

Estudios genéticos

María Dolores Miramar Gallart,
Javier López Pisón

Septiembre 2017

Introducción

- Los estudios genéticos aplicados a la clínica diaria están experimentando un enorme y continuo avance en los últimos años: array-CGH y estudios de secuenciación.
- Los avances en genética molecular han revolucionado el proceso diagnóstico y se están constituyendo en muchos casos en la primera prueba a realizar.
- La identificación de una mutación patogénica cierra el estudio etiológico y optimiza seguimiento, asesoramiento genético y diagnósticos prenatal y preimplantacional.
- De especial importancia es la identificación de enfermedades susceptibles de tratamiento y las enfermedades de transmisión vertical, autosómicas dominantes o ligadas a X.

Introducción

- Esta puesta al día pretende reflejar de forma clara y sencilla dónde estamos hoy día en los estudios genéticos aplicados a la clínica diaria, aunque es un tema complejo que está experimentando un enorme y continuo avance en los últimos años.
- Son pruebas no solicitadas habitualmente por el pediatra de Atención Primaria (PAP), pero debe conocer su existencia y estar preparado para poder comprender su utilidad y por qué están revolucionando el proceso diagnóstico.
- Indicación estudios genéticos en pediatría
 - Diagnóstico en pacientes afectos de una enfermedad.
 - Cribado neonatal.
 - Detección de portadores.
 - Estudios de susceptibilidad o predisposición genética a determinadas enfermedades.

Variantes responsables de patologías

Las enfermedades genéticas pueden estar causadas por:

- Mutaciones genéticas.
- Mutaciones genómicas.
- Alteraciones cromosómicas.
- Cambios epigenéticos anómalos.

Y pueden encontrarse en:

- Todas las células de un individuo.
- Solo en un porcentaje de ellas (mosaicismo).

Variantes responsables de patologías

Mutaciones genéticas: son alteraciones que afectan a la secuencia del ADN codificante o regulador de los diversos genes. Hoy en día se ha pasado a utilizar más el término “variante”, que puede ser clasificadas como:

- Patogénicas: mutación (se reserva el término mutación a la patogenicidad).
- De significado incierto (VOUS o VUS, del inglés *variant of uncertain significance*)
- Polimórficas (presentes a partir del 1% en la población), consisten en *single nucleotide polymorphisms* (SNP) que pueden afectar a un nucleótido o una pequeña secuencia. Muchos SNP no tienen efecto sobre la función de la célula, pero otros podrían influir en la predisposición a enfermedades y en la respuesta a bacterias, virus o toxinas y en la respuesta a diferentes drogas y tratamientos.

Variantes responsables de patologías

Mutaciones genéticas

- Las enfermedades hereditarias monogénicas son originadas por la mutación o alteración patogénica en la secuencia de un solo gen. Se conocen más de 6000 enfermedades hereditarias monogénicas y se transmiten por un patrón de herencia mendeliano: dominante, recesivo o ligado al X.
- Cuando la mutación se localiza en el ADN mitocondrial, la herencia es por vía materna.
- Las enfermedades poligénicas o multifactoriales son producidas por la combinación de múltiples factores ambientales y variantes de riesgo en varios genes.

Variantes responsables de patologías

Mutaciones genéticas

- En algunos casos, existen mutaciones *de novo*, que no están presentes en los progenitores.
- Son especialmente relevantes en enfermedades en las que un solo alelo mutado es suficiente para desarrollar la enfermedad.
- Ejemplos representativo son la mayoría de las encefalopatías epilépticas de inicio precoz y muchas de las causas de discapacidad intelectual y otros trastornos del neurodesarrollo.

Variantes responsables de patologías

Mutaciones genéticas

- También existen enfermedades genéticas debidas a la expansión de tripletes en regiones que inactivan el gen.
- Se trata de mutaciones dinámicas ya que se puede producir un fenómeno de expansión en la siguiente generación:
 - Síndrome de X-frágil.
 - Distrofia miotónica.
 - Ataxia de Friedreich.
 - Otras.

Variantes responsables de patologías

Mutaciones genómicas

- Afectan a la estructura o número de copias de fragmentos de un cromosoma.
- Se incluyen las microdeleciones y microduplicaciones, que son la causa de un gran número de síndromes como:
 - Síndrome de DiGeorge-velocardiofacial (delección en región 22q1.2).
 - Síndrome de Williams (delección en región 7q11.23).

Variantes responsables de patologías

Alteraciones cromosómicas

Engloban grandes regiones de los cromosomas o cromosomas completos y pueden ser:

- Numéricas
 - Trisomía 21 (Down), trisomía 18 (Edwards), trisomía 13 (Patau).
 - Monosomía X (Turner), disomía X en varones (Klinefelter) o trisomía X.
- Estructurales.
- Equilibradas, cuando se conserva el contenido de material genético.
- Desequilibradas, existe una pérdida o ganancia de material genético: deleciones, duplicaciones, translocaciones, inserciones, inversiones y otros reordenamientos complejos.

Variantes responsables de patologías

Cambios epigenéticos anómalos

- La impronta genómica es un proceso epigenético de regulación de expresión génica durante el desarrollo, que afecta a un número reducido de genes y determina el silenciamiento de los mismos, dependiendo del origen parental, de modo que únicamente se expresa el alelo paterno o el materno.
- Enfermedades asociadas a la alteración de este mecanismo son síndromes de Prader-Willi, Beckwith-Wiedemann y Silver-Russell.

Estudios genéticos

- Las técnicas empleadas para el abordaje genético van a depender de si existe o no una sospecha clínica definida sobre una patología determinada y del tipo de alteración genética subyacente a la misma, ya que todas las técnicas tienen su campo de aplicación y sus limitaciones.
- Además, la mayoría de las enfermedades se deben a diferentes tipos de alteraciones, por lo que en el análisis de una enfermedad suelen estar implicadas diferentes técnicas de análisis genético.

Estudios genéticos

- Cariotipo convencional y de alta resolución.
- Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
- Análisis de expansiones. Mutaciones dinámicas.
- PCR a tiempo real.
- *Multiple ligation-dependent probe amplification* (MLPA).
- Array-CGH
- Secuenciación Sanger y de nueva generación: paneles y exomas (todavía no implementada a nivel clínico).
- Secuenciación del genoma total.

Estudios genéticos

Cariotipo convencional y de alta resolución

- Detectan solo anomalías cromosómicas numéricas o estructurales mayores, entre 5-10 Mb, y su rentabilidad diagnóstica es baja.
- Se ha limitado su uso a casos con antecedentes familiares de reordenamientos cromosómicos, a fenotipos clásicos claramente identificados (como el Down) o para detección de mosaicismos.

Estudios genéticos

Hibridación in-situ fluorescente (FISH)

- Se basa en el marcaje con fluorescencia de una sonda de DNA complementaria a la región de interés, que es hibridada a regiones cromosómicas en interfase o metafase. Existen diversos tipos de sondas para el marcaje.
- Permite la detección de duplicaciones o deleciones genómicas, así como inversiones y translocaciones balanceadas. También permite identificar mosaicismos y cuantificar su grado.
- Hoy en día la aplicación de esta técnica en el campo de la pediatría está indicada ante clara sospecha de un síndrome conocido por microdelección/microduplicación o antecedentes familiares del mismo, así como para el estudio de reordenamientos complejos tras su detección por aCGH, la detección de traslocaciones equilibradas y de mosaicismos.

Estudios genéticos

Análisis de expansiones. Mutaciones dinámicas

- Algunas enfermedades (ataxia de Friedreich, la enfermedad de Steinert, corea de Huntington o el síndrome de X-frágil) se deben a la expansión de tripletes debido a mutaciones dinámicas en el ADN. El estudio de estas expansiones se realiza, principalmente por técnicas basadas en PCR y TP-PCR a través del análisis de fragmentos en un secuenciador capilar y, en casos de grandes expansiones fuera de los límites de cuantificación de estas técnicas, análisis por *southern-blot*.
- Las alteraciones genéticas por expansión no son detectables mediante otras tecnologías, por lo que su estudio exige este tipo de análisis.

Estudios genéticos

PCR a tiempo real

- La PCR a tiempo real es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de PCR. En un equipo de PCR a tiempo real, a través de la medición de fluorescencia, se cuantifica la tasa de generación de fragmentos específicos de PCR. Dicha medición, se realiza tras cada ciclo de amplificación.
- Se utiliza para enfermedades con un volumen elevado de estudios en la rutina clínica y con mutaciones recurrentes, como la hemocromatosis hereditaria tipo 1 en la que se estudian tres mutaciones en el gen *HFE* (C282Y, H63D y S65C).

Estudios genéticos

Multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA)

- Permite detectar variantes de número de copias (CNV) que afectan a exones de genes o regiones de los mismos. Se basa en el uso de sondas específicas para cada región, una amplificación múltiple simultánea y análisis de fragmentos por secuenciación capilar. Ventaja de poder estudiar varias regiones a la vez por un método rápido que permite un tiempo de esta rápido (2-3 días) y con bajo coste. Sin embargo no detecta reordenamientos genómicos balanceados ni mosaicismos. Existen muchas sondas MLPA comerciales, sin embargo, no todos los genes tienen disponible este tipo de sondas.
- Útil para trastornos genómicos recurrentes y para enfermedades cuya causa genética más frecuente son las grandes deleciones o duplicaciones, como la enfermedad de Duchenne. Todas las enfermedades genéticas causadas por mutaciones genéticas pueden tener un pequeño porcentaje de casos debidos a mutaciones genómicas. En estos casos, tras la secuenciación de un gen se realiza el estudio mediante MLPA.

Estudios genéticos

Methylation-specific MLPA (MS-MLPA)

- Se pueden estudiar cambios en el estado de metilación de regiones en el ADN. Además de cuantificar dosis génica, como la técnica MLPA, permite valorar el porcentaje de metilación de las regiones sometidas a impronta genómica.
- De elección para el estudio de enfermedades causadas por errores de impronta genómica como los síndromes de Prader-Willi, Wiedemann-Beckwith o Silver-Russell.

Estudios genéticos

Array de hibridación genómica comparativa (array-CGH)

- La hibridación genómica comparativa o CGH permite la exploración de los 46 cromosomas humanos en una sola prueba, identificando CNV al compararlas con una muestra de referencia: ganancia o pérdida de cromosomas completos o regiones subcromosómicas (deleciones y duplicaciones) en escala microscópica.
- El array-CGH permite medir la variación del número de copias *locus* por *locus* con una resolución mayor, que depende del diseño del array.
- El array-CGH solo puede detectar anomalías cromosómicas desequilibradas. Su desventaja principal es su incapacidad para detectar aberraciones cromosómicas estructurales sin cambios en el número de copia, como translocaciones cromosómicas equilibradas, inversiones y cromosomas en anillo. El nivel de mosaicismo que puede ser detectado depende de la sensibilidad y resolución espacial de los clones, aunque generalmente el 20% es el límite de detección.
- Es hoy estudio de primera elección de la discapacidad intelectual, junto al X-frágil (transmisión vertical). Identifica la mutación causal en alrededor del 20% de los casos.

Estudios genéticos

Secuenciación

Las técnicas de secuenciación identifican mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o duplicaciones. También permite, en algunos casos, el análisis de CNV.

- **Secuenciación Sanger:** indicada para el estudio de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o duplicaciones en genes. Gran validez analítica y clínica. Los hallazgos patológicos detectados por secuenciación masiva se deben validar por esta técnica. Limitada al estudio de genes de forma individual: NF1, esclerosis tuberosa, fibrosis quística...

Estudios genéticos

Secuenciación

- **Secuenciación de nueva generación:** permite secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela a un precio más bajo. La detección de variantes genéticas a partir de datos de NGS consiste en identificar diferencias en la secuencia de ADN de un individuo al compararlo con un ADN de referencia. Se pueden detectar mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o duplicaciones y actualmente se están implementando algoritmos de detección de CNV que podrán sustituir a los estudios por MLPA.
- Paneles de genes para enfermedades que pueden estar causadas por diferentes genes.
- La secuenciación del exoma para la búsqueda de mutaciones causales para una enfermedad de sospecha en la que están implicados varios genes, para búsqueda de mutaciones en genes de grupos de enfermedades o para la identificación de mutaciones en ausencia de una sospecha clínica definida. Generalmente a partir del estudio de dos genes, su coste es inferior respecto a la secuenciación Sanger. Se estima un rendimiento diagnóstico de 25-30%.

Interpretación de resultados.

Predicción del efecto de los CNV y SNP

- Como todo estudio, los resultados pueden ser claramente anómalos (responsable de patología), normales (lo que indica que no se ha identificado la supuesta mutación responsable) o dudosos. En los casos dudosos la información debe ser clara en ese sentido, y se debe intentar aclarar en lo posible con los medios disponibles.
- Se dispone de bases de datos de variantes genéticas y genómicas. Cuando se identifica un CNV o SNP se establece si ha sido previamente asociada a patología en las bases de datos existentes, en cuyo caso probablemente será diagnóstico.
- Si no ha sido reportado asociado a patología se valora el tipo de mutación y cómo afecta a la secuencia proteica.
- Las variantes que originan un codón de stop y por tanto generan una proteína truncada se consideran patogénicas, aunque no se hayan descrito previamente.

Interpretación de resultados.

Predicción del efecto de los CNV y SNP

- Si se trata de otro tipo de variante y no está reportada previamente se establece como variante de significado clínico incierto (VOUS). En esos casos se realizan los estudios de predicción bioinformáticos o estudios *in silico*, que indican la probabilidad de que sean o no patogénicas. Se han desarrollado una serie de programas y aplicaciones informáticas para predecir los efectos que una determinada variante tendrá sobre la correspondiente proteína y algoritmos de predicción de *splicing*.
- En los casos de variantes de *splicing* se pueden realizar estudios a partir de ARN para estudiar su efecto y verificar si origina una alteración en el transcrito. En algunos casos se pueden realizar estudios de expresión proteica o estudios funcionales a partir de fibroblastos.
- En todos los casos se estudia a los progenitores: mutación *de novo* apoya la patogenicidad, aunque hay descritas enfermedades de herencia AD con penetrancia incompleta y expresividad variable; puede haber progenitores asintomáticos portadores de las mutaciones.