

Estudios genéticos



M. D. Miramar Gallart¹, J. López Pisón²

¹Sección de Genética. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

²Sección de Neuropediatría. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

PUNTOS CLAVE

- 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 que realizar.
- La identificación de una mutación patogénica cierra el estudio etiológico y optimiza el seguimiento, el asesoramiento genético y los diagnósticos prenatal y preimplantacional.
- De especial importancia es la identificación de enfermedades susceptibles de tratamiento y las enfermedades de transmisión vertical, autosómicas dominantes (AD) o ligadas a X.
- En algunos casos hay orientación clínica como para dirigirse a la identificación de mutaciones responsables de un determinado proceso.
- En ausencia de un diagnóstico clínico de razonable certeza, la tendencia es a realizar estudios ampliados a las posibilidades diagnósticas existentes.
- En algunos casos, como la mayoría de las encefalopatías epilépticas de inicio precoz y muchos de los trastornos del neurodesarrollo, son mutaciones *de novo*.
- En general, casi todas las enfermedades pueden deberse a diferentes tipos de alteraciones genéticas, por lo que su estudio abarca diferentes técnicas.
- En los próximos años la secuenciación del genoma total sustituirá a los estudios por exoma, ya que se considera que puede incrementar el rendimiento diagnóstico.
- El pediatra de Atención Primaria (PAP) debe conocer los avances en genética y comprender por qué están revolucionando el proceso diagnóstico.

RESUMEN

Se realiza una actualización de los estudios genéticos aplicados a la clínica, que están experimentando un enorme y continuo avance en los últimos años. El PAP debe conocer su existencia y estar preparado para poder comprender su utilidad y por qué están revolucionando el proceso diagnóstico. Los estudios de genética molecular se están constituyendo en muchos casos en la primera prueba que realizar. La tendencia es, en ausencia de un diagnóstico clínico de razonable certeza, realizar estudios ampliados a las posibilidades diagnósticas existentes. En los casos de clara orientación clínica, los estudios buscan la identificación de mutaciones responsables de un determinado proceso. En general casi todas las enfermedades pueden deberse a diferentes tipos de alteraciones genéticas, por lo que su estudio abarca diferentes técnicas.

INTRODUCCIÓN

La indicación de los exámenes complementarios busca establecer el diagnóstico etiológico, de gran importancia en patologías que puedan ser susceptibles de tratamiento como algunas enfermedades hereditarias como la fenilcetonuria o el hipotiroidismo, o que asocien un riesgo de repetición como los problemas genéticos. De especial importancia es la identificación de enfermedades de transmisión vertical como la distrofia miotónica, de herencia AD, y el síndrome X-frágil y la distrofia muscular de Duchenne, ligadas a X.

El proceso diagnóstico de muchos problemas genéticos es con frecuencia poco rentable, con baja relación coste-efectividad de los estudios complementarios en ausencia de orientación clínica clara, como es frecuente en diversos problemas como los trastornos del neurodesarrollo, muchas epilepsias genéticas, muchas raras enfermedades neuromusculares y muchas enfermedades metabólicas, todos problemas de alto

impacto personal, social, familiar y económico, lo que lleva a una elevada demanda de diagnóstico precoz. La mayoría son enfermedades raras, y la Comunidad Europea recomienda a sus estados miembros que establezcan un plan nacional de enfermedades raras¹; en España la segunda línea estratégica de este plan nacional es la prevención y detección precoz².

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, ayuda a obtener las respuestas buscadas y a optimizar el seguimiento, evita la necesidad de muchos otros estudios complementarios y permite el asesoramiento genético y diagnóstico prenatal y preimplantacional, constituyéndose en herramienta preventiva de primer orden.

En algunos casos hay orientación clínica como para dirigirse a la identificación de mutaciones responsables de un determinado proceso, como puede ser la atrofia muscular espinal, la fibrosis quística o la distrofia miotónica. Los continuos avances genéticos asocian un abaratamiento de estudios menos dirigidos, y la tendencia es, en ausencia de un diagnóstico clínico de razonable certeza, a realizar estudios ampliados a las posibilidades diagnósticas existentes; resulta más económico en tiempo y dinero un estudio amplio que ir buscando mutaciones en los diferentes genes candidatos.

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 PAP, pero este debe conocer su existencia y estar preparado para poder comprender su utilidad, y por qué están revolucionando el proceso diagnóstico.

INDICACIÓN DE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS EN PEDIATRÍA

Las pruebas genéticas en Pediatría se pueden clasificar en diferentes grupos según el objetivo al que van dirigidas: diagnóstico en pacientes afectados de una enfermedad, cribado neonatal, detección de portadores o estudios de susceptibilidad o predisposición genética a determinadas enfermedades.

En Pediatría, las pruebas genéticas que se solicitan con más frecuencia se dirigen al diagnóstico de pacientes afectados.

En las determinaciones incluidas en el cribado neonatal se encuentra el estudio genético de fibrosis quística en los casos

que presentan tripsina inmunorreactiva por encima del límite de la normalidad. Gracias a la detección oportuna de estas enfermedades, se pueden realizar intervenciones para prevenir la aparición de los síntomas o minimizar la gravedad de la enfermedad.

Las pruebas de detección de portadores se realizan generalmente a familiares de pacientes diagnosticados previamente y con un estudio genético realizado positivo. Los estudios de susceptibilidad o predisposición genética sirven para identificar a las personas con riesgo de una enfermedad antes de la aparición de los síntomas. Estas pruebas son muy útiles cuando una persona tiene antecedentes familiares de una enfermedad en particular y existe un método de intervención disponible para prevenir la aparición de dicha enfermedad o para minimizar su gravedad.

Variantes responsables de patologías

El exoma humano es el conjunto de secuencias codificantes para proteínas y ácidos ribonucleicos (ARN) con diversas funciones en el organismo y representa el 1-2% del genoma (35-70 Mb frente a 3200 Mb). Sin embargo, se considera que el 85% de las mutaciones responsables de patologías se encuentran en el exoma.

Las enfermedades genéticas pueden estar causadas por mutaciones genéticas, mutaciones genómicas, alteraciones cromosómicas o cambios epigenéticos, y pueden encontrarse en todas las células de un individuo o solo en un porcentaje de ellas (mosaicismo).

Las **mutaciones genéticas** son alteraciones que afectan a la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) codificante o regulador de los diversos genes. Hoy en día se ha pasado a utilizar más el término “variante”, que puede ser clasificada como patogénica, de significado incierto (VOUS o VUS, del inglés *variant of uncertain significance*) o polimórfica, reservando el término mutación en caso de patogenicidad. 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. Estas variantes consisten en *single nucleotide polymorphisms* (SNP), que son variaciones polimórficas (presentes a partir del 1% en la población) 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. Actualmente su principal campo de aplicación es la farmacogenética. Los SNP que se encuentran en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el *splicing* (procesamiento de la molécula de ARN hasta su forma madura tras la eliminación de los intrones o secuencias no codificantes de los genes), la unión de factores de transcripción o modificar la secuencia de ARN no codificante. Los SNP permitirán un gran desarrollo de la medicina personalizada, así como avances en el estudio de la farmacocinética y la farmacodinámica, puesto que determinan en buena parte el desarrollo de enfermedades, la afinidad por dianas farmacológicas o la forma en que se metaboliza una determinada droga.

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

Existen enfermedades en las cuales hay una mutación recurrente que es la causa del mayor porcentaje de los casos, como por ejemplo la acondroplasia, donde existe una mutación responsable del 95% de los casos.

Hay enfermedades en las cuales hay un conjunto de mutaciones recurrentes en una población y el estudio puede dirigirse a las mismas, como es el caso del cribado neonatal de fibrosis quística. Sin embargo, muchas enfermedades genéticas no tienen mutaciones prevalentes y las mutaciones causales se distribuyen a lo largo de toda la secuencia del gen.

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. Un ejemplo de enfermedad asociada a mutación dinámica es el síndrome de X-frágil, con expansión de repeticiones CGG que afectan al gen *FMR1*.

Las **mutaciones genómicas** afectan a la estructura o número de copias de fragmentos de un cromosoma. En este grupo se incluyen las microdeleciones y microduplicaciones, que son la causa de un gran número de síndromes como el síndrome de DiGeorge, el síndrome velocardiofacial (deleción en la región 22q1.2) o el síndrome de Williams (deleción en la región 7q11.23). Algunas variantes polimórficas de número de copia (CNV) polimórficas, al igual que determinados SNP, pueden

influir en la predisposición a enfermedades, como se ha comentado anteriormente.

Las **alteraciones cromosómicas** engloban grandes regiones de los cromosomas o cromosomas completos y pueden ser numéricas o estructurales.

Las aneuploidías, como la trisomía 21 (síndrome de Down), trisomía 18 (síndrome de Edwards) o la trisomía 13 (síndrome de Patau) son un ejemplo de alteración cromosómica numérica. Hoy en día las técnicas de cribado prenatal han disminuido el número de niños nacidos con este tipo de alteraciones.

Otras aneuploidías frecuentes y viables afectan a los cromosomas sexuales como la monosomía X (síndrome de Turner), disomía X en varones (síndrome de Klinefelter) o la trisomía X.

Las alteraciones cromosómicas estructurales pueden ser equilibradas, cuando se conserva el contenido de material genético, o desequilibradas, cuando existe una pérdida o ganancia de material genético.

Las alteraciones estructurales incluyen las deleciones, duplicaciones, translocaciones, inserciones, inversiones y otros reordenamientos complejos.

En el genoma humano existen modificaciones químicas sobre la secuencia del ADN (metilación) y sobre las histonas, que son proteínas que empaquetan el ADN y están implicadas principalmente en la regulación génica. Existen enfermedades genéticas debidas a **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. Un ejemplo de enfermedades asociadas a la alteración de este mecanismo son el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Beckwith-Wiedemann y el síndrome de 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. Hay que tener en cuenta que, 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. Por ello los estudios genéticos se deben realizar de forma protocolizada, estudiando en primer lugar las

causas más frecuentes y finalizar el estudio con las alteraciones menos prevalentes. En la **Tabla 1** se presenta un resumen de los tipos de alteraciones genéticas, las técnicas aplicadas y ejemplos de enfermedades en cada caso.

Cariotipo

El cariotipo convencional y el cariotipo de alta resolución detectan solo anomalías cromosómicas numéricas o estructurales mayores, entre 5-10 Mb, y su rentabilidad diagnóstica es baja. Actualmente se ha limitado su uso a casos con antecedentes familiares de reordenamientos cromosómicos, a fenotipos clásicos claramente identificados, como el síndrome de Down o para la detección de mosaicismos. El cariotipo ha sido sustituido como prueba de primera línea por el array-CGH para el estudio de trastornos del neurodesarrollo.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Se basa en el marcaje con fluorescencia de una sonda de ADN complementaria a la región de interés, que es hibridada a regiones cromosómicas en interfase o metafase. Existen diversos tipos de sondas para el marcaje, como sondas *painting*, que marcan un determinado cromosoma, sondas centroméricas o teloméricas y sondas específicas de una región. El tamaño de la sonda puede variar desde Kb a 1 Mb. Esta técnica permite la detección de duplicaciones o deleciones genómicas, así como inversiones y translocaciones balanceadas. También permite identificar mosaicismos y cuantificar su grado. Existen diversidad de sondas con un diseño que abarca regiones cromosómicas cada 100 Kb, aproximadamente, y son muy útiles para detectar translocaciones crípticas tras un hallazgo patológico por array-CGH. Hoy en día la aplicación de esta técnica en el campo de la Pediatría está indicada en caso de clara sospecha de un

Tabla 1. **En general casi todas las enfermedades pueden deberse a diferentes tipos de alteraciones genéticas por lo que su estudio abarca diferentes técnicas**

Tipo de alteración genética	Técnicas genéticas aplicadas	Ejemplos de enfermedades
Mutaciones genéticas I: puntuales/pequeñas deleciones o inserciones	Secuenciación Sanger	Neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1) Neurofibromatosis tipo 1 (NF1) Esclerosis tuberosa Fibrosis quística
Mutaciones genéticas II: puntuales/pequeñas deleciones o inserciones	Secuenciación masiva	Síndrome de Noonan Síndromes hereditarios de fiebre periódica Miocardiopatías Diabetes MODY Retinosis pigmentaria Hipoacusias hereditarias Trastornos del neurodesarrollo
Mutaciones genéticas III: puntuales/pequeñas deleciones o inserciones recurrentes	PCR a tiempo real Kits basados en microsatélites y análisis de fragmentos	Hemocromatosis Cribado neonatal de fibrosis quística Trombofilia hereditaria
Mutaciones genéticas dinámicas: expansión de tripletes	PCR, TP-PCR, <i>southern-blot</i>	Ataxia de Friedreich Síndrome de X-frágil Distrofia miotónica de Steinert Corea de Huntington
Mutaciones genómicas	Array-CGH, MLPA, FISH	Síndrome de DiGeorge Síndrome de Smith-Magenis Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (CMT1A) Trastornos del neurodesarrollo
Mutaciones en ADN mitocondrial	Secuenciación del mtADN	Neuropatía óptica hereditaria de Leber Encefalopatías mitocondriales. Miopatías mitocondriales
Alteraciones cromosómicas	Array-CGH, FISH, cariotipo	Síndrome de Down Síndrome de Edwards Síndrome de Turner
Alteraciones de la impronta genómica	Análisis de metilación por MLPA (MS-MLPA)	Síndrome de Prader-Willi Síndrome de Beckwith-Wiedemann Síndrome de Silver-Russell

En el texto se explica el protocolo de estudio en algunos de los ejemplos de enfermedades citados en la tabla, para ayudar a comprender la complejidad en el abordaje de gran parte de las enfermedades genéticas.

síndrome conocido por microdelección/microduplicación o antecedentes familiares del mismo, así como para el estudio de reordenamientos complejos tras su detección por array-CGH, la detección de translocaciones equilibradas y de mosaicismos.

Análisis de expansiones. Mutaciones dinámicas

Algunas enfermedades 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 la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* [PCR]) y *triplet repeat primed*-PCR (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. La ataxia de Friedreich, la enfermedad de Steinert, corea de Huntington o el síndrome de X-frágil son algunos ejemplos de patologías asociadas a mutaciones dinámicas.

Las alteraciones genéticas por expansión no son detectables mediante otras tecnologías por lo que su estudio exige este tipo de análisis.

PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real (en inglés *real time* PCR [qPCR]) 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).

Multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA)

La técnica MLPA permite detectar 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. Presenta la ventaja de la posibilidad de estudiar varias regiones a la vez por un método rápido que permite un tiempo de respuesta 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.

El estudio mediante MLPA es útil para trastornos genómicos recurrentes y para enfermedades cuya causa genética más frecuente son las grandes delecciones o duplicaciones. Un ejemplo

de enfermedad estudiada por MLPA es la distrofia muscular de Duchenne, donde el 65% de los casos es debido a grandes delecciones. Los diseños por MLPA también pueden incluir estudio de mutaciones puntuales recurrentes, como en la enfermedad de Wilson.

Todas las enfermedades genéticas causadas por mutaciones genéticas pueden tener un pequeño porcentaje de casos debidos a mutaciones genómicas por grandes delecciones, inserciones o reordenamientos complejos. En estos casos, tras la secuenciación de un gen se realiza el estudio mediante MLPA para descartar la existencia de este tipo de alteraciones.

Existe una modificación de la técnica MLPA llamada *methylation-specific* MLPA (MS-MLPA) mediante la cual se pueden estudiar cambios en el estado de metilación de regiones en el ADN. Además de cuantificar la dosis génica, como la técnica MLPA, permite valorar el porcentaje de metilación de las regiones sometidas a impronta genómica. El MS-MLPA es la técnica de elección para el estudio de enfermedades causadas por errores de impronta genómica como el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Wiedemann-Beckwith o el síndrome de Silver-Russell.

Array-CGH

La hibridación genómica comparativa o CGH (por sus siglas en inglés *comparative genomic hybridization*) 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 (**delecciones y duplicaciones**) en escala microscópica. El array de hibridación genómica comparativa, array-CGH, permite medir la variación del número de copias *locus por locus* con una resolución mayor, que depende del diseño del array (número de sondas y su distribución). Existen arrays de 60 K (60 000 sondas), 180 K (180 000 sondas), 400 K (400 000 sondas) y 1 M (1 millón de sondas), entre otros. Los arrays más frecuentemente utilizados son los de 60 K y permiten detectar alteraciones de número de copia de un tamaño igual o superior a 100-125 Kb, en las regiones eucromáticas pericentroméricas, subteloméricas y de reordenamiento recurrente de todos los cromosomas. Fuera de las regiones candidatas, es posible detectar alteraciones de número de copia de un tamaño igual o superior a 350 Kb. Los arrays de 1 M permiten detectar alteraciones de número de copia de un tamaño igual o superior a 10-15 Kb. Actualmente también existen plataformas de microarrays para el análisis genómico de SNP de forma global (SNP arrays) o bien microarrays de CGH que combinan SNP. El estudio de SNP en microarrays permite la detección de regiones con disomía uniparental (dos copias heredadas de un

mismo progenitor) y tiene utilidad cuando estas regiones están sometidas a impronta genómica.

El array-CGH solo puede detectar anomalías cromosómicas desequilibradas, y 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.

El array-CGH permite identificar la mutación causal en alrededor del 20% de los casos de discapacidad intelectual, y actualmente es, junto al X-frágil (transmisión vertical), el estudio de primera elección de la discapacidad intelectual, habiéndose dejado de realizar el cariotipo^{3,4}.

Secuenciación

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

Gracias a los avances tecnológicos de la última década la secuenciación del ADN ha sufrido un gran desarrollo, con un incremento exponencial en su rendimiento diagnóstico.

Secuenciación Sanger

Para el estudio de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o duplicaciones en genes conocidos el *gold standard* es la secuenciación Sanger. La ventaja de esta técnica es su gran validez analítica y clínica. Los hallazgos patológicos detectados por secuenciación masiva se deben validar por esta técnica.

Tiene el inconveniente de que es limitada al estudio de genes de forma individual, no puede detectar variantes estructurales o grandes deleciones o duplicaciones y, para enfermedades con varios genes implicados, a partir del estudio de dos genes tiene un coste-eficacia bajo en relación con la secuenciación masiva.

Secuenciación de nueva generación

La secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing* [NGS]), también conocida como secuenciación masiva paralela, permite secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela a un precio abaratado. 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.

Las aplicaciones de la NGS en la práctica clínica incluyen: secuenciación de paneles de genes diseñados a través capturas selectivas, secuenciación de exoma (*whole exome sequencing* [WES]) o secuenciación de exoma completo.

El estudio mediante paneles de genes está indicado para enfermedades o grupos de enfermedades que pueden estar causadas por diferentes genes. Tiene la ventaja de que el diseño específico de las sondas de captura permite el análisis de prácticamente la totalidad de los genes estudiados. Sin embargo, tiene grandes limitaciones, como la necesidad de rediseñar el experimento si se desea incluir nuevos genes, y tampoco permite la identificación de nuevos genes causales para una patología.

La **secuenciación del exoma** utiliza kits de captura para todas las regiones codificantes, reguladoras y de *splicing* de todos los genes codificantes del genoma humano (más de 19 000 genes). La mejora de cobertura para los genes en el diseño de los kits de captura de exoma en los últimos años, con una cobertura cercana al 100% para genes OMIM, ha permitido que el abordaje por exoma del estudio de enfermedades asociadas a varios genes sustituya a la mayoría de los paneles de genes por captura selectiva. Mediante la tecnología de exoma se obtiene la información de las secuencias de todos los genes codificantes. El análisis de estos datos se realiza según las necesidades, pudiendo realizarse el análisis de un número limitado de genes (exoma dirigido), de todos los genes conocidos asociados a patología (exoma clínico, ~ 5700 genes) o bien de su totalidad (19 000-23 000 genes). Para ello se emplean *pipelines* de análisis según el objetivo. El análisis de datos de NGS requiere un flujo de trabajo en el que se integran de forma secuencial diversos tipos de programas computacionales (controles de calidad, alineamiento de secuencias, comparación con bases de datos, etc.). El *pipeline* es la información detallada de todo proceso de análisis bioinformático con los *softwares* utilizados en cada fase. Dado que el análisis de datos no sigue un modelo único y la combinación de distintas herramientas de *software* y bases de datos puede dar lugar a resultados variables, es necesario el uso de *pipelines* de análisis eficientes y precisos para la correcta identificación y caracterización de variantes.

Las nuevas tecnologías están permitiendo la identificación de nuevos genes implicados en patología de modo exponencial. El estudio mediante exoma presenta la gran ventaja de la posibilidad de reanálisis, ya que, al disponer de toda la información sobre el exoma, en caso de considerar posteriormente el estudio de otros genes, puede realizarse únicamente a través de un análisis bioinformático. El abordaje más eficiente a día de hoy es el **exoma-tríos**, que compara los datos de exoma obtenidos en el paciente con sus progenitores. Esta estrategia es muy

útil ya que nos permite identificar el origen parental o *de novo* de variantes de significado incierto y, al realizarse el estudio sobre todos los genes incluidos en el exoma, permite la identificación de genes que pueden ser causales y no están incluidos en los estudios convencionales dirigidos.

Los estudios a través de exoma pueden servir 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, y actualmente están implementados en la rutina clínica⁵. Por otra parte, se ha demostrado que los estudios genéticos mediante exoma son coste-eficientes⁶ ya que, generalmente a partir del estudio de dos genes, su coste es inferior respecto a la secuenciación Sanger y, por su elevado rendimiento, permiten una mejor tipificación etiológica, descartan hipótesis alternativas, evitan pruebas innecesarias, permiten el asesoramiento genético familiar y reproductivo, mejoran el seguimiento clínico del paciente y, en algunos casos, principalmente en enfermedades metabólicas, se puede realizar un tratamiento precoz. Se han publicado numerosos artículos sobre secuenciación de exoma a nivel clínico, que estiman un rendimiento diagnóstico del 25-30%⁵⁻⁸. En los casos de discapacidad intelectual grave se estima que la secuenciación por exoma puede identificar la causa genética en un 27% de los casos no identificados mediante array-CGH⁹.

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 (HGMD, LOVD, NCBI ClinVar, DECIPHER, ISCA, IPN, dbSNP, EVS, ExAC)¹⁰.

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. 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. Se han desarrollado una serie de programas y aplicaciones informáticas para predecir los efectos que una determinada variante tendrá sobre la correspondiente proteína (SIFT, PolyPhen-2, PredictSNP, MutationTaster, LRT-Pred, PROVEAN, FATHMM, MetaSVM, AlignGVGD o CONDEL) y algoritmos de predicción de *splicing* (NNSPLICE, SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, GeneSplicer y Human Splicing Finder). Estos análisis bioinformáticos de predicción del efecto de las mutaciones o estudios *in silico* indican la probabilidad de que sean o no patogénicas.

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; si se trata de una mutación *de novo*, apoya la patogenicidad, aunque hay descritas enfermedades de herencia AD donde existe una penetrancia incompleta y expresividad variable, de forma que puede haber progenitores asintomáticos portadores de las mutaciones.

COMPLEJIDAD EN EL ABORDAJE DE GRAN PARTE DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

En general casi todas las enfermedades pueden deberse a diferentes tipos de alteraciones genéticas, por lo que su estudio abarca diferentes técnicas. A continuación, se explica el protocolo de estudio en algunos de los ejemplos de enfermedades citados en la [Tabla 1](#).

Un pequeño porcentaje de los casos de neoplasia endocrina múltiple tipo 1, neurofibromatosis tipo 1 (NF1), fibrosis quística, síndrome de Noonan, miocardiopatías, diabetes MODY y, en general de la mayoría de las enfermedades genéticas, también pueden ser debidas a grandes inserciones o deleciones que se analizan por MLPA si hay kit comercial disponible.

En el caso de la NF1, debido a la gran variedad y rareza de mutaciones patogénicas identificadas y a la elevada frecuencia de mutaciones que afectan al *splicing* (25-30%), el estudio se realiza a partir del ARN, obteniendo por retrotranscripción el ADN complementario (cADN) y posterior secuenciación. Las deleciones completas del gen NF1 ocurren un 4-5% de los casos, por lo que, si el estudio de secuenciación es negativo se estudian las grandes deleciones/duplicaciones por MLPA.

En ocasiones, los rasgos fenotípicos de una enfermedad pueden ser solapantes con otras enfermedades incluidas en su diagnóstico diferencial. En estos casos, la secuenciación masiva es muy útil ya que permite ampliar el espectro de enfermedades a estudio de forma que estudiamos “grupos de enfermedades” que asocian patologías relacionadas, en lugar de una sola. De este modo, el estudio por secuenciación masiva de enfermedades como el síndrome de Noonan puede realizarse analizando los genes identificados asociados a esta enfermedad o a través de un exoma dirigido a rasopatías. Otro ejemplo es la fiebre mediterránea familiar, que puede estudiarse mediante un exoma dirigido a síndromes con fiebre recurrente. En las enfermedades genéticas con múltiples genes asociados, como miocardiopatías, diabetes MODY, retinosis pigmentaria o hipocausias hereditarias, la secuenciación masiva permite el estudio simultáneo de todos los genes.

Cuando se trata de mutaciones recurrentes en enfermedades con un volumen considerable de estudios en la rutina diaria, como es el caso de la hemocromatosis o la trombofilia, se han desarrollado técnicas basadas en PCR a tiempo real, que permiten el abordaje de estos estudios de un modo rápido y automatizado. También existen kits basados en microsatélites para su estudio, con análisis en un secuenciador capilar.

Para el estudio de las mutaciones dinámicas por expansión en enfermedades como la ataxia de Friedreich, el síndrome de X-frágil, la distrofia miotónica de Steinert, o la corea de Huntington se utilizan técnicas de PCR, TP-PCR y, en algunos casos patológicos, *southern-blot* para cuantificar la expansión. La ataxia de Friedreich es una enfermedad recesiva. El 98% de los casos presenta dos alelos expandidos. En un 2% de los casos se identifica un alelo expandido y una mutación puntual en el gen *FXN* en el segundo alelo, que se identifica (cuando solo se encuentra un alelo expandido) mediante secuenciación del gen.

En los casos de mutaciones genómicas, si existe una sospecha clara sobre una enfermedad el estudio se puede dirigir y hacerlo mediante MLPA o FISH, como en el síndrome de DiGeorge, el síndrome de Smith-Magenis o el CMT1A, ya que su causa más frecuente se debe a una gran delección, en los dos primeros, y a una gran duplicación en el CMT1A, que pueden detectarse con esta técnica. En el caso de estudio de CMT1A en un paciente afecto, cuando es negativo el análisis por MLPA, hoy en día el abordaje a seguir más eficiente es un exoma dirigido a neuropatías hereditarias sensitivomotoras, que cubre las mutaciones puntuales del gen CMT1A.

El array-CGH es útil como técnica de rastreo de este tipo de mutaciones genómicas, en ausencia de sospecha clínica definida,

o bien, aunque esta exista, porque no existe posibilidad de estudio de la misma por MLPA o FISH.

Únicamente un 10-15% de las enfermedades de origen mitocondrial son debidas a mutaciones en el ADN mitocondrial (mtADN). El resto son originadas por mutaciones en genes nucleares.

El síndrome de Prader-Willi (SPW) puede deberse a varios tipos de alteraciones. El gen implicado (*SNRPN*) está regulado por impronta genómica, por lo que únicamente se expresa el alelo de un progenitor, en este caso el paterno. Por tanto, puede ser causado por grandes delecciones (del alelo paterno), disomía uniparental materna (mUPD) o mutaciones puntuales en el centro del *imprinting*. Mediante array-CGH o FISH podemos detectar el SPW únicamente cuando es debido a delección. La técnica de elección para el SPW es MS-MLPA. En caso de alteración de la metilación con dosis génica normal, se debe sospechar una mUPD y realizar un estudio de la región cromosómica por microsatélites al niño afecto y sus progenitores.

El síndrome de Beckwith-Wiedemann está causado principalmente por alteraciones epigenéticas y genómicas en la región 11p15. En el 50% de los casos hay hipometilación del alelo materno en el centro del *imprinting 2* (IC2). Un 20% de los casos se debe a disomía uniparental paterna en 11p15. En el 5% de los casos hay hipermetilación del alelo materno en el centro del *imprinting 1* (IC1). Estas alteraciones se estudian mediante MS-MLPA y análisis por microsatélites. Mutaciones en el alelo materno del gen *CDKN1C* son responsables de, aproximadamente, el 40% de los casos familiares y entre el 5-10% de los casos esporádicos. El análisis de *CDKN1C* se realiza por secuenciación. Un 1% de los casos presenta alteraciones en 11p15 detectables con técnicas citogenéticas.

El síndrome de Silver-Russell (SSR) se origina por cambios epigenéticos de hipometilación en el ADN en la región H19/IGF2-*imprinting* control región (ICR1) en la región cromosómica 11p15.5. ICR1 regula la expresión de los genes *H19* y *IGF2*, sometidos a impronta genómica. El estudio genético se realiza por MS-MLPA. Sin embargo, existe aproximadamente un 10% de los casos de SSR que son debidos a disomía uniparental materna del cromosoma 7, que deben estudiarse por microsatélites.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Hoy en día la investigación para la identificación de mutaciones causales en el genoma humano avanza a un ritmo acelerado. Se han desarrollado paralelamente aplicaciones de la NGS, de uso actual para investigación, como *RNA sequencing*

(RNAseq) que permiten el estudio del transcriptoma (conjunto de secuencias de ARN mensajero celular). Los estudios por RNAseq permiten el estudio de transcritos alternativos, modificaciones transcripcionales, genes de fusión, mutaciones/SNP y cambios en la expresión génica a lo largo del tiempo. Actualmente ya se dispone de la secuenciación del genoma total

(*whole genome sequencing* [WGS]), aunque todavía no se ha implementado a nivel clínico. En los próximos años la secuenciación del genoma total sustituirá a los estudios por exoma, ya que se considera que puede incrementar el rendimiento diagnóstico hasta en un 42%⁹.

CUADERNO DEL PEDIATRA

- Los estudios genéticos aplicados a la clínica están experimentando un enorme y continuo avance en los últimos años, y han revolucionado el proceso diagnóstico, constituyéndose en muchos casos en la primera prueba a realizar: la identificación de una mutación patogénica cierra el estudio etiológico, optimiza el seguimiento, asesoramiento genético y diagnósticos prenatal y preimplantacional.
- De especial importancia es la identificación de enfermedades susceptibles de tratamiento y de las enfermedades de transmisión vertical, como la neurofibromatosis 1 y la esclerosis tuberosa (AD), y el síndrome X-frágil y la distrofia muscular de Duchenne (ligadas a X).
- En algunos casos la clínica orienta la búsqueda de mutaciones: distrofia muscular de Duchenne, neurofibromatosis 1, hemocromatosis, o el síndrome de Prader-Willi. Los continuos avances genéticos asocian un abaratamiento de estudios menos orientados, y la tendencia es, en ausencia de un diagnóstico clínico de razonable certeza, a realizar estudios ampliados a las posibilidades diagnósticas existentes: array-CGH y estudios de secuenciación masiva (secuenciación de paneles de genes o de exoma). Resulta más económico en tiempo y dinero un estudio amplio que ir buscando mutaciones en los diferentes genes candidatos.
- En algunos casos, existen mutaciones *de novo* (no presentes en los progenitores, que por tanto deben ser estudiados para ello): la mayoría de las encefalopatías epilépticas de inicio precoz y muchas de las causas de discapacidad intelectual y otros trastornos del neurodesarrollo.
- En general casi todas las enfermedades pueden deberse a diferentes tipos de alteraciones genéticas por lo que su estudio abarca diferentes técnicas.
- En los próximos años la secuenciación del genoma total (ya disponible, aunque todavía no implementada a nivel clínico) sustituirá a los estudios por exoma, y se incrementará el rendimiento diagnóstico.
- Los estudios genéticos son pruebas no solicitadas habitualmente por el pediatra de Atención Primaria, pero debe conocer su existencia y estar preparado para poder comprender su utilidad, y el porqué están revolucionando el proceso diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Proposal for a Council recommendation on a European action in the field of rare diseases. En: Eur-lex [en línea] [consultado el 14/09/2017]. Disponible en: [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A52008PC0726R\(02\)](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A52008PC0726R(02))
2. Estrategia en enfermedades raras del Sistema Nacional de Salud. En: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad [en línea] [consultado el 14/09/2017]. Disponible en: http://www.msc.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/Estrategia_Enfermedades_Raras_SNS_2014.pdf
3. Trakadis Y, Shevell, M. Microarray as a first genetic test in global developmental delay: a cost-effectiveness analysis. *Dev Med Child Neurol.* 2011; 53:994-9.
4. Caballero Pérez V, López Píson FJ, Miramar Gallart MD, González Álvarez A, García Jiménez MC, García Iñiguez JP, et al. Fenotipo en pacientes con discapacidad intelectual y array-CGH patológico. *Neurología.* 2016 May 6. pii: S0213-4853(16)30027-5.
5. Vissers LELM, van Nimwegen KJM, Schieving JH, Kamsteeg EJ, Kleefstra T, Yntema HG, et al. A clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. *Genet Med.* 2017;19:1055-63.

6. Monroe GR, Frederix GW, Savelberg SM, de Vries TI, Duran KJ, van der Smagt JJ, *et al.* Effectiveness of whole-exome sequencing and costs of the traditional diagnostic trajectory in children with intellectual disability. *Genet Med.* 2016;18:949-56.
7. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, *et al.* Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA.* 2014;312:1870-9.
8. Valencia CA, Husami A, Holle J, Johnson JA, Qian Y, Mathur A, *et al.* Clinical impact and cost-effectiveness of whole exome sequencing as a diagnostic tool: a pediatric center's experience. *Front Pediatr.* 2015;3:67.
9. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, *et al.* Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature.* 2014;511:344-7.
10. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, *et al.* ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D862-8.