1052.
17. Aydin S, Hanimoglu H, Tanriverdi T, Yentur E, Kaynar MY (2005) Chiari type I malformations in adults: a morphometric analysis of the posterior cranial fossa. *Surg Neurol* 64: 237–241; discussion 241.
18. Schady W, Metcalfe RA, Butler P (1987) The incidence of craniocervical bony anomalies in the adult Chiari malformation. *J Neurosci* 82: 193–203.
19. Karagoz F, Izgi N, Kapijicoglu Sencer S (2002) Morphometric measurements of the cranium in patients with Chiari type I malformation and comparison with the normal population. *Acta Neurochir (Wien)* 144: 165–171; discussion 171.
20. Milhorat TH, Nishikawa M, Kula RW, Dlugacz YD (2010) Mechanisms of cerebellar tonsil herniation in patients with Chiari malformations as guide to clinical management. *Acta Neurochir (Wien)* 152: 1117–1127.
21. Stovner IJ, Bergan U, Nilsen G, Sjaastad O (1993) Posterior cranial fossa dimensions in the Chiari I malformation: relation to pathogenesis and clinical presentation. *Neuroradiology* 35: 113–118.
22. Vega A, Quintana F, Berciano J (1990) Basichondrocranium anomalies in adult Chiari type I malformation: a morphometric study. *J Neurol Sci* 99: 137–145.
23. Marin-Padilla M (1991) Cephalic axial skeletal-neural dysraphic disorders: embryology and pathology. *Can J Neurol Sci* 18: 153–169.
24. Schanker BD, Walcott BP, Nahed BV, Kahle KT, Li YM, et al. (2011) Familial Chiari malformation: case series. *Neurosurg Focus* 31: E1.
25. Speer MC, Enterline DS, Mehlrette L, Hammock P, Judith Joseph MD, et al. (2003) Chiari Type I Malformation With or Without Syringomyelia: Prevalence and Genetics. *Journal of Genetic Counseling* 12: 297–311.
26. Fujita K, Aida N, Asakura Y, Kurosawa K, Niwa T, et al. (2009) Abnormal basiocciput development in CHARGE syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol* 30: 629–634.
27. Wojcik C, Volz K, Ranola M, Kitch K, Karim T, et al. (2010) Rubinstein-Taybi syndrome associated with Chiari type I malformation caused by a large 16p13.3 microdeletion: a contiguous gene syndrome? *American journal of medical genetics Part A* 152A: 479–483.
28. Fujisawa H, Hasegawa M, Kida S, Yamashita J (2002) A novel fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Crouzon syndrome associated with Chiari type I malformation and syringomyelia. *J Neurosurg* 97: 396–400.
29. Schimmenti LA, Shim HH, Wirtschafter JD, Panzarino VA, Kashtan CE, et al. (1999) Homonucleotide expansion and contraction mutations of PAX2 and inclusion of Chiari I malformation as part of renal-coloboma syndrome. *Hum Mutat* 14: 369–376.
30. Boyles AL, Enterline DS, Hammock PH, Siegel DG, Slifer SH, et al. (2006) Phenotypic definition of Chiari type I malformation coupled with high-density SNP genome screen shows significant evidence for linkage to regions on chromosomes 9 and 15. *Am J Med Genet A* 140: 2776–2785.
31. Kibar Z, Capra V, Gros P (2007) Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clinical genetics* 71: 295–310.
32. Urbizu A, Poca M, Vidal X, Rovira A, Sahuquillo J, et al. (2012) MRI-based morphometric analysis of posterior cranial fossa: a probability model for diagnosis of Chiari malformation type I. *Journal of Neuroimaging*. In press.
33. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
34. Niederreither K, Dolle P (2008) Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9: 541–553.
35. Bottcher RT, Niehrs C (2005) Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine reviews* 26: 63–77.
36. Shapiro R, Robinson F (1976) Embryogenesis of the human occipital bone. *AJR Am J Roentgenol* 126: 1063–1068.
37. Kageyama R, Niwa Y, Shimajo H (2009) Rhythmic gene expression in somite formation and neural development. *Molecules and cells* 27: 497–502.
38. Witter L, Shin EH, Grote P, Kispert A, Beckers A, et al. (2007) Expression of *Msn1* in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and *Tbx6*. *EMBO reports* 8: 784–789.
39. Aulehla A, Pourquie O (2009) Signaling gradients during paraxial mesoderm development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000869.
40. William DA, Saitta B, Gibson JD, Traas J, Markov V, et al. (2007) Identification of oscillatory genes in somitogenesis from functional genomic analysis of a human mesenchymal stem cell model. *Developmental biology* 305: 172–186.
41. Miura S, Davis S, Klingensmith J, Mishina Y (2006) BMP signaling in the epiblast is required for proper recruitment of the prospective paraxial mesoderm and development of the somites. *Development* 133: 3767–3775.
42. Alexander T, Nolte C, Krumlauf R (2009) Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 431–456.
43. Olsen BR, Reginato AM, Wang W (2000) Bone development. Annual review of cell and developmental biology 16: 191–220.
44. Monsoro-Burq AH (2005) Sclerotome development and morphogenesis: when experimental embryology meets genetics. *The International journal of developmental biology* 49: 301–308.
45. Tribioli C, Lufkin T (1999) The murine *Bapx1* homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development* 126: 5699–5711.
46. Martin JF, Bradley A, Olson EN (1995) The paired-like homeo box gene *MHox* is required for early events of skeletogenesis in multiple lineages. *Genes & development* 9: 1237–1249.
47. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 25: 114–126.
48. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, et al. (2004) Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 25: 560–572.
49. Tubbs RS, Rutledge SL, Kosentka A, Bartolucci AA, Oakes WJ (2004) Chiari I malformation and neurofibromatosis type 1. *Pediatric neurology* 30: 278–280.
50. Freeman AF, Davis J, Hsu AP, Holland SM, Puck JM (1993) Autosomal Dominant Hyper IgE Syndrome. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA).
51. Gu CC, Yu K, Rao DC (2008) Characterization of LD structures and the utility of HapMap in genetic association studies. *Adv Genet* 60: 407–435.
52. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15: 1592–1593.
53. Barnes MR (2006) Navigating the HapMap. *Brief Bioinform* 7: 211–224.
54. Mueller JC (2004) Linkage disequilibrium for different scales and applications. *Brief Bioinform* 5: 355–364.
55. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, et al. (2004) Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 74: 106–120.
56. Lin CH, Yeakley JM, McDaniel TK, Shen R (2009) Medium- to high-throughput SNP genotyping using VeraCode microbeads. *Methods Mol Biol* 496: 129–142.
57. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M (2006) Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 38: 209–213.
58. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–265.
59. Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, et al. (2007) SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23: 644–645.
60. Wickham H (2009) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer, New York.
61. Storey JD (2002) A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 64: 647–679.
62. Boyles AL, Hammock P, Speer MC (2005) Candidate gene analysis in human neural tube defects. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 135C: 9–23.
63. Kibar Z, Capra V, Gros P (2007) Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clin Genet* 71: 295–310.
64. Greene ND, Stanier P, Copp AJ (2009) Genetics of human neural tube defects. *Human molecular genetics* 18: R113–129.
65. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, et al. (1985) Retinoic acid embryopathy. *The New England journal of medicine* 313: 837–841.
66. Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, et al. (2007) *RDH10* is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes & development* 21: 1113–1124.
67. Duester G (2008) Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134: 921–931.
68. Kane WJ (1977) Scoliosis prevalence: a call for a statement of terms. *Clinical orthopaedics and related research*: 43–46.
69. Houle M, Sylvestre JR, Lohnes D (2003) Retinoic acid regulates a subset of *Cdx1* function in vivo. *Development* 130: 6555–6567.
70. Houle M, Prinos P, Iulianella A, Bouchard N, Lohnes D (2000) Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Molecular and cellular biology* 20: 6579–6586.
71. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, et al. (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and biophysical research communications* 187: 1579–1586.
72. Demir R, Seval Y, Huppertz B (2007) Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 109: 257–265.

73. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66–70.
74. Xu Z, Taylor JA (2009) SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic acids research* 37: W600–605.

Table S1. Description of the 384 SNPs initially selected for the genotyping assay using the VeraCode Technology.

Gene (cov ^a)	Location	TagSNP_ID	SNPs captured ^b	Genotype Call Rate (%)	MAF ^c	HWE ^d (<i>p-val</i>)	Case/Control (<i>p-val</i>) ^e All patients	Case/Control (<i>p-val</i>) ^e Classical CMI		
ADH4 (1)	4q22	rs17218560 ¹	rs2602880, rs2602880, rs2602883, rs2851255, rs2602891, rs2851253, rs2924583, rs1042365, rs1042364, rs2602895, rs2851248, rs2851247, rs2851246, rs2602896, rs2602878, rs34936974, rs13129488, rs29001203, rs17817359, rs17217949, rs17218003, rs13143133, rs17218073, rs17218108, rs13112176, rs17218141, rs17218162, rs17218239, rs17218288, rs13133647, rs7669636, rs7670060, rs7670241, rs7694646, rs4699712, rs4699713, rs4699714, rs17817868, rs1126672, rs17218602, rs17817958, rs13110176, rs13110764, rs13138294, rs2602877, rs6532795, rs6532796, rs1126673, rs1126671, rs6837685, rs13113166, rs1126670, rs6532798, rs7689753, rs10017466, rs7670638, rs3919370, rs4699716, rs4699717							
		rs1800759	-	100	0.42	0.72	0.401	0.75075		
		rs2602884	-	99.9	0.15	0.29	0.757	0.86450		
		rs3762894	-	99.8	0.18	1	0.345	0.36130		
		rs3828541 ⁴	rs10009145, rs13148577							
		rs4148883	-	98.8	0.48	0.42	0.310	0.98474		
		rs4699710	-	100	0.33	0.62	0.709	0.51922		
		ALDH1A2 (0.85)	15q21.3	rs2067062	rs2704218	97	0.48	0.72	0.051	0.00425
				rs2899611	-	100		0.66	0.077	0.00201
				rs3784260	rs10851631, rs12907038, rs7495968, rs9325, rs3204689, rs4646640, rs12910113, rs4646638, rs11855259, rs4646636, rs7165247, rs3784263, rs3784262, rs10851630, rs4646616, rs12903551, rs12903474, rs12908953, rs12915901, rs12148907, rs12901462	100	0.46	0.86	0.229	0.07091
rs3784264	rs8041644, rs1441815, rs2642630			97.2	0.41	0.31	0.460	0.02039		
rs4238326	rs11071365, rs4646576, rs4646572, rs4646568			99.8	0.35	0.06	0.049	0.01333		
rs4238328	-			99.9	0.21	0.90	0.153	0.05668		

		rs4646580	rs10851632, rs1441819, rs4646645, rs1061278, rs1063666, rs3204690, rs4646642, rs2197092, rs3742961, rs3742960, rs3742959, rs4646626, rs4646625, rs2414527, rs3784259, rs3784257, rs12594082, rs4646609, rs12898976, rs8026952, rs12907125, rs12914388, rs1822205, rs4646607, rs1899355, rs4646606, rs4646605, rs7180059, rs12917536, rs1441829, rs12909423, rs1372369, rs4646600, rs4646595, rs4646594, rs4646590, rs4646589, rs4646588, rs4646584, rs4646582, rs4646581, rs2642632, rs7178598, rs12903724, rs12148281, rs8032572, rs4646579, rs12595180, rs12912093, rs2899613, rs1994927, rs17820990, rs12914603, rs4646564, rs6493981, rs2704225, rs4646560, rs11071367, rs4646559, rs4646555, rs4646554, rs2414530, rs7171261	99.9	0.45	0.79	0.180	0.01280
		rs4646615	-	99.2	0.35	0.63	0.633	0.40794
		rs6493979	rs11071364, rs10518961, rs1994926, rs8027188, rs4238325, rs4238327, rs17820966, rs4144005	100	0.44	0.06	0.024	0.00209
		rs7169289 ⁴	-					
		rs7169439	-	99.9	0.13	0.26	0.659	0.83777
<i>Axin2</i> (1)	17q23-q24	rs11079571	-	100	0.22	0.52	0.831	0.17468
		rs11655966	-	99.6	0.24	0.71	0.580	0.75120
		rs11868547	-	100	0.41	0.86	0.299	0.15239
		rs12452196	-	100	0.17	0.54	0.760	0.61896
		rs2240308 ⁴	-					
		rs3923086	-	100	0.50	0.86	0.920	0.87306
		rs3923087	-	99.9	0.30	0.91	0.458	0.22702
		rs4074947	-	99.8	0.25	0.90	0.498	0.12799
		rs4541111 ⁴	-					
		rs4791171	rs11867417	100	0.34	0.54	0.120	0.22860
		rs7224837 ³	rs7210356					
		rs740026	-	99.9	0.39	0.46	0.820	0.96824
		rs757558	-	99.9	0.17	0.54	0.540	0.32799
		rs7591	-	99.9	0.41	0.93	0.298	0.11181
<i>NKX3-2</i> (1)	4p16.3	rs10939485 ⁴	-					
		rs16888802 ⁴	-					
		rs3822226 ¹	-					
		rs758974	rs758973, rs12501307, rs1476211	100	0.17	0.19	0.070	0.44272
<i>BMP2</i> (1)	20p12	rs1005464	-	100	0.20	0.34	0.705	0.36768
		rs170986	-	100	0.17	0.87	0.294	0.16656
		rs1979855	-	99.7	0.19	0.12	0.638	0.21651
		rs1980499	-	100	0.47	0.66	0.474	0.51044
		rs235764	-	99.9	0.31	0.47	0.678	0.47010
		rs235767	-	99.9	0.44	0.86	0.130	0.66840
		rs235770 ¹	rs6054512, rs235768, rs235772					

		rs235771	-	100	0.36	0.57	0.624	0.61712
		rs28488 ¹	-					
		rs3178250	-	99.8	0.25	0.13	0.279	0.03122
		rs6117432	-	99.9	0.22	0.70	0.666	0.27882
<i>BMPRIA</i> (1)	10q22.3	rs10887666	rs4934275, rs11202231, rs11202232, rs7895131, rs10788533, rs10887664, rs11594941, rs10788528, rs4934280, rs11594289, rs7094713	100	0.16	0.44	0.514	0.09989
		rs11202185	-	99.8	0.37	0.34	0.152	0.50827
		rs11202222 ⁴	-					
		rs11594232	-	99.9	0.25	0.29	0.434	0.78817
		rs12415784	-	100	0.12	0.07	0.027	0.00704
		rs12765929	rs17335915	100	0.27	0.07	0.111	0.01011
		rs2168730	rs2125055, rs4934272, rs7095025, rs4481940, rs4933416, rs4933417, rs11202221	99.7	0.25	0.90	0.626	0.43565
		rs4934263	-	99.9	0.41	0.64	0.079	0.06040
		rs6586037	rs7074582, rs2353786, rs6586034, rs6586035, rs7916903, rs3858284, rs4934262, rs4934265, rs2125054, rs4934268, rs7906823, rs2354353, rs2883420, rs7905807, rs4934279	95.1	0.43	0.41	0.307	0.30566
		rs7096781	rs7095804, rs4934261, rs2168727, rs10887654, rs3905377, rs7088641	99.5	0.32	0.76	0.779	0.24694
		rs733877 ³	-					
		rs7895217 ¹	rs1124482, rs4933411, rs10887656, rs2354352, rs11202197, rs4934269, rs4478900, rs7478254, rs4933415, rs4934273, rs10887658, rs2125057, rs722068, rs2354354, rs2354355, rs11202227, rs10887660, rs7087358, rs7091555					
		rs7922846	rs10749542, rs749673, rs7074064	98.8	0.29	0.02	0.273	0.30817
<i>CDH1</i> (0.89)	16q22.1	rs11075699	-	99.6	0.43	0.10	0.874	0.88966
		rs12185157 ⁴	rs1078621, rs7203337, rs11642413, rs4783676, rs1125557, rs12448999					
		rs12597188	-	100	0.31	0.07	0.443	0.52844
		rs16958383	-	100	0.14	0.58	0.700	0.44864
		rs17690554	rs13689	100	0.15	0.39	0.881	0.42987
		rs2276330	-	99.9	0.12	0.07	0.320	0.18831
		rs3785078	rs8061932	99.9	0.13	0.54	0.653	0.49525
		rs7186053	rs10431923, rs10431924	100	0.40	0.10	0.360	0.37972
		rs7186084 ¹	-					
		rs7188750	-	100	0.17	1	0.863	0.37428
		rs7196495	rs7196661, rs2902185, rs13335476, rs4783672, rs9941051, rs11640099, rs9940250, rs4783673, rs1974873, rs12931189, rs4783572	100	0.10	0.64	0.770	0.92258
		rs7203904	-	99.9	0.22	0.90	0.496	0.91403

		rs9925923 ¹	rs2059254, rs7186333, rs16260, rs11865026, rs7200690, rs17772363, rs13333528, rs9646284, rs9928847, rs13334471, rs8056538, rs12930371, rs12446407, rs12446413, rs12443730, rs4783681, rs4783570, rs13334326, rs13339591, rs9282650, rs17772411, rs2113199, rs12599517, rs2113200, rs2113201, rs7199991, rs7198799, rs2961, rs1981871, rs9929218, rs9929239, rs9929479, rs12919719, rs12924033, rs4076177, rs12599393, rs17715799, rs2010724, rs1075959, rs1862748, rs4783686						
		rs9935563	rs1801552	99.7	0.36	0.25	0.808	0.85441	
<i>CDX1</i> (0.83)	5q32	rs2282809	rs2282808, rs2282810, rs2282812	99.8	0.34	0.92	0.005	0.00308	
		rs3776083 ⁴	-						
		rs6890699 ⁴	-						
		rs6894617 ⁴	-						
		rs887343	-	99.8	0.38	0.93	0.002	0.00044	
		rs887344 ⁴	rs2302275, rs3776082, rs2237091, rs717746						
<i>CRABP1</i> (0.5)	15q24	rs3813573	rs2139440	100	0.20	0.69	0.269	0.88354	
		rs8027180	-	99.8	0.5	0.33	0.090	0.82392	
<i>CTNNB1</i> (1)	3p21	rs4135385	-	99.8	0.23	0.38	0.359	0.60125	
		rs9311265	rs3864004, rs4533622, rs2371452, rs3915129, rs6776881, rs2140090, rs4973927, rs13076290, rs1798802, rs13072632, rs1880481, rs11564450, rs11564452, rs2953, rs9870255, rs9883073, rs1722845, rs9813198, rs13075993, rs3774369, rs11564454, rs3774371, rs11564465, rs11129895	99.9	0.43	0.13	0.743	0.15597	
<i>CYP26A1</i> (1)	10q23-q24	rs10882140 ⁴	-						
		rs7905501	rs17465590, rs7905939	99.8	0.20	1	0.891	0.39933	
		rs11812460	rs4411227	99.9	0.27	0.16	0.364	0.31404	
<i>CYP26C1</i> (1)	10q23.33	rs12256889	rs4919594	100	0.32	0.09	0.432	0.50127	
		rs1339820	-	98.3	0.11	1	0.333	0.63270	
		rs1538648	-	99.7	0.47	0.09	0.088	0.33212	
		rs2068888	rs4418728	99.9	0.47	1	0.873	0.79843	
		rs7073161 ⁴	-						
		rs7922067 ⁴	rs8211						
<i>DLL1</i> (1)	6q27	rs1028489	rs1028488	99.8	0.49	0.22	0.766	0.85004	
		rs1033583	-	99.9	0.34	0.55	0.197	0.24311	
		rs2738820	-	99.9	0.35	0.49	0.142	0.16199	
		rs9356632 ⁴	rs2180052						
		rs9460102	-	100	0.18	0.54	0.670	0.56402	
		rs9460103	-	98.7	0.39	0.30	0.257	0.64103	
<i>DUSP4</i> (1)	8p12-p11	rs12540995	-	99.7	0.25	0.91	0.469	0.70954	
		rs2056025	rs7831728, rs1455915, rs7823775	100	0.11	0.49	0.891	0.90819	
		rs2341674	-	99.9	0.18	0.66	0.151	0.58428	

		rs3824133 ¹	-						
		rs473004	rs474824	100	0.36	1	0.765	0.73181	
		rs567436	rs569209, rs2637819	100	0.25	0.73	0.826	0.69406	
<i>FGF8</i> (1)	10q24	rs1348870	-	99.9	0.39	0.85	0.999	0.64623	
<i>FGFR1</i> (1)	8p12	rs10105686	rs6474354	99.7	0.22	0.38	0.235	0.87953	
		rs10958704	-	99.8	0.37	0.71	0.131	0.11048	
		rs17182127 ⁴	rs17182120, rs7825208						
		rs2288696	-	99.8	0.20	0.90	0.197	0.60851	
		rs2411256	-	100	0.21	0.58	0.079	0.48876	
		rs2978076 ³	rs2280846, rs2956724, rs2978073						
		rs2978083	-	99.9	0.02	0.33			
		rs3758102	-	99.8	0.22	0.68	0.017	0.06674	
		rs3925 ¹	rs2411257, rs10958700, rs13317, rs3779921, rs2293971, rs2304000, rs4647907, rs10101096, rs16887378, rs11777067						
		rs4733930	-	100	0.43	0.37	0.882	0.94066	
		rs6983315	rs6987534	100	0.41	0.47	0.477	0.48755	
		rs6996321	rs12677355	100	0.41	0.31	0.224	0.11976	
		rs7012413	-	99.6	0.31	0.76	0.893	0.51959	
<i>FLT1</i> (1)	13q12	rs10507385 ³	-						
		rs11149523	-	99.5	0.32	0.70	0.173	0.23780	
		rs12858139	rs655024	99.8	0.42	0.07	0.401	0.43052	
		rs12877718 ⁴	rs7982639, rs10507382, rs17086497						
		rs1324057 ⁴	-						
		rs17086609	-	99	0.34	1	0.002	0.00137	
		rs17086617	rs2296284, rs7983774, rs9513095, rs1555641, rs9319428, rs9319429, rs7992068, rs9508025, rs9508026, rs9513105, rs9508029, rs10871266	96.5	0.26	1	0.721	0.50782	
		rs2104330	rs2296283, rs7332329, rs2057535, rs9551465, rs9319427, rs2182007, rs9551467, rs11149520, rs9943922	99.7	0.45	0.79	0.733	0.61062	
		rs3751395	-	99.9	0.48	0.60	0.617	0.16356	
		rs3751397	-	99.9	0.45	0.53	0.478	0.39418	
		rs3936415	-	99.8	0.28	0.92	0.137	0.29840	
		rs677471	rs748253, rs679791, rs614820, rs612564, rs748252, rs600640	99.9	0.33	0.55	0.385	0.53352	
		rs7330109	rs9554330, rs9551471, rs7992940, rs718273, rs9551475	100	0.28	0.52	0.541	0.55427	
		rs7987649	-	96.3	0.32	1	0.967	0.48820	
		rs7995976 ³	-						
		rs8002446	rs9508033, rs9508034, rs722503, rs9319434, rs9513111	100	0.30	1	0.443	0.81292	
		rs9319425	-	99.8	0.41	1	0.783	0.82498	
		rs9508021	rs7337610	99.9	0.34	0.14	0.491	0.34714	
		rs9513070	-	99.9	0.41	0.46	0.443	0.65011	
		rs9513089	rs7339170, rs9513088, rs1853581, rs9508019	99.9	0.31	0.22	0.713	0.82857	

		rs9513112	rs2296285, rs9513113, rs9513116	100	0.30	0.17	0.705	0.67276
		rs9513114	-	99.8	0.28	0.66	0.735	0.45595
		rs9551462	-	99.8	0.30	0.75	0.324	0.09552
		rs9554320	-	99.9	0.43	0.72	0.077	0.00575
		rs9554322	rs2387632	100	0.32	0.69	0.333	0.53414
		rs9554325	-	99.8	0.43	0.59	0.408	0.26479
		rs9579177 ³	rs9579176, rs7993418, rs9554316, rs9554319, rs7982283, rs9513073, rs9513075					
		rs9582036	-	99.9	0.30	0.03	0.140	0.01882
<i>HES7</i> (1)	17p13.1	rs1442849	-	99.6	0.29	0.04	0.900	0.73510
		rs3027232	-	99.9	0.21	0.49	0.207	0.77593
		rs3027279 ⁴	rs8067165					
<i>HOXA1</i> (0.67)	7p15.3	rs12700785	-	99.9	0.20	0.79	0.930	0.98901
		rs3807592	-	99.8	0.43	0.04	0.849	0.67219
<i>HOXA2</i> (1)	7p15.2	rs2428431	-	95.3	0.33	0.84	0.267	0.75884
<i>HOXA3</i> (1)	7p15.2	rs11764513 ³	-					
		rs2428432	-	99.7	0.31	0.41	0.964	0.73586
		rs10085570	rs4722657, rs7811753, rs4722659, rs2107063	99.8	0.15	1	0.767	0.88380
<i>HOXA4</i> (0.75)	7p15.2	rs4719884	-	99.9	0.22	0.52	0.839	0.58638
		rs6973182 ³	rs11564055, rs2428433, rs2465276, rs7801565					
		rs1859166	-	99.5	0.24	0.81	0.203	0.22718
<i>HOXB1</i> (1)	17q21.3	rs11079828 ⁴	-					
		rs9905940	rs35621842, rs12939811, rs8073963, rs8079617, rs8074125, rs7207109, rs6504340, rs2229302	100	0.22	1	0.634	0.44719
<i>HOXB2</i> (1)	17q21.32	rs1042815	-	99.7	0.40	0.24	0.502	0.10642
<i>HOXB3</i> (1)	17q21.3	rs999493	-	100	0.37	0.06	0.500	0.67523
		rs890432	rs3826542	99.7	0.31	0.15	0.550	0.94628
		rs4793927 ²	-					
		rs7503053 ²	rs733920, rs6504389, rs11652148					
		rs2740760 ¹	-					
		rs2740757	rs2555110	99.8	0.16	0.12	0.361	0.49333
		rs2555111	-	99.9	0.48	0.01	0.228	0.83818
		rs2288277 ²	rs7406324					
<i>HOXB4</i> (1)	17q21.32	rs3809782 ²	-					
<i>HOXC4</i> (1)	12q13.3	rs10747689	rs894738, rs736825, rs894737, rs754133, rs4759318, rs10876528, rs10876529, rs10876530, rs2071449, rs12422600, rs765634	99.9	0.31	0.04	0.563	0.75435
		rs10876532	rs2171216	99.8	0.41	0.09	0.470	0.33363
		rs11170792	rs11608918	99.9	0.2	0.78	0.531	0.29813
		rs11615193 ⁴	-					
		rs2630772	-	99.6	0.27	0.73	0.817	0.77290
		rs4759317	rs11170786	99.6	0.41	0.05	0.469	0.86481
		rs7136731	rs10747691, rs10747692, rs1386016	100	0.39	0.14	0.816	0.97287
		rs7297416	rs4759062, rs7136889, rs7315688, rs6580970, rs10876531	99.9	0.26	0.03	0.616	0.65858

		rs746423	-	99.9	0.16	0.87	0.663	0.99276
<i>HOXD1</i> (1)	2q31.1	rs6433572	-	99.9	0.43	0.18	0.926	0.80795
<i>HOXD3</i> (1)	2q31.1	rs717852	rs2857540, rs711830, rs1318778, rs2072590	100	0.30	1	0.453	0.23507
		rs10834	-	99.5	0.32	0.47	0.203	0.10622
		rs7600360 ³	-					
		rs13028842	-	99.8	0.28	0.83	0.654	0.41450
		rs1374325	rs9141, rs34727427, rs7606110, rs2301301, rs13017511, rs6759499, rs13390932	100	0.34	0.63	0.785	0.92940
<i>HOXD4</i> (0.67)	2q31.1	rs4972504 ¹	-					
		rs4972505	rs4972806, rs1867863, rs2071581, rs1542180, rs4246626, rs1446575	98.2	0.36	0.77	0.605	0.33873
		rs6060262 ⁴	rs6060260, rs6060261, rs15817, rs6058189, rs6058197					
<i>ID1</i> (1)	20q11	rs35434759	-	99.8	0.12	0.66	0.271	0.33984
<i>ID2</i> (1)	2p25	rs4669330	-	99	0.25	0.34	0.240	0.58572
<i>KDR</i> (1)	4q11-q12	rs10020464	-	99.9	0.30	0.13	0.024	0.42635
		rs11732292	rs7655964, rs6848933, rs2168945, rs13109660, rs2305945, rs12507807, rs3828550	99.6	0.32	0.37	0.648	0.28622
		rs12502008	-	100	0.34	0.63	0.322	0.72294
		rs12642307	-	100	0.27	1	0.574	0.57636
		rs1531289	-	99.8	0.32	0.60	0.105	0.14734
		rs1531290	-	99.9	0.50	0.79	0.299	0.35548
		rs1551641	rs1551642	100	0.31	0.68	0.627	0.75421
		rs17709898	rs7671745	100	0.35	0.77	0.367	0.80718
		rs2034965	-	100	0.26	0.08	0.426	0.06085
		rs2071559	rs7667298	99.6	0.49	0.38	0.140	0.65601
		rs2239702 ⁴	-					
		rs6828477	rs7673274, rs7654599	99.6	0.44	0.15	0.281	0.34831
		rs6838752 ³	rs17085265, rs2219471, rs1870377, rs1870379, rs1870378, rs13136007, rs17085262					
		rs7692791	rs11133360	99.8	0.45	0.79	0.325	0.65374
<i>LFNG</i> (1)	7p22.2	rs11770785	-	94.9	0.34	0.01	0.554	0.30340
		rs13234810	-	96.4	0.38	0.13	0.807	0.88176
		rs1982157 ⁴	-					
		rs2895	-	100	0.10	0.21	0.023	0.07548
		rs4632959	-	99.6	0.49	0.01	0.942	0.40097
		rs755179	-	100	0.48	0.03	0.277	0.64238
<i>MESP2</i> (0.50)	15q26.1	rs12908026	rs12900413, rs11632886	99.5	0.26	0.82	0.654	0.58699
		rs6496601	rs6496602, rs12908343	99.9	0.30	0.60	0.905	0.86206
<i>Msgn1</i> (1)	2p24.2	rs11689375	-	99.5	0.44	0.29	0.012	0.00810
		rs6711333	rs4132753, rs4432452, rs4075922	99.9	0.50	0.06	0.068	0.04409
		rs6754626	-	100	0.46	0.54	0.292	0.12409
<i>NF1</i> (1)	17q11.2	rs11080149 ³	-					

		rs12943508	rs2952998, rs1123232, rs4239229, rs4263003, rs4559963, rs7503395, rs4541129, rs12948444, rs11870097, rs7220268, rs7212264, rs11868459, rs4795579, rs7214792, rs12949230, rs12942479, rs12942397, rs12603885, rs2905794, rs2952982, rs2952980, rs2952978, rs2905790, rs2905788, rs2269855, rs2952976, rs1124918, rs2953013, rs2953012, rs2953009, rs1801052, rs2953000, rs2952999, rs2905878, rs2952989, rs2905869, rs2905804, rs2905803, rs2905870, rs2905801, rs2905872, rs2952991, rs1013946, rs2905800, rs2285812, rs2341348, rs1034705, rs2952993, rs2952995, rs2905875, rs2905877, rs2905880, rs984125, rs2012988, rs2905795, rs2905881, rs2285892, rs8067021, rs2072131, rs2066736, rs2018634, rs2018624, rs2012581, rs9894862, rs9913470, rs9898664, rs9896041, rs7216033, rs7220483, rs9303642, rs11080146, rs4795587, rs9906488, rs7406870, rs757384, rs10512433, rs8080679, rs12945157, rs12940303, rs11080148, rs4795591, rs4795593, rs9892839, rs9902427, rs9902893, rs2040791, rs11080150, rs3087591, rs12940802, rs7226006, rs6505234, rs2057769, rs2107360, rs2854322, rs2051507, rs7406983, rs1800845, rs7210604	99.6	0.25	0.82	0.515	0.13149
		rs2905873	rs7215555	99.9	0.28	0.74	0.628	0.80062
		rs2905874	rs1013948, rs2952975, rs2905808, rs3815156	100	0.14	0.14	0.898	
		rs2953014	-	100	0.22	0.90	0.907	
		rs2953016	-	98.8	0.20		0.348	0.04996
		rs3815154	rs7505, rs1129506, rs3785956, rs2525563, rs2854306, rs35109242, rs2854307, rs2525564, rs9894648, rs2285894, rs7503922, rs2854308, rs2525565, rs2189525, rs2854311, rs2525568, rs2525569, rs964288, rs7350943, rs7502834, rs7406783, rs10438801, rs2854319, rs2854320, rs2107359, rs1048317, rs8067440, rs2040792, rs2214538, rs10512434, rs7218930, rs2342319, rs12943365, rs2525570, rs2525574	99.9	0.38	0.51	0.493	0.25235
<i>NKD1</i> (0.86)	16q12.1	rs12596811	-	99.8	0.22	0.13	0.285	0.54268
		rs4785220	-	100	0.35	0.70	0.373	0.36972
		rs7204135	rs4785438, rs7203943	100	0.47	0.04	0.113	0.44195
		rs8047222	rs8046845, rs7206907, rs1558663, rs11640716, rs7198686, rs12913, rs745230	100	0.38	0.41	0.164	0.15879
		rs933566	-	100	0.47	0.38	0.064	0.35890
		rs9673419	-	99.9	0.30	0.19	0.052	0.06422
<i>NKD2</i> (1)	5p15.3	rs10040568	rs881334, rs4975577, rs6876150	99.5	0.42	0.65	0.168	0.13449

		rs12517757	rs4975576	99.9	0.48	0.93	0.012	0.02614
		rs16870629	-	100	0.46	0.72	0.841	0.96584
		rs4975528 ⁴	-					
<i>NOG</i> (0.75)	17q22	rs1442828	-	99.7	0.30	0.37	0.022	0.13493
		rs16957413	-	100	0.12	0.24	0.053	0.74653
		rs9915822	-	100	0.49	0.73	0.483	0.91409
<i>NOTCH1</i> (0.86)	9q34.3	rs10870079 ⁴	-					
		rs11145760	-	99.3	0.42	0.86	0.647	0.92578
		rs11145770	-	100	0.34	0.10	0.736	0.46303
		rs13290979	-	99.6	0.34	0.33	0.545	0.19021
		rs2229971	-	99.6	0.27	0.59	0.263	0.24443
		rs2229974 ⁴	-					
		rs3013304	rs3013302, rs3013300	99.1	0.29	0.83	0.546	0.66832
		rs3013309	-	99.8	0.29	0.46	0.897	0.03351
		rs3124596 ⁴	rs3124594					
		rs3124603	rs3125009, rs3124607	99.3	0.32	0.07	0.382	0.20360
		rs3124999	rs10521	98.9	0.34	0.62	0.901	0.99079
		rs3125002 ⁴	-					
		rs3812604	-	99.8	0.41	0.86	0.691	0.83829
		rs3812605	rs3812603	97.7	0.46	0.86	0.975	0.79962
		rs4489420 ⁴	-					
		rs6563	-	99.7	0.45	0.18	0.334	0.37152
		rs710411	-	99.8	0.37	0.85	0.749	0.59390
		rs9314867	-	100	0.45	0.72	0.272	0.04188
		rs9411255	-	100	0.28	0.30	0.080	0.04052
<i>PRRX1</i> (1)	1q24	rs10489232 ³	-					
		rs10919449	-	99.9	0.41	0.41	0.444	0.61853
		rs12566345	rs12744534, rs2421490, rs2213751	100	0.11	0.83	0.589	0.38478
		rs17551172	rs17551016, rs736022, rs4656222, rs2421491, rs12409048, rs1016819, rs17550940, rs4656796, rs17551291, rs17551298, rs3820416	100	0.29	0.40	0.877	0.62052
		rs4656220	rs4656794	99.9	0.35	0.12	0.976	0.82686
		rs4656797	rs489090, rs2187895, rs6701640	100	0.20	1	0.531	0.49467
		rs4656799	-	100	0.38	0.05	0.535	0.43676
		rs502612	-	100	0.46	0.03	0.291	0.28488
		rs531650	rs1476040	99.1	0.29	0.83	0.577	0.56812
		rs541618 ⁴	rs513287, rs10800531					
		rs591715	-	99.9	0.22	0.45	0.873	0.59205
		rs593479 ¹	-					
		rs600093	rs520525	100	0.29	0.67	0.583	0.54736
		rs659580	-	99	0.23	0.70	0.230	0.17715
		rs662871	rs7520192, rs520131	100	0.39	0.58	0.642	0.47434
		rs7540713	-	99.6	0.30	0.40	0.841	0.33940
<i>RARA</i> (1)	17q21	rs2715553	-	100	0.44	0.86	0.790	0.88317
		rs2715554	-	99.7	0.13	0.56	0.971	0.95429

		rs482284	-	98.4	0.31	0.32	0.023	0.11733
		rs9303286	rs7217852, rs9904270, rs12946680, rs9303285	99.1	0.11	0.66	0.738	0.68453
<i>RARG</i> (0.75)	12q13	rs1554753	-	100	0.20	1	0.007	0.24999
		rs3741434	-	98.5	0.13	0.70	0.799	0.64854
		rs6580936	-	100	0.15	1	0.008	0.01752
<i>RBP1</i> (1)	3q23	rs12485273	rs2071387	99.9	0.14	0.38	0.265	0.24278
		rs184157	rs184156	100	0.26	0.91	0.875	0.57743
		rs186105	-	99.8	0.41	0.21	0.228	0.49727
		rs190910	rs10935331, rs893704, rs176990	98.7	0.42	0.01	0.520	0.60140
		rs2071388	rs176987, rs188420, rs188421, rs295484, rs167187	98.8	0.40	0.12	0.918	0.98941
		rs211585	rs295486, rs188422, rs295488	99.7	0.49	0.11	0.752	0.71110
		rs295490	rs397940	100	0.15	1	0.478	0.74983
		rs295492 ⁴	rs190909, rs295493					
		rs747346	rs9834607, rs9835241, rs13086868	100	0.22	0.16	0.901	0.55793
		rs893703 ³	rs4683502, rs3772868, rs3821543, rs4407373, rs1511570, rs12493507					
		rs9821204	-	99.2	0.23	0.28	0.589	0.56187
<i>RBP4</i> (1)	10q23-q24	rs10882273	rs10882272	99.3	0.40	0.58	0.745	0.87945
		rs11187537	rs11187536	99.5	0.28	0.28	0.711	0.57526
		rs17108978	-	99.2	0.32	0.84	0.244	0.83092
		rs34571439	rs12766992, rs17108973, rs13376835, rs17108991, rs17484721	98.5	0.22	1	0.478	0.81908
		rs7079946	-	98.7	0.27	0.57	0.787	0.66965
		rs7094671	-	99.8	0.29	0.91	0.301	0.91472
<i>RBPJ1</i> (1)	4p15.2	rs946346 ³	-					
		rs13109703	rs13114911, rs13133397, rs2725303, rs2725304, rs11722744, rs2725309, rs13128014, rs2725305, rs13119840, rs4289434, rs4692532, rs11727747, rs4536914, rs7655165, rs2725325, rs13115260, rs3109843, rs3109842, rs11726853, rs3109839, rs7349722, rs13147671, rs3113016, rs3109849, rs12639629, rs2788864, rs2270225, rs10939110, rs10939111	99.3	0.45	0.86	0.121	0.43649
		rs17639483	rs1877207, rs13109842, rs13128399, rs13135696, rs3762930, rs2063446	98.8	0.46	0.72	0.239	0.40327
		rs3109836	-	100	0.17	0.30	0.015	0.15916
		rs3796802 ⁴	-					
		rs6816542	-	99.8	0.12	0.28	0.431	0.38265
		rs6821126	rs4330343	100	0.19	1	0.935	0.89911
		rs6853254	rs2153155, rs3109828, rs3109841	99.9	0.36	0.28	0.065	0.23727
<i>RDH10</i> (1)	8q21.11	rs10110749 ⁴	-					
		rs11776584	rs7827088, rs11774608, rs4374985, rs17287095, rs17214921, rs11779182, rs17287304	99.9	0.24	0.72	0.790	0.51517
		rs11779605	rs10957652, rs6989495, rs3793373	99.8	0.32	0.13	0.881	0.52753
		rs16938610	rs4737370	100	0.22	0.15	0.022	0.00903

		rs2070764	-	99.9	0.31	0.55	0.034	0.02789
		rs4394387	rs4237000	99.3	0.25	0.54	0.169	0.11285
		rs6472765	rs4237001, rs7840840, rs10957653, rs4738319, rs4738320	99.5	0.26	0.48	0.230	0.09481
		rs7837090	rs7819550, rs9886504	99.8	0.20	0.25	0.384	0.95478
		rs7843902	-	99.2	0.46	0.79	0.126	0.21713
<i>RXRA</i> (1)	9q34.3	rs11103473	-	99.9	0.39	0.85	0.899	0.76198
		rs1805352	rs3132296, rs3118529, rs1887309	99.3	0.30	0.29	0.225	0.71384
		rs3118571	rs877954, rs1805343, rs4842194	99.7	0.36	0.33	0.097	0.34123
		rs4240705	-	100	0.37	0.51	0.304	0.28401
		rs4842196	-	99.9	0.26	0.91	0.297	0.55818
		rs875444	-	99.9	0.44	0.53	0.965	0.67358
<i>SHH</i> (1)	7q36	rs1233556	-	99.9	0.15	0.40	0.578	0.44141
		rs1233560 ⁴	-					
		rs1233571	-	99.6	0.15	0.28	0.336	0.39889
		rs2239966	-	93.8	0.39	0.71	0.289	0.23116
		rs288746	-	100	0.13	0.45	0.726	0.36522
		rs872723	-	100	0.25	0.21	0.253	0.22327
<i>SNAI1</i> (1)	20q13.2	rs1543442	-	98.3	0.41	0.85	0.790	0.80534
		rs16995010	rs6095728, rs6020166, rs4647958, rs4647957, rs16995009, rs4647959, rs6091078, rs6020177, rs6020179	98.5	0.14	0.71	0.339	0.91906
		rs6020170	rs6091080, rs6020178, rs6012791	99.9	0.21	1	0.764	0.38425
		rs6125849 ⁴	-					
<i>SNAI2</i> (1)	8q11	rs11781122	rs6982389	99.9	0.38	0.23	0.778	0.70602
		rs1992375	-	99.8	0.50	0.86	0.418	0.37442
		rs2735455 ³	-					
<i>STAT3</i> (1)	17q21.31	rs1053004	-	99.8	0.39	1	0.803	0.57457
		rs12601982	rs2293155, rs8078731, rs2293154, rs3198502, rs1053023, rs1053005, rs3744483, rs8074524, rs3809758, rs9909659	100	0.16	1	0.079	0.04114
		rs12949918 ¹	rs17885629, rs744166, rs12942547					
		rs17593222 ³	-					
		rs2293152 ⁴	-					
		rs6503695	-	99.5	0.3	0.59	0.129	0.06506
		rs7217655	rs3816769, rs957970, rs1026916, rs4796791, rs7219739, rs9891119, rs7211777	100	0.35	0.77	0.181	0.06357
		rs8069645	rs6503696, rs6503697, rs4103200, rs9912773, rs3785898, rs4796793	100	0.26	0.64	0.169	0.07175
<i>STR46</i> (1)	15q24.1	rs10910	rs1052622	99.8	0.26	0.43	0.412	0.58514
		rs11633768	-	100	0.28	0.19	0.451	0.70832
		rs11855667	-	99.7	0.18	0.76	0.669	0.35794
		rs12915891	rs3888004, rs13259, rs3848161, rs2899824, rs11630317, rs11631944, rs12912578, rs409856, rs12899173, rs971757, rs971756, rs971755, rs11857410, rs733163, rs12912258, rs11639369,	99.9	0.15	1	0.602	0.35978

rs11630924

		rs351219	-	100	0.37	0.13	0.504	0.64228
		rs351222 ¹	-					
		rs351224	rs351223	100	0.48	0.48	0.872	0.90397
		rs351238	rs351237	99.1	0.34	1	0.875	0.60930
		rs974456	-	100	0.20	0.79	0.809	0.94518
T (1)	6q27	rs1056053 ¹	rs1134481					
		rs12208710	rs13191186, rs3127328, rs12207298, rs2277094, rs3816304, rs12154075, rs12200529, rs2028792, rs2028791	100	0.11	0.68	0.160	0.40843
		rs1867592	-	99.9	0.10	0.82	0.201	0.35923
		rs1867594	rs10946129, rs12207747, rs12207966, rs16898752, rs12215543, rs10946130	99.9	0.28	0.75	0.646	0.43997
		rs3099266	rs2197450	99.8	0.41	0.58	0.260	0.86018
		rs3099282	rs6928216, rs11962977, rs1122751	99.8	0.22	0.17	0.294	0.68028
		rs3127334	rs1056051, rs3127329, rs3127331, rs3099268, rs3127332, rs3099270, rs3127345	99.9	0.28	0.91	0.075	0.73747
		rs3127344	rs2305089	100	0.48	0.79	0.209	0.73159
		rs6917533	rs9356431, rs6914547, rs9356430, rs3127337	100	0.43	0.79	0.228	0.36232
		rs7773665	-	100	0.38	0.78	0.953	0.63724
		rs9356434	-	99.9	0.30	0.92	0.571	0.54778
		rs9459589	rs9295321, rs9295322	100	0.33	0.92	0.076	0.42514
		rs9459593 ¹	rs6927011, rs6931915, rs9295323					
TBX6 (1)	16p11.2	rs11644459	rs8060511	98.2	0.44	0.65	0.685	0.49640
		rs11861842 ³	rs11863129					
		rs2278557	rs28592059	99.9	0.34	0.29	0.503	0.61958
		rs2289292 ¹	-					
		rs3809624	-	99.9	0.33	0.76	0.735	0.73654
VEGFA (1)	6p12	rs10434	-	97.5	0.46	0.21	0.083	0.22286
		rs2146323	rs3025010	100	0.33	0.28	0.912	0.99429
		rs25648	-	99.1	0.16	0.63	0.649	0.91608
		rs3025000	rs833060, rs833068, rs833069, rs3024997	99.1	0.27	0.19	0.271	0.44600
		rs3025030	rs3025033	100	0.12	1	0.453	0.84163
		rs3025040	-	100	0.13	1	0.773	0.68231
		rs6899540	-	99.7	0.16	0.53	0.327	0.23270
		rs6900017 ³	-					
		rs833070	rs833061, rs699947	100	0.48	0.66	0.805	0.33946
		rs998584	-	99.8	0.47	0.38	0.111	0.04011
WNT3A (1)	1q42	rs10916258	-	99.8	0.21	1	0.680	0.96261
		rs13374948 ³	rs6672559, rs6672422, rs7539664, rs1034792, rs10916262, rs11589513, rs11584499, rs882451, rs4653533					

rs1636195	rs697763, rs708118, rs708121, rs3094911, rs708109, rs1745413, rs708123, rs708124, rs708108, rs697761, rs697762, rs708113	99.8	0.34	0.92	0.978	0.77371
rs1745423 ⁴	-					
rs3094912	rs708112, rs964941, rs708114, rs3094914, rs3094913, rs708111, rs947631	100	0.44	0.59	0.430	0.78434
rs3121309 ⁴	-					
rs708122	-	100	0.35	0.77	0.227	0.66144
rs766972	rs3121310, rs752107	98.9	0.31	1	0.722	0.83730

Abbreviations: MAF, Minor Allele Frequency

SNPⁿ: Excluded for the following reasons: ¹TagSNP in Linkage Disequilibrium with another one across the gene in our sample of 350 controls; ²Not in Hardy-Weinberg equilibrium in the control sample ($p < 0.01$); ³ Monomorphic or $MAF < 0.10$; ⁴Genotyping Failure; ⁵Not passing through the SNPlex design pipeline

SNP[&]: Non-synonymous SNPs additionally included in the tagSNPs list.

^a Gene Coverage= tag SNPs analyzed/total of tag SNPs per gene

^b According to HAPMAP Data Rel 27 PhaseII+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126

^c MAF of cases and controls

^d HWE test performed in the control sample)

^e p-value calculated using the Cochran-Armitage Trend Test (ATT)

Analysis of the Polycomb gene *SUZ12* in patients with Chiari malformation type I or II

Aintzane Urbizu, Maria A Poca^{2,3}, Ester Cuenca-León, Ampar Cuixart⁴, Xavier Miró⁵, Alfons Macaya

¹From the Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Department of Neurosurgery and ³Neurosurgery and Neurotraumatology Research Unit (UNINN), ⁴Spina Bifida Unit, Rehabilitation Department, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany.

Les malformacions de Chiari (tipus I i II) són anomalies congènites caracteritzades per l'herniació caudal del contingut de la fossa cranial posterior a través del forat magne cap el canal espinal on, a més, en el tipus II, es produeixen alteracions en la medul·la espinal. L'etiologia és encara desconeguda, tot i que diversos estudis senyalen factors genètics com a possibles causants de les dues malformacions. En aquest estudi es va realitzar un cribratge mutacional del gen *SUZ12* en 30 pacients, ja que s'ha vist que l'haploinsuficiència d'aquest gen indueix, en hàmmsters, fenotips semblants a les malformacions de Chiari de tipus I i II.

De les 24 variants que es van identificar en la cohort de pacients, cap sembla ser la causant de les malformacions.

Els resultats d'aquest estudi, tot i que es van obtenir en una mostra limitada de pacients, no recolzen que el gen *SUZ12* sigui el responsable de les malformacions.

Manuscrit en preparació. S'enviarà a una revista internacional

Analysis of the Polycomb gene *SUZ12* in patients with Chiari malformation type I or II

Aintzane Urbizu, Maria A Poca^{2,3}, Ester Cuenca-León, Ampar Cuixart⁴, Xavier Miró⁵, Alfons Macaya

¹From the Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Department of Neurosurgery and ³Neurosurgery and Neurotraumatology Research Unit (UNINN), ⁴Spina Bifida Unit, Rehabilitation Department, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany.

Correspondence:

Dr. Alfons Macaya
Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica
Vall d'Hebron Institut de Recerca
Pg Vall d'Hebron 119-129
08035, Barcelona, Spain

Tel +34 934893890

Fax +34 932746837

Email: amacaya@vhebron.net

Abstract

The Chiari malformations (type I and type II) are defined as a congenital hindbrain and spinal cord abnormalities defined by caudal herniation of the posterior fossa contents through the foramen magnum. The etiology remains unclear although several studies have indicated that genetic factors are at play in both types of malformation. In this study we performed a mutational screen of the *SUZ12* gene, which in haploinsufficiency induces a Chiari-like phenotype in mice, in 30 patients with Chiari malformations type I or type II.

Among the 24 variants identified in this cohort, none appeared as disease-causing.

These data, although obtained in a small sample, do not favour *SUZ12* as a leading causative gene of the Chiari malformations.

Introduction

The Chiari malformations (type I and II) belong to a group of malformations described by the pathologist Hans Chiari (1851–1916) involving varying degrees of hindbrain herniation through the foramen magnum as a result of a hindbrain overcrowding into an underdeveloped posterior cranial fossa (PCF) [1]. Chiari malformation type I (CMI) is characterized by herniation of the cerebellar tonsils of at least 3 mm through the foramen magnum, as identified by midsagittal or coronal MRI [2], which may cause neurological dysfunction although the mildest within the clinical spectrum of the Chiari malformations. CMI prevalence is unknown, but was estimated at 1/1280 in a retrospective study using a conservative definition of cerebellar tonsillar herniation of ≥ 5 mm [3]. The most frequent symptoms are headache, ocular disturbances, Menière-like syndrome or other otoneurological signs, lower cranial nerve signs, including sleep apnea, tongue fasciculation, dysphagia or dysarthria and motor and sensory symptoms [4]. These are due to direct neural compression or cerebrospinal fluid disturbances that give rise to the frequently associated syringomyelia or hydrocephalus. Chiari malformation type II (CMII) is found in

virtually all patients with myelomeningocele and consists of a caudal descent of cerebellar vermis, fourth ventricle, and lower brain stem, and is seen almost always in conjunction with hydrocephalus. This is typically identified at or before birth and can be life threatening [5]. The prevalence of CMII with associated neural tube defects (NTD) ranges from 0.17 to 6.39 per 1,000 live births [6]. Signs and symptoms related to CMII vary markedly. Infants and children younger than 2 years present most frequently with severe para or quadriparesis, hypotonia, and lower cranial nerve dysfunction. When the patients survive the first two years, then the most common finding is cervical myelopathy with upper-extremity weakness and spasticity. Changes in handwriting skills, dexterity, and self-care may be the first outwardly noticeable signs. Ataxia, of both the upper extremities and trunk, is also common and occipital headache and/or craniocervical pain, similar to that experienced in the CMI, can be present in the absence of more serious neurological symptoms [7].

The etiology of NTDs is complex, with both environmental and genetic contribution [8]: A strong genetic component is indicated by the high recurrence risk for siblings of affected individuals. Syndromic cases of NTD also exist, often associated with chromosomal anomalies, but these represent 10% of all defects. The majority of NTDs are sporadic, with recurrence fitting a multifactorial polygenic or oligogenic pattern, rather than a monogenic one (reviewed in [9]).

The etiology in CMI is unknown but however, familial aggregation, high concordance in monozygotic twins and the fact that many known Mendelian syndromes are associated with CMI (reviewed in [10]) suggest a genetic basis. But despite growing evidence of genetic influences, the underlying culprit genes have not been fully elucidated [10].

In 2009 Miro and colleagues suggested the Polycomb gene *suz12* as a possible causative of CMI and CMII when they observed diverse malformations of the brain and neural tube in mice with *suz12* haploinsufficiency. The phenotype included cerebellar herniation into the foramen magnum with a crowded PCF, enlarged brainstem, occipital cortical alterations, scoliosis and downward displacement of the cerebellum producing hydrocephalus, reminiscent of the

pathological features of CMI and CMII. The most severely affected animals showed varying degrees of spina bifida with paraplegia [11].

Since the Polycomb group (PcG) proteins, including *SUZ12*, are known to regulate the Hox genes, which control the orderly differentiation of vertebrae [12] and play an important role in the process of neural tube closure [13], we considered *SUZ12* as a plausible candidate for human Chiari malformations.

In addition, *SUZ12* is comprised in the large genomic deletion that produces 5-20% of cases of neurofibromatosis type 1 (NF1) [14]. Of note, NF1 is often associated with CMI [15, 16].

In this study we tested the hypothesis of whether mutations in *SUZ12* may contribute to the pathogenesis of CMI or CMII.

Material and Methods

A total of 30 unrelated patients were included in this study: 11 CMI patients and 19 CMII patients which were diagnosed and treated at the Division of Neurosurgery and Spine Bifida Unity, respectively, of the Vall d'Hebron University Hospital in Barcelona.

All of the CMI patients had undergone a surgical decompression via suboccipital craniectomy. Three of them suffered from NF1. After obtaining written informed consent, genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes of the patients and their relatives following standard procedures [17]. The 16 exons of the *SUZ12* gene and their corresponding exon/intron junctions including splice sites and branch points were PCR-amplified and sequenced (see Supplementary Table 1 for primer design and PCR conditions). Purified PCR products were sequenced using the Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1 and the automated sequencer ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results

Design avoided amplification of the *SUZ12* pseudogenes (*SUZ12P1* and

SUZ12P2) (NC_000017.10 and NC_000014.8, respectively). The amplification and sequencing of the 16 exons and exon-intron junctions of the *SUZ12* gene (NM_015355.2) in 11 CMI and 19 in CMII patients identified 24 variants: two changes were found in the 5'UTR region and other two missense variants were located in exon 1, all four previously reported in several genomic databases. Five of these 24 variants were previously undescribed but they are located in intronic regions of the gene in CMI and CMII cases (Table1).

Discussion

After sequencing the 16 exons and intron junctions of the *SUZ12* gene in 30 Chiari patients (type I and type II), we did not find any candidate variant or mutation susceptible to produce a structural or functional impact on the protein.

Although several genetic approaches have been followed to study the human NTDs (positional cloning strategies, genome wide linkage studies, direct mutation screening of candidate genes, association studies of common polymorphic variants, particularly related to folate one-carbon metabolism) no causative gene has been yet identified (reviewed in [9]).

Marin-Padilla proposed that an early paraxial mesodermal insufficiency could be the original anomaly underlying these different Chiari malformations. In his studies he observed that at any time during the segmental formation of the embryonic skeletal-neural axis, a simple reduction in the number of paraxial mesodermal cells could impair the formation of the axial skeleton as well as the elevation of the neural folds thus interfering with their closure. He concluded that the final type of malformation was determined by variations of the degree, time of occurrence, and duration of the paraxial mesodermal insufficiency [18, 19]. In fact, a number of morphometric studies [4, 20-22] have provided evidence of occipital bone hypoplasia in CMI, lending support to the theory of paraaxial mesoderm insufficiency, as originally introduced by Marin-Padilla [18] but no candidate gene has been reported.

The phenotype described by Miro et al. in mice with *Suz12* haploinsufficiency overlaps with the clinical manifestations of the CM spectrum and certainly rendered the human *SUZ12* gene a very interesting candidate gene for both CMI and CMII [11].

Lee and colleagues demonstrated that SUZ12, a subunit of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), occupied regions of more than 200 genes (these included 39 of 40 of the homeotic genes found in the HOX clusters and the majority of homeodomain genes) that control development and transcription [23]. This is interesting because it is known that the first four hox genes regulate the first four somites development that form the occipital bone and Hox9 gene regulates part of the thoracic and lumbar region [24], so SUZ12 could be controlling the expression of all these genes. In fact, Lee showed that SUZ12 binds to the HOXD9 promoter region in human embryonic stem cells [23], which controls the development of lumbar L3-L4 vertebrae [25].

Although our analysis did not find an obvious pathogenic variant, we can not rule out the possibility of an abnormal regulation of *SUZ12* transcription or translation processes. According to the ENCODE Project Consortium, biochemical functions are assigned to 80% of the genome, i.e. a large portion of the non protein-coding regions [26]. Thus, any of the five undescribed variants we have found, all located in intronic regions of the gene, might still determine changes in *SUZ12* expression. Alternatively, although we have explored *SUZ12* assuming a monogenic, Mendelian pattern, a more parsimonious approach should not exclude the possibility that human Chiari Malformations may in fact be complex diseases. If so, variants in several genes could predispose to the phenotype.

Three of our 11 samples were from CMI patients affected with NF1. NF1 is an autosomal dominant disorder that affects 1/3,500 individuals and characterised particularly by café-au-lait spots and fibromatous tumors on the skin and it is caused by defects in the *NF1* gene. Deletions of part of the *NF1* gene as well as deletions and duplications of the complete *NF1* gene have been described [14]. Relatively common (5-20% of NF1 cases) is a deletion of a 1,500 kb

chromosomal region that involves the *NF1* gene and contiguous genes lying in its flanking regions (such as *SUZ12*), which is caused by unequal homologous recombination of *NF1* repeats (REPs). Samples from the three *NF1* patients that were screened here had been previously studied using the Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) technique and deletions in *NF1* were ruled out. We here showed that no alteration in the *SUZ12* sequence was present in any of these *NF1* cases.

Conclusions

While our findings militate against a role of *SUZ12* as a primary disease-causing gene of CMI and CMII, the reduced size of the sample precludes any definitive conclusion. Furthermore, the relevance of rare (functional) *SUZ12* variants under an oligogenic or even polygenic model is perfectly possible and it is not unusual for a gene with a major effect in some severe phenotypes (i.e. the one displayed by the haploinsufficient mouse) to exert less severe phenotypic influences in milder clinical forms (such as CMI) of complex disorders. It is also possible that epigenetic influences may silence *SUZ12* expression at the critical stage of neurulation. Therefore, further studies, better powered and considering different inheritance patterns and gene effects are warranted in order to rule out the *SUZ12* hypothesis in the Chiari malformation spectrum.

Acknowledgements

This work was supported by grants of Instituto de Salud Carlos III, Spain, grant PI061606, Fundació La Marató TV3, Spain, grant 062710 and Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Spain, grant 2009SGR-0078. A.U. is the recipient of a scholarship from AGAUR (Spain).

Bibliography

1. Cai, C. and W.J. Oakes, *Hindbrain herniation syndromes: the Chiari malformations (I and II)*. Semin Pediatr Neurol, 1997. **4**(3): p. 179-91.
2. Barkovich, A.J., et al., *Significance of cerebellar tonsillar position on MR*. AJNR Am J Neuroradiol, 1986. **7**(5): p. 795-9.
3. Meadows, J., et al., *Asymptomatic Chiari Type I malformations identified on magnetic resonance imaging*. J Neurosurg, 2000. **92**(6): p. 920-6.
4. Milhorat, T.H., et al., *Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients*. Neurosurgery, 1999. **44**(5): p. 1005-17.
5. Van den Hof, M.C., et al., *Evaluation of the lemon and banana signs in one hundred thirty fetuses with open spina bifida*. American journal of obstetrics and gynecology, 1990. **162**(2): p. 322-7.
6. Bowman, R.M., V. Boshnjaku, and D.G. McLone, *The changing incidence of myelomeningocele and its impact on pediatric neurosurgery: a review from the Children's Memorial Hospital*. Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery, 2009. **25**(7): p. 801-6.
7. Stevenson, K.L., *Chiari Type II malformation: past, present, and future*. Neurosurgical focus, 2004. **16**(2): p. E5.
8. Eskes, T.K., *From birth to conception. Open or closed*. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, 1998. **78**(2): p. 169-77.
9. Greene, N.D., P. Stanier, and A.J. Copp, *Genetics of human neural tube defects*. Human molecular genetics, 2009. **18**(R2): p. R113-29.
10. Schanker, B.D., et al., *Familial Chiari malformation: case series*. Neurosurg Focus, 2011. **31**(3): p. E1.
11. Miro, X., et al., *Haploinsufficiency of the murine polycomb gene Suz12 results in diverse malformations of the brain and neural tube*. Dis Model Mech, 2009. **2**(7-8): p. 412-8.
12. Kessel, M. and P. Gruss, *Murine developmental control genes*. Science, 1990. **249**(4967): p. 374-9.
13. Song, P.P., et al., *Embryonic ectoderm development protein is regulated by microRNAs in human neural tube defects*. American journal of obstetrics and gynecology, 2011. **204**(6): p. 544 e9-17.
14. Venturin, M., et al., *Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2*. Journal of medical genetics, 2004. **41**(1): p. 35-41.
15. Santos-Garcia, D., et al., *[Type 1 neurofibromatosis and Arnold-Chiari malformation]*. Actas dermo-sifiliograficas, 2009. **100**(9): p. 820-2.
16. Tubbs, R.S., et al., *Chiari I malformation and neurofibromatosis type 1*. Pediatric neurology, 2004. **30**(4): p. 278-80.
17. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
18. Marin-Padilla, M. and T.M. Marin-Padilla, *Morphogenesis of experimentally induced Arnold--Chiari malformation*. J Neurol Sci, 1981. **50**(1): p. 29-55.
19. Marin-Padilla, M., *Cephalic axial skeletal-neural dysraphic disorders: embryology and pathology*. Can J Neurol Sci, 1991. **18**(2): p. 153-69.

20. Nishikawa, M., et al., *Pathogenesis of Chiari malformation: a morphometric study of the posterior cranial fossa*. J Neurosurg, 1997. **86**(1): p. 40-7.
21. Noudel, R., et al., *Incidence of basioccipital hypoplasia in Chiari malformation type I: comparative morphometric study of the posterior cranial fossa. Clinical article*. J Neurosurg, 2009. **111**(5): p. 1046-52.
22. Milhorat, T.H., et al., *Mechanisms of cerebellar tonsil herniation in patients with Chiari malformations as guide to clinical management*. Acta Neurochir (Wien), 2010. **152**(7): p. 1117-27.
23. Lee, T.I., et al., *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 301-13.
24. Alexander, T., C. Nolte, and R. Krumlauf, *Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 431-56.
25. Burke, A.C., et al., *Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology*. Development, 1995. **121**(2): p. 333-46.
26. Consortium, T.E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 57-74.

Tables

Table 1. Variants found in the mutation screening of the *SUZ12* gene in 30 patients with Chiari malformations.

Gene region		Nucleotide numbering Genomic Reference Sequence (NG_009237.1)	Nucleotide numbering Coding DNA Reference Sequence (NM_015355.2)	Nucleotide Numbering Protein Reference Sequence (NP_056170.2)	Described	Location (strand)	MAF
E1	5' UTR	g.5010C>T	c.-213C>T	-	rs190366663, SNP (C/T)	17:30264053 (+)	<0.01 (T)
		g.5143G>A	c.-80G>A	-	rs182208921, SNP (G/A)	17:30264186 (+)	0.01 (A)
	Coding region	g.5418G>A	c.196G>A	p.Ala66Thr	rs199728576, SNP (G/A)	17:30264461 (+)	-
		g.5433G>A	c.211G>A	p.Val71Met	rs149833913, SNP (G/A)	17:30264476 (+)	0.01(A)
I1		g.5504T>C	c.274+8 T>C	-	rs201453847, SNP (C/T)	17:30264547 (+)	0.01 (C)
I3		g.8537_8538insA	c.386+75_386+76insA	-	rs72129328, insertion (-/A)	17:30267581-30267580 (+)	-
I4		g.34107_34108insT	c.456-16_456-15insT	-	rs55829156, insertion (-/T)	17:30293151-30293150 (+)	-
I5		g.40987_40988insA	c.506-135_506-134insA	-	Not described, insertion (-/A)	17:30.300.030 (+)	-
I6		g.41296T>G	c.591+89T>G	-	Not described, (T/G)	17:30300339 (+)	-
		g.41349T>G	c.591+142T>G	-	rs184025395, SNP (G/T)	17:30300392 (+)	0.01 (G)
		g.43368G>A	c.592-90G>A	-	rs548957, SNP (G/A)	17:30302411 (+)	0.08 (A)
I7		g.43694_43695insT	c.823+5_823+6insT	-	rs11396265, insertion (-/T)	17:30302738-30302737 (+)	-
		g.44438_44442delATATC	c.824-59_824-55delATATC	-	rs147986570, deletion (ATATC/-)	17:30303481-30303485 (+)	0.08 (-)
I9		g.51269_51270insT	c.1023+189_1023+190insT	-	rs34878231, insertion (-/T)	17:30310313-30310312 (+)	-
I10		g.56244A>G	c.1024-52A>G	-	rs530209, SNP (A/G)	17:30315287 (+)	0.08 (G)
		g.56574_56575insTT	c.1201+101_1201+102insTT	-	rs57744180, insertion (-/TT)	17:30315618-30315617 (+)	-
I11		g.61818_61819insT	c.1294-23_1294-22insT	-	rs55811201, insertion (-/T)	17:30320862-30320861 (+)	-
I12		g.62089delA	c.1437+105delA	-	rs55701061, deletion (A/-)	17:30321132 (+)	0.08 (-)
		g.62524_62525insG	c.1438-16_1438-15insG	-	rs111242694, insertion (-/G)	17:30321568-30321567 (+)	-
I13		g.62719G>C	c.1595+22G>C	-	rs473356, SNP (G/C)	17:30321762 (+)	0.08 (C)
		g.63423A>G	c.1596-117A>G	-	Not described (A/G)	17:33322466 (+)	
I14		g.63836_63837insA	c.1794+98_1794+99insA	-	rs200403353, insertion (-/A)	17:30322880-30322879 (+)	0.02 (A)
		g.63838_63839insT	c.1794+100_1794+101insT	-	Not described, insertion (-/T)	17:30322882-30322881 (+)	-
		g.64703_64704delCT	c.1795-71-1795-70delCT	-	Not described, deletion (CT/-)	17:30323746-30323747 (+)	-

I: intron, E: exon

Supplementary Table 1. Primers for PCR-amplification of *SUZ12* exons and flanking sequences..

Exon	Primer name	Primer sequence (5' -> 3')	Product length (bp)	Anneling temperature (°C) [#]
1	F1neu	Fw- CAACAAACTAAGGATCTAGACTCGCT	1116	66
	R1.1	Rv- GTGACTGCGGCTCAGTTCAACTGC		
2+3	F2neu	Fw- ATTTAGTGCGATATAAATAGTGCG	509	2Step 62-60
	R3	Rv- AACCACTGTGCAACCAATTCAACC		
4	F4neu	Fw- ATGGGGCTTGAAGGCTCGTGTGC	415	2Step 62-60
	R4	Rv- TTTCTGACTTGTGTGTGAGTTTGG		
5	F5	Fw- AACAGGGAAAGCATAGAGTCATGGG	418	2Step 62-60
	R5	Rv- ATTGCAACCAGCCTTCACTCTGC		
6	F6	Fw- TTGTGCCACTGCACTGTACCTTGG	740	2Step 62-60
	R6neu	Rv- CTCTCTCTTAGCCCTTACC		
7	F7neu	Fw- CAGATCACTGTTAGCTAAATATTAGG	643	2Step 62-60
	R7	Rv- CCTCCACCTCAACATTTTGTGTG		
8	F8	Fw- ATTAGCATTTGCAAAGATGTGGGG	519	2Step 62-60
	R8	Rv- AACTGAGCTATCTATCCG		
9	F9	Fw- CTTTCATCAGGACTGGAGTGTAGC	595	2Step 62-60
	R9neu	Rv- CACGCAGAATCACAGAATCACAGC		
10	F10	Fw- GTTTGCCTAGCCGTCTCAGTCAGC	495	63
	R10	Rv- GAAATCACGCTACTGCACTCCTGC		
11	F11	Fw- TTTCTGCGATCATCAGTTGAGGG	420	60
	R11	Rv- GTTGCAGTGAGCCAAGACTGCACC		
12	F12	Fw- TGGGATTAACAGGCGTGAGTGACC	455	Touchdown 69-61 (each cycle -0.5), 25x60
	R12	Rv- GTCATGCTATCTTGTACTTAATGC		
	RnewOk	Rv- AAGAAATCTCTTGTACCCCATAAATA		For sequencing
13	F13	Fw- AGGTCTTCTGACTGCCTGTTTACC	450	2Step 60-58
	R13	Rv- GTAGTTAACAACCCCATAGACACC		
14	F14	Fw- ACCCAGAAAGACAGTTTGTGTTTG	637	60
	R14	Rv- CTCGCAAAGTGCTAGGATTACAGG		
15	F15	Fw- GAGATCGTGCCACTGTACTTCAGC	593	64
	R15	Rv- GTGCAACAAGTTCTAAAGGCAAGG		
16	F16	Fw- TCAGTTTCTCTATAGTTTACTGC	660	2Step 60-58
	R16	Rv- TGCATAATGAAGTGAAGTAGAACCC		

[#] 2Step: Two-step protocol, see Supplementary table 2; Touchdown: See supplementary table 3

Supplementary Table 2. Two-step PCR procedure for some of the PCR reactions used in the *SUZ12* mutation screening.

Temperature [°C]	Time	Cycles
94	10'	1
94	40''	15
Temperature 1	40''	
72	1	
90	40''	20
Temperature 2	40''	
72	1	
72	10'	1

Supplementary Table 3. Touchdown PCR procedure for some of the PCR reactions used in the *SUZ12* mutation screening.

Temperature [°C]	Time	Cycles
95	3'	1
95	30''	10
From temperature 1 to temperature 2 -0.5°C each cycle	30''	
72	2'	
95	30''	25
Temperature 3	30''	
72	2'	
72	10'	1

Annex: Seqüenciació d'exomes en una família amb la malformació de Chiari tipus I

Motivació de l'estudi

Un dels individus inclosos en el cribratge mutacional del gen *SUZ12* pertany a una família amb 12 subjectes amb MCI, prèviament sotmesa a anàlisi de lligament genètica a escala genòmica. Aquesta anàlisi, realitzada per membres del grup l'any 2008 (veure apartat 2.2.1.1 de la Introducció), va revelar un *locus* lligat a la malaltia al cromosoma 17, d'unes 34 Mb, que conté més de 200 gens. Un d'aquests gens és *SUZ12*, que codifica un repressor transcripcional, un bon candidat funcional per a la patologia perquè ratolins *knock-out* pel gen (en heterozigosi) presenten malformacions similars a les observades en els pacients humans (Miro et al., 2009) (veure apartat 2.3 de la Introducció). L'anàlisi mutacional d'aquest gen no va oferir resultats positius i, tenint en compte la dificultat de seqüenciar un número tan elevat de gens candidats pel mètode de Sanger, es va decidir utilitzar la tecnologia NGS per seqüenciar l'exoma sencer en dos individus de la família. En aquest sentit, la seqüenciació de l'exoma ofereix actualment una relació cost/temps/resultats força bona, tot i que encara és necessari validar cadascuna de les variants candidates identificades mitjançant la seqüenciació pel mètode de Sanger.

Materials i mètodes

Pacients inclosos a l'estudi

Es va extreure ADN genòmic de 29 individus d'aquesta família (12 afectats amb MCI, 4 amb MC0 i 13 individus sans) utilitzant el mateix protocol que en l'estudi d'associacions (Article 3) i l'anàlisi mutacional del gen *SUZ12* (Article 4).

Per seqüenciar els exomes es va utilitzar l'ADN genòmic de dos individus amb una relació de parentesc de segon grau (cosins). La comprovació de les variants candidates es va realitzar pel mètode de Sanger a la resta d'individus de la família (Figura 21).

Captura de l'exoma, seqüenciació i identificació de les variants

La seqüenciació de l'exoma es va realitzar al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica

de Barcelona (CNAG) amb instruments HiSeq2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) i utilitzant protocols estàndard. L'assignació de bases es va fer amb el *software* SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) aplicant un filtre de cobertura mínima de 15X.

Anàlisi

Els resultats de la seqüenciació dels dos exomes es van analitzar conjuntament, considerant com a candidates només aquelles variants presents en heterozigosi (forma més probable de les variants que es transmeten en herència autosòmica dominant) en els dos individus afectats, i que no haguessin estat descrites prèviament. La detecció de noves variants es va confirmar per comparació amb les existents a les bases de dades dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp), 1000genomes (www.1000genomes.org) i la base de dades interna del CNAG. La predicció de l'efecte funcional de les variants es va realitzar utilitzant l'Ensembl SNP Effect Predictor (McLaren et al., 2010) en el context d'estructura de transcrit.

Avaluació de les variants candidates

A continuació es van seleccionar marcadors de tipus SNP genotipats en el marc del projecte de lligament previ a escala genòmica que cobrien cadascun dels 57 gens en què s'havien identificat variants genètiques rares, i es va repetir l'anàlisi de lligament. Per a cada gen es van seleccionar cinc marcadors distals i cinc marcadors proximals i es va realitzar una anàlisi multipuntual seguint un model paramètric amb herència dominant, penetració del 80 o 100%, taxa de fenocòpies del 0 o el 10% i prevalença de la malaltia de 0,008, mitjançant el programa GeneHunter implementat a la plataforma EasyLinkage Plus v 5.05 (Lindner and Hoffmann, 2005). Només un dels 57 gens identificats estaven situats a la zona en què s'havia detectat el lligament genètic, al cromosoma 17.

Posteriorment, només en aquells casos en què el valor màxim del LOD *score* multipuntual era superior a 1, es va determinar la presència o absència de la variant rara identificada a la resta de membres de la família utilitzant amplificació per PCR i seqüenciació Sanger. Les característiques dels encebadors dissenyats i les condicions experimentals en què es van utilitzar es mostren a les Taules 5 i 6, respectivament.

Taula 5. Característiques dels encebadors utilitzats en la validació de les variants genètiques candidates.

Gen	Exó	Encebador	Seqüència de l'encebador (5' -> 3')	Longitud encebador (pb)	Longitud producte (pb)	Temperatura d'anellament (°C)
GPR149	1	GPR149_F	tctaaaggagacatggctgacc	22	396	64.3
		GPR149_R	ATCATCCACAGACCAGGAAGC	21		65.3
OR10G8	1	OR10G8_F	CACCGAGTGTTTCCCTCTACACAG	23	411	64.8
		OR10G8_R	ATACAGTGGGAGGCACAGGTC	21		65.2
GP1BA	1	GP1BA_F	CAAGGTGTGGACGTCAAGG	19	394	64.4
		GP1BA_R	TGGATTTTGGAGTTTTGGAGA	21		63.3
DDX52	3	DDX52_F	GGTATGGCTTTCTTGCTACACA	22	500	62.9
		DDX52_Falt	TCAAATGATCCTCCCCACTC	20		63.9
		DDX52_R	CCAAATCCAGCGAATAAGTCA	21	358	63.7

Taula 6. Condicions experimentals de les reaccions de PCR utilitzades en la validació de variants candidates a causar MCI.

Temperatura [°C]	Temps	Cicles
95	5'	1
95	1'	14
64	30"	
72	1'	
95	1'	30
57	30"	
72	1'	
72	5'	1

Resultats

La cobertura mitjana de la seqüència dels exomes va ser de 140X. L'assignació de variants només es féu quan el valor de la cobertura superava 15X. Després de filtrar les més de 40.000 variants identificades en els dos exomes (no presència a les bases de dades dbSNP, 1000genomes i interna del CNAG; presència en heterozigosi als dos individus afectats), la xifra es va reduir a 57 canvis, situats en 57 gens diferents (cap d'ells a *SUZ12*). Només un dels gens estava situat dins la regió de lligament al chr 17 (variant número 45 al gen *DDX52*, Taula 7).

Per prioritzar les variants identificades de cara a la fase de validació per Sanger, es va fer anàlisi de lligament multipuntual utilitzant 10 marcadors de tipus SNP

per cadascun dels 57 gens, genotipats en 13 membres de la família en el cribratge genòmic previ a la seqüenciació dels exomes (Figura 21). Els LOD scores multipuntuals màxims resultants es mostren a la Taula 7. Només quatre regions van presentar LOD scores superiors a 1, i corresponen als següents gens: *GPR149* (cromosoma 3, LOD màxim = 1,1), *OR10G8* (cromosoma 11, LOD màxim = 1,0), *GP1BA* (cromosoma 17, LOD màxim = 1,5) i *DDX52* (cromosoma 17, LOD màxim = 1,8). A la Figura 21 es representen els haplotips obtinguts al voltant de la variant identificada en el gen *DDX52*, que presenta el LOD score més elevat. Aquestes variants corresponen a tres canvis no sinònims i a un canvi en un lloc canònic de *splicing*, respectivament (Taula 7).

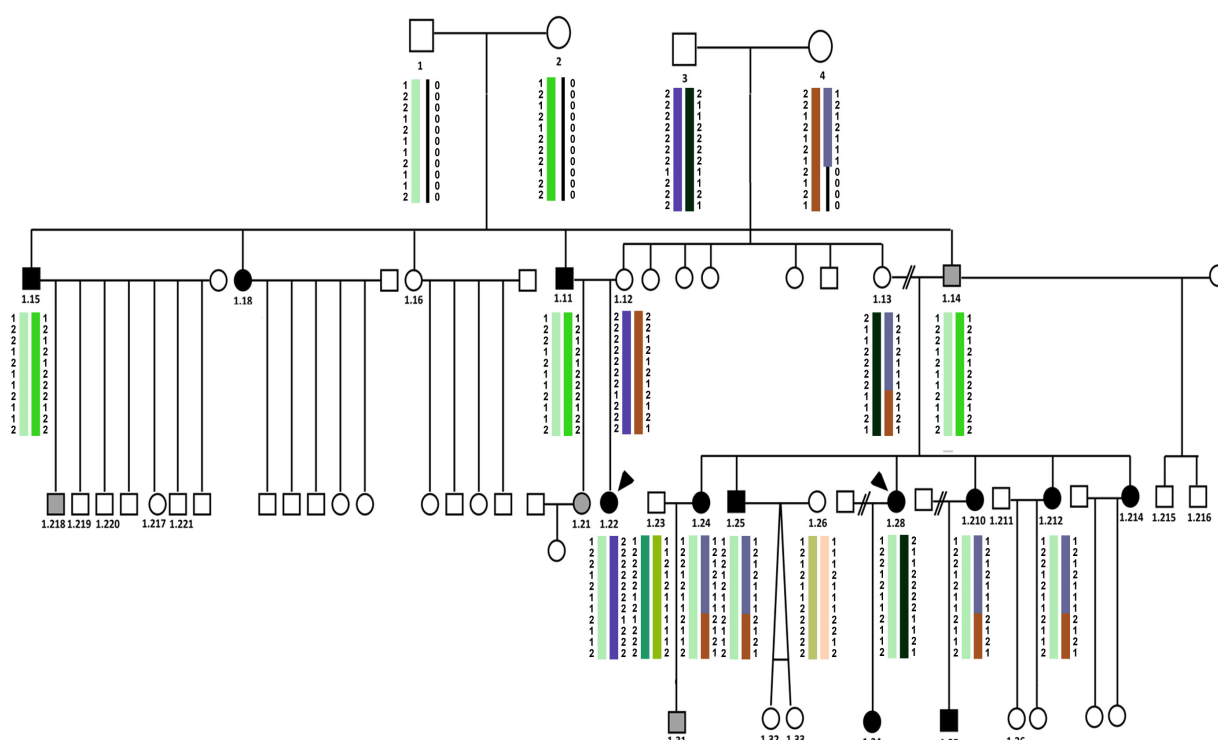


Figura 21. Estructura de la família estudiada amb els haplotips de la regió genòmica que conté la variant identificada al gen *DDX52*. La cadena de color verd clar és la comuna en tots els individus afectats. Els haplotips dels individus 1, 2, 3 i 4, no genotipats, s'han inferit a partir dels seus descendents. Les fletxes indiquen els individus en què s'ha seqüenciat l'exoma.

A continuació es van seqüenciar les quatre variants identificades a tots els membres de la família, i una d'elles, situada en el gen *DDX52*, va resultar ser un fals positiu. Cap de les altres tres variants cosegregava perfectament amb el fenotip patològic. La millor situació es dona en el cas del canvi p.Gly302Asp al gen *GP1BA*, amb una correlació perfecta entre genotip i fenotip en 23 dels 29

individus analitzats, mentre que en sis individus no hi és (dos pacients MCI no portadors de la mutació, i quatre subjectes sans portadors)(Figura 22).

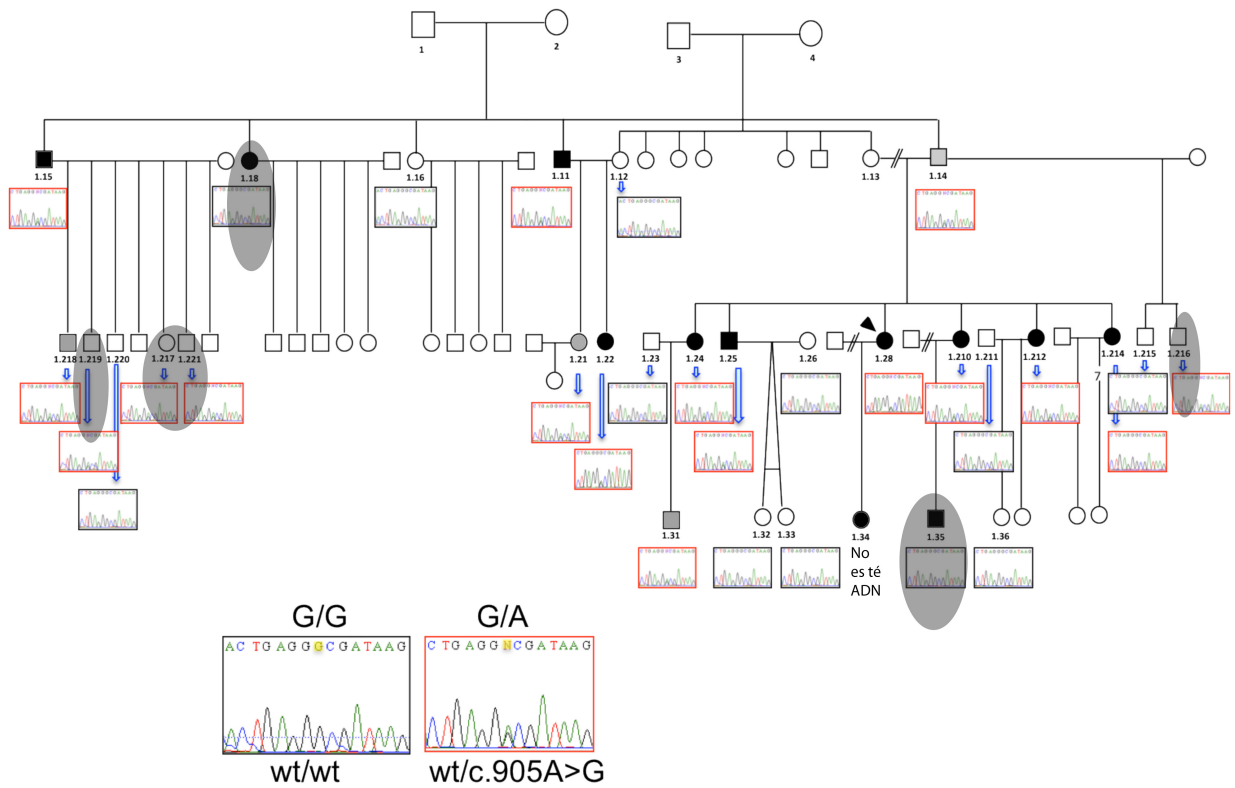


Figura 22. Segregació de la variant p.Gly302Asp identificada al gen GP1BA. En negre es mostren les seqüències corresponents al genotip normal i en vermell, al genotip heterozigot per la mutació. S'indiquen amb un cercle ombrejat els individus en què no encaixa la cosegregació de la variant amb la patologia: quatre dels individus sense DA presenten la possible variant causant de la MCI, i per contra, dos dels casos, no.

Taula 7. Variants genètiques identificades en els dos exomes estudiats. Es mostren 57 variants de 57 gens diferents, cap d'elles descrites prèviament i presents en heterozigosi en els pacients. Es mostra també la puntuació màxima obtinguda en l'anàlisi de lligament multipuntual (LOD score) de cadascuna de les regions.

Nº	Variant	S*	Nom gen	Gen	Transcrit	Conseqüència	Posició en CDS	Posició en proteïna	Canvi AA	Canvi codó	LOD score
1	1_52703355_C/T	+	ZFYVE9	ENSG00000157077	ENST00000287727	NS	266	89	A/V	gCt/gTt	<0
2	1_156446944_T/C	-	MEF2D	ENSG00000116604	ENST00000340875	NS	712	238	Y/H	Tat/Cat	<0
3	1_166819585_T/C	+	POGK	ENSG00000143157	ENST00000367875	NS	1769	590	L/S	tTg/tCg	<0
4	1_179312753_G/A	+	SOAT1	ENSG00000057252	ENST00000367619	NS	970	324	A/T	Gct/Act	<0
5	1_197111665_G/A	-	ASPM	ENSG00000066279	ENST00000294732	NS	1717	573	G/R	Ggg/Agg	<0
6	1_212798310_C/T	+	FAM71A	ENSG00000162771	ENST00000294829	STOP	91	31	Q/*	Caa/Taa	<0
7	1_213341260_C/-	+	RPS6KC1	ENSG00000136643	ENST00000366959	FS	859-860	287	-	-	<0
8	1_153751800_TG/-	+	SLC27A3	ENSG00000143554	ENST00000368659	FS	-	-	-	-	<0
9	1_179504026_AAG/-	+	AXDND1	ENSG00000162779	ENST00000360322	NS	2610-2612	870-871	VR/V	gtAAGa/gta	<0
10	2_28805359_A/G	+	PLB1	ENSG00000163803	ENST00000327757	NS	1720	574	R/G	Agg/Ggg	<0
11	2_190532092_G/A	+	ASNSD1	ENSG00000138381	ENST00000260952	NS	1234	412	G/R	Gga/Aga	<0
12	2_228118886_C/T	+	COL4A3	ENSG00000169031	ENST00000315699	NS	824	275	P/L	cCc/cTc	<0
13	2_29380249_-/T	+	CLIP4	ENSG00000115295	ENST00000415891	FS	1435-1436	479	-	-	<0
14	3_33584983_T/A	-	CLASP2	ENSG00000163539	ENST00000307312	NS	1813	605	Y/N	Tac/Aac	<0
15	3_49753044_C/T	+	RNF123	ENSG00000164068	ENST00000433785	NS	383	128	A/V	gCg/gTg	<0
16	3_154147385_T/C	-	GPR149	ENSG00000174948	ENST00000389740	NS	20	7	I/T	aTc/aCc	1,1
17	3_107491759_AGA/-	+	BBX	ENSG00000114439	ENST00000415149	NS	1189-1191	397	R/-	AGA/-	<0
18	4_41691606_T/C	+	LIMCH1	ENSG00000064042	ENST00000511496	NS	2519	840	M/T	aTg/aCg	<0
19	4_70723311_G/T	-	SULT1E1	ENSG00000109193	ENST00000226444	NS	52	18	V/L	Gta/Tta	<0
20	4_119947962_AAG/-	+	SYNPO2	ENSG00000172403	ENST00000307142	NS	436-438	146	K/-	AAG/-	<0
21	4_155244402_TTTG/-	-	DCHS2	ENSG00000197410	ENST00000339452	FS	4098	1366	-	-	<0
22	5_72383526_G/A	+	FCHO2	ENSG00000157107	ENST00000341845	NS	2356	786	E/K	Gaa/Aaa	<0
23	5_95018302_G/T	-	SPATA9	ENSG00000145757	ENST00000274432	NS	80	27	A/E	gCa/gAa	<0

24	5_140166363_G/A	+	<i>PCDHA1</i>	ENSG00000204970	ENST00000378133	NS	488	163	G/D	gGt/gAt	<0
25	5_150886976_G/A	-	<i>FAT2</i>	ENSG00000086570	ENST00000261800	NS	12256	4086	V/I	Gtc/Atc	<0
26	5_180582257_TGTC/-	+	<i>OR2V2</i>	ENSG00000182613	ENST00000328275	FS	312-315	104-105	-	-	<0
27	6_159420780_C/T	-	<i>RSPH3</i>	ENSG00000130363	ENST00000252655	NS	229	77	R/W	Cgg/Tgg	<0
28	7_21470365_G/C	+	<i>SP4</i>	ENSG00000105866	ENST00000222584	NS	1582	528	A/P	Gca/Cca	<0
29	7_23349140_C/T	+	<i>C7orf30</i>	ENSG00000156928	ENST00000466681	NS					<0
30	7_64439749_-/CT	-	<i>ZNF117</i>	ENSG00000152926	ENST00000282869	FS	199-200	67	-	-	<0
31	9_131600508_C/T	-	<i>CCBL1</i>	ENSG00000171097	ENST00000302586	NS	340	114	Q/*	Caa/Taa	<0
32	9_135730272_C/T	-	<i>AK8</i>	ENSG00000165695	ENST00000298545	NS	374	125	P/L	cCc/cTc	<0
33	10_64975079_C/T	-	<i>JMJD1C</i>	ENSG00000171988	ENST00000399251	NS	302	101	T/I	aCt/aTt	<0
34	10_81372080_C/T	+	<i>SFTPA1</i>	ENSG00000122852	ENST00000372308	NS	185	62	P/L	cCa/cTa	<0
35	10_95987198_G/A	+	<i>PLCE1</i>	ENSG00000138193	ENST00000260766	NS	1945	649	A/T	Gct/Act	<0
36	10_18087630_TG/-	+	<i>AL928729.1</i>	ENSG00000184040	ENST00000450905	FS	767-768	256	-	-	<0
37	11_7530648_G/-	+	<i>OLFML1</i>	ENSG00000183801	ENST00000329293	FS	437-438	146	-	-	<0
38	11_123886819_G/A	+	<i>OR10G8</i>	ENSG00000234560	ENST00000320891	NS	538	180	A/T	Gca/Aca	1.0
39	12_18435399_CCC/-	+	<i>PIK3C2G</i>	ENSG00000139144	ENST00000266497	NS	382-384	128	P/-	CCC/-	<0
40	13_98669104_T/C	+	<i>IPO5</i>	ENSG00000065150	ENST00000261574	NS	2669	890	I/T	aTt/aCt	<0
41	14_45650874_A/G	+	<i>FANCM</i>	ENSG00000187790	ENST00000267430	NS	4352	1451	H/R	cAt/cGt	<0
42	15_28483903_C/A	-	<i>HERC2</i>	ENSG00000128731	ENST00000261609	NS	3593	1198	A/D	gCt/gAt	<0
43	16_85945232_G/A	+	<i>IRF8</i>	ENSG00000140968	ENST00000268638	NS	415	139	G/S	Ggt/AgT	<0
44	17_4836804_G/A	+	<i>GP1BA</i>	ENSG00000185245	ENST00000329125	NS	905	302	G/D	gGc/gAc	1,5
45	17_35993317_C/T	-	<i>DDX52</i>	ENSG00000141141	ENST00000349699	SPLC	-	-	-	-	1.8
46	17_21319651_GAG/-	+	<i>KCNJ12</i>	ENSG00000184185	ENST00000331718	NS					0,91
47	18_9815201_G/A	+	<i>RAB31</i>	ENSG00000168461	ENST00000306096	NS	362	121	C/Y	tGc/tAc	<0
48	19_7695505_A/G	+	<i>C19orf79</i>	ENSG00000229833	ENST00000456958	NS	74	25	N/S	aAt/aGt	<0
49	19_44590000_CTC/-	+	<i>ZNF284</i>	ENSG00000186026	ENST00000328297	NS					<0
50	20_126311_CC/-	+	<i>DEFB126</i>	ENSG00000125788	ENST00000382398	FS	313-314	105	-	-	<0
51	21_32638871_T/C	-	<i>TIAM1</i>	ENSG00000156299	ENST00000286827	NS	418	140	S/P	Tca/Cca	<0
52	21_34003761_T/G	-	<i>SYNJ1</i>	ENSG00000159082	ENST00000322229	NS	4266	1422	D/E	gaT/gaG	<0

Nº	Variant	S*	Nom gen	Gen	Transcrit	Conseqüència	Posició en CDS	Posició en proteïna	Canvi AA	Canvi codó	LOD score
53	21_38865433_A/G	+	<i>DYRK1A</i>	ENSG00000157540	ENST00000321219	NS	1066	356	T/A	Act/Gct	<0
54	21_42813771_C/G	+	<i>MX1</i>	ENSG00000157601	ENST00000288383	NS					<0
55	X_3248125_G/C	-	<i>MXRA5</i>	ENSG00000101825	ENST00000217939	NS	643	215	E/Q	Gag/Cag	<0
56	X_37587156_G/A	+	<i>XK</i>	ENSG00000047597	ENST00000378616	NS	776	259	S/N	aGt/aAt	<0
57	X_135431924_C/T	+	<i>GPR112</i>	ENSG00000156920	ENST00000287534	NS	5870	1957	P/L	cCg/cTg	<0

NS=canvi no sinònim; FS=canvi pauta de lectura (*frameshift*); SPLC=canvi en lloc canònic de *splicing*; S=cadena, CDS=seqüència codificant; AA=aminoàcid.

S'indiquen en groc les variants situades en regions que presenten puntuacions de LOD score superiors a 1.

¹LOD score multipuntual calculat sota un model dominant (penetrància = 100%, fenocòpies = 0%).

Discussió

1. Característiques de la mostra reclutada

Els elements més importants en els estudis genètics de qualsevol malaltia són la recollida de la mostra i el disseny de l'estudi (Cardon and Bell, 2001). En els estudis de malalties complexes, a més, és especialment determinant una caracterització clínica rigorosa. En aquest apartat es discuteixen les característiques dels pacients i la selecció de controls adients per aquests estudis.

1.1. Els pacients amb malformació de Chiari tipus I

1.1.1. Logística de la recollida de casos amb MCI

Els departaments de Neurocirurgia i Neurologia Pediàtrica de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron van iniciar la recollida prospectiva de mostres sanguínies de pacients amb MCI l'any 2004. El criteri d'inclusió dels pacients es va basar en el criteri actual de DA (superior a 3mm). Tots els pacients van ser visitats pels neurocirurgians o neuròlegs i es van recollir les dades de manera sistemàtica a partir de sang o saliva un cop es confirmava el diagnòstic per IRM. Amb l'objectiu d'incrementar el nombre de pacients per l'estudi d'associació cas-control, es va contactar telefònicament amb els pacients visitats i intervinguts quirúrgicament durant els anys anteriors al mateix hospital i amb diverses associacions de MCI de l'Estat Espanyol. A aquells pacients que van acceptar participar en l'estudi, se'ls va enviar un qüestionari i un kit d'extracció d'ADN de saliva. En el cas dels pacients procedents de les associacions, també se'ls va demanar l'informe mèdic d'un radiòleg, neuròleg o neurocirurgià i la IRM. En tots els casos, els pacients van signar el consentiment informat i es va parlar especial atenció a descartar els individus d'origen estranger o d'altres ètnies diferents a la caucàsica.

Respecte al nombre de mostres recollides finalment, les mides mostrals aconseguides pels diferents projectes d'aquest treball són, des del punt de vista estadístic, petites. Però s'ha de tenir en compte la dificultat per reclutar pacients amb MCI a causa de la relativa baixa freqüència d'aquesta patologia i al

desconeixement de la malaltia. Tot i així, fins ara, els treballs presentats en aquesta Tesi són els que presenten mides mostrals més elevades.

1.1.2. Característiques clíniques dels pacients

En total es van reclutar 530 pacients corresponents a 450 famílies diferents. En total, 28 famílies tenien dos o més individus afectats (confirmats radiològicament): 10 amb dos individus afectats, 12 famílies amb 3 i 6 famílies amb 4 o més afectats en múltiples generacions (Figura 23), la qual cosa confirma la idea que, almenys en un subgrup de pacients amb MCI, hi ha una contribució genètica. És probable que entre la població reclutada hi hagi d'altres famílies amb més individus afectats (sovint, els pacients manifesten que o el pare o la mare es queixaven del mateix), però donada la dificultat per obtenir les proves radiològiques d'aquests familiars (bé perquè no volen col·laborar en l'estudi, són gent molt gran o perquè ja han mort), no es va poder confirmar.

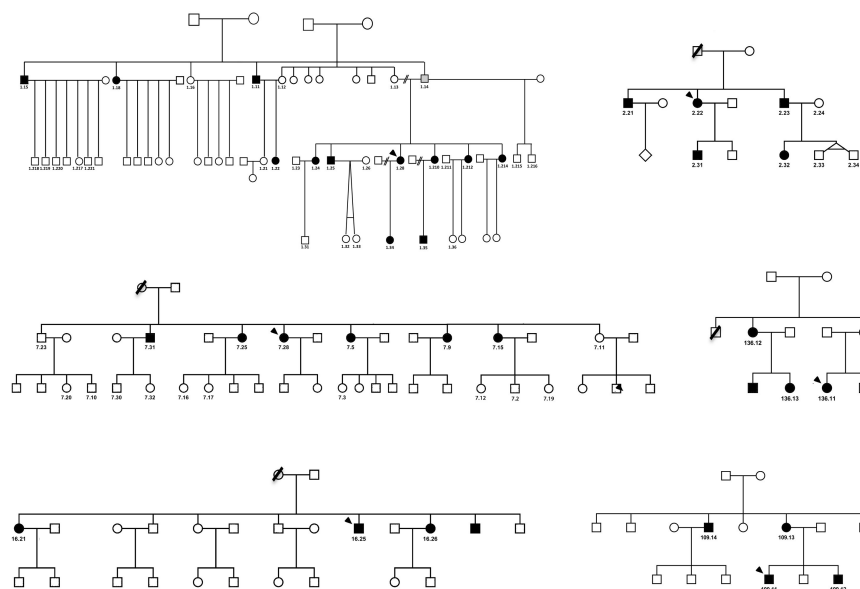


Figura 23 Arbres genealògics de les famílies amb quatre o més individus amb MCI que es van reclutar. En negre, els individus afectats; la fletxa indica el cas índex de cada família.

La transmissió de la malaltia a les famílies suggereix un patró similar a l'autosòmic dominant (Figura 23).

La major part dels pacients prové de Catalunya, segurament per la proximitat del seu domicili i del CAP respecte a l'Hospital (Figura 24).

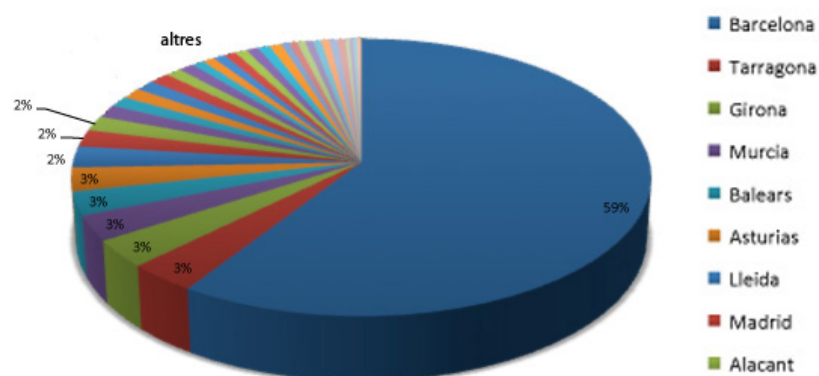


Figura 24. Origen dels pacients amb MCI. Representació gràfica de la procedència dels pacients presentat per províncies i expressat en percentatge.

El fet de que hi hagi certa heterogeneïtat geogràfica en l'origen de la mostra, amb un 41% dels pacients procedents de fora de Barcelona (sempre, però, de l'Estat Espanyol), podria fer pensar en una major heterogeneïtat genètica en els casos que en els controls, que podria qüestionar la validesa de l'estudi d'associació. No obstant, estudis que comparen poblacions amb diferents orígens geogràfics dins l'estat espanyol han demostrat que aquestes no presenten estratificació, inclosos estudis del nostre grup en diverses patologies neurològiques complexes (Corominas et al., 2009; Toma et al., 2012).

Les dades clíniques dels 530 pacients reclutats es resumeixen a la Taula 8.

Com en altres estudis realitzats amb pacients amb MCI, dues tercers parts dels afectats eren dones (Elster and Chen, 1992). S'han suggerit diferents explicacions per a aquesta asimetria: una, recolza la idea que el DA podria ser degut a l'esforç que ha de realitzar la dona en el moment de donar a llum, que seria el major desencadenant de la malformació en les dones (Nash et al., 2002); l'altra, fa referència al creixement precoç que es dona en el cerebel de les dones (Meadows et al., 2000). Fins ara, no s'ha pogut demostrar cap de les dues suposicions.

D'altra banda, tot i que la MCI apareix en la segona-tercera dècada de vida (Schady, Metcalfe and Butler 1987, Stovner et al. 1993, Nishikawa et al. 1997, Milhorat et al. 1999), 77 dels nostres pacients eren nens o van començar a manifestar els primers símptomes abans dels 18 anys. La mitjana d'edat d'inici dels símptomes va resultar ser als 26 anys. Un 6% dels pacients no descrivia cap símptoma i es va detectar la malformació de forma casual, com d'altres autors ja havien descrit prèviament (Meadows et al., 2000).

És difícil fer una estimació exacta sobre quins dels símptomes que presenten els pacients són atribuïbles a la MCI, ja que molts d'ells són comuns a d'altres malalties i són els propis malalts els que obliden esmentar-los al seu metge, sovint perquè no els relacionen amb la seva malformació. També sol passar el contrari: pacients ja cansats de visitar diferents metges, exageren el seu malestar per intentar aconseguir més atenció del professional i anomenen tots els símptomes que se'ls ocorren o que han patit en algun moment de la seva vida. En aquest treball s'ha estimat que els símptomes més comuns manifestats en el pacients van ser el mal de cap (66,4%) i el dolor cervical (46%). Sovint es queixaven de marejos, pèrdua de la capacitat motora, formigueig (parestèsia) a les extremitats superiors, inestabilitat, pèrdua de sensibilitat, sensació de fatiga i vertigen. Una part dels pacients també afirmava tenir contractures musculars, alteracions visuals (sovint visió borrosa) i de la son, problemes per empassar l'aliment o la saliva (disfàgia), dificultat per caminar, dolor a les extremitats superiors i tinnitus. Amb menys freqüència, es descrivien símptomes de depressió, disfonia o dolor a les extremitats inferiors.

Pel que fa a les complicacions associades, gairebé un 40% presentava siringomièlia, essent aquesta la més freqüent, seguida de la hidrocefàlia (16%). Només una petita part dels pacients (inferior al 6% del total) presentaven també problemes psiquiàtrics, fibromiàlgia i/o síndrome de fatiga crònica.

I respecte al nombre de pacients que van ser tractats quirúrgicament, aproximadament a la meitat dels pacients (54%) se'ls va haver de fer una RFP.

Taula 8. Dades clíniques dels pacients amb MCI reclutats.

	% Pacients MCI		% Pacients MCI
Sexe (H/D)	136/394	Signes i símptomes	
Signes i símptomes		Tinnitus	12,4
Asimptomàtic	6,1	Ansietat	10,9
Edat aparició símptomes (anys)	26,6±14,5	Nistagme	10,7
Temps d'evolució (mesos)	184,3±171,3	Depressió	9,0
Mal de cap	66,4	Disfonia	4,4
Localització mal de cap (occipital)	27,7	Mal a les extremitats inferiors	3,9
Mal cervical	46,0	Problemes mentals psiquiàtrics	5,6
Marejos	34,5	Fibromiàlgia	3,2
Pèrdua capacitat motora	32,1	Síndrome fatiga crònica	1,2
Parestèsia extremitats superiors	30,7	Complicacions associades	
Inestabilitat	29,9	Siringomièlia	37,7
Pèrdua sensibilitat	28,5	Hidrocefàlia	15,6
Fatiga	26,5	Escoliosi	8,5
Mals de cap en tossir	24,1	Malformacions craniocervicals	
Vertigen	20,9	Retrocés de la dent de l'axis	10,9
Contractures musculars	18,7	Impressió basilar	3,4
Alteracions visuals	18,2	Platibàsia	1,9
Disfàgia	18,2	Síndromes associades	
Dificultat per caminar	17,5	Pseudotumor Cerebri	4,6
Alteracions de la son o insomni	14,6	Malformació de Klippel-Feil_	1,0
Dolor a les extremitats superiors	13,6	Neurofibromatosi tipus I	10,9
Parestèsia extremitats inferiors	12,6	Reconstrucció FCP	53,8

1.2. La població control

Els estudis d'associació cas-control consisteixen en comparar la freqüència de determinats factors de risc genètics en individus afectats i individus control (que en principi no tenen la malaltia) per detectar associacions amb la malaltia. Per tant, la selecció dels controls adients és un principi epidemiològic crucial per a la validesa d'aquests estudis. Si no es duu a terme un aparellament correcte dels grup de pacients i el de controls, qualsevol diferència observada en les freqüències al·lèliques o genotípiques podria ser deguda a factors independents de la patologia, com ara l'etnicitat, el gènere, les migracions o d'altres processos (Cardon and Bell, 2001; Chanock et al., 2007).

No obstant, reunir una població control adequada és sempre delicat: cal tenir en compte la dificultat que comporta l'obtenció de mostres d'individus sans, que tinguin el mateix origen ètnic o geogràfic que els pacients i, idealment, que puguin ser aparellats amb ells per sexe i, en funció de l'estudi, també per edat. En el cas de la MCI, l'aparellament per sexe, individu a individu, és important per tal de salvar les diferències sistemàtiques que poden haver-hi entre homes i dones, tant a nivell morfològic com en relació a les variants al·lèliques que tenen influència sobre el fenotip. En el cas dels estudis amb IRM es va procurar a més que els pacients superessin els 18 anys, ja que les estructures anatòmiques varien en mida i proporcions durant el període de creixement.

Respecte a l'origen dels controls utilitzats en els diferents treballs d'aquesta tesi, aquest va variar per a cada estudi realitzat: els controls que es van obtenir pels estudis realitzats amb IRM eren pacients que per algun motiu s'havien realitzat una IRM del crani, però que, per diagnòstic, no era esperable que tinguessin afectació de les estructures que s'estudiarien en els pacients amb MCI (per tal que fos un grup homogeni, es van seleccionar pacients amb primer brot d'esclerosi múltiple de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron). Respecte als estudis genètics, es va utilitzar població general com a control (exceptuant les comprovacions de les variants detectades en els estudis de formes monogèniques que es van realitzar en familiars no afectats). Lògicament, el control ideal hagués estat una població MCI-negativa. Però per descartar la MCI no és suficient un interrogatori estructurat, ja que la MCI pot romandre asimptomàtica o amb símptomes inespecífics de caràcter lleu. El procediment més fiable és la IRM, però aquesta opció és inviable sobretot a nivell econòmic. Així, doncs, es va optar per seleccionar una cohort control procedent de la població general, aparellada per edat i sexe amb els casos i de la mateixa ètnia (caucàsica i de nacionalitat espanyola), composta per persones que acudeixen a l'hospital per fer-se una analítica per causes diverses o familiars dels pacients, assumint la possibilitat que algun dels individus pugui tenir la patologia estudiada.

En el cas concret de l'estudi d'associació, el fet que no s'hagi exclòs el fenotip estudiat a la mostra control apropa la composició genètica del grup de casos i

controls i per tant es redueix la capacitat de l'estudi de detectar diferències entre ells. L'efecte de la utilització de controls de població general és dependent de la prevalença de la malaltia a la població general. En el cas de trastorns poc freqüents pot arribar a ser menyspreable, mentre que en trastorns molt comuns, com la migranya, pot condicionar l'aparició de falsos negatiu.

2. Estudis morfomètrics

2.1. Consideracions generals sobre els estudis amb IRM

La IRM s'ha establert com una eina molt valuosa en el diagnòstic clínic i en recerca perquè es tracta d'una tècnica no invasiva i de gran resolució, que permet diferenciar i visualitzar amb nitidesa els teixits tous de múltiples àrees del cos. Es basa en la capacitat que tenen alguns nuclis, especialment els protons de l'aigua, per absorbir ones de radiofreqüència quan són sotmesos a l'efecte d'un camp magnètic. Aquesta capacitat genera un senyal que és detectat per un receptor i transformat en imatges en un ordinador.

La idea de realitzar un estudi morfomètric amb IRM pot donar la impressió de certa simplicitat. No obstant, obtenir mesures consistents és quelcom relativament complicat, i s'han de tenir en compte diferents aspectes per tal de garantir una feina homogènia, fàcilment reproduïble i fiable.

2.1.1. Elecció de la imatge i el tall adient

És molt important tenir clar el teixit o l'estructura que es vol estudiar per saber en quin tipus de seqüència serà preferible efectuar les mesures. Cada teixit, segons la seva abundància en protons i el temps que tarden en relaxar-se després d'haver estat estimulats, emet un senyal de major o menor intensitat que és captat per l'equip. La diferència de potencial es quantifica numèricament (imatge digital) i, en els estudis de IRM convencionals, finalment es transforma en tons d'una escala de grisos. Es poden modificar diversos paràmetres tècnics per obtenir un contrast diferent entre els teixits. En les imatges potenciades en T1 es poden veure estructures amb temps de relaxació molt curts, com el greix

(apareix amb alta intensitat de senyal) però no, en canvi, estructures amb temps de relaxació més perllongats, com l'aigua (senyal molt poc intensa). Les imatges potenciades en T2 per contra, mostren el greix com un senyal de baixa intensitat, i els líquids, com una senyal d'alta intensitat. Es produeix també inversió en la intensitat de senyal de la substància blanca, que s'observa de menor intensitat respecte a la substància gris.

Tant en T1 com en T2 s'observa el moll de l'os amb intensitat, i en canvi, la part compacta i esponjosa, de color negre. A la Taula 9 es resumeix com es veuen els diferents teixits en funció del tipus d'IRM. Per realitzar els estudis morfomètrics presentats en aquest treball, es van utilitzar imatges potenciades en T1.

Taula 9. Visualització dels diferents teixits en funció dels temps de relaxació potenciats (T1 o T2).

	Blanc	Gris	Negre
T1	<p>Greix Hemorràgia subaguda Contrast Substància blanca Moll de l'os</p>	<p>Substància grisa Fetge Melsa Pàncrees Ronyó Músculs Lesions amb aigua</p>	<p>LCR Orina Quists Tendons Vasos Aire Fibrosi Part compacta i esponjosa os</p>
T2	<p>LCR Orina Quists Tumors Ronyó, Melsa Aigua lliure Moll de l'os</p>	<p>Substància grisa Greix</p>	<p>Substància blanca Pàncrees Fetge Múscul Os cortical Tendons Aire Vasos Part compacta i esponjosa os</p>

D'altra banda, l'estudi realitzat en un pacient implica una seqüència d'imatges corresponents a un gran nombre de talls consecutius (sagitals i/o axials) de la regió d'interès. El gruix del tall pot variar entre 3 i 4 mm i la distància entre ells, entre 0,6-0,8 mm. Així doncs, la secció de les diferents estructures varia al llarg dels diferents talls, i per tant, també, la seva mida. Quan es vol mesurar una estructura determinada, és molt important escollir correctament en els diferents individus, el tall i l'alçada on es realitzarà l'anàlisi o mesura, per tal d'evitar

diferències degudes al nivell de la secció. Per uniformitzar les mesures, en aquest treball es va escollir com a imatge de referència en tots els individus, la corresponent al tall mig de l'estudi, en tall sagital, on es visualitzés tota la dent de l'axis.

2.1.2. Selecció dels individus per a l'estudi

La mida mostral de la població és un aspecte fonamental a l'hora de dissenyar una anàlisi o experiment, ja que és determinant en relació al poder estadístic de l'estudi (Lipsey and Hurley, 2009).

L'edat i el sexe dels individus a estudiar són dues variables importants que també cal tenir en compte en estudis de morfometria, ja que poden tenir influència en l'anatomia, i sobretot, en la mida de les estructures.

2.1.3. Dificultats afegides en els estudis d'IRM retrospectius

Normalment els estudis per IRM s'utilitzen fonamentalment com a eina diagnòstica, la qual cosa implica una sèrie de dificultats afegides a l'hora de dur a terme un estudi morfomètric retrospectiu.

Sovint no es tenen les IRM de tots els pacients inclosos inicialment en l'estudi. La causa principal és la **extraviació dels estudis** per part dels pacients amb el pas dels anys: quan els estudis es realitzen en centres diferents del de diagnòstic i els pacients es fan càrrec del seu manteniment, el pas del temps facilita la seva pèrdua.

Un altre inconvenient que es pot presentar és l'**aparició d'artefactes** en les imatges. Tot i que aquests no dificulten la visualització de l'estructura d'interès per al diagnòstic, en aquest cas el DA, sí que poden deteriorar o alterar la imatge d'altres estructures d'interès en posteriors estudis de morfometria.

El **període de temps** que passa des que es realitza l'estudi IRM per diagnosticar fins que es decideix fer l'anàlisi morfomètrica també s'ha de tenir en compte, no només per la probabilitat de pèrdua de les imatges, sinó també pel fet que es pot produir un **canvi en els criteris o pautes** de presa d'IRM. Aquest canvi de criteri o pautes pot modificar el nombre i gruix d'imatges necessàries per obtenir el

diagnòstic, fent que al final, cada pacient presenti, per al mateix diagnòstic, un estudi d'IRM amb característiques diferenciades. Quan el tall escollit com a referència no hi és, cal descartar el pacient per tal d'evitar alteracions en els punts de referència, que posteriorment acabaran afectant la mesura. El fet que un estudi d'IRM mostri només el tall de referència i uns pocs de flanquejants, però no tota l'estructura en si, impedeix realitzar cert tipus de mesures, com ara les volumètriques, que requereixen tots els talls de l'estudi; només que en falti un o que no s'especifiquin les característiques de cada tall, la mesura no es podrà realitzar. El temps també afecta el tipus de mostra que arriba (**format d'IRM**), ja que antigament les IRM es donaven en format placa i actualment s'obtenen i es guarden en format digital. Aquest problema es pot resoldre homogeneïtzant la mostra: fotografiant les IRM en format placa per tal de tenir-les totes digitalitzades.

Quan l'**origen** de les IRM varia, en l'era digital s'afegeix l'inconvenient que cada centre utilitza un programa de visualització d'imatges diferent, de manera que l'obtenció dels estudis d'IRM de certs pacients requereix un temps addicional per instal·lar els programes necessaris per visualitzar les imatges, que sovint estan protegides contra còpies i modificacions. Davant la dificultat o impossibilitat d'introduir estudis d'IRM d'altres centres en el programa oficial utilitzat per mesurar en el centre on es realitza l'anàlisi morfomètric, és **necessària la utilització de programes alternatius d'anàlisi d'imatges**, a més de l'utilitzat pel centre. Per aquest motiu es van haver d'utilitzar dos *softwares* diferents per analitzar i mesurar les variables: NUMARIS/4 syngo® post-processing workstation, versió MR 2004A (Siemens AG, Erlangen, GE) per a les imatges obtingudes a l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron; i Image J software versió 1.41 per a les imatges realitzades en un altre centre o en format placa.

2.1.4. Tests de consistència

En el transcurs de l'anàlisi morfomètrica en IRM és recomanable avaluar la fiabilitat de les mesures. Realitzar una anàlisi de consistència és important en els estudis en què la percepció visual és fonamental, ja que pot haver-hi variabilitat deguda al factor humà.

La variabilitat total de les mesures es pot desglossar en dues components: la variabilitat deguda a les diferències entre els diferents individus, i la deguda a les diferències entre les mesures realitzades per cada observador. Aquesta darrera depèn de la variabilitat entre observacions i d'una variabilitat residual o aleatòria associada a l'error que comporta tota mesura. És important realitzar una **anàlisi intraespecífica** per comprovar si qui realitza les mesures és consistent amb els punts de referència establerts *a priori*, de la mateixa manera que realitzar una **anàlisi interespecífica** és important per certificar que la utilització de diferents *softwares* d'anàlisi d'imatge no alteren les mesures. En aquestes anàlisis és important el nombre de mostres que es mesuren, escollides aleatòriament, el nombre de vegades que es repeteix una anàlisi, i el temps que es deixa passar entre aquestes repeticions, per tal d'evitar que una repetició es faci més per memòria que no pas en base a un criteri d'establiment dels punts de referència.

L'índex estadístic més idoni per avaluar la fiabilitat de les mesures és el coeficient de correlació intraclassa (CCI), que es basa en un model d'anàlisi de variances (ANOVA) amb mesures repetides. En funció del nombre d'observadors, mètodes i mostres a valorar, s'utilitzen els models d'efectes aleatoris, fixes o mixtes per tal d'evitar possibles errors de probabilitat. Els valors del CCI poden oscil·lar entre 0 i 1 on 0 indica absència de concordança i 1, la concordança o fiabilitat absoluta dels resultats obtinguts. Valors superiors al 0,70 representen una fiabilitat excel·lent (Prieto et al., 1998).

2.1.5. Tests d'anàlisi de dades i correccions

Es poden comparar dos o més grups utilitzant test estadístics que formulen una hipòtesi nul·la que d'un principi pot ser rebutjada. A l'hora de contrastar la hipòtesi nul·la inicial s'han de tenir en compte diversos factors per determinar la prova estadística més adient: nombre de mostres que es vol comparar (dues o més de dues), si les mostres estan aparellades o són dependents, el tipus de variable (contínua, categòrica o binària) i la distribució de les variables. Si la variable presenta una distribució normal i homogeneïtat de variàncies, s'apliquen tests paramètrics; si en la mostra no es compleix una de les dues

característiques s'apliquen els anomenats tests no paramètrics, menys potents (són més exigents per rebutjar la hipòtesi nul·la) i a més propensos a cometre errors de tipus beta (no rebutjar la hipòtesi nul·la quan aquesta és falsa, fals negatiu o error de tipus II) (du Prel et al., 2010).

Quan es realitzen moltes mesures augmenta la probabilitat que algun resultat sigui estadísticament significatiu tan sols per atzar (fals positiu o error de tipus I). Cal, per tant, establir l·lindars de significació més rigorosos que tinguin en compte el nombre de tests realitzats. No hi ha un mètode universal per establir aquests nous límits. Una correcció inadequada per a proves múltiples pot derivar en dos resultats igualment indesitjables: increment de falsos positius (errors de tipus I) deguts a una correcció dèbil, o la no detecció d'efectes reals de les variants sobre el fenotip (errors de tipus II) deguts a l'aplicació d'una correcció massa severa. Per resoldre aquest problema es poden utilitzar diferents aproximacions (Abou-Sleiman et al., 2006; Chanock et al., 2007; Gordon and Finch, 2005). El mètode més utilitzat fins fa poc era la correcció de Bonferroni per a múltiples comparacions. Aquesta correcció estableix un nou l·lindar de significació (α') segons el nombre de tests independents realitzats (n) seguint la relació $\alpha' = \alpha/n$, amb α típicament igual a 0,05. Això assegura una probabilitat d'error de tipus I no superior al 5% en cadascuna de les comparacions realitzades. El problema d'aquest test és que sovint no està clar el nombre d'hipòtesis independents que es contrasten, de manera que l'aplicació estricta d'aquest mètode és extremadament conservadora (severa) i tendeix a incrementar els errors de tipus II (Abou-Sleiman et al., 2006; Colhoun et al., 2003; Curran-Everett, 2000).

En l'estudi morfomètric de la FCP es va aplicar la correcció de Bonferroni. En canvi, en l'estudi de l'orofaringe, aquesta correcció no es va aplicar per evitar incórrer en errors de tipus II ja que els paràmetres analitzats es van considerar tots ells independents entre si.

2.2. Estudi morfomètric de la FCP

Diferents estudis morfomètrics senyalen una FCP petita com la principal causa

del DA i per tant, de la compressió de les diferents estructures i de l'alteració de la circulació del LCR en pacients amb MCI (Aydin et al., 2005; Karagoz et al., 2002; Milhorat et al., 1999; Nishikawa et al., 1997; Schady et al., 1987; Trigylidas et al., 2008; Vega et al., 1990).

L'estudi realitzat en aquesta Tesi és el primer estudi morfomètric de la FCP dut a terme amb pacients amb MCI d'origen espanyol utilitzant IRM. Es va corroborar la dimensió disminuïda de la FCP dels pacients i es va crear un model matemàtic capaç de predir amb una alta sensibilitat i especificitat, el diagnòstic de la MCI sense tenir en compte el grau de DA.

2.2.1. Característiques de la FCP en pacients amb MCI

Es tracta d'un estudi retrospectiu realitzat en IRM T1W1 de talls sagitals de cranis amb pacients MCI i controls, on 10 de les 19 mesures van mostrar diferències estadísticament significatives entre les dues poblacions. Entre elles, les àrees de la FCP i la FCP òssia, que eren més petites en els pacients, tal i com altres estudis havien senyalat prèviament (Karagoz et al., 2002; Milhorat et al., 2009; Milhorat et al., 1999; Milhorat et al., 2010; Schady et al., 1987; Vega et al., 1990). Les diferències més significatives es van trobar en l'alçada de la FCP, el clivus i les distàncies entre la línia de Mc Rae i el cos callós, el fastigi i el pons, indicant una FCP més baixa de l'habitual. El forat magne i el tentori (longitud i angle), en canvi, tot i que aparentment semblen més petits en els pacients, no van mostrar diferències estadísticament significatives, en contrast amb allò que senyalen d'altres estudis (Aydin et al., 2005; Karagoz et al., 2002; Milhorat et al., 1999; Milhorat et al., 2010; Nishikawa et al., 1997; Noudel et al., 2009; Sekula et al., 2005).

Tot i la importància de quantificar el volum de la FCP, en aquesta anàlisi no es va poder mesurar aquesta variable, a causa de la falta de talls en diversos estudis d'IRM i a la falta d'informació sobre el gruix i la distància entre els diferents talls, dades necessàries per realitzar els càlculs de volum utilitzant el principi de Cavalieri (Mayhew and Olsen, 1991).

Els resultats mostren una FCP òssia petita. Tot i que aquesta està formada per dos ossos, l'occipital (escama occipital i basioccipital) i l'esfenoide

(basiesfenoide), tots els estudis apunten a l'os occipital com a responsable de la reducció del volum de la FCP. Hi ha controvèrsia respecte a quina part de l'os és la veritablement curta i responsable. En aquest estudi es mostra una gran diferència en la mida del clivus (basiesfenoide més basioccipital) que és molt més petit en pacients, tal i com ja havien indicat altres autors (Aydin et al., 2005; Noudel et al., 2009; Sekula et al., 2005). En canvi, tot i que altres estudis havien suggerit una reducció en la mida de l'escama occipital en individus amb MCI (Aydin et al., 2005; Milhorat et al., 2009; Milhorat et al., 1999; Milhorat et al., 2010; Nishikawa et al., 1997; Noudel et al., 2009; Sekula et al., 2005), aquí no es van observar diferències significatives respecte als controls. Pel que fa a la part del clivus que pot estar afectada, tot i que es va valorar en l'estudi, no es van obtenir resultats estadísticament significatius en cap de les dues parts. Això podria ser degut al nombre limitat de pacients i de controls que van poder ser mesurats (n=22), ja que la sincondrosi que els separa desapareix amb els anys i no sempre és visible en IRM de pacients adults.

El fet que les nostres dades mostrin una part de l'os occipital afectada, reforça la idea que la MCI podria ser causada per un mesoderma paraxial subdesenvolupat.

Cal tenir en compte que es va aplicar el test de Bonferroni en totes les mesures per corregir el nivell de significació, com si totes les mesures proporcionessin informació sobre del mateix paràmetre, la qual cosa no és certa. Això significa, que en aquest estudi hem estat més rigorosos del que caldria i segurament hi ha mesures que, tot i que no superen el llindar establert després d'aplicar Bonferroni, si que superen una $\alpha=0,05$ i podrien considerar-se també significatives.

2.2.2. Avantatges d'aquest estudi morfomètric respecte d'altres realitzats prèviament

La realització d'un estudi amb 100 pacients i 50 individus controls fa que aquest sigui un dels estudis amb una mida mostral més gran que s'ha realitzat fins ara (Taula 10), i per tant, un dels que presenta un major poder estadístic i fiabilitat. A més, s'ha de tenir en compte la mostra amb què es va treballar: individus majors de 18 anys i amb les mateixes proporcions home/dona en casos i

controls, per tal de minimitzar els canvis anatòmics relacionats amb l'edat i el sexe.

A diferència de la majoria de treballs publicats, per a realitzar aquest estudi es van dur a terme els tests de consistència intraespecífics per a cada mètode d'anàlisi utilitzada, i un test de consistència interespecífic per comparar els dos mètodes. En cadascuna de les mesures es va mostrar una consistència elevada (CCI>0,70).

Taula 10. Estudis morfomètrics de la MCI realitzats fins ara. Per a cadascun d'ells s'indica l'origen de la població estudiada, el nombre de casos i controls mesurats, el nombre d'homes i de dones en cada població, el tipus d'imatge utilitzada i l'any de publicació.

Autors (Any publicació estudi)	Origen població	nº morfometria cas/control	H/D casos	H/D controls	Tipus Estudi Radiogràfic
(Schady et al., 1987)	Anglaterra	32			radio+CT
(Vega et al., 1990)	Espanya	42/46			radio+CT
(Milhorat et al., 1999)	EEUU	50/50	13H/37D	17H/33D	IRM
(Nishikawa et al., 1997)	Japó	30/50	13H/17D	20H/30D	IRM
(Karagoz et al., 2002)	Turquia	22/21	10H/12D	11H/10D	IRM
(Aydin et al., 2005)	Turquia	60/30	24H /36D	15H/15D	IRM
(Sekula et al., 2005)	EEUU	22/25	8H/14D	9H/16D	IRM
(Noudel et al., 2009)	França	17/30	7H/10D	12H/18D	IRM
(Milhorat et al., 2009)	EEUU	280/75	78H/202D	20H/55D	IRM
		228/75	40H/188D		
		30/75	12H/18D		
(Khan et al., 2010)	Pakistan	60/50	20H/40D		IRM
(Milhorat et al., 2010)	EEUU	388/80	111H/277D	25H/55D	IRM
		225/80	44H/181D		
		55/80	15H/40D		
		30/80	12H/18D		
		28/80	12H/16D		
		5/80	2H/3D		
(Dagtekin et al., 2011)	Turquia	15/25	6H/9D	10H/15D	IRM
(Dufton et al., 2011)	Canadà	81/107	60H/21D	63H/44D	IRM
Present estudi (2012)	Espanya	100/50	38H/62D	19H/31D	IRM

2.2.3. Nou criteri de diagnòstic proposat

Tal i com s'ha comentat prèviament a la Introducció (veure Apartat 1.5 de la Introducció), cada cop es qüestiona més el criteri de diagnòstic d'aquesta

malformació basat en el DA, ja que no s'ha trobat cap correlació entre aquest paràmetre i la gravetat dels símptomes (Duddy and Williams, 1991; Elster and Chen, 1992; McGirt et al., 2005; Milhorat et al., 1999; Nash et al., 2002; Sekula et al., 2005; Tubbs et al., 2001b; Ventureyra et al., 2003). A més, s'ha suggerit que el DA varia en funció de l'edat (Mikulis et al., 1992), i encara més important, s'ha observat que el DA es pot produir de forma secundària per causes diferents a les d'una FCP reduïda (Chumas et al., 1993; Cinalli et al., 2005b; Lemar et al., 1994; Milhorat et al., 2009; Milhorat et al., 2007; Richards et al., 2001a).

Tenint en compte el significat tant ampli i l'ambigüitat associada a l'actual definició de la MCI, en aquest treball proposem una alternativa al criteri de diagnòstic actual que permet reconèixer aquells casos produïts com a conseqüència d'una FCP petita, independentment del DA.

La regressió logística binària multivariant permet predir una variable dependent (en aquest cas, si una FCP és hipoplàstica o no) a partir de certes variables que hom creu que són rellevants (podent ser categòriques o quantitatives), donant una resposta d'interpretació fàcil (normalment dicotòmica). A partir de la combinació de set paràmetres d'una FCP hipoplàstica es va aconseguir predir, amb un 93% de fiabilitat, si un individu és sa o afectat en funció de la seva FCP i no del DA. La corba ROC és un índex representat de forma de gràfica que permet avaluar l'exactitud d'una prova diagnòstica valorant la seva sensibilitat i especificitat. Es pot quantificar aquest índex tot mesurant l'àrea sota la corba ROC (amb la sensibilitat a les ordenades i l'especificitat a les abscisses), i es defineix com la probabilitat de classificar correctament un parell d'individus sa i afectat, seleccionats a l'atzar d'una població, mitjançant els resultats obtinguts en aplicar-los la prova diagnòstica. Un valor superior a 0,9 indica exactitud alta, valor que és superat pel model matemàtic proposat en aquest treball (0,95). El fet que en l'interval de confiança no estigui inclòs el valor 0,5 (95% IC, 0.923–0.988) significa que la prova és capaç de diferenciar entre malalts i sans (Burgueno et al., 1995).

El fet d'utilitzar un criteri diagnòstic que valora la FCP i no el DA, segurament fa que els casos MCO quedin inclosos com a individus afectats de la MCI, ja que s'ha vist que presenten també una FCP subdesenvolupada i semblen diferenciar-se

dels MCI únicament en el DA. Aquesta inclusió, que *a priori* semblaria errònia, es podria considerar raonable si tenim en compte que s'han trobat famílies amb individus afectats amb MCI i MC0, i s'ha suggerit que ambdues malformacions podrien tenir una mateixa causa genètica (Markunas et al., 2012). Aquest canvi en el criteri diagnòstic implicaria segurament un canvi en la definició de la MCI o, si més no, en la diferenciació de subgrups basats en les causes del DA. Aquest fet, tot i que implicaria un descens de la mida mostral de posteriors estudis, permetria obtenir una població més homogènia, i per tant, resultats més consistents.

Tot i que el model obtingut demostra que el criteri diagnòstic actual ha de ser modificat, cal reconèixer que el proposat aquí també pot ser millorat. Una possible limitació d'aquest model matemàtic és que per desenvolupar-lo es va partir de pacients amb MCI diagnosticats sota el criteri del DA superior o igual als 3 mm. Tot i que es van seleccionar pacients amb un DA superior als 5 mm, segurament es va incloure algun pacient sense una FCP subdesenvolupada. Basant-nos únicament en pacients amb FCP hipoplàstica, potser alguna altra variable milloraria el model. D'altra banda, el fet d'haver de mesurar set variables en cada pacient per establir-ne el diagnòstic pot semblar un criteri una mica feixuc i difícil de dur a la pràctica. S'ha de tenir en compte, també, que tot i que la probabilitat de diagnosticar correctament és força elevada, no es va assolir el 100%, la qual cosa significaria que algun pacient amb MCI seria erròniament diagnosticat. Potser es podria millorar el model tenint en compte altres paràmetres importants en la MCI (i MC0), com ara la mesura del volum de la FCP, el flux del LCR o el volum dels espais per on aquest ha de passar.

En els darrers anys s'han desenvolupat noves tècniques que poden completar i facilitar el diagnòstic. Són tècniques que permeten l'estudi de la dinàmica del flux del LCR (Armonda et al., 1994; Hofkes et al., 2007; McGirt et al., 2005) i determinen, a nivell del forat magne, el grau d'obstrucció de la seva circulació. Per exemple, la nova seqüència de IRM en contrast de fase, que anul·la el teixit estàtic alhora que remarca les estructures en moviment, permet realitzar un estudi qualitatiu i quantitatiu del LCR abans i després de la intervenció quirúrgica. L'estudi qualitatiu es realitza mitjançant el diagnòstic de cine-RMN de

flux, que captura diverses imatges del LCR durant el cicle cardíac de manera que quan es visualitzen seqüencialment es pot veure el pas del LCR a través dels diferents espais (com l'espai aracnoïdal) i forats (com el forat magne o els ventricles). L'estudi quantitatiu permet estudiar diferents paràmetres del moviment del LCR en un lloc determinat, com és la velocitat del flux i el volum de líquid que hi circula. També existeix el diagnòstic per imatge d'ultrasò Doppler, que és un tipus d'ecografia que permet avaluar, a temps real i en la mateixa intervenció quirúrgica, el flux dinàmic del LCR i les estructures anatòmiques, com les amígdales cerebel·loses.

2.3. Estudi de la cavitat orofaríngia

Més d'un cop s'ha descrit la dificultat que tenen els neurocirurgians i anestesistes a l'hora d'intubar els pacients amb MCI per tal de realitzar la descompressió de la FCP (Hagberg et al., 2005; Menezes and VanGilder, 1988; Mustapha et al., 2011), la qual cosa suposa un risc afegit al tractament quirúrgic. L'estudi de la cavitat orofaríngia en aquests pacients podria ajudar a entendre el per què d'aquests problemes i facilitar la predicció d'una intubació complicada, permetent l'aplicació de les mesures preventives necessàries abans d'iniciar la intervenció quirúrgica.

L'alteració en la FCP en pacients amb MCI és clara i està sent força estudiada, però les alteracions en la cavitat orofaríngia d'aquests pacients són, en canvi, desconegudes.

A més dels símptomes neurològics i motors que presenten el pacients amb MCI, com els mals de cap occipitals, marejos, vertígens, debilitat muscular o pèrdua de la capacitat motora, entre d'altres, s'ha vist que els pacients amb MCI poden manifestar símptomes com tos crònica, estridor, disfàgia, moviment anormal de les cordes vocals, reflux gastroesofàgic, aspiració, infeccions respiratòries recurrents, intolerància a l'alimentació, retard del creixement o alteracions de la son (Choi et al., 1999; Greenlee et al., 2002; Marin-Padilla, 1991; Tubbs et al., 2004b).

La correlació entre disfàgia neurogènica, parèsia de les cordes vocals, alteració respiratòria, o retard en el creixement és ben coneguda en pacients amb MCII (Bell et al., 1987; Cai and Oakes, 1997; Choi et al., 1999; Papasozomenos and Roessmann, 1981), però en pacients amb MCI pràcticament no s'ha descrit. Marín-Padilla, a partir d'observacions realitzades en cranis de fetus humans, va ser el primer en descriure les alteracions orofaríngies d'aquests pacients com a alteracions secundàries produïdes per la insuficiència del mesoderma paraxial; Greenle i col·laboradors van descriure que el 69% dels nens menors de 6 anys amb MCI presentaven anomalies de la funció orofaríngia; i Tubbs i col·laboradors van demostrar enervació en la cavitat orofaríngia en infants amb MCI que presentaven absència d'arcades (Greenlee et al., 2002; Marin-Padilla, 1991; Tubbs et al., 2004b).

Donat que fins ara ningú ha comprovat aquestes observacions en adults, en aquesta part de la Tesi, es va voler corroborar la presència d'alteracions a l'orofaringe en una mostra de pacients adults amb MCI per tal de poder entendre millor aquests símptomes menys coneguts i també altres problemes afegits que apareixen quan són intubats. Amb la selecció de pacients amb $DA > 5\text{mm}$ i una FCP petita (determinat mitjançant el model matemàtic obtingut en l'estudi de la FCP) es va intentar obtenir un conjunt de pacients amb MCI homogeni respecte a la possible causa de la malformació.

2.3.1. Fortalesa de l'estudi

Com en l'estudi morfomètric de la FCP, l'elevat nombre de pacients estudiat (80 pacients i 49 controls) dóna força poder estadístic al treball. De la mateixa manera, el fet que tots els individus tinguin més de 18 anys i que es mantingués la mateixa relació homes/dones en casos i en controls, permet descartar que les diferències obtingues siguin degudes a l'edat o al sexe. Cal esmentar també l'elevat nivell de fiabilitat proporcionat pel test de consistència intraespecífic amb una $ICC > 0,7$ per a cadascuna de les mesures estudiades.

2.3.2. Característiques de la cavitat orofaríngia en pacients amb MCI

Coincidint amb les observacions de Marín-Padilla, en aquest estudi es va observar que els pacients amb MCI presenten una cavitat bucal més petita i un

vel del paladar més llarg i prim comparat amb els controls. En canvi, la diferència en la mida de la llengua, no va ser estadísticament significativa com havia descrit prèviament el mateix autor. Tampoc es van observar alteracions en l'alçada de la laringe. Respecte als diàmetres mesurats a la via respiratòria superior, tampoc es va observar cap diferència significativa. L'epiglotis, en canvi, estava situada més avall en els casos que en els individus control, fet totalment contrari al que havia observat Marín-Padilla, qui l'havia descrit, fins i tot, més amunt de l'habitual (Marin-Padilla, 1991). L'angle Wackenheim també va donar diferències significatives respecte als controls.

El fet que algunes mesures no coincideixin amb les observacions de Marín-Padilla, podria ser degut als canvis anatòmics que es donen a la cavitat orofaríngia al llarg del creixement. Cal recordar que l'estudi realitzat per aquest autor es va basar en fetus humans, a diferència del nostre estudi, realitzat amb individus majors de 18 anys. Un exemple és l'epiglotis, que en infants és més gran i rígida que en l'edat adulta. La mida de la llengua i la seva posició també varien al llarg del creixement, essent més llarga en proporció a la mida de la boca, i localitzant-se de manera més pròxima al paladar, en els infants. La laringe és una altra de les estructures que varia: en infants sol estar localitzada per damunt del coll, a nivell de les C3-C4, mentre que en adults està situada a l'alçada de les C4-C5. Tot i que no explica el perquè de les diferències entre els casos i controls, aquest fet explicaria per què Marín-Padilla va observar més amunt la laringe en els seus pacients respecte al que es va observar en aquest estudi (Infosino, 2002).

Les diferències no són tan significatives si es comparen amb les obtingudes en l'estudi de la morfometria de la FCP (10^{-3} , $^{-4}$ i 10^{-18} , $^{-20}$, respectivament). Això podria explicar-se pel fet que segurament no tots els pacients amb MCI presenten aquestes anomalies. Això explicaria la diferència en la manifestació de símptomes entre els diferents pacients.

2.3.3. Relació de la morfologia observada amb els símptomes en pacients amb MCI

Estudis retrospectius d'històries mèdiques relacionen els problemes de les vies respiratòries amb la morfologia craniofacial (Marin-Padilla, 1991; McNamara, 1981). De fet, se sap que un increment en la longitud i gruix del vel del paladar predisposa a l'obstrucció completa o parcial de les vies respiratòries, i s'ha relacionat això amb la duració dels roncs en la síndrome de l'apnea obstructiva de la son (SAOS) (Akpinar et al., 2011). També, la baixa posició de la laringe pot donar com a resultat un segment de col·lapse més llarg a les vies respiratòries i, per tant, un major risc per la SAOS (Yamashiro and Kryger, 2012).

Els trastorns de la son i les anomalies en la respiració nocturna són alguns dels símptomes manifestats per alguns pacients amb MCI. De fet, s'ha observat que la prevalença de la SAOS en aquests pacients és superior si es compara amb la població general (Ferre Maso et al., 2011). Ara per ara es desconeix el mecanisme fisiopatològic que la produeix, però s'han proposat diverses teories que intenten explicar-ho: una es sustentaria en una PCF petita, que produiria una compressió de les estructures que afectarien a l'estructura i funcionalitat neural; una altra teoria proposa lairingomièlia com la principal causa, la qual s'associa sovint a la disfàgia i disfonia; i la darrera proposa la hipercàpnia. Els nostres resultats mostren que la causa podria estar en les alteracions de la cavitat de l'orofaringe, com el fet de tenir una cavitat bucal més petita de l'habitual, on la llengua segurament ocupa tots els espais lliures; i/o a un vel del paladar anormalment llarg; i/o a una epiglòtis situada més avall. A més, l'anàlisi de correlació realitzada en 41 dels pacients mostra que el gruix del vel del paladar i l'angle de Wackenheim tenen una influència moderada sobre els trastorns de la son. Que aquest angle sigui un dels causants d'aquestes alteracions encaixa perfectament amb els resultats obtinguts en l'estudi d'associacions (veure Apartat 3.2.2 de la Discussió) en que és precisament aquest angle el que sembla estar associat amb les variants de susceptibilitat identificades en el grup de pacients amb MCI estudiades (veure Article 3). Aquest angle, a més, ve donat per la inclinació de l'os del clivus, que com s'ha comentat anteriorment està format

per la fusió de l'os basioccipital amb el basiesfenoide, essent el primer l'os que hom creu que és anormalment més petit i produeix la FCP hipoplàstica.

Tot i que el vel del paladar sol ser més llarg i ample en els pacients amb SAOS, en aquest estudi es va observar que els pacients amb MCI presentaven un vel del paladar llarg, però també més estret. És difícil trobar una explicació a aquest fenomen, però podria ser degut a la proporció alterada entre la cavitat oral i la mida de la llengua. La llengua, de mida normal, en no tenir suficient espai dins la cavitat bucal, més petita de l'habitual, podria pressionar al vel del paladar tot impedit que aquest s'eixamplés com ho faria normalment, i fent, fins i tot, que fos més estret. Aquest mateix fet podria ser el causant d'un vel del paladar més llarg.

Sovint, les estructures anatòmiques que produeixen la SAOS són les mateixes que dificulten la intubació. Així per exemple, el to muscular de la faringe que protegeix la via respiratòria es perd tant quan es dorm com quan s'està sota els efectes de l'anestèsia, la qual cosa predispesa a l'obstrucció de les vies respiratòries, particularment, en aquelles que són més estretes (Hillman et al., 2003). Seguint aquest raonament, el llarg vel del paladar que predispesa a la SAOS podria ser un dels obstacles que compliquen la intubació.

D'altra banda, en aquest estudi es va determinar el nivell de la laringe mesurant la distància entre l'epiglotis i la dent de l'axis. En els nostres pacients hi havia major distància entre les dues estructures, la qual cosa faria pensar que la laringe està situada més avall de l'habitual. Donat que la longitud vertical de les vies respiratòries, que mesura la distància fins la val·lècula, no presenta diferències respecte als individus controls, podríem assumir que l'epiglotis es troba situada a l'alçada habitual. Així doncs, podria ser que o bé l'epiglotis fos més curta de l'habitual, o que el nivell de la base o mida de la dent de l'axis estigués alterada en els pacients amb MCI.

El contacte directe de l'epiglotis i la laringe amb els teixits que envolten la gola i el vel del paladar són els mecanismes existents que eviten l'acumulació de menjar a la cavitat oral i a l'orofaringe. Aquest contacte es trenca breument durant la deglució, quan el vel del paladar s'eleva i l'epiglotis es doblega cap

avall, però després de la deglució es restableix ràpidament (German and Palmer, 2006). El vel del paladar serveix com una aleta mòbil que impedeix que aliments i l'aigua entrin als conductes nasals durant la deglució, de manera que si el vel del paladar és allargat es bloquejarà davant de la via aèria durant la inhalació. De la mateixa manera, l'epiglòtis ajuda a prevenir l'aspiració durant la deglució. L'epiglòtis és desplaçada posteriorment per contracció de la base de la llengua i l'elevació laríngia. Això fa que la vora superior lliure de l'epiglòtis caigui sobre l'entrada de la laringe i tanqui el seu pas, però si l'epiglòtis és més curta de l'habitual, el tancament no es pot fer correctament. Aquestes anomalies, doncs, no només afectarien la intubació, anestèsies i apnees de la son, sinó també la deglució.

2.3.4. Possible relació entre la FCP subdesenvolupada i la cavitat orofaríngia alterada en pacients amb MCI

Segons Marín-Padilla, aquests defectes de la cavitat orofaríngia serien secundaris i es produirien com a resultat de l'adaptació al fet de tenir una base del crani més curta de l'habitual (Marin-Padilla, 1991). Però, com s'ha explicat en el punt anterior, el fet que l'os basioccipital pugui ser anòmal (quant a llargada i inclinació) i pugui causar alteracions tant en la FCP com en la cavitat orofaríngia, donaria suport a la hipòtesi que els canvis siguin primaris, i uns com a conseqüència dels altres. De fet, la formació de la membrana orofaríngia comença a la tercera setmana de gestació (German and Palmer, 2006). La cara, el paladar i les estructures superiors de la cavitat oral es formen a partir dels arcs branquials, que comencen a desenvolupar-se a partir del dia 22 de d'embrió, moment en què comencen a desenvolupar-se les primeres somites que donaran a lloc a l'os occipital. Podria ser que el mateix causant del subdesenvolupament i canvi en la inclinació de l'os occipital fos el que produís aquestes alteracions en la cavitat orofaríngia en els pacients amb MCI. Però no podem explicar per quina raó no tots els pacients amb FCP petita presenten aquesta alteració si tenen un mateix efecte causant.

3. Identificació de variants genètiques de susceptibilitat en pacients amb malformació de Chiari tipus I: selecció de gens candidats i estudi d'associació genètica cas-control poblacional

La MCI és una malaltia que se sospita que té una base genètica, ja que s'ha descrit agregació familiar i s'ha estimat una prevalença familiar d'entre el 3 i el 12% (Milhorat et al., 1999; Schanker et al., 2011; Speer et al., 2000; Tubbs et al., 2011a). L'elevada freqüència de casos esporàdics i el fet que pugui tenir una prevalença més alta del que fins ara s'havia considerat, sembla indicar que podria tractar-se d'una malaltia d'herència complexa, on diversos gens podrien estar alterats.

Fins ara, no s'ha publicat cap estudi d'associació genètica en MCI. L'estudi que es presenta en aquesta part de la Tesi és, doncs, el primer que s'ha realitzat.

3.1. Consideracions generals sobre els estudis d'associació

Entre els diversos tipus d'estudis d'associació genètica, els de tipus cas-control poblacional són els més utilitzats. En aquest tipus d'aproximació es compara la freqüència de variants al·lèliques, genotípiques o haplotípiques comunes entre un grup de pacients i un grup de controls amb l'objectiu d'identificar variants de susceptibilitat o protectores. Diferències estadísticament significatives en les freqüències indiquen la presència d'una variant genètica que contribueix al desenvolupament de la malaltia o que aquesta està a prop. És molt important realitzar un disseny apropiat de l'estudi per maximitzar la probabilitat d'identificar variants de susceptibilitat. En els següents apartats es discuteixen diversos factors que cal tenir en compte en els estudis d'associació genètica de tipus cas-control.

3.1.1. Selecció de gens candidats i polimorfismes

Els gens candidats són aquells que poden estar involucrats en el desenvolupament de la malaltia en estudi segons diversos criteris (veure Apartat 3 de la Introducció). Normalment, de cada gen se seleccionen diverses variants

polimòrfiques. Aquesta selecció és un punt clau en el disseny dels estudis d'associació, de tal manera que els polimorfismes analitzats poden estar directament implicats en la patologia (associació directa) o bé estar en LD amb la variant realment rellevant a nivell funcional (associació indirecta)(Cordell and Clayton, 2005).

Abans, la majoria dels estudis d'associació tan sols contemplaven un nombre reduït de polimorfismes candidats pels quals es tenien evidències de conseqüències a nivell funcional. Les variants situades en regions codificants dels gens que impliquen canvis d'aminoàcid són bones candidates, però aquest tipus de polimorfisme és relativament rar. En un gen poden haver-hi multitud de variants no codificants, com ara canvis situats en zones reguladores de la transcripció, o en seqüències consens pel tall i empalmament d'exons (*splicing*), en d'altres, dels quals es desconeix si tenen rellevància funcional (Cordell and Clayton, 2005). La principal limitació és, doncs, el desconeixement de les possibles implicacions funcionals de la major part dels polimorfismes del genoma humà per manca de suport experimental. La tendència actual en els estudis d'associació amb gens candidats és la cobertura gènica basada en patrons coneguts de LD, la qual cosa incrementa el nombre de marcadors a analitzar i el cost dels estudis. Aquesta és l'estratègia que s'ha seguit en aquest estudi.

L'objectiu comú dels diferents mètodes de selecció és limitar el nombre de polimorfismes a estudiar tot reduint les redundàncies genètiques, però minimitzant alhora la pèrdua d'informació. La majoria de polimorfismes que s'estudien són de tipus SNP, per la seva elevada representació en el genoma (de l'ordre d'una desena de milions), en comparació amb d'altres variacions com les VNTR (nombre variable de repeticions en tàndem) o les insercions/deleccions, i també per la fàcil automatització dels protocols de genotipació. En aquesta Tesi hem optat per treballar amb SNPs. Els criteris de selecció es basen en la detecció de blocs haplotípics o simplement en el LD entre parelles de SNPs (Carlson et al., 2004; Gabriel et al., 2002; Gu et al., 2008), que es poden obtenir a la base de dades de HapMap (www.hapmap.org). S'ha estimat que seleccionant tots els SNPs que no estan correlacionats, és a dir, excloent aquells que estan a $r^2 \geq 0,80$ respecte a un SNP representatiu (tagSNP), la densitat de SNPs necessària per

cobrir una regió genòmica es redueix entre un 75 i un 90% sense pèrdua essencial d'informació.

Respecte a la freqüència de la variant de susceptibilitat, hi ha diferents estratègies.

La hipòtesi de malaltia comuna-variant comuna (*Common Disease-Common Variant*, CDCV) implica que moltes de les variants genètiques presumptament implicades en l'etiologia de les malalties complexes serien comunes a la població, i, en conseqüència, es podrien identificar mitjançant estudis d'associació. L'alternativa recolzada per alguns autors és que la base genètica de les malalties complexes s'explicaria per múltiples variants de baixa freqüència que confereixen un risc moderat a la patologia (Balding, 2006; Zondervan and Cardon, 2004). També s'ha postulat que caldria buscar l'etiologia molecular d'alguns trastorns complexes en la contribució d'un número relativament petit de variants rars d'efecte major (hipòtesi *Common Disease- Rare Variant*, CDRV), i no menor com s'assumeix generalment (Bodmer and Bonilla, 2008).

Per a la selecció de tagSNPs d'aquest treball es va fer servir el programa LD-select (Carlson et al., 2004), que utilitza un algoritme per identificar grups de SNPs (anomenats *bins*), amb una MAF i un valor mínim de r^2 establerts per l'usuari. La genotipació d'un grup reduït de tagSNPs permet capturar la major part de la variabilitat genètica de la regió. En el disseny de l'estudi es van seleccionar tots els tagSNPs amb $r^2 < 0,85$ en relació a tots els SNPs genotipats a cada gen en la fase II+III del projecte HapMap, tot afegint-hi les 5kb flanquejants a 5' i 3', amb MAF superior a 0,15 (menys de 20 tagSNPs en el gen) o superior a 0,25 (més de 20 tagSNPs). A més, una vegada genotipats els marcadors a la nostra sèrie d'individus, es van establir els patrons de LD dins la nostra població control, i es van eliminar de l'estudi aquells marcadors que, tot i presentar valors de $r^2 < 0,85$ en relació a qualsevol altre marcador segons HapMap, assolien valors superiors a 0,85 a la nostra població (17 SNPs). Tot i que descartar informació és sempre poc desitjable, la pèrdua és limitada en comparació amb els beneficis que s'obtenen per la simplificació de les anàlisis i l'increment del poder estadístic de l'estudi, conseqüència de la reducció del nombre de comparacions (Balding,

2006). També es van eliminar aquells SNPs amb percentatges d'individus genotipats inferior al 85% (40 SNPs en total).

Aquestes reduccions han fet que el nivell de cobertura dels gens estudiats no sigui òptim en alguns casos, de manera que els resultats obtinguts no són necessàriament concloents, especialment si són negatius. Un exemple serien els gens *CRABP1* i *MESP2*, amb una cobertura gènica del 50%. Una alternativa seria utilitzar, un cop es disposa dels resultats de la genotipació, tècniques alternatives per aquelles variacions que no s'han pogut determinar.

Independentment de l'estratègia adoptada per a l'estudi, en darrer terme serà necessari realitzar estudis funcionals per determinar el possible paper causal d'una variant genètica, ja que la relació de causa-efecte entre gen i malaltia no es pot demostrar tan sols mitjançant els estudis d'associació (Cardon and Bell, 2001).

3.1.2. Determinació del fenotip en una malaltia complexa

El grup de pacients inclosos en aquest tipus d'estudi ha de ser el més homogeni possible per facilitar la identificació dels factors genètics subjacents. Incloure diferents fenotips incrementa l'heterogeneïtat i pot conduir a la no detecció d'associacions reals (falsos negatius o errors de tipus II).

Com s'ha comentat en la primera part de la Discussió, els pacients van ser inclosos a l'estudi seguint el criteri radiològic actual del DA. Donada la possibilitat que la mostra fos heterogènia en relació a la causa del DA, en aquest estudi es va realitzar una segona anàlisi incloent únicament aquells individus que, segons el model logístic obtingut prèviament (veure Article 1), determinava una FCP subdesenvolupada. Per diferents motius (veure Apartat 2.1 de la Discussió), només es van poder analitzar les IRM corresponents a 211 pacients amb MCI, dels quals, 186 van resultar tenir una FCP petita segons el model.

3.1.3. Errors de genotipació

Els estudis cas-control poblacionals són especialment vulnerables a errors de genotipació en comparació amb els estudis basats en famílies, ja que no es poden detectar possibles errors tècnics mitjançant anàlisis de segregació (Abou-

Sleiman et al., 2006). Generalment els estudis d'associació comporten la genotipació d'un gran nombre de SNPs en una gran quantitat de mostres. Errors en l'assignació de genotips a petita escala o aleatoris no tendeixen a incrementar els errors de tipus I (falsos positius) ja que en principi s'esdevenen de forma independent d'estatus; no obstant, tenen com a conseqüència una pèrdua de poder estadístic (Abou-Sleiman et al., 2006; Gordon and Finch, 2005; Miller et al., 2008b; Pompanon et al., 2005).

A nivell pràctic, les contramesures habituals comprenen la inclusió de mostres duplicades dins de plaques i entre plaques, la utilització de controls negatius i la comprovació de l'assignació genotípica per seqüenciació d'un grup de mostres de cada grup (Abou-Sleiman et al., 2006). Alguns autors han suggerit que seria desitjable incloure dades confirmatòries mitjançant una segona tècnica de genotipació per verificar l'exactitud de les dades (Chanock et al., 2007), però la fiabilitat de les metodologies actuals no ho fa necessari.

De forma habitual, es mesura l'equilibri de Hardy-Weinberg (HWE) a la mostra control per comprovar la qualitat de les dades genotípiques sota l'assumpció que una taxa d'errors elevada genera desequilibri (Pompanon et al., 2005). En aquest treball, el llindar de significació per l'HWE es va establir a $P=0,01$ i es van eliminar quatre marcadors de l'estudi perquè no complien aquest criteri.

3.1.4. Estratificació poblacional

L'estratificació poblacional es dona quan la mostra reclutada està formada per una barreja d'individus de característiques diferents, en general en relació amb la seva ètnia, que poden determinar diferències en les freqüències al·lèliques no relacionades amb la malaltia estudiada. El problema sorgeix quan una de les ètnies està representada de forma direccional entre casos i controls, de manera que qualsevol polimorfisme no associat a la patologia que presenti freqüències al·lèliques diferents entre les dues poblacions podria ser erròniament observat com un factor de risc (o protector) en l'estudi d'associacions de casos *versus* controls. Les evidències d'associació poden ser significatives, però en realitat no estarien relacionades amb una influència real de l'al·lel investigat, sinó que

serien degudes a l'estructura de la població (Abou-Sleiman et al., 2006; Cardon and Bell, 2001; Colhoun et al., 2003).

Per tant, l'existència d'ancestres genètics homogenis comuns en casos i controls és necessària, ja que l'evolució històrica dels haplotips i els patrons de LD poden variar significativament entre diferents grups ètnics. S'ha de tenir especialment en consideració aquells casos en què la prevalença de la malaltia és més elevada en un grup ètnic respecte als altres, ja que podria resultar en una sobrerepresentació d'aquesta població entre els casos (Abou-Sleiman et al., 2006). Alguns grups ètnics (com per exemple les poblacions de Sardenya, Finlàndia o Islàndia) tenen un nombre limitat de fundadors, la qual cosa comporta que proporcionin menys heterogeneïtat a la malaltia i regions més àmplies de LD, facilitant, doncs, l'estratègia dels estudis d'associacions (Cardon and Bell, 2001). No és el cas de la població utilitzada en aquest estudi.

Per tal d'evitar la presència d'estratificació poblacional en aquest estudi, la mostra de casos i controls està formada exclusivament per individus d'ètnia caucàsica descendents de població espanyola.

3.1.5. Anàlisi de marcadors individuals

S'ha utilitzat el test Xi-quadrat com a mètode contrast estadístic per determinar si les freqüències genotípiques eren significativament diferents en casos i controls. La hipòtesi nul·la assumeix que no hi ha diferències i per tant que l'associació entre marcador i malaltia és inexistent. Es poden considerar diferents models d'herència (dominant, recessiu, additiu i codominant).

Sovint es desconeix el vertader model d'herència de la malaltia que es vol estudiar i, tot i que una especificació errònia del model genètic redueix la potència de l'anàlisi, l'associació d'una variant genètica amb una malaltia sol avaluar-se assumint un model d'herència additiu, en què el risc de patir la malaltia depèn del nombre de còpies de l'al·lel de risc. Per aquest motiu, en aquest estudi es va realitzar l'anàlisi sota l'assumpció d'aquest model. Només es va treballar amb genotips i no amb al·lels perquè els resultats són més directament traslladables a la realitat clínica; a més, una associació significativa

en una comparació de genotips se sol traduir en un resultat positiu en l'anàlisi per al·lels.

3.1.6. Anàlisi de marcadors múltiples: estimació d'haplotips

A més de l'anàlisi de marcadors individuals és convenient considerar també la possibilitat que la susceptibilitat a la patologia es reforci en considerar combinacions de dos o més marcadors en un gen. En malalties complexes, en què diverses variants genètiques contribuïrien al fenotip, pot resultar interessant analitzar conjunts de marcadors ja que les diferents combinacions al·lèliques poden actuar com un meta-al·lel. Quan una combinació d'al·lels té una freqüència superior entre els casos, es considera que aquella combinació dona susceptibilitat a la malaltia, constituint un haplotip de risc.

La determinació d'aquest haplotip de risc seria senzilla si es disposés dels genotips dels progenitors dels individus estudiats, però donat que en els estudis d'associació poblacionals els individus genotipats no estan emparentats, cal recórrer a mètodes estadístics per estimar aquestes fases.

No hi ha cap procediment estàndard per a la identificació d'haplotips de risc. Així, molts estudis estimen haplotips formats per marcadors físicament consecutius, mentre que d'altres consideren totes les combinacions possibles de marcadors en un gen. En aquest treball, per tal de reduir al mínim el nombre de tests i l'error de tipus I, l'anàlisi es va basar únicament en els blocs de LD que contenien els SNPs que mostraven associació en l'anàlisi de marcadors individuals tot superant les correccions per múltiples comparacions.

3.1.7. Correccions per múltiples comparacions

Com s'ha comentat en l'Apartat 2.1.5 de la Discussió, un elevat nombre d'hipòtesis a contrastar augmenta la probabilitat que algun resultat sigui estadísticament significatiu tan sols per atzar (fals positiu). L'abaratiment dels costos de genotipació ha determinat una tendència a l'augment del nombre de gens i de variants que s'analitzen en els estudis d'associació. Això amplia l'abast dels estudis però implica un increment substancial en el nombre de

comparacions que es realitzen, i per tant, la necessitat d'una correcció del llindar de significació.

Hi ha diversos mètodes de correcció per a múltiples comparacions:

➤ La correcció de Bonferroni per múltiples comparacions:

Com s'ha comentat en l'Apartat 2.1.5 de la Discussió, la correcció de Bonferroni es basa en el nombre de contrastos independents realitzats.

En aquest treball es van analitzar diverses variants pertanyents a un mateix gen i es van eliminar de les anàlisis aquells SNPs que aportaven informació redundant ($r^2 > 0,85$). No obstant, la resta de marcadors dins de cada gen poden presentar nivells no nuls de LD, i per tant, no serien totalment independents, de la mateixa manera que també poden no ser-ho les distribucions genotípiques i haplotípiques. En conseqüència, en aquest treball ajustar el nivell de significació solament pel mètode de Bonferroni era massa conservador i implicava rebutjar associacions potencialment reals. Per aquesta raó es van aplicar, també, altres mètodes.

➤ Mètodes alternatius de correcció per múltiples comparacions:

La utilització de mètodes alternatius més apropiats va en augment entre els investigadors.

Una aproximació és la taxa de falsos descobriments (***False Discovery Rate, FDR***), que calcula la proporció de resultats falsos positius entre tots els resultats positius obtinguts, o dit d'una altra manera, la fracció d'hipòtesis nul·les rebutjades per error. El FDR considera la distribució dels nivells de significació assolits (valors de P) com un tot i discrimina d'entre la distribució uniforme (hipòtesi nul·la) aquells valors que se'n desvien (hipòtesi alternativa), ajustant el nivell de significació.

Una altra solució és la utilització de correccions basades en procediments computacionals tals com el mètode de **correccions per permutacions**. Segons aquesta aproximació, mantenint les dades genotípiques, s'assigna el fenotip de forma aleatòria entre els individus per generar grups de dades que mantenen l'estructura de desequilibri de lligament però que compleixen la hipòtesi nul·la de no associació amb el fenotip, procés que es realitza múltiples vegades. S'obtenen d'aquesta manera nous valors ajustats de significació que es comparen

amb el valor α . L'avantatge d'aquests mètodes és que es poden aplicar tant quan les comparacions són independents com quan estan relacionades.

La selecció d'un tipus de correcció o un altre dependrà de cada estudi, però haurà de ser adequat al conjunt de dades (Abou-Sleiman et al., 2006; Chanock et al., 2007; Curran-Everett, 2000; Gordon and Finch, 2005). En aquest treball es va utilitzar el FDR per a establir un llindar de significació ajustat després de les comparacions genotípiques aplicades a polimorfismes individuals. En canvi, en l'anàlisi d'haplotips, es va utilitzar el mètode de permutacions. La utilització d'aquestes correccions va permetre identificar associacions que no eren significatives en aplicar les correccions de Bonferroni.

3.1.8. Estudis de rèplica

El propòsit de replicar els estudis d'associació és avaluar un resultat positiu obtingut en un estudi particular en una cohort independent.

En els estudis de rèplica cal considerar una sèrie de paràmetres com la mida de la mostra (ha de proporcionar un poder adient per detectar un efecte dèbil, i normalment superar la mida de la mostra inicial) o analitzar els mateixos SNPs en una població de la mateixa ètnia i mateix fenotip que l'estudiada inicialment.

Donat que la prevalença de la MCI s'estima en 0,008 (Meadows et al., 2000; Speer et al., 2003; Vernooij et al., 2007), és a dir, no és gaire elevada, i es requereix força temps per obtenir una mostra amb una mida considerable, no es va poder realitzar un estudi per replicar els resultats obtinguts.

3.1.9. Poder estadístic

Un dels passos fonamentals en el disseny i la planificació d'un estudi d'associació és el càlcul del número d'individus necessari per detectar un determinat efecte genètic sobre una malaltia concreta. El poder estadístic és la probabilitat d'obtenir en un estudi un resultat significatiu quan aquest resultat és cert (Zondervan and Cardon, 2004). S'han de tenir en compte diversos factors en l'estimació del poder estadístic, alguns d'ells desconeguts en bona mesura: la magnitud de l'efecte de la variant responsable, la freqüència al·lèlica del marcador funcionalment rellevant per a la malaltia i la del marcador analitzat, el

LD entre aquests marcadors, la mida de la mostra, la prevalença de la malaltia i el tipus d'herència (Abou-Sleiman et al., 2006). Hi ha un ampli ventall de programes que permeten estimar el poder estadístic per a estudis d'associació (Knight, 2004).

Per aquest estudi es va determinar el poder estadístic tant per a l'anàlisi realitzada amb els 404 pacients amb MCI com per a la realitzada amb la submostra més homogènia, corresponent als 186 pacients amb FCP petita. Assumint una oportunitat relativa (OR) de 1,5, una prevalença de la malaltia estimada en 0,008 (Meadows et al., 2000; Speer et al., 2003; Vernooij et al., 2007), un nivell de significació de 0,05 i una freqüència al·lèlica del marcador funcionalment rellevant per a la malaltia de 0,10 sota un model additiu, es va estimar un poder estadístic del 78% i el 53% respectivament.

3.2. Resultats obtinguts en l'estudi d'associació genètica cas-control en la malformació de Chiari tipus I

La teoria més acceptada per explicar la patogènia en la MCI és la que va proposar Marín-Padilla, basada en la insuficiència del mesoderma paraxial, que es genera entre la tercera i quarta setmana de gestació (Marin-Padilla, 1979; Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981). Per aquest motiu, en aquest estudi es va mirar si hi havia associació genètica entre la MCI i 384 variants polimòrfiques situades en 58 gens diferents implicats en la formació del mesoderma paraxial, de les somites que donen lloc a l'os occipital, de les cèl·lules endotelials, i en l'origen d'algunes de les síndromes genètiques conegudes associades amb la MCI. Es va avaluar, també, si algunes de les variants polimòrfiques estaven associades a algun tret morfomètric de la FCP.

Els resultats que es van obtenir donen suport a la hipòtesi que variants implicades en el desenvolupament del mesoderma paraxial poden afectar la FCP en pacients amb MCI.

3.2.1. Estudi d'associació genètica cas-control

Quan es va realitzar l'anàlisi de marcadors individuals en la mostra sencera (404 pacients), es va detectar associació nominal ($P < 0,05$) entre la MCI i 18 SNPs. Tot i

que tres d'aquests SNPs situats en tres gens diferents (*CDX1*, *FLT1* i *RARG*) van presentar una associació amb un valor $P < 0,01$, cap va resultar significatiu després d'aplicar correccions per múltiples comparacions (Bonferroni i FDR). En canvi, quan es va analitzar la mostra de pacients amb MCI amb una FCP petita (186), van ser 26 els SNPs que van presentar associació nominal, i 13 d'aquests (corresponents a sis gens diferents: *ALDH1A2*, *RDH10*, *CDX1*, *BMPR1A*, *MSGN1* i *FLT1*) van presentar valors $P < 0,01$. En aquesta segona anàlisi, després d'aplicar la correcció FDR al 10% per múltiples comparacions, quatre SNPs corresponents a tres gens diferents (rs887343 al gen *CDX1*, rs17086609 al gen *FLT1* i rs2899611 i rs6493979 al gen *ALDH1A2*) van continuar essent significatius.

El fet que els resultats millorin en la segona anàlisi (en algun cas amb salts de significació d'un ordre de magnitud) és probablement degut a la major homogeneïtat clínica de la mostra.

Quan es va realitzar l'anàlisi per marcadors múltiples (considerant els blocs haplotípics que contenen SNPs amb associacions significatives en l'anàlisi de marcadors individuals) es van obtenir dos possibles haplotips de risc: un constituït per la combinació al·lèlica G-G en el gen *CDX1*, i un altre, constituït per la combinació al·lèlica C-A-G-C-G en el gen *ALDH1A2*.

És cert que l'estudi presenta certes limitacions: una mida mostral no massa gran; pèrdua de cobertura gènica de 12 dels gens seleccionats, manca d'un estudi de rèplica que confirmi els resultats obtinguts, o com s'ha explicat anteriorment, la utilització de població general com a població control (veure Apartat 1.2 de la Discussió). Però els resultats que es van obtenir són interessants, ja que gairebé tots els SNPs associats amb la MCI en l'anàlisi d'un únic marcador ($P < 0,01$), pertanyen a gens que formen part de la via de síntesi de l'AR (*ALDH1A2*, *RDH10*, *RARG*), o bé regulen o són regulats per aquest (*CDX1*, *FLT1*) durant la somitogènesi o la condricació (*BMPR1A*).

L'AR és un derivat de la vitamina A, produït per teixits derivats del mesoderma, essencial en la senyalització cel·lular durant la somitogènesi i organogènesi en vertebrats: regula el procés de formació de les somites generant gradients d'expressió per afavorir la diferenciació de les cèl·lules del mesoderma paraxial en somites, determina la seva identitat axial, regula la condricació i està

involucrat en el desenvolupament de l'endoteli vascular (Aulehla and Pourquie, 2010; Hoffman et al., 2006; Lai et al., 2003). Marín-Padilla va observar que elevades dosis de vitamina A en hámsters prenyades induïa una descendència amb fenotip de MCI i MCII amb os basioccipital curt que produïa una FCP petita (Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981).

Perquè la vitamina A pugui actuar sobre el desenvolupament ha de transformar-se en retinol, que és transportat fins a les cèl·lules i incorporat, convertir-se en AR (en dos passos diferents), ser transportat al nucli cel·lular on és reconegut per receptors nuclears i, aleshores, ser capaç d'interaccionar amb els elements de resposta a l'AR (RARE) de certs gens tot regulant la seva transcripció (Figura 25).

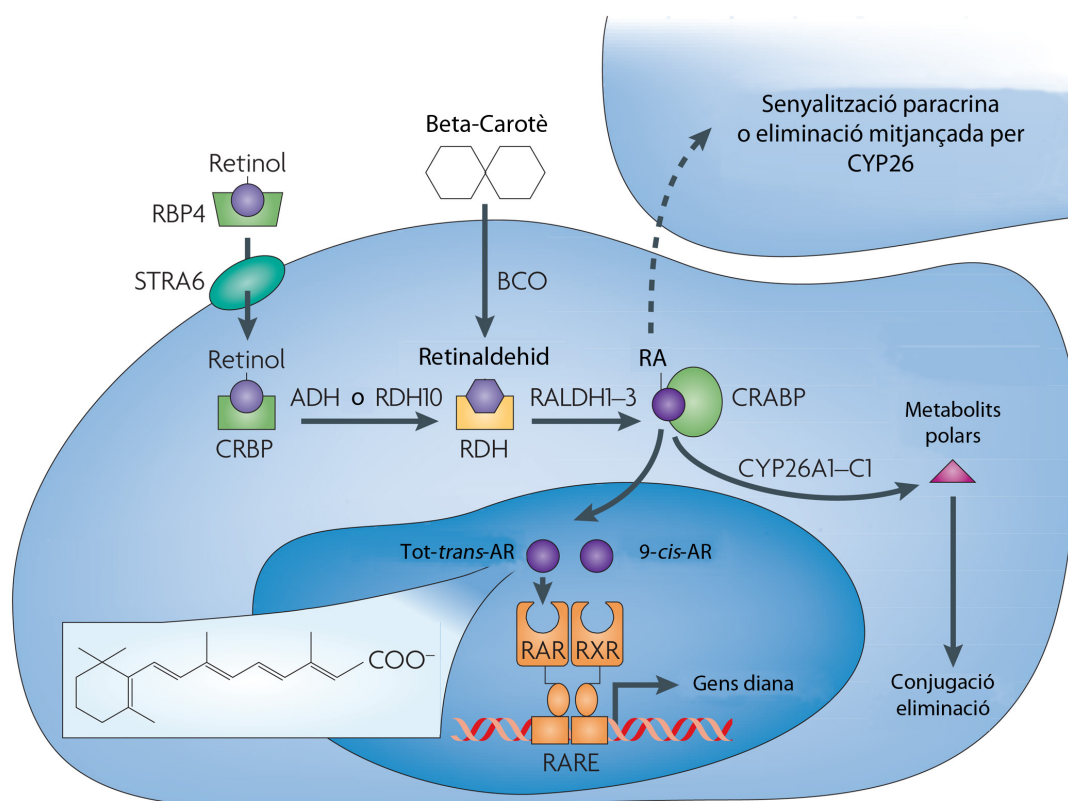


Figura 25. Via de senyalització de l'àcid retínoic. El retinol és transportat fins les cèl·lules per la proteïna RBP4 i incorporat mitjançant el transportador STRA6. Dins la cèl·lula és oxidat, primer per RDH10, i després per RALDH. L'àcid retínoic produït com a resultat d'aquestes oxidacions pot ser, aleshores, degradat per CYP26A1 o bé transportat al nucli cel·lular. Dins del nucli és reconegut per receptors nuclears, podent interaccionar amb els elements de resposta a l'AR (RARE) de cert gens i regular la seva transcripció.

El gen *RDH10* codifica el primer enzim de la via la transformació del retinol en AR (l'oxida i dóna lloc al retinaldehid); *ALDH1A2* codifica per l'enzim que oxida el retinaldehid i el converteix en AR, i *RARG*, el gen que codifica un dels receptors nuclears que, en formar heterodímers, reconeix les seqüències RARE (Niederreither and Dolle, 2008). Sembla que la quantitat d'AR és important en el desenvolupament ja que s'ha observat que l'exposició a elevades dosis d'AR produeix disrafisme congènit en humans (Lammer et al., 1985), i també que mutacions en *RDH10* (i per tant, incapaces de sintetitzar AR) produeixen anomalies letals en múrids (Sandell et al., 2007). *ALDH1A2* és el primer gen de la via de síntesi de l'AR que s'expressa, induït a la línia primitiva i a les cèl·lules mesodèrmiques durant la gastrulació. En ratolins *knock-out* s'ha demostrat que *ALDH1A2* és el gen responsable de tota la producció d'AR a l'inici de l'embriogènesi. La seva deficiència afecta molts sistemes que en aquell moment s'estan desenvolupant, entre ells, les somites que són més petites quan hi ha disminueix l'expressió d'*ALDH1A2* (Niederreither and Dolle, 2008).

Un dels papers que de l'AR en les somites que s'estan desenvolupant és l'activació de l'expressió dels gens *HOX*, essencials en el desenvolupament axial anteroposterior i en l'establiment de la simetria bilateral (Aulehla and Pourquie, 2010; Duester, 2008; Niederreither and Dolle, 2008). Alteracions en aquests gens homeòtics poden estar implicats en l'origen dels defectes de la columna vertebral, com l'escoliosi (Kane, 1977), present en un 20% dels individus estudiats. L'AR pot regular de manera directa els gens *HOX* o bé fer-ho mitjançant intermediaris, com el gen *CDX1* (Houle et al., 2003). Els ratolins *CDX1*^{-/-} tenen alteracions homeòtiques en l'esquelet axial semblants a les que produeixen els mutants nuls en *RAR*_{α/γ}, i també alteracions en l'os basioccipital (Houle et al., 2003).

BMPR1A és el gen que codifica el receptor de les BMP de tipus IA. És necessari a l'epiblast per regular el reclutament correcte de les cèl·lules del mesoderma paraxial i dirigir el desenvolupament de les somites. De fet, s'ha vist que si se suprimeix parcialment l'expressió del gen es formen somites més amples (Miura et al., 2006). Les proteïnes BMP també juguen un paper important en l'ossificació tot estimulant la formació de cartílag. S'ha observat que la vitamina A i els seus

metabòlits també intervenen en el procés condrogènic s'ha vist que la vitamina A i els seus metabòlits també intervenen, però en aquest cas, inhibint la formació dels condroblasts. El gen *ALDH1A2* està regulat per les proteïnes BMP, de manera que les proteïnes BMP, que determinen una disminució de l'AR tot estimulant la formació de cartílag (Hoffman et al., 2006).

FLT1, en canvi, codifica per un dels receptors dels VEGFs. Està involucrat en la formació dels capil·lars i en el desenvolupament vascular durant l'embriogènesi. Les primeres manifestacions de vasculogènesi s'observen el dia 21 dpc, al mateix temps que es formen les quatre primeres somites (Demir et al., 2007). Mutacions en *FLT1* produeixen desorganització endotelial i anomalies en la formació dels vasos. L'AR també regula la formació dels vasos sanguinis suprimint el creixement cel·lular endotelial. La transcripció de *FLT1* està regulada per *ALDH1A2* (Lai et al., 2003).

El gen *MSGN1* sembla ser l'únic que no interacciona amb l'AR o els seus metabòlits. Està regulat per Wnt i TBX6 durant la maduració i segmentació del mesoderma paraxial en ratolins (Wittler et al., 2007).

Cap de les quatre variants associades a la MCI (rs887343 al gen *CDX1*, rs17086609 al gen *FLT1* i rs2899611 i rs6493979 al gen *ALDH1A2*) estan situades en regions codificants, per la qual cosa no tenen conseqüències directes sobre la seqüència proteica. Es van explorar altres possibilitats utilitzant el *software* SNPfunction (Xu and Taylor, 2009), que permet avaluar possibles efectes funcionals per variacions en llocs de reconeixement de factors de transcripció, alteració en els llocs de tall i empalmament d'exons, o afectació de la síntesi proteica per interferència amb llocs d'unió a microARN. No obstant, no es van obtenir resultats significatius. Finalment, podria ser que l'alteració funcional fos deguda a altres variants en LD amb aquelles que presenten associació en el nostre estudi.

3.2.2. Anàlisi de la relació entre la morfometria de la FCP i les variants genètiques

Quan es va avaluar si les quatre variants associades a pacients amb MCI (amb FCP petita) estaven relacionades amb les característiques morfomètriques de la FCP, només els SNPs rs2899611 i rs6493979 del gen *ALDH1A2* van mostrar relació amb l'angle basal i l'angle de Wackenheim. Tot i que no es va observar una relació directa amb cap de les característiques més típiques de la FCP (com la longitud del clivus, les àrees de la FCP i el diàmetre antero-posterior de la FCP), el resultat obtingut és interessant, ja que tant l'angle basal com l'angle de Wackenheim vénen donats per la inclinació del clivus, i per tant de l'os basioccipital. Aquests resultats podrien indicar que aquests genotips de risc poden tenir influència sobre la inclinació de la part basilar de l'os occipital, fent que els pacients amb MCI amb FCP petita tinguin una predisposició a tenir un angle basal més obtús, i per tant, més probabilitats de presentar platibàsia, anomalia associada a la MCI (veure Apartat 1.4 de la Introducció).

3.2.3. Possible relació entre la MCI i la MCII

La MCII es caracteritza per una FCP petita (on a més de donar-se DA del cerebel, també es produeix l'herniació del bulb raquidi i del quart ventricle a través del forat magne), mielomeningocele i hidrocefàlia. Tot i presentar característiques comunes, sovint s'ha considerat la MCII com una anomalia independent de la MCI (Milhorat et al., 1999; Speer et al., 2003). Marín-Padilla va demostrar, en canvi, que totes dues malformacions podrien ser induïdes en el fetus, administrant un excés de vitamina A en la mare (Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981). La seva hipòtesi postulava en què l'excés de vitamina A afectaria el nombre de cèl·lules inicials que formen el mesoderma paraxial, fent que aquest resulti insuficient. Se sap que el tancament del tub neural es dona entre els dies 21 i 28 de l'embrió, quan la placa neural es plega i tanca per donar lloc al tub neural. El mesoderma paraxial és la capa situada just per sota de la placa neural, i sembla que seria la responsable d'impulsar el seu tancament (Figura 26). D'aquesta manera, un mesoderma paraxial deficitari, no impulsaria prou el tancament i donaria lloc a una espina bífida.

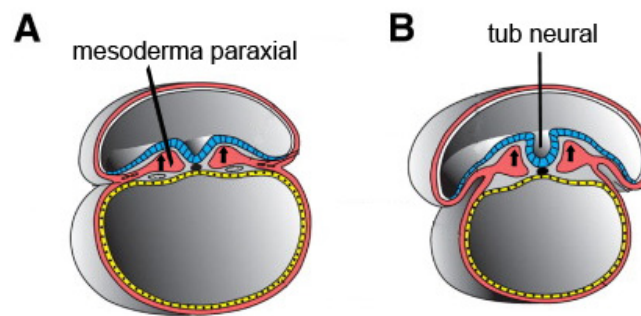


Figura 26. Esquema del tancament del tub neural. Els laterals de la placa neural (en blau) s'eleva, impulsats des de sota pel mesoderma paraxial, per convergir i tancar-se donant lloc al tub neural.

Així doncs, en funció del moment en què el mesoderma quedés afectat, es produirien unes somites més petites que acabarien afectant l'os occipital, i per tant, la FCP (és el que succeiria amb els pacients amb MCI), el tancament del tub neural, o a tots dos alhora (és el que succeiria amb els pacients amb MCII) (Marin-Padilla and Marin-Padilla, 1981).

Tot i que es coneix la importància que té l'àcid fòlic en el tancament del tub, el mecanisme biològic exacte que hi intervé roman desconegut. En MCII s'han dut a terme diversos estudis genètics per avaluar els gens implicats en el tancament del tub neural i també els causants de la mielomeningocele (Au et al., 2010; Boyles et al., 2005; Greene et al., 2009). Els gens implicats en la síntesi i metabòlits de l'AR i els seus derivats es consideren bons candidats a ser responsables del defecte en el tancament del tub neural, de la mateixa manera que també ho són altres gens del desenvolupament, com ara gens implicats en els mecanismes de reparació de l'ADN, estrès oxidatiu o migració cel·lular (Au et al., 2010). Per aquest motiu, en alguns d'aquests estudis es van considerar gens que també s'han estudiat en aquest treball (*CRABP1*, *CRABP2*, *ALDH1A2*, *RALDH2*, *CYP26*, *HOX*, *NOG*, *SHH* i *TBX6*) però en cap d'ells es va identificar una mutació o detectar associació consistent amb el defecte en el tancament del tub neural o la MCII (Taula 11).

Taula 11. Gens del desenvolupament embrionari prèviament estudiats per la seva possible implicació en el tancament del tub neural i seleccionats per a l'estudi d'associació realitzat en aquest treball.

Gen	Origen població estudiada	Mida mostra	Significatiu	Tipus d'estudi	Resum resultats obtinguts en NTDs	Referències
<i>ALDH1A2</i>	Americà	318 famílies SB	Si	Estudi d'associació basat en famílies	Associació feble en 3 SNPs	(Deak et al., 2005)
<i>CRABP1</i>	Americà	230 casos SB, 318 famílies SB	No	Anàlisi mutacional i estudi d'associació basat en famílies	No evidència d'associació (3 SNPs analitzats)	(Deak et al., 2005)
	Americà caucàsic	477 casos esporàdics i familiars, 153 controls	No	Anàlisi de polimorfismes	No evidència d'associació (2 SNPs)	(Dickerson et al., 2002)
<i>CRABP2</i>	Americà	230 casos SB	No	Anàlisi mutacional	No evidència d'associació	(Deak et al., 2005)
	Americà caucàsic	477 casos esporàdics i familiars, 153 controls	No	Anàlisi de polimorfismes	No evidència d'associació (3 SNPs)	(Dickerson et al., 2002)
<i>CYP26A1</i>	Americà	230 casos SB	No	Anàlisi mutacional	No evidència d'associació	(Deak et al., 2005)
<i>CYP26B1</i>	Americà	230 casos SB, 318 famílies SB	No	Anàlisi mutacional i estudi d'associació basat en famílies	No mutació. No evidència d'associació (5 SNPs analitzats)	(Deak et al., 2005)
<i>CYP26</i>	Americà caucàsic	477 casos esporàdics i familiars, 153 controls	No	Anàlisi de polimorfismes	No evidència d'associació	(Dickerson et al., 2002)
<i>HOX</i>	Americà caucàsic i descendent de mexicans i hispans	459 casos SB i familiars	No	Anàlisi de polimorfismes	No evidència d'associació per als gens <i>HOXA</i> , <i>HOXB</i> , <i>HOXC</i> i <i>HOXD</i>	(Volcik et al., 2002)
<i>NOG</i>	Alemanys i britànics	79 casos i famílies	No	Estudi d'associació basat en famílies	Una mutació, però no específica de la malaltia	(Morrison et al., 1998)
	Americà caucàsic	202 casos	No	Anàlisi de polimorfismes	Mutació present en un cas, però no en cap membre de la família	(Bauer et al., 2002)
	Alemanys	179 casos	No	Anàlisi de polimorfismes	Un polimorfisme trobat en un pacient, però també al seu pare i en un individu control	(Felder et al., 2002)
<i>RALDH2</i>	Americà caucàsic	477 casos esporàdics i familiars, 153 controls	No	Anàlisi de polimorfismes	Evidència limitada per afirmar que hi ha associació	(Dickerson et al., 2002)

SHH	Irlandès	78 famílies, 49 amb DTN	No	Anàlisi mutacional	No evidència d'associació	(Vargas et al., 1998)
	Americà	50 casos i 50 controls	No	Anàlisi de polimorfismes	Un SNP intrònic sense evidència d'associació	(Zhu et al., 2003)
T	Irlandès	218 trios cas-pares	No	Anàlisi pel polimorfisme T1VS7-2	1 variant a l'intró 7: inconsistent evidència d'associació	(Shields et al., 2000)
	Alemanys i Irlandès	79 casos i familiars	Si	Anàlisi pel polimorfisme T1VS7-2 i A530G	Evidència de associació, però tan sols en 6-18% dels casos amb DTN	(Morrison et al., 1998)
	Americà (barreja)	96 casos esporàdics i 13 famílies informatives	No	Estudi d'associació basat en famílies	No evidència d'associació	(Trembath et al., 1999)
	Alemanys	183 casos i 266 controls	No	Anàlisi pel polimorfisme T1VS7	No evidència d'associació	(Richter et al., 2002)
	Americà caucàsic	125 casos; 86 famílies	No	Anàlisi mutacional del gen sencer i desequilibri de lligament pel polimorfisme T1VS7	No evidència d'associació	(Speer et al., 2002)
	Irlandès	320 famílies	Si	Estudi d'associació basat en famílies	Associació no significativa	(Pangilinan et al., 2012)

SB=espina bífida; DTN=defectes del tub neural

Tot i que els resultats obtinguts en el nostre treball no són concloents (per falta d'estudis de rèplica), i són diferents als obtinguts fins ara en estudiar els gens relacionats amb el defecte en el tancament del tub neural, no es pot descartar que es MCI i MCII estiguin relacionades etiològicament, potser no a nivell de gens concrets però si de vies funcionals.

3.2.4. Possible relació entre la MCI i la MC0

La MC0 té una simptomatologia similar a la MCI, amb una FCP petita i escurçament de l'os occipital, però sense DA.

S'han descrit famílies amb membres que presenten MCI i MC0 en generacions alternes per la qual cosa s'ha proposat que ambdues malformacions serien realment un continu de la mateixa condició (Markunas et al., 2012). De fet, a la gran família de 12 afectats amb MCI que va estudiar el nostre grup de recerca, i que es va sotmetre a anàlisi de lligament genètic, sembla que es compleix (Figura 27). Tot i que es podria atribuir a un efecte epigenètic, no es descarta que hi hagi un efecte genètic comú, encara desconegut (Markunas et al., 2012).

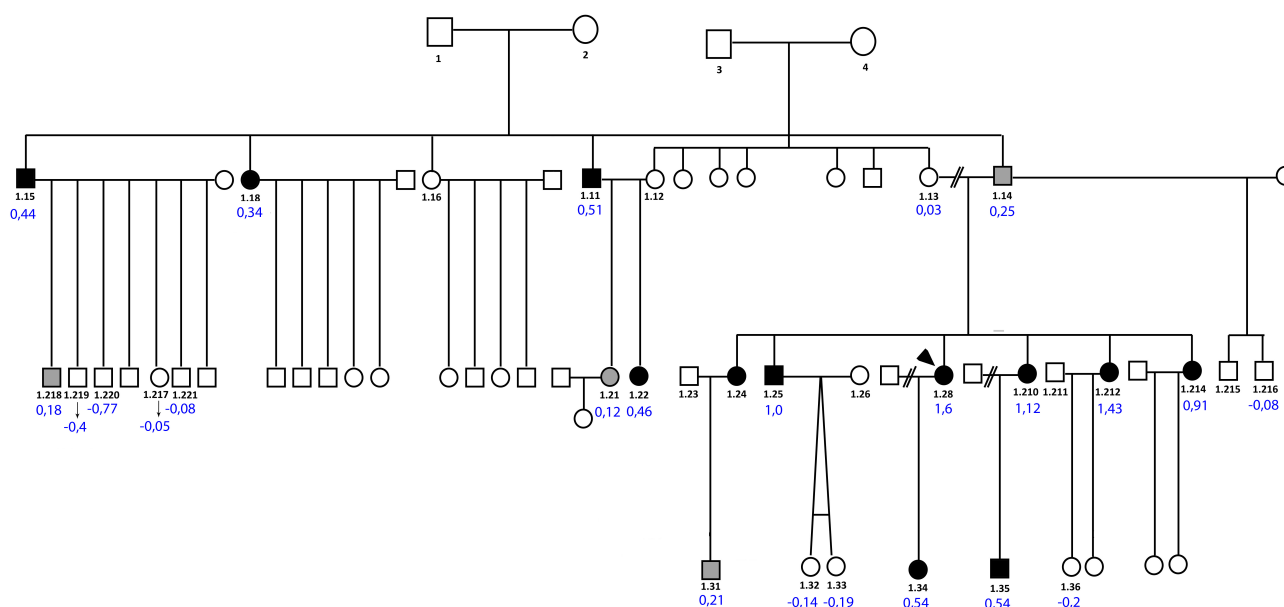


Figura 25. Arbre genealògic d'una família amb individus amb MCI i MC0. Els símbols colorejats en negre corresponen als pacients amb MCI, en gris, els pacients amb MC0 i en blanc, els sanes. A sota, els valors en blau, corresponen al DA mesurat en les IRMs.

En aquest treball es van estudiar les variants gèniques comunes en pacients amb MCI, però seria interessant repetir l'estudi amb pacients amb MC0 i comparar els resultats. El problema rau en el fet que la MC0 es una malformació poc descrita, relativament rara, de la qual es desconeix fins i tot la prevalença. Potser en un futur, quan la caracterització dels pacients sigui millor i es puguin diferenciar bé MCI i els MC0, es podran realitzar estudis d'associació basats en famílies.

4. Anàlisi genètica de formes monogèniques en la malformació de Chiari tipus I: anàlisi mutacional del gen *SUZ12* i seqüenciació d'exomes

Tot i que els resultats de l'estudi d'associacions realitzat en el marc d'aquesta Tesi donen suport a la hipòtesi que la MCI podria ser causada per la contribució de diverses variants comunes d'efecte menor en gens diferents, no es pot descartar la possibilitat que en les formes complexes de MCI algunes variants rares puguin participar també en la determinació del fenotip, potser en combinació amb variants comunes. A més, podria ser que algunes famílies concretes presentin una herència mendeliana, amb una única variant en un únic gen com a agent causal. El fet que en l'anàlisi de lligament realitzada prèviament pel grup en una família multigeneracional (veure Apartat 2.2.1.1. de la Introducció) s'identifiqués una regió amb una elevada probabilitat de contenir la variant causal de la MCI, assumint un model d'herència autosòmica dominant d'alta penetrància, podria indicar que en aquesta família la malformació té una etiologia mendeliana monogènica.

4.1. Consideracions generals sobre els estudis de cribratge mutacional

L'anàlisi mutacional és una metodologia que s'utilitza per detectar la presència de variants en una regió genòmica d'interès. Es pot enfocar a una variant concreta, ja descrita prèviament, o bé a la detecció de qualsevol variant genètica, independentment de si està descrita o no. La primera aproximació s'utilitza en

aquelles malalties en què la major part d'individus afectats presenten les mateixes variants (ja sigui perquè hi ha *hot spots* mutacionals o perquè s'ha produït un efecte fundador), o quan es realitza un estudi amb famílies, per confirmar l'absència de la variant candidata en els membres sans, i la seva presència en els afectats. En el segon cas, en canvi, el cribratge es dirigeix a tota la regió genòmica d'interès. El nostre estudi entraria dins del segon grup, ja que per una banda s'ha seqüenciat un gen candidat concret en un número determinat de pacients, i per l'altra s'ha obtingut la seqüència sencera de l'exoma (la fracció codificant del genoma) en individus d'una família en què prèviament s'havia identificat un *locus* candidat mitjançant anàlisi de lligament genètic.

4.1.1. Metodologies de cribratge mutacional

Es poden utilitzar diferents tècniques per dur a terme un cribratge mutacional, com l'anàlisi de polimorfismes de cadena senzilla (*Single Strand Conformation Polymorphism Analysis*, SSCP), la digestió enzimàtica, la seqüenciació pel mètode de Sanger, o la seqüenciació massiva (NGS), entre d'altres. La seqüenciació és el mètode més directe i el més utilitzat, tot i que no sempre és el més adequat, ja que determinats tipus de mutacions, com les que impliquen reordenaments grans de material genètic, encara no es poden detectar de forma sistemàtica i fiable utilitzant la seqüenciació.

S'ha observat que el 85% de les causes genètiques conegudes de trastorns mendelians afecten les regions del genoma que codifiquen proteïnes (Botstein and Risch, 2003). Per aquest motiu, i pel cost econòmic i les dificultats tècniques que pot comportar, poques vegades se seqüencia un gen complet, sinó que els estudis se centren habitualment en els exons i en les regions que poden tenir influència sobre els nivells d'expressió del gen o sobre l'estructura de l'ARN missatger (sobretot els promotors, les regions UTR i els donadors o acceptors de *splicing*). És per això que en aquesta Tesi tant en l'estudi realitzat sobre un gen candidat concret com en l'estudi de seqüenciació d'exomes es va optar per aquesta estratègia.

4.1.2. Anàlisi de la variant identificada

Mitjançant la comparació de la seqüència obtinguda amb una seqüència de referència es detecten les variants potencialment implicades en la patologia. És important esbrinar de quin tipus de variant es tracta (canvi de nucleòtid, inserció o deleció) i considerar en quina regió del gen està situada (regió codificant, promotor, UTR, regions de tall i empalmaments d'exons o introns). També és important determinar si la mutació és absent en una població control, així com determinar possibles efectes funcionals, primer *in silico* i finalment amb suport experimental.

Gràcies a diferents consorcis i projectes, com el Projecte Genoma Humà (Consortium, 2004; Kidd et al., 2008), el Consorci dels 1000 genomes (Consortium, 2010; Consortium, 2012b) o el projecte ENCODE (Consortium, 2012a) actualment es disposa de molta informació sobre el genoma humà (seqüència, gens, SNPs o variants estructurals del genoma, elements funcionals) que facilita l'anàlisi dels resultats dels cribratges mutacionals.

4.1.2.1. Exclusivitat de la mutació en el pacient

Per descartar que la variant trobada sigui un polimorfisme encara no present a les bases de dades, és necessari descartar que individus sans la presentin. D'entrada, si hom disposa de mostres d'ADN de parents de l'individu afectat en què s'ha identificat la mutació, cal comprovar la segregació del canvi a la família.

A més cal seqüenciar un mínim de 100 individus control del mateix grup poblacional que el pacient per tal d'assegurar que la variant no hi és present, i que per tant, aquesta tindria en principi una freqüència <1%. És previsible que aquest requeriment es vegi progressivament substituït per la simple comprovació de la presència o no de la variant en bases de dades multiètniques com la dels 1000 genomes que actualment conté més de 2000 genomes complets seqüenciats, entre els que s'hi inclouen 100 genomes de poblacions ibèriques d'Espanya (Consortium, 2012b).

4.1.2.2. Predicció de l'efecte patogènic de la variant

Tot i la gran quantitat d'informació de què disposem actualment sobre el genoma humà, encara hi ha variants genètiques de les quals es desconeix l'efecte biològic. Per esbrinar-ho, cal realitzar experiments que demostrin la rellevància funcional del canvi. Però això no sempre és possible, de manera que una alternativa és recórrer a les prediccions bioinformàtiques del possible impacte de la variant sobre el producte final. Hi ha diversos programes que fan prediccions, utilitzant diferents mètodes., que solen assignar finalment un valor entre 0 i 1 a la mutació, sent zero el valor de la predicció d'un impacte nul en el producte final. Un exemple és el **programa PolyPhen-2** (PPH2), que prediu els efectes funcionals de la substitució d'un aminoàcid en l'estructura i funció de la proteïna humana tenint en compte consideracions físiques i comparatives (Adzhubei et al., 2010). Un altre mètode de és la **predicció SIFT** que també prediu el possible efecte d'un aminoàcid en la funció proteica però basant-se en el grau de conservació evolutiva dels residus aminoacídics i en les seves propietats físiques (Kumar et al., 2009; Ng and Henikoff, 2006). **Condell** avalua l'impacte de les variants d'un únic nucleòtid (SNVs) no sinònimes en la funció proteica ponderant la puntuació donada per 5 eines diferents, entre elles SIFT i PPH2 (Gonzalez-Perez and Lopez-Bigas, 2011), i **SNPfunction** avalua les possibles conseqüències funcionals de diferents tipus de variants genètiques presents a la base de dades de HapMap, incloent canvis d'aminoàcid però també alteracions en regions reguladores o de tall i empalmament d'exons (Wang et al., 2006). **ESE finder** prediu si les variants poden interferir en el tall i empalmament d'exons (Cartegni et al., 2003; Smith et al., 2006).

L'eina **Variant Effect Predictor** de l'Ensembl genera un llistat de posicions i al·lels en diferents transcrits, i prediu l'efecte de cadascuna de les variants en cada transcrit. La predicció es fa a partir de tres algorismes diferents: PolyPhen, SIFT i Condell (McLaren et al., 2010).

4.2. Anàlisi de gens candidats: *SUZ12*

4.2.1. El gen *SUZ12* com a candidat

Aquest gen es va considerar candidat per a la malformació de Chiari I (i II) a partir de l'estudi publicat per Miró i col·laboradors en què es constata que l'haploinsuficiència del gen *Suz12* murí podia donar lloc a fenotips similars a la MCI i a la MCII (Miro et al., 2009).

La seva candidatura es reforçava, a més, per la seva localització cromosòmica, ja que és un gen que es troba dins la regió del cromosoma 17 identificada en l'anàlisi de lligament realitzada prèviament pel nostre grup amb una família MCI (veure Apartat 2.2.1.1 de la Introducció), i molt proper al gen responsable de la NF1, una síndrome que pot estar associada a la MCI (veure Apartat 2.1.1.3 de la Introducció) (Figura 28).

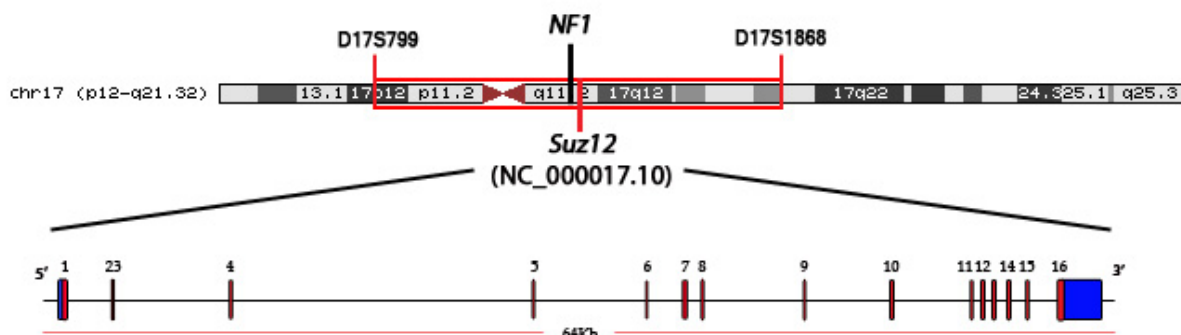


Figura 28. El gen *SUZ12*. El gen *SUZ12* (NC_000017.10) està situat al chr 17 dins la regió obtinguda en l'anàlisi de lligament (on D17S799 i D17S1868 són els marcadors que delimiten la regió). El gen *SUZ12* té una longitud de 64kb i està comprès per 16 exons. Està situat molt a prop del gen *NF1* on s'ubiquen moltes de les mutacions responsables de la Neurofibrosi de tipus I, associada a pacients amb MCI.

El gen *SUZ12* codifica la proteïna SUZ12, que forma part del complex repressor policomb 2 (PRC2) juntament amb EED i EZH2 (Cao et al., 2002). Els PRC (1 i 2) actuen com a silenciadors gènics epigenètics tot regulant l'expressió de nombrosos gens del desenvolupament que controlen la proliferació cel·lular, la identitat cel·lular, així com també la inactivació del cromosoma X. No es coneix el mecanisme exacte pel qual indueixen la repressió, però es creu que les modificacions que indueixen en les histones poden interferir amb la dinàmica

dels nucleosomes (oligomerització i condensació de la cromatina) i modificar l'inici de transcripció (Figura 29) (Lee et al., 2006; Spivakov and Fisher, 2007).

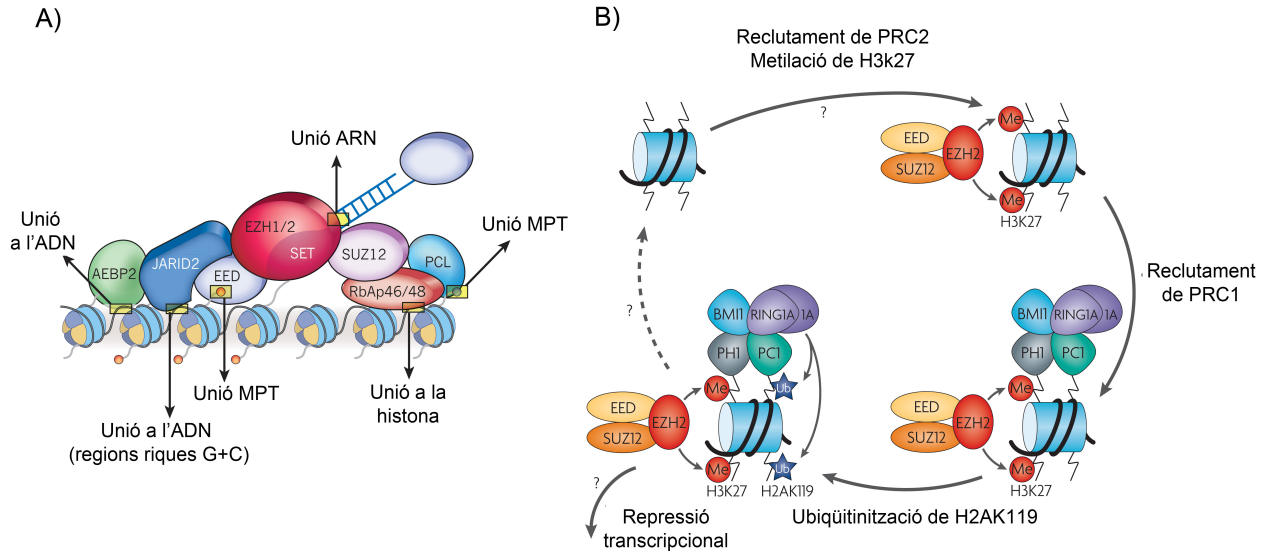


Figura 29. Estructura i funció del complex repressor polycomb 2. En A) es mostra el PRC 2 amb totes les unitats que el conformen. En B) el mecanisme de regulació de l'expressió gènica: se sap que quan s'ensambla el PRC2, EZH2 metila la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me). Aquesta modificació recluta PRC1 amb el qual ubiquitina la histona 2 (H2AK119). Adaptats de (Margueron and Reinberg, 2011; Spivakov and Fisher, 2007).

S'ha observat que SUZ12 és capaç de reconèixer elements no codificants altament conservats (illes CpG) dins dels promotors. De fet, s'ha associat SUZ12 amb 1893 promotors dels 22500 gens humans, entre ells, els dels gens *HOXA*, *HOX B*, *HOXC* i *HOXD*, els quals, com s'ha explicat anteriorment, són clau en la determinació axial de les somites (Lee et al., 2006). Aquesta troballa indica que el 8% dels gens que codifiquen proteïnes són ocupats per SUZ12 en les cèl·lules embriològiques, demostrant així, un important paper en la regulació de l'expressió gènica.

4.2.2. Consideracions metodològiques: especificitat dels encebadors

El cribratge mutacional del gen *SUZ12* s'ha dut a terme mitjançant amplificació per PCR dels exons del gen, les regions intròniques flanquejants i els punts de ramificació, seguida de seqüenciació Sanger. El punt clau d'aquesta estratègia és el disseny d'uns encebadors de PCR que presentin unes característiques

(longitud, temperatura de *melting*, %GC, complementarietat i estabilitat) adients per a la seva unió al genoma, i que a més, s'aparellin de manera específica amb la regió d'interès. Hi ha diversos programes que faciliten aquesta tasca tot comprovant *in silico* la seva possible eficàcia en l'amplificació de la regió diana i avaluant l'especificitat mitjançant un BLAST amb el genoma. En aquesta Tesi s'ha utilitzat *Primer3* Input (<http://primer3.wi.mit.edu>).

El disseny dels encebadors es pot complicar si el genoma presenta pseudogens, ja que moltes de les regions seran idèntiques o molt semblants i costarà dissenyar encebadors específics que amplifiquin el gen d'interès i no la còpia. En el cas del gen *SUZ12* es coneixen fins a dos pseudogens (*SUZ12P1* i *SUZ12P2*). *SUZ12P1* està situat al chr 17 i presenta un 96% d'identitat amb el gen *SUZ12* (<http://tables.pseudogene.org/Human69/PGOHUM00000237350>). *SUZ12P2* està al chr 14 i té una identitat del 38,6% respecte al gen *SUZ12* (<http://tables.pseudogene.org/Human69/PGOHUM00000248111>). En el primer cas el pseudogen s'hauria originat per una duplicació del gen original, mentre que en el segon cas l'origen és ambigu.

4.2.3. Resultats de l'anàlisi mutacional del gen *SUZ12* en pacients amb malformació de Chiari tipus I i II

Tot i que aquesta Tesi se centra en l'estudi de la base genètica de la MCI, en aquesta anàlisi es van incloure també pacients amb MCII, ja que en el model murí d'haploinsuficiència utilitzat per Miró i col·laboradors s'havien observat fenotips semblants als dos tipus de malformació (Miro et al., 2009). A més, tampoc s'ha descartat de forma definitiva que les dues formes humanes puguin obeir a un mateix defecte genètic o mecanisme causal.

En total es va analitzar el gen en 30 pacients: 11 amb MCI i intervinguts quirúrgicament (tres dels quals presentaven, a més, NF1), i 19 pacients amb MCII. Es van identificar en total 24 variants (tant en pacients MCI com MCII), de les quals 14 no havien estat descrites prèviament. Destaquen dues variants trobades en heterozigosi en dos pacients amb MCII, situades a la regió codificant de l'exó1, i que comportaven un canvi d'aminoàcid. Els valors de predicció de l'impacte d'aquestes variants en el producte final, però, van ser molt baixos

(Taula 12). L'anàlisi en els familiars no afectats que van accedir a col·laborar i en 100 individus control, va descartar totalment la seva possible implicació en MCI i MCII: ambdues estaven presents en algun membre sa de la família (en aquests membres portadors de la nova variant es va comprovar que no presentessin espina bífida oculta mitjançant un estudi radiològic) (Figura 30).

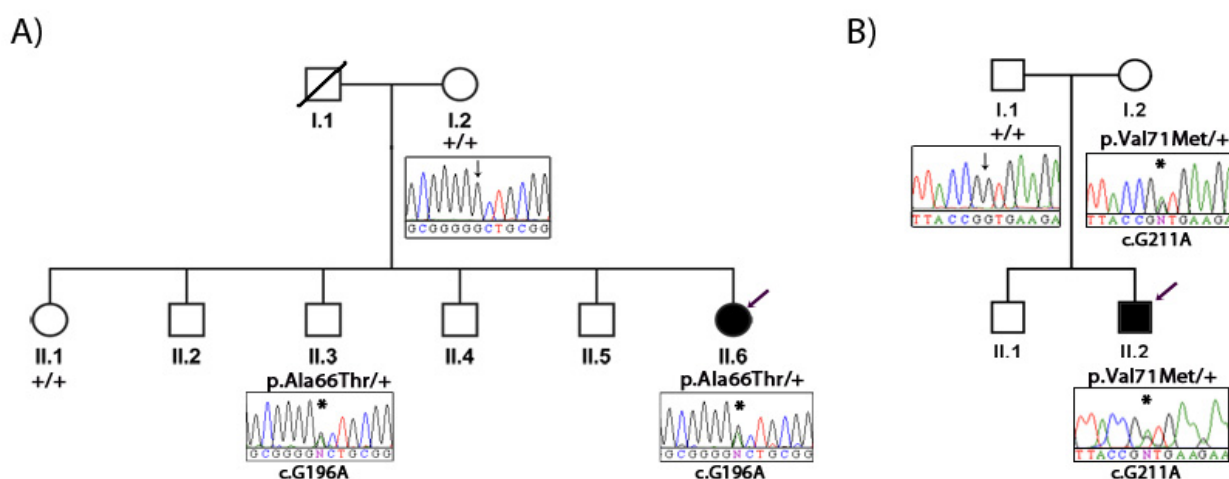


Figura 30. Arbres genealògics i electroferogrames de les dues variants més destacades identificades en l'estudi mutacional del gen *SUZ12*. En A) la variant g.5418G>A; en B) la variant g.5433G>A. Les fletxes assenyalen el cas índex de la família. Els símbols pintats de negre, corresponen als individus afectats, i els asteriscs, els llocs on es va trobar la variant.

D'ençà que es va realitzar el cribratge mutacional, i gràcies a la gran quantitat de dades aportades per consorcis internacionals i projectes, 10 de les 14 variants han estat identificades i descrites com a polimorfismes de tipus SNP, insercions o delecions, entre elles les dues a les quals vam atribuir una major probabilitat de tenir un efecte patogènic. Això descartaria definitivament que aquestes puguin ser les causants de la MCI i la MCII o que puguin estar relacionades amb la NF1 (Taula 12), almenys si assumim la hipòtesi d'una herència mendeliana monogènica.

Taula 12. Evolució del coneixement del genoma humà (2009-2012) exemplificada a través de l'avaluació de les variants identificades en el gen *SUZ12* en pacients amb MCI i MCII. Es mostren també, els valors de predicció de l'impacte de les variants en el producte final.

Part del gen		Posició en la seqüència de referència genòmica (NG_009237.1)	Descrita 2009	Descrita 2012	Localització	Predicció	
						Shift	Polyphen
Exó 1	5' UTR	g.5010C>T	no	rs190366663, SNP (C/T)	17:30264053 (cadena positiva)		
		g.5143G>A	no	rs182208921, SNP (G/A)	17:30264186 (cadena positiva)		
	regió codificant	g.5418G>A	no	rs199728576, SNP (G/A)	17:30264461 (cadena positiva)	0,3	0
		g.5433G>A	no	rs149833913, SNP (G/A)	17:30264476 (cadena positiva)	0,02	0,472
Intró 1		g.5504T>C	no	rs201453847, SNP (C/T)	17:30264547 (cadena positiva)		
Intró 3		g.8537_8538insA	sí	rs72129328, inserció (-/A)	17:30267581-30267580 (cadena positiva)		
Intró 4		g.34107_34108insT	sí	rs55829156, inserció (-/T)	17:30293151-30293150 (cadena positiva)		
Intró 5		g.40987_40988insA	no	no descrita, inserció (-/A)	17:30.300.030 (cadena positiva)		
Intró 6	g.41296T>G		no	no descrita, (T/G)	17:30300339 (cadena positiva)		
	g.41349T>G		no	rs184025395, SNP (G/T)	17:30300392 (cadena positiva)		
	g.43368G>A		sí	rs548957, SNP (G/A)	17:30302411 (cadena positiva)		
Intró7	g.43694_43695insT		sí	rs11396265, inserció (-/T)	17:30302738-30302737 (cadena positiva)		
	g.44438_44442delATATC		no	rs147986570, deleció (ATATC/-)	17:30303481-30303485 (cadena positiva)		
Intró 9		g.51269_51270insT	sí	rs34878231, inserció (-/T)	17:30310313-30310312 (cadena positiva)		
Intró 10	g.56244A>G		sí	rs530209, SNP (A/G)	17:30315287 (cadena positiva)		
	g.56574_56575insTT		sí	rs57744180, inserció (-/TT)	17:30315618-30315617 (cadena positiva)		
Intró 11		g.61818_61819insT	sí	rs55811201, inserció (-/T)	17:30320862-30320861 (cadena positiva)		
Intró 12	g.62089delA		no	rs55701061, deleció (A/-)	17:30321132 (cadena positiva)		
	g.62524_62525insG		sí	rs111242694, inserció (-/G)	17:30321568-30321567 (cadena positiva)		
Intró 13	g.62719G>C		sí	rs473356, SNP (G/C)	17:30321762 (cadena positiva)		
	g.63423A>G		no	no descrita, (A/G)	17:33322466 (cadena positiva)		
Intró 14	g.63836_63837insA		no	rs200403353, inserció (-/A)	17:30322880-30322879 (cadena positiva)		
	g.63838_63839insT		no	no descrita, inserció (-/T)	17:30322882-30322881 (cadena positiva)		
	g.64703_64704delCT		no	no descrita, deleció (CT/-)	17:30323746-30323747 (cadena positiva)		

La nostra anàlisi mutacional es va centrar en les regions codificants, regions UTR i els donadors o acceptors de *splicing*. Per aquest motiu *a priori*, podríem descartar el gen *SUZ12* com a gen causal principal en la MCI i la MCII. Tot i això, no es pot menysprear la possibilitat que algunes de les variants causals puguin estar en regions intròniques o reguladores, tot i que és poc freqüent en malalties d'herència mendeliana. Segons dades recents del projecte ENCODE (Consortium, 2012a), els introns semblen estar implicats en les funcions bioquímiques del 80% del genoma i formen part dels mecanismes de regulació gènica. En aquest sentit, es en aquest estudi, es van identificar variants situades en regions intròniques que continuen sense estar descrites, i de les quals no es pot predir la funció.

4.3. Seqüenciació massiva

El nombre de variants que s'identifiquen en els estudis de seqüenciació d'exomes en un individu concret oscil·la entre 20.000 i 50.000 respecte una seqüència de referència (varia en funció de la cobertura que s'utilitzi, la plataforma de seqüenciació i els algorismes que s'utilitzin per fer el mapatge). Per reduir aquest nombre, i identificar la variant causant de la malaltia, cal filtrar aquestes variants: un 20% corresponen a variants en heterozigosi i un 80% a variants en homozigosi. També es poden descartar aquelles variants que són sinònimes. Això redueix el nombre de variants a unes 5.000. La reducció més important es dona quan es descarten aquelles variants que han estat descrites prèviament (en un 90-95%). Normalment queden entre 150 i 500 variants rares truncants, no sinònimes o situades en llocs de tall i empalmament d'exons que s'han de prioritzar en funció del seu potencial patogènic (Gilissen et al., 2012).

En el marc d'aquesta Tesi es van seqüenciar els exomes de dos individus amb MCI d'una família amb múltiples individus afectats i una herència aparentment autosòmica dominant. Es van deixar de banda les variants comunes i només es van considerar els canvis truncants (codons de parada de la traducció i insercions/delecions que trenquen la pauta de lectura), no sinònims i aquells que alteren llocs canònics de *splicing* que estaven presents en heterozigosi en els dos individus afectats, 57 en total.

A continuació es van utilitzar els resultats de l'anàlisi de lligament a escala genòmica previ per prioritzar les variants identificades. Tot i que per a una regió concreta del cromosoma 17 es va obtenir un LOD *score* superior a 3,29 en l'anàlisi multipuntual (considerant els 29 individus disponibles, entre sans i afectats), diverses regions del genoma que contenien variants identificades en l'estudi d'exomes presentaven valors de LOD positius i també es van tenir en compte.

Només quatre de les 57 variants estaven situades en regions en què l'anàlisi de lligament duta a terme en 13 individus de la família donava valors de LOD *score* multipuntual superiors a 1 (Taula 7). Una d'elles, situada al gen *DDX52*, és a la regió del chr 17 en què presumptament es va localitzar el *locus* de la malaltia (Figura 18), però en realitzar la validació per seqüenciació Sanger es va constatar que era un fals positiu. No es van identificar canvis al gen *SUZ12*, també situat a la regió lligada.

Les altres tres variants, totes elles substitucions aminoacídiques, es van genotipar a la resta de membres de la família. La que més bé cosegregava amb el fenotip (veure l'Annex de l'Article 4 dels Resultats) està situada al gen *GP1BA*, que contra tot pronòstic, no està situat dins la regió de lligament que el nostre grup havia identificat prèviament en aquesta família. En 23 dels 29 familiars estudiats hi havia correlació entre el genotip i el fenotip, mentre que dos individus MCI no tenien la mutació i quatre individus sans eren portadors. El gen *GP1BA* codifica la glicoproteïna plaquetària Ib, de superfície de membrana, que actua com a receptor del factor de von Willebrand. La seva unió facilita l'adhesió inicial de les plaquetes del subendoteli vascular quan hi ha una ferida i també inicia l'activació de les plaquetes, trombosi i hemostàsia. Tot i que s'expressa en un període més tardà del moment en què es formen les somites i les cèl·lules vasculares (en ratolí a l'estadi E14.5, equivalent al 50^e dia de desenvolupament embrionari humà), no es pot descartar que estigui relacionat d'alguna manera amb el gen *FLT1*, en el qual es van trobar variants de susceptibilitat en l'estudi d'associació gènica (veure Article 3). A més, els valors predits pels diferents programes (PolyPhen, Condel i SIFT) sobre l'impacte d'aquesta variant en el producte final van ser de 0,539, 0,566 i 0,02, respectivament. Els resultats

predits per Polyphen i Condel assenyalariaien un possible efecte deleteri d'aquesta variant, reforçant la seva possible implicació.

Així doncs, a l'espera d'aprofundir en la possible implicació del gen *GP1BA* en la patologia, de moment no s'ha pogut determinar clarament quina és la variant genètica que causa la MCI en aquesta família. Podria ser que la variant no estigués situada en una regió codificant, la qual cosa hagués requerit un abordatge diferent, utilitzant seqüenciació del genoma complet o com a mínim, de la regió crítica identificada en l'anàlisi de lligament. O bé que realment no es tracti d'una malaltia causada per una única variant, i en aquest cas caldria considerar conjuntament tots els canvis identificats.

De totes formes, la seqüenciació de l'exoma presenta certes limitacions tècniques que podrien haver complicat la identificació d'una única variant causal situada en una regió codificant: d'entrada, el kit de captura que es va utilitzar deixa fora uns 4.000 gens (es pot accedir a més de 500.000 seqüències, corresponents a uns 19.000 gens (≈ 300.000 exons)). S'estima, doncs, que la seqüenciació d'exomes, permet inspeccionar actualment el 85% de la porció codificant del genoma (Majewski et al., 2011). A més, s'ha vist que aquesta tècnica cobreix pobrament les regions riques en GC i no permet detectar variants estructurals com inversions o translocacions (Majewski et al., 2011; Sulonen et al., 2011). Només en cas de saber *a priori* quins són els gens o les vies implicades en el fenotip resultaria raonable completar l'anàlisi mitjançant PCR i seqüenciació Sanger dels exons que, per aquestes raons, tenen una cobertura baixa o nul·la en la captura i seqüenciació de l'exoma.

També cal afegir la dificultat que comporta l'anàlisi de les dades obtingudes. La gran quantitat d'informació que es genera fa necessària l'aplicació de diversos nivells filtrat que en algun cas podrien deixar fora de l'anàlisi la variant causal.

Per tant, tot i que amb l'anàlisi dels dos exomes no s'hagi identificat encara cap variant que encaixi perfectament amb el comportament d'herència mendeliana i cosegregui perfectament en la família estudiada, no es pot descartar completament l'origen monogènic de la MCI en aquesta família. Per aquest motiu, i amb la col·laboració del grup de "Variació de genètica i epigenètica de la

malaltia” del Centre de Regulació Genòmica dirigit pel Dr. Ossowski, es va decidir ampliar l’estudi seqüenciant més individus de la mateixa família, i individus d’altres famílies amb quatre o més individus afectats, estudi que encara no s’ha completat.

Conclusions

Les conclusions del treball realitzat en aquesta Tesi, són:

➤ És necessari replantejar el criteri de diagnòstic en la malformació de Chiari tipus I (MCI) per tal de diferenciar, almenys, aquells pacients en què la malformació és deguda a una fossa cranial (FCP) petita, tant per millorar el tractament com per poder estudiar correctament la causa de la malformació.

➤ Mitjançant estudis morfomètrics s'han identificat altres paràmetres, diferents del descens de les amígdals cerebel·loses (DA), que es podrien utilitzar com a criteris diagnòstics per la MCI. Aquests nous elements de diagnòstic, independentment del DA, permeten identificar pacients amb una FCP petita amb una sensibilitat i especificitat superiors al 91%.

➤ L'anàlisi morfomètrica d'imatge per ressonància magnètica (IRM) ha permès establir que els pacients amb MCI no només presenten una FCP subdesenvolupada, sinó també alteracions en la cavitat orofaríngea: cavitat bucal petita, vel del paladar llarg i estret, més distància entre l'epiglòtis i la base de la dent de l'axis i angle Wackenheim augmentat. Aquestes alteracions podrien ser les responsables de les apnees de la son, de les dificultats en la deglució i dels problemes que pateixen els pacients quan són intubats i anestesiats en ser sotmesos a un tractament quirúrgic. La inclinació del clivus sembla afavorir la presència d'anomalies que interfereixen en les diferents fases de la son.

➤ Mitjançant un estudi d'associació genètica cas-control poblacional s'han identificat diverses variants genètiques comunes associades amb la MCI i una FCP petita (rs887343 al gen *CDX1*, rs17086609 al gen *FLT1*, i rs2899611 i rs6493979 al gen *ALDH1A2*). Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que gens implicats en el desenvolupament del mesoderma paraxial, somites i cèl·lules endotelials, podrien estar implicats en la formació d'una FCP petita i produir la MCI. La via de senyalització de l'àcid retinoic sembla tenir un paper important en la malformació, determinant probablement determinant una morfologia anòmala del clivus.

- Es desconeix el mecanisme exacte pel qual les variants genètiques associades amb la MCI donen susceptibilitat a la malaltia. Aquestes variants no estan situades en cap regió codificant.
- L'anàlisi mutacional del gen *SUZ12* en un grup de malalts amb CMII o CMI severa no ha permès identificar canvis genètics a les regions codificants relacionades amb les patologies, tot suggerint que aquest gen no és una causa comuna d'aquestes malformacions. El fenotip d'un model murí d'haploinsuficiència del gen *SUZ12* assenyalava aquest gen com un bon candidat.
- La seqüenciació dels exomes de dos individus amb MCI d'una família multigeneracional amb una herència autosòmica dominant en què s'havia identificat prèviament el *locus* de la malaltia mitjançant anàlisi de lligament genètic no ha revelat mutacions clarament implicades en la patologia.

Bibliografia

-A-

Abou-Sleiman P.M., Hanna M.G., Wood N.W. (2006) Genetic association studies of complex neurological diseases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77:1302-4. DOI: 10.1136/jnnp.2005.082024.

Aboulez A.O., Sartor K., Geyer C.A., Gado M.H. (1985) Position of cerebellar tonsils in the normal population and in patients with Chiari malformation: a quantitative approach with MR imaging. *J Comput Assist Tomogr* 9:1033-6.

Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 7:248-9. DOI: 10.1038/nmeth0410-248.

Afifi A.K., Dolan K.D., Van Gilder J.C., Fincham R.W. (1988) Ventriculomegaly in neurofibromatosis-1. Association with Chiari type I malformation. *Neurofibromatosis* 1:299-305.

Aitken L.A., Lindan C.E., Sidney S., Gupta N., Barkovich A.J., Sorel M., Wu Y.W. (2009) Chiari type I malformation in a pediatric population. *Pediatric neurology* 40:449-54. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2009.01.003.

Akpınar M.E., Celikoyar M.M., Altundag A., Kocak I. (2011) The comparison of cephalometric characteristics in nonobese obstructive sleep apnea subjects and primary snorers cephalometric measures in nonobese OSA and primary snorers. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* 268:1053-9. DOI: 10.1007/s00405-010-1448-z.

Alexander T., Nolte C., Krumlauf R. (2009) Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:431-56.

Altshuler D.M., Gibbs R.A., Peltonen L., Dermitzakis E., Schaffner S.F., Yu F., Bonnen P.E., de Bakker P.I., Deloukas P., Gabriel S.B., Gwilliam R., Hunt S., Inouye M., Jia X., Palotie A., Parkin M., Whittaker P., Chang K., Hawes A., Lewis L.R., Ren Y., Wheeler D., Muzny D.M., Barnes C., Darvishi K., Hurles M., Korn J.M., Kristiansson K., Lee C., McCarroll S.A., Nemesh J., Keinan A., Montgomery S.B., Pollack S., Price A.L., Soranzo N., Gonzaga-Jauregui C., Anttila V., Brodeur W., Daly M.J., Leslie S., McVean G., Moutsianas L., Nguyen H., Zhang Q., Ghorri M.J., McGinnis R., McLaren W., Takeuchi F., Grossman S.R., Shlyakhter I., Hostetter E.B., Sabeti P.C., Adebamowo C.A., Foster M.W., Gordon D.R., Licinio J., Manca M.C., Marshall P.A., Matsuda I., Ngare D., Wang V.O., Reddy D., Rotimi C.N., Royal C.D., Sharp R.R., Zeng C., Brooks L.D., McEwen J.E. (2010) Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467:52-8. DOI: 10.1038/nature09298.

Andlin-Sobocki P., Jonsson B., Wittchen H.U., Olesen J. (2005) Cost of disorders of the brain in Europe. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 12 Suppl 1:1-27. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2005.01202.x.

Angurana S.K., Angurana R.S. (2011) Hyper-IgE syndrome. *JK Science* 13:111-114.

Anson J.A., Benzel E.C., Awad I.A. AANS Publications Committee. (1997) Syringomyelia and the Chiari malformations. American Association of Neurological Surgeons, Park Ridge, Ill.

Armonda R.A., Citrin C.M., Foley K.T., Ellenbogen R.G. (1994) Quantitative cine-mode magnetic resonance imaging of Chiari I malformations: an analysis of cerebrospinal fluid dynamics. *Neurosurgery* 35:214-23; discussion 223-4.

Atkinson J.L., Kokmen E., Miller G.M. (1998) Evidence of posterior fossa hypoplasia in the familial variant of adult Chiari I malformation: case report. *Neurosurgery* 42:401-3; discussion 404.

Attenello F.J., McGirt M.J., Gathinji M., Dato G., Atiba A., Weingart J., Carson B., Jallo G.I. (2008) Outcome of Chiari-associated syringomyelia after hindbrain decompression in children: analysis of 49 consecutive cases. *Neurosurgery* 62:1307-13; discussion 1313. DOI: 10.1227/01.neu.0000333302.72307.3b.

Au K.S., Ashley-Koch A., Northrup H. (2010) Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. *Developmental disabilities research reviews* 16:6-15. DOI: 10.1002/ddrr.93.

Aulehla A., Pourquie O. (2010) Signaling gradients during paraxial mesoderm development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000869.

Aydin S., Hanimoglu H., Tanriverdi T., Yentur E., Kaynar M.Y. (2005) Chiari type I malformations in adults: a morphometric analysis of the posterior cranial fossa. *Surg Neurol* 64:237-41; discussion 241.

-B-

Badie B., Mendoza D., Batzdorf U. (1995) Posterior fossa volume and response to suboccipital decompression in patients with Chiari I malformation. *Neurosurgery* 37:214-8.

Balding D.J. (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature reviews. Genetics* 7:781-91. DOI: 10.1038/nrg1916.

Banerji N.K., Millar J.H. (1974) Chiari malformation presenting in adult life. Its relationship to syringomyelia. *Brain : a journal of neurology* 97:157-68.

Barkovich A.J., Wippold F.J., Sherman J.L., Citrin C.M. (1986) Significance of cerebellar tonsillar position on MR. *AJNR Am J Neuroradiol* 7:795-9.

Barnette T., Gourraud P.A., Cambon-Thomsen A. (2005) Strategies in analysis of the genetic component of multifactorial diseases; biostatistical aspects. *Transplant immunology* 14:255-66. DOI: 10.1016/j.trim.2005.03.015.

Barry A., Patten B.M., Stewart B.H. (1957) Possible factors in the development of the Arnold-Chiari malformation. *Journal of neurosurgery* 14:285-301. DOI: 10.3171/jns.1957.14.3.0285.

Batzdorf U. (1991) Classification of syringomyelia, in: U. Batzdorf (Ed.), *Syringomyelia. Current concepts in diagnosis and management*, Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1-2.

Bauer K.A., George T.M., Enterline D.S., Stottmann R.W., Melvin E.C., Siegel D., Samal S., Hauser M.A., Klingensmith J., Nye J.S., Speer M.C. (2002) A novel

mutation in the gene encoding noggin is not causative in human neural tube defects. *Journal of neurogenetics* 16:65-71.

Bejjani G.K. (2001) Definition of the adult Chiari malformation: a brief historical overview. *Neurosurg Focus* 11:E1.

Bell W.O., Charney E.B., Bruce D.A., Sutton L.N., Schut L. (1987) Symptomatic Arnold-Chiari malformation: review of experience with 22 cases. *Journal of neurosurgery* 66:812-6. DOI: 10.3171/jns.1987.66.6.0812.

Bodmer W., Bonilla C. (2008) Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature genetics* 40:695-701. DOI: 10.1038/ng.f.136.

Botstein D., Risch N. (2003) Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics* 33 Suppl:228-37. DOI: 10.1038/ng1090.

Boyles A.L., Enterline D.S., Hammock P.H., Siegel D.G., Slifer S.H., Mehlretter L., Gilbert J.R., Hu-Lince D., Stephan D., Batzdorf U., Benzel E., Ellenbogen R., Green B.A., Kula R., Menezes A., Mueller D., Oro J.J., Iskandar B.J., George T.M., Milhorat T.H., Speer M.C. (2006) Phenotypic definition of Chiari type I malformation coupled with high-density SNP genome screen shows significant evidence for linkage to regions on chromosomes 9 and 15. *Am J Med Genet A* 140:2776-85.

Boyles A.L., Hammock P., Speer M.C. (2005) Candidate gene analysis in human neural tube defects. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 135C:9-23. DOI: 10.1002/ajmg.c.30048.

Burgueno M.J., Garcia-Bastos J.L., Gonzalez-Buitrago J.M. (1995) [ROC curves in the evaluation of diagnostic tests]. *Medicina clinica* 104:661-70.

-C-

Caetano de Barros M., Farias W., Ataide L., Lins S. (1968) Basilar impression and Arnold-Chiari malformation. A study of 66 cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 31:596-605.

Cai C., Oakes W.J. (1997) Hindbrain herniation syndromes: the Chiari malformations (I and II). *Semin Pediatr Neurol* 4:179-91.

Cai C., Zhang Q., Shen C., Sun G., Wang C. (2008) Chiari malformation caused by craniometaphyseal dysplasia: case report and review of literature. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie* 18:198-201. DOI: 10.1055/s-2008-1038536.

Caldemeyer K.S., Boaz J.C., Wappner R.S., Moran C.C., Smith R.R., Quets J.P. (1995) Chiari I malformation: association with hypophosphatemic rickets and MR imaging appearance. *Radiology* 195:733-8.

Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298:1039-43. DOI: 10.1126/science.1076997.

Capra V., De Marco P., Merello E., Baffico A.M., Baldi M., Divizia M.T., Gimelli S., Mallet D., Raso A., Mascelli S., Toma P., Rossi A., Pavanello M., Cama A., Magnani C. (2009) Craniosynostosis, hydrocephalus, Chiari I malformation and radioulnar synostosis: probably a new syndrome. *European journal of medical genetics* 52:17-22. DOI: 10.1016/j.ejmg.2008.10.005.

Cardon L.R., Bell J.I. (2001) Association study designs for complex diseases. *Nature reviews. Genetics* 2:91-9. DOI: 10.1038/35052543.

Carlson C.S., Eberle M.A., Rieder M.J., Yi Q., Kruglyak L., Nickerson D.A. (2004) Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 74:106-20.

Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M.Q., Krainer A.R. (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic acids research* 31:3568-71.

Cavender R.K., Schmidt J.H., 3rd. (1995) Tonsillar ectopia and Chiari malformations: monozygotic triplets. Case report. *Journal of neurosurgery* 82:497-500. DOI: 10.3171/jns.1995.82.3.0497.

Chanock S.J., Manolio T., Boehnke M., Boerwinkle E., Hunter D.J., Thomas G., Hirschhorn J.N., Abecasis G., Altshuler D., Bailey-Wilson J.E., Brooks L.D., Cardon L.R., Daly M., Donnelly P., Fraumeni J.F., Jr., Freimer N.B., Gerhard D.S., Gunter C., Guttmacher A.E., Guyer M.S., Harris E.L., Hoh J., Hoover R., Kong C.A., Merikangas K.R., Morton C.C., Palmer L.J., Phimister E.G., Rice J.P., Roberts J., Rotimi C., Tucker M.A., Vogan K.J., Wacholder S., Wijsman E.M., Winn D.M., Collins F.S. (2007) Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 447:655-60. DOI: 10.1038/447655a.

Chapman D.L., Cooper-Morgan A., Harrelson Z., Papaioannou V.E. (2003) Critical role for Tbx6 in mesoderm specification in the mouse embryo. *Mechanisms of development* 120:837-47.

Chiari H. (1987) Concerning alterations in the cerebellum resulting from cerebral hydrocephalus. 1891. *Pediatric neuroscience* 13:3-8.

Choi S.S., Tran L.P., Zalzal G.H. (1999) Airway abnormalities in patients with Arnold-Chiari malformation. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 121:720-4. DOI: 10.1053/hn.1999.v121.a98013.

Chumas P.D., Armstrong D.C., Drake J.M., Kulkarni A.V., Hoffman H.J., Humphreys R.P., Rutka J.T., Hendrick E.B. (1993) Tonsillar herniation: the rule rather than the exception after lumboperitoneal shunting in the pediatric population. *J Neurosurg* 78:568-73.

Cinalli G., Renier D., Sebag G., Sainte-Rose C., Arnaud E., Pierre-Kahn A. (1995) Chronic tonsillar herniation in Crouzon's and Apert's syndromes: the role of premature synostosis of the lambdoid suture. *Journal of neurosurgery* 83:575-82. DOI: 10.3171/jns.1995.83.4.0575.

- Cinalli G., Renier D., Sebag G., Sainte-Rose C., Arnaud E., Pierre-Kahn A.** (1996) [Chiari "malformation" in Crouzon syndrome]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 3:433-9.
- Cinalli G., Spennato P., Sainte-Rose C., Arnaud E., Aliberti F., Brunelle F., Cianciulli E., Renier D.** (2005a) Chiari malformation in craniosynostosis. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 21:889-901. DOI: 10.1007/s00381-004-1115-z.
- Cinalli G., Spennato P., Sainte-Rose C., Arnaud E., Aliberti F., Brunelle F., Cianciulli E., Renier D.** (2005b) Chiari malformation in craniosynostosis. *Childs Nerv Syst* 21:889-901.
- Ciruna B., Rossant J.** (2001) FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 1:37-49.
- Ciruna B.G., Schwartz L., Harpal K., Yamaguchi T.P., Rossant J.** (1997) Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development* 124:2829-41.
- Cohen M.M., Jr., Kreiborg S.** (1992) Birth prevalence studies of the Crouzon syndrome: comparison of direct and indirect methods. *Clinical genetics* 41:12-5.
- Colhoun H.M., McKeigue P.M., Davey Smith G.** (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361:865-72.
- Colombo A., Cislighi M.G.** (1993) Familial syringomyelia: case report and review of the literature. *Italian journal of neurological sciences* 14:637-9.
- Consortium I.H.G.S.** (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-45. DOI: 10.1038/nature03001.
- Consortium T.E.P.** (2012a) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489:57-74. DOI: 10.1038/nature11247.
- Consortium T.G.P.** (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061-73. DOI: 10.1038/nature09534.
- Consortium T.G.P.** (2012b) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491:56-65. DOI: 10.1038/nature11632.
- Cordell H.J., Clayton D.G.** (2005) Genetic association studies. *Lancet* 366:1121-31. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67424-7.
- Coria F., Quintana F., Rebollo M., Combarros O., Berciano J.** (1983) Occipital dysplasia and Chiari type I deformity in a family. Clinical and radiological study of three generations. *J Neurol Sci* 62:147-58.
- Corominas R., Ribases M., Camina M., Cuenca-Leon E., Pardo J., Boronat S., Sobrido M.J., Cormand B., Macaya A.** (2009) Two-stage case-control association study of dopamine-related genes and migraine. *BMC medical genetics* 10:95. DOI: 10.1186/1471-2350-10-95.

Curran-Everett D. (2000) Multiple comparisons: philosophies and illustrations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 279:R1-8.

-D-

Dagtekin A., Avci E., Kara E., Uzmanse D., Dagtekin O., Koseoglu A., Talas D., Bagdatoglu C. (2011) Posterior cranial fossa morphometry in symptomatic adult Chiari I malformation patients: Comparative clinical and anatomical study. *Clin Neurol Neurosurg* 113:399-403.

de Jong T., Rijken B.F., Lequin M.H., van Veelen M.L., Mathijssen I.M. (2012) Brain and ventricular volume in patients with syndromic and complex craniosynostosis. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 28:137-40. DOI: 10.1007/s00381-011-1614-7.

Deak K.L., Dickerson M.E., Linney E., Enterline D.S., George T.M., Melvin E.C., Graham F.L., Siegel D.G., Hammock P., Mehlretter L., Bassuk A.G., Kessler J.A., Gilbert J.R., Speer M.C. (2005) Analysis of ALDH1A2, CYP26A1, CYP26B1, CRABP1, and CRABP2 in human neural tube defects suggests a possible association with alleles in ALDH1A2. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 73:868-75. DOI: 10.1002/bdra.20183.

Demir R., Seval Y., Huppertz B. (2007) Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 109:257-65.

Dequeant M.L., Pourquie O. (2008) Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat Rev Genet* 9:370-82.

Dickerson M., Joseph J., George T., Enterline D., Melvin E., Gilbert J., Linney E., Speer M., Group N.C. (2002) CYP26A1 and RALDH2 are not implicated in the development of human neural tube defects. *Am J Hum Gen* 71:469.

Dlouhy B.J., Menezes A.H. (2011) Osteopetrosis with Chiari I malformation: presentation and surgical management. *Journal of neurosurgery. Pediatrics* 7:369-74. DOI: 10.3171/2011.1.PEDS10353.

Dooley J., Vaughan D., Riding M., Camfield P. (1993) The association of Chiari type I malformation and neurofibromatosis type 1. *Clinical pediatrics* 32:189-90.

du Prel J.B., Rohrig B., Hommel G., Blettner M. (2010) Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Arzteblatt international* 107:343-8. DOI: 10.3238/arztebl.2010.0343.

Duddy M.J., Williams B. (1991) Hindbrain migration after decompression for hindbrain hernia: a quantitative assessment using MRI. *British journal of neurosurgery* 5:141-52.

Duester G. (2008) Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134:921-31.

Dufton J.A., Habeeb S.Y., Heran M.K., Mikulis D.J., Islam O. (2011) Posterior fossa measurements in patients with and without Chiari I malformation. *Can J Neurol Sci* 38:452-5.

-E-

Eberle M.A., Ng P.C., Kuhn K., Zhou L., Peiffer D.A., Galver L., Viaud-Martinez K.A., Lawley C.T., Gunderson K.L., Shen R., Murray S.S. (2007) Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels. *PLoS genetics* 3:1827-37. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030170.

Elster A.D., Chen M.Y. (1992) Chiari I malformations: clinical and radiologic reappraisal. *Radiology* 183:347-53.

Evans W.A.J. (1942) An encephalographic ratio for estimating ventricular enlargement and cerebral atrophy. *Arch Neurol Psychiatry.* 47:931-937.

-F-

Felder B., Stegmann K., Schultealbert A., Geller F., Strehl E., Ermert A., Koch M.C. (2002) Evaluation of BMP4 and its specific inhibitor NOG as candidates in human neural tube defects (NTDs). *European journal of human genetics : EJHG* 10:753-6. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200875.

Fernández A.A., Guerrero A.I., Martínez M.I., Vazquez M.E., Fernandez J.B., Chesa i Octavio E., Labrado Jde L., Silva M.E., de Araoz M.F., Garcia-Ramos R., Ribes M.G., Gomez C., Valdivia J.I., Valbuena R.N., Ramon J.R. (2009) Malformations of the craniocervical junction (Chiari type I and syringomyelia: classification, diagnosis and treatment). *BMC musculoskeletal disorders* 10 Suppl 1:S1. DOI: 10.1186/1471-2474-10-S1-S1.

Fernández Cornejo V.J. (2007) Malformación de Chiari en adultos. *Neurocirugía contemporánea* 1.

Ferre Maso A., Poca M.A., de la Calzada M.D., Solana E., Romero Tomas O., Sahuquillo J. (2011) Sleep disturbance: a forgotten syndrome in patients with Chiari I malformation. *Neurologia.* DOI: 10.1016/j.nrl.2011.01.008.

Fischbein N.J., Dillon W.P., Cobbs C., Weinstein P.R. (1999) The "presyrinx" state: a reversible myelopathic condition that may precede syringomyelia. *AJNR. American journal of neuroradiology* 20:7-20.

Freeman A.F., Collura-Burke C.J., Patronas N.J., Ilcus L.S., Darnell D., Davis J., Puck J.M., Holland S.M. (2007) Brain abnormalities in patients with hyperimmunoglobulin E syndrome. *Pediatrics* 119:e1121-5. DOI: 10.1542/peds.2006-2649.

Freeman A.F., Holland S.M. (2009) Clinical manifestations, etiology, and pathogenesis of the hyper-IgE syndromes. *Pediatric research* 65:32R-37R. DOI: 10.1203/PDR.0b013e31819dc8c5.

Fujisawa H., Hasegawa M., Kida S., Yamashita J. (2002) A novel fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Crouzon syndrome associated with Chiari type I malformation and syringomyelia. *Journal of neurosurgery* 97:396-400. DOI: 10.3171/jns.2002.97.2.0396.

Funahashi Y., Shawber C.J., Vorontchikhina M., Sharma A., Outtz H.H., Kitajewski J. (2010) Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *Journal of angiogenesis research* 2:3. DOI: 10.1186/2040-2384-2-3.

Furuya K., Sano K., Segawa H., Ide K., Yoneyama H. (1998) Symptomatic tonsillar ectopia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 64:221-6.

-G-

Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J., Blumenstiel B., Higgins J., DeFelice M., Lochner A., Faggart M., Liu-Cordero S.N., Rotimi C., Adeyemo A., Cooper R., Ward R., Lander E.S., Daly M.J., Altshuler D. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225-9. DOI: 10.1126/science.1069424.

George S., Page A.B. (2006) Familial Arnold-Chiari Type I malformation. *Eye* 20:400-2. DOI: 10.1038/sj.eye.6701887.

German R.Z., Palmer J.B. (2006) Anatomy and development of oral cavity and pharynx, GI Motility online.

Geroldi C., Frisoni G.B., Bianchetti A., Trabucchi M., Bricolo A. (1999) Arnold-Chiari malformation with syringomyelia in an elderly woman. *Age and ageing* 28:399-400.

Gilissen C., Hoischen A., Brunner H.G., Veltman J.A. (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European journal of human genetics : EJHG* 20:490-7. DOI: 10.1038/ejhg.2011.258.

Goldie L.C., Nix M.K., Hirschi K.K. (2008) Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis* 4:257-63.

Goldstein F., Kepes J.J. (1966) The role of traction in the development of the Arnold-Chiari malformation. An experimental study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 25:654-66.

Gonzalez-Perez A., Lopez-Bigas N. (2011) Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *American journal of human genetics* 88:440-9. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.03.004.

Gordon D., Finch S.J. (2005) Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *The Journal of clinical investigation* 115:1408-18. DOI: 10.1172/JCI24756.

Greally M.T., Carey J.C., Milewicz D.M., Hudgins L., Goldberg R.B., Shprintzen R.J., Cousineau A.J., Smith W.L., Jr., Judisch G.F., Hanson J.W. (1998) Shprintzen-Goldberg syndrome: a clinical analysis. *American journal of medical genetics* 76:202-12.

Greene N.D., Stanier P., Copp A.J. (2009) Genetics of human neural tube defects. *Human molecular genetics* 18:R113-29. DOI: 10.1093/hmg/ddp347.

Greenlee J.D., Donovan K.A., Hasan D.M., Menezes A.H. (2002) Chiari I malformation in the very young child: the spectrum of presentations and experience in 31 children under age 6 years. *Pediatrics* 110:1212-9.

Grimm T., Wesselhoeft H. (1980) [The genetic aspects of Williams-Beuren syndrome and the isolated form of the supravalvular aortic stenosis. Investigation of 128 families (author's transl)]. *Zeitschrift fur Kardiologie* 69:168-72.

Gripp K.W., Scott C.I., Jr., Nicholson L., Magram G., Grissom L.E. (1997) Chiari malformation and tonsillar ectopia in twin brothers and father with autosomal dominant spondylo-epiphyseal dysplasia tarda. *Skeletal radiology* 26:131-3.

Gu C.C., Yu K., Rao D.C. (2008) Characterization of LD structures and the utility of HapMap in genetic association studies. *Adv Genet* 60:407-35.

-H-

Hagberg C., Georgi R., Krier C. (2005) Complications of managing the airway. Best practice & research. *Clinical anaesthesiology* 19:641-59.

Halpin D.M., Trend P., Symon L., Harding A.E. (1990) Type 1 Arnold-Chiari malformation in a 77 year old woman. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 53:88-9.

Hamilton J., Chitayat D., Blaser S., Cohen L.E., Phillips J.A., 3rd, Daneman D. (1998) Familial growth hormone deficiency associated with MRI abnormalities. *American journal of medical genetics* 80:128-32.

Hara H., Arakawa H. (2005) Coexistence of neurofibromatosis 1 and chiari type I malformation: an unusual association. *The Journal of dermatology* 32:34-7.

Hayhurst C., Osman-Farah J., Das K., Mallucci C. (2008) Initial management of hydrocephalus associated with Chiari malformation Type I-syringomyelia complex via endoscopic third ventriculostomy: an outcome analysis. *Journal of neurosurgery* 108:1211-4. DOI: 10.3171/JNS/2008/108/6/1211.

Hillman D.R., Platt P.R., Eastwood P.R. (2003) The upper airway during anaesthesia. *British journal of anaesthesia* 91:31-9.

Hoffman L.M., Garcha K., Karamboulas K., Cowan M.F., Drysdale L.M., Horton W.A., Underhill T.M. (2006) BMP action in skeletogenesis involves attenuation of retinoid signaling. *The Journal of cell biology* 174:101-13. DOI: 10.1083/jcb.200604150.

Hofkes S.K., Iskandar B.J., Turski P.A., Gentry L.R., McCue J.B., Houghton V.M. (2007) Differentiation between symptomatic Chiari I malformation and asymptomatic tonsillar ectopia by using cerebrospinal fluid flow imaging: initial estimate of imaging accuracy. *Radiology* 245:532-40. DOI: 10.1148/radiol.2452061096.

Houle M., Sylvestre J.R., Lohnes D. (2003) Retinoic acid regulates a subset of Cdx1 function in vivo. *Development* 130:6555-67.

-I-

Iglesias-Osma C., Gomez Sanchez J.C., Suquia Mugica B., Querol Prieto R., de Portugal Alvarez J. (1997) [Paget's disease of bone and basilar impression associated with an Arnold-Chiari type-1 malformation]. *Anales de medicina interna* 14:519-22.

Infosino A. (2002) Pediatric upper airway and congenital anomalies. *Anesthesiology clinics of North America* 20:747-66.

Ishikawa A., Kitajima S., Takahashi Y., Kokubo H., Kanno J., Inoue T., Saga Y. (2004) Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev* 121:1443-53.

Ishikawa M., Kikuchi H., Fujisawa I., Yonekawa Y. (1988) Tonsillar herniation on magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 22:77-81.

Iskandar B.J., Hedlund G.L., Grabb P.A., Oakes W.J. (1998) The resolution of syringohydromyelia without hindbrain herniation after posterior fossa decompression. *J Neurosurg* 89:212-6.

Isu T., Iwasaki Y., Akino M., Abe H. (1990) Hydrosyringomyelia associated with a Chiari I malformation in children and adolescents. *Neurosurgery* 26:591-6; discussion 596-7.

-J-

Jamjoom A.A., Jamjoom B.A., Waliuddin A.R., Jamjoom A.B. (2009) Lessons from a case of osteopetrosis oxycephaly and Chiari type I malformation: a case report. *Cases journal* 2:6787. DOI: 10.4076/1757-1626-2-6787.

Jenne D.E., Tinschert S., Reimann H., Lasinger W., Thiel G., Hameister H., Kehrer-Sawatzki H. (2001) Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions. *American journal of human genetics* 69:516-27. DOI: 10.1086/323043.

-K-

Kageyama R., Niwa Y., Shimojo H. (2009) Rhythmic gene expression in somite formation and neural development. *Mol Cells* 27:497-502.

Kane W.J. (1977) Scoliosis prevalence: a call for a statement of terms. *Clinical orthopaedics and related research*:43-6.

Kane W.J., Moe J.H. (1970) A scoliosis-prevalence survey in Minnesota. *Clinical orthopaedics and related research* 69:216-8.

Karagoz F., Izgi N., Kapijicjoglu Sencer S. (2002) Morphometric measurements of the cranium in patients with Chiari type I malformation and comparison with the normal population. *Acta Neurochir (Wien)* 144:165-71; discussion 171.

Khan A.A., Bhatti S.N., Khan G., Ahmed E., Aurangzeb A., Ali A., Khan A., Afzal S. (2010) Clinical and radiological findings in Arnold Chiari malformation. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC* 22:75-8.

Kidd J.M., Cooper G.M., Donahue W.F., Hayden H.S., Sampas N., Graves T., Hansen N., Teague B., Alkan C., Antonacci F., Haugen E., Zerr T., Yamada N.A., Tsang P., Newman T.L., Tuzun E., Cheng Z., Ebling H.M., Tusneem N., David R., Gillett W., Phelps K.A., Weaver M., Saranga D., Brand A., Tao W., Gustafson E., McKernan K., Chen L., Malig M., Smith J.D., Korn J.M., McCarroll S.A., Altshuler D.A., Peiffer D.A., Dorschner M., Stamatoyannopoulos J., Schwartz D., Nickerson D.A., Mullikin J.C., Wilson R.K., Bruhn L., Olson M.V., Kaul R., Smith D.R., Eichler E.E. (2008) Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature* 453:56-64. DOI: 10.1038/nature06862.

Kim I.K., Wang K.C., Kim I.O., Cho B.K. (2010) Chiari 1.5 malformation : an advanced form of Chiari I malformation. *J Korean Neurosurg Soc* 48:375-9.

Knight J. (2004) A survey of current software for genetic power calculations. *Human genomics* 1:225-7.

Koehler P.J. (1991) Chiari's description of cerebellar ectopy (1891). With a summary of Cleland's and Arnold's contributions and some early observations on neural-tube defects. *J Neurosurg* 75:823-6.

Kulkarni M.L., Marakkanavar S.N., Sushanth S., Pradeep N., Ashok C., Balaji M.D., Sajith K.P., Srinivas G. (2007) Osteopetrosis with Arnold Chiari malformation type I and brain stem compression. *Indian journal of pediatrics* 74:412-5.

Kumar P., Henikoff S., Ng P.C. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* 4:1073-81. DOI: 10.1038/nprot.2009.86.

-L-

Laederich M.B., Horton W.A. (2010) Achondroplasia: pathogenesis and implications for future treatment. *Current opinion in pediatrics* 22:516-23. DOI: 10.1097/MOP.0b013e32833b7a69.

Lai L., Bohnsack B.L., Niederreither K., Hirschi K.K. (2003) Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development* 130:6465-74. DOI: 10.1242/dev.00887.

Lammer E.J., Chen D.T., Hoar R.M., Agnish N.D., Benke P.J., Braun J.T., Curry C.J., Fernhoff P.M., Grix A.W., Jr., Lott I.T., et al. (1985) Retinoic acid embryopathy. *The New England journal of medicine* 313:837-41. DOI: 10.1056/NEJM198510033131401.

Lander E., Kruglyak L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature genetics* 11:241-7. DOI: 10.1038/ng1195-241.

Lazaro C., Ravella A., Gaona A., Volpini V., Estivill X. (1994) Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *The New England journal of medicine* 331:1403-7. DOI: 10.1056/NEJM199411243312102.

Lee T.I., Jenner R.G., Boyer L.A., Guenther M.G., Levine S.S., Kumar R.M., Chevalier B., Johnstone S.E., Cole M.F., Isono K., Koseki H., Fuchikami T., Abe K., Murray H.L., Zucker J.P., Yuan B., Bell G.W., Herbolsheimer E., Hannett N.M., Sun K., Odom D.T., Otte A.P., Volkert T.L., Bartel D.P., Melton D.A., Gifford D.K., Jaenisch R., Young R.A. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125:301-13. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.043.

Lemar H.J., Jr., Perloff J.J., Merenich J.A. (1994) Symptomatic Chiari-I malformation in a patient with acromegaly. *South Med J* 87:284-5.

Lemay P., Trinh Q.-H., Knowler P., Dubé M.-P., Blott S., Rouleau G.A., Rusbridge C., Kibar Z. (2011) A Genome wide association identifies six loci

associated with Chiari-like malformation in the Griffon Bruxellois breed. Poster communication to the 12th International Congress of human genetics, Montréal (Canada).

Lindner T.H., Hoffmann K. (2005) easyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses. *Bioinformatics* 21:405-7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti009.

Lindsay R., Feldkamp M., Harris D., Robertson J., Rallison M. (1994) Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *The Journal of pediatrics* 125:29-35.

Lipsey M.W., Hurley S.M. (2009) Design sensitivity: Statistical power for applied experimental research., in: L. B. D. Rog (Ed.), *The SAGE Handbook of Applied Social Research Methods* (2nd edition), Sage, Los Angeles. pp. 44-76.

Little J.R., Houser O.W., MacCarty C.S. (1975) Clinical manifestations of aqueductal stenosis in adults. *Journal of neurosurgery* 43:546-52. DOI: 10.3171/jns.1975.43.5.0546.

Loukas M., Shayota B.J., Oelhafen K., Miller J.H., Chern J.J., Tubbs R.S., Oakes W.J. (2011) Associated disorders of Chiari Type I malformations: a review. *Neurosurgical focus* 31:E3. DOI: 10.3171/2011.6.FOCUS11112.

-M-

Machinis K., Pantel J., Netchine I., Leger J., Camand O.J., Sobrier M.L., Dastot-Le Moal F., Duquesnoy P., Abitbol M., Czernichow P., Amselem S. (2001) Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *American journal of human genetics* 69:961-8.

Mahore A., Shah A., Nadkarni T., Goel A. (2010) Craniofrontonasal dysplasia associated with Chiari malformation. *Journal of neurosurgery. Pediatrics* 5:375-9. DOI: 10.3171/2009.10.PEDS09155.

Majewski J., Schwartzenruber J., Lalonde E., Montpetit A., Jabado N. (2011) What can exome sequencing do for you? *Journal of medical genetics* 48:580-9. DOI: 10.1136/jmedgenet-2011-100223.

Margueron R., Reinberg D. (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469:343-9. DOI: 10.1038/nature09784.

Marin-Padilla M. (1966) Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A. *J Embryol Exp Morphol* 15:261-9.

Marin-Padilla M. (1979) Notochordal-basichondrocranium relationships: abnormalities in experimental axial skeletal (dysraphic) disorders. *J Embryol Exp Morphol* 53:15-38.

Marin-Padilla M. (1991) Cephalic axial skeletal-neural dysraphic disorders: embryology and pathology. *Can J Neurol Sci* 18:153-69.

Marin-Padilla M., Marin-Padilla T.M. (1981) Morphogenesis of experimentally induced Arnold--Chiari malformation. *J Neurol Sci* 50:29-55.

Markunas C.A., Tubbs R.S., Moftakhar R., Ashley-Koch A.E., Gregory S.G., Oakes W.J., Speer M.C., Iskandar B.J. (2012) Clinical, radiological, and genetic

similarities between patients with Chiari Type I and Type 0 malformations. *Journal of neurosurgery. Pediatrics* 9:372-8. DOI: 10.3171/2011.12.PEDS11113.

Martinez-Lage J.F., Guillen-Navarro E., Lopez-Guerrero A.L., Almagro M.J., Cuartero-Perez B., de la Rosa P. (2011) Chiari type 1 anomaly in pseudohypoparathyroidism type Ia: pathogenetic hypothesis. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 27:2035-9. DOI: 10.1007/s00381-011-1606-7.

Martinot A., Hue V., Leclerc F., Vallee L., Closset M., Pruvo J.P. (1993) Sudden death revealing Chiari type 1 malformation in two children. *Intensive care medicine* 19:73-4.

Mavinkurve G.G., Sciubba D., Amundson E., Jallo G.I. (2005) Familial Chiari type I malformation with syringomyelia in two siblings: case report and review of the literature. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 21:955-9. DOI: 10.1007/s00381-005-1146-0.

Mayhew T.M., Olsen D.R. (1991) Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. *J Anat* 178:133-44.

McGaughan J., Aftimos S., Jefferies C., Winship I. (2001) Clinical phenotypes of nine cases of Kabuki syndrome from New Zealand. *Clinical dysmorphology* 10:257-62.

McGirt M.J., Nimjee S.M., Floyd J., Bulsara K.R., George T.M. (2005) Correlation of cerebrospinal fluid flow dynamics and headache in Chiari I malformation. *Neurosurgery* 56:716-21; discussion 716-21.

McLaren W., Pritchard B., Rios D., Chen Y., Flicek P., Cunningham F. (2010) Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* 26:2069-70. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq330.

McNamara J.A. (1981) Influence of respiratory pattern on craniofacial growth. *The Angle orthodontist* 51:269-300. DOI: 10.1043/0003-3219(1981)051<0269:IORPOC>2.0.CO;2.

Meadows J., Kraut M., Guarnieri M., Haroun R.I., Carson B.S. (2000) Asymptomatic Chiari Type I malformations identified on magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 92:920-6.

Medvedev P., Stanciu M., Brudno M. (2009) Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing. *Nature methods* 6:S13-20. DOI: 10.1038/nmeth.1374.

Menezes A.H., VanGilder J.C. (1988) Transoral-transpharyngeal approach to the anterior craniocervical junction. Ten-year experience with 72 patients. *Journal of neurosurgery* 69:895-903. DOI: 10.3171/jns.1988.69.6.0895.

Mercuri E., Atkinson J., Braddick O., Rutherford M.A., Cowan F.M., Counsell S.J., Dubowitz L.M., Bydder G. (1997) Chiari I malformation in asymptomatic young children with Williams syndrome: clinical and MRI study. *European*

journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society 1:177-81.

Mikulis D.J., Diaz O., Eggin T.K., Sanchez R. (1992) Variance of the position of the cerebellar tonsils with age: preliminary report. *Radiology* 183:725-8.

Milhorat T.H., Bolognese P.A., Nishikawa M., Francomano C.A., McDonnell N.B., Roonprapunt C., Kula R.W. (2009) Association of Chiari malformation type I and tethered cord syndrome: preliminary results of sectioning filum terminale. *Surg Neurol* 72:20-35.

Milhorat T.H., Bolognese P.A., Nishikawa M., McDonnell N.B., Francomano C.A. (2007) Syndrome of occipitoatlantoaxial hypermobility, cranial settling, and chiari malformation type I in patients with hereditary disorders of connective tissue. *J Neurosurg Spine* 7:601-9.

Milhorat T.H., Chou M.W., Trinidad E.M., Kula R.W., Mandell M., Wolpert C., Speer M.C. (1999) Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery* 44:1005-17.

Milhorat T.H., Nishikawa M., Kula R.W., Dlugacz Y.D. (2010) Mechanisms of cerebellar tonsil herniation in patients with Chiari malformations as guide to clinical management. *Acta Neurochir (Wien)* 152:1117-27.

Miller J.H., Limbrick D.D., Callen M., Smyth M.D. (2008a) Spontaneous resolution of Chiari malformation Type I in monozygotic twins. *Journal of neurosurgery. Pediatrics* 2:317-9. DOI: 10.3171/PED.2008.2.11.317.

Miller M.B., Schwander K., Rao D.C. (2008b) Genotyping errors and their impact on genetic analysis. *Advances in genetics* 60:141-52. DOI: 10.1016/S0065-2660(07)00406-3.

Miro X., Zhou X., Boretius S., Michaelis T., Kubisch C., Alvarez-Bolado G., Gruss P. (2009) Haploinsufficiency of the murine polycomb gene *Suz12* results in diverse malformations of the brain and neural tube. *Dis Model Mech* 2:412-8.

Miura S., Davis S., Klingensmith J., Mishina Y. (2006) BMP signaling in the epiblast is required for proper recruitment of the prospective paraxial mesoderm and development of the somites. *Development* 133:3767-75.

Monsoro-Burq A.H. (2005) Sclerotome development and morphogenesis: when experimental embryology meets genetics. *The International journal of developmental biology* 49:301-8. DOI: 10.1387/ijdb.041953am.

Morris Z., Whiteley W.N., Longstreth W.T., Jr., Weber F., Lee Y.C., Tsushima Y., Alphas H., Ladd S.C., Warlow C., Wardlaw J.M., Al-Shahi Salman R. (2009) Incidental findings on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 339:b3016.

Morrison K., Papapetrou C., Hol F.A., Mariman E.C., Lynch S.A., Burn J., Edwards Y.H. (1998) Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Annals of human genetics* 62:379-96. DOI: 10.1046/j.1469-1809.1998.6250379.x.

Muller F., O'Rahilly R. (1994) Occipitocervical segmentation in staged human embryos. *J Anat* 185 (Pt 2):251-8.

Muller F., O'Rahilly R. (2003) Segmentation in staged human embryos: the occipitocervical region revisited. *J Anat* 203:297-315.

Murphy R.L., Tubbs R.S., Grabb P.A., Oakes W.J. (2006) Chiari I malformation and idiopathic growth hormone deficiency in siblings. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 22:632-4. DOI: 10.1007/s00381-005-0041-z.

Mustapha B., Chkoura K., Elhassani M., Ahtil R., Azendour H., Kamili N.D. (2011) Difficult intubation in a parturient with syringomyelia and Arnold-Chiari malformation: Use of Airtraq laryngoscope. *Saudi journal of anaesthesia* 5:419-22. DOI: 10.4103/1658-354X.87274.

-N-

Nakai T., Asato R., Miki Y., Tanaka F., Matsumoto S., Konishi J. (1995) A case of achondroplasia with downward displacement of the brain stem. *Neuroradiology* 37:293-4.

Nash J., Cheng J.S., Meyer G.A., Remler B.F. (2002) Chiari type I malformation: overview of diagnosis and treatment. *WMJ : official publication of the State Medical Society of Wisconsin* 101:35-40.

Needleman J.P., Panitch H.B., Bierbrauer K.S., Schidlow D.V. (2000) Chiari type I malformation in children and adolescents with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 30:490-2.

Ng P.C., Henikoff S. (2006) Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annual review of genomics and human genetics* 7:61-80. DOI: 10.1146/annurev.genom.7.080505.115630.

Ng S.B., Buckingham K.J., Lee C., Bigham A.W., Tabor H.K., Dent K.M., Huff C.D., Shannon P.T., Jabs E.W., Nickerson D.A., Shendure J., Bamshad M.J. (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature genetics* 42:30-5. DOI: 10.1038/ng.499.

Ng S.B., Turner E.H., Robertson P.D., Flygare S.D., Bigham A.W., Lee C., Shaffer T., Wong M., Bhattacharjee A., Eichler E.E., Bamshad M., Nickerson D.A., Shendure J. (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461:272-6. DOI: 10.1038/nature08250.

Niederreither K., Dolle P. (2008) Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9:541-53.

Niikawa N., Kuroki Y., Kajii T., Matsuura N., Ishikiriyama S., Tonoki H., Ishikawa N., Yamada Y., Fujita M., Umemoto H., et al. (1988) Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: a study of 62 patients. *American journal of medical genetics* 31:565-89. DOI: 10.1002/ajmg.1320310312.

Nishikawa M., Sakamoto H., Hakuba A., Nakanishi N., Inoue Y. (1997) Pathogenesis of Chiari malformation: a morphometric study of the posterior cranial fossa. *J Neurosurg* 86:40-7.

Noudel R., Jovenin N., Eap C., Scherpereel B., Pierot L., Rousseaux P. (2009) Incidence of basioccipital hypoplasia in Chiari malformation type I: comparative

morphometric study of the posterior cranial fossa. Clinical article. J Neurosurg 111:1046-52.

-O-

Oldfield E.H., Muraszko K., Shawker T.H., Patronas N.J. (1994) Pathophysiology of syringomyelia associated with Chiari I malformation of the cerebellar tonsils. Implications for diagnosis and treatment. Journal of neurosurgery 80:3-15. DOI: 10.3171/jns.1994.80.1.0003.

Olsen B.R., Reginato A.M., Wang W. (2000) Bone development. Annu Rev Cell Dev Biol 16:191-220.

Orioli I.M., Castilla E.E., Barbosa-Neto J.G. (1986) The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. Journal of medical genetics 23:328-32.

-P-

Pang D., Thompson D.N. (2011) Embryology and bony malformations of the craniovertebral junction. Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery 27:523-64. DOI: 10.1007/s00381-010-1358-9.

Pangilinan F., Molloy A.M., Mills J.L., Troendle J.F., Parle-McDermott A., Signore C., O'Leary V.B., Chines P., Seay J.M., Geiler-Samerotte K., Mitchell A., VanderMeer J.E., Krebs K.M., Sanchez A., Cornman-Homonoff J., Stone N., Conley M., Kirke P.N., Shane B., Scott J.M., Brody L.C. (2012) Evaluation of common genetic variants in 82 candidate genes as risk factors for neural tube defects. BMC medical genetics 13:62. DOI: 10.1186/1471-2350-13-62.

Papasozomenos S., Roessmann U. (1981) Respiratory distress and Arnold-Chiari malformation. Neurology 31:97-100.

Paquis P., Lonjon M., Brunet M., Lambert J.C., Grellier P. (1998) Chiari Type I malformation and syringomyelia in unrelated patients with blepharophimosis. Report of two cases. Journal of neurosurgery 89:835-8. DOI: 10.3171/jns.1998.89.5.0835.

Parkinson D., Hay R. (1986) Neurofibromatosis. Surgical neurology 25:109-13.

Patel A.J., Raol V.H., Jea A. (2011) Rare association between cystic fibrosis, Chiari I malformation, and hydrocephalus in a baby: a case report and review of the literature. Journal of medical case reports 5:366. DOI: 10.1186/1752-1947-5-366.

Paulig M., Prosiegel M. (2002) Misdiagnosis of amyotrophic lateral sclerosis in a patient with dysphagia due to Chiari I malformation. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 72:270.

Penfield W., Coburn D. (1938) Arnold-Chiari malformation and its operative treatment. Arch. Neurol. Psychiat. 40:328-336.

Pober B.R., Filiano J.J. (1995) Association of Chiari I malformation and Williams syndrome. Pediatric neurology 12:84-8.

Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nature reviews. Genetics 6:847-59. DOI: 10.1038/nrg1707.

Prieto L., Lamarca R., Casado A. (1998) [Assessment of the reliability of clinical findings: the intraclass correlation coefficient]. *Medicina clinica* 110:142-5.

Puget S., Kondageski C., Wray A., Boddaert N., Roujeau T., Di Rocco F., Zerah M., Sainte-Rose C. (2007) Chiari-like tonsillar herniation associated with intracranial hypotension in Marfan syndrome. Case report. *Journal of neurosurgery* 106:48-52. DOI: 10.3171/ped.2007.106.1.48.

-R-

Rakheja D., Xu Y., Burns D.K., Veltkamp D.L., Margraf L.R. (2003) Cystic fibrosis and Chiari type I malformation: autopsy study of two infants with a rare association. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 6:88-93. DOI: 10.1007/s10024-002-0021-1.

Richards P.S., Bargiota A., Corrall R.J. (2001a) Paget's disease causing an Arnold-Chiari Type 1 malformation: radiographic findings. *AJR Am J Roentgenol* 176:816-7.

Richards P.S., Bargiota A., Corrall R.J. (2001b) Paget's disease causing an Arnold-Chiari Type 1 malformation: radiographic findings. *AJR. American journal of roentgenology* 176:816-7.

Richter B., Schultealbert A.H., Koch M.C. (2002) Human T and risk for neural tube defects. *Journal of medical genetics* 39:E14.

Ritterbusch J.F., McGinty L.D., Spar J., Orrison W.W. (1991) Magnetic resonance imaging for stenosis and subluxation in Klippel-Feil syndrome. *Spine* 16:S539-41.

Roth M. (1981) Idiopathic scoliosis from the point of view of the neuroradiologist. *Neuroradiology* 21:133-8.

Royo-Salvador M.B. (1996) [Platybasia, basilar groove, odontoid process and kinking of the brainstem: a common etiology with idiopathic syringomyelia, scoliosis and Chiari malformations]. *Rev Neurol* 24:1241-50.

Royo-Salvador M.B. (1997) [A new surgical treatment for syringomyelia, scoliosis, Arnold-Chiari malformation, kinking of the brainstem, odontoid recess, idiopathic basilar impression and platybasia]. *Revista de neurologia* 25:523-30.

Rusakow L.S., Guarin M., Lyon R.M., Splaingard M.L. (1995) Syringomyelia and chiari malformation presenting as scoliosis in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 19:317-8.

Rusbridge C., Knowler S.P., Pieterse L., McFadyen A.K. (2009) Chiari-like malformation in the Griffon Bruxellois. *The Journal of small animal practice* 50:386-93. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2009.00744.x.

-S-

Saez R.J., Onofrio B.M., Yanagihara T. (1976) Experience with Arnold-Chiari malformation, 1960 to 1970. *Journal of neurosurgery* 45:416-22. DOI: 10.3171/jns.1976.45.4.0416.

- Sahuquillo J., Poca M.A.** (1998) [Current surgical treatment of Chiari type I malformation and Chiari I-syringomyelia complex]. *Neurologia* 13:223-45.
- Sahuquillo J., Rubio E., Poca M.A., Rovira A., Rodriguez-Baeza A., Cervera C.** (1994) Posterior fossa reconstruction: a surgical technique for the treatment of Chiari I malformation and Chiari I/syringomyelia complex--preliminary results and magnetic resonance imaging quantitative assessment of hindbrain migration. *Neurosurgery* 35:874-84; discussion 884-5.
- Sandell L.L., Sanderson B.W., Moiseyev G., Johnson T., Mushegian A., Young K., Rey J.P., Ma J.X., Staehling-Hampton K., Trainor P.A.** (2007) RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev* 21:1113-24.
- Santos-Garcia D., Cabanillas M., Suarez-Dono I., Monteagudo B., de la Fuente-Fernandez R., Suarez-Amor O.** (2009) [Type 1 neurofibromatosis and Arnold-Chiari malformation]. *Actas dermo-sifiliograficas* 100:820-2.
- Schady W., Metcalfe R.A., Butler P.** (1987) The incidence of craniocervical bony anomalies in the adult Chiari malformation. *J Neurol Sci* 82:193-203.
- Schanker B.D., Walcott B.P., Nahed B.V., Kahle K.T., Li Y.M., Coumans J.V.** (2011) Familial Chiari malformation: case series. *Neurosurg Focus* 31:E1.
- Schimmenti L.A., Shim H.H., Wirtschafter J.D., Panzarino V.A., Kashtan C.E., Kirkpatrick S.J., Wargowski D.S., France T.D., Michel E., Dobyns W.B.** (1999) Homonucleotide expansion and contraction mutations of PAX2 and inclusion of Chiari 1 malformation as part of renal-coloboma syndrome. *Human mutation* 14:369-76. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(199911)14:5<369::AID-HUMU2>3.0.CO;2-E.
- Sekula R.F., Jr., Jannetta P.J., Casey K.F., Marchan E.M., Sekula L.K., McCrady C.S.** (2005) Dimensions of the posterior fossa in patients symptomatic for Chiari I malformation but without cerebellar tonsillar descent. *Cerebrospinal Fluid Res* 2:11.
- Sgouros S., Kountouri M., Natarajan K.** (2007) Skull base growth in children with Chiari malformation Type I. *J Neurosurg* 107:188-92.
- Shapiro R., Robinson F.** (1976) Embryogenesis of the human occipital bone. *AJR. American journal of roentgenology* 126:1063-8.
- Shields D.C., Ramsbottom D., Donoghue C., Pinjon E., Kirke P.N., Molloy A.M., Edwards Y.H., Mills J.L., Mynett-Johnson L., Weir D.G., Scott J.M., Whitehead A.S.** (2000) Association between historically high frequencies of neural tube defects and the human T homologue of mouse T (Brachyury). *American journal of medical genetics* 92:206-11.
- Smith P.J., Zhang C., Wang J., Chew S.L., Zhang M.Q., Krainer A.R.** (2006) An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Human molecular genetics* 15:2490-508. DOI: 10.1093/hmg/ddl171.
- Snyder P.** (2008) Chiari malformation and syringomyelia. *Radiologic technology* 79:555-8.

Solth A., Barrett C., Holliman D., Mitchell P. (2010) Chiari malformation in female monozygotic twins. *British journal of neurosurgery* 24:607-8. DOI: 10.3109/02688697.2010.495173.

Speer M.C., Enterline D.S., Mehltrerte L., Hammock P., Judith Joseph M.D., Ellenbogen R.G., Milhorat T.H., Hauser M.A., George T.M. (2003) Chiari Type I Malformation With or Without Syringomyelia: Prevalence and Genetics. *Journal of Genetic Counseling* 12:297-311.

Speer M.C., George T.M., Enterline D.S., Franklin A., Wolpert C.M., Milhorat T.H. (2000) A genetic hypothesis for Chiari I malformation with or without syringomyelia. *Neurosurg Focus* 8:E12.

Speer M.C., Melvin E.C., Viles K.D., Bauer K.A., Rampersaud E., Drake C., George T.M., Enterline D.S., Mackey J.F., Worley G., Gilbert J.R., Nye J.S. (2002) T locus shows no evidence for linkage disequilibrium or mutation in American Caucasian neural tube defect families. *American journal of medical genetics* 110:215-8. DOI: 10.1002/ajmg.10436.

Spivakov M., Fisher A.G. (2007) Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nature reviews. Genetics* 8:263-71. DOI: 10.1038/nrg2046.

Steinberg A.G., Brown D.C. (1960) On the Incidence of Cystic Fibrosis of the Pancreas. *American journal of human genetics* 12:416-24.

Stovner L.J. (1992) Headache and Chiari type I malformation: occurrence in female monozygotic twins and first-degree relatives. *Cephalalgia : an international journal of headache* 12:304-7; discussion 268.

Stovner L.J., Bergan U., Nilsen G., Sjaastad O. (1993) Posterior cranial fossa dimensions in the Chiari I malformation: relation to pathogenesis and clinical presentation. *Neuroradiology* 35:113-8.

Stovner L.J., Cappelen J., Nilsen G., Sjaastad O. (1992) The Chiari type I malformation in two monozygotic twins and first-degree relatives. *Annals of neurology* 31:220-2. DOI: 10.1002/ana.410310213.

Stovner L.J., Sjaastad O. (1995) Segmental hyperhidrosis in two siblings with Chiari type I malformation. *European neurology* 35:149-55.

Strachan T., Read A.P. (2005) *Human molecular genetics*. 3rd ed ed. Garland Science, New York.

Sulonen A.M., Ellonen P., Almusa H., Lepisto M., Eldfors S., Hannula S., Miettinen T., Tynismaa H., Salo P., Heckman C., Joensuu H., Raivio T., Suomalainen A., Saarela J. (2011) Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing. *Genome biology* 12:R94. DOI: 10.1186/gb-2011-12-9-r94.

Sun X., Meyers E.N., Lewandoski M., Martin G.R. (1999) Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes & development* 13:1834-46.

Szewka A.J., Walsh L.E., Boaz J.C., Carvalho K.S., Golomb M.R. (2006) Chiari in the family: inheritance of the Chiari I malformation. *Pediatric neurology* 34:481-5. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2005.09.008.

-T-

Tajima T., Hattori T., Nakajima T., Okuhara K., Tsubaki J., Fujieda K. (2007) A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. *Endocrine journal* 54:637-41.

Toma C., Hervas A., Balmana N., Salgado M., Maristany M., Vilella E., Aguilera F., Orejuela C., Cusco I., Gallastegui F., Perez-Jurado L.A., Caballero-Andaluz R., Diego-Otero Y.D., Guzman-Alvarez G., Ramos-Quiroga J.A., Ribases M., Bayes M., Cormand B. (2012) Neurotransmitter systems and neurotrophic factors in autism: association study of 37 genes suggests involvement of DDC. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. DOI: 10.3109/15622975.2011.602719.

Trembath D., Sherbondy A.L., Vandyke D.C., Shaw G.M., Todoroff K., Lammer E.J., Finnell R.H., Marker S., Lerner G., Murray J.C. (1999) Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 59:331-41. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9926(199905)59:5<331::AID-TERA4>3.0.CO;2-L.

Trigylidas T., Baronia B., Vassilyadi M., Ventureyra E.C. (2008) Posterior fossa dimension and volume estimates in pediatric patients with Chiari I malformations. *Childs Nerv Syst* 24:329-36.

Tubbs R.S., Beckman J., Naftel R.P., Chern J.J., Wellons J.C., 3rd, Rozzelle C.J., Blount J.P., Oakes W.J. (2011a) Institutional experience with 500 cases of surgically treated pediatric Chiari malformation Type I. *J Neurosurg Pediatr* 7:248-56.

Tubbs R.S., Beckman J., Naftel R.P., Chern J.J., Wellons J.C., 3rd, Rozzelle C.J., Blount J.P., Oakes W.J. (2011b) Institutional experience with 500 cases of surgically treated pediatric Chiari malformation Type I. *Journal of neurosurgery. Pediatrics* 7:248-56. DOI: 10.3171/2010.12.PEDS10379.

Tubbs R.S., Elton S., Blount J.P., Oakes W.J. (2001a) Preliminary observations on the association between simple metopic ridging in children without trigonocephaly and the Chiari I malformation. *Pediatric neurosurgery* 35:136-9. DOI: 50407.

Tubbs R.S., Elton S., Grabb P., Dockery S.E., Bartolucci A.A., Oakes W.J. (2001b) Analysis of the posterior fossa in children with the Chiari 0 malformation. *Neurosurgery* 48:1050-4; discussion 1054-5.

Tubbs R.S., Hill M., Loukas M., Shoja M.M., Oakes W.J. (2008) Volumetric analysis of the posterior cranial fossa in a family with four generations of the Chiari malformation Type I. *J Neurosurg Pediatr* 1:21-4.

Tubbs R.S., Lyerly M.J., Loukas M., Shoja M.M., Oakes W.J. (2007) The pediatric Chiari I malformation: a review. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 23:1239-50. DOI: 10.1007/s00381-007-0428-0.

Tubbs R.S., Rutledge S.L., Kosentka A., Bartolucci A.A., Oakes W.J. (2004a) Chiari I malformation and neurofibromatosis type 1. *Pediatric neurology* 30:278-80. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2003.09.013.

Tubbs R.S., Webb D., Smyth M.D., Oakes W.J. (2004b) Magnetic resonance imaging evidence of posterior pharynx denervation in pediatric patients with Chiari I malformation and absent gag reflex. *Journal of neurosurgery* 101:21-4. DOI: 10.3171/ped.2004.101.2.0021.

Tubbs R.S., Wellons J.C., 3rd, Blount J.P., Grabb P.A., Oakes W.J. (2003) Inclination of the odontoid process in the pediatric Chiari I malformation. *J Neurosurg* 98:43-9.

Tubbs R.S., Wellons J.C., 3rd, Blount J.P., Oakes W.J. (2004c) Syringomyelia in twin brothers discordant for Chiari I malformation: case report. *Journal of child neurology* 19:459-62.

Turgut M. (2001) Chiari type I malformation in two monozygotic twins. *British journal of neurosurgery* 15:279-80.

-V-

Vargas F.R., Roessler E., Gaudenz K., Belloni E., Whitehead A.S., Kirke P.N., Mills J.L., Hooper G., Stevenson R.E., Cordeiro I., Correia P., Felix T., Gereige R., Cunningham M.L., Canun S., Antonarakis S.E., Strachan T., Tsui L.C., Scherer S.W., Muenke M. (1998) Analysis of the human Sonic Hedgehog coding and promoter regions in sacral agenesis, triphalangeal thumb, and mirror polydactyly. *Human genetics* 102:387-92.

Vari R., Puca A., Meglio M. (1996) Cleidocranial dysplasia and syringomyelia. Case report. *Journal of neurosurgical sciences* 40:125-8.

Vega A., Quintana F., Berciano J. (1990) Basichondrocranium anomalies in adult Chiari type I malformation: a morphometric study. *J Neurol Sci* 99:137-45.

Ventureyra E.C., Aziz H.A., Vassilyadi M. (2003) The role of cine flow MRI in children with Chiari I malformation. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 19:109-13. DOI: 10.1007/s00381-002-0701-1.

Venturin M., Guarnieri P., Natacci F., Stabile M., Tenconi R., Clementi M., Hernandez C., Thompson P., Upadhyaya M., Larizza L., Riva P. (2004) Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2. *Journal of medical genetics* 41:35-41.

Vernooij M.W., Ikram M.A., Tanghe H.L., Vincent A.J., Hofman A., Krestin G.P., Niessen W.J., Breteler M.M., van der Lugt A. (2007) Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med* 357:1821-8.

Volcik K.A., Blanton S.H., Kruzal M.C., Townsend I.T., Tyerman G.H., Mier R.J., Northrup H. (2002) Testing for genetic associations in a spina bifida population: analysis of the HOX gene family and human candidate gene regions implicated by mouse models of neural tube defects. *American journal of medical genetics* 110:203-7. DOI: 10.1002/ajmg.10435.

-W-

Wang P., Dai M., Xuan W., McEachin R.C., Jackson A.U., Scott L.J., Athey B., Watson S.J., Meng F. (2006) SNP Function Portal: a web database for exploring the function implication of SNP alleles. *Bioinformatics* 22:e523-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl241.

Watson N.F., Buchwald D., Goldberg J., Maravilla K.R., Noonan C., Guan Q., Ellenbogen R.G. (2011) Is Chiari I malformation associated with fibromyalgia? *Neurosurgery* 68:443-8; discussion 448-9. DOI: 10.1227/NEU.0b013e3182039a31.

Weisfeld-Adams J.D., Carter M.R., Likeman M.J., Rankin J. (2007) Three sisters with Chiari I malformation with and without associated syringomyelia. *Pediatric neurosurgery* 43:533-8. DOI: 10.1159/000108803.

William D.A., Saitta B., Gibson J.D., Traas J., Markov V., Gonzalez D.M., Sewell W., Anderson D.M., Pratt S.C., Rappaport E.F., Kusumi K. (2007) Identification of oscillatory genes in somitogenesis from functional genomic analysis of a human mesenchymal stem cell model. *Dev Biol* 305:172-86.

Wittler L., Shin E.H., Grote P., Kispert A., Beckers A., Gossler A., Werber M., Herrmann B.G. (2007) Expression of *Msn1* in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and *Tbx6*. *EMBO Rep* 8:784-9.

-X-

Xu Z., Taylor J.A. (2009) SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic acids research* 37:W600-5. DOI: 10.1093/nar/gkp290.

-Y-

Yamashiro Y., Kryger M. (2012) Is laryngeal descent associated with increased risk for obstructive sleep apnea? *Chest* 141:1407-13. DOI: 10.1378/chest.10-3238.

Yokoyama Y., Narahara K., Tsuji K., Moriwake T., Kanzaki S., Murakami M., Namba H., Ninomiya S., Higuchi J., Seino Y. (1992) Growth hormone deficiency and empty sella syndrome in a boy with dup(X) (q13.3---q21.2). *American journal of medical genetics* 42:660-4. DOI: 10.1002/ajmg.1320420506.

Yoshikawa Y., Fujimori T., McMahon A.P., Takada S. (1997) Evidence that absence of *Wnt-3a* signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Developmental biology* 183:234-42. DOI: 10.1006/dbio.1997.8502.

-Z-

Zhu H., Barber R., Shaw G.M., Lammer E.J., Finnell R.H. (2003) Is Sonic hedgehog (SHH) a candidate gene for spina bifida? A pilot study. *American journal of medical genetics. Part A* 117A:87-8. DOI: 10.1002/ajmg.a.10841.

Zondervan K.T., Cardon L.R. (2004) The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nature reviews. Genetics* 5:89-100. DOI: 10.1038/nrg1270.

Zondervan K.T., Cardon L.R. (2007) Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nature protocols* 2:2492-501. DOI: 10.1038/nprot.2007.366.

