

NUEVO ALGORITMO DE TEST GENÉTICOS PARA EVALUACIÓN DE TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO

LUIS IZQUIERDO

Veritas Intercontinental. Madrid

Resumen En más de la mitad de los trastornos del neurodesarrollo se demuestra una etiología genética. La detección de estas variantes patogénicas tiene un impacto enorme en el curso de la enfermedad de estos pacientes. Permite la aceptación de la enfermedad por parte de los padres de los pacientes, emitir un pronóstico, adelantarnos a las futuras consecuencias de la enfermedad y, en cada vez más casos, instaurar un tratamiento o cambiar el ya establecido. Las técnicas genéticas que permiten estos diagnósticos etiológicos son muy jóvenes y por lo tanto todavía no totalmente asumidas por los neuropediatras. Incluso en las guías de diagnóstico de las diferentes sociedades científicas, sus algoritmos están desfasados por la rápida incorporación de nuevas técnicas. En este artículo se revisan las técnicas actuales así como los últimos avances en las mismas, que se están incorporando a la práctica clínica.

Palabras clave: trastornos del neurodesarrollo, test genéticos, últimos avances

Abstract *New genetic testing algorithm for evaluation of neurodevelopmental disorders.* In more than half of neurodevelopmental disorders, a genetic etiology is demonstrated. The detection of these pathogenic variants has a huge impact on the course of the disease of these patients. It allows the acceptance of the disease by the parents of the patients, issue a prognosis, anticipate the future consequences of the disease and in more and more cases establish a treatment or change the one already established. The genetic techniques that allow these etiological diagnoses are very recent therefore not yet fully assumed by neuropediatricians. Even in the diagnostic guides of the different scientific societies, their algorithms are outdated by the quick incorporation of new techniques. This article reviews the current techniques as well as the latest advances in them that are being incorporated into clinical practice.

Key words: neurodevelopmental disorders, genetic tests, latest advances

Los trastornos del neurodesarrollo son las afecciones médicas crónicas más prevalentes que se encuentran en la atención primaria pediátrica.

La atención integral de estos pacientes permite no sólo realizar diagnósticos apropiados y tratamientos basados en la evidencia, sino que debe de incluir la búsqueda de un diagnóstico etiológico, principalmente mediante la evaluación genética¹.

La identificación de una etiología genética subyacente permite emitir un pronóstico, aclarar el riesgo de recurrencia, dar forma al manejo clínico y dirigir a los pacientes y sus familias a recursos y apoyos específicos de la afección.

Aquí revisamos la utilidad de las pruebas genéticas en pacientes con trastornos del desarrollo neurológico y

describimos las tres modalidades de prueba principales y sus rendimientos: microarreglo cromosómico, *array-CGH* (**C**omparative **G**enomic **H**ybridization), secuenciación del exoma (con / sin detección de variantes de número de copia) y análisis de repetición FMR1CGG (retraso mental frágil que contiene gen CGG repetido) para el síndrome de X frágil. Además, recientemente se ha incorporado como herramienta de diagnóstico la secuenciación completa del genoma.

Dado el rendimiento diagnóstico de las pruebas genéticas y el potencial de utilidad clínica y personal, existe el consenso que las pruebas genéticas deben ofrecerse a todos los pacientes con retraso global del desarrollo, discapacidad intelectual y / o trastorno del espectro autista.

Existen recomendaciones y algoritmos diagnósticos genéticos publicados por diversas sociedades científicas para personas con discapacidad intelectual, retraso global en el desarrollo o trastornos del espectro autista. La incorporación de nuevas técnicas, gracias a su reducción en el coste y mejora en el análisis, están cambiando es-

Dirección postal: Dr. Luis Izquierdo López. Veritas Intercontinental S.L. Paseo de la Castellana 101, Bajo 1, 28046, Madrid.
e-mail: consejo.genetico@veritasint.com

tos algoritmos y no estamos lejos de la utilización de la secuenciación completa del genoma como única prueba en estos casos, pues incluirá las anomalías genéticas ya conocidas en estos pacientes mediante diferentes test, *array*, exoma, expansión, añadiendo por ejemplo otras variantes causantes de enfermedad como las intrónicas profundas.

Utilidad de las pruebas genéticas en personas con trastornos del neurodesarrollo

Establecer una base genética para el fenotipo del desarrollo neurológico de un niño puede proporcionar información adicional sobre su pronóstico y permitir que los cuidadores comprendan las áreas potenciales de necesidad y las oportunidades para un mayor apoyo.

Por ejemplo, un diagnóstico genético y la información de pronóstico que proporciona pueden facilitar la adquisición de servicios educativos, de discapacidad y de empleo.

Aunque actualmente es poco frecuente en el caso de los trastornos del desarrollo neurológico, un diagnóstico genético también podría proporcionar acceso a tratamientos específicos.

Dado el número de tratamientos que se están explorando actualmente en modelos animales y ensayos clínicos, es probable que tales terapias genéticas específicas se vuelvan más comunes. Mientras tanto, se desarrollan nuevas terapias, un diagnóstico genético puede brindar acceso a protocolos de investigación específicos.

Es importante señalar, que dilucidar las etiologías y los procesos fisiopatológicos es un paso necesario hacia el desarrollo de modelos animales y líneas celulares humanas para su uso en estudios de patogénesis, ensayos clínicos y, en última instancia, tratamientos dirigidos basados en mecanismos para los trastornos del neurodesarrollo.

Además de facilitar el manejo médico y el acceso a los servicios, un diagnóstico genético también puede permitir a las familias evitar pruebas diagnósticas innecesarias, como resonancias magnéticas repetidas y, con un diagnóstico etiológico en la mano, las familias pueden evitar intervenciones terapéuticas que se basan en teorías etiológicas infundadas y son potencialmente dañinas. (p. ej. terapia de quelación).

También, las pruebas genéticas pueden brindarles a los pacientes y a sus cuidadores la capacidad de identificar, tratar y / o prevenir comorbilidades médicas en el momento del diagnóstico, así como afecciones que pueden desarrollarse más adelante en la vida, adelantándose a las consecuencias de las mismas y mejorando la calidad de vida del paciente.

El conocimiento de la etiología genética permite el conocimiento sobre el riesgo de recurrencia y así poder tomar diferentes opciones reproductivas.

Cuando se determina la etiología, el riesgo de recurrencia para una familia varía según las variantes genómicas identificadas. Para los padres de un niño con un trastorno del neurodesarrollo, la recurrencia puede ser del 50%, por ejemplo, en el caso de una duplicación intersticial del cromosoma 15q11 – q13 heredado de origen materno, del 25% en el caso de un trastorno autosómico recesivo como el Síndrome de Smith- Lemli-Opitz, o aproximadamente la tasa de prevalencia del trastorno en particular en la población general (p. ej. ~ 1.5% para TEA) si el niño tiene una variante *de novo*, es decir no heredada de los progenitores.

Esta información, explicada en una sesión de asesoramiento genético, ofrece a los padres y otros miembros de la familia, hermanos, una comprensión de sus riesgos reproductivos y de las diferentes opciones para disminuir el riesgo mediante diagnóstico pre-implantacional o prenatal.

En el caso de etiologías hereditarias, la identificación de un diagnóstico genético para el probando, también puede proporcionar el diagnóstico de otros miembros de la familia con antecedentes de un trastorno del neurodesarrollo.

Además de la utilidad clínica conferida a través de un diagnóstico genético, la identificación de una etiología también puede proporcionar un beneficio psicosocial a las familias.

Un diagnóstico genético puede proporcionar a las familias una explicación del historial de desarrollo de su hijo y, por lo tanto, poner fin a la "odisea diagnóstica" del niño que puede haber incluido años de incertidumbre, ansiedad y evaluaciones y también puede orientar a los pacientes y sus familias hacia recursos y apoyos específicos para cada afección.

Recibir un diagnóstico aumenta el conocimiento, proporciona una sensación de empoderamiento, produce tranquilidad, aumenta la calidad de vida de los padres, disminuye su culpabilidad y fomenta una mayor aceptación de la discapacidad de su hijo.

Pruebas genéticas en pacientes con trastornos del neurodesarrollo

En las últimas dos décadas, los rápidos avances en el desarrollo de tecnologías de pruebas genéticas y la aplicación de estas tecnologías a cohortes de pacientes bien caracterizadas han revolucionado nuestra capacidad para realizar diagnósticos genéticos específicos en pacientes que presentan trastornos del neurodesarrollo.

Se están conociendo nuevos genes implicados en el neurodesarrollo a un ritmo rápido. Actualmente se conocen más de 900 genes con una relación probada con trastornos del neurodesarrollo.

En la práctica, un diagnóstico etiológico genético puede sospecharse clínicamente y confirmarse mediante pruebas genéticas específicas de genes, (paneles).

También más comúnmente, puede conseguirse mediante el análisis de regiones del genoma como son los micro-arreglos cromosómicos (CMA), la secuenciación del exoma (ES) o el análisis de expansiones de CGG en FMR1 para X frágil.

Siendo este último un test inicial o de primera línea recomendado como parte de rutina de la evaluación de un paciente con trastorno del neurodesarrollo en ausencia de un síndrome clínicamente reconocible.

Micro-arreglo cromosómico o *array*-CGH (CMA)

El micro-arreglo cromosómico (una prueba de primer nivel para varias indicaciones, incluso en pacientes con trastorno del CMA – *Chromosomal microarray analysis*) de todo el genoma ha sido aprobado como Espectro Autista (TEA), Discapacidad Intelectual (DI), Trastorno Generalizado del Desarrollo (TGD) y / o anomalías congénitas múltiples.

Las tecnologías CMA (hibridación genómica comparada (CGH) *array* CGH y las pruebas basadas en polimorfismos de nucleótido único (SNP) detectan variantes del número de copias (CNV): ganancias o pérdidas de material cromosómico respecto a un genoma control.

En algunos casos, tales ganancias o pérdidas afectan la función de los genes y afectan a la salud y el desarrollo de su portador.

La resolución, o el tamaño de las ganancias y pérdidas que puede detectar la CMA, varía y está determinada por la tecnología específica utilizada y la distancia genómica entre las sondas de ADN.

Las variantes en número de copias detectadas a través de CMA deben clasificarse en las siguientes categorías de acuerdo con las pautas del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) y *Clinical Genome Resource* (ClinGen).

1) Patogénicas: CNV, que se sabe que están asociadas con enfermedades. Las CNV patogénicas son las que explican el fenotipo del paciente, también aquellas que están asociadas con el estado de portador de una condición recesiva y aquellas que indican riesgo de enfermedad por un fenotipo no relacionado, incidentales. Las CNV patogénicas que son responsables del trastorno del neurodesarrollo de un paciente pueden incluir deleciones o duplicaciones recurrentes, como el síndrome de deleción 22q11.2 o la microdeleción recurrente 17p11.2 que causa el síndrome de Smith-Magenis, es decir CNV ya descritas o nuevas ganancias o pérdidas que afectan a la función del gen.

2) Probablemente patogénicas: CNV que tienen pruebas considerables que sugieren que están asociadas con una enfermedad, pero en las que pruebas adicionales podrían aclarar aún más la patogenicidad de la variante.

3) Significado incierto: CNV que no tienen suficiente información para determinar si son patogénicas o benignas. Cuando se identifica una CNV con significado incierto, se pueden utilizar estudios parentales para proporcionar información adicional para aclarar la patogenicidad.

4) Probablemente benignas: CNV que tienen evidencia considerable para sugerir que no están asociadas con la enfermedad, pero donde evidencia adicional podría aclarar esto.

5) Benignas: CNV que no se cree que estén asociadas con una enfermedad. Suelen estar presentes en individuos fenotípicamente normales o en la población general.

Las interpretaciones pueden cambiar con el tiempo a medida que surgen nuevas pruebas que informan la patogenicidad de una variante. Debido a que la CMA analiza todo el genoma, se pueden identificar hallazgos incidentales o aquellos que no están relacionados con la indicación primaria.

Además de las CNV, los laboratorios que emplean CMA basada en SNP también pueden detectar regiones de homocigosidad (segmentos cromosómicos que son idénticos entre sí). La identificación de regiones de homocigosidad permite la detección potencial de condiciones que pueden ser causadas por disomía uniparental (UPD) tales como los síndromes Silver-Russell (cromosoma 7 UPD materno), Angelman (cromosoma 15 UPD paterno) y Prader-Willi (cromosoma 15 UPD materno).

Aunque la CMA puede detectar CNV, esta tecnología tiene una capacidad limitada para detectar reordenamientos cromosómicos equilibrados (translocaciones, inversiones), expansiones de repetición de trinucleótidos, desequilibrios en el genoma mitocondrial, anomalías epigenéticas (p. ej., anomalías de metilación), variantes de nivel de secuencia o niveles bajos de nivel de mosaicismo para las CNV.

Como se indicó anteriormente, el tamaño de las deleciones y / o duplicaciones que puede detectar CMA varía. Las plataformas clínicas actuales de CMA pueden detectar CNV de aproximadamente 400 kb de tamaño y muchos laboratorios detectan esas > 250 kb.

Ciertas regiones pueden tener un objetivo más específico, lo que permite una detección de CNV aún más pequeña, pero suelen complicar la asignación de estas microdeleciones nuevas con la clínica del paciente. Está recomendada una resolución de 400 kb.

Las pruebas adicionales discutidas en esta revisión pueden ayudar en la detección de algunas variantes que CMA no puede detectar, incluido el análisis de repetición CGG en FMR1 para la expansión de repetición de trinucleótidos que causa el síndrome de X frágil y ES para la detección de variantes de secuencia exónica. Las pruebas citogenéticas, incluido el cariotipo con bandas G y / o la hibridación in situ de fluorescencia (FISH), así como las pruebas de metilación, pueden detectar variantes adicionales o aclarar los resultados de la CMA.

Rendimiento diagnóstico de CMA en TEA, DI, TGD

El rendimiento diagnóstico de CMA es la proporción de pruebas realizadas que identifican una variante que se considera causante del fenotipo de un paciente. En conjunto, puede identificar un resultado causal en el 15-20% de las personas con DI / TGD, TEA y / o anomalías congénitas múltiples.

Secuenciación del exoma (SE)

En la última década, la llegada de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, denominadas colectivamente secuenciación de próxima generación (NGS) o secuenciación masivamente paralela, ha reducido el costo y aumentado la velocidad de secuenciación, lo que permite a los laboratorios secuenciar grandes cantidades de ADN. En lugar de analizar un solo gen o varios genes, los laboratorios ahora pueden ofrecer la secuenciación de amplios paneles de genes, de todo el exoma o el genoma completo.

En SE, se secuencian las regiones codificantes de proteínas, o exones, del genoma. El exoma constituye alrededor del 1.5% al 2% del genoma, pero la gran mayoría de variantes patogénicas responsables de las enfermedades monogénicas se localizan en las regiones codificantes, los exones.

SE permite la detección de variantes de un solo gen a nivel de secuencia en casi todo el exoma y un pequeño número de nucleótidos intrónicos en los límites de cada exón.

Además de la detección de variantes a nivel de secuencia, varios laboratorios clínicos ahora están incorporando el análisis de CNV en SE y pueden detectar deleciones y duplicaciones de múltiples exones y es probable que más laboratorios agreguen esto a sus análisis de exomas en el futuro.

La secuenciación completa del exoma se está imponiendo como prueba de primer nivel. Aunque el análisis limitado de un número de genes relacionados con la clínica del paciente, es en principio más económico, la complejidad en la descripción de la exploración física del paciente y los datos analíticos conducen a estudios sin resultado que finalmente han de ser ampliados a secuenciación de exoma completo.

Al igual que con CMA, las variantes detectadas por ES se clasifican como patogénicas, probablemente patogénicas, de significado incierto, probablemente benignas o benignas de acuerdo con las pautas de interpretación de variantes de secuencia de ACMG / *Association for Molecular Pathology* (AMP).

Con el tiempo, la patogenicidad de una variante puede actualizarse a medida que surge nueva información. La

SE también incluye el análisis de genes que aún no están asociados con un fenotipo específico, por lo que es muy importante pautar un re-análisis periódico en estos casos como en el de las variantes de significado incierto.

También pueden detectarse variantes patogénicas no relacionadas con la enfermedad del paciente, hallazgos incidentales, que se reportarán en el caso que en el consentimiento informado se halla expresado la conformidad con su comunicación, por ejemplo: variantes patogénicas en genes relacionados con cáncer familiar.

El ACMG ha recomendado que los médicos notifiquen a sus pacientes si se identifica una variante que se sabe o se espera que aumente el riesgo de enfermedad en una lista de, actualmente, 59 genes clínicamente procesables. ACMG ha especificado que los pacientes y las familias tienen la capacidad de optar por no participar en tales hallazgos y continuará actualizando esta lista de genes clínicamente procesables a medida que surja evidencia adicional.

Aunque SE captura la mayor parte del exoma, éste no está cubierto en su totalidad y la cobertura puede diferir entre plataformas y laboratorios. Como resultado, SE puede no detectar todas las variantes en la secuencia codificante y por tanto dar un resultado no informativo en casos que realmente son debidos a variantes patogénicas. Es por tanto importante al revisar un resultado que se indique el tanto por ciento de cobertura en los genes estudiados por si es necesario realizar una técnica adicional para completar la cobertura.

SE también tiene una menor sensibilidad para la detección de mosaicismo y deleciones y/o duplicaciones a nivel de exón en comparación con los paneles de genes que incluyen análisis de deleciones/ duplicaciones.

Un número cada vez mayor de laboratorios está analizando CNV a partir de datos de SE. Sin embargo, los laboratorios que detectan y notifican las CNV tienen una capacidad limitada para detectar deleciones o duplicaciones que involucran solo uno o dos exones. Además, SE no puede detectar secuencias de ADN repetitivas, incluidas repeticiones de trinucleótidos (p. ej., la expansión de la repetición CGG que causa el síndrome de X frágil), variantes intrónicas/no codificantes, variantes mitocondriales, variantes epigenéticas (p. ej., anomalías de metilación) o reordenamientos cromosómicos equilibrados.

El rendimiento diagnóstico del análisis de la secuenciación del exoma completo, es decir el tanto por ciento de estudios que detectan una variante patogénica en los casos del trastorno del neurodesarrollo es de media un 30% aunque diversas publicaciones dan un rango entre el 25 y el 41%, debido seguramente a la selección de los pacientes en los estudios, con o sin malformaciones asociadas².

En el caso de discapacidad intelectual (IQ<50) el rendimiento es del 16 al 27% mientras que en trastornos del espectro autista (TEA) el rendimiento baja al 12-16%.

Los algoritmos propuestos por las diferentes sociedades científicas en el momento actual son:

Recomendaciones de las sociedades científicas

Las recomendaciones de las principales sociedades científicas con respecto al algoritmo de estudios genéticos en los casos de trastornos del neurodesarrollo son:

Academia Americana de Psiquiatría de niños y adolescentes:

- CMA en todas las personas con TEA, DI, TGD
- Análisis de repeticiones de *FMR1* en hombres y mujeres con DI o antecedentes familiares
- Dependiendo de la historia y el examen físico, considerar:
 - o Prueba de *PTEN* si la circunferencia de la cabeza (HCM) es más de 2.5 DE por encima de la media para la edad en un niño con TEA, DI, TGD
 - o Prueba de *MECP2* para el síndrome de Rett en mujeres con identificación severa
- Cariotipo si se sospecha un síndrome cromosómico
- Si otras investigaciones no proporcionan una etiología y hay hallazgos clínicos no justificados, considere la secuenciación de exoma completo y la prueba de ADN mitocondrial.

Academia Americana de Pediatría

- Si una historia y un examen completos son indicativos de un síndrome o trastorno específico, proceda con pruebas específicas en pacientes con TEA, DI, TGD
- En todos los individuos con TEA, DI, TGD sin hallazgos específicos, considere realizar el análisis CMA y *FMR1* CGG.
- En mujeres con TEA, DI, TGD sin hallazgos específicos, considere la prueba *MECP2*.
- En varones con DI, TGD sin hallazgos específicos, considere un panel de DI ligado al X (XLID).
- Si no se identifica una etiología, considere una derivación a genética para un estudio adicional, incluida la secuenciación del exoma.

Colegio Americano de Genética Médica

- Tras una historia familiar detallada y un examen físico, proceda con pruebas específicas para pacientes con TEA si se sospecha un síndrome o si las características sugieren una condición mitocondrial o metabólica.
- Si los antecedentes familiares y el examen físico no sugieren un diagnóstico específico, una condición metabólica o mitocondrial, proceda con CMA para todos los pacientes con TEA y repita el análisis *FMR1* para todos los hombres con TEA.

- Si CMA (en hombres y mujeres) y el análisis repeticiones de *FMR1* (en hombres) no son diagnósticos, considere:

- o Secuenciación de *MECP2* en todas las mujeres con TEA
- o Prueba de duplicación *MECP2* en hombres con ASD si el fenotipo es sugestivo
- Prueba de *PTEN* en pacientes con TEA si la HCM es más de 2.5 DE por encima de la media para la edad
- Análisis de repeticiones de *FMR1* en mujeres con ASD y características adicionales que sugieren X frágil (p. ej. antecedentes familiares y fenotipo)
- CMA es la prueba genética de primer nivel en pacientes con anomalías congénitas múltiples que no son indicativas de un síndrome genético específico y aquellos con TEA, DI, TGD no sindrómico.

Sociedad de Neurología Infantil de la Academia Americana de Neurología

- Cariotipo de alta resolución y análisis de repeticiones de *FMR1* para pacientes con TEA que también tienen DI, antecedentes familiares de X frágil y/o DI, o características dismórficas.
- Después de obtener una historia personal y familiar detallada para pacientes con TEA, DI, TGD, si se considera una etiología específica, realice las pruebas apropiadas, como pruebas de un solo gen, pruebas metabólicas o panel XLID.
- Si no se sospecha una etiología específica, realice CMA (o, si no es posible, cariotipo y FISH sub-telomérico) para todas las personas con TEA, DI, TGD, prueba *MECP2* para mujeres con DI, TGD de moderada a grave y análisis de repeticiones de *FMR1* en todas las personas con DI, TGD leve.
- Si estos y otros estudios etiológicos son negativos, considere una derivación a genética.

Conclusiones

Estos algoritmos serán en breve revisados a la vista de los últimos estudios publicados sobre el rendimiento diagnóstico del análisis del exoma y del genoma completo así como la mayor capacidad de las técnicas de secuenciación masiva para detectar no solo variaciones en el número de copia sino también las expansiones de tripletes en el gen *FMR1*.

En 2019 ya se propuso el siguiente algoritmo por un comité de expertos:

- Secuenciación completa del exoma en pacientes con discapacidad intelectual o TEA
- Si no se halla variante patogénica, y no se han analizado las CNVs realizar un CMA

- Si ninguno de los dos anteriores son diagnósticos, se deben de reanalizar las variantes de significado incierto halladas periódicamente.

En 2022 podríamos añadir como siguiente paso el análisis de secuenciación completa del genoma. El rendimiento del análisis del genoma en trastornos del neurodesarrollo está entre el 41 y el 73%, aunque las series son todavía pequeñas es claro que se impondrá en breve como test de primera línea³.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Savatt JM, Myers SM. Genetic testing in neurodevelopmental disorders. *Font Pediatr* 2021; 9: 526779. doi.org/10.3389/fped.2021.526779
2. Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med* 2019; 21: 2413-21.
3. Lee HF, Chi CS, Tsai CR. Diagnostic yield and treatment impact of whole-genome sequencing in pediatric neurological disorders. *Dev Med Child Neurol* 2021; 63: 934-8.