Tesis Doctoral

Trastornos del neurodesarrollo y Array-CGH: sensibilidad y especificidad utilizando una lista de verificación como criterio para realizar el estudio genético

Autor: Alfonso Amado Puentes

Tutores: José Ramón Fernández Lorenzo

Santiago de Compostela, Mayo de 2020

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mi tutor, el Prof. Dr. Fernández Lorenzo, por el continuo apoyo de mi estudio de doctorado e investigación, por su paciencia, motivación y conocimiento. Su orientación me ayudó durante todo el período de investigación y redacción de esta tesis.

Gracias a la Dra. Andrade y al Dr. Reparaz, y a su equipo de la Unidad de Citogenética perteneciente al Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Álvaro Cunqueiro por su papel en la realización de los estudios genéticos.

Gracias a mis compañeros de la Unidad de Neuropediatría, la Dra. Melcón y el Prof. Dr. Blanco por su ayuda en la búsqueda de pacientes y recogida de datos clínicos.

También a la Unidad de Metodología y Estadística del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, personalizada en el Dr. Angel Salgado, por la realización del análisis estadístico.

Agradecer también a la Sociedad Española de Neurología Pediátrica (SENEP) y a la Fundación Mutual Médica las becas concedidas para poder poner en marcha este proyecto.

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a mi familia: mi mujer y mis hijos por apoyarme a lo largo de la escritura de esta tesis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Conflicto de intereses

Esta investigación recibió aportaciones económicas de la Sociedad Española de Neurología Pediátrica (SENEP) y de la Fundación Mutual Médica a través de la consecución de becas competitivas.

El doctorando declara no tener ningún otro conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumen

Antecedentes: La hibridación genómica comparada basada en micromatrices (aCGH) es un método de estudio molecular para localizar alteraciones cromosómicas o variaciones del número de copias (CNV) que se relacionan con determinados fenotipos clínicos. El objetivo de nuestro trabajo fue identificar las variables clínicas más asociadas con un resultado positivo de los análisis de aCGH, y de esta manera desarrollar una puntuación clínica predictora sencilla.

Métodos: Estudio transversal en un centro hospitalario de tercer nivel, comparando el genotipo y el fenotipo de los casos. Se desarrolló una puntuación predictiva mediante regresión logística multivariante. La mejor puntuación de punto de corte, sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, y el área bajo la curva se calculó con la curva de características operativas del receptor (ROC).

Resultados: El aCGH identificó alteraciones cromosómicas estructurales responsables del fenotipo clínico en el 13,7% (IC95: 10,9-16,5) de nuestra muestra (570 pacientes analizados por aCGH). Sobre la base de las características fenotípicas más frecuentes entre los pacientes con CNVs patógenas, hemos creado una lista de verificación con los siguientes elementos: alteración del perímetro craneal, estatura <p3, peso <p3, presencia de malformaciones cerebrales, malformaciones oftalmológicas, 2 o más características dismórficas en el mismo paciente y trastorno del espectro autista (ASD). Con una puntuación mayor o igual a 1.5 como punto de corte para la realización de la prueba, obtuvimos una sensibilidad de 82.4% (95% CI 73.1% - 91.8%) con una especificidad de 54.2% (IC 95% 49.7% - 58.7%).

Conclusión: Debe realizarse un aCGH a los individuos con una puntuación de 1.5 o más. Este enfoque puede mejorar las indicaciones clínicas para aCGH en pacientes con trastornos del neurodesarrollo. Esta lista de verificación debe validarse en un grupo externo.

Palabras clave: Array-CGH, genética, trastornos del espectro autista, lista de verificación, neurodesarrollo, escala.

Abstract

Background: Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) is a method of molecular analysis that identifies chromosomal anomalies or copy number variants (CNVs) correlating with clinical phenotypes. The aim of our study was to identify the most significant clinical variables associated with a positive outcome of aCGH analyses to develop a simple clinical score.

Methods: We carried out a cross-sectional study in a tertiary center, comparing the genotype and phenotype of the cases. A score was developed by multivariate logistic regression. The best cutoff point of the score, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and area under the curve was calculated with the receiver operating characteristic (ROC) curve.

Results: aCGH identified structural chromosomal alterations responsible in 13,7% (CI95: 10,9-16,5) of our sample. Based on the most frequent phenotypic characteristics among patients with a pathogenic CNV, we have created a checklist with the following items: alteration of the cranial perimeter, stature <p3, weight <p3, presence of brain malformations, ophthalmic malformations, 2 or more dysmorphic features in the same patient and ASD diagnosis. Using a score greater than or equal to 1.5 as a cut-off point for the test, we obtained a sensitivity of 82.4% (95% CI 73.1% - 91.8%) with a specificity of 54.2% (CI 95% 49.7% - 58.7%).

Conclusion: All individuals with a score of 1.5 or higher should be genetically screened with a aCGH. This approach can improve clinical indications for aCGH in patients with neurodevelopmental disorders but this scoring system needs to be validated.

Keywords: Neurodevelopment, genetics, Array-CGH, Autism Spectrum Disorders, scale, checklist.

Índice general

1 INTRODUCCIÓN....1
1.1 Generalidades....1
1.2 Trastornos del neurodesarrollo....3
1.2.1 Definición....3
1.2.2 Tipos....7
1.2.3 Etiología y patogenia....16
1.3 Técnicas de investigación genética....17
1.3.1 Citogenética....18
1.3.2 Genética molecular....18
1.3.3 Variantes genéticas....19
1.3.4 Cambios en el número de copias....20
1.3.5 Métodos de detección de anomalías cromosómicas disponibles....26
1.3.6 Array de hibridación genómica comparada....28
1.4 Interés clínico....36
1.5 Consejo genético....36
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS....41
2.1 Hipótesis....41
2.2 Objetivos....42
2.2.1 Objetivo Principal....42
2.2.2 Objetivos Secundarios....43
3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO....46
3.1 Relevancia científica de la investigación....46
3.2 Relevancia práctica de la investigación....46
4 METODOLOGÍA....51
4.1 Diseño del estudio....51
4.2 Población de referencia y de estudio....51
4.3 Criterios de selección....51
4.3.1 Protocolo de estudio....52
4.4 Procesado de muestras....56
4.5 Análisis de los datos....56
4.6 Aspectos Ético-Legales....57
5 RESULTADOS....61
5.1 Características de los pacientes incluidos....61

5.2 Listaje de puntuación....66
5.3 Implicaciones diagnósticas....72
6 DISCUSIÓN....77
7 CONCLUSIONES....87
8 LÍNEAS FUTURAS....91
BIBLIOGRAFÍA....95
ANEXOS....105
Tabla variaciones del número de copia encontradas (CNVs)....107
Modelo de consentimiento informado....115
Autorización de empleo de imágenes externas....117
Autorización CEIC....118
Adenda CEIC....119
Trabajos fin de grado / fin de máster tutorizados por el autor de la presente tesis y que han servido de base para el establecimiento de hipótesis de trabajo:....120
Título del trabajo fin de grado: Condicionantes genéticos y ambientales de Trastornos de Neurodesarrollo en el área sanitaria de Pontevedra....120
Título del trabajo fin de grado: Desarrollo de una escala de predicción clínica para valorar la indicación de tests genéticos en pacientes con trastornos del neurodesarrollo:....120
Título del trabajo fin de máster: Técnica array CGH. Aplicación clínica en trastornos neurológicos y anomalías congénitas....121
Comunicaciones de resultados iniciales / parciales de la tesis y publicaciones realizadas previo a su propuesta a la Comisión:....122
Abstract Congreso SENEP 2017 (Madrid)....122
Abstract EPNS 2018 (Lyon)....123
Presentación SENEP 2017 (Madrid)....124
Poster EPNS 2018 (Lyon)....125
Abstracts SENEP 2019 (Oviedo)....126
Abstract EPNS 2019 (Atenas)....127
Poster SENEP 2019 (Oviedo)....128
Libro escrito por el autor:....129
Artículo Neuropediatrics:....129

Índice de figuras

Figura 1: Ejemplo de representación gráfica de deleción en cromosoma 13 (licencia Creative Commons)..

Figura 2. Representación esquemática de la técnica de Array de Hibridación Genómica Comparada (licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0)

Figura 3: Polimorfismo de un solo nucleótido (licencia Creative Commons).

Figura 4. Variación en el número de copias (licencia Creative Commons).

Figura 5: Consenso de la Sociedad Americana de Genética Humana. Extraído de Miller DT et al 2010.

Figura 6: Resultados aCGH

Figura 7: curva ROC

Figura 8: Precisión de la puntuación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de tablas

Tabla 1: Evaluación de la patogenicidad de una CNV (elaboración propia, adaptado de Miller y otros, 2010).

Tabla 2: Estudio de asociación.

Tabla 3. Dismorfias y malformaciones en pacientes con y sin CNVs patogénicas.

Tabla 4. Modelo de regresión y valores Beta y Exp B.

Tabla 5. Puntuaciones

Tabla 6: Sensibilidad, especificidad, VP+, VP- y exactitud para cada punto de corte

Tabla 7: Sensibilidad y especificidad utilizando 1.5 como punto de corte

Tabla 8: Distribución de la muestra utilizando 1.5 como punto de corte

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Abreviaturas

TND: Trastornos del Neurodesarrollo.
TEA: Trastorno del Espectro Autista.
TDAH: Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad.
DI: Discapacidad Intelectual.
CNV: *Copy Number Variants* (variaciones del número de copia).
aCGH: *Array Comparative Genomic Hybridization* (array de hibridación genómica comparada)
RPM: Retraso psicomotor.
RGD: Retraso Global del Desarrollo
FISH: *Fluorescence in situ hybridization* (hibridación in situ fluorescente)
NGS: *Next generation sequencing* (secuenciación de próxima generación)
WES: *Whole Exome Sequencing* (secuenciación de exoma completo)
GWAS: *Genome Wide Association study* (estudio de asociación del genoma)
HAC: Hospital Álvaro Cunqueiro
CIR: Crecimiento Intrauterino Retardado
PC: Perímetro craneal
DE: Desviación estándar
SENEP: Sociedad Española de Neurología Pediátrica.
EPNS: *European Pediatric Neurology Society* (Sociedad Europea de Neurológica Pediátrica).

1

Introducción

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 Introducción

1.1 GENERALIDADES

La razón principal para la derivación de pacientes a Unidades de Neuropediatría son los Trastornos del Neurodesarrollo (TND)[1,2] que incluyen Trastornos del Espectro Autista (TEA), Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) o Discapacidad Intelectual (DI). La clasificación de estos TND[3] se basa en agrupaciones estadísticas de aspectos fenomenológicos, cualitativos (no cuantitivos) que no miden la gradación del síntoma descrito. Esto tan solo ayuda al médico a identificar ciertas áreas deficitarias, pero no permite graduar la intensidad del síntoma. Se trata de una clasificación de "negro o blanco" o de "todo o nada", que no recoge la realidad de las consultas clínicas por trastornos del neurodesarrollo. Estas áreas de deficiencia podría ser capacidad cognitiva, funciones ejecutivas, interacción social y algunas otras[4,5]. Este tipo de clasificación ayuda muy poco a establecer diagnósticos etiológicos, excepto en fenotipos muy concretos de comportamiento, claramente definidos[6]. En el día a día de la consulta, es una tarea muy complicada para el médico diferenciar fenotipos clínicos de pacientes con TEA, TDAH, DI y otros, ya que muchos de los síntomas estudiados coexisiten en el mismo paciente. No se trataría de "compartimentos estancos" si no más bien de vasos comunicantes en los cuales, según el momento evolutivo y las circunstancias ambientales, pueden ponerse más o menos de manifiesto algunos síntomas y no otros.

El TEA ha aumentado su prevalencia de una manera preocupante en los últimos 20 años, con prevalencias que rondan 1 de cada 100 niños o incluso 1 de cada 78 niños. El fenotipo clínico viene caracterizado por dificultades en las relaciones sociales, lenguaje, comunicación y conductas repetitivas con patrones de intereses restringidos y estereotipados. En algunos de estos niños también se detecta discapacidad intelectual asociada, y la gran mayoría sufren un impacto negativo de esta sintomatología en las dimensiones social, familiar y escolar que requiere apoyos sustanciales.

El TDAH es considerado como uno de los trastornos del neurodesarrollo más fácilmente reconocible y frecuente, con una prevalencia que ronda un 5% de la población general. Se caracteriza por distintos grados de inatención, hiper-reactividad e impulsividad que afectan a la dimensión escolar, familiar y social, generando discapacidad.

La discapacidad intelectual o retraso mental se caracteriza por una limitación sustancial de las funciones cognitivas, con un impacto negativo en la conducta adaptativa. Estos síntomas comienzan antes de los 18 años. Afectan a entre un 1 y 3% de la población según las distintas series. El diagnóstico se establece generalmente cuando en las pruebas para calcular el cociente intelectual (CI) este es inferior a 70. Debido a las características inherentes a la aplicación de estas pruebas (generalmente su validez es más robusta a partir de los 6-8 años), el diagnóstico no suele establecerse hasta después de esta edad o en la edad adulta. Sin embargo, en la infancia se identifican la mayoría de las personas con retraso mental por un retraso en el desarrollo, que pueden incluir el retraso motor, cognitivo o en el habla.

Los factores genéticos podrían ser la base y la explicación del 50% de los casos más severos, y el 15% de los casos más leves (discapacidad intelectual leve). La asociación entre este trastorno y las alteraciones genéticas es conocida desde hace mucho tiempo, con el hallazgo de la trisomía 21 (síndrome de Down) detectable por estudios cromosómicos desde 1959, que continúa siendo considerada la causa cromosómica más importante de discapacidad intelectual. Las alteraciones de un solo gen como causa de discapacidad intelectual también han sido identificadas; por ejemplo en el caso de los genes ligados al cromosoma X, como el síndrome de X frágil, el más común de los síndromes hereditarios causados por un defecto de un solo gen.

En base a esta información, el TEA, TDAH y DI representan una carga importante de morbimortalidad general, siendo motivos de consulta frecuentes en las Unidades de Neuropediatría. Implican un esfuerzo importante para lograr el diagnóstico causal y son un motivo frecuente de realización de estudios genéticos.

En las últimas décadas se han producido avances significativos en el campo de la investigación genética, que han conllevado la irrupción de nuevas técnicas de diagnóstico molecular que han permitido identificar cambios cromosómicos en el número de copias (CNVs), y cambios de un solo nucleótido (SNPs) en este grupo de pacientes con trastornos del neurodesarrollo y/o anomalías congénitas. Estos avances tecnológicos incluyen el array de hibridación genómica comparada (aCGH), el array de genotipado de polimorfismo de un solo nucleótido-polimorfismo (SNP) y la secuenciación masiva en paralelo. Estas nuevas herramientas diagnósticas

han permitido un nuevo enfoque en la identificación de alteraciones genéticas a nivel molecular en los laboratorios de investigación inicialmente, y en el momento actual en el ámbito de los diagnósticos clínicos etiológicos.

1.2 TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO

1.2.1 Definición

Los TND son considerados problemas que afectan al correcto desarrollo neurológico de los niños, y que interfieren negativamente en su funcionamiento diario.

Sabemos que el cerebro es una estructura compleja en constante desarrollo, y que los primeros años de vida son esenciales para establecer las bases de la futura capacidad cognitiva, de memoria, de funciones ejecutivas, y de la conducta. Esto no ocurre sólo del género humano, sino en todas las especies superiores. Este aspecto evolutivo de los trastornos, claramente puesto de manifiesto en la práctica clínica, hasta el momento no había quedado establecido ni en la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) ni en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM). En el caso de los trastornos mentales, ambas clasificaciones están basadas exclusivamente en agrupaciones estadísticas de aspectos fenomenológicos, obviando las características dimensionales de los trastornos.

En el caso del DSM, si se ha incluido en su última edición (DSM-5) un capítulo que lleva por título 'trastornos del neurodesarrollo", en un intento de recoger esta realidad de la práctica clínica habitual.

El concepto "TND" se ha extendido mucho en la neuropediatría y psiquiatría infantil, ya que recoge bajo un mismo paraguas distintos trastornos con un nexo común: son variaciones del desarrollo neurológico, que pueden cambiar evolutivamente (mejorar o empeorar) y que suponen una limitación en el funcionamiento diario de los niños, pudiendo afectar a la dimensión social, escolar y/o familiar. Este concepto pone de manifiesto que los problemas del neurodesarrollo son dinámicos, no estáticos, y se pueden ver influenciados por el ambiente (de manera positiva o negativa).

Cada individuo cuenta con una determinada carga genética, que es heredada de su padre y de su madre. En esta carga genética viene

determinada nuestra susceptibilidad a sufrir trastornos del neurodesarrollo. El cerebro ha evolucionado a lo largo de miles de años realizando adaptaciones que resultaban ventajosas para los individuos. Por ejemplo, el hecho de acumular grasa suponía una ventaja evolutiva de cara a afrontar los períodos de ayuno. Estas ventajas evolutivas adquiridas a lo largo de miles de años, en nuestro mundo actual pueden suponer una desventaja. Nuestra vida sedentaria y llena de abundancia ha convertido la ventaja previa de acumular grasa para períodos de ayuno en una desventaja evolutiva (obesidad). Esto ocurre también con conductas consideradas disfuncionales en el momento actual, pero que pudieron tener un papel a la hora suponer una adaptación al medio. Por ejemplo: el miedo a los insectos o arañas son consideradas fobias en nuestro medio, pero pudieron haber supuesto una ventaja en un entorno ancestral en el que el medio era más peligroso e impredecible. Por lo tanto, nuestro concepto de normalidad está condicionado por el medio social implícito. Esta selección natural ha guiado el camino evolutivo de nuestro cerebro, condicionando su estructura y función.[8].

La misión de los genes es codificar proteínas que tienen una determinada función. En el caso del cerebro, estas proteínas tienen influencia sobre factores tan complejos como el comportamiento, la memoria, la atención, la comunicación, etc. Existen multitud de genes que regulan estos procesos, y que a la vez interactúan unos con otros. Esta carga genética viene determinada prenatalmente, pero se ve influenciada por factores epigenéticos y ambientales. Esto nos da una idea de la tremenda complejidad implícita en el funcionamiento de nuestro cerebro, y concretamente en el neurodesarrollo.

Cada individuo tiene una determinada carga genética, heredada de ambos progenitores. Como decimos, sobre esta base genética actúan factores ambientales y epigenéticos en distintos momentos evolutivos. A nivel prenatal, se pueden generar mutaciones de novo en base a infecciones perinatales / congénitas, exposición a drogas / sustancias tóxicas (alcohol), deficiencias nutricionales durante el embarazo, u otras enfermedades maternas. Estas situaciones pueden generar cambios epigenéticos que influyen en la plasticidad neuronal, modulando la susceptibilidad individual a sufrir un trastorno del neurodesarrollo.

Factores postnatales también pueden causar cambios epigenéticos que influyan en esta misma plasticidad neuronal y que también jueguen un papel en esa susceptibilidad a desarrollar un TND. Por ejemplo, el maltrato infantil, determinados condicionantes socioeconómicos, adopción, situaciones de institucionalización en etapas precoces de la vida, condiciones de vida…

Esta susceptibilidad / vulnerabilidad a desarrollar un TND puede manifestarse de distintas maneras y con distintos síntomas, configurando determinados patrones de fenotipos conductuales reconocibles: esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, trastorno del espectro autista, trastorno ansioso-depresivo, trastornos del aprendizaje, discapacidad intelectual, epilepsia…

En este contexto, los estudios genéticos deberían proporcionar un valor translacional en la práctica clínica diaria a los médicos. Con esta perspectiva, deberíamos avanzar en futuros sistemas nosológicos de clasificación de enfermedades que deberían no solo estar basados en categorías estadísticamente determinadas. La genética, conjuntamente con una mejor comprensión de las valoraciones fenotípicas y endofenotípicas, podría contribuir a predecir y prevenir trastornos psiquiátricos y del neurodesarrollo, así como identificar en el futuro potenciales dianas terapéuticas.

Dentro de este marco conceptual, es necesario tener en cuenta que en los TND no se suele seguir el modelo un gen-una enfermedad. Los TND no suelen ser monogénicos. Procesos tan complejos como la capacidad intelectual, las funciones ejecutivas, el aprendizaje, el establecimiento de relaciones con iguales, la comunicación… son influenciados por distintos genes que interactúan entre sí y con el entorno.

En muchos TND, el modelo podría ser comparable a las bases etiopatogénicas de la hipercolesterolemia o la hipertensión. Esto es, sobre una base de susceptibilidad, se modula ambientalmente el trastorno. Un modelo poligénico sobre el que influye el ambiente y la epigenética.

En un intento de utilizar un lenguaje común, la psiquiatría científica intentó clasificar patrones cognitivo-conductuales comunes puestos de manifiesto en distintos individuos a través de una agrupación de síntomas. Esta agrupación de síntomas era observacional y basada en la experiencia clínica y el consenso entre expertos. La identificación de estos patrones

sintomáticos ayudaría a progresar enormemente en el campo de la investigación y daría un marco común de trabajo a los clínicos. Las enfermedades mentales se convertirían así en definiciones consensuadas basadas en unos criterios diagnósticos / conjuntos sintomáticos con consecuencias disfuncionales en relación con el medio implícito.

No obstante, en los últimos años este marco se ha mostrado incapaz de abordar trastornos mentales complejos[9], especialmente a raíz de la irrupción de los conocimientos en genética. El gran problema de los trastornos mentales / del neurodesarrollo a la hora de su abordaje a través de un método científico ha sido la ausencia de un biomarcador que sea capaz de homogeneizar los diagnósticos. Al estar estos basados en criterios diagnósticos clínicos / fenómenos conductuales, la subjetividad y la ausencia de una gradación sintomática son handicaps a la hora de abordarlos desde un punto de vista científico. Este hecho se pone de manifiesto en el día a día, en el cuál los diagnósticos de TEA o TDAH por ejemplo, pueden cumplir criterios o no según la información recogida por el profesional, pudiendo ser distinta en función del interlocutor entrevistado o incluso el momento evolutivo.

Esto no quiere decir que no exista una base biológica de los trastornos, algo ampliamente aceptado, sino que el hecho de no contar con un biomarcador dificulta el proceso diagnóstico e incluso el pronóstico de este tipo de enfermedades. Previamente comentamos que el modelo podría acercarse al de enfermedades poligénicas claramente 'biológicas', como, por ejemplo, la diabetes, la hipertensión o el cáncer porque los avances genéticos rechazan el modelo un gen para una enfermedad[10]. Pero aún así, en estas enfermedades contamos con determinados biomarcadores "medibles" que ayudan a consensuar diagnósticos / y ofrecer pronósticos y tratamientos (glucemia / cetonemia / insulina, mediciones de tensión arterial, marcadores analíticos de neoplasias…)

Como decimos, la versión actual del DSM (DSM-V), aunque ha mejorado muchos aspectos, ha evidenciado fuertes incongruencias inherentes al propio modelo[11]. Uno de los aciertos ha sido agrupar bajo un mismo paraguas conceptual (trastornos del neurodesarollo) a distintas patologías que tienen un nexo común (TDAH, TEA, etc). Las incongruencias inherentes al modelo serían varias: por un lado, el carácter categórico atribuido a los trastornos mentales; y, por otro, la elevadísima

comorbilidad de los mismos (a través de los diagnósticos realizados mediante el DSM se detecta una muy elevada comorbilidad o coexistencia de distintos diagnósticos en el mismo paciente)[12]. Es frecuente que en el mismo paciente coexistan distintos diagnósticos como TEA, TDAH, trastorno por tics, trastorno específico del aprendizaje… ¿Se trataría de 4 condiciones independientes o estas tendrían un nexo común? Parece lógico pensar que existe una base de susceptiblidad común que hace que se desarrolle esta sintomatología evolutivamente en el mismo paciente.

Otro aspecto importante a tener en cuenta, y que pone de manifiesto las limitaciones de este tipo de clasificaciones son los casos *subumbral* o fenotipos ampliados en familiares. En la práctica clínica vemos familiares de pacientes que cumplirían criterios diagnósticos de algún trastorno si procediésemos a una recogida sistemática de datos clínicos. Sin embargo, estos familiares han desarrollado su vida (con mayores o menores limitaciones) de una manera adecuada en el ámbito social, familiar y escolar ya que estas manifestaciones, aunque presentes, lo han hecho con una intensidad apenas disfuncional. Por tanto, la generalización del diagnóstico a través de criterios DSM / CIE-10 ha generado falsos constructos: sano / no sano, TDAH / no TDAH / TEA / no TEA que no recogen toda la variabilidad fenotípica existente. Esto contrasta con la petición de la familia, que solicita y desea ser informada de si existe o no existe un problema en una marco conceptual de todo / nada. Todo esto configura una realidad nosológica muy distinta de la derivada de la concepción categórica[13]. El objetivo de poner de manifiesto todos estos aspectos en esta introducción deriva de la necesidad de conocer las limitaciones de este marco conceptual a la hora de clasificar los trastornos del neurodesarrollo, de cara a un mejor entendimiento de la aportación que puede tener la genética para entender esas bases de susceptibilidad. Estos conocimientos podrían contribuir a un cambio nosológico que ayudase a superar estas limitaciones.

1.2.2 Tipos

Los TND son un grupo heterogéneo de condiciones que tienen como nexo común una alteración en el desarrollo normal de las funciones cerebrales superiores, que produce un impacto negativo en distintos niveles

de desempeño del individuo en nuestro medio (familiar, social, escolar…). Ejemplos de trastornos del neurodesarrollo son la discapacidad intelectual, la esquizofrenia, el autismo, o los trastornos específicos del aprendizaje (dislexia por ejemplo…).

A nivel práctico se tiende a diferenciar tres grupos de TND, que no deben ser vistos como compartimentos estancos sin interconexiones entre ellos, sino como con *continuum* que comparte diferentes características. Este diferenciación entre tres grupos es artificial y solo intentar proporcionar un marco y un punto común inicial de estudio.

– TND de características sindrómicas y base genética. Este grupo se ajustaría a un patrón de herencia de tipo mendeliano. Los TNDs aquí incluidos pueden compartir características dismórficas y de fenotipo conductual comunes. Se ha identificado una región específica responsable de esta sintomatología. Por ejemplo, en el Síndrome de Smith Magenis (deleción 17p11.2) se suelen identificar dismorfias comunes (braquicefalia, abombamiento frontal, hipertelorismo, sinofridia…), un fenotipo conductual peculiar (abrazo espasmódico, trastornos del sueño, disminución de la sensibilidad al dolor)….

– TND asociados a causas ambientales conocidas. El más representativo, por su elevada frecuencia, son los Trastornos del Espectro Alcohol Fetal. Otros de más actualidad en los últimas años son los derivados de la exposición de ácido valproico (antiepiléptico) durante el embarazo. Aunque existe una posible causa ambiental conocida, la predisposición / susceptibilidad a sufrir un TND también juega un papel en la génesis del trastorno, principalmente modulando la intensidad de sus manifestaciones.

– TND sin ninguna causa específica identificada. Este grupo se recoge de una manera heterogénea y poco definida en el DSM-IV y CIE-10. El DSM 5, incluyen en este grupo: el trastorno del lenguaje, el trastorno del habla, el trastorno de la comunicación social, el trastorno específico del aprendizaje, el TDAH, el trastorno del espectro autista (TEA), el trastorno del desarrollo de la comunicación, el trastorno de movimientos estereotipados y los diversos trastornos de tics. Los estudios genéticos recientes (recogidos en el presente trabajo) se orientan a este último grupo tan heterogéneo y de difícil caracterización.

Como decíamos, entre este constructo de grupos dentro de los TND, no existen compartimentos estancos, ni tampoco límites definidos sino que, por

el contrario, existe una gran heterogeneidad y solapamiento entre los mismos. Existen muchos ejemplos que ilustran esta afirmación. Estudios epidemiológicos ponen de manifiesto que en algunas poblaciones el TEA se asocia a discapacidad intelectual en el 70% de los casos. El solapamiento entre TDAH y trastornos del aprendizaje es muy habitual, y su diferenciación se hace tremendamente complicada y laboriosa, ya que presentan características comunes. Esta diferenciación, por otra parte, es escasamente práctica en el día a día del clínico, ya que aporta poco sentido práctico en el manejo de estos pacientes. La dislexia lleva como comorbilidad el TDAH, la discalculia o los trastornos específicos del lenguaje en un gran número de casos. Incluso en el mismo individuo, en distintos momentos evolutivos, puede existir un trastorno definido por el DSM que evoluciona a otro diagnóstico también recogido en la misma clasificación, de forma natural y evolutiva. Ejemplo: trastorno específico del lenguaje y trastorno de la lectoescritura. Por otra parte, otras condiciones más "neurológicas" como puede ser la epilepsia o la discapacidad intelectual, son mucho más prevalentes en pacientes con patología sugestiva de un TND / patología psiquiátrica compleja. De todo esto podemos inferir que los TND comparten genes, mecanismos moleculares y vías involucradas en el neurodesarrollo, y debe ser misión del clínico identificar estas potenciales vías comunes.

1.2.2.1 Discapacidad intelectual y retraso global del desarrollo.

La discapacidad intelectual afecta al 1.5-2% de la población de los países occidentales, y se caracteriza por una limitación significativa en el funcionamiento intelectual y la conducta adaptativa que se manifiesta antes de los 18 años,

Las causas de la discapacidad intelectual permanecen desconocidas en la mayoría de pacientes debido a la ausencia de claves morfológicas y a su extensa heterogeneidad clínica y genética. La posibilidad de entender como un genotipo determinado se convierte en un fenotipo característico mejora el conocimiento de este tipo de trastornos en la práctica clínica.

El término Retraso Mental utilizado en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, edición IV (DSM-IV) se sustituye por el de discapacidad intelectual (DI) en el DSM-5. Se inicia durante el

desarrollo o antes de los 18 años de edad y se caracteriza por limitaciones significativas del comportamiento adaptativo y la función intelectual. El término "Retraso Global del Desarrollo" (RGD) se utiliza generalmente para describir a los niños menores de cinco años que no cumplan los hitos de desarrollo esperados en múltiples áreas de funcionamiento intelectual y cuyo nivel de gravedad clínica no se puede evaluar con fiabilidad.

Las limitaciones en la función adaptativa están relacionadas con el deterioro intelectual subyacente y afectan a múltiples ámbitos como el hogar, la comunidad y la escuela. Déficits adaptativos incluyen limitaciones en al menos uno de los tres dominios: conceptual, social y práctica. Requieren de un apoyo continuo en comparación con otros niños de su mismo grupo de edad.

Las limitaciones en la función intelectual (inteligencia), incluyen el aprendizaje, el razonamiento y la resolución de problemas, el pensamiento abstracto y el juicio. Esta limitación en la capacidad intelectual (CI) normalmente corresponde a un cociente intelectual inferior a 70 (medición realizada generalmente a través de escala de WISC).

Esta definición, asume que las limitaciones en la función deben ser evaluadas en relación con la edad del niño, la experiencia, y el medio ambiente. La gravedad se establece en función de la función adaptativa y no en función del CI como se hacía en el DSM-IV, estableciéndose la gravedad en función de la necesidad de apoyos[11].

La presentación clínica habitual es la preocupación de los padres o el pediatra por el retraso en la adquisición de los hitos del desarrollo como un retraso en el lenguaje, un comportamiento inmaduro o dificultades en el aprendizaje. La detección de la DI varía según la severidad, los niños con afectación severa suelen reconocerse antes de los dos años de edad.

En ocasiones presentan una asociación con otros trastornos como el autismo y otros trastornos de la conducta, especialmente en aquellos con afectación severa.

La asociación con otras características clínicas es frecuente. Destacan las convulsiones, alteraciones motoras que afectan a la motricidad fina, la motricidad gruesa y el habla, anomalías estructurales, dismorfias, alteraciones en la visión y la audición, así como otras discapacidades sensoriales.

La prevalencia de la discapacidad intelectual varía entre los distintos estudios debido a las diferencias en el diseño, el enfoque de diagnóstico, la severidad y las características de la población, como puede ser la edad. En la población general, la prevalencia de la discapacidad intelectual es de aproximadamente un 1.3%[16], aumentando si se considera en función del CI hasta a un 3%[17]. La prevalencia del RGD se estima entre el 1 y el 3% [18].

La discapacidad intelectual grave (dificultades cognitivas severas o un CI < 50) afecta a uno de cada 200-300 individuos en los países desarrollados. En la mayoría de los niños con una discapacidad intelectual grave no sindrómica y sin noxas perinatales claras, no se puede llegar a ningún diagnóstico.

Las causas genéticas son frecuentemente sospechadas pero no confirmadas.

Por tanto, la identificación de las causas de la discapacidad intelectual supone un reto diagnóstico. Diversos estudios de investigación indican que los factores genéticos están implicados en muchos de los casos idiopáticos, y frecuentemente se encuentran dismorfias, retraso de crecimiento y malformaciones o una historia familiar de discapacidad intelectual. Se logra identificar la causa hasta en el 5% del total de los pacientes con DI, subiendo esta cifra hasta el 7% en los que tiene una DI moderada / severa.

El diagnóstico se basa en la aplicación de pruebas psicométricas para la medición de CI, teniendo que situarse éste por debajo de 70. La aplicación de estas pruebas psicométricas precisa, para su validez, realizarse en un período de madurez que permita extraer resultados fiables de las capacidades cognitivas del paciente. Esto conlleva que los diagnósticos de discapacidad intelectual no suelen surgir hasta después de los 6-8 años o incluso en la edad adulta, si bien es verdad que suelen existir datos de alarma previos en el plano motor, cognitivo o del lenguaje.

Las causas de la discapacidad intelectual son múltiples e incluyen cualquier trastorno que interfiera con el desarrollo del cerebro y su funcionamiento. Entre las causas conocidas de la DI, la mayoría son anomalías genéticas. En una minoría la causa es ambiental como teratógenos, toxinas, infecciones, traumatismos, hipoxia isquémica en el parto y déficits nutricionales. Las causas genéticas son cada vez más diagnosticadas gracias a los avances tecnológicos en las pruebas genéticas, y su creciente uso permitirá descubrir muchos más genes implicados tanto en

la discapacidad intelectual sindrómica (asociada a otras comorbilidades clínicas), como la no sindrómica. El análisis de microarrays cromosómicos es actualmente la herramienta más valiosa en la práctica clínica para identificar las causas genéticas[19].

1.2.2.2 Trastorno del espectro autista

La terminología y los criterios diagnósticos para el trastorno del espectro autista (TEA) varía según el DSM y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE). El DSM, que se utiliza principalmente en Estados Unidos, ha sido actualizado en el 2013 (DSM-5) y la CIE en su décima revisión (CIE-10) de la Organización Mundial de la Salud se utiliza en países de todo el mundo. Hasta el momento de la publicación del DSM-5, los criterios diagnósticos y las categorías de ambas clasificaciones eran prácticamente superponibles e intercambiables. Sin embargo, con el DSM-5, el grupo de Trastornos Generalizados del Desarrollo se han unificado bajo un único diagnóstico Trastorno del Espectro Autista (TEA), eliminando todas las características existentes previamente (trastorno autista, trastorno de Rett, trastorno desintegrativo infantil, trastorno de Asperger y trastorno generalizado del desarrollo no especificado).

En el DSM-5 el diagnóstico de los TEA se caracteriza por déficits persistentes y mantenidos en intención comunicativa e interacción con iguales en distintos ámbitos (por ejemplo, problemas en el establecimiento de reciprocidad social, comunicación no verbal, escasas habilidades en el inicio y mantenimiento de relaciones sociales) así como patrones de conductas, intereses y actividades restrictivos, repetitivos y estereotipados. Los síntomas deben estar presentes en el desarrollo temprano, pero pueden no manifestarse hasta que las demandas sociales exceden las capacidades del individuo. De esta manera se excluyen los criterios anteriores de los síntomas que debían presentarse antes de un límite de edad especificado como aparecían en el DSM-IV.

El DSM-5 recomienda que se especifique el nivel de gravedad según tres niveles (de 1 el más leve a 3 el más severo) teniendo en cuenta que puede variar con el contexto y con el tiempo. La gravedad debe evaluarse por separado para cada dominio; por una parte la comunicación social e interacción y por otra los patrones de conductas repetitivas y restringidas. Además es recomendable especificar la presencia o ausencia de deterioro

intelectual, deterioro del lenguaje, asociación con otros síndromes conocidos o factores ambientales, la asociación con otro trastorno del neurodesarrollo (como TDAH) o catatonia[11].

La prevalencia de los TEA en todos los países desarrollados ha aumentado significativamente en los últimos 30 años. La mayoría de los estudios realizados desde mediados de la década de 1990 indican una prevalencia de aproximadamente 1-2 por 1000[20]. Sin embargo, los estudios más recientes indican que la prevalencia de los TEA oscila entre 2 y 20 por 1.000[21]. Es aproximadamente cuatro veces más común en hombres que en mujeres y existe un aumento de recurrencia entre hermanos que puede ser tan alta como hasta un 20%[22].

La patogénesis del TEA es heterogénea y multifactorial, con una compleja interrelación entre predisposición genética y "*triggers*" o desencadenantes ambientales. El consenso general es que tiene una etiología genética, lo que altera el desarrollo del cerebro, y afecta a su vez al desarrollo social y la comunicación que conduce a intereses restringidos y comportamientos repetitivos. La evidencia del papel de los factores genéticos en la etiología de los TEA se deriva de las siguientes observaciones: la distribución por sexos desigual, el aumento de la prevalencia en los hermanos de los pacientes con TEA en comparación con la población general, la tasa de concordancia alta entre gemelos monocigóticos y el aumento del riesgo según la proximidad de parentesco. Como decimos, los TEA son trastornos de una enorme complejidad, con muy diversas manifestaciones clínicas difícilmente cuantificables fenotípicamente. Esta heterogeneidad podría ser explicada por múltiples genes responsables interaccionando entre sí y con factores epigenéticos / ambientales que los modifiquen evolutivamente y precipiten una expresión variable de los mismos[23]. Otras teorías complementarias establecen la posibilidad de que los TEA tengan en su origen distintas variaciones en el número de copias en múltiples locus independientes, que van sumando su potencial patogénico. Esta hipótesis está apoyada por la observación de la asociación con la supresión o duplicación en 15q11.2 y 16p11.2[2425]

Anomalías cerebrales, factores ambientales, factores perinatales y la edad de los padres también han sido relacionadas con este trastorno.

El defecto genético que sustenta estos trastornos puede identificarse en un número de casos, como la trisomía del 21 (desde 1959). También se han

identificado defectos monogénicos que incluyen genes autosómicos y ligados a X, siendo el X frágil el más común de todos ellos.

En la última década, los avances en investigación genética han permitido descubrir variaciones en el número de copias y cambios de un sólo nucleótido como causas subyacentes de problemas de discapacidad intelectual y autismo. Estos avances han transformado el acercamiento a la hora de identificar los genes etiológicos y los reordenamientos genéticos en el laboratorio, y en este momento se está viendo su implicación en el diagnóstico clínico.

1.2.2.3 Trastorno por déficit de atención e hiperactividad.

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es un fenotipo clínico que suele surgir en los primeros 8 años de vida, generalmente a partir de los 4-6 años y se caracterizada por hiperactividad, impulsividad y / o falta de atención. Estos síntomas clínicos producen un efecto negativo en el desarrollo del funcionamiento cognitivo, académico, conductual, emocional, y social[26].

Su prevalencia varía entre el 2 y el 18 por ciento, dependiendo de los criterios diagnósticos aplicados y del tipo de población estudiada, aunque se objetiva una elevada concordancia entre países independientemente de su nivel de desarrollo.

Se trata de un trastorno en que las comorbilidades suelen ser la norma, especialmente en la esfera psiquiátrica: trastorno oposicionista desafiante, trastornos ansioso-depresivos, trastornos específicos del aprendizaje (dislexia, discalculia, etc).

Su patogénesis no se conoce con exactitud. Parece existir un desequilibrio a nivel bioquímico en el metabolismo de catecolaminas (principalmente dopamina) en distintas áreas cerebrales, principalmente la corteza prefrontal y áreas afines. Distintos trabajos de neuroimagen funcional y estructural ponen de manifiesto diferencias en el volumen y función de estas áreas entre casos y controles. Asimismo, la respuesta inicialmente empírica a fármacos con actividad dopaminérgica (por ejemplo, metilfenidato) parece apoyar esta teoría. Sin embargo, también conocido que diversos factores ambientales (adopción, situación socio-económica, maltrato, etc) pueden jugar un papel crucial y su importancia es controvertida.

La evidencia de una base genética del TDAH se apoya en los estudios de gemelos que demuestran una alta concordancia. Estudios de asociación global de genoma (GWAS) han generado genes "candidatos" a estar implicados en la etiopatogenia del trastorno. El apoyo adicional para una contribución genética al TDAH es proporcionado por un estudio de casos y controles en el que los niños con TDAH tienen una mayor tasa de variaciones del número de copias (CNV) que los controles (15,6 frente a 7,5 por ciento)[27].

1.2.2.4 Trastornos del aprendizaje

El trastorno específico del aprendizaje (TA) es un trastorno del neurodesarrollo que se inicia necesariamente al comienzo de la escolarización, aunque en algunas ocasiones no se identifica hasta la edad adulta. Los trastornos del aprendizaje se ponen de manifiesto al objetivar dificultades en la lectura, escritura y matemáticas (independientemente o asociadas entre sí), que son cruciales para desarrollar unas adecuadas capacidades para aprender.

Este tipo de dificultades a diferencia de los problemas del aprendizaje, tendrían un origen biológico, serían inherentes al individuo. Las influencias extrínsecas, como son una mala instrucción académica o los factores institucionales no explicarían su procedencia y sería necesario la adopción de medidas educativas específicas para su abordaje terapéutico.

Se estima que entre el 5 y el 15 por ciento de los niños en edad escolar tienen problemas de aprendizaje. Los trastornos del aprendizaje relacionados con la lectoescritura (ejemplo: dislexia) suponen el 80% del total. Es importante destacar la elevada comorbilidad (33%) con TDAH.

Las dificultades en el desarrollo de habilidades escolares más frecuentemente encontradas suelen producirse en el ámbito de la lectoescritura, grafía, ortografía, comprensión de textos y enunciados, y cálculos numéricos. Esta base de dificultades en habilidades escolares influiría negativamente en el proceso de afianzamiento de conocimientos en el ámbito de materias más específicas con la historia, ciencias naturales y sociales, geografía, química, física, etc. Todo esto conllevaría un impacto muy negativo en el aprendizaje global.

Consecuencia de esto deriva la necesidad de una detección precoz de este tipo de problemas, ya que conllevan un impacto muy negativo en el desarrollo académico del individuo. Esto derivaría en el desarrollo de potenciales comorbilidades como podría ser trastornos anímicos, estatus socio-económico más bajo, riesgo de exclusión social derivado de mayor tasa de desempleo y abandono precoz de la educación obligatoria.

La nomenclatura utilizada (trastorno específico del aprendizaje) definiría un término médico, lo cual conllevaría un diagnóstico recogido en la clasificación DSM. Este es un término ampliamente utilizado tanto en el ámbito médico, como educativo, e incluso en el ámbito legal.

Aunque la discapacidad de aprendizaje no es exactamente sinónimo de trastorno específico del aprendizaje, una persona con un diagnóstico de trastorno específico del aprendizaje puede cumplir con los criterios de una discapacidad de aprendizaje. Esto es especialmente importante en algunos países (ejemplo: Estados Unidos de América), ya que significa contar con el reconocimiento legal de una discapacidad, para realizar adaptaciones escolares.

El diagnóstico necesariamente tendría que ser realizado tras el inicio de la educación obligatoria, y se deben cumplir los 4 criterios recogidos por el DSM-V

1.2.3 Etiología y patogenia.

La etiopatogenia de todos estos trastornos es multifactorial, por lo que el diagnóstico es clínico a través de entrevistas estructuradas o tests específicos.

Bajo este paraguas de una etiopatogenia multifactorial encontramos eventos ambientales que han podido influir en su desarrollo a nivel prenatal, perinatal o postnatal, así como causa genética, de las podrían derivar trastornos metabólicos, síndrome genéticos bien conocidos o trastornos degenerativos)[28]

La importancia de una historia clínica adecuada radica en la capacidad de identificar factores exógenos clave que pueden ser el origen de determinados TND. Como hemos comentado anteriormente, un ejemplo claro sería el Síndrome de Alcohol Fetal (SAF), en el que la exposición al alcohol durante el período embrionario es bien conocido que puede causar un fenotipo físico y conductual fácilmente reconocible. Otro ejemplo similar

sería la exposición a ácido valproico intrautero, que, además poder ser la causa de distintos tipo de malformaciones, está bien documentado que aumenta signifiicativamente el riesgo de desarrollar TND del tipo TEA. Por tanto, sobre la base de una adecuada historia clínica, deducimos si el TND puede tener una causa ambiental o genética.[28–30].

Como hemos destacado, las clasificaciones diagnósticas clásicas (DSM, CIE) presentan dos grandes incongruencias que cuestionan este modelo de acercamiento a los TNDs. En primer lugar, atribuir un concepto categórico a los trastornos, poco compatible con la existencia (puesta de manifiesto en la práctica clínica diaria) de gran cantidad de casos por debajo del umbral para poder realizar el diagnóstico y la visualización a diario de fenotipos ampliados en familiares de pacientes. Las nuevas técnicas genéticas esperamos que permitan avanzar hacia un nuevo modelo, donde se puede encajar el carácter dimensional y categórico de un mismo trastorno. En este sentido, podríamos diferenciar en primer lugar entre variantes genéticas raras, de gran tamaño, de alta penetrancia y con elevada magnitud de efecto, y en segundo lugar variantes frecuentes y de efecto aditivo entre ellas. Las primeras serían responsables de la tendencia categórica del trastorno (herencia mendeliana), y las segundas, del aspecto dimensional del mismo (efecto aditivo de varias variantes de baja magnitud). Asimismo la elevada comorbilidad, tal como se ha abordado hasta la fecha, se ve explicada por los avances en genética. No es el objetivo hallar uno o varios genes específicos y determinantes para cada trastorno (TEA, TDAH, etc), ya que hemos puesto de manifiesto que estas condiciones comparten distintos genes y vías moleculares, y estas dan lugar a los fenotipos clínicos. La comorbilidad es un artefacto derivado de una clasificación que no recoge estos avances. La nueva genética esperamos que pueda abrir las puertas a una nueva nosología, que incuestionablemente deberá quedar reflejada en las nuevas clasificaciones de las enfermedades mentales y los trastornos del neurodesarrollo.

1.3 TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN GENÉTICA

El inicio de la investigación en genética se produjo en el momento en el que los avances en el campo de microscopía óptica permitieron la observación directa de los cromosomas, y su caracterización morfológica.

En base a esta observación directa, se podían identificar anomalías cromosómicas, si están eran lo suficientemente grandes como para ponerse de manifiesto a través del microscopio óptico. La genética ha ido progresivamente nuevas técnicas de identificación de anomalías cromosómicas, aumentando la capacidad diagnóstica progresivamente.

1.3.1 Citogenética

Como decíamos, a través de las técnicas de tinción diferencial de los cromosomas, fue posible comenzar a identificar anomalías en la década de los sesenta. Estas técnicas de tinción permitían identificar alteraciones en el cromosoma entero (trisomías, monosomías, etc.), y también variaciones estructurales de gran tamaño (deleciones, duplicaciones, traslocaciones, etc.), que podían estar relacionadas con alguna entidad caracterizada clínicamente. Algunos ejemplos de TND identificados inicialmente con el microscopio óptico son, el síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) y el síndrome X frágil[31]. Los microscopios ópticos tienen la entendible limitación de que tan solo pueden identificar regiones extensas del ADN, no pudiendo centrarse en regiones más pequeñas cuyos defectos pasarían desapercibidos**.** En la medida que se ha conseguido una mayor resolución, se ha incrementado la detección de un gran número de síndromes y enfermedades genéticas.

1.3.2 Genética molecular

El siguiente gran salto en el diagnóstico fue la genética molecular, que permite –a partir de la secuencia de ADN/ARN– el estudio de la estructura y la función de los genes. Si bien con el microscopio óptico se puede alcanzar una resolución de bandas de varios millones de nucleótidos, la genética molecular alcanza una resolución desde cientos de miles de nucleótidos hasta un nucleótido. La genética molecular se sirve de diversas técnicas, pero las más utilizadas son la hibridación in situ (FISH) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La FISH tiene como fundamento la posibilidad de que el ADN puede "juntarse" (hibridarse) entre sí. Si en una enfermedad se conoce la secuencia de nucleótidos alterada, deleción, duplicación, inversión, etc, se puede obtener una sonda, es decir, una

secuencia previamente conocida de ADN marcada con fluoróforos y, mediante la hibridación, identificar si dicha secuencia está presente en la muestra que se quiere estudiar. La reacción en cadena de la polimerasa tiene como objetivo obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN, lo cual permite identificar genes específicos en una región del ADN.

1.3.3 Variantes genéticas

Las variantes genéticas pueden estar presentes en una parte importante de los individuos o, por el contrario, en una proporción mínima de los mismos. El primer supuesto lo denominaremos variante frecuente o polimorfismo, tomando que su frecuencia es superior al 1%. Por el contrario, la variante rara es aquélla cuya frecuencia poblacional es inferior al 1%[32]. Tanto una como otra (variantes frecuentes / variantes raras) pueden ser de secuencia de nucleótidos o estructurales (variaciones de dosis). Las variantes de secuencia de nucleótidos afectan al orden en que los mismos se ubican en la cadena del ADN. Hasta fechas recientes, la investigación genética de los TND se ha centrado en las variaciones de secuencia de un solo nucleótido –single nucleotid polymorphism (SNP)–. En la década de los noventa contábamos con algunos miles de SNP[33] identificados, pero en años sucesivos se ha incrementado exponencialmente este número. En el año 2001 se pudo conseguir un mapa genético de 1,4 millones de SNP, en 2007 este número fue de 3,1 millones[34], y en la actualidad supera ampliamente los 10 millones. En base a esto podemos estimar que están identificados alrededor del 80% de los SNP, cuya frecuencia es mayor al 10% en la población general[35]. Puesto que algunos SNP se localizan en regiones del genoma que dan lugar a alteraciones en la proteína codificada por esa región, estas zonas han sido motivo de interés para la investigación de los TND. Las variantes estructurales más habituales[36], denominadas variantes en el número de copia (VNC ó CNVs), afectan a una región de la cadena de ADN de más de 1 kb donde se ha producido una deleción o duplicación (modificaciones de la dosis genética). A partir de 2004 se empezó a detectar, mediante el uso de la tecnología de microarray, que el genoma contenía un gran número de CNVs[37]. Este hallazgo fue inesperado, pues las variantes estructurales conocidas hasta la fecha se consideraban patológicas y, por tanto, no se contemplaba que pudieran estar presentes en una proporción importante de la población general, como así era el caso.

1.3.4 Cambios en el número de copias

Las CNVs, de manera individual, se podría decir que son infrecuentes, porque pueden detectarse en una proporción pequeña de la población. No obstante, consideradas en conjunto, son muy frecuentes, dado que acumulan una gran cantidad de variantes diferentes. Además existen múltiples CNVs (en más del 1% de la población) de muy pequeño tamaño que se llaman polimorfismos en el número de copias. Las características que definen estas variantes genéticas, tanto SNP como CNVs, de cara a valorar su potencial patogenicidad, son:

– Magnitud de efecto alta o baja. Las mutaciones responsables de enfermedades mendelianas (dominantes, recesivas o ligadas al sexo) tienen una magnitud de efecto determinante. Un solo gen es condición suficiente para sufrir la enfermedad. Pero también cabe la posibilidad de que la variante no sea condición suficiente para que se exprese el fenotipo, en cuyo caso, para que aparezca un trastorno, se requiere la concurrencia de varias alteraciones genéticas distintas.

– Variante de pequeño tamaño / gran tamaño. El tamaño de la variante es un determinante de la carga genética, pues el tamaño determina el número de genes que contiene. Cuantos más genes estén incluidos (en defecto/duplicaciones o en exceso/deleciones) en una CNVs, mayor probabilidad de que sea patogénica.

– Variante frecuente/rara. Las variantes raras se presentan de forma esporádica y se mantienen merced a mutaciones de novo o recurrentes. Los individuos portadores de variantes con elevada magnitud de efecto tienden a tener una menor probabilidad de tener descendencia y el fenotipo resultante de la alteración genética no favorece su adaptación al ambiente. En función de esta desventaja para la reproducción, su persistencia en la población se atribuirá a una alta tasa de mutaciones de novo y no a la heredabilidad. En el sentido opuesto, cuando una mutación influye favorablemente para aumentar las posibilidades de supervivencia reproducción del individuo, adquiere una elevada tasa de transmisión hereditaria. Esto explicaría el por qué, tras muchas generaciones, esta variante ancestral se convierte en variante frecuente. En el momento actual se admite que 9/10 variantes genéticas no tiene ningún papel determinante en este aspecto o bien influye en características que no son relevantes. Gran parte de las enfermedades

comunes (entre ellas, los TND por su elevada prevalencia), en sus formas menos severas, se considera que tienen poca interferencia en la eficiencia reproductiva, lo que explicaría la implicación de variantes tan frecuentes y no raras en su etiología. Incluso algunas manifestaciones propias de ciertos trastornos podrían llegar a ser facilitadoras. Por ejemplo, en el TDAH, la impulsividad puede actuar en favor de la reproducción mediante un mecanismo de búsqueda constante de nuevas parejas, sin capacidad para inhibir los impulsos reproductivos, favoreciendo la promiscuidad. Igualmente, algunas características del fenotipo ampliado del autismo, en concreto el anteriormente denominado Síndrome de Aspeger, pueden resultar muy favorables en nuestro medio, al seleccionar individuos muy centrados en desarrollar de forma muy específica y eficiente actividades de alto nivel tecnológico que producen un valor añadido a la sociedad en su conjunto. Es razonable admitir, por tanto, que en la base genética de enfermedades comunes (específicamente los TNDs) intervengan variantes frecuentes, no necesariamente negativas para la población general. Esto dificultaría la identificación de variantes relacionadas con la enfermedad en el contexto de los TNDs.

– Variante codificante / no codificante. Las variantes, tanto las frecuentes como las raras, pueden estar ubicadas en zonas codificantes o en zonas no codificantes. La mayor parte de regiones no codificantes están conservadas en las especies, lo cual sugiere que pueden tener una función como moduladoras de la expresividad de genes codificntes[38,39]. Se solía denominar a esta parte del genoma no codificante, de forma inadecuada, 'ADN basura', cuando en realidad cada vez más publicaciones ponen de manifiesto su importancia en el correcto funcionamiento del genoma en su conjunto.

Destacábamos que las CNVs se definen como ganancias de material genético (duplicaciones) o pérdidas de material genético (deleciones). Estas ganancias o pérdidas se producen en determinadas localizaciones del ADN en relación con un genoma de referencia humano con el que comparar. Estas variaciones en el número de copias pueden ser de diferentes tamaños (desde kilobases (kb) a varias megabases (Mb). Los mayores tamaños se darían en el caso de englobar cromosomas enteros, como en el caso de las trisomías o monosomías (estas sí identificables por microscopía óptica). Las ganancias

o pérdidas englobarían uno o varios genes, así como ser heredadas de uno de los progenitores o surgir de novo.

Estas variaciones del número de copias, en el caso de las pérdidas de material genético (deleciones) podemos encontrarnos con que existe una pérdida de una de las dos copias (heterocigotas) o que hemos perdido las dos copias normales (homocigotas). También existen las variaciones hemicigotas, por ejemplo en el caso de supresiones del cromosoma X en los varones.

Las duplicaciones habitualmente dan lugar a tres copias, en comparación con las dos copias normales, aunque en algunas regiones del genoma están presentes más de tres copias y la gama observada de números de copias es mucho mayor. Múltiples estudios con grandes muestras han demostrado que algunas regiones del genoma son tolerantes a los cambios del número de copias y que cada persona tiene numerosos cambios del número de copias que son, en su mayor parte, benignas.

Los cambios en el número de copias cromosómicas fueron reconocidos por primera vez como causa de discapacidad intelectual en 1959, cuando se descubrió que una copia extra del cromosoma 21 era la causa del Síndrome de Down. Con el progresivo desarrollo de estas técnicas diagnósticas, evolutivamente se comenzaron a detectar reordenamientos desequilibrados, como es el caso de translocaciones, grandes deleciones o duplicaciones, o la presencia de cromosomas supranumerarios. Así, comenzaron a correlacionarse determinadas alteraciones genéticas con fenotipos clínicos que cursaban con DI o TEA. Ejemplos de este tipo de correlaciones los encontramos en el síndrome de Prader-Willi y de Angelman (15q11-q13), el síndrome de Williams-Beuren (7q11.23), y el síndrome de Smith-Magenis (17p12)[40]. Algunas publicaciones establecían que del 1 al 3% de los pacientes con autismo presentaban una duplicación heredada por vía materna en la región 15q11-q13[25].

Pero esta correlación fenotipo-genotipo no siempre es de esta manera. Existen distintas microdeleciones y duplicaciones en determinadas regiones genéticas que dan lugar a fenotipos muy variables de distinta gravedad. Este es el caso de deleciones en 1q21.1: grados variables de discapacidad intelectual, y una o más anomalías congénitas, incluyendo cataratas y cardiopatías congénitas[40]. En esta misma región también hemos encontrado

alteraciones genéticas relacionadas con trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia.

Otro ejemplo de un cambio de número de copias con resultados muy variables es la deleción 16p11.2[24]. Las supresiones de 16p11.2 están presentes en hasta un 1% de las personas con TEA, pero también se asocian con discapacidad intelectual sin TEA.

En otros trastornos como la esquizofrenia, epilepsia o TDAH también se han identificado cambios del número de copias. Como sucede con las deleciones y duplicaciones en 15q11.2 que se han asociado a una gran variedad de trastornos neuropsiquiátricos y a distintas anomalías faciales[41].

La interpretación de las CNV puede suponer un reto y diferir entre distintos laboratorios. Para ayudar a la correcta interpretación de las CNV entre causales, de significado incierto o probablemente benignas se han establecido criterios a la hora de establecer una interpretación más estandarizada[19].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CRITERIOS PRIMARIOS	Patológica	Benigna
CNV idéntica en padre sano		X
CNV heredada del padre y alterada o ampliada	X	
CNV de padre afectado	X	
Similar a CNV de sano		X
Similar a CNV de afecto	X	
CNV completamente definida en una base de datos de CNV de individuos sanos		X
CNV desequilibrio genómico definido en una base de datos de CNV para los pacientes con DI, TEA y/o MAC	X	
CNV que se superpone a las coordenadas genómicas de un síndrome conocido	X	
Contiene genes OMIM	X	
CNV larga	X	
CNV corta		X

Tabla 1. Evaluación de la patogenicidad de una CNV (elaboración propia, adaptado de Miller y otros, 2010).

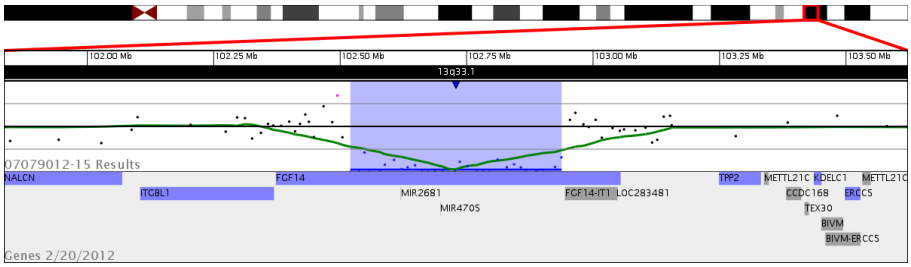


Figura 1: Ejemplo de representación gráfica de deleción en cromosoma 13 (Unidad de Citogenética, HAC).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.5 Métodos de detección de anomalías cromosómicas disponibles.

1.3.5.1 Cariotipo

Se trata de la imagen de los 46 cromosomas humanos ordenados por parejas de homólogos según la nomenclatura internacional (ISCN). Puede realizarse en cualquier tejido vivo, bien conservado y no contaminado. Se necesita un tiempo de cultivo para llegar a obtener cromosomas metafásicos (cariotipo estándar) o cromosomas prometafásicos (alta resolución). Se visualizan y se estudian todos los cromosomas mediante técnicas de identificación cromosómicas ("bandas")[46].

El cariotipo detecta deleciones, duplicaciones, translocaciones e inversiones que pueden llegar a ser de 3 Mb en el de alta resolución, pero con frecuencia se pueden pasar por alto desequilibrios de 5-10 Mb en función de la región y las condiciones del estudio. Al no incluir pacientes con Trisomía 21 (reconocibles según fenotipo físico), encontraríamos que esta técnica es capaz de identificar alteraciones genéticas causales en menos del 3% de los pacientes con DI [19].

1.3.5.2 FISH: Hibridación en situ fluorescente

Es el estudio de una región específica en un cromosoma concreto tras su hibridación con las sondas apropiadas marcadas con fluorocromos. Puede realizarse en cualquier tipo de tejido bien conservado y fijado, en tejido parafinado y en tejido cultivado o no. Se utiliza para determinar pequeñas delecciones, duplicaciones y translocaciones que impliquen fragmentos cromosómicos de tamaño inferior a 3 Mb. Posee una tasa de detección de anomalías subteloméricas clínicamente significativas de un 2.6%[47].

1.3.5.3 Array de hibridación genómica comparada

La hibridación genómica comparada (habitualmente abreviada CGH del inglés Comparative Genomic Hybridization) es un ensayo comparativo basado en el FISH en el que el ADN del paciente está marcado con un colorante fluorescente y ADN de un sujeto control sano (ADN de referencia) está marcado con un segundo colorante fluorescente. Las

muestras se hibridan en una matriz o array que contienen sondas. Las sondas son secuencias de ADN conocidas. Al hibridar estas sondas de secunencias conocidas con las regiones a estudiar, medimos la intensidad de fluorescencia de cada colorante en cada punto. Las diferencias en las intensidades de fluorescencia relativa a un punto dado en la matriz reflejan diferencias en el número de copias entre el genoma del paciente y el ADN de referencia, identificando ganancias o pérdidas de material genético. El tamaño de esta variación del número de copia viene determinado por el número de sondas de la matriz y el espacio entre éstas[48].

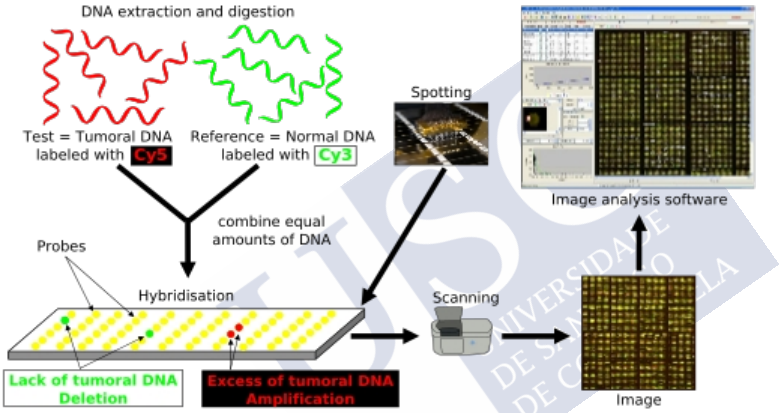


Figura 2: Representación esquemática de la técnica de Array de Hibridación Genómica Comparada (licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0, Wikipedia)

1.3.5.4 Array de genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido

Un polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés single-nucleotide-polymorphism o SNP) es una variación del genoma que afecta a una sola base. En cada locus identificamos dos alelos distintos, a los que nos podremos referir como A y B. El array-SNPs es un tipo de ensayo basado en la fluorescencia. Marcaríamos el alelo A con un colorante y el B con otro diferente. Si medimos la intensidad de esta fluorescencia para un locus y

calculamos la relación de intensidades entre los dos colorantes, analizaríamos de esta manera los datos de esa matriz. En cada zona a estudiar, tendríamos distintas combinaciones de alelos: AA, AB o BB. Si nos encontramos con una pérdida (deleción), la intensidad de esa fluorescencia a cuantificar sería menor. De la misma manera, un aumento de fluorescencia de correlaciona con duplicaciones (ganancias). Está técnica tiene la ventaja de que puede identificar grandes extensiones de regiones en homocigosis del genoma, que podrían representar consanguinidades o disomías uniparentales. Estas disomías no serían detectables a través del CGH array[40].

1.3.6 Array de hibridación genómica comparada.

1.3.6.1 Descubrimiento de la técnica

La hibridación genómica comparada (CGH) fue inicialmente descrita por Kallioniemi en 1992[49] para el análisis citogenético-molecular en tumores sólidos. Con esta técnica inicial se conseguía una resolución de 3 Mb, pero en general era de 5-10 Mb.

1.3.6.2 Tipos de hibridación genómica comparada

Existen dos tipos de CGH:

CGH convencional con una resolución de 5-20 Mb, por lo que se pueden distinguir pequeñas variaciones cromosómicas. Para esta técnica son necesarias tres muestras el ADN de la muestra a estudiar, un ADN de control y cromosomas en metafase de un cariotipo normal. Los cromosomas en metafase se fijan a un porta y se marcan con DAPI (un marcador fluorescente que se fija fuertemente a regiones que contienen adenina y timina) de modo que se verán de color azul bajo el microscopio de fluorescencia. Tras esto se mezclan ADN muestra y control en cantidades equimolares ya marcados previamente con distintos fluorocromos. Finalmente se realiza una hibridación in situ de esta mezcla con los cromosomas metafásicos previamente fijados y marcados con DAPI. Estos ADNs competirán por hibridar en los mismos sitios, reportando una fluorescencia intermedia en los lugares del cromosoma en los que ambas

muestras se encuentren en una proporción normal. Si la muestra a estudiar contiene una deleción, si predomina el fluorocromo del control; o si por el contrario, hay una duplicación, se observará un predominio del fluorocromo de la muestra. Este tipo de CGH se utiliza principalmente en cáncer, ya que en las últimas fases de esta enfermedad se acumulan anomalías cromosómicas[49].

Array de hibridación genómica comparada (aCGH) permite la detección de amplificaciones y deleciones de regiones más pequeñas de ADN, de un menor número de kb, a lo largo de las longitudes de todos los cromosomas. Además el procesamiento de los datos obtenidos se realiza por medio de un software específico. En los array de CGH el ADN comparador se dispone sobre un portaobjetos de vidrio o perlas de vidrio. Hay tres tipos básicos de array: los array de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), array de oligonucleótidos (habitualmente de 60 pares de bases de longitud), o array de polimorfismo de nucleótido único (SNP) (habitualmente de unos pocos nucleótidos de longitud; aunque ahora muchos también incluyen sondas de locus individuales, así como SNPs). Con respecto el tipo de matiz o array hay dos tipos principales: array "selectivos u objetivos" (llamados en inglés target) y array del genoma entero (del inglés whole genomic). Como hemos visto anteriormente, a menor tamaño de las dianas, mayor resolución[50].

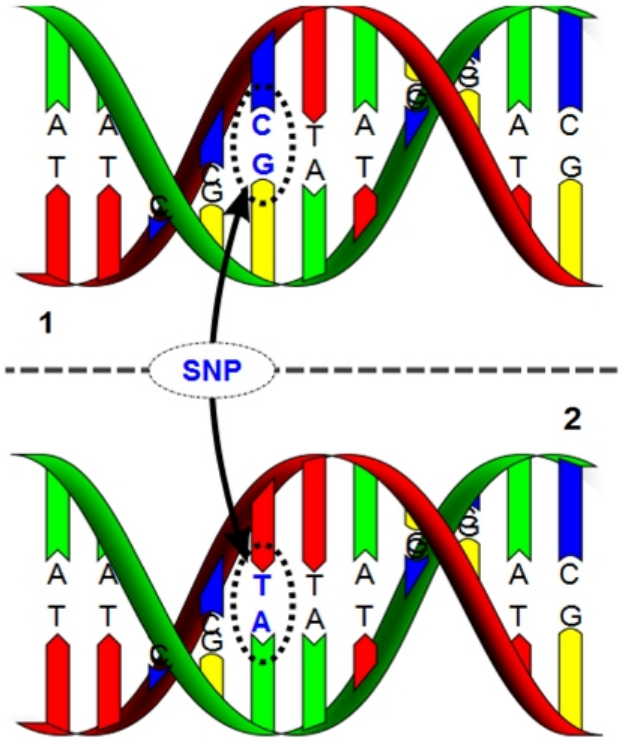


Figura 3: Polimorfismo de un solo nucleótido (licencia Creative Commons, US National Library of Medicine)).

Los array target son los más utilizados para estudiar síndromes causados por de microdelecciones y microduplicaciones, así como el estudio de otros locus conocidos de los trastornos con herencia mendeliana (por ejemplo, esclerosis tuberosa). Los array whole genomic abarcan todo el genoma en diferentes niveles de resolución.

Actualmente los array de oligonucleótidos y array SNP han suplantado el uso de BAC. La mayoría de los laboratorios utilizan array de oligonucleótidos o array de SNP con una resolución promedio de alrededor de 35 kb en todo el genoma.

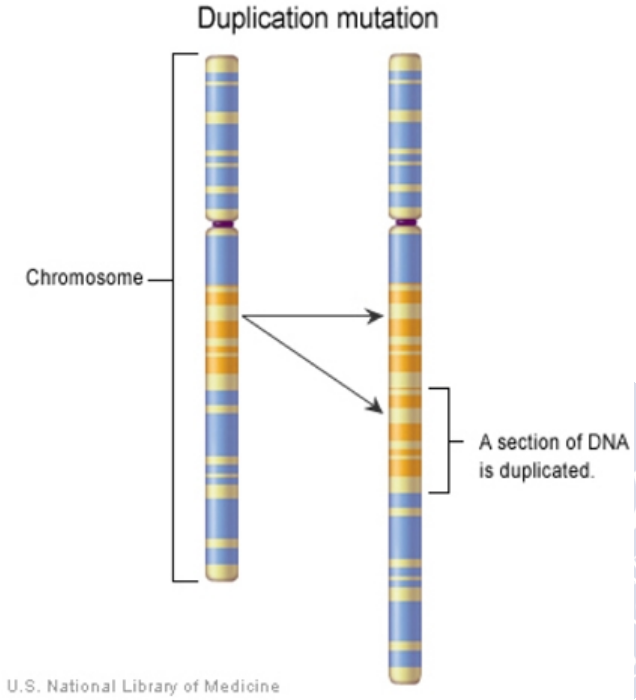


Figura 4. Variación en el número de copias (licencia Creative Commons, US National Library of Medicine).

1.3.6.3 Hallazgos y rentabilidad

Los hallazgos de esta técnica son los cambios en el número de copias CNV, cuya interpretación puede ser complicada, ya que la presencia CNV puede ser benigna, patógena o desconocida.

Identificamos alteraciones genéticas en el 20% de los pacientes con TEA, pero se considera que el 90% de los casos son "heredables".

El juicio clínico del médico es fundamental, y requiere un acercamiento sistemático al caso.

Distinguimos entre:

- "TEA esencial" (75%): no caracteríticas dismorfológicas, 6:1 para niños, mayor riesgo de recurrencia, historia familia positiva.
- "TEA complejo" (sindrómico): dismorfias reconocidas, 3,5:1, menor riesto de recurrencia, historia familia negativa.

La técnica de aCGH ha emergido como un tipo de estudio que puede arrojar información acerca de la etiología de numerosos casos de pacientes con DI, TEA o malformaciones múltiples (mayores o menores). La realización de aCGH y cariotipo con bandas-G en cada paciente aumenta sustancialmente el costo total de las pruebas genéticas.

El Consorcio ISCA (International Standard Cytogenomic Array) llevó a cabo una revisión bibliográfica de 33 estudios[51], incluyendo 21.698 pacientes comparando los resultados de aCGH con los del cariotipo teniendo en cuenta las ventajas técnicas y limitaciones, el rendimiento diagnóstico y la interpretación del análisis. El aCGH ofrece un rendimiento diagnóstico en estos pacientes mucho más alto (15% -20%) frente al cariotipo (~ 3%, excluyendo el síndrome de Down y otros síndromes cromosómicos reconocibles), gracias a su mayor sensibilidad para detectar deleciones y duplicaciones. En base a todos estos datos, la utilización del aCGH por encima del cariotipo convencional parece que muestra más ventajas que inconvenientes en el estudio de pacientes con TND, considerándose como un tipo de estudio de primer nivel en este grupo de pacientes. Estudios posteriores también demuestran la utilidad del aCGH en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y anomalías congénitas, y su superioridad en la rentabilidad diagnóstica frente al cariotipo.

El ISCA ha publicado unas recomendaciones de actuación que se resumen en el siguiente esquema:

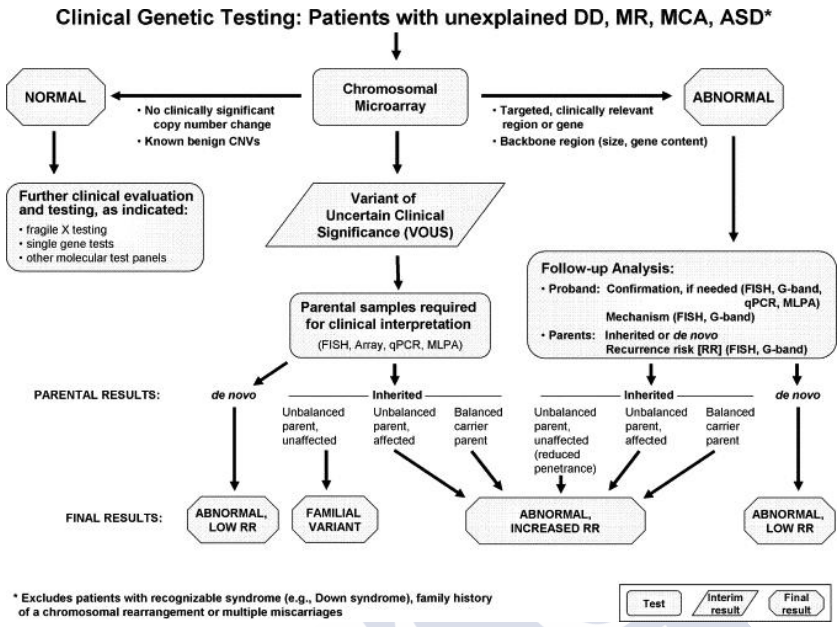


Figura 5: Consenso de la Sociedad Americana de Genética Humana. Extraido de Miller DT et al 2010.

Las dificultades que pueden existir para clasificar los hallazgos se reflejan en los estudios. En un metaanálisis de 19 estudios, 12 publicados, el rendimiento diagnóstico de la prueba fue de un 10%, y el número de resultados positivos considerados CNV no causales fue del 7%. Por este motivo se debe ser precavido a la hora de clasificar los hallazgos[52].

Con respecto a los costes existen estudios que comparan el coste-beneficio entre aCGH y las pruebas genéticas convencionales mediante la elaboración de modelos. El coste de aCGH es mayor que el de las pruebas convencionales como el cariotipo pero dado que posee una tasa de detección más alta cuenta finalmente con una buena relación calidad-precio como prueba de primera línea.

Otro punto sobre el que se está investigando, aunque hasta la fecha existen pocos trabajos publicados, es el establecer criterios clínicos que maximicen el rendimiento diagnóstico[7]

Existe una falta de directrices uniformes que determinen el rendimiento clínico esperado de la prueba en términos de resolución y cobertura (es decir, todo el genoma o locus específico), que impide la normalización de la práctica clínica. Se pone de manifiesto una heterogeneidad en cuanto a las plataformas tecnológicas, diseño y contenido de los estudios, en función del laboratorio donde se realicen**.** Esto supone un reto en la interpretación de los resultados. La mayoría de los laboratorios tienen bases de datos internas de CNVs patógenas y benignas, además existen bases de datos como la UCSC Genome Browser, ENSEMBL, DECIPHER a las que la mayoría de laboratorios tienen acceso. Con el fin de mejorar la interpretación de la prueba la ISCA está trabajando para crear una base centralizada de acceso público ente distintos laboratorios para comparar las interpretaciones clínicas de los resultados.

1.3.6.4 Ventajas e inconvenientes

Las principales ventajas del array de hibridación genómica comparada es que no es necesario cultivar tejidos para obtener células en división, es suficiente con una muestra de ADN de calidad. Además la resolución de la prueba es de un promedio de alrededor de 35 kb, superior a otras técnicas, que varía en función de la matriz o array utilizada.

La desventaja de esta técnica es que no permite detectar reordenamientos estructurales equilibrados (es decir, translocaciones equilibradas, inserciones e inversiones) porque no suponen un cambio en el número de copias. Otra desventaja es que no permite detectar niveles de mosaicismo menores del 20%. Además la interpretación de CNVs no conocidas puede ser in reto, especialmente cuando son heredadas de uno de los padres.

Algunos TNDs surgen por alteraciones genéticas o cromosómicas[53–55]. El Array CGH es un método de análisis molecular para identificar anomalías cromosómicas correlacionables con fenotipos clínicos. Este método puede identificar las CNV patógenas en el 7.8% de los sujetos con Retraso en el Desarrollo Global (RGD) y en el 10,6% de los pacientes con características sindrómicas[28]. Aunque es siempre importante resaltar que

determinados reordenamientos (equilibrados) y mosaicismos (de bajo nivel) no son detectados por esta técnica, este tipo de alteraciones serían responsables de menos del 1% de los casos de TNDs.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4 INTERÉS CLÍNICO.

Un diagnóstico etiológico preciso tiene un impacto en el manejo clínico, de acuerdo con Riggs et al, por varias razones: da pistas sobre el pronóstico adicional y permite un seguimiento personalizado. Al haber identificado una alteración genética determinada presente en otros individuos con la misma patología, podremos anticiparnos a potenciales complicaciones antes de que estas supongan un problema. En determinadas alteraciones genéticas incluso permite programas de entrenamiento (terapia cognitivo-conductual, terapia de estimulación cognitiva) mejor dirigidos a ese fenotipo conductual característico, ya que conocemos la evolución natural de la patología. Las implicaciones a nivel de consejo genético permiten asimismo una caracterización lo más exacta posible del riesgo de recurrencia en futuros embarazos, y el análisis puede extenderse a otros familiares de primer grado. También es importante obtener un diagnóstico preciso para optimizar el uso de los recursos y evitar pruebas instrumentales y de laboratorio innecesarias.

1.5 CONSEJO GENÉTICO

La Ley 14/2007 del 3 de julio, de Investigación Biomédica regula y define en nuestro país el consejo genético. Definiéndolo como "procedimiento destinado a informar a una persona sobre las posibles consecuencias para él o su descendencia de los resultados de un análisis o cribado genéticos y sus ventajas y riesgos y, en su caso, para asesorarla en relación con las posibles alternativas derivadas del análisis. Tienen lugar tanto antes como después de una prueba o un cribado genético e incluso en ausencia de los mismos".

El consejo genético es una de las principales facetas dentro de la práctica de la genética clínica. Debe abarcar distintos aspectos como determinar el riesgo de una patología concreta, informar de manera exhaustiva sobre las consecuencias de la enfermedad en cuestión, la probabilidad de padecerla y la frecuencia de aparición de los síntomas,

explicación del proceso de transmisión, la posibilidad de tratamiento (curativo o paliativo) e información sobre la posibilidad de realizar o no un diagnóstico prenatal y plantear alternativas reproductivas al riesgo de recurrencia.

El objetivo del consejo genético es la prevención de la aparición de enfermedades hereditarias y la información de manera comprensiva a los consultantes para que estos puedan decidir de manera libre y responsable. Además debe facilitar la adaptación a la presencia del trastorno y a su riesgo de recurrencia.

Para todo ello es imprescindible realizar una historia clínica detallada que incluya un árbol genealógico, así como averiguar si existe o no consanguinidad. Se debe conocer los síntomas y signos de la patología a tratar y las leyes básicas de transmisión genética.

El cálculo del riesgo de recurrencia es sencillo cuando el trastorno sigue las leyes de herencia mendeliana y se calculará de forma empírica en las enfermedades de herencia poligénica.

El diagnóstico genético bien definido aporta numerosas ventajas en los pacientes con trastornos del neurodesarrollo; permite estimar mejor el riesgo de recurrencia entre hermanos, puede contribuir a mejorar el tratamiento al definir la causa de enfermedad y habitualmente el establecer un diagnóstico causal disminuye la ansiedad en los familiares del niño afecto.

Este consejo genético debe realizarse siempre siguiendo los principios hipocráticos y basándose en el Código Deontológico.

2

Hipótesis y Objetivos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 HIPÓTESIS

En muchos casos, especialmente en el caso de TND sin sintomatología neurológica en particular, es difícil para el médico decidir si debe solicitar un estudio genético, basado en criterios de costo-efectividad. La dificultad en caracterizar fenotipos conductuales, y la frecuente superposición de los mismos dificulta la labor del clínico a la hora de dirigir los estudios.

Desde hace más de 15 años han existido intentos de correlacionar determinados parámetros clínicos identificables en la consulta (de manera que pudiesen traducirse una puntuación de predicción clínica o checklist) con la positividad del estudio genético solicitado. Uno de estos primeros intentos se publicó en 2001[56]. En este caso, el estudio genético a realizar era un MLPA (estudio de reordenamientos subteloméricos), y el tamaño de la muestra era de 139 pacientes con DI. A través de la hipótesis de trabajo se consiguió una puntuación de lista de verificación (checklist) que parecía facilitar la preselección de casos candidatos a realizar un estudio mediante MLPA.

4 años después (2005), el mismo autor revisó esta checklist[57] aplicándola al estudio genético mediante aCGH (resolución 100ks) en 100 pacientes con DI. Obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre una puntuación más alta y un resultado positivo en el estudio genético. Desde esta publicación, la mayoría de los estudios sobre el uso de aCGH en DI / retraso del desarrollo se han centrado en niños con DI moderada o grave asociada con malformaciones congénitas o dismorfismos faciales[58]. Se han realizado algunos estudios sobre series de casos con otros TND como TDAH[59,60] TEA[61,62] y epilepsia idiopática[63], pero nuestra hipótesis de trabajo, es que a tenor de los avances en la caracterización de los TND, una lista de verificación actualizada sería de interés. Tammimies et al[64] observaron el rendimiento de aCGH en TEA, considerando la presencia de dismorfismos y un sistema de clasificación de simple a complejo, y comparando el rendimiento en estos grupos. En el contexto de estos trabajos, parece sensato intentar optimizar el rendimiento diagnóstico

del aCGH en muestras más heterogéneas de pacientes, en el contexto de la actividad clínica habitual en una consulta de neuropediatría.
Asimismo, creemos que es interesante definir adecuadamente el impacto "real" que tienen los resultados positivos de un aCGH en la práctica clínica diaria, en cuanto al manejo de este grupo de pacientes.

El solapamiento entre distintos tipos de TNDs hace muy complicada su diferenciación en "compatimentos". Las comorbilidades son la regla y no la excepción, lo que hace necesario una actualización de reglas de predicción clínica previas teniendo en cuanta la diversidad de diagnósticos y la coexistencia de diferentes diagnósticos en el mismo paciente.

Clásicamente, el aCGH estaba indicado en pacientes con cariotipo normal y un cuadro clínico con retraso mental o del desarrollo idiopático, anomalías congénitas o rasgos dismórficos, TEA severo o presentaciones que sugieran un síndrome cromosómico concreto. Este paradigma ha cambiado. El rendimiento del cariotipo es mínimo, y ya existen guías que desaconsejan su uso rutinario en el caso de TNDs, salvo sospecha muy específica.

La Sociedad Americana de Genética Humana ha establecido un consenso[30]basado en los resultados de los estudios llevados a cabo por el Consorcio Internacional de Array Citogenético (ISCA) en los que revisaron datos de 21.698 pacientes analizados con arrays: los microarrays cromosómicos es el primer test diagnóstico a realizar en individuos con retraso mental o anomalías congénitas. El cariotipo debe reservarse para pacientes con síndromes obvios, familias con reordenamientos cromosómicos o historia de múltiples abortos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Principal

Nuestro objetivo fue desarrollar una escala de predicción clínica con una adecuada sensibilidad y especificidad que pueda ayudar a decidir al

clínico cuándo se debe solicitar un estudio genético mediante aCGH en paciente con trastornos del neurodesarrollo.

2.2.2 Objetivos Secundarios

Valorar la implicación de un resultado diagnóstico positivo a través del estudio de aCGH en cuanto a cambios de tratamiento o petición de nuevas pruebas diagnósticas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3

Justificación del estudio

3 Justificación del estudio

3.1 Relevancia científica de la investigación

Los arrays basados en la Hibridación Genómica Comparada son una técnica de reciente aparición que ha demostrado mayor rentabilidad diagnóstica que el cariotipo y FISH en pacientes con discapacidad intelectual, trastornos del espectro autista, malformaciones congénitas y otros trastornos neuropsiquiátricos, según se recoge en múltiples estudios realizados en los últimos 10 años. Esta técnica ha permitido la descripción de nuevas CNV implicadas en estas patologías y existen hasta la fecha múltiples deleciones y duplicaciones cuya patogenicidad no es clara y que por lo tanto requieren de más estudios para su definición.

Su aplicación en la práctica clínica diaria es de implantación reciente y continúa siendo un motivo de investigación en el momento actual.

En los trabajos previos se ha estudiado su rentabilidad frente otras técnicas de diagnóstico molecular, especialmente el cariotipo; el coste-efectividad; los hallazgos obtenidos; y en menor medida se ha tratado de estudiar el fenotipo de los pacientes para tratar de optimizar los resultados al realizar una mejor selección de los pacientes.

En el futuro con la aplicación de sistemas de secuenciación masiva en la práctica clínica habitual será necesario desarrollar nuevos algoritmos de trabajo para el uso del diagnóstico molecular de una forma racional.

El planteamiento de este trabajo se basa en el interés por conocer las características que definen los pacientes sobre los que se ha realizado el aCGH, además de determinar su rendimiento diagnóstico y tratar de aumentarlo en los próximos años.

3.2 Relevancia práctica de la investigación

En el caso de los TND, el poder identificar un defecto genético causal puede tener trascedencia a nivel pronóstico y terapéutico, y ayuda a aconsejar adecuadamente a los familiares en el contexto de un consejo genético en base a los resultados obtenidos[65].

En este contexto, una lista de verificación / escala de predicción clínica sencilla de aplicar sería una valiosa herramienta para el clínico, ya que permitiría preselecionar a los pacientes que se beneficiarían más de la indicación del estudio genético, optimizando los recursos limitados del centro sanitario. Este grado de estratificación ayudaría a orientar mejor la indicación de estudio.

Motivo de la evaluación genética:

- Consejo reproductivo.
- Identificación de tratamientos específicos y anomalías genéticas con vulnerabilidades médicas.

Ventajas de resultado positivo: información diagnóstica, pronóstica, riesgo de recurrencias, posibles terapias potenciales.

La comparación de la eficacia del aCGH en nuestro centro con otros trabajos justificará su implantación como prueba de estudio molecular de elección. Además la descripción de los hallazgos obtenidos exponiendo los casos, contribuirá al esclarecimiento de las causas de discapacidad intelectual, TEA, trastornos del comportamiento y malformaciones congénitas, entre otros trastornos.

El estudio de estos pacientes, la descripción del fenotipo tanto físico como conductual, así como la correlación de los hallazgos genotípicos con las características fenotípicas, los antecedentes y el diagnóstico clínico inicial nos permitirá una mejor selección de los pacientes. Este aspecto tiene una especial relevancia, pues permitirá aumentar la rentabilidad diagnóstica en el futuro y un mejor uso del aCGH.

Este trabajo posee una relevancia socio-sanitaria pues afecta directamente al diagnóstico de numerosas patologías frecuentes en la población. Los hallazgos descritos contribuyen a la realización del consejo genético, la posibilidad de intervenciones terapéuticas específicas y por lo tanto mejorar la asistencia al paciente y su familia.

Por otra parte, contamos con muy escasos estudios que evalúen realmente el impacto de estos diagnósticos en el paciente y en la familia, no existen estudios de medicina basada en la evidencia acerca de su utilidad clínica.

Sabemos que este tipo de información es valiosa porque establece una relación causal que es beneficiosa para las familias. Esta información evita ulteriores consultas y otros tests diagnósticos, mejora el acceso a los

servicios comunitarios, proporciona consejo genéticos, pronóstico y necesidades futuras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4

Metodología

4 Metodología

4.1 Diseño del estudio

Se planteó un estudio transversal de pacientes con TND (TEA, TDAH, DI, RGD, TA), remitidos a la Unidad de Neuropediatíra del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo. La valoración de estos pacientes se realizó inicialmente en el antiguo hospital Xeral y posteriormente en el nuevo hospital Álvaro Cunqueiro entre 2013 y 2015.

Previamente a la elaboración del protocolo, se realizó una búsqueda bibliográfica previa en diversos repertorios y bases de datos indexadas de bibliografía.

Posteriormente se realizó un estudio descriptivo retrospectivo correspondiente en el que se recogieron datos acerca de las consecuencias de un resultado genético positivo a nivel de práctica clínica (cambio de pauta terapéutica, derivación a otras especialidades, petición de nuevas pruebas) de los pacientes con resultado genético patológico.

4.2 Población de referencia y de estudio

El Complejo Hospitalario Universitario de Vigo es el centro terciario de referencia en el sur de la provincia de Pontevedra (España). Cuenta con una población objetivo de alrededor de 500,000 personas, con más de 70,000 de por debajo de los 15 años (población de atención pediátrica).

El estudio se centró en los pacientes con TND valorados en la Unidad de Neuropediatría.

4.3 Criterios de selección

Para la realización del estudio se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión/exclusión:

Criterios de inclusión:

- Pacientes menores de 15 años a los que se estudió mediante array-CGH entre los años 2013 y 2015. Los diagnósticos de estos pacientes incluyen: DI/ Retraso psicomotor (RPM), TEA, TDAH, malformaciones congénitas y otros trastornos neurológicos.
- Pacientes con familiares que hablen castellano, gallego o inglés.

- Pacientes que cuenten con al menos un familiar biológico vivo.
- Pacientes cuyos tutores hayan firmado el consentimiento informado para la realización del estudio genético, así como para que los resultados del mismo puedan ser consultados.

Criterios de exclusión:

- Pacientes cuya solicitud de la prueba se hizo por un profesional externo a la Unidad de Neuropediatría del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo.
- Pacientes no valorados o seguidos por alguno de los neuropediatras que componen la Unidad.
- Pacientes cuyos tutores no hayan querido participar en el estudio.
- Pacientes fuera de seguimiento.

4.3.1 Protocolo de estudio

Tres Neuropediatras procedieron a puntuar todos los casos de manera retrospectiva, en función de las variables relacionadas con los antecedentes perinatales, datos antropométricos, dismorfias, malformaciones asociadas, antecedentes familiares… Las evaluaciones de los Neuropediatras se realizaron en pacientes que habían recibido el diagnóstico de un TND (DI, TDAH, TEA, TA…) basado en los criterios diagnóstico y estadísticos del Manual de trastornos mentales (Cuarta edición, Revisión de texto) 3. El DSM-V (Quinta edición) no se utilizó con la población del estudio porque su publicación fue realizada en 2013, y por tanto, no disponible para la evaluación de los primeros pacientes. En caso de no haberse realizado, se realizó[66] medición de capacidades intelectuales CI con la Escala de inteligencia de Wechsler y la Escala de inteligencia primaria de Wechsler o la Escala de inteligencia abreviada de Wechsler.

Se realizó un estudio genético mediante aCGH a todos los pacientes, siendo las pruebas solicitadas por 3 Neuropediatras, y dirigidas a la Unidad de Citogenética del mismo hospital.

Variables recogidas

Las variables recogidas en el estudio han sido:

Variables independientes:

• Variables demográficas: sexo, edad en el momento de la petición, edad de la madre en el momento del parto.

• Datos del nacimiento: bajo peso al nacer, restricción del crecimiento intrauterino.

• Antecedentes familiares: historia familiar de discapacidad intelectual o trastornos del espectro autista.

• Exploración y pruebas complementarias: perímetro craneal, talla, hipertelorismo, anomalías palpebrales, anomalías nasales, anomalías de pabellones auriculares, otras anomalías faciales, anomalías en manos, anomalías cardíacas, anomalías renales, anomalías genitales, anomalías otorrinolaringológicas, alteraciones oftamológicas, cociente intelectual (CI), cariotipo, resonancia magnética cerebral,

• Datos neurológicos: rasgos autistas, epilepsia, sordera, hiperactividad, agresividad, hipo/hipertonía, retraso en la adquisición de ítems del desarrollo, alteraciones de conducta, trastorno del espectro autista, discapacidad intelectual y retraso global del desarrollo, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, trastornos del comportamiento, trastorno generalizado del desarrollo, trastorno del aprendizaje.

Variable dependiente:

• Resultados del array-CGH.

Definición de variables

• Sexo: variable cualitativa dicotómica: femenino/masculino.

• Edad en el momento de la petición: variable cuantitativa.

• Edad de la madre en el momento del parto: variable cuantitativa.

• Bajo peso al nacer: variable cualitativa dicotómica: sí/no.

• Restricción del crecimiento intrauterino: sí/no.

• Historia familiar de discapacidad intelectual y TEA: variable cualitativa dicotómica: sí/ no.

• Perímetro craneal: variable cualitativa categórica: microcefalia/macrocefalia/ normal.

• Talla: variable cualitativa categórica: baja / macrosomía/ normal.

• Hipertelorismo: variable cualitativa dicotómica: sí/no.

• Anomalías palpebrales: variable cualitativa dicotómica: sí/no.

• Anomalías nasales: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Anomalías de pabellones auriculares: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Otras anomalías faciales: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Anomalías en manos: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Anomalías cardíacas variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Anomalías renales: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Anomalías genitales: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Anomalías otorrinolaringológicas: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Alteraciones oftamológicas: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Cociente intelectual (CI): variable cualitativa dicotómica: severo, moderado, leve, límite, normal.
• Cariotipo; variable cualitativa dicotómica: normal/alterado.
• Resonancia magnética cerebral: variable cualitativa dicotómica: normal/alterada.
• Rasgos autistas: variable cualitativa dicotómica: sí/no
• Epilepsia: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Sordera: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Hiperactividad: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Agresividad: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Hipo/hipertonía: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Retraso en la adquisición de ítems: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Alteraciones de conducta: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Trastorno del espectro autista: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Discapacidad intelectual y retraso global del desarrollo: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Trastorno por déficit de atención e hiperactividad: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Trastornos del comportamiento: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Trastorno generalizado del desarrollo: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Trastorno del aprendizaje: variable cualitativa dicotómica: sí/no.
• Resultado del array CGH: variable cualitativa categórica: normal/probablemente causal/ significado incierto/ probablemente benigna.

• Origen de la alteración: variable cualitativa categórica: materna/paterna/ de novo.

Las variables independientes incluidas en el modelo fueron: antecedentes familiares de enfermedad renal crónica / enfermedad psiquiátrica, retraso del crecimiento intrauterino (CIR) definido como peso al nacer <percentil 3 (p3) según la edad gestacional, microcefalia definida como perímetro craneal (PC) <p3, macrocefalia definida como PC> percentil 97 (p97), estatura baja <p3, estatura alta> p97, DI (basada en la Escala de Inteligencia de Wechsler para Niños <70) / TEA (definida como sí / no / no recopilada); Malformaciones menores definidas como faciales: asimetría facial, hipertelorismo, alteraciones de los párpados, anomalías nasales y / o del oído. Malformaciones de manos y / o pies: clinodactilia y otras; tórax: pectus carinatum, excavatum y algunos otros; oreja-nariz-garganta (ORL): paladar ojival; Malfȷormaciones importantes como cardiaca, urogenital: criptorquidia e hipospadias; Neuroimágenes y alteraciones oftalmológicas, p. ej. coloboma
Una variante de número de copia se definió como un desplazamiento del valor normal de al menos 3 sondas consecutivas, y las posiciones de mapeo se refieren al conjunto del genoma hg19 (compilación 37). La calidad de la prueba se evaluó por la solidez de los valores de las métricas de control de calidad.
Las variantes se clasificaron según las directrices de ACMG en 5 categorías: patógenas, probablemente patógenas, variantes de importancia desconocida, probablemente benignas y benignas. Se realizaron pruebas a los padres para establecer la herencia cuando se encontraron variantes patogénicas, probablemente patogénicas y variantes de importancia desconocida. Los genes de contenido, el tipo de CNV (eliminación, duplicación), el modo de herencia y los informes anteriores en bases de datos (Decipher, ClinGen), nos ayudaron a clasificar las variantes.

Como estudio complementario, también se recogieron datos acerca del cambio que había supuesto un estudio de array positivo en cuanto a petición de nuevas pruebas complementarias, hallazgo de nuevas anomalías o cambios de pauta de tratamiento.

El doctorando participó en el diseño del estudio y la interpretación de los datos. La recogida y procesado de las muestras ha sido realizada por parte de la Unidad de Citogenética del Hospital Alvaro Cunqueiro.

4.4 PROCESADO DE MUESTRAS

Array-CGH se realizó en sangre periférica con la plataforma comercial de Signature Genomics (Perkin Elmer) CGX-HD 4-plex (4x180k) que contiene 180,000 sondas de oligonucleótidos. Para la visualización, el análisis bioinformático y la interpretación de los resultados, utilizamos los programas Cytogenomics (Agilent) y Genoglyphix (Signature Genomics, Perkin Elmer) en comparación con Genome Build (hg 19).

4.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se realizaron análisis descriptivos de las principales características de los sujetos incluidos, así como análisis univariado y de regresión logística para seleccionar potenciales predictores de CNV positiva. En el análisis descriptivo, se emplearon las medias y las desviaciones estándar para representar las variables cuantitativas y las frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas. La asociación entre pacientes con y sin variantes patógenas (análisis univariado) se evaluó mediante la prueba de la t de Student en el caso de variables cuantitativas y la prueba de ji cuadrado y exacta de Fisher para la comparación de las variables cualitativas. El test de ANOVA se empleó únicamente en la comparación de las medias de edad entre los cuatro grupos; CNV patogénicas, de significado incierto, benignas y sin cambio.

Las variables que presentaron significación estadística en el análisis univariante se incluyeron en los posteriores análisis multivariantes. Los predictores se seleccionaron mediante regresión logística, utilizando para la selección el método por pasos hacia atrás de Wald. Para la selección del modelo de regresión que mejor se adapte a los datos, se comprobó la bondad de ajuste de los distintos modelos utilizando el test de Hosmer y Lemeshow, considerando como válidos aquellos con un valor de P mayor que 0.05. Los modelos que cumplan esta condición se evaluaron mediante el criterio de información de Akaike (AIC) seleccionando finalmente aquel con menor puntuación en esta medida. El AIC es un indicador que nos permite medir la

capacidad explicativa de los modelos a la vez que penalizar su grado de complejidad, de esta manera buscamos obtener un modelo con buena capacidad predictiva reduciendo en lo posible el número de variables predictoras.

Se calcularon los odds ratios (OR) junto con sus IC del 95%, en este caso Exp (β), brutos y ajustados para el modelo final.

Sobre la base de los valores de β, los Exp (β) y el valor de significación de cada predictor en el modelo final, se asignó una puntuación a cada variable en la nueva puntuación. El resultado de la puntuación se aplicó a la población de estudio, utilizando la curva de características operativas del receptor (ROC) para determinar la exactitud diagnostica del listaje de puntuación y el mejor punto de corte para discriminar entre pacientes con y sin variantes patógenas.

Para obtener el mejor punto de corte del listaje de puntuación, se calcularon las siguientes estimaciones: sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos, valores predictivos negativos y exactitud para cada punto de corte.

El análisis de los datos se realizó con un programa estadístico SPSS Windows 19.0 y EpiDat 3.1.

4.6 ASPECTOS ÉTICO-LEGALES

Se estableció la necesidad del cumplimiento de las Normas de Buena Práctica Clínica y de la Declaración de Helsinki.

En cuanto a la confidencialidad de la información, especialmente importante en el cambio de la genética, el tratamiento, comunicación y cesión de los datos se hizo conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. Sólo el equipo y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tuvieron acceso a todos los datos recogidos por el estudio.

El manejo de muestras biológicas se realizó conforme a la Ley 14/2007 y el RD 1716/2011. Las muestras y los datos asociados fueron guardados de forma codificada. Esta información está a cargo del investigador principal y sólo pueden acceder a ella los miembros del equipo investigador y las autoridades sanitarias en el ejercicio de sus funciones. Los Responsables de la custodia de las muestras es la Unidad de Citogenética donde permanecen almacenadas

Ver Anexo: Modelo de consentimiento informado

El consentimiento informado por escrito para la investigación y publicación de los resultados se obtuvo de todos los pacientes, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de Galicia (número de aprobación: 2011/005).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5

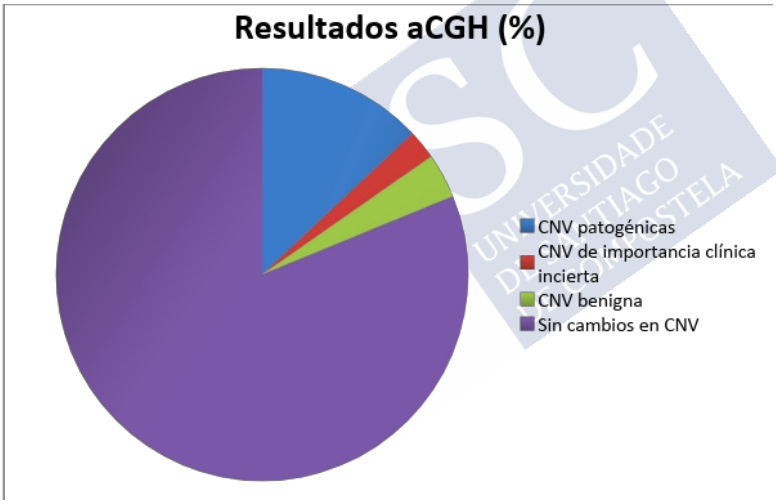
Resultados

5 Resultados

Se analizaron 570 pacientes con DI / RPM, TEA y / o malformaciones congénitas; de los cuales 188 eran mujeres y 382 varones.

Se identificaron variantes patógenas o probables en 74 pacientes (13%); variantes de importancia clínica incierta en 13 pacientes (2,3%); La CNV fue probablemente benigna en 20 pacientes (3,5%) y no hubo cambios en el número de copias en 463 pacientes (81,2%).

Figura 6: Resultados aCGH.



5.1 Características de los pacientes incluidos

En el estudio de asociación (tabla 2), no se encontró relación estadística de CNV patógena con variables demográficas, familiares y relacionadas con el nacimiento, como el sexo o la restricción del crecimiento intrauterino. Una historia familiar de DI o TEA estuvo presente en 20 (27,0%) pacientes con CNV patógena y 101 (20,5%) sin CNV patógena (p = 0,204).

Con respecto a las variables antropométricas, hubo una relación estadísticamente significativa entre la CNV patógena y la presencia de

alteraciones en el perímetro cefálico (p = 0,006), y altura y peso <p3 (p = 0,018 yp = 0,002). No se encontraron diferencias con la altura y el peso sobre p97 o el índice de masa corporal.

Respecto al diagnóstico establecido por el neuropediatra, hubo una relación significativa con los pacientes diagnosticados de TEA (p = 0,004).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2: Estudio de asociación.

Variables	CNV patogénicas				p-valor
	PC (n=74)	SI (n=13)	PB (n=20)	No (n=463)	
Edad (X±DE)	7,1 ± 4,4	7,3 ± 3,2	6,9 ± 4,4	6,9 ± 4,5	0,962
Sexo (masculino)	50 (67,6%)	9 (69,2%)	16 (80,0%)	307 (66,3%)	0,644
Historia familiar de TND	20 (27,0%)	3 (23,1%)	6 (30,0%)	92 (20,0%)	0,424
CIR	6 (8,1%)	2 (15,4%)	4 (20,0%)	34 (7,4%)	0,169
Microcefalia PC<p3	17 (23,0%)	4 (30,8%)	3 (15,0%)	74 (16,0%)	0,265
Macrocefalia PC>p97	14 (18,9%)	2 (15,4%)	1 (5,0%)	47 (10,2%)	0,115
Alteración perím. craneal	31 (41,9%)	6 (46,2%)	4 (20,0%)	121 (26,1%)	0,015
Talla baja <p3	23 (31,1%)	2 (15,4%)	5 (25,0%)	88 (19,0%)	0,106
Talla alta >p97	6 (8,1%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	26 (5,6%)	0,558
Bajo peso <p3	14 (18,9%)	1 (7,7%)	1 (5,0%)	36 (7,8%)	0,018
Sobpreso >p97	7 (9,5%)	1 (7,7%)	1 (5,0%)	32 (6,9%)	0,856
DI25 / RPM	26 (35,1%)	4 (30,8%)	5 (25,0%)	147 (31,7%)	0,848
TEA	49 (66,2%)	4 (30,8%)	7 (35,0%)	229 (49,5%)	0,010

PC: probablemente causales; **SI**: significado incierto; **PB**: probablemente benignas; **TND**: trastorno del neurodesarrollo; **RPM: retraso psicomotor**; **CIR** crecimiento intrauterino retardado. DI: discapacidad intelectual. TEA: trastorno del espectro autista.

También analizamos variables relacionadas con dismorfias y anomalías congénitas (tabla 3). Se encontró una relación significativa con malformaciones urogenitales ($p = 0,008$), neurológicas ($p < 0,001$) y oftalmológicas ($p < 0,001$) (por ejemplo, glaucoma congénito, cataratas). No hubo relación con la presencia de dismorfia facial, anomalías de manos y pies, malformaciones torácicas menores, malformaciones otorrinolaringológicas o cardiacas mayores. Sin embargo, se encontró una relación con la presencia de, al menos, dos malformaciones o dismorfismos en el mismo paciente ($p < 0,001$). Las variables que perdieron significación estadística en el análisis multivariado se eliminaron del modelo y, por lo tanto, no se tuvieron en cuenta en la puntuación.

En cuanto a las correcciones por comparaciones multiples, en el caso del análisis univariante, no se realizaron porque se comparaban solo dos grupos, los grupos de CNVs patógenicas frente al CNVs no patogénicas, y no se considera necesario realizar comparaciones múltiples en esas circunstancias. En el caso de los análisis multivariantes para decidir las variables a incluir en modelo se empleo regresión logística por pasos y se evaluó su adecuación rehaciendo la selección de variables basándonos en el criterio de información de Akaike y se determinó la calidad del ajuste del modelo mediante el test de Hosmer y Lemeshow. El AIC o valor del criterios de información de Akaike del modelo final fue de 71.99, el menor de entre los modelos probados. La p del test de Hosmer y Lemeshow fue de 0.563, por lo tanto se pudo considerar válido el modelo.

Tabla 3. Dismorfias y malformaciones en pacientes con y sin CNVs patogénicas.

	CNVs patogénicas				p-valor
	PC (n=74)	SI (n=13)	PB (n=20)	No (n=463)	
Dismorfias faciales	31 (41,9%)	8 (61,5%)	6 (30,0%)	138 (29,8%)	0,022
Dismorfias en manos o pies	12 (16,2%)	3 (23,1%)	3 (15,0%)	51 (11,0%)	0,345
Malformaciones torácicas	9 (12,2%)	1 (7,7%)	1 (5,0%)	31 (6,7%)	0,397
Malformaciones ORL	13 (17,6%)	4 (30,8%)	2 (10,0%)	65 (14,0%)	0,300
Malformaciones mayores: cardíacas	10 (13,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	45 (9,7%)	0,187
Malformaciones mayores: urogenital	15 (20,3%)	1 (7,7%)	1 (5,0%)	47 (10,2%)	0,056
Malformaciones en neuroimagen	20 (27,0%)	2 (15,4%)	2 (10,0%)	53 (11,9%)	0,006
Malformaciones oftalmológicas	13 (17,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	27 (5,8%)	0,001
Uno o más signos dismórficos	20 (27,0%)	5 (38,5%)	5 (25,0%)	120 (25,9%)	0,786
Dos o más signos dismórficos	39 (52,7%)	6 (46,2%)	4 (20,0%)	130 (28,1%)	<0,001

5.2 LISTAJE DE PUNTUACIÓN

Teniendo en cuenta las características más frecuentes observadas en pacientes con una matriz CGH positiva, se desarrolló una lista de puntuaciones (lista de verificación) para contribuir a la preselección de pacientes para esta prueba de diagnóstico e informar al paciente y a sus padres.

Para la realización de la lista de verificación se realizaron modelos de regresión para determinar las variables que presentaban asociación con CNVs patogénicas. La puntuación se obtuvo a partir del valor de beta obtenido en el modelo de regresión logistica. En la tabla 5 se puede ver el resultado del modelo final con los valores de beta, los exponentes junto a su intervalo de confianza y el p-value para cada item. Las variables que mostraron una asociación significativa con CNV patogénica fueron la macrocefalia, presentar bajo peso, TEA, un signo dismórfico y tener 2 o más signos dismórficos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Modelo de regresión y valores Beta y Exp B.

Item	B	Exp B (IC 95%)	p-value
Macrocefalia PC>p97	0,764	2,15 (1,07-4,31)	0,031
Bajo peso <p3	1,159	3,19 (1,54-6,58)	0,002
TEA	1,005	2,73 (1,58-4,73)	<0,001
1 signo dismórfico	0,942	2,57 (1,25-5,28)	0,010
2 o más signos dismórficos	1,505	4,51 (2,35-8,66)	<0,001
Constante	-3,600	0,027	<0,001

Tras realizar diferentes combinaciones y determinaciones en base a los valores de beta y a los valores Exp (Beta) se optó por dar la puntuaciones a cada una de las variables que aparecen en la tabla 5.

Tabla 5. Puntuaciones

Items	Puntuación
Macrocefalia PC>p97	1
Bajo peso <p3	1,5
TEA	1,5
1 signo dismórfico	1
2 o más signos dismórficos	2

En la figura 7 se puede observar la curva ROC resultante de aplicar la puntuación a cada uno de los sujetos incluidos en el estudio. El área bajo la curva ROC fue de 0.76 (IC 95%: 0.71 – 0.81).

Figura 7: Curva ROC

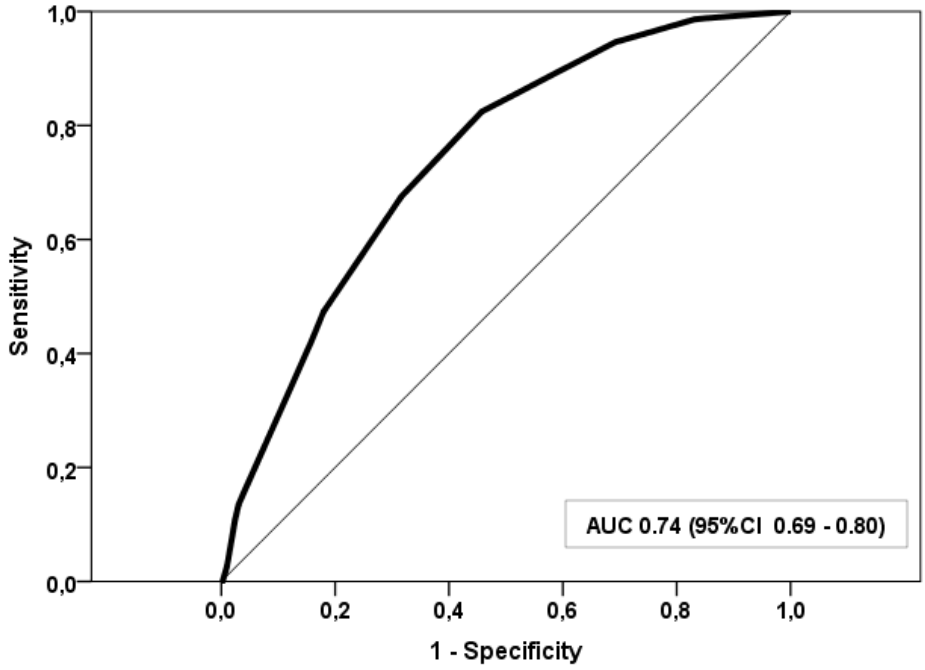
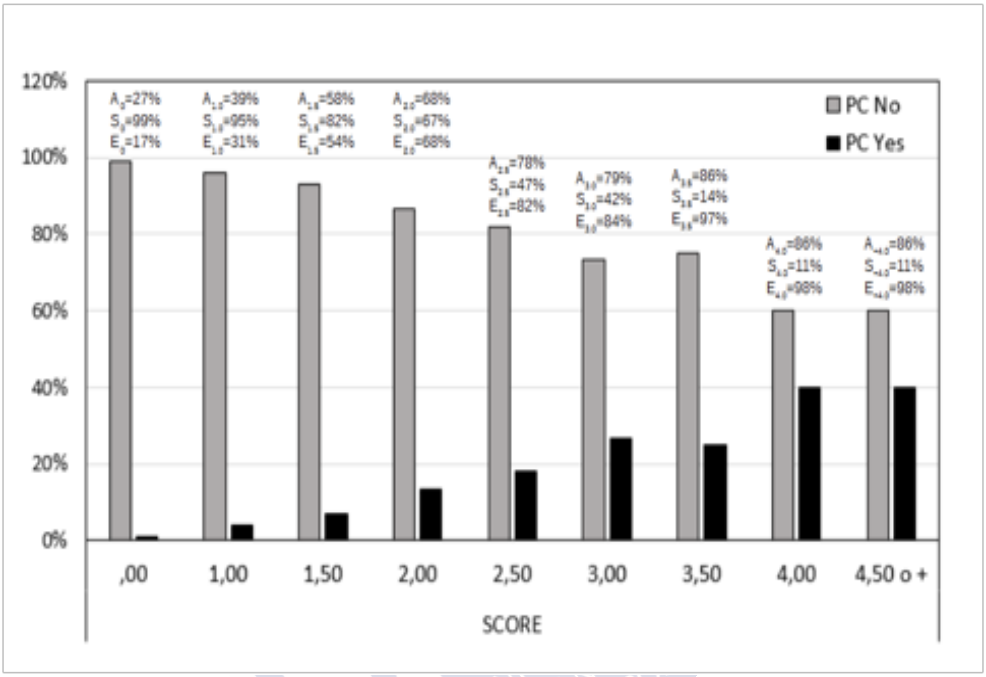


Figura 8: Precisión de la puntuación



A: Accuracy (exactitud), S: sensibilidad, E: especificidad.

Tabla 6: Sensibilidad, especificidad, VP+, VP- y exactitud para cada punto de corte

	Sensibilidad	Especificidad	VP+	VP-	Exactitud
0	98,7 (95,3-100)	16,7 (13,4-20,1)	15,0 (11,7-18,3)	98,8 (95,9-100)	27,4 (23,6-31,1)
1	94,6 (88,8-100)	30,9 (26,7-35,0)	17,0 (13,2-20,7)	97,5 (94,7-100)	39,1 (35,0-43,2)
1,5	82,4 (73,1-91,8)	54,2 (49,8-58,7)	21,2 (16,3-26,1)	95,4 (92,8-98,0)	57,9 (53,8-62,0)
2	67,6 (56,2-78,9)	68,4 (64,2-72,5)	24,2 (18,1-30,2)	93,4 (90,7-96,1)	68,3 (64,3-72,2)
2,5	47,3 (35,3-59,4)	82,1 (78,6-85,5)	28,2 (19,9-36,6)	91,3 (88,5-94,0)	77,5 (74,0-81,1)
3	41,9 (30,0-53,8)	84,3 (81,0-87,6)	28,4 (19,5-37,4)	90,7 (87,9-93,4)	78,8 (75,3-82,2)
3,5	13,5 (5,1-22,0)	97,0 (95,4-98,6)	40,0 (18,8-61,2)	88,3 (85,5-91,1)	86,1 (83,2-89,1)
4	10,8 (3,1-18,6)	97,6 (96,1-99,0)	40,0 (16,0-64,0)	88,0 (85,2-90,8)	86,3 (83,4-89,2)
4,5 o +	2,7 (0,0-7,1)	99,0 (98,0-100)	28,6 (0,0-69,2)	87,2 (84,4-90,1)	86,5 (83,6-89,4)

Usando un puntaje mayor o igual a 1.5 como punto de corte para la prueba, obtuvimos una sensibilidad de 82.4% (95% CI 73.1% - 91.8%) con una especificidad de 54.2% (IC 95% 49.7% - 58.7%). Esto implica que podríamos haber excluido a 268 pacientes de los 492 con un resultado normal en la prueba, aunque 13 pacientes con una probable matriz causal no alcanzaron la puntuación de 1.5 puntos. Esto significa que en pacientes con una puntuación de ≤1.5 la probabilidad de obtener un resultado positivo es de 4.6% (figura 8).

Tabla 7: Sensibilidad y especificidad utilizando 1.5 como punto de corte

	Probablemente causal	
	Valor	95%CI
Sensibilidad	82,4	73,1 - 91,8
Especificidad	54,2	49,7 - 58,7
Exactitud	57,9	53,7 - 62,0
Valor predictivo +	21,2	16,3 - 26,1
Valor predictivo -	95,4	92,8 - 98,0
Prevalencia	13,0	10,1 - 15,8

La tabla 8 muestra la distribución de los 74 aCGH probablemente causales y el 496 normal al dividirlos en función de tener una puntuación mayor o menor de 1,5.

Tabla 8: Distribución de la muestra utilizando 1.5 como punto de corte

	Probablemente causal	
SCORE	Sí (n=74)	No (n=496)
>1.5	61	227
≤1.5	13	268

5.3 IMPLICACIONES DIAGNÓSTICAS.

Valoraciones / derivaciones a otras Unidades.

1. Cardiología: Derivación de 23 pacientes (15,5 %) por soplos objetivados en consulta de neuropediatría o pediatra de centro de salud. Diagnóstico más frecuente: Soplo benigno en 6 pacientes (4,1%). Otras: CIV en 4 pacientes (2,7%) , Ductus persistente en 2 pacientes (1,35%)

2. Gastroenterología Infantil: Derivación de 19 pacientes. Motivo de consulta mas frecuente presencia de RGE (7 pacientes 4,8%).

3. Nefrología: Derivación de 18 pacientes. Gran variedad de motivos de consulta. Lo mas frecuente Criptorquidia en 4 pacientes (2,7%) seguido de hidronefrosis, enuresis, hipospadias y RVU grado III (2 pacientes cada uno).

4. Oftalmología: Derivados 50 pacientes. 21 pacientes por alteraciones en la refracción (14,2%). 9 pacientes derivados para estudio de estrabismo (6,1%).

5. Estudios de neuroimagen: Se realizó neuroimagen como prueba complementaria antes de realizar técnicas genéticas en 79 pacientes(53,4%). ECO normal: 4 pacientes (2,7%), RM normal: 52 pacientes (35,1%), RM alterada: 23 pacientes (15,5%) La alteración más frecuente: Quiste pineal en 4 pacientes (2,7%). Otras alteraciones: 1 paciente con Variante Dandy-Walker y 1 paciente con Arnold Chiarri tipo 1.

Valoraciones / derivaciones a otras especialidades consecuencia del resultado del array:

1. Cardiología: 13 pacientes para descartar anomalías asociadas a las alteraciones de Array halladas. 9 pacientes con estudio normal (6,1%). Resto: 1 discrepancia en vías pulmonares, 1 displasia de valvula pulmonar ,1 soplo benigno y 1 valvula aórtica bicúspide normofuncionante con insuficiencia minima y aceleración leve en situación hiperdinámica.

2. Gastroenterología Infantil: Se derivan 2 pacientes. No patología orgánica objetivable.
3. Nefrología: Se derivan 5 pacientes para descartar anomalías posiblemente asociadas a sus hallazgos en Array. Patología encontrada en 3 pacientes: Megaureter derecho + reflujo vesicoureteral grado IV-V, Riñón en herradura, Estenosis pielo-ureteral + hidronefrosis
4. Oftalmología: Se derivan 3 pacientes. En dos de ellos se encuentra patología: miopía + retinosis pigmentaria, nistagmus pendular.
5. Estudios de neuroimagen: Una vez obtenido resultado de Array se realizan pruebas de imagen en 12 pacientes . En 4 de ellos para control de su patología ya conocida (Arnold chiari tipo 1 , hidrocefalia, quiste en bolsa de Rathke y variante Dandy-Walker). En 5 ocasiones (3,35%) los resultados de la nueva prueba de imagen fueron normales (1 ecografía y 4 RM). Se hallan anomalías en 3 pacientes: 1 Anomalías venosas frontales, 1 Agenesia cuerpo calloso, 1 Aumento espacios subaracnoideos.

Cambios de tratamiento consecuencia del resultado del array: ninguno.

Se deduce de estos datos que gracias a los resultados de aCGH se ha realizado un despistaje de malformaciones urológicas, oftalmológicas, cardiológicas y del sistema digestivo, encontrándose así patologías en otros órganos o sistemas que, de otra manera, no se hubiesen descubierto. En nuestra serie de pacientes el aCGH no demostró ser de utilidad para realizar cambios en el tratamiento de los pacientes.

6

Discusión

6 Discusión

Las listas de comprobación ó checklists se han generalizado y popularizado en los entornos médicos en los últimos años. Son ejemplos de estas, las listas de comprobación previo a una cirugía, que han demostrado ser un método rápido y eficaz para evitar errores en este ámbito. En un marco conceptual tan variado y complejo como son los TNDs y la genética de los mismos, una lista de comprobación emerge como un método potencialmente útil para manejar de una manera eficiente los recursos y ayudar al clínico a tomar decisiones.

Su utilidad emana en primer lugar de la rapidez en aplicarla. Se trata de una escala de 5 items (macrocefalia, bajo peso, TEA, 1 signo dismórfico, 2 o más signos dismórficos) con una puntuación determinada. Cuando esa puntuación supera un determinado punto de corte (1.5) conseguimos la mejor sensibilidad y especificidad a la hora de solicitar un estudio genético de variación de dosis génica (CNV) como es el aCGH, que se ha demostrado un acercamiento adecuado en pacientes con TND.

En segundo lugar, la aplicación de esta escala no supone un esfuerzo extra para el clínico, ni tampoco precisa de un aparataje específico. Los 5 items son eminentemente clínicos, y se recogen de rutina en una consulta de neuropediatría habitual. Esto favorece su aplicabilidad en distintos niveles asistenciales independientemente de la complejidad o dimensión de la Unidad de Neuropediatría que lo aplique.

De esta circunstancia deriva también otro aspecto como es la posibilidad de una mayor homogeneización de la asistencia, que conllevaría una mejor gestión de recursos. Suele ser frecuente ver en distintas unidades y en distintos profesionales unas tasas de solicitud de estudios genéticos muy dispares en función del manejo y la familiaridad del profesional o del equipo con los estudios genéticos. Esto dificulta enormemente la gestión de recursos para los laboratorios de citogenética, ya que hace difícil anticipar las necesidades de exploraciones complementarias. Aplicando una escala de predicción clínica se ayudaría a consensuar la solicitud de estudios genéticos, mejorando posiblemente el acceso a los mismos por parte de los clínicos, ya que las solicitudes de estudios genéticos estarían mejor

fundamentadas y razonadas, con la consiguiente optimización en la utilización de recursos.

El acercamiento diagnóstico clásico en muchos casos de TNDs (especialmente en los casos de TEA o discapacidad intelectual) sugería la realización de un cariotipo, un estudio neurofisiológico tipo electroencefalograma (EEG), un estudio metabólico ampliado (aminoácidos en sangre y orina, ácidos orgánicos en orina, perfil de acilcarnitinas en tandem masas) y un estudio de neuroimagen (generalmente una resonancia magnética nuclear (RMN). Este tipo de abordaje a nivel de pruebas complementarias se ha demostrado muy poco eficaz para el diagnóstico etiológico, siendo la mayor parte de estas pruebas complementarias normales, o en otros casos con hallazgos muy inespecíficos que no arrojaban luz sobre las potenciales causas de ese TND, y que también dificultaban su interpretación por parte de los clínicos y la transmisión de una información fiable a la par que comprensible a las familias.

Este hecho ha motivado un cambio de paradigma, que conjuntamente con la irrupción de las nuevas técnicas de genética molecular ha hecho necesario un cambio de planteamiento en el proceso diagnóstico. El porcentaje de diagnósticos etiológicos en TNDs a través de la realización de estudios de aCGH o aSNPs ronda el 10-15%. Este porcentaje de diagnósticos es muy superior al acercamiento previo, pero todavía insuficiente para dar respuesta a un número adecuado de pacientes. Una lista de predicción clínica podría ayudar a definir mejor al "paciente tipo" que se beneficiaría de este tipo de estudios de genética molecular.

Esta checklist es fácilmente reproducible en distintos ambientes clínicos sin necesidad de una formación específica. Cualquier clínico que atienda pacientes con TNDs puede aplicarla y ponerla en marcha.

También proporcionaría una cierta seguridad para el profesional que tiene delante al paciente con un TND, ya que ayudaría a tomar decisiones a la hora de solicitar pruebas complementarias avaladas por la evidencia.

Los pacientes con TND son un porcentaje muy elevado del total de pacientes atendidos en las Unidades de Neuropediatría, por lo que la aplicación de una escala clínica predictora simple, podría ayudar al Neuropediatra a decidir la indicación de estudios genético a través de aCGH. Esta preselección clínica se antoja muy interesante debido a la

complejidad técnica y el costo de los estudios genéticos, así como el aumento progresivo en la demanda de valoración de pacientes con TND.

A cualquier escala clínica predictiva debemos exigirle una alta sensibilidad, para evitar la pérdida de potenciales pacientes que se podrían beneficiar de un diagnóstico genético etiológico que no llegaría de otra manera. En el presente trabajo, se ha conseguido una sensibilidad del 82,4%, la cual parece suficiente aunque mejorable. El objetivo final sería una sensibilidad del 100%, para evitar excluir a pacientes que pudiesen beneficiarse de la técnica. El aumento de la sensibilidad creemos que podría lograrse con una "n" de pacientes más elevada. La mayor accesibilidad y el menor coste de este tipo de estudios en los últimos años posibilitará con toda seguridad conseguir un número de pacientes más elevado con el poder afinar aún más esta checklist y aumentar su sensibilidad. Como hemos dicho, la información de cada elemento de nuestra checklist se puede obtener de forma rápida y confiable en cualquier consulta médica, sin necesidad de evaluaciones complejas o demoras en el tiempo.

Si eligiésemos un punto de corte superior, lograríamos una mejor especificidad y, pero también limitaríamos el número de pacientes que necesitarían ser evaluados a poco más de la mitad. De esta manera perderíamos el 7% de resultados positivos en cuanto a hallazgos causales. Como contrapartida, perderíamos varios casos. Como ejemplo ilustrativo, si estableciésemos el punto de corte en una puntuación de 5 o más, se reduciría el número de pacientes a los que se les hará la prueba a menos de un 1/5, pero casi la mitad de las CNVs patógenas o causales no se detectarían.

Si este enfoque es aceptable para un Servicio de Neuropediatría con una Unidad de Citogenética depende en gran medida de los recursos disponibles en cada centro, pero a priori no parece adecuado ni para el paciente ni para el clínico.

Una de las limitaciones a tener en cuenta en nuestro estudio es el hecho de que tres neurólogos pediátricos calificaron los casos basándose en datos retrospectivos, pero no se ha calculado ni tenido en cuenta la tasa de acuerdo interobservador. Sí debemos incidir en el hecho de que los mismos neurólogos pediátricos fueron los que indicaron el estudio genético.

Los tres neuropediatras están acreditados por la Sociedad Española de Neuropediatría (SENEP) dependiente de la Asociación Española de Pediatría (AEPED) habiendo superado satisfactoriamente los criterios de

acreditación. Presuponemos por tanto su habilidad para calificar y describir los casos clínicos, que por otra parte incluyen patologías relativamente frecuentes en las consultas de neuropediatría. No obstante, somos conscientes de que la calidad del estudio mejoraría con un tipo de estudio prospectivo teniendo en cuenta la tasa de acuerdo interobservador.

En los últimos años, el Whole Exome Sequencing (WES) ha emergido como la prueba genética complementaria para los TEA en el caso de resultados de Array negativos. En el estudio no se han incluido los resultados de los pacientes con Array normal a los que se les ha realizado un WES posteriormente.

No se han incluido porque la plataforma de aCGH utilizada ha sido homogénea a lo largo del período de estudio, con los mismos estándares técnicos, pero el estudio mediante WES ha variado según el laboratorio al que se ha enviado. El estudio de aCGH está integrado dentro de los estudios analíticos "convencionales" en nuestro hospital, pero el WES es una prueba que se envía a laboratorios externos en función de criterios económicos coyunturales. De esta manera, los resultados de distintos WES podrían no se comparables a lo largo del período de estudio.

Sin embargo, el hecho de incluir resultados que han dado un diagnóstico etiológico a través de WES, en pacientes con un estudio de array negativo, podría complementar los datos de sensibilidad y especificidad de los estudios genético indicados en pacientes con TND.

Para el diagnóstico de determinados trastornos del neurodesarrollo se utilizó el DSM-IV, ya que era la edición correspondiente al inicio del período de estudio. La última versión del DSM (DSM-V) fue lanzado en 2013, por lo que no pudo estar disponible para los primeros pacientes, y no se adaptó posteriormente para evitar un sesgo de selección y favorecer una homogeneidad en el estudio.

La tendencia actual es a realizar diagnósticos utilizando la última versión del DSM, que contiene significativas diferencias con respecto a la previa, lo que podría modificar los datos de prevalencia / incidencia de nuestro estudio. Por otra parte, en el campo de los TND cada vez se tiende más a utilizar valoraciones diagnósticas lo más "objetivas" posibles, intentando no realizar valoraciones categoriales (agrupaciones de síntomas). En el caso del TDAH, las valoraciones neuropsicológicas han aportado importantes avances en este aspecto. Estudios neuropsicológicos como el d-

cpt, ENFEN, NEPSY-II ayudan a categorizar a los pacientes con más fiabilidad y objetividad. En el caso de los TEA, el *gold standard* en el momento actual está considerada una evaluación neuropsicológica que incluya la aplicación de dos pruebas: ADI-R y ADOS-2, que optimizan la sensibilidad y especificidad de las valoraciones. En nuestro estudio se utilizaron también para TEA los criterios diagnósticos del DSM-IV para homogeneizar la muestra, aunque algunos pacientes aportaban valoraciones neuropsicológicas externas no realizadas en nuestra Unidad.

Las descripciones de los rasgos dismórficos están realizadas en función de la valoración subjetiva de los neurólogos infantiles que han evaluado al paciente, pero no se han realizado mediciones a comparar con z-scores correspondientes en función de la dismorfia evidenciada. En el caso de atlas dedicados al estudio de dismorfias, se recomiendan 132 mediciones solo a nivel facial, lo que hacía muy difícil su aplicación práctica en una consulta de neuropediatría.

El hecho de incluir pacientes con TDAH supone un cierto conflicto para la indicación de pruebas genéticas, dado que para el TDAH aislado no existe ninguna recomendación de estudio genético fuera del campo de los estudios de investigación. Como se ha comentado anteriormente, en la práctica clínica diaria los diagnósticos de TND no suelen ser "compartimentos estancos", sino que con mucha frecuencia se superponen distintas comorbilidades a nivel clínico. No es infrecuente que pueda coincidir una discapacidad intelectual con un TDAH. De hecho, los síntomas disatencionales, de hipercinesia, y los datos sugestivos de una disfunción ejecutiva, son recogidos con mucha frecuencia en las consultas de neuropediatría. Esta es una realidad que creemos que no se puede obviar, y la aplicación de una escala busca el máximo de practicidad para el médico. El objetivo final sería que que éste pueda aplicarla en el día a día independientemente del diagnóstico inicial recogido.

Una de las limitaciones del estudio es la muestra, ya que se trata de un grupo de pacientes que han sido referidos a un hospital de tercer nivel desde atención primaria. Este hecho podría ser un sesgo, ya que el rendimiento de aCGH podría verse aumentado por este hecho. No obstante, la tendencia actual es que la valoración de este grupo de pacientes se realice en este tipo de centros, intentando concentrar recursos y experiencia en el manejo de este tipo de paciente, de cara una asistencia sanitaria más adecuada.

Otra limitación es el hecho de que, conforme se van realizando más estudios genéticos, la caracterización de CNVs como probablemente patológicas, patológicas, probablemente benignas y benignas se va actualizando con el tiempo, pudiendo cambiar evolutivamente. A posteriori a la elaboración de este estudio y el análisis de resultados, algunas variantes pueden cambiar su clasificación (benigna, probablemente benigna, patogénica, probablemente patogénica, variante de significado incierto…). Conforme se van haciendo más estudios de CNVs, las bases de datos aumentan de tamaño y esto ayuda a caracterizar mejor las alteraciones encontradas. De este hecho ser deriva que las alteraciones puedan cambiar su transcendencia clínica en cualquier momento. Este factor de variabilidad puede cambiar los valores de especificidad y sensibilidad obtenidos. Una solución a este sesgo sería la realización de un estudio prospectivo de pudiese validar la especificidad real de la checklist, asignando una puntuación a priori a cada paciente a través de esta checklist "provisional" y valorando posteriormente la sensibilidad y especificidad de la misma en pacientes con TNDs.

Por este motivo, creemos necesario enfatizar que para la elaboración de la lista de verificación se ha utilizado en una muestra relativamente pequeña de casos retrospectivos de pacientes con CNVs.

La expresión fenotípica de una CNV depende de varios factores que incluyen el tamaño, la ubicación y la presencia de alelos (recesivos anormales) en el homólogo restante. La sensibilidad actual se encontró utilizando 180,000 sondas de oligonucleótidos. Si se utilizan matrices de mayor resolución, la sensibilidad puede ser menor. Como ya hemos comentado el aCGH no detecta mutaciones patogénicas. El aCGH detecta variaciones de dosis génica (deleciones o duplicaciones de un determinado tamaño), pero no mutaciones. En el caso de los TNDs en particular, la detección de deleciones y las duplicaciones en regiones genéticas determinadas han demostrado su utilidad de cara al diagnóstico etiológico. Al hilo de este aspecto, es necesario incidir en el hecho de que el aCGH no identifica inversiones de translocación equilibradas o mutaciones.

Para el estudio de mutaciones, tendríamos que recurrir a estudios de secuenciación. En el momento actual, el coste de la secuenciación de regiones exónicas supone una limitación a la hora del número de pacientes que pueden ser estudiados mediante esta técnica. Es esperable que esta

circunstancia cambie en el futuro, ya que los costes de este tipo de estudio disminuyen progresivamente. Si la tendencia fuese esta (pruebas más eficientes a un menor coste), la inclusión de pacientes para ser estudiados de esta manera podría ser menos rigurosa y más laxa, pero siempre sería interesante contar con una lista de verificación para asegurar una adecuada asignación de recursos. Por tanto, una lista de verificación en el campo de la secuenciación exónica parece un paso lógico derivado del presente trabajo. Hasta entonces, será preciso la realización de una selección de pacientes candidatos para la prueba de aCGH, por lo que la lista de verificación presentada en este trabajo podría ser útil.

Los paneles de secuenciación de próxima generación (NGS) y la secuenciación de exoma completo (WES) cada vez han ganado más terreno en la identificación de alteraciones genéticas causales en pacientes con TND. El rendimiento de WES es significativo (25 a 40%) en pacientes con DI y TND[67] relacionado y se está convirtiendo en una herramienta de diagnóstico cada vez más empleada, aunque limitada por el elevado precio de los estudios, aunque la tendencia es a que cada vez puedan ser más asequibles. Aún así, con el más que posible abaratamiento progresivo de los estudios genéticos es probable que WES se convierta en la prueba genética primaria para la evaluación genética de TNDs. Parece sensato que un siguiente paso sea perfilar una nueva escala que ayude a validar la indicación de pruebas genéticas por aCGH combinada con WES.

La evaluación diagnóstica inicial de pacientes con TND debe incluir la realización de un aCGH. Además de las implicaciones pronósticas y de consejo genético, supone un cambio en el manejo en uno de cada cuatro pacientes estudiados.

En nuestra muestra no hemos apreciado cambios significativos en cuanto a modificación de las pautas de tratamiento derivados de los resultados del estudio genético, pero sí en cuanto a indicación de otras pruebas y derivación a otros especialistas.

7

Conclusiones

7 Conclusiones

1. La utilización del aCGH es una herramienta de diagnóstico genético válida para la detección de variaciones del número de copias relacionadas con la etiopatogenia de distintos TND.
2. La preselección clínica efectiva es esencial debido a las complejidades técnicas y el costo de detección de anomalías genéticas. Creemos que todos los individuos con un TND y una puntuación de 1.5 o más deben ser examinados genéticamente con aCGH.
3. Este enfoque planteado en esta tesis mejora las indicaciones clínicas para aCGH en el estudio de pacientes con trastornos del desarrollo neurológico, y puede informar la selección apropiada de pruebas de diagnóstico molecular para niños afectados por TND.
4. Es necesaria una validación externa de los resultados con un estudio prospectivo que tenga en cuenta las nuevas técnicas de diagnóstico genético, como la WES.

8

Líneas Futuras

8 Líneas Futuras

La idea de establecer criterios para seleccionar pacientes con TND para un paso de diagnóstico como el aCGH es importante y de relevancia clínica. En el contexto de WES, será aún más importante seleccionar pacientes que se beneficien inicialmente de una herramienta genética menos costosa y rápida como es el aCGH.

Sería importante estandarizar protocolos y definir criterios de calidad del análisis a partir de la escala. Quedaría por resolver la precisión diagnóstica de estas pruebas en un estudio prospectivo, para afianzar las indicaciones y comprobar la eficacia de este acercamiento investigador a través de listas de verificación. Serían necesarias colaboraciones multicéntricas, para comprar resultados, establecer bases de datos comunes que ayuden a su interpretación y tengan más potencia estadística, así como uniformizar los informes clínicos y las valoraciones médicas, y acumular información acerca de las correlaciones genotipo / fenotipo para futuras referencias.

Bibliografía

Bibliografía

1. Blanco-Lago R, Garcia-Ron A, Granizo-Martinez JJ, Ruibal JL. [Current situation of the demand for health care in neuropaediatrics. Characteristics of consultations and comparison with other paediatric specialties]. *Rev Neurol*. 2014;59(9):392-398. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342052.

2. García-Ron A, Illán-Ramos M, García-Ron G, Vieco-García A, Huete-Hernani B, Moreno-Vinues B. [Assessment of "neurophobia" or "neurological illiteracy" as cause of increased assistance in child neurology]. *Rev Neurol*. 2016;62(4):191-192. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26860725.

3. APA APA. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Vol DSM-IV-TR. American Psychiatric Association; 2000.

4. Artigas-Pallarés J, Paula-Pérez I. Unresolved issues in the DSM-5. *Rev Neurol*. 2015;60(Supl 1):S95-S101.

5. Artigas J. Do we know what a disorder is? Prospects of the DSM 5. *Rev Neurol*. 2011;52(Supl 1):559-569.

6. Artigas-Pallarés J, Guitart M, Gabau-Vila E. The genetic bases of neurodevelopmental disorders. *Rev Neurol*. 2013;56(SUPPL. 1):23-34.

7. D'Arrigo S, Gavazzi F, Alfei E, et al. The Diagnostic Yield of Array Comparative Genomic Hybridization Is High Regardless of Severity of Intellectual Disability/Developmental Delay in Children. *J Child Neurol*. 2015;31(6):0883073815613562-. doi:10.1177/0883073815613562

8. Tooby J, Cosmides L. On the Universality of Human Nature and the Uniqueness of the Individual: The Role of Genetics and Adaptation. *J Pers*. 1990. doi:10.1111/j.1467-6494.1990.tb00907.x

9. Artigas Pallarés J. ¿Sabemos qué es un trastorno? Perspectivas del DSM 5. *Rev Neurol*. 2019. doi:10.33588/rn.52s01.2010802

10. Hudziak JJ, Faraone S V. The new genetics in child psychiatry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010. doi:10.1016/j.jaac.2010.06.010

11. American Psychiatric Association. DSM-5 Development. *J Okla Dent Assoc*. 2013.

12. Aragona M. The concept of mental disorder and the DSM-V. *Dialogues Philos Ment Neuro Sci*. 2002.

13. Hyman SE. *The Diagnosis of Mental Disorders: The Problem of Reification*.; 2010. doi:10.1146/annurev.clinpsy.3.022806.091532

14. Aragona M. The role of comorbidity in the crisis of the current psychiatric classification system. *Philos Psychiatry Psychol*. 2009. doi:10.1353/ppp.0.0211

15. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004. doi:10.1038/ng1416

16. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil*. 2011. doi:10.1016/j.ridd.2010.12.018

17. Roeleveld N, Zielhuis GA. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol*. 2008. doi:10.1111/j.1469-8749.1997.tb07395.x

18. Shevell MI, Majnemer A, Morin I. Etiologic yield of cerebral palsy: A contemporary case series. *Pediatr Neurol*. 2003. doi:10.1016/S0887-8994(03)00006-7

19. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.006

20. Sugden SG, Corbett BA. Autism - Presentation, diagnosis, and management. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2006. doi:10.1212/01.CON.0000290500.58398.e4

21. Taylor B, Jick H, MacLaughlin D. Prevalence and incidence rates of autism in the UK: Time trend from 2004-2010 in children aged 8 years. *BMJ Open*. 2013. doi:10.1136/bmjopen-2013-003219

22. S. O, G.S. Y, A. C, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: A baby siblings research consortium study. *Pediatrics*. 2011. doi:peds.2010-2825 [pii]\r10.1542/peds.2010-2825

23. R. Muhle, Ste[hanie V. Trentacoste IR. The genetics of autism. *Semin Pediatr Neurol*. 2004. doi:10.1016/j.spen.2004.07.003

24. Weiss LA. Autism genetics: Emerging data from genome-wide copynumber and single nucleotide polymorphism scans. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009. doi:10.1586/erm.09.59

25. Hogart A, La Salle JM. Epigenetic dysregulation of 15q11-13 GABAA receptor genes in autism. In: *The Neurochemical Basis of Autism: From Molecules to Minicolumns*. ; 2010. doi:10.1007/978-1-4419-1272-5_8

26. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders : DSM-5*. *American Psychiatric Association*.; 2014. doi:10.1176/appi.books.9780890425596.744053

27. Lo-Castro A, D'Agati E, Curatolo P. ADHD and genetic syndromes. *Brain Dev*. 2011. doi:10.1016/j.braindev.2010.05.011

28. Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2011;77(17):1629-1635. doi:10.1212/WNL.0b013e3182345896

29. Sherr EH, Michelson DJ, Shevell MI, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Neurodevelopmental disorders and genetic testing: current approaches and future advances. *Ann Neurol*. 2013;74(2):164-170. doi:10.1002/ana.23950

30. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86(5):749-764. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.006

31. Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet*. 1969.

32. Lowther C, Costain G, Baribeau DA, Bassett AS. Genomic Disorders in Psychiatry—What Does the Clinician Need to Know? *Curr Psychiatry Rep*. 2017. doi:10.1007/s11920-017-0831-5

33. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science (80-)*. 1998. doi:10.1126/science.280.5366.1077

34. The International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007. doi:10.1038/nature06258

35. Kitts A, Sherry S. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. *NCBI Handb*. 2011.

36. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001. doi:10.1038/35057149

37. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science (80-)*. 2004. doi:10.1126/science.1098918

38. Boyko AR, Williamson SH, Indap AR, et al. Assessing the evolutionary impact of amino acid mutations in the human genome. *PLoS Genet*. 2008. doi:10.1371/journal.pgen.1000083

39. Stone EA, Sidow A. Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Res*. 2005. doi:10.1101/gr.3804205

40. Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med*. 2012. doi:10.1056/NEJMra1114194

41. Abdelmoity AT, Lepichon JB, Nyp SS, Soden SE, Daniel CA, Yu S. 15q11.2 proximal imbalances associated with a diverse array of neuropsychiatric disorders and mild dysmorphic features. *J Dev Behav Pediatr*. 2012. doi:10.1097/DBP.0b013e31826052ae

42. Strutevant A. The linear arrangement of six sex-linked factors inDrosophila as shown by their mode of association. *Z Indukt Abstamm Vererbungsl*. 1913. doi:10.1007/bf01943452

43. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest*. 2008. doi:10.1172/JCI34772

44. Hurd PJ, Nelson CJ. Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Briefings Funct Genomics Proteomics*. 2009. doi:10.1093/bfgp/elp013

45. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*. 2010. doi:10.1038/ng.646

46. Pérez AV, Rousselet MAA. Retraso psicomotor. *Neurol Supl*. 2008.

47. McClarren J, Donnenfeld AE, Ravnan JB. Prenatal diagnosis of an unexpected interstitial 22q11.2 deletion causing truncus arteriosus and thymic hypoplasia in a ring 22 chromosome derived from a maternally inherited paracentric inversion. *Prenat Diagn*. 2006. doi:10.1002/pd.1590

48. Itsara A, Cooper GM, Baker C, et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet*. 2008. doi:10.1016/j.ajhg.2008.12.014

49. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (80-)*. 1992. doi:10.1126/science.1359641

50. Aerts S, Lambrechts D, Maity S, et al. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol*. 2006. doi:10.1038/nbt1203

51. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: Revision 2013. *Genet Med*. 2013. doi:10.1038/gim.2013.129

52. Sagoo GS, Little J, Higgins JPT. Systematic reviews of genetic association studies. Human Genome Epidemiology Network. *PLoS Med*. 2009. doi:10.1371/journal.pmed.1000028

53. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*. 2011;43(9):838-846. doi:10.1038/ng.909

54. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(3):182-192. doi:10.1016/j.gde.2007.04.009

55. Bernardini L, Alesi V, Loddo S, et al. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *Eur J Hum Genet*. 2010;18(2):178-185. doi:10.1038/ejhg.2009.154

56. de Vries BB, White SM, Knight SJ, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet*. 2001;38(3):145-150. doi:10.1136/jmg.38.3.145

57. de Vries BBA, Pfundt R, Leisink M, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2005;77(4):606-616. doi:10.1086/491719

58. Coutton C, Dieterich K, Satre V, et al. Array-CGH in children with mild intellectual disability: a population-based study. *Eur J Pediatr*. 2015;174(1):75-83. doi:10.1007/s00431-014-2367-6

59. O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, et al. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet*. 2011;43(6):585-589. doi:10.1038/ng.835

60. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res*. 2011;1380:42-77. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.078

61. Lionel AC, Crosbie J, Barbosa N, et al. Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Sci Transl Med*. 2011;3(95):95ra75. doi:10.1126/scitranslmed.3002464

62. Williams NM, Zaharieva I, Martin A, et al. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9750):1401-1408. doi:10.1016/S0140-6736(10)61109-9

63. Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, et al. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet*. 2010;6(5):e1000962. doi:10.1371/journal.pgen.1000962

64. Tammimies K, Marshall CR, Walker S, et al. Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA*. 2015;314(9):895-903. doi:10.1001/jama.2015.10078

65. Riggs ER, Wain KE, Riethmaier D, et al. Chromosomal microarray impacts clinical management. *Clin Genet*. 2014;85(2):147-153. doi:10.1111/cge.12107

66. Wechsler D. *Wechsler Intelligence Scale for Children*.; 1976.

67. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012;367(20):1921-1929. doi:10.1056/NEJMoa1206524

Anexos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexos

Se muestra en este capítulo de anexos los siguientes documentos empleados en la realización de esta tesis doctoral:

ANEXOS.....105
Tabla variaciones del número de copia encontradas (CNVs).....107
Modelo de consentimiento informado.....115
Autorización de empleo de imágenes externas.....117
Autorización CEIC.....118
Adenda CEIC.....119
Trabajos fin de grado / fin de máster tutorizados por el autor de la presente tesis y que han servido de base para el establecimiento de hipótesis de trabajo:.....120
Título del trabajo fin de grado: Condicionantes genéticos y ambientales de Trastornos de Neurodesarrollo en el área sanitaria de Pontevedra.....120
Título del trabajo fin de grado: Desarrollo de una escala de predicción clínica para valorar la indicación de tests genéticos en pacientes con trastornos del neurodesarrollo:.....120
Título del trabajo fin de máster: Técnica array CGH. Aplicación clínica en trastornos neurológicos y anomalías congénitas.....121
Comunicaciones de resultados iniciales / parciales de la tesis y publicaciones realizadas previo a su propuesta a la Comisión:.....122
Abstract Congreso SENEP 2017 (Madrid).....122
Abstract EPNS 2018 (Lyon).....123
Presentación SENEP 2017 (Madrid).....124
Poster EPNS 2018 (Lyon).....125
Abstracts SENEP 2019 (Oviedo).....126
Abstract EPNS 2019 (Atenas).....127
Poster SENEP 2019 (Oviedo).....128
Libro escrito por el autor:.....129
Artículo Neuropediatrics:.....129

TABLA VARIACIONES DEL NÚMERO DE COPIA ENCONTRADAS (CNVS)

PC: Probablemente causal, PB: probablemente benigna, SI: Significado incierto, mat: materna, pat: paterna, dn:desconocida. ISCN: Sistema internacional para nomenclatura de citogenética humana *(Internacional System for Human Cytogenetics Nomenclatura)*

CLASIFICACIÓN	HERENCIA	ISCN
PC	mat	arr[hg19] 6q22.31(123,518,451-124,327,675)x3 mat
PB	pat	arr[hg19] 15q26.3(102,358,040-102,505,743)x1 pat
PC	mat	arr[hg19] 15q13.2q13.3(31,140,606-32,438,944)x1 mat
PC	dn	arr[hg19] 16p11.2(29,664,618-30,192,347)x3 dn
PC	dn	arr[hg19] 16p11.2(28,833,437-29,046,252)x1 dn
PC	dn	arr[hg19] Xp22.31(6,456,777-8,119,329)x3,12p13.31(8,059,896-8,105,244)x3
SI	dn	arr[hg19] 11p15.2(14,515,447-14,696,597)x1
PB	mat	arr[hg19] 20p13(875,240-1,292,457)x3 mat
PC	dn	arr[hg19] 5q14.3q15(88,326,705-96,472,839)x1
SI	dn	arr[hg19] 5q22.1q22.2(111,450,863-111,831,481)x3
PC	dn	arr[hg19] 20p13(71,023-1,048,400)x1 dn
PC	dn	arr[hg19] 7q11.23(72,745,047-74,138,460)x1

PC	dn	arr[hg19] Xp11.4(41,623,672-41,877,684)x1 dn
SI	mat	arr[hg19] 1q23.1(158,507,238-158,885,030)x1 mat
PC	dn	arr[hg19] 3p12.3p12.2(79,537,856-80,228,570)x1
SI	dn	arr[hg19] 5p13.1(40,887,652 41,560,823)x3,12q21.31q21.32(85,383,771-86,837,754)x1
PB	mat	arr[hg19] 13q12.11(20,804,067-21,032,171)x1
PC	dn	arr[hg19] 2p24.1(19,840,007-20,296,113)x1,16p11.2(29,664,618-30,176,568)x1
PC	mat	arr[hg19] Xp11.22(50,404,581-50,659,485)x2 mat
PB	pat	arr[hg19] 6q25.2q25.3(155,318,584-155,791,331)x3 pat
PB	pat	arr[hg19] 18q22.1(64,426,279-64,829,633)x1 pat
PC	dn	arr[hg19] Xp22.33(296,520-533,341)x3 mat,9q33.1(119,441,426-119,721,232)x
PC	mat	arr[hg19] 8q22.2(100,109,821-100,554,501)x1 mat
PB	pat	arr[hg19] 10q22.3(81,685,369-81,967,860)x1 pat
PB	pat	arr[hg19] 5q31.2(136,539,976-136,701,414)x1 pat
PB	mat	arr[hg19] 1q44(245,948,623-246,640,347)x1 mat

PB	mat	arr[hg19] 11p13(33,068,986-33,565,745)x3 mat
PB	pat	arr[hg19] 11q14.1(79,534,785-82,067,092)x1 pat
SI	mat	arr[hg19] 1q23.1(158,520,6 94-158,885,030)x1mat,6p25.3(1,884,857-2,071,471)x1 mat
PC	dn	arr[hg19] 9q34.11(131,230,446-131,756,557)x1
PC	dn	arr[hg19] 16p11.2(29,664,618-30,188,269)x1 dn
PB	dn	arr[hg19] 2q14.3(123,554,011-123,948,716)x1
PC	dn	arr[hg19] 13q14.11q21.1(44,120,870-55,917,274)x1 dn
PC	pat	arr[hg19] 16p11.2(29,657,192-30,192,347)x3 pat
PC	dn	arr[hg19] 17q21.31(43,713,616-44,151,667)x1 dn
PC	dn	arr[hg19] 7q11.23(73,313,852-74,138,460)x1
SI	mat	arr[hg19] 14q13.3q21.1(37,732,663-38,087,957)x1 mat
PC	dn	arr[hg19] Xp22.33(404,219-1,203,380)x1
PC	mat	arr[hg19] Xq28/Yq12(154,933,719-155,221,913)x1 dn,15q13.2q13.3(31,140,606-32,438,944)x3 mat
PC	dn	arr[hg19] 1q21.1q21.2(146,531,538-147,726,542)x3 dn

SI	pat	arr[hg19] 5q14.3(83,027,696-85,425,359)x1 pat
PB	mat	arr[hg19] 4q12q13.1(58,574,861-59,554,295)x3
PC	dn	arr[hg19]12p12.1(24,099,480-24,494,670)x1 dn
PC	dn	arr[hg19] Xq11.2(63,397,989-63,552,763)x1 dn
PC	pat	arr[hg19] Xq13.1(70,242,046-70,654,411)x2 dn,15q11.2(22,835,886-23,085,219)x3 pat
PB	mat	arr[hg19] Yq12(28,802,327-59,328,296)x2 mat
PC	mat	arr[hg19] 16p12.2(21,578,513-21,739,542)x1
PC	dn	arr[hg19] 11p11.2(47,154,868-47,566,131)x1 dn
PB	pat	arr[hg19] 5q12.1(61,806,316-62,150,652)x3 pat
PC	mat	arr[hg19] 15q13.2q13.3(31,140,606-32,438,944)x1 mat
PC	pat	arr[hg19] 15q14(36,665,445-39,501,040)x3 pat
PC	mat	arr[hg19] Xp11.22(50,404,581-50,659,485)x3 mat
PB	dn	arr[hg19] Yq11.221(15,704,763-15,938,864)x2
PC	mat	arr[hg19] 6q26(162,519,220-163,126,751)x3 mat
PC	dn	arr[hg19] 9p24.3p23(209,020-14,194,256)x1 dn

PC	dn	arr[hg19] 17q12(34,816,424-36,207,540)x1 dn
PB	dn	arr[hg19]12q24.32(127,057,919-127,327,557)x3
PC	mat	arr[hg19] 15q11.2(22,822,019-23,085,219)x1 mat
PC	mat	arr[hg19] Xq23(111,773,261-112,667,937)x2 mat
SI	dn	arr[hg19] Xq28/Yq12(154,934,638-155,228,049)x3
PC	mat	arr[hg19] 2q13(110,862,369-110,978,000)x3 mat
SI	mat	arr[hg19] 5q22.1q22.2(111,423,577-111,831,481)x3,7q31.32q32.1(123,627,320-127,363,290)x3 mat
PC	dn	arr[hg19] 22q11.21(18,981,417-21,460,595)x3 dn
PB	pat	arr[hg19] 4q35.2(188,462,419-189,949,006)x3 pat
SI	mat	arr[hg19] 9p22.3p22.2(15,753,135-16,626,508)x3 mat
SI	mat	arr[hg19]19q13.42q13.43(55,383,911-56,441,353)x3 mat
PC	dn	arr[hg19] 1p36.13p36.12(19,220,577-21,686,693)x3 dn
PB	pat	arr[hg19] 6p11.2q11.1(57,512,669-62,889,664)x3 pat
PC	mat	arr[hg19] 6q24.2q25.2(145,511,177-154,393,280)x3 dn
PC	dn	arr[hg19] 17p13.2(4,727,289-5,090,840)x1 dn

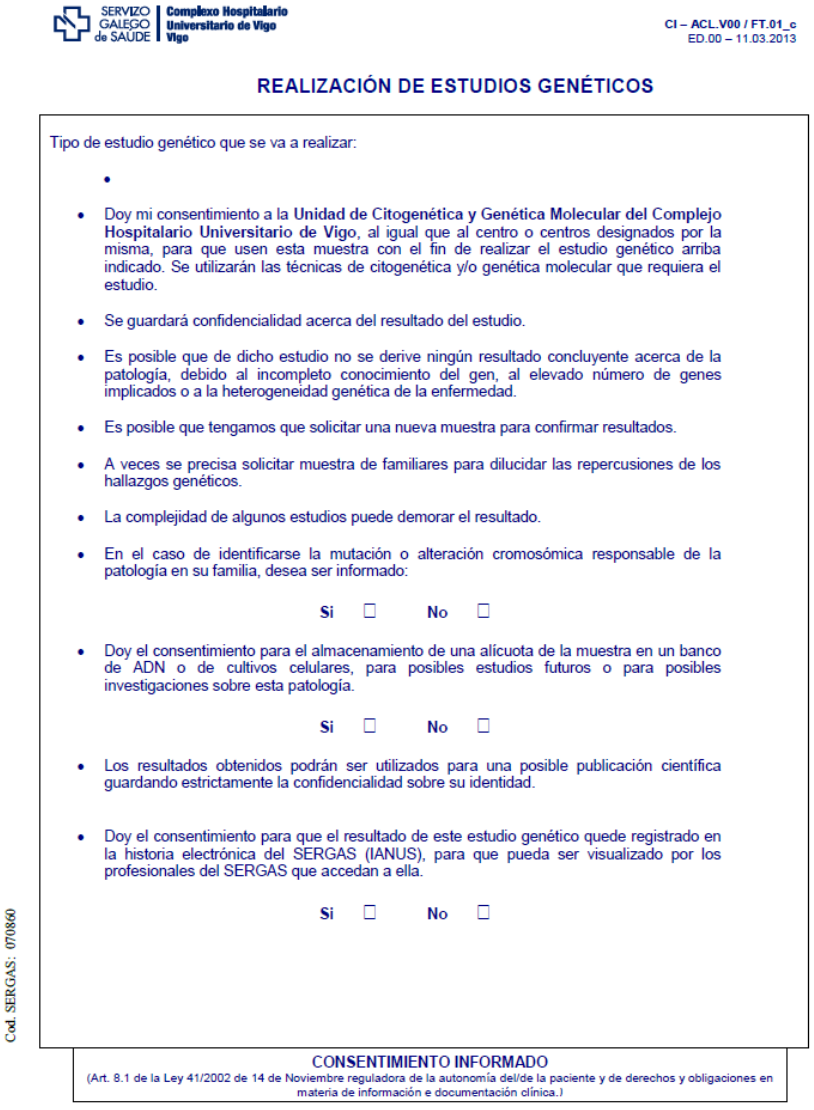
PC	pat	arr[hg19] Xp22.31(6,456,777-8,119,329)x3 pat
PC	mat	arr[hg19] 22q11.21(18,919,528-21,460,595)x1 mat
PC	dn	arr[hg19] Xp22.33q28(1-155,270,560)x3
PC	mat	arr[hg19] 2q24.3(164,234,398-165,041,977)x1 mat
PC	mat	arr[hg19] 15q11.2(22,822,019-23,085,219)x3 mat
PC	dn	arr[hg19] 13q33.1(102,521,058-102,945,326)x1
PC	pat	arr[hg19] 15q12q13.1(26,238,136-28,100,246)x1 pat
PC	dn	arr[hg19] 16p11.2(29,664,618-30,192,347)x1 dn
PC	dn	arr[hg19] 17p11.2(16,814,853-20,217,778)x3 dn
PC	dn	arr[hg19] 22q11.21(18,919,528-21,417,549)x1
PC	pat	arr[hg19] 2q13(110,862,369-110,978,000)x3 pat
PC	mat	arr[hg19] Xp22.31(6,456,777-8,119,329)x0 mat
PC	mat	arr[hg19] 1q21.1(145,388,977-145,746,493)x1 mat
PC	dn	arr[hg19] 19p13.3(1,206,799-1,223,167)x1 dn

PC	dn	arr[hg19] 22q11.21(18,919,528-21,417,549)x3 dn
PC	mat	arr[hg19] Xq22.2(102,734,405-103,256,266)x2mat
PC	dn	arr[hg19] 1p36.33p36.22(835,601-10,292,291)x1 dn
PC	dn	arr[hg19]22q11.21q11.23(21,798,705-24,258,233)x3 dn
PC	dn	arr[hg19] 16p11.2(29,664,618-30,188,269)x1 dn
PC	desc	arr[hg19] 15q11.2(22,822,019-23,085,219)x1 mat
PC	mat	arr[hg19] 15q13.2q13.3(31,140,606-32,438,944)x1 mat
PC	mat	arr[hg19] 22q11.21(18,919,528-21,349,219)x3 mat
PC	mat	arr[hg19] 15q11.2(22,822,019-23,085,219)x1 mat
PC	mat	arr[hg19] 2q13(110,862,369-110,978,000)x3 mat
PC	dn	arr[hg19] 14q21.3(47,114,303-47,443,679)x3 dn
PC	mat	arr[hg19] 15q11.2(22,822,019-23,085,219)x1 mat
PC	pat	arr[hg19] Yq11.221(16,714,151-18,940,450)x0 pat
PC	dn	arr[hg19] 2p12p11.2(75,897,571-89,054,061)x1 dn
PC	pat	arr[hg19] 16p11.2(29,657,192-30,188,269)x3 pat

PC	pat	arr[hg19] 15q11.2(22,822,019-23,085,219)x1 pat
PC	mat	arr[hg19] 9q34.3(140,788,788-141,005,514)x3 mat
PC	pat	arr[hg19] 20p12.1(14,989,224-15,169,247)x1 pat
PC	desc	arr[hg19] 16p12.2(21,571,710-21,758,666)x3
PB	pat	arr[hg19] 13q31.3(90,617,250-91,860,937)x3 pat
PC	pat	arr[hg19] Xp22.31(6,456,777-8,119,329)x3 pat
SI	dn	arr[hg19] Xp22.33(2,435,189-2,869,431)x2 dn

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Complexo Hospitalario Universitario de Vigo Vigo

CI – ACL.V00 / FT.01_c
ED.00 – 11.03.2013

REALIZACIÓN DE ESTUDIOS GENÉTICOS

Tipo de estudio genético que se va a realizar:

•

- Doy mi consentimiento a la **Unidad de Citogenética y Genética Molecular del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo**, al igual que al centro o centros designados por la misma, para que usen esta muestra con el fin de realizar el estudio genético arriba indicado. Se utilizarán las técnicas de citogenética y/o genética molecular que requiera el estudio.
- Se guardará confidencialidad acerca del resultado del estudio.
- Es posible que de dicho estudio no se derive ningún resultado concluyente acerca de la patología, debido al incompleto conocimiento del gen, al elevado número de genes implicados o a la heterogeneidad genética de la enfermedad.
- Es posible que tengamos que solicitar una nueva muestra para confirmar resultados.
- A veces se precisa solicitar muestra de familiares para dilucidar las repercusiones de los hallazgos genéticos.
- La complejidad de algunos estudios puede demorar el resultado.
- En el caso de identificarse la mutación o alteración cromosómica responsable de la patología en su familia, desea ser informado:

Si ☐ **No** ☐

- Doy el consentimiento para el almacenamiento de una alícuota de la muestra en un banco de ADN o de cultivos celulares, para posibles estudios futuros o para posibles investigaciones sobre esta patología.

Si ☐ **No** ☐

- Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica guardando estrictamente la confidencialidad sobre su identidad.
- Doy el consentimiento para que el resultado de este estudio genético quede registrado en la historia electrónica del SERGAS (IANUS), para que pueda ser visualizado por los profesionales del SERGAS que accedan a ella.

Si ☐ **No** ☐

Cod. SERGAS: 070860

CONSENTIMIENTO INFORMADO
(Art. 8.1 de la Ley 41/2002 de 14 de Noviembre reguladora de la autonomía del/de la paciente y de derechos y obligaciones en materia de información e documentación clínica.)

RELLENESE LO QUE PROCEDA

D/Dª _____,

Mayor de edad, con domicilio en _____, calle _____nº y con DNI nº _____ , en representación propia o de

D/Dª. _____

ATENDIDO/A en el Complexo Hospitalario de Vigo a cargo del servicio de....., por concurrir la condición de _____

(familiar o representante legal o persona autorizada por el paciente).

ETIQUETA DEL / DE LA PACIENTE

Por medio del presente escrito **M A N I F I E S T O**

PRIMERO. Que me ha sido explicado en un lenguaje comprensible y de forma detallada por el Dr. D/Dª. _____ la enfermedad que padezco, así como las alternativas terapéuticas y pruebas diagnósticas más probables y frecuentes que, ante la misma, se pueden aplicar y que se describen en el anverso de este documento.

SEGUNDO. Que, también, me han sido explicados y he entendido, los beneficios, los riesgos, complicaciones y secuelas más frecuentes y probables que tal actuación médica conlleva y que, como consecuencia lógica, puedan producirse a lo largo del proceso de mi enfermedad, que asumo en su totalidad, **estando relacionados en el anverso** que forma parte de este documento.

TERCERO. Consiento libremente a los/as facultativos/as del Servicio _____ para que ante las posibles y diferentes acciones terapéuticas, pruebas diagnósticas e intervenciones quirúrgicas planteadas, y tras haber entendido correctamente las diferentes actuaciones médicas que se puedan realizar, practiquen el acto médico. _____Soy conocedor/a de que en caso de urgencia o por causas imprevistas podrán realizarse las actuaciones diagnóstico/terapéuticas necesarias para mantenerme con vida o evitarme daño.

CUARTO. Que he sido informado/a que puedo ampliar información sobre el acto médico que me van a hacer, previamente a su realización.

QUINTO. Sé que la presente autorización de acto médico puede ser revocada en cualquier momento del tratamiento, debiendo ser tal revocación de forma fehaciente al equipo médico actuante.

SEXTO. Que consiento, en caso de que me sea extirpado tejido, que aquel que no sea necesario para el correcto diagnóstico de mi enfermedad, podrá ser utilizado en proyectos de investigación. En este caso la muestra será tratada conforme a la legislación vigente.

Y para que así conste, a los efectos antes descritos, firmo el presente documento en Vigo a _____ de _____ de 20_____

Fdo.D/Dª: _____
(paciente o representante legal)

Fdo.: Dr. D/Dª. _____
Nº Colegiado/a_____

Fdo.:Dr. D/Dª. _____
Nº Colegiado/a _____
(solo si el paciente requiere más información del facultativo/a realizador de la prueba)

Nota: Firme este documento sólo en el caso de entender lo que en el mismo se describe.

*He decidido **REVOCAR** mi consentimiento respecto a la realización del procedimiento referido.Vigo a de de 2.....*

Fdo.D/Dª. (paciente o representante legal)

Fdo.: Dr. D/Dª Nº Colegiado/a

D/Dª testigo/a

AUTORIZACIÓN DE EMPLEO DE IMÁGENES EXTERNAS

Consentimiento para obtener Fotografías al Menor de Edad

En Vigo, a.....

D....., mayor de edad, representante legal del/la enfermo/a.....

(menor de edad), ingresad@ en este Hospital, con domicilio en.....

....., provisto de D.N.I. nº .....

Que, por las circunstancias del proceso que padece mi representad@, se ha propuesto la obtención de su imagen para con **fines asistenciales, docentes y de investigación**

Que conozco y se me ha informado del derecho que asiste a tod@ enferm@ de la confidencialidad de toda la información relacionada con su proceso y con su estancia en el Hospital, reconocido en la Ley General de Sanidad (artículo 10,3, Ley 14/1986, de 25 de Abril) y Ley Básica de Autonomía del Paciente y de Información y Documentación Clínica (Caps. 1 y 3 Ley 41/2002 de 14 de Noviembre).

Que se me han facilitado todas las explicaciones necesarias, y resuelto todas las dudas planteadas.

Que en todo caso, se procurará que, mediante las herramientas tecnológicas disponibles, no se sea posible en ningún momento la identificación del paciente.

OTORGO EXPRESAMENTE el consentimiento para la obtención y difusión de la imagen de mi hijo y/o representad@ con fines científicos

Conozco que, en cualquier momento y sin necesidad de ninguna explicación, puedo revocar la autorización que ahora presto.

Firmado (nombre y rúbrica)

SERVICIO DE PEDIATRIA DE VIGO

AUTORIZACIÓN CEIC

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral

Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia
Edificio Administrativo de San Lázaro
15781 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tlf: 881 546425 Fax: 881 541804
ceic@sergas.es

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALICIA

Dña. Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 15/02/2011 el estudio:

Título: Retraso mental asociado a anomalías cromosómicas. Estudo mediante MLPA
Promotor: Alfonso Amado Fuentes
Version:
Código do Promotor:
Código de Registro CEIC de Galicia: 2011/005

Y que este Comité de conformidad con sus Procedimientos Normalizados de Trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, emite un **DICTAMEN FAVORABLE** al estudio propuesto y que se llevará a cabo en:

Centros	Investigadores principales
C.H. de Vigo	Alfonso Amado Fuentes

En Santiago de Compostela a 17 de febrero de 2011
La Secretaria,

Paula M. López Vázquez

ADENDA CEIC

En relación con el estudio de investigación "Retraso mental asociado a anomalías cromosómicas. Estudio mediante MLPA" con Código de Registro del CEIC de Galicia número 2011/005, autorizado con fecha 17 de Febrero de 2011, se realiza la siguiente adenda:

- La técnica de estudio genético inicial (MLPA) se modificó por la técnica de Array-CGH (aCGH), por motivos logísticos y por ser esta más sensible que la previa.
- El proyecto inicial preveía la inclusión de 100 pacientes. Progresivamente hemos incorporado esta técnica a nuestra actividad clínica habitual, por lo que en el momento actual se ha realizado a casi 400 pacientes.
- El proyecto inicial incluía a pacientes con Dispacacidad Intelectual, hemos ampliado el espectro de selección de los casos a todos los pacientes con Trastornos del Neurodesarrollo en los que se sospecha una base genética.

En base al elevado número de pacientes incluidos, en el momento actual hemos planteado la realización de un estudio casos-controles para valorar el impacto que los condicionantes ambientales pueden jugar en el desarrollo de este tipo de trastornos.

Para ellos solicitamos al CEIC la ampliación de la recogida de datos (nuevas variables recogidas en el nuevo protocolo de investigación adjunto), así como la recogida de esos datos en pacientes sin trastornos del neurodesarrollo (controles) procedentes de consultas de Atención Primaria.

Documentación adjunta:

- Protocolo de investigación: "Condicionantes genéticos y ambientales de Trastornos del Neurodesarrollo"
- Consentimiento informado para la realización de estudio mediante Array-CGH, elaborado conjuntamente con el Servicio de Análisis Clínicos (Unidad de Citogenética).
- Compromiso del IP

En Vigo a 24 de Junio de 2015
Alfonso Amado Puentes
Investigador Principal.



TRABAJOS FIN DE GRADO / FIN DE MÁSTER TUTORIZADOS POR EL AUTOR DE LA PRESENTE TESIS Y QUE HAN SERVIDO DE BASE PARA EL ESTABLECIMIENTO DE HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Título del trabajo fin de grado: Condicionantes genéticos y ambientales de Trastornos de Neurodesarrollo en el área sanitaria de Pontevedra.

Curso académico: 2015-2016

Autoras:
Patrícia Bastos Viana,
Mafalda Isabel da Fonseca Marinho Vaz Soares,
Ana Isabel Freitas Amorim,
Eduarda Maria Marinho Pinto,

Tutor: José Ramón Fernández Lorenzo
Co-tutores: Alfonso Amado Puentes y Aida del Campo García
Centro de realización: Complejo Hospitalario Universitario de Vigo
Línea de investigación: Metodología de la investigación durante el desarrollo humano.

Título del trabajo fin de grado: Desarrollo de una escala de predicción clínica para valorar la indicación de tests genéticos en pacientes con trastornos del neurodesarrollo:

Curso académico: 2017/2018

Autor: Diego Fernández González
Tutor: José Ramón Fernández Lorenzo
Cotutor: Alfonso Amado Puentes
Centro de realización: Complejo Hospitalario Universitario de Vigo
Línea de investigación: Metodología de la investigación durante el desarrollo humano.

Título del trabajo fin de máster: Técnica array CGH. Aplicación clínica en trastornos neurológicos y anomalías congénitas.

Curso académico: 2013-2014

Autora: Aida del Campo García DNI: 53195016H
Director: José Ramón Fernández Lorenzo.
Tutores: Alfonso Amado Puentes. Alfredo Reparaz Andrade.
Centro de realización: Complejo Hospitalario Universitario de Vigo
Línea de investigación: Metodología de la investigación durante el desarrollo humano.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

COMUNICACIONES DE RESULTADOS INICIALES / PARCIALES DE LA TESIS Y PUBLICACIONES REALIZADAS PREVIO A SU PROPUESTA A LA COMISIÓN:

Abstract Congreso SENEP 2017 (Madrid)

Sesión: Comunicaciones Orales 2.3

Código presentación: O-110

Tema: TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO 2

Desarrollo de una escala de predicción clínica para valorar la indicación de tests genéticos en pacientes con trastornos del neurodesarrollo.

A. Amado, A. Reparaz, A. Del Campo, M.O. Blanco, C. Melcón, C. Torreira, V. Del Campo, J.R. Fernández

Hospital Alvaro Cunqueiro

Texto

Objetivos: Analizar las características de los pacientes y los factores relacionados con el resultado de la técnica Array-CGH (aCGH) para desarrollar una checklist que pueda mejorar la rentabilidad diagnóstica.

Métodos: Estudio descriptivo de una cohorte de 576 pacientes (estudiados con aCGH) y un estudio analítico transversal, comparando el genotipo y el fenotipo de los casos (la presencia de malformaciones, discapacidad intelectual (DI) y/o trastorno del espectro autista (TEA).

Resultados: Del total de 576 pacientes en 110 se halló una CNV (rentabilidad diagnóstica: 13,7% (IC95: 10,9-16,5). Se asocia con la detección de CNV patógenas la presencia de alteraciones del perímetro craneal (p 0.05), la talla <p3 (p 0.035), peso <p3 (p 0.029), la presencia de malformaciones cerebrales (p 0.016), oftalmológicas (p 0.005) y la presencia de 2 o más malformaciones en un mismo paciente (p 0.02).

Items	Score
Alteración del perímetro craneal	1
Talla <p3	1
Peso <p3	1
Malf. SNC	1
Malf. oftalmológicas	1
TEA	2
1 dismorfia	1
2 o más dismorfias	2

Con un score de 3 o mayor se encuentra una mayor probabilidad de la presencia de una CNV patógena de forma estadisticamente significativa (p 0.003), con una especificidad de 43% y una sensibilidad del 74%.

Conclusiones:

- Sería recomendable realizar un estudio de aCGH en los pacientes con una puntuación igual o mayor a 3 de este score.
- Este análisis mejoraría las indicaciones clínicas del aCGH en el estudio de pacientes con trastornos del neurodesarrollo.

Abstract EPNS 2018 (Lyon).

P1-98

Neurodevelopment disorders and Array-CGH: Sensitivity and specificity using a checklist as criteria for performing a genetic test

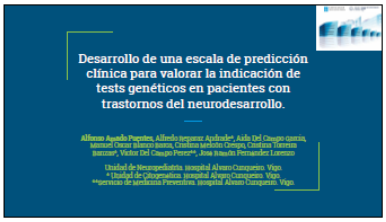
Alfonso Amado Puentes, Alfredo Reparaz Andrade, Aida del Campo García, Manuel Oscar Blanco Barca, Cristina Torreira Banzas, Victor del Campo Pérez, José Ramón Fernández Lorenzo. *Department of Pediatrics, Child Neurology Unit, Alvaro Cunqueiro Hospital, Vigo, Spain*

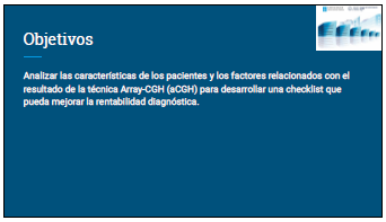
Objective: Identify the most significant clinical variables associated with a positive outcome of microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) analyses in order to develop a simple clinical score. **Methods:** Descriptive study of a cohort of 576 patients (studied with aCGH) and a cross- sectional analytical study, comparing the genotype and phenotype of the cases (the presence of malformations, intellectual disability (ID) and / or autistic spectrum disorder (ASD). **Results:** aCGH identified structural chromosomal alterations responsible for the intellectual disability/developmental delay phenotype in 13,7% (CI95: 10,9−16,5) of our sample. Based on the most frequent phenotypic characteristics among patients with a pathogenic CNV, we have created a checklist with the following items: alteration of the cranial perimeter, size <=" disorders.=" neurodevelopmental=" with=" patients=" of=" study=" the=" in=" acgh=" for=" indications=" clinical=" improve=" can=" approach=" this=" -=" higher.=" or=" 3=" score=" a=" individuals=" on=" conduct=" to=" need=" emphasize=" want=" we=" anomalies.=" genetic=" screening=" cost=" and=" complexities=" technical=" because=" essential=" is=" preselection=" effective=" 74%.=" sensitivity=" 497)=" (214=" 43%=" specificity=" assuming=" 0.003),-=" (p=" way=" significant=" statistically=" cnv=" pathogenic=" finding=" probability=" greater=" there=" higher,=" points=" 2=" dysmorphia=" more=" point=" 1=" asd=" malformations=" ophthalmic=" brain=" presence="

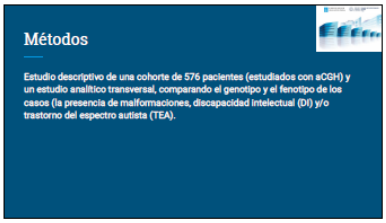
http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.04.916

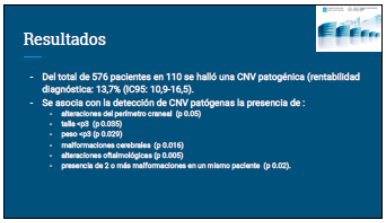
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

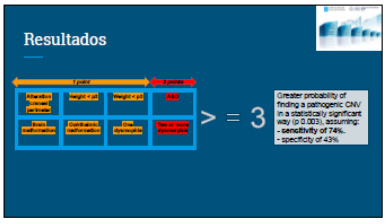
Presentación SENEP 2017 (Madrid)

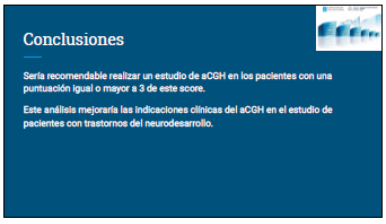












Poster EPNS 2018 (Lyon)

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Xerencia de Xestión Integrada de Vigo Vigo

Neurodevelopment disorders and Array-CGH: sensitivity and specificity using a checklist as criteria for performing a genetic test.

A Amado, A Reparaz*, A Del Campo, MO Blanco, C Melcón, C Torreira*, V Del Campo**, JR Fernández
Department of Pediatrics, Child Neurology Unit. Alvaro Cunqueiro Hospital. Vigo.
* Department of Clinical Analysis, Cytogenetics Unit, Alvaro Cunqueiro Hospital. Vigo.
** Department of Preventive Medicine and Public Health. Alvaro Cunqueiro Hospital. Vigo.

Objectives

To identify the most significant clinical variables associated with a positive outcome of aCGH analyses to develop a **simple clinical score**.

Methods

Descriptive study of a cohort of 576 patients (studied with aCGH) and **cross-sectional analytical study**, comparing the genotype and phenotype of the cases (the presence of malformations, intellectual disability (ID) and / or autistic spectrum disorder (ASD).

Results

Items	Score
Alteration of the craneal perimeter	1
Height <p3	1
Weight <p3	1
brain malformation	1
Ophthalmic malformation	1
ASD	2
1 dysmorphia	1
2 or more dysmorphia	2

score ≥ 3

Greater probability of finding a pathogenic CNV in a statistically significant way (p 0.003), assuming:
- sensitivity of 74%.
- specificity of 43%

Conclusions

- **Effective clinical preselection** is essential because of technical complexities and cost of screening for genetic anomalies.
- We want to emphasize the need to **conduct a aCGH on individuals with a score ≥ 3**
- This approach can **improve clinical indications for aCGH** in the study of patients with neurodevelopmental disorders.

Abstracts SENEP 2019 (Oviedo)

P-052
NUEVA MUTACIÓN EN GEN *KCNA1* EN FAMILIA CON ATAXIA, EPILEPSIA Y MIOQUÍMIA

Chacón Pascual, Almudena; Darling, Alejandra; Alonso-Colmenero, Itziar; Sans, Óscar; López-Sala, Anna; Yubero, Dèlia; Amstrong, Judith; García-Cazorla, Àngels; O´callaghan, Mar.

Hospital Sant Joan de Deu, Esplugues de Llobregat, España.

Introducción: El gen *KCNA1* (OMIM*176260) codifica una subunidad del canal de potasio. Mutaciones en dicho gen se relacionan con síndrome de ataxia episódica tipo 1 familiar en ocasiones asociados a mioquimia con un patrón de herencia autosómico dominante. Menos frecuentemente asocia epilepsia parcial o discinesia paroxística cinesigénica familiar.

Caso clínico: Niña, 10 años, desde los 15 meses presenta episodios sugestivos de vértigo y crisis de probable origen focal: desconexión del medio con temblor fino generalizado precedidos de sensación de mareo, desorientación posterior e inestabilidad, en ocasiones disartria. Espontáneos o desencadenados por situaciones de estrés.

Antecedentes familiares: Padre y abuelo paterno diagnosticados de "Petit Mal" en la infancia y episodios de ataxia y disartria, exacerbados con alcohol, asociados a mioquimia en manos. Dos primos del padre con epilepsia y discapacidad intelectual no filiada.

Estudio metabólico, LCR y RM sin alteraciones. EEG en sueño a los 2 años: anomalías epileptiformes multifocales de predominio en hemisferio derecho. Recibió tratamiento con VPA con persistencia de episodios. Mejoría clínica tras inicio de CBZ, sin remisión completa. Estudio genético de secuenciación masiva: variante c.938A>Cen heterocigosis en *KCNA1* (NM_000217.2), no descrita previamente. Estudio de segregación: padre y abuelo paterno portadores de la misma mutación. Iniciado recientemente tratamiento con acetazolamida asociado a carbamazepina.

Conclusiones: Mutaciones en *KCNA1* se asocian generalmente a ataxia episódica. El exoma clínico dirigido permite la identificación de nuevas mutaciones relacionadas a fenotipos heterogéneos en una misma familia, no sólo de ataxia, sino también de mioquimia y epilepsia. El diagnóstico genético permite el tratamiento específico dirigido.

P-053
IMPLICACIONES PRÁCTICAS DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO MEDIANTE ARRAY-CGH

Amado Puentes, Alfonso; Ocampo, Ana; Sandín, Diego; Fiel, Antía; Taboas, Fernanda.

Hospital Alvaro Cunqueiro, Vigo, España.

Introducción: Los trastornos del neurodesarrollo (TND) son causa habitual de consulta en neuropediatría. En los últimos años ha emergido el uso del Array-CGH (aCGH), para su diagnóstico etiológico, pero no existen muchas publicaciones que analicen el impacto que tienen estos resultados en la práctica clínica diaria.

Objetivos: Valorar el impacto del diagnóstico genético en cuanto a manejo práctico en una Unidad de Neuropediatría.

Material y método: Estudio descriptivo retrospectivo en un hospital de tercer nivel durante el año 2016. Se recogieron datos acerca de las consecuencias a nivel de práctica clínica (cambio de pauta terapéutica, derivación a otras especialidades, petición de nuevas pruebas) de los pacientes con resultado genético patológico.

Resultados: Durante el período de estudio se objetivaron 42 pacientes con resultado de aCGH patológico. Dicho descubrimiento supuso un cambio de medicación en el 4,2% de los casos (2 pacientes), inicio de la valoración en otras subespecialidades en el 22% (9 pacientes) y, también en el 22% (9 pacientes) la solicitud de nuevas pruebas complementarias.

Conclusiones: La evaluación diagnóstica inicial de pacientes con TND debe incluir la realización de un aCGH. Además de las implicaciones pronósticas y de consejo genético, supone un cambio en el manejo en uno de cada cuatro pacientes estudiados. En nuestra muestra no hemos apreciado cambios significativos en cuanto a modificación de las pautas de tratamiento.

P-054
CONDRODISPLASIA PUNCTATA RIZOMÉLICA TIPO 1 POR MUTACIÓN EN EL GEN PEX7

Anticona Huaynate, Jennifer[1]; Inarejos Clemente, Emilio[1]; De Los Santos, Mariela[1]; Montero, Raquel[1]; Lastra Rodríguez, Juan[2]; Ortigoza Escobar, Juan Dario[1].

[1]Hospital Sant Joan de Deu, Esplugues de Llobregat, España; [2]Hospital Can Misses Ibiza, Ibiza, España.

Introducción: La condrodisplasia punctata rizomélica de tipo 1 (RCDP1; MIM#215100) es un trastorno peroxisomal raro caracterizado por talla baja desproporcionada con acortamiento rizomélico de las extremidades superiores, fenotipo peculiar, contracturas congénitas, anomalías oculares, retraso mental grave y calcificaciones punteadas de cartílago no osificado de centros epifisarios.

Caso clínico: Varón de 16 años de edad con discapacidad intelectual severa, fenotipo peculiar y crisis convulsivas. Cataratas intervenidas con lente intraoculares. Alimentación por boca con triturados, dieta restringida en ácido fitánico. Bioquímica inicial con disminución de plasmalógenos y aumento de ácido fitánico. Examen físico con ausencia de lenguaje espontáneo, comprensión alterada, limitación de la supraversión ocular, dificultad para el seguimiento de objetos, nistagmo pendular horizontal. Hipotonía axial con hipertonía de extremidades inferiores, contracturas de isquiotibiales. Columna vertebral con cifoscoliosis de concavidad derecha. EEG con anomalías epileptiformes multifocales con predominio anterior. PEATC-A con hipoacusia neurosensorial leve bilateral. RM cerebral con severa atrofia de cerebelo, así como reducción global del volumen de sustancia blanca e hiperseñal periventricular. Densitometría ósea con Z-score en columna L1-L4: -4 (corregido -1.8), esqueleto total excepto cráneo: -3 (corregido -0.1). Tratamiento actual con ácido valproico (30 mg/kg/d), levomepromazina (5 mg/día) y baclofeno (25 mg/día).

Conclusiones: El fenotipo clínico de la RCDP es muy característico. El principal marcador bioquímico de todas las RCDP es la disminución de plasmalógenos, pudiéndose utilizar el ácido fitánico como marcador diferencial de los distintos tipos de RDCP, dado que puede existir una superposición bioquímica entre la RCDP1 (gen PEX7) y RCDP5 (gen PEX5).

Abstract EPNS 2019 (Atenas)



Attn. Mr. Alfonso Amado
Hospital Alvaro Cunqueiro, Vigo, Spain

SUBJECT: EPNS 2019 Congress - Notification of acceptance as POSTER presentation

Wednesday, April 3, 2019

Dear Mr. Amado,

On behalf of the Organising Committee of the 13th European Paediatric Neurology Society (EPNS) Congress, which will take place in Athens-Greece, at the Megaron Athens International Conference Centre, on 17-21 September 2019, it is our great pleasure to inform you that your below abstract has been selected for **Poster Communication**.

Abstract details

Abstract Title	PRACTICAL IMPLICATIONS OF GENETIC DIAGNOSIS THROUGH ARRAY-CGH
Reference Code	24

Abstract Title	Validation of the use of whatsapp as a method of communication with families
Reference Code	11

Presentation details to follow as soon as possible by separate communication.

Poster SENEP 2019 (Oviedo)

IMPLICACIONES PRÁCTICAS DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO MEDIANTE ARRAY-CGH

Ana Maria Ocampo Alvarez, Antía Fiel Ozores, Diego Sandin Fernandez, Fernanda Taboas Ledo, Alfonso Amado Puentes, Jose Ramón Fernandez Lorenzo

Hospital Álvaro Cunqueiro, Vigo, Pontevedra

OBJETIVOS

- **Trastornos en el desarrollo neurológico (TDN)** Causa habitual de consulta en neuropediatría.
- **Array-CGH (aCGH)** Permiten analizar las variaciones en el número de copias a través de todo el genoma.
- Se ha intentado llevar a cabo un análisis del impacto de los resultados patológicos del aCGH en la práctica clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Estudio descriptivo retrospectivo realizado en un hospital de tercer nivel. Se recogieron datos acerca de las implicaciones clínicas de los resultados de aCGH patológicos obtenidos de pacientes con TDN entre enero de 2013 y diciembre de 2016.

RESULTADOS

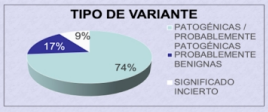
1. CARACTERISTICAS DE NUESTRA MUESTRA:

HERENCIA:

Materna: 34,4%. Paterna 17,6%.
De novo: 27%. Desconocida:21%.

46 102

EDAD MEDIA : 7,05



DERIVACIÓN PRE-ARRAY	Nº	Patología predominante
CARDIOLOGÍA	23	Soplo benigno
GASTROENTEROLOGÍA	19	Reflujo gastroesofágico
OFTALMOLOGÍA	50	Defectos en refracción
NEFROUROLOGÍA	18	Gran variedad: Enuresis, Reflujo vesicoureteral III grado, criptorquidia…

3. NEUROIMAGEN PRE-ARRAY:

RM ALTERADA en 23 pacientes

4. NEUROIMAGEN POST-ARRAY:

CONTROL ALTERACION PREVIA: 4 pacientes.
RM ALTERADA: 1 Anomalías venosas frontales.
1 Agenesia cuerpo calloso.
1 Aumento espacio subacracnoideo.

RM ALTERADA
POSTERIOR
PREVIA

6. ESTUDIOS POST-ARRAY Y CAMBIOS EN EL TRATAMIENTO PREVIO: no se realizaron cambios en ningún tratamiento.

CARDIOLOGÍA	13 Pacientes derivados para descartar anomalías asociadas a la variante Array hallada.	- Discrepancia vías pulmonares. - Displasia válvula pulmonar - Válvula Ao bicúspide + insuficiencia
NEFROUROLOGÍA	5 Pacientes derivados para descartar anomalías asociadas a la variante Array hallada.	- Megaureter derecho + RVU IV-V. - Riñón en herradura. - Estenosis pielo-ureteral + hidronefrosis
OFTALMOLOGÍA	3 Pacientes derivados para descartar anomalías asociadas a la variante Array hallada.	- Miopía y retinosis pigmentaria - Nistagmo pendular
	3 pacientes derivados para control de patología previa.	
GASTROENTEROLOGÍA	Control de gastrostomía en 2 pacientes.	

CONCLUSIONES

- Gracias a los resultados de aCGH se ha realizado un despistaje de malformaciones urológicas, oftalmológicas, cardiológicas y del sistema digestivo, encontrandose así patologías en otros órganos o sistemas que, de otra manera, no se hubiesen descubierto.
- En nuestra serie de pacientes el aCGH **no demostró** ser de utilidad para realizar **cambios en el tratamiento** de los pacientes.
- Neuroimagen postarray únicamente en 2 de los 69 pacientes que no presentaban RM previa al resultado patológico.



Libro escrito por el autor:

Trastornos del Neurodesarrollo. Trastornos del Aprendizaje. ISBN: 9788491103103. Editorial Panamericana 2019.

Artículo Neuropediatrics:

Amado-Puentes A, Reparaz-Andrade A, Del Campo-García A, et al. Neurodevelopmental Disorders and Array-Based Comparative Genomic Hybridization: Sensitivity and Specificity using a Criteria Checklist for Genetic Test Performance. Neuropediatrics. 2019;50(3):164-169. doi:10.1055/s-0039-1685216

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA