



FACULTADE DE MEDICINA E  
ODONTOLOXÍA

TRABALLO FIN DE GRAO DE MEDICINA

**Diagnóstico genético en los  
trastornos del espectro autista (TEA):  
Análisis de exoma**

**AUTORA: Ben Rivas, Alba**

**TITOR: Carracedo Álvarez, Ángel María**

**COTITORA 1: Rodríguez Fontenla, María Cristina**

**COTITORA 2: Alonso González, Aitana**

**Departamento: Medicina Xenómica, Pediatría.**

**Curso académico: 2019-2020**

**Convocatoria: Xullo**

**ÍNDICE**

Resumen.....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1. Trastornos del espectro autista (TEA) .....	6
1.1.1. Definición.....	6
1.1.2. Evolución .....	6
1.1.3. Criterios diagnósticos de los TEA (en el DSM-5) .....	7
1.1.4. Niveles de gravedad de los TEA.....	8
1.1.5. Epidemiología .....	9
1.1.6. Signos precoces de TEA.....	10
1.1.7. Marcadores neurobiológicos tempranos .....	11
1.1.8. Detección precoz y diagnóstico. ....	11
1.1.9. Tratamiento .....	15
1.2. Etiología de los TEA .....	16
1.2.1. Factores ambientales.....	16
1.2.2. Genética de los TEA.....	16
2. ANTECEDENTES.....	23
2.1. Historia clínica de los pacientes. Aspectos fenotípicos destacados.....	23
2.2. Test genéticos previos .....	25
3. OBJETIVOS .....	26
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
4.1. Filtrado inicial de variantes .....	27
4.1.1. Posición genómica con respecto al gen y cambios en la secuencia de aminoácidos: ....	27
4.1.2. Frecuencia poblacional .....	27
4.1.3. Criterios de calidad asociados a cada variante .....	28
4.1.4. Bases de datos específicas de enfermedad .....	28
4.2. Priorización de variantes .....	29
4.2.1. Herencia. Comparación con el exoma del padre y la madre .....	30
4.3. Clasificación de variantes .....	31
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSIÓN .....	38
7. CONCLUSIONES .....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## Resumen

**Antecedentes:** Los **trastornos del espectro autista, TEA** (en inglés **ASD**, “Autism Spectrum Disorders”) son trastornos del neurodesarrollo (TND) caracterizados por déficits en la comunicación social, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. Los TEA son TND complejos, en los que el **ambiente** y la **genética** son claves en su patogénesis. El componente genético de los TEA se estima en torno a un 80%. Aunque la variación común es la que juega un papel más relevante, la variación rara (MAF<1%) confiere un mayor riesgo individual.

**Objetivo:** El objetivo principal de este trabajo es realizar un **análisis de exoma completo** en 3 tríos de TEA (padre y madre no afectados, hijo afecto) para su diagnóstico genético. En este caso, los probandos afectados muestran un fenotipo grave, que parece indicar una causa genética subyacente, pero cuyo diagnóstico genético no se pudo esclarecer en una primera fase, en la que solo se buscaron mutaciones en genes de riesgo conocidos para TEA. Una vez priorizadas las variantes genéticas, se realizará una caracterización bibliográfica de los genes descubiertos en relación a la historia clínica de los individuos con TEA.

**Métodos:** Seguimos una serie de criterios de filtrado de variantes, atendiendo a la posición genómica y los cambios en los aminoácidos, la frecuencia poblacional y criterios de calidad. Se consultó una serie de bases de datos (DECIPHER, Varsome, Polyphen2, HPO, gnomAD) para llevar a cabo la priorización de variantes. Finalmente, se clasificaron las variantes siguiendo los criterios propuestos por el ACMG.

**Resultados:** No identificamos variantes patogénicas en los probandos afectados 1 y 2, aunque sí que encontramos algunas de significado incierto, que podrían ser diagnósticas si existiese otra variante no detectada hasta el momento. Sí que conseguimos un diagnóstico genético en el probando afecto 3, al hallar una variante *de novo* que justifica su fenotipo.

## Resumo

**Antecedentes:** Os **trastornos do espectro autista, TEA** (en inglés **ASD**, “Autism Spectrum Disorders”) son trastornos do neurodesenvolvemento (TND) caracterizados por déficits na comunicación social, intereses restrinxidos e comportamentos repetitivos. Os TEA son TND complexos, nos que o **ambiente** e a **xenética** son claves na súa patoxénese. O componente xenético dos TEA estímase en torno a un 80%. Aínda que a variación común é a que xoga un papel máis relevante, a variación rara (MAF<1%) confire un maior risco individual.

**Obxectivo:** O obxectivo principal deste traballo é realizar unha **análise de exoma completo** en 3 tríos de TEA (pai e nai non afectos, fillo afecto) para o seu diagnóstico xenético. Neste caso, os probandos afectos mostran un fenotipo grave, que parece indicar unha causa xenética subxacente, pero cuxo diagnóstico xenético non se puido esclarecer nunha primeira fase, na que só se buscaron mutacións en xenes de risco coñecidos para TEA. Unha vez priorizadas as variantes xenéticas, realizárase unha caracterización bibliográfica dos xenes descubertos en relación á historia clínica dos individuos con TEA.

**Métodos:** Seguimos unha serie de criterios de filtrado de variantes, atendendo á posición xenómica e aos cambios nos aminoácidos, á frecuencia poblacional e a criterios de calidade. Consultouse unha serie de bases de datos (DECIPHER, Varsome, Polyphen2, HPO, gnomAD) para levar a cabo a priorización das variantes. Finalmente, clasificáronse as variantes seguindo os criterios propostos polo ACMG.

**Resultados:** Non identificamos variantes patoxénicas nos probandos afectos 1 e 2, aínda que sí que encontramos algunhas de significado incerto, que poderían ser diagnósticas se existise outra variante non detectada ata o momento. Si que conseguimos chegar a un diagnóstico xenético no probando afecto 3, ao achar unha variante *de novo* que xustifica o seu fenotipo.

## Abstract

**Background:** Autism Spectrum Disorders (ASD) are Neurodevelopmental Disorders (NDDs) characterized by deficits in social communication, restricted interests, and repetitive behaviors. ASDs are complex NDDs, in which **environment** and **genetics** are key to their pathogenesis. The genetic component of ASDs is estimated about 80%. Although the common variation plays the most relevant role, the rare variation (MAF <1%) confers a higher individual risk.

**Objective:** The main objective is to **analyse a complete exome** in 3 trios of ASD (unaffected father and mother, affected son) for genetic diagnosis. In this case, the affected probands show a severe phenotype, that seems to indicate an underlying genetic cause, but whose genetic diagnosis could not be clarified in the first phase, in which only mutations in known ASD risk genes were sought. Once the genetic variants have been prioritized, we will make a bibliographic characterization of the genes discovered in relation to the clinical history of individuals with ASD.

**Methods:** We follow different variant filtering criteria, attending to genomic position and aminoacid changes, population frequency, and quality criteria. Several databases (DECIPHER, Varsome, Polyphen2, HPO, gnomAD) were consulted to carry out variant prioritization. Finally, variants were classified according to the ACMG recommendations.

**Results:** We did not identify pathogenic variants in probands 1 and 2. However, we find some variants of uncertain significance, which could be diagnostic if it existed another variant not detected at this moment. We could diagnose proband 3, by finding a de novo variant that justifies its phenotype.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA)

#### 1.1.1. DEFINICIÓN

Los **trastornos del espectro autista, TEA** (en inglés **ASD**, *Autism Spectrum Disorders*) son trastornos del neurodesarrollo (TND) caracterizados por déficits en la comunicación social, intereses restringidos y comportamientos repetitivos (1).

La definición de los TEA se ha ido modificando y ajustando en las últimas décadas, teniendo en cuenta los resultados de diversas investigaciones. Con la publicación en 2013 del DSM-5, el “Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales” (del inglés “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*”, *Fifth edition*) (2), se constituye la denominación genérica y única de **TEA**, eliminando las subcategorías del DSM-IV-TR, que incluían al autismo, síndrome de Asperger y trastorno generalizado del desarrollo no especificado, entre otros.

Este cambio ayuda a expresar el concepto dimensional de los TEA. Resulta difícil establecer límites precisos entre los subgrupos. Se trata de trastornos complejos y altamente heterogéneos, tanto en lo referente a la etiología como en la manifestación y evolución de los síntomas en las diferentes etapas del desarrollo, en su expresión y presentación según el sexo, edad o comorbilidades coexistentes (3).

En el DSM-5, los TEA se engloban en una nueva categoría denominada “**trastornos del neurodesarrollo**” (TND). Esta categoría también incluye, además de a los TEA, los trastornos del desarrollo intelectual, de la comunicación, del aprendizaje, trastornos motores y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (2).

#### 1.1.2. EVOLUCIÓN

Los TEA presentan una evolución crónica, se inician en la infancia y están presentes toda la vida, pasando por diferentes grados de afectación, adaptación funcional y desarrollo del área del lenguaje e intelectual.

Estudios recientes de TEA han visto que existe una tendencia a la mejora de los síntomas y mejor adaptación funcional con la edad, aun tratándose de un trastorno crónico. También encontraron que el retraso en el inicio del lenguaje no implica una diferencia significativa en la adaptación funcional evolutiva en la edad adulta (3).

### 1.1.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LOS TEA (EN EL DSM-5)

Con la clasificación nueva del DSM-5 (2), los criterios de inclusión para el diagnóstico de los TEA se volvieron más específicos y estrictos. Por ejemplo, se incluyeron las alteraciones sensoriales (hiporreactividad o hiperreactividad sensorial) dentro de los “patrones restringidos y repetitivos de comportamiento, actividades e intereses”.

Así, se reduce la probabilidad de falsos positivos; sin embargo, también se reduce la sensibilidad para la detección de cuadros clínicos menos graves. Es decir, el grupo de pacientes que sólo presenta alteraciones socioemocionales y de la comunicación, pero que no tienen conductas repetitivas, no serán incluidos actualmente en el diagnóstico de TEA, cuando anteriormente, en el DSM-IV-TR, sí lo hacían.

<b>CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LOS TEA (DSM-5)</b>	
<b>A. Déficits persistentes clínicamente significativos en la comunicación y en la interacción social</b> , que se presentan en diversos contextos, sea actualmente o en sus antecedentes:	
1.	<b>Dificultades en la reciprocidad socio-emocional:</b> desde aproximaciones sociales anormales y fracaso de las conversaciones bidireccionales, pasando por la disminución de intereses, emociones o afectos compartidos, hasta la falta total de iniciación de interacciones sociales.
2.	<b>Déficits en la comunicación no verbal, que se presentan en las interacciones sociales:</b> desde una comunicación verbal o no verbal con baja integración, que se manifiesta con el contacto visual y del lenguaje corporal, pasando por déficits de la comprensión y el uso de gestos, hasta una falta total de expresión facial y de comunicación no verbal.
3.	<b>Dificultades para desarrollar, mantener y comprender las relaciones sociales:</b> desde problemas para ajustar el comportamiento en diversos contextos sociales, pasando por dificultades para compartir juegos imaginativos o para hacer amigos y amigas, hasta una falta aparente de interés por otras personas.
<b>B. Patrones repetitivos y restringidos de comportamiento, actividades e intereses</b> , que se manifiestan en <u>al menos dos</u> de los siguientes puntos (actualmente o en sus antecedentes):	
1.	<b>Comportamientos motores, verbales o utilización de objetos de forma estereotipada o repetitiva</b> (estereotipias motoras simples, uso de objetos de forma repetitiva, alineación de los juguetes, frases idiosincrásicas, ecolalia...).
2.	<b>Adherencia excesiva a rutinas, patrones de comportamiento verbal y no verbal ritualizado o excesiva resistencia a los cambios</b> (insistencia en una misma rutina o comida, angustia extrema frente a cambios pequeños o transiciones, patrones de pensamiento rígidos...)
3.	<b>Intereses muy restringidos y fijos, que son anormales en cuanto a su intensidad o foco de interés</b> (fuerte preocupación o apego por objetos inusuales, intereses excesivamente perseverantes)
4.	<b>Hiperreactividad o hiporreactividad sensorial o interés sensorial inusual por determinados aspectos del entorno</b> (indiferencia aparente al dolor, al calor, al frío; respuesta negativa a sonidos o texturas específicas, oler o tocar objetos en exceso, fascinación por las luces o por los objetos que giran).

<b>C. Los síntomas deben estar presentes en la infancia temprana</b> , aunque puede que no se manifiesten plenamente hasta que las demandas sociales del entorno excedan sus capacidades.
<b>D. Sus síntomas limitan y causan un deterioro clínicamente significativo</b> en lo social, laboral u otras áreas importantes del <b>funcionamiento diario</b> .
<b>E. Las alteraciones del paciente no se explican mejor por la discapacidad intelectual o por el retraso global del desarrollo</b> . La discapacidad intelectual y el trastorno del espectro autista frecuentemente coinciden. Para hacer diagnósticos de comorbilidades de un TEA y discapacidad intelectual, la comunicación social estará por debajo de lo previsto para su nivel de desarrollo.
<b>Para hacer el diagnóstico deben cumplirse los criterios A, B, C, D y E.</b>

**Tabla 1:** Criterios diagnósticos de los trastornos del espectro autista (DSM-5) (2)

Además de cumplirse estos cinco criterios para hacer el diagnóstico de TEA, también se debe **especificar**:

- Si existe discapacidad intelectual acompañante o no.
- Si hay alteraciones o retraso en el desarrollo del lenguaje.
- Si está asociado a una afección médica o genética, o a un factor ambiental conocidos.
- Si está asociado a otro trastorno del neurodesarrollo, mental o del comportamiento.
- Si está asociado con catatonía.

#### 1.1.4. NIVELES DE GRAVEDAD DE LOS TEA

Respecto a la **severidad de los TEA**, se describen tres niveles (grado 1, 2 y 3) para cada una de las dos dimensiones que forman los criterios diagnósticos (“Comunicación social” y “Comportamientos restringidos y repetitivos”) (3).

Estos niveles se refieren al **grado de ayuda necesaria** para cada uno de los dominios ("necesita ayuda muy notable", "necesita ayuda notable" o "necesita ayuda").

NIVELES DE GRAVEDAD DE LOS TEA		
Categoría dimensional de los TEA en el DSM-5	Comunicación social	Comportamientos restringidos y repetitivos
<b>Grado 3:</b> Necesita ayuda muy notable	Mínima comunicación social	Interferencia marcada en la vida diaria, por inflexibilidad y dificultades de cambio de foco de atención.

<b>Grado 2:</b> Necesita ayuda notable	Marcado déficit con limitada iniciación o respuestas reducidas o atípicas	Interferencia frecuente, relacionada con la inflexibilidad y dificultades del cambio de foco.
<b>Grado 1:</b> Necesita ayuda	Sin apoyo in situ, aunque presenta alteraciones significativas en el área de la comunicación social	Interferencia significativa en, al menos, un contexto.
<b>Síntomas subclínicos</b>	Algunos síntomas en esta o ambas dimensiones, pero sin alteraciones significativas	Presenta un inusual o excesivo interés, pero no interfiere.
<b>Dentro de la normalidad</b>	Puede ser peculiar o aislado, pero sin interferencia	No interferencia.

**Tabla 2:** Niveles de gravedad en los TEA (DSM-5) (2)

### 1.1.5. EPIDEMIOLOGÍA

Hace años, las primeras estimaciones acerca de la prevalencia de los TEA los consideraban como trastornos raros, que afectaba a 4-5/10.000. En 2012, los datos se sitúan en 1 de cada 68 niños de 8 años, según el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) en Estados Unidos. En 2014, nuevos resultados del CDC en Estados Unidos, encuentran que los TEA tienen una prevalencia del 2,24% (1 de cada 45 niños) (4). Los últimos datos muestran una prevalencia de los TEA en la población general del 1% aproximadamente (18).

En los últimos estudios de incidencia y prevalencia se refleja un incremento paulatino del número de casos. Esto está posiblemente relacionado con cambios en los criterios diagnósticos, con un cambio metodológico, cuestionarios más sensibles para la detección de casos. En definitiva, el aumento de diagnósticos de TEA se debe a una mejor detección y evaluación de los pacientes, tanto por el sistema educacional como el sistema de salud (5,6).

Análisis sobre el estudio de prevalencia de los TEA del CDC estiman una proporción significativamente mayor entre los **niños** de 8 años (23,6 diagnosticados de TEA por cada 1.000) en comparación con las **niñas** de la misma edad (5,3 diagnosticadas por cada 1.000) (3). Los últimos estudios muestran que los niños tienen tres veces más probabilidades de estar afectados que las niñas (18).

Además, en cuanto a la raza o la etnia, la estimación de prevalencia de los TEA era significativamente mayor entre los blancos no-hispanos en comparación con los niños negros no-hispanos y los hispanos. También se observaban diferencias de estimación según la zona.

El porcentaje de edad en el que recibían una evaluación completa era de 36 meses, sin diferencias en cuanto al sexo, pero si era superior en la población de niños no hispanicos blancos (45%), comparado con la población negra no-hispana (40%) e hispanos (39%). Las diferencias

de prevalencia en TEA según raza/etnia, especialmente para el grupo de hispanos, y las diferencias encontradas en la edad de recibir evaluación completa, parecían poder explicarse por la falta de posibilidades de algunos niños de tener acceso a los servicios, tanto de atención como de intervención (7).

En relación al cociente intelectual, se observó que más del 62% de la población con TEA tiene una capacidad intelectual dentro de la normalidad, con un CI mayor o igual a 70, de los que un 38% presentan un CI mayor o igual a 85. Por lo tanto, la mayoría de niños y niñas diagnosticados no presentan alteraciones evolutivas muy marcadas en la primera infancia y reciben una educación ordinaria. Por otro lado, se sabe que la discapacidad intelectual asociada a TEA es proporcionalmente más prevalente en chicas que en chicos (3).

### **1.1.6. SIGNOS PRECOCES DE TEA**

Un aspecto muy importante en el abordaje del autismo es la **detección temprana**, para la cual necesitamos conocer los signos precoces de los TEA (8).

Aunque el diagnóstico generalmente se hace a los 3-4 años de edad, los padres de los pacientes, mirando retrospectivamente, ya observan signos a partir de los 12-18 meses. Además, un diagnóstico precoz facilita el tratamiento y mejora el pronóstico.

Se hicieron estudios retrospectivos, basados en recuerdos de los padres, registros de historias clínicas y vídeos grabados de niños con TEA, cuando estos eran más pequeños. En ellos, se encontró que muchos de los niños que se diagnosticaron posteriormente de TEA, presentaban signos de desviaciones en el desarrollo social y comunicativo, incluso antes del año de edad. Frecuentemente, el comportamiento social es normal a los 4-6 meses y, entre los 9-12 meses, puede ocurrir una pérdida de competencias sociales, como la mirada ocular, las vocalizaciones, etc. Al año de edad, se detecta una disminución del contacto ocular, no reconocimiento de su nombre, no señalan para pedir algo y no muestran objetos a los adultos.

Sin embargo, en estos estudios hay importantes sesgos, como el de la dificultad de los padres para recordar la secuencia en que fueron apareciendo los síntomas de su hijo. Por esta razón, se diseñaron estudios longitudinales en población de riesgo de TEA, como son los hermanos de niños ya diagnosticados.

Estos estudios demostraron una variabilidad importante en el desarrollo de síntomas y signos precoces relacionados con TEA. Las manifestaciones más frecuentes son alteraciones motoras y en la esfera sensorial en algunos bebés durante el primer año de vida. Los signos precoces de alteraciones del desarrollo social y comunicativo se suelen ver más durante el segundo año de vida.

A los 18 meses, se pueden destacar síntomas predictivos de TEA como el reducido o alterado contacto ocular, combinado con una disminución de gestos comunicativos y del acto de dar y ofrecer objetos a una persona para compartirlos, así como la emergencia de conductas

repetitivas. Estos factores predictivos incrementan 3 veces el riesgo de desarrollar TEA a los 36 meses (3, 8).

Estos hallazgos muestran a necesidad de **monitorizar durante los primeros tres años de vida** a aquellos niños con alto índice de riesgo de desarrollar TEA. Desde Atención Primaria, el rol fundamental de los profesionales es detectar estos signos precoces de TEA, mediante el seguimiento del desarrollo del niño y el uso de instrumentos de cribado (8).

No hay suficiente evidencia para recomendar las pruebas de cribado para TEA a los niños entre 18 y 30 meses en los que no se sospeche el trastorno. Sin embargo, existe cada vez más evidencia acerca de la importancia de la intervención temprana en el comportamiento para mejorar las capacidades cognitivas, el lenguaje y las habilidades adaptativas (9).

Por lo tanto, la identificación temprana de los TEA es muy importante, y los expertos recomiendan el uso de herramientas de *screening* validadas en las revisiones de los 18 y 24 meses de edad (9).

#### **1.1.7. MARCADORES NEUROBIOLÓGICOS TEMPRANOS**

Recientemente, se ha avanzado en el conocimiento de la relación que existe entre signos tempranos de TEA con marcadores neurobiológicos, como son el **volumen cerebral** y la **neuroimagen funcional**.

En niños posteriormente diagnosticados con TEA, se ha observado un incremento del volumen cerebral en los primeros años de vida, tanto de la sustancia gris como de la blanca, en especial en el lóbulo temporal y frontal y en áreas subcorticales, como la amígdala. Esto se detecta midiendo el perímetro craneal y realizando estudios de neuroimagen.

En algunos estudios longitudinales realizados en grupos de alto riesgo, se encontró que un desarrollo aberrante de las conexiones de la sustancia blanca entre los 6 y los 24 meses, precedía al desarrollo de TEA a los 2 años. Estos mismos estudios también encontraron respuestas atípicas neuronales utilizando potenciales evocados a los 6-10 meses en bebés que más tarde desarrollarían TEA (10).

#### **1.1.8. DETECCIÓN PRECOZ Y DIAGNÓSTICO.**

La detección y diagnóstico precoz de los TEA y la instauración temprana de un tratamiento mejora el pronóstico de los síntomas autistas, la adaptación funcional a su entorno y las habilidades cognitivas. Dentro del proceso de detección de los TEA, se puede establecer distintos niveles: la vigilancia del desarrollo, la detección específica de los TEA y la valoración diagnóstica específica por parte de un servicio especializado.

### 1.1.8.1. VIGILANCIA EVOLUTIVA DEL DESARROLLO. PRIMER NIVEL

Dentro del “Programa de niño sano” que se realiza en Atención Primaria, se debe incluir las preocupaciones de los padres sobre el desarrollo de sus hijos, la utilización de escalas y pruebas sobre el desarrollo general de los niños y la observación por los profesionales de las desviaciones en el desarrollo.

Un estudio de observación sobre el uso de instrumentos para la detección de TEA en Pediatría llegó a la conclusión de que un 39% de los casos que presentaban signos de TEA, no fueron reconocidos por los expertos en las revisiones evolutivas (11).

La Asociación Americana de Pediatría (AAP) recomienda una revisión por el pediatra a los 9, 18 y 24-30 meses, para poder identificar retrasos evolutivos y signos relacionados con TEA. Si los niños pertenecen a grupos de alto riesgo (aquellos con bajo peso al nacer, prematuros, cuyos hermanos presentan TEA, etc), pueden ser necesarios reconocimientos adicionales. Sin embargo, *The US Preventive Service Task Force* (USPSTF) considera inadecuado realizar un cribado específico para TEA en aquellos niños en edades precoces cuyos padres no habían mostrado preocupación sobre el desarrollo de sus hijos, por no tener clara evidencia directa de los beneficios reportados a las familias (12,13).

*The American Academy of Neurology and Child Neurology Society* recomienda la vigilancia de rutina del desarrollo en todos los niños de riesgo y cribado para TEA con uno de los dos cuestionarios: MCHAT o el *Autism Screening Questionnaire*, de los que hablaremos posteriormente (14).

El diagnóstico de los TEA es eminentemente clínico, no existe ninguna prueba biológica específica que los diagnostique. Existen **instrumentos de cribado** para ver la evolución del desarrollo en edades precoces, algunos de los cuales se han validado para utilizar en nuestro país:

- ❖ **Cuestionarios rellenados por los padres:** Son fáciles y rápidos.
  - ASQ-3 (Ages and Stages Questionnaire) (Bricker & Squires, 2009): Son de uso recomendado, fácil administración y buena validez. Está formado por 21 cuestionarios para edades comprendidas entre 1 y 66 meses, que evalúan aspectos generales del desarrollo.
  - PEDS (The Parents Evaluation of the Developmental Status) (Glascoe, 1998): Cuestionario que rellenan los padres de niños entre 0 y 8 años. Incluye una serie de preguntas que los padres deben contestar con sus preocupaciones sobre el aprendizaje, desarrollo y conducta de su hijo.

- ❖ **Escalas de desarrollo mixtas de aplicación por profesionales e información recogida de padres:** Generalmente, se emplean como las medidas *gold standard* para alteraciones del desarrollo en un primer nivel de cribado. Son costosas en tiempo y requieren formación para su uso, lo cual limita su aplicabilidad clínica.
  - *Bayley Scales of Infant and Toddler Development, Third edition* (2005): Aplicada a niños entre 1 y 42 meses, pero no adaptada a la población española. Exige entrenamiento y una duración de 90 minutos aproximadamente.
  - *BDIST (Batelle Developmental Inventory Screening Test)* (Newborg, et al. 2005): Incluye 96 ítems que se aplican en 10-30 minutos, dependiendo de la edad del niño, y requiere entrenamiento.
  - Escala Denver-II: Puede utilizarse desde el nacimiento hasta los 6 años. Consta de 65 ítems, y se realiza en 30 minutos aproximadamente. Es ampliamente utilizada. Algunos estudios realizados demuestran que tiene una buena sensibilidad, pero escasa especificidad (14, 15).

En España, han sido ampliamente utilizadas la **Escala Observacional del Desarrollo de Secadas** (2011) y la **Escala Haizea-Llevant** (Fernández & Álvarez, 1989), que son sencillas y rápidas.

#### 1.1.8.2. VIGILANCIA ESPECÍFICA PARA TEA. SEGUNDO NIVEL

Además de la vigilancia de rutina durante las revisiones, la AAP recomienda un **cribado específico para TEA** a todos los niños entre los 18 y los 24 meses. Dentro de este cribado, hay que diferenciar el nivel 1 y 2. El nivel 1 es aplicable a todos los niños en general, independientemente del estatus de riesgo (cribado universal). En cambio, el nivel 2 se aplica sólo a los niños identificados como de riesgo.

Entre los **instrumentos para el cribado** encontramos los siguientes:

- **M-CHAT (*Modified Checklist for Autism in Toddlers*):** Fue el primer instrumento de *screening* para TEA en la población general. El M-CHAT tiene 23 ítems y se combina con una entrevista de seguimiento. La nueva versión, el M-CHAT-R con seguimiento, ha conseguido mejoras en cuanto a la fiabilidad de la escala. Se redujo a 20 ítems, mejorándose la formulación y la descripción de las preguntas (16).

Se aplica a pacientes entre los 16 y los 30 meses, no implica coste alguno, tiene una duración aproximada de 5 minutos, y su sensibilidad es del 85-87% y su especificidad del 93-99% (17).

El M-CHAT – R/F consta de dos etapas. En la primera, los padres deben completar 20 preguntas de contestar sí o no; en la segunda, el profesional pregunta sobre los ítems del

cuestionario que no se ha pasado. Se suma una puntuación total y se categoriza el M-CHAT-R. Si se alcanzan más de 3 puntos, o 2 puntos en ítems críticos, el *screening* se considera positivo. Un 98% de los positivos en estas dos fases del *screening*, desarrollaron problemas o preocupaciones con su desarrollo (15).

- **PDDST-II (*Pervasive Developmental Disorder Screening Test-II*) (Siegel B, 2004):** Incluye preguntas sobre el desarrollo del niño en los primeros 48 meses. Consta de tres etapas: la etapa 1, para el cribado en Atención Primaria; la etapa 2, para diferenciarlo de otros trastornos del desarrollo; y la etapa 3, para distinguir los diferentes trastornos existentes en los TEA (14).
- **ESAT (*Early screening for autism traits questionnaire*) (Dietz, et al. 2006):** Es un cuestionario con 14 ítems, diseñado con el objetivo de identificar a niños en riesgo de TEA a los 14-15 meses. Se hace en dos fases: la primera de 4 ítems, que se realiza en la revisión pediátrica; y la segunda fase, para los que resultan positivos en la primera, más larga y realizada por un profesional experto (16).
- **STAT (*Screening Tool for Autism in Two-Year-Olds*) (Stone, 2008):** Se utiliza en grupos clínicos de 2 años con sospecha de TEA. Su sensibilidad es del 92% y la especificidad del 85%. Es más complejo que el M-CHAT-R, pero hay entrenamientos informatizados para mejorar la efectividad a la hora de utilizarlo (16).

### 1.1.8.3. VALORACIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS TEA. TERCER NIVEL

En cuanto detectamos a un paciente con TEA, este debe remitirse a un **equipo multidisciplinar de profesionales especializados**, para llevar a cabo una evaluación completa, rápida y efectiva, evitando retrasos diagnósticos y terapéuticos (3). Dentro de esta evaluación diagnóstica de TEA, los aspectos fundamentales en los que se centrará son:

- **Evaluación médica y neurológica amplia:** Para identificar una posible alteración del desarrollo o regresión evolutiva, encefalopatías, epilepsia, problemas con el sueño, etc.
- **Historia familiar:** La probabilidad de aparición de TEA es mayor en hermanos de niños afectados, como veremos más adelante.
- **Examen físico y neurológico:**
  - Haremos un examen general, utilizando la lámpara de Wood, debido a la prevalencia de autismo en la esclerosis tuberosa. Evaluaremos las interacciones sociales, del juego, lenguaje, función comunicativa y de conducta, el reconocimiento de sus propias emociones y la empatía.
  - También se realizará un examen motor, para detectar posibles hipotonías, espasticidades o estereotipias motoras.

- Mediremos el perímetro cefálico, ya que suele incrementarse a partir de los 6 meses de edad, pero en un 80% de los casos, se normaliza posteriormente. El incremento estará relacionado con la severidad del TEA.
  - Se debe someter al paciente a una audiometría, como a todos los niños que presenten retrasos en el desarrollo, especialmente en áreas sociales y del lenguaje.
- **Pruebas de laboratorio:**
- Se deben realizar estudios metabólicos cuando existe letargia, vómitos cíclicos, crisis epilépticas tempranas, rasgos dismórficos o retraso mental.
  - Estudios genéticos, incluyendo el cariotipo, el análisis de ADN para el X frágil, estudio de *microarrays* y, en casos de discapacidad intelectual acompañante, alteraciones morfológicas y cuadros atípicos, se haría secuenciación del exoma o de todo el genoma del paciente. Los padres de niños con TEA deben recibir consejo genético por un experto en el tema. Este, con la ayuda de test genéticos, podrá esclarecer si la variante genética relacionada con la causa de TEA es heredada o es *de novo* y, por tanto, si tiene muy incrementado el riesgo de recurrencia en hermanos, o el riesgo es el mismo que para la población general, respectivamente.
  - Pruebas electrofisiológicas, indicadas si hay sospecha clínica de epilepsia o historia de regresión. Los picos de aparición de crisis epilépticas ocurren en la primera infancia y en la adolescencia.
  - Neuroimagen, sólo en casos de presencia de rasgos neurológicos no explicados por el diagnóstico de TEA (examen motor asimétrico, disfunción en los pares craneales, severos dolores de cabeza, etc.).
- **Pruebas diagnósticas específicas para TEA:** El diagnóstico ha de ser multidisciplinario. Existen instrumentos clínicos diagnósticos con fiabilidad demostrada, especialmente el **ADI-R** (*Autism diagnostic interview-revised*) o el **ADOS** (*Autism diagnostic observational schedule*), con su última actualización ADOS2. Ambos son instrumentos claves en la evaluación clínica y de investigación de TEA (3).

### 1.1.9. TRATAMIENTO

La detección temprana de los TEA y la **implementación lo más rápida posible de un tratamiento adecuado** para el paciente siguen siendo los aspectos de mayor relevancia, ya que se relacionan con una mejor evolución clínica del niño (3).

Así, se diseñan programas integrales, intensivos y estructurados basados en intervenciones sobre el comportamiento, que se comparten con los padres, la escuela y el terapeuta responsable del niño, para que sean ellos mismos los encargados de llevarlos a cabo con el paciente. Se deben realizar, dentro de lo posible, en los entornos naturales del niño. Además, se debe de hacer un seguimiento periódico de su evolución clínica por un **equipo multidisciplinar**, pudiendo pedir la colaboración a otras especialidades médicas si se considerase necesario (19).

La mayoría de los niños con TEA no se benefician de un **tratamiento farmacológico**. En caso de decidir administrarlo, se debe comenzar por un único fármaco, e ir incrementando su dosis muy despacio, para así controlar de cerca posibles efectos secundarios. Se deberá informar a los padres de aquellos más frecuentes para que también estén alerta. Además, evitaremos comenzar el tratamiento durante periodos de cambios en la vida del paciente.

En la actualidad, no existen fármacos de eficacia probada para todos los síntomas específicos de TEA (9). Los únicos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) son la **Risperidona** y el **Aripiprazol**. Estos se utilizan para las comorbilidades asociadas a TEA. La medicación más ampliamente estudiada y más prometedora para los síntomas específicos de autismo es la **Oxitocina**. Su uso por vía intranasal parece estar asociado a una mejora en la cognición social, en el contacto ocular y el reconocimiento de expresiones faciales. Su mayor limitación es que tiene una vida media muy corta, lo que la convierte en una opción terapéutica no recomendable (3).

## **1.2. ETIOLOGÍA DE LOS TEA**

Los TEA son trastornos del neurodesarrollo complejos y multifactoriales (21). El **ambiente** y la **genética** son claves en su patogénesis.

### **1.2.1. FACTORES AMBIENTALES**

Entre los **factores ambientales** que influyen en la etiología de TEA se encuentran las alteraciones perinatales (prematuridad extrema, muy bajo peso al nacer), la exposición a tóxicos o a medicamentos durante el embarazo (por ejemplo, ácido valproico para el tratamiento de la epilepsia), enfermedades maternas durante la gestación que produzcan una gran reacción inmunológica, así como dificultades durante el parto, que lleguen a producir hipoxia fetal. También influye la edad paterna en el momento de la concepción, que luego comentaremos. Cabe destacar que estos factores por sí solos no son causa de TEA, sino que pueden actuar sobre el componente genético influyendo sobre su etiología (22).

### **1.2.2. GENÉTICA DE LOS TEA**

Los TEA presentan un **fuerte componente genético** (20). Este se estima en torno a un 80%. La **epigenética** está también implicada de manera relevante en los TEA (21).

Estudios en diversas familias y gemelos han demostrado la contribución de la **genética** a la etiología de los TEA (23). El porcentaje de herencia se situaba en el 90% de casos (24), pero un análisis posterior más preciso estimó una herencia del 83% (25). Una parte importante de la herencia se puede explicar por los **SNPs**. Estas variantes comunes contribuyen en la etiología del TEA alrededor de un 50% cuando se consideran en conjunto (26).

Un metaanálisis de **GWAS** sobre TEA desarrolló un control de calidad bien definido y, por primera vez, llevó a la identificación de 93 marcadores genéticos significativos para TEA, de los cuales 53 fueron replicados en cohortes independientes (27).

A pesar de la evidencia del papel fundamental que tienen las **variantes comunes** en el riesgo de TEA, las **variantes raras** (MAF<1%) confieren al niño un riesgo individual más alto. Estas variantes raras se pueden encontrar en inserciones y deleciones pequeñas (*indels*), CNV (*copy number variants*) o SNVs (*single nucleotide variant*). Además, pueden ser heredadas del padre o de la madre, o, por el contrario, aparecer *de novo* en el paciente afecto (28).

Estas mutaciones **de novo** (DNMs) son variantes identificadas en el paciente, pero que no se encontraron en los padres biológicos. Las DNMs tienen más probabilidades de causar un efecto fuerte sobre el individuo. El descubrimiento de DNMs nos permite identificar genes de riesgo para TEA (29).

Por ejemplo, presentar un SNV *de novo* y una mutación específica “sin sentido” confiere sobre 5 veces más riesgo individual que presentar una CNV heredada (30). Además, los niños con **síntomas de TEA graves** son susceptibles de portar **DNMs más patogénicas** (31). Por lo tanto, existe un interés considerable en identificar nuevas DNMs asociadas a los TEA.

### 1.2.2.1. IDENTIFICACIÓN DE DNMs (DE NOVO MUTATIONS)

Los estudios en **tríos genéticos** (el padre y la madre no afectados y el hijo afecto) se han usado desde 2007 para estudiar DNMs y buscar mutaciones en el paciente que no estuviesen presentes en ninguno de los padres. Analizando las características de las DNMs identificadas, es posible **caracterizar genes previamente desconocidos para TEA** (23).

En los primeros estudios para detectar CNVs usando *micro-arrays* de gran resolución, los CNVs *de novo* eran más frecuentes en los casos que en los controles (32), así como más frecuentes en familias simples que en familias múltiples (32, 33).

Sin embargo, el gran número de CNVs existentes supone un problema cuando tenemos como objetivo detectar genes candidatos para TEA. Las CNVs pueden contribuir a un riesgo moderado de TEA, mientras que los SNVs tienen más probabilidad de indicar directamente genes asociados a una alta susceptibilidad para TEA (34).

Para revelar la arquitectura genética del TEA se han utilizado grandes secuenciaciones paralelas y específicamente, la secuenciación de exoma completo o WES (*Whole Exome*

*Sequencing*) (35, 36, 37). Esta tecnología se ha utilizado en la gran mayoría de estudios de DNMs, recogiendo datos de muchas familias (normalmente en tríos, como se explicó anteriormente) (28, 38, 39). Comparando la secuencia de ADN obtenida del niño afecto con la de sus padres, podemos identificar DNMs, después de haber filtrado los artefactos de la secuenciación (40). Este proceso requiere un *pipeline* bioinformático que incluya diferentes filtros de frecuencia poblacional y parámetros de calidad más o menos restrictivos (41). De todas formas, cada DNM será finalmente resecuenciado por separado, mediante otros métodos, normalmente secuenciación de Sanger, para comprobar así la precisión de los hallazgos (23).

Todas las DNMs localizadas en la secuenciación de exoma se deben clasificar también según su anotación funcional, es decir, según el impacto que tenga la sustitución aminoacídica en la estructura de la proteína formada y en su función (23). Podemos encontrarnos mutaciones de cambio de sentido (*missense DNMs*) y mutaciones sin sentido (*non-sense DNMs*), que truncarían la proteína al formarse un codón de parada (*stop codon*). Las mutaciones que implican una pérdida de función (**LoF mutation**, *loss of function mutation*) pueden clasificarse en *frameshift* (mutación por desplazamiento del marco de lectura), *splice site* (mutaciones de *splicing*, en el lugar de empalme) y *stop-gain* (mutaciones que truncan la proteína).

La importancia de las DNMs *missense* en la patogénesis de los TEA se ha comenzado a estudiar recientemente. Así, los genes que presentan dos o más mutaciones de este tipo tienen más probabilidades de ser patogénicas en los TEA (42). Además, algunos estudios refieren un aumento de las mutaciones LoF en pacientes con TEA comparados con familiares suyos sanos. En concreto, mutaciones LoF heterocigotas están presentes en el 20% de los pacientes, pero solo en el 10% de los hermanos no afectados (38, 43, 44, 45).

Las mutaciones de cambio de sentido (*missense mutations*) son también más comunes en pacientes con TEA que en sus hermanos cuando se consideran cohortes grandes. Se calculó que las mutaciones *missense* contribuyen al menos a un 10% de los diagnósticos de TEA (40).

### 1.2.2.2. RECURRENCIA DE LOS TEA EN HERMANOS DEL PACIENTE

El riesgo de padecer TEA aumenta para un niño cuando tiene un hermano mayor afecto. El riesgo total de recurrencia en hermanos se estima alrededor del 6,9-18% dependiendo del diseño del estudio (46). Este porcentaje es significativamente superior al riesgo en la población general, que es del 1%. Si el niño tiene 2 o más hermanos con TEA, el riesgo de presentarlo se incrementa al 30% (3).

Los padres que han tenido un hijo diagnosticado de TEA deben de recibir consejo genético por un especialista a la hora de tomar la decisión de si tener o no más hijos. Esta decisión va a depender, en parte, de si hemos podido identificar o no una causa genética específica para TEA en su primer hijo o hija. Si hemos detectado una mutación *de novo* responsable, los hijos posteriores tendrán el mismo riesgo de TEA que la población general.

### 1.2.2.3. INFLUENCIA DE LA EDAD PATERNA

Se ha establecido una relación entre la **edad paterna avanzada** y el **aumento del riesgo de los TEA** (47,48). Esta relación se puede explicar por múltiples mecanismos biológicos, no solo las DNMs, sino también los cambios epigenéticos asociados con la edad (49).

Las **DNMs** están presentes típicamente en el espermatozoide o en el óvulo de uno de los padres, transmitiéndose después al embrión. En los estudios realizados se vio que la mayoría de los DNMs se originaban en el **padre** (50), lo cual parece lógico conociendo el número mucho mayor de espermatozoides que se producen a lo largo de la vida, comparado con el número de óvulos en la madre. Las células germinales masculinas presentan un gran número de divisiones celulares, lo cual puede explicar estos hallazgos mutacionales. Además, se calculó que por cada año adicional en la edad paterna en el momento de la concepción, aparecían 2 DNMs extra en el hijo. Sin embargo, el número de mutaciones transmitidas por la madre se mantenía constante año tras año (51). Estos resultados nos muestran que la edad paterna más alta conlleva un aumento del riesgo de padecer TEA debido a la acumulación de un mayor número de mutaciones.

Sin embargo, esta hipótesis biológica solo revelaría un riesgo genético moderadamente mayor (sobre un 10-20%), por lo que se deben considerar otros **mecanismos adicionales**. Una hipótesis alternativa sugiere que la paternidad atrasada se correlaciona con una tendencia a las enfermedades neuropsiquiátricas, ya que los factores de riesgo genéticos para problemas psiquiátricos altamente hereditarios los compartirán padres mayores y su descendencia (52). Como vemos, este riesgo relacionado con la edad paterna está sujeto a una **gran red de factores genéticos y epidemiológicos interrelacionados**.

### 1.2.2.4. ESTUDIOS DE EXOMA EN LOS TEA. PRINCIPALES GENES DE RIESGO

Las variantes raras y *de novo* constituyen la mayor contribución al riesgo individual para TEA (28, 34, 40). Cuando una variante rara interrumpe un gen más frecuentemente de lo esperado por azar, implica que este es de riesgo (60). Los genes de riesgo proporcionan información sobre los fundamentos de los TEA tanto individualmente (61, 62) como en conjunto (28, 34, 63, 64).

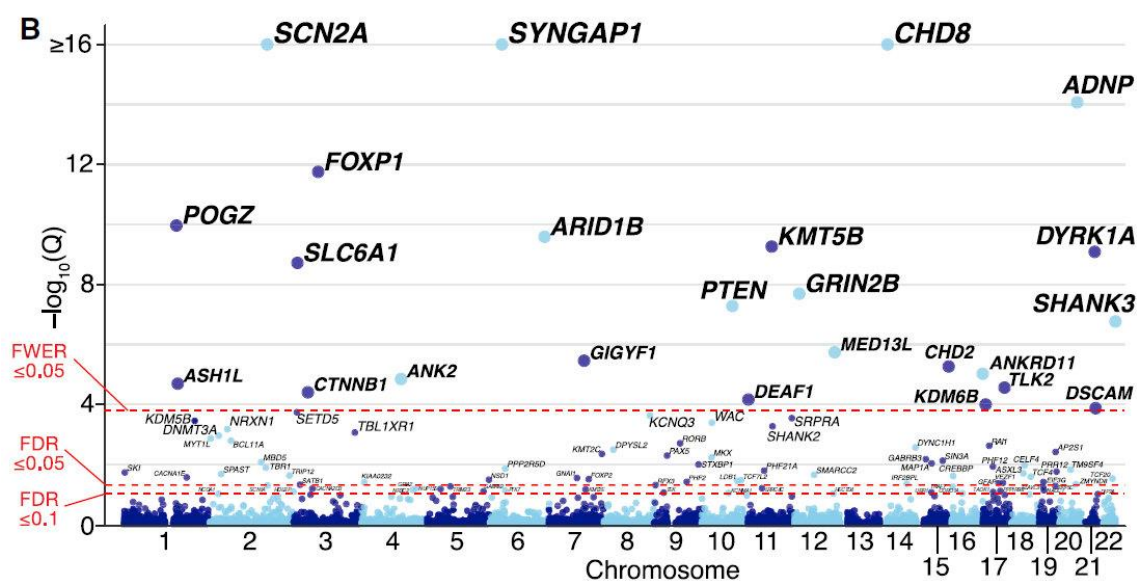
En la última década se han realizado varios estudios de este tipo (Rubeis et al, 2014, Sanders et al, 2015), que han contribuido a aumentar paulatinamente la lista de genes de riesgo en los TEA. El ASC (*Autism Sequencing Consortium*) incrementa las cohortes de tríos en cada estudio, contribuyendo con este aumento del tamaño muestral a un mayor poder estadístico, que ha permitido encontrar nuevas variantes y genes de riesgo de los TEA.

### ESTUDIO DE SATTERSTROM (65):

En el último estudio de WES del ASC (Satterstrom et al, 2020), se llevó a cabo la mayor secuenciación de exoma en los TEA hasta la fecha. Se reunió una cohorte de 35.584 muestras, incluyendo 11.986 con TEA. Se introdujo un marco analítico mejorado, consiguiendo identificarse **102 genes asociados a TEA** (FDR, *false discovery rate*  $\leq 0.1$ ). Para llegar a estos resultados, se consideraron tanto variantes *de novo* como heredadas (DNMs y CNVs), utilizando una herramienta de análisis denominada TADA (*Transmission and De Novo Association Analysis*).

Se identificaron subgrupos dentro de los 102 genes asociados a TEA. Así, 49 genes mostraron frecuencias más elevadas de variantes disruptivas *de novo* en individuos con TND graves, mientras que 53 genes mostraron frecuencias más elevadas en individuos con TEA. Además, 13 de los genes asociados colocalizan con *loci* afectados de forma recurrente por las variantes del número de copias (CNVs) (65).

Mediante la comparación de diferentes casos de TEA con mutaciones en estos grupos de genes, se reveló que también mostraban **diferencias fenotípicas**. Hay que considerar que a partir de los resultados de los estudios de exoma (genes asociados), se puede llegar a estudiar otras jerarquías biológicas que implican, por ejemplo, las rutas biológicas subyacentes a la patogénesis de los TEA. Para ello, se utilizan diferentes herramientas bioinformáticas que integran datos de expresión a nivel celular. En el estudio de Satterstrom, la mayoría de los genes mostraron una expresión temprana en el neurodesarrollo del cerebro y tienen un papel en la regulación de la expresión génica o en la comunicación neuronal, pudiendo aparecer un desequilibrio excitador-inhibidor subyacente en los TEA. En conjunto, estos conocimientos constituyen un importante paso para dilucidar la neurobiología de los TEA (65).



**Figura 1:** Manhattan plot que muestra los 102 genes autosómicos asociados con TEA en el último estudio de exoma (65).

**SFARI GENE:**

La base de datos de **SFARI Gene** constituye una plataforma desarrollada para permitir la evaluación sistemática de la evidencia genética de la comunidad para genes individuales relacionados con los TEA (66). Contiene una clasificación de genes con diferente *score* de riesgo para TEA (dependiendo de si los estudios tienen una evidencia constatada muy fuerte o no).

Dentro de SFARI, el módulo **Human Gene** es una colección activa de genes candidatos identificados a través de estudios de asociación genética, genes vinculados a los TEA sindrómicos y genes en los que se han encontrado mutaciones raras que están vinculadas a TEA (66).

En la última actualización, se agregaron un total de 30 genes nuevos al módulo de Human Gene, lo que lleva a un número total de 1.171. También se completó la anotación en profundidad de 641 variantes raras y 1331 variantes comunes, y se agregaron 74 nuevas referencias. Los **genes y referencias añadidas** incluyen:

- De los 102 genes asociados a TEA que se identificaron en el estudio de Satterstrom et al., 24 fueron recientemente añadidos a SFARI Gene: *AP2S1, MAP1A, MKX, SRPRA, GFAP, GNAII, KIAA0232, LDB1, PHF12, SATB1, SKI, TM9SF4, VEZF1, ZMYND8, CORO1A, GABRB2, LRRC4C, NCOA1, NUP155, PPP1R9B, PPP5C, TEK, TRIM23, y UBR1*.
- Formas sindrómicas nuevas de TEA se asociaron a los genes *ZMIZ1, TET3, SUPT16H, YWHAG, SRPRA*.
- Se agregó un total de 8 referencias recientemente seleccionadas y 292 registros de casos individuales al módulo Copy Number Variant (CNV) de SFARI Gene, que es un recurso paralelo que cataloga las deleciones y duplicaciones recurrentes de un solo gen y de múltiples genes en el genoma y describe su posible vínculo con el autismo (66). Así, se hace un total de 619 referencias seleccionadas.
- El módulo de ratón (*mouse model*) se actualizó con datos de un total de 10 referencias. Los modelos de ratones derivados de genes de riesgo incluyeron los genes: *CNTNAP2, PTEN, FMRI, CUL3, POGZ, SCNIA, MECP2, Y SHANK3*.

El módulo de Modelos animales de SFARI Gene examina datos de modelos animales utilizados en investigaciones de laboratorio para dilucidar los mecanismos de acción de los genes de riesgo de TEA. Ofrece una cobertura integrada de los últimos descubrimientos a nivel molecular, celular y conductual en TEA. Las anotaciones más destacadas incluyen:

- **CUL3**: En el estudio de Dong et al. (67) se generaron ratones con deficiencia de *CUL3*, que manifestaron déficits sociales, mayor ansiedad, mayor transmisión glutamatérgica y excitabilidad neuronal. La inhibición farmacológica de EIF4G1, un objetivo de Cul3, y la inhibición quimiogénica de la actividad neuronal de las neuronas piramidales del

hipocampo ventral, rescataron los déficits celulares y conductuales asociados a TEA en ratones con genes inactivados con *Cul3*.

- ***EIF4G1***: Los ratones con deficiencia de microexón *EIF4G1* muestran déficits en el enfoque social y la memoria social, interacción social disminuida, memoria episódica deteriorada, y la plasticidad sináptica hipocampal alterada. También muestran una mayor expresión de proteínas sinápticas críticas incluyendo *GluN1* (68).
- ***POGZ***: Ratones con *knockdown* del gen *POGZ* muestran alteraciones del desarrollo neuronal cortical, de la migración y de la diferenciación neuronal, aumento de la excitabilidad neuronal y alteración de la función de la red cortical madura. La inhibición compensatoria del aumento de la excitabilidad neuronal en mutantes de *POGZ* que usa el agente antiepiléptico Perampanel restaura la sociabilidad en ratones que portan mutaciones heterocigotas en Q1038R (69).

#### 1.2.2.5. FUTURO EN GENÉTICA DE TEA

A pesar de los importantes avances que se han realizado en los últimos años en el estudio de genética de los TEA, todavía existen limitaciones en la detección de DNMs, que tendrán que resolverse en futuros estudios (23).

Ha quedado patente la necesidad de una fente de información unificada y optimizada. Esta será una de las áreas más beneficiadas en futuras investigaciones. Así, se conseguirá descubrir **nuevos factores genéticos implicados en la patogénesis de los TEA**, estudiando el mayor número posible de familias y empleando diferentes métodos de detección de variantes, *de novo indels*, variaciones estructurales post-zigóticas, mosaicismos heredados de padres asintomáticos, mutaciones *de novo* en regiones no codificantes, etc. (28, 53). Todas estas fuentes de variabilidad genética se estudiarán también en detalle gracias a la secuenciación de genoma completo (WGS, Whole Genome Sequencing), que está permitiendo obtener información de las mismas en el restante 98% del genoma que no codifica para proteínas y que tiene principalmente una función reguladora.

También se esperan nuevos abordajes bioinformáticos para permitir la implementación de estructuras de análisis integradas y adaptadas a la biología de TEA, y así definir mapas de rutas neurobiológicas implicadas más detalladas y válidas.

## 2. ANTECEDENTES

En este trabajo, partimos de tres tríos genéticos, es decir, tres pacientes con un diagnóstico clínico de TEA (probandos afectados) y sus respectivos padre y madre (progenitores sanos). El exoma de cada uno de los integrantes del trío fue secuenciado en el contexto de un proyecto de investigación. Así pues, de cada probando afecto, tenemos el conjunto de las variantes genéticas exónicas, anotadas funcionalmente con la herramienta ANNOVAR (*ANNOtate VARIation*) y organizadas en un archivo en formato Excel con extensión .xlsx.

### **2.1. HISTORIA CLÍNICA DE LOS PACIENTES. ASPECTOS FENOTÍPICOS DESTACADOS.**

A continuación, procedo a la caracterización fenotípica de los tres pacientes con TEA, que se nombrará como “Probando afecto 1”, “Probando afecto 2” y “Probando afecto 3”.

#### **2.1.1. PROBANDO AFECTO 1**

- Se trata de un varón de 11 años.
- Antecedentes personales y familiares: Fue un CIR (crecimiento intrauterino retardado).
- Antecedentes familiares: Una tía materna presenta discapacidad intelectual.
- Exploración física y clínica: TEA sindrómico. Dificultades motoras y dificultades para la comunicación verbal y no verbal (ausencia de lenguaje). Presenta **epilepsia** parcial compleja del lóbulo frontal. Cataratas congénitas bilaterales. Microcefalia y dismorfias.
- Pruebas complementarias: Cariotipo normal, descartados X frágil y Síndrome de Angelman; RMN cerebral normal, con leve agenesia del cuerpo calloso.

#### **2.1.2. PROBANDO AFECTO 2**

- Se trata de un varón de 21 años.
- Antecedentes personales: Amenaza de parto pretérmino a los 5 meses de gestación. Finalmente, parto pretérmino a los 8 meses, mediante cesárea. Cribado de metabolopatías normal. Se le detectó poca fuerza muscular en los primeros meses de vida.

- Antecedentes familiares: Sin interés.
- Exploración física y clínica: A los 2 años, se describió como un niño macrosómico, con clinodactilia (en el 5º dedo), pabellones auriculares ligeramente deformes. Se observó pliegue transversal único incompleto; facies plana; nariz respingona, ligera micrognatia. Prácticamente, ausencia de lenguaje. Padece DM1 (diabetes mellitus tipo 1), episodios de agitación y agresividad. Sufre también **epilepsia**.
- Pruebas complementarias: Cariotipo normal; RMN y TAC cerebrales sin hallazgos patológicos; *Arrays* (estudio del genoma) y Potenciales evocados normales; analítica de orina anodina.

### 2.1.3. PROBANDO AFECTO 3

- Se trata de una mujer de 24 años.
- Antecedentes personales: Durante el segundo trimestre de embarazo, su madre sufrió varicela. Período neonatal sin incidencias.
- Antecedentes familiares: Su madre presenta microcefalia. Su hermana sufre habitualmente migrañas.
- Exploración física y clínica: La paciente se sigue desde los 8 meses en las consultas de Neuropediatría, diagnosticándose de un **trastorno generalizado del desarrollo no especificado**. Desde los 4 meses, presenta **epilepsia**, con las siguientes características: Mirada alta, reflejo de chupeteo, hiperextensión cervical y movilidad de extremidades. A los 5 años, sufre un **status convulsivo**, con infarto isquémico temporo-parietal derecho. A los 2 años (casi 3 años), se hace el diagnóstico de **“Trastorno de la conducta adaptativo, social y del lenguaje”**. Emplea gestos, ausencia de lenguaje. No aparecen conductas disruptivas.
- Pruebas complementarias:
  - En el año 2010, la RMN cerebral informa de “ligera atrofia de surcos corticales a nivel parietal derecho”.
  - En el 2011, se sospecha deficiencia de MCAD (acil-CoA deshidrogenasa de cadena media). Se realiza estudio de acilcarnitinas, que muestra una muy ligera elevación de C5OH. El gen MCAD resultó negativo para mutaciones.
  - Cariotipo sin alteraciones; EEG y perfil metabólico normales. Estudio del genoma sin alteraciones significativas.
  - Se descartó síndrome de Williams, síndrome de Rett y síndrome de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial).
- Tratamiento: Carbamacepina (400-0-400) y Topiramato (150-0-125).

## **2.2. TEST GENÉTICOS PREVIOS**

Anteriormente al desarrollo de este trabajo, se habían realizado ya una serie de pruebas genéticas para cada uno de los 3 probandos afectados.

Se les había hecho un *array* previo, en el que no se identificó ninguna CNV clínicamente significativa. También habían pasado un cribado para **X frágil**, que resultó negativo. Y además, se había realizado un **análisis de exoma**, filtrando por genes previamente seleccionados por su asociación firmemente demostrada con algún trastorno del neurodesarrollo (n = 261), sin hallar tampoco ninguna variante clínicamente significativa en ninguno de los genes seleccionados.

Por lo tanto, el siguiente paso, en el que se centra este trabajo, es analizar el exoma completo.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es realizar un **análisis de exoma completo** en **3 tríos de TEA** (probando afecto y progenitores sanos), en busca de variantes genéticas que sirvan para proporcionar un **diagnóstico genético** en cada uno de los probandos. Para ello, se utilizarán diferentes bases de datos y criterios de filtrado.

En particular, este trabajo se centrará en analizar los exomas completos de 3 tríos en los que el probando afecto muestra un fenotipo grave (que parece indicar una **causa genética subyacente**), pero cuyo diagnóstico genético no se pudo esclarecer tras realizar previamente otros test genéticos de rutina.

Una vez filtradas y priorizadas las variantes genéticas, se realizará una **caracterización bibliográfica de los genes** descubiertos en relación a la historia clínica de los individuos con TEA.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la detección de variantes clínicamente relevantes en los 3 probandos afectados, partimos de 3 archivos en formato Excel con extensión .xlsx, que contienen todas las variantes genéticas exónicas identificadas en cada individuo, anotadas funcionalmente con la herramienta ANNOVAR. Inicialmente, el Probando afecto 1 presentaba 65.854 variantes genéticas; el Probando afecto 2, 66.150; y el Probando afecto 3, 68.010 variantes.

Así pues, el filtrado de variantes se llevará a cabo teniendo en cuenta la información proporcionada para cada una de ellas por ANNOVAR y la información de calidad asociada a cada variante. Para ello, utilizamos la herramienta “Filtro”, que tiene disponible el programa Excel en el apartado “Ordenar y filtrar”. Nos vamos a ir centrando en los aspectos que se explican a continuación, que corresponden cada uno a una columna de la tabla Excel.

### 4.1. FILTRADO INICIAL DE VARIANTES

#### 4.1.1. POSICIÓN GENÓMICA CON RESPECTO AL GEN Y CAMBIOS EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS:

- **Func.refGene** y **Func.ensGene**: Solo se dejarán las variantes que son exónicas ( “exonic”) o de splicing ( “splicing”), ya que son las que se espera que tengan un impacto funcional en la proteína resultante. Las demás variantes no las seleccionaremos ( “downstream”, “intergenic”, “intronic”, “upstream”, etc), es decir, las eliminaremos en el filtrado, ya que no proporcionan información clínica relevante para el diagnóstico genético.
- **ExonicFunc.ensGene** y **ExonicFunc.refGene**: En este caso, eliminaremos las mutaciones sinónimas ( “synonymous”) y las desconocidas ( “unknown”). Las variantes más patogénicas van a ser las que en esta columna se clasifiquen como “stopgain”, ya que son mutaciones sin sentido (*nonsense mutation*), que provocan la aparición de un codón de terminación prematuro, lo cual conduce a la producción de un producto proteico truncado. Por lo tanto, podemos comprobar inicialmente si hay alguna variante *stopgain* en nuestro probando afecto que pueda estar relacionada con el fenotipo expresado.

#### 4.1.2. FRECUENCIA POBLACIONAL

- **MaxPopFreq**: Contiene información sobre la frecuencia poblacional general de cada variante, haciendo un compendio de la información incluida en bases de datos de diferentes consorcios (ExAC, GnomAD). Para realizar el filtrado, se quitarán todas las variantes que tengan una frecuencia mayor a 0,01, es decir, se dejarán seleccionadas las variantes con una frecuencia  $\leq 0,0099$  . Esto se hace porque estamos buscando una variante rara, que no sea común en la población.

- **Vardb life**: Corresponde al número de veces que se ha identificado esa variante en algún paciente de la Fundación de Medicina Xenómica. Solo se dejarán variantes que se hayan registrado hasta 10 veces ( de 0 a 10) y las que no se hayan registrado nunca ( “Vacías”).

#### **4.1.3. CRITERIOS DE CALIDAD ASOCIADOS A CADA VARIANTE**

- **GQ**: Se trata de un parámetro de calidad. La mayoría de las variantes que están bien secuenciadas, van a tener un 99% de calidad, es decir, la calidad óptima. Para hacer el filtrado inicial, y no marcar un umbral demasiado exigente, pondremos el punto de corte en un 50% de calidad. Seleccionamos pues las variantes con  $GQ \geq 50\%$  .
- **AD\_ALT1**: Indica el número de veces que se lee el alelo alternativo. Si el alelo alternativo sólo se leyó 10 veces o menos, sospechamos que se trata de un artefacto. Por tanto, eliminamos  de 0 a 10.
- **Pérdida del ratio 50:50 entre el alelo de referencia y el alelo alternativo**: En una mutación heterocigota, se espera que se lea el alelo de referencia alrededor del 50% de las veces, y el otro 50% el alelo alternativo, por azar. Sin embargo, si el número de lecturas del alelo alternativo (**AD\_ALT1**) es muy inferior al número de lecturas del alelo de referencia (**AD\_REF**), es muy probable que la variante realmente sea un artefacto y, por tanto, podemos eliminarla. Sería una excepción cuando la mutación es homocigota, ya que sólo veremos el alelo alternativo.

#### **4.1.4. BASES DE DATOS ESPECÍFICAS DE ENFERMEDAD**

- **OMIM ID**: Como estamos haciendo diagnóstico, utilizaremos la información que se recoge en esta base de datos. En OMIM se incluye un catálogo de genes y su enfermedad asociada a cada uno de ellos. Si un gen no está codificado en OMIM, significa que no se ha encontrado enfermedad asociada a él; con lo cual, no lo estudiaremos, porque no nos interesa para el objetivo de este trabajo. Por tanto, en esta columna, **OMIM\_ID**, quitaremos las  “Vacías”.
- **OMIM Disorder**: Procedemos a filtrar por enfermedad. Sabiendo la clínica de cada uno de los probandos afectos (recogida en el apartado “Antecedentes” de este trabajo), iremos descartando y eliminando síndromes o enfermedades que claramente no tienen relación alguna con los problemas clínicos de nuestro paciente. Ante la duda en algún síndrome, lo dejamos seleccionado, ya que seguimos dentro del filtrado básico inicial. Si finalmente resulta no ser importante, ya se eliminará a posteriori, como ya explicaremos. Enfermedades como el cáncer, las debemos eliminar, ya que no es lo que estamos buscando, y así también se evita la identificación de hallazgos incidentales.

- **ClinVar:** Contiene información de variantes genéticas, junto a su interpretación clínica y el fenotipo asociado a cada una de ellas (54).

En esta base de datos, las variantes se clasifican según las **normas del ACMG** (*American College of Medical Genetics and Genomics*) en: Patogénicas, probablemente patogénicas, significado incierto, probablemente benignas y benignas.

ClinVar\_S es una opción dentro del Excel que incluye la clasificación de cada variante según la base de datos ClinVar y nos puede resultar de ayuda a la hora de filtrar. No obstante, que una variante esté considerada benigna, tampoco nos la descarta totalmente, ya que esta base de datos puede contener errores. En ClinVar también podemos consultar con qué nivel de evidencia se ha clasificado la variante.

FILTRADO	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Func.refG	28.871	28.826	29.181
Func.ens	28.393	28.317	28.726
ExonicFunc.ensGene	15.274	15.300	15.345
ExonicFunc.refGene	14.620	14.681	14.681
Vardb_life	4.212	4.140	4.201
MaxPopFreq	887	884	897
AD_ALT1	407	393	522
GQ	380	368	495
OMIM_ID	296	293	404
OMIM_Disorder	249	248	309
Manual	184	159	185
Enfermedad asoc.	51	38	27

**Tabla 3:** Número de variantes genéticas restantes tras cada uno de los filtrados.

#### **4.2. PRIORIZACIÓN DE VARIANTES**

Después de aplicar estos criterios de filtrado, cuando ya conseguimos quedarnos con pocas variantes genéticas en cada probando, iremos analizándolas una por una, buscando información sobre ellas, y comprobando si algún síndrome asociado al gen en el que se localiza dicha variante nos coincide con el fenotipo que expresa cada uno de nuestros pacientes.

Para realizar esta búsqueda, tenemos disponibles las siguientes **bases de datos**:

- **DECIPHER:** Es una base de datos interactiva que incorpora múltiples herramientas diseñadas para interpretar variantes genéticas. DECIPHER mejora el diagnóstico clínico al recopilar información de una gran variedad de recursos bioinformáticos relevantes para cada variante genética. Introduciríamos una variante y observaríamos como la han clasificado otras personas (55).

- **Varsome**: Se trata de una plataforma con un sistema de búsqueda de variantes genómicas humanas y una base de conocimiento integrado de más de 70 recursos de datos, con referencias cruzadas, así como información de cualquier variante a tiempo real. El sistema clasifica la variante según los criterios propuestos por el ACMG y además explica todos los criterios de evidencia desglosados en los que se ha basado (56).
- **SIFT, Polyphen2, CADD**: Son predictores funcionales *in silico* de patogenicidad, es decir, herramientas que predicen computacionalmente el posible impacto funcional de una variante. Cada una emplea diferentes criterios a la hora de discernir entre variantes benignas y patogénicas. Estos generalmente se basan en el grado de conservación entre especies del aminoácido o el nucleótido, la localización del aminoácido resultante en la proteína y las consecuencias bioquímicas de la sustitución aminoacídica. De estas, la más utilizada es sin duda **Polyphen2**, a pesar de que las tendencias actuales prefieren no utilizar un único método, sino una combinación de varios *scores in silico* para establecer los criterios para clasificar mutaciones benignas y patogénicas (23, 57).
- **HPO** (*Human Phenotype Ontology*): Se trata de una herramienta que proporciona el vocabulario estandarizado de anomalías fenotípicas encontradas en las enfermedades humanas, relacionadas con unos genes en concreto. HPO hace un compendio de la literatura médica, Orphanet, Decipher y OMIM. Actualmente, contiene más de 13.000 términos y más de 156.000 referencias a enfermedades hereditarias (58).
- **gnomAD** (*Genome Aggregation Database*): Anteriormente llamado ExaC (*Exome Aggregation Consortium*). Se trata de un recurso desarrollado por una coalición internacional de investigadores, con el objetivo de agregar y armonizar los datos de secuenciación del exoma de una amplia variedad de proyectos a gran escala. Actualmente, abarca 125.748 secuencias de exoma y 15.708 secuencias de genoma completo (59).  
Es una base de datos de frecuencia poblacional. Puede que una variante que nos aparece con una frecuencia población muy baja, se haya encontrado últimamente en muchos pacientes, y como las bases de datos se actualizan muy rápidamente, la frecuencia poblacional sube. Si la frecuencia de esa variante sube de 0,01, la podremos eliminar.

#### 4.2.1. HERENCIA. COMPARACIÓN CON EL EXOMA DEL PADRE Y LA MADRE

Dado que también estaban disponibles las secuencias de los exomas completos de los progenitores, se comprobó si las variantes con criterios de patogenicidad eran *de novo* (ausentes en los progenitores) o **heredadas**.

Esto permitió descartar trastornos de herencia autosómica recesiva, en el caso de que todas las variantes con criterios de patogenicidad fuesen heredadas del mismo progenitor (solo un alelo mutado) o descartar trastornos de herencia autosómica dominante si la variante era heredada de un progenitor sano.

### **4.3. CLASIFICACIÓN DE VARIANTES**

Debemos ordenar de más a menos patogénicas las variantes genéticas, siguiendo las recomendaciones del ACMG (70).

Las **recomendaciones del ACMG** evalúan 28 tipos diferentes de evidencia asociados a características inherentes a cada variante, como puede ser la frecuencia alélica, análisis funcionales, predicciones *in-silico*, análisis de segregación, relación genotipo-fenotipo, asignándole a cada una un código alfanumérico que valora su contribución al nivel de patogenicidad. Específicamente hay 1 código para *Pathogenic very Strong* (PVS), 4 para *Pathogenic Strong* (PS), 6 para *Pathogenic Moderate* (PM), 4 para *Pathogenic Supporting* (PP), 1 para *Benign Stand Alone* (BA), 4 para *Benign Strong* (BS) y 7 para *Benign Supporting* (BP).

Luego, estos códigos funcionan como un puntaje, combinándose para dar lugar a la clasificación final de cada variante en **5 categorías**: patogénica (*pathogenic*, P), probablemente patogénica (*likely pathogenic*, LP), variante de significado incierto (*variant of uncertain significance*, VUS), probablemente benigna (*likely benign*, LB), o benigna (*benign*, B).

Comprender en profundidad estos criterios requiere el conocimiento y el manejo de varios campos disciplinares. El porcentaje de variantes clasificadas de manera significativamente diferente por distintos laboratorios, disminuyó del 22% al 5%, después de que se discutiese conjuntamente la valoración de cada tipo de evidencia (70).

El proceso de evaluar toda la evidencia para un número significativo de variantes por caso se debe implementar de manera ordenada, siguiendo un camino lógico y sistemático para la recolección de información, como el que se propone a continuación:

- El primero comprende la valoración de la **frecuencia poblacional** de cada variante en poblaciones de referencia. Si la misma es superior al 5%, la variante será “benigna”, por lo que no vale la pena profundizar en su análisis. Por otro lado, si la frecuencia de la misma es superior a lo esperado para la prevalencia de la enfermedad o se observa para enfermedades dominantes en individuos sanos, se le asignará también la categoría de “benigna”. En cambio, la ausencia (o muy baja frecuencia) de la misma en bases de datos será evidencia a favor de su patogenicidad.
- El segundo grupo de evidencia lo forman las **anotaciones y las predicciones del efecto molecular**. Éstas contemplan el tipo de variante (*nonsense, missense, frameshift*, etc), la posición de la misma en el gen y en la proteína (si forma o no parte de un dominio funcional), la existencia de estudios funcionales, las predicciones *in-silico* y el mecanismo molecular por el cual se desarrolla la enfermedad.
- El tercer grupo de evidencia comprende el **análisis del fenotipo del caso** en relación con la información provista por las bases de datos clínicas. Por un lado, se

requiere evaluar si el fenotipo del paciente es altamente específico para aquello observado en el gen donde se halla la variante. En ese caso, se sospechará de patogenicidad. Esto suele hacerse comparando el fenotipo clínico con aquellos ejemplos reportados en OMIM para casos con mutaciones patogénicas en el mismo gen. Alternativamente, se debe evaluar la posibilidad de una causa alternativa desencadenante del fenotipo observado, lo que se traduce en la **presencia de otra variante** con un mayor nivel de evidencia para explicar el cuadro clínico observado.

- Por otro lado, se debe evaluar la existencia de **reportes previos** donde se haya clasificado la variante como patogénica o benigna. Si bien parece simple, esta categoría es una de las más discutidas y donde se observan mayores diferencias de interpretación. En este contexto, la recomendación del ACMG, es utilizar una fuentes independiente donde se haya analizado la misma variante en un contexto clínico y se tenga una asignación de “patogénica” o “benigna.
- El último grupo analiza la evidencia asociada a la segregación de la variante dentro del **grupo familiar**, valorando si concuerda o no con el modelo de herencia propuesto para la patología, o si se ha verificado que la variante es *de novo*.

Una vez asignados los códigos correspondientes a la variante de interés, estos se combinan para dar como resultado la clasificación de la misma en “patogénica”, “probablemente patogénica”, “variante de significado incierto”, “probablemente benigna” o “benigna” (70).

Se debe tener en cuenta que el ACMG sólo ha hecho unas recomendaciones, que son específicas para trastornos de herencia mendeliana. Los TEA son trastornos complejos, en los que son comunes los fenómenos de penetrancia incompleta y expresividad variable. Por lo tanto, las guías de la ACMG deben ser interpretadas con cautela en el diagnóstico de individuos con TEA.

## 5. RESULTADOS

Tras la priorización y la clasificación de las variantes genéticas, estudiándolas una a una, obtuvimos los siguientes resultados:

### 5.1. PROBANDO AFECTO 1

No se identificaron variantes patogénicas. La gran mayoría de las variantes genéticas presentaron criterios de evidencia para su clasificación como “benignas” o “probablemente benignas”. No obstante, podemos destacar las siguientes variantes, que fueron clasificadas como “de significado incierto” por los motivos que se comentarán posteriormente:

Gen	Posición	Variante genética	Enfermedad asociada	Manifestaciones clínicas	Herencia	Clasificación ACMG
<i>SRD5A3</i>	4q12	NM_02459 2:exon3:c.5 46_547ins ATGG:p.P 182fs	Trastorno congénito de la glicosilación de tipo Iq, Sdme de Kahrizi	Retraso psicomotor, hipotonía, alteraciones oculares, cutáneas, endocrinas.	AR	Significado incierto
<i>LAMC3</i>	9q34.12	NM_00605 9:exon13:c. 2282C>T:p .S761L	Malformaciones corticales occipitales	Epilepsia, anomalías oculares, desarrollo psicomotor retrasado	AR	Significado incierto
<i>LGII</i>	10q23.33	NM_00130 8275:exon6 :c.625C>T: p.R209C,L GII	Epilepsia familiar en el lóbulo temporal	Epilepsia, crisis parciales y generalizadas, auras auditivas	AD	Significado incierto
<i>SLCIA2</i>	11p13	NM_00119 5728:exon9 :c.1090C>T :p.R364C,S LC1A2	Encefalopatía epiléptica infantil temprana	Epilepsia, retraso psicomotor y mental, hipotonía	AD	Significado incierto

**Tabla 4:** Variantes genéticas susceptibles de patogenicidad en el Probando afecto 1

➤ Encontramos una variante en el gen *SRD5A3*:

Esta inserción de cuatro pares de bases, en heterocigosis, y heredada de la madre, en el gen *SRD5A3*, provoca un cambio en la pauta de lectura y la consiguiente aparición de un codón de parada prematuro, dando lugar a una proteína truncada. Variantes patogénicas en este gen se asocian con “**Trastorno congénito de la glicosilación tipo Iq**” (OMIM #612379) y “**Síndrome de Kahrizi**” (OMIM #612713).

Las principales manifestaciones clínicas asociadas al “**Trastorno congénito de la glicosilación tipo Iq**” descritas en OMIM son las siguientes: braquicefalia, implantación baja de orejas, anomalías oculares (coloboma hipertelorismo, nistagmus, hipoplasia del disco óptico, pérdida visual variable), puente nasal deprimido, alteraciones cutáneas (dermatitis ictiosiforme, hiperqueratosis, pigmentación oscura en rodillas y dorso de manos y pies, hipertrichosis) y anomalías neurológicas (retraso mental, hipotonía, desarrollo motor retrasado, hipoplasia de la hipófisis, polimicrogiria, hipoplasia del vermis cerebelar), endocrinológicas (IGF1 y IGF3 bajos), hematológicas (anemia microcítica, defectos de la coagulación, deficiencia de antitrombina III) y hepatológicas (transaminasas elevadas).

Con respecto al “**Síndrome de Kahrizi**”, es un trastorno de herencia AR, que se describe con las siguientes manifestaciones clínicas en OMIM: anomalías oculares (coloboma, cataratas), amplio puente nasal, labios gruesos, anomalías esqueléticas (contracturas, cifosis torácica), cutáneas (hemangioma capilar) y alteraciones neurológicas (retraso mental severo, retraso en el desarrollo psicomotor, discurso no adquirido)

Así pues, las manifestaciones clínicas que se han descrito en ambos trastornos relacionados con variantes patogénicas en *SRD5A3*, se asemejan al **fenotipo del probando afecto 1**, desarrollado en el apartado “Antecedentes” de este trabajo. Este también presenta anomalías oculares (cataratas congénitas bilaterales), déficits de comunicación verbal y no verbal, y dificultades motoras.

Esta variante se ha clasificado como “patogénica” en Varsome, según los criterios del ACMG. Sin embargo, al estar asociada a trastornos de herencia AR y no haber detectado una segunda mutación patogénica en el otro alelo del gen, esta mutación por sí sola no explica el fenotipo del paciente. Por este motivo, la podemos clasificar como “de significado incierto”.

➤ También encontramos una variante en el gen *LAMC3*:

Se trata de una variante en heterocigosis, heredada de la madre, en el gen *LAMC3*, que provoca un cambio aminoacídico en la proteína resultante. Variantes patogénicas en este gen se asocian con un trastorno AR, llamado “**Malformaciones corticales occipitales**” (OMIM #614115). Este se define por las siguientes manifestaciones clínicas en OMIM: anomalías oculares (pérdida de visión episódica, agudeza visual disminuída, estrabismo), neurológicas (ataques epilépticos tónico-clónicos y ausencias, con debut de los 2 a los 11 años, desarrollo psicomotor retrasado, síntomas autonómicos, paquigiria y polimicrogiria occipital, alteraciones del EEG). Coinciden con el fenotipo del probando afecto 1 en cuanto a las anomalías oculares y la epilepsia.

Esta variante presenta criterios de patogenicidad. Sin embargo, está asociada a un trastorno AR y no se encontró una segunda variante patogénica. No obstante, se debe destacar el hecho de que se identificaron 3 variantes raras, aunque sin criterios de patogenicidad, que habían sido heredadas del padre y que, por tanto, se localizaron en el otro alelo. Por todo ello, se ha clasificado la variante como “de significado incierto”.

➤ Hallamos una variante en el gen *LGII*:

Se trata de una variante en heterocigosis, heredada del padre, en el gen *LGII*, que provoca un cambio aminoacídico en la proteína resultante. Mutaciones patogénicas asociadas a este gen se relacionan con un trastorno AD (autosómico dominante), denominado “**Epilepsia familiar del lóbulo temporal**” (OMIM #600512), que se define con las siguientes manifestaciones clínicas en OMIM: epilepsia del lóbulo temporal, crisis epilépticas parciales simples y complejas, crisis tónico-clónicas generalizadas, auras auditivas, sonidos simples no formados (zumbidos, timbres, clics, zumbidos), características auditivas complejas (voces, música), distorsionadas (cambios de volumen, amortiguación), cognitivas (afasia receptiva) y reflejos auditivos (convulsiones precipitadas por sonidos). Coincide con el fenotipo del probando afecto 1 la presencia de epilepsia.

Esta variante genética justifica la epilepsia, pero es heredada de un progenitor sano. Teniendo en cuenta que la penetrancia de este trastorno podría ser incompleta, la variante se clasificó como “de significado incierto”.

➤ Por último, encontramos una variante genética en el gen *SLCIA2*:

Se trata de una variante en heterocigosis, heredada del padre, en el gen *SLCIA2*, que provoca un cambio aminoacídico en la proteína resultante. Mutaciones patogénicas en este gen se asocian a un trastorno AD, denominado “**Encefalopatía epiléptica infantil temprana, 41**” (OMIM #617105), que se define con las siguientes manifestaciones clínicas en OMIM: crecimiento general pobre, microcefalia, dificultad para el seguimiento y la fijación ocular, dificultades para la alimentación, contracturas musculares, cifoescoliosis, hipotonía muscular, y alteraciones neurológicas (encefalopatía epiléptica, crisis epilépticas de múltiples tipos, alteraciones en el EEG, retraso en el desarrollo global, retraso mental profundo, letargia, irritabilidad, discurso pobre, incapacidad para andar o sentarse, espasticidad, movimientos discinésicos, hipometilación cerebral, atrofia supratentorial, cuerpo calloso fino). Coincide con el fenotipo del probando afecto 1 en la microcefalia, la epilepsia, la agenesia del cuerpo calloso, el déficit de comunicación verbal y las dificultades motoras.

Esta variante, como la anterior, justifica la epilepsia, pero es heredada de un progenitor sano. Por tanto, considerando que la penetrancia de este trastorno podría ser incompleta, queda clasificada como “de significado incierto”.

## **5.2. PROBANDO AFECTO 2**

**No se identificaron variantes patogénicas.** La gran mayoría de las variantes genéticas presentaron criterios de evidencia para su clasificación como “benignas” o “probablemente benignas”. No obstante, podemos destacar la siguiente variante, que fue clasificada como “de significado incierto” por los motivos que se comentarán posteriormente:

Gen	Posición	Variante genética	Enfermedad asociada	Manifestaciones clínicas	Herencia	Clasificación ACMG
<i>ABAT</i>	16p13.2	NM_000663:exon14:c.1157C>T:p.P386L	Deficiencia de GABA transaminasa	Epilepsia, retraso psicomotor severo	AR	Significado incierto, probablemente benigna

**Tabla 5:** Variante genética susceptible de patogenicidad en el Probando afecto 2

➤ Encontramos una variante en el gen *ABAT*:

Se trata de una variante en heterocigosis, heredada de la madre, en el gen *ABAT*, que provoca un cambio aminoacídico en la proteína resultante. Mutaciones patogénicas en este gen se asocian a un trastorno AR, denominado “**Deficiencia de GABA transaminasa**” (OMIM #613163), que se describe con las siguientes manifestaciones clínicas en OMIM: crecimiento lineal acelerado, retrognatia, fisuras palpebrales bajas, hipotonía muscular, anomalías neurológicas (retraso severo en el desarrollo psicomotor, crisis epilépticas refractarias, hiperreflexia, postura tónica, letargia, leucodistrofia, agenesia del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelar, quiste de la fosa posterior), llanto agudo y alteraciones analíticas (aumento del ácido gamma-aminobutírico en plasma, en orina y en LCR (líquido ceforraquídeo), aumento de beta-alanina, aumento de la hormona del crecimiento y disminución de la actividad hepática de GABA). Coincide con el fenotipo del probando afecto 2 en el retraso psicomotor, la hipotonía en los primeros meses de vida y la epilepsia.

Esta variante se ha clasificado como “de significado incierto” en ClinVar, según los criterios del ACMG. Sin embargo, al estar asociada a trastornos de herencia AR y no haber detectado una segunda mutación patogénica en el otro alelo del gen, esta mutación por sí sola no explica el fenotipo del paciente. Por este motivo, la podemos clasificar como “de significado incierto, probablemente benigna”.

### **5.3. PROBANDO AFECTO 3**

Se ha encontrado una variante que ha sido clasificada como “patogénica” en este paciente. Por lo tanto, conseguimos llegar así a su **diagnóstico genético**.

Gen	Posición	Variante genética	Enfermedad asociada	Manifestaciones clínicas	Herencia	Clasificación ACMG
<i>RHOBTB2</i>	8p21.3	NM_001160037:exon3:c.314G>A:p.G105E	Encefalopatía epiléptica infantil temprana	Epilepsia, discapacidad intelectual, retraso psicomotor, ausencia de habla	AD, de novo	Patogénica

**Tabla 6:** Variante genética patogénica en el Probando afecto 3

- Esta variante diagnóstica se encuentra en el gen ***RHOBTB2***:

Se trata de una variante en heterocigosis y *de novo* en el gen *RHOBTB2*, que provoca un cambio aminoacídico en la proteína resultante. Se puede clasificar como una variante **patogénica**, porque es *de novo*, no se ha descrito previamente en la población general, predictores teóricos de su efecto sugieren que sea patogénica y, además, justifica toda la patología.

Variantes patogénicas en ese gen se asocian a “**Encefalopatía epiléptica infantil temprana, 64**” (OMIM #618004), que se define en OMIM como un trastorno del neurodesarrollo de herencia AD, caracterizado por la aparición de crisis epilépticas y status epiléptico (tienden a responder al tratamiento médico), asociado a discapacidad intelectual (desde moderada a profunda), mielinización retrasada, microcefalia, cuerpo calloso fino, ventrículos engrandecidos, atrofia cortical e hipoplasia cerebelar. También se presenta un desarrollo psicomotor deficiente (movimientos anormales, hipotonía, distonía, e incluso hemiparesia en algún caso) y habla pobre o ausente. Además, incluye características dismórficas inespecíficas (micrognatia, orejas grandes, puente nasal deprimido labio superior fino). Dentro de las manifestaciones psiquiátricas, presenta movimientos estereotípicos y anormalidades del comportamiento. Este cuadro presenta **gravedad variable** y debuta generalmente en el primer año de vida. Suele ser causado por una mutación *de novo*.

Se describe, como vemos, un fenotipo que coincide con la clínica del probando afecto 3, desarrollada en el apartado “Antecedentes” de este trabajo. Esta incluye la epilepsia, el status convulsivo, la atrofia de surcos corticales y la discapacidad intelectual con ausencia del lenguaje.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. PROBANDO AFECTO 1

Con la variante identificada en el gen **SRD5A3**, clasificada como “patogénica” en Varsome, no podemos alcanzar un diagnóstico, ya que al estar asociado a un trastorno AR, necesitaríamos hallar otra variante en el mismo gen para ello. Sin embargo, las manifestaciones clínicas y el fenotipo del probando afecto 1 coinciden con el síndrome asociado a este gen, el “**Trastorno congénito de la glicosilación de tipo Iq**”.

En realidad, este trastorno engloba a múltiples errores innatos del metabolismo, que se producen por una deficiencia de la enzima esteroide 5-alfa-reductasa 3 (SRD5A3), lo cual conlleva una incorrecta glicosilación de proteínas y lípidos. Debido a las importantes funciones biológicas de los oligosacáridos, tanto en las glucoproteínas como en los glucolípidos, la síntesis incorrecta de estos compuestos da como resultado amplias manifestaciones clínicas multisistémicas. Este amplio espectro fenotípico todavía no se ha caracterizado completamente, ya que solo se han reportado unos pocos individuos afectados (71).

Al tratarse de un trastorno multiorgánico, puede haber síntomas descritos dentro de esta entidad que aún no haya manifestado el paciente y que aparezcan *a posteriori*. Por lo tanto, resulta de vital importancia realizar un **seguimiento activo** del paciente, para llegar a un diagnóstico precoz, que mejorará el pronóstico y la calidad de vida del paciente.

Llegados a este punto, en el que tenemos una sola variante genética en el gen **SRD5A3**, pero el fenotipo del probando afecto nos coinciden con las manifestaciones clínicas del trastorno asociado al gen, estudiamos la posibilidad de que exista una **segunda variante patogénica**, que aún **no se pudo detectar**, por diversas razones: i) que la variante esté localizada en una región no analizada (regiones intrónicas, regiones reguladoras o no accesibles), ii) que esa segunda mutación sea una variante que no podemos detectar con esta aproximación (secuenciación de exoma completo); por ejemplo, podría tratarse de CNVs, inserciones, inversiones, etc.

En este caso, podríamos proceder a hacer **más pruebas**, para completar el estudio. El test de diagnóstico para todos los tipos de Trastornos congénitos de la glicosilación, CDG (*Congenital Disorders of N-Linked Glycosylation*), es el **análisis de las glucoformas de transferrina en suero**. Esta prueba de diagnóstico se realiza por enfoque isoeléctrico (IEF) o por electroforesis capilar, para determinar el número y la presencia de residuos de oligosacáridos N-ligados sialilados incompletos unidos a la transferrina sérica (71). Parece la prueba más adecuada para realizar a continuación debido a su buena relación de coste-beneficio.

Después de esta prueba, si los resultados obtenidos no resultan suficientemente claros, se podría continuar con **otras pruebas moleculares genéticas**, con el objetivo de buscar esa segunda variante patogénica. Esto implicaría el uso de pruebas genómicas más completas, incluida **la secuenciación del genoma completo** (71). Con ella se cubriría el espectro total de la variabilidad genética, podríamos buscar CNVs a mayor resolución que un *array*, o variantes situadas en regiones que no hayan sido cubiertas en la secuenciación de exoma completo, llevada a cabo en este trabajo.

Esta aproximación, aunque conlleva un coste adicional, puede ser importante para los progenitores, pues en caso de encontrar al segundo portador, esto podría ser de ayuda para proporcionarles un **consejo genético** adecuado, ante la posibilidad de que quieran tener más hijos en un futuro.

## **6.2. PROBANDO AFECTO 2**

En este paciente hallamos una variante en el gen *ABAT*, pero al asociarse a un trastorno AR (“Deficiencia de GABA transaminasa”), necesitaríamos hallar otra variante genética para alcanzar un diagnóstico. En estos casos, siempre se puede decir que la **otra variante** podría estar **presente, sin haber sido detectada todavía**.

Sin embargo, este trastorno tiene muchas anomalías metabólicas asociadas que deberían haber sido detectadas en nuestro probando. Entre ellas, destacan las siguientes **alteraciones en parámetros analíticos**: aumento del ácido gamma-aminobutírico en plasma, en orina y en líquido cefalorraquídeo, aumento de beta-alanina, aumento de la hormona del crecimiento y disminución de la actividad hepática de GABA.

Teniendo en cuenta que una metabolopatía es lo primero que se descarta, parece muy poco probable que esta sea la causa de la patología del paciente, ya que no consta que se hayan detectado estas anomalías en analíticas previas.

Ante el fenotipo sindrómico del paciente, es probable que la causa del trastorno sea **genética**. Habiéndose hecho ya todos los test genéticos que se han realizado, la siguiente opción es la de completar el estudio con la **secuenciación del genoma completo** (WGS, *Whole Genome Sequencing*). Esta consiste en secuenciar la totalidad del genoma humano, sin limitarnos a las regiones codificantes, es decir, incluyendo también aquellas regiones intrónicas e intergénicas, no codificantes y con funciones reguladoras, que tienen cada vez más importancia (74) y que son excluidas en el caso de la secuenciación de exoma completo (WES).

Por lo tanto, la WGS ofrece un análisis genético más completo que la WES, permitiendo el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas raras y no diagnosticadas (75). Además, la WGS puede reducir la duración del proceso diagnóstico molecular, lo que proporcionaría beneficios médicos y económicos, así como un profundo impacto psicosocial en el paciente y su familia (75). En un futuro cercano, la WGS probablemente reemplazará a los *microarrays* como el test genético estándar para los TEA (76).

Cabe destacar que la WGS tiene una **desventaja**, los hallazgos incidentales. La WGS identifica con frecuencia variantes genéticas patogénicas, de potencial importancia para el niño o la familia, pero que no están relacionadas con la patología a estudio (77). Informar hallazgos incidentales es controvertido, especialmente en población pediátrica, ya que los sujetos no se consideran legalmente competentes cuando se les hace la prueba, pero ganarán competencia a medida que crezcan (78).

### **6.3. PROBANDO AFECTO 3**

En este paciente hemos conseguido llegar a un **diagnóstico genético**. Se ha encontrado una variante genética *de novo* en el gen *RHOBTB2*, que se asocia a un trastorno, la “**Encefalopatía epiléptica infantil temprana**”, cuyas manifestaciones clínicas coinciden en su mayoría con el fenotipo del probando afecto.

*RHOBTB2* codifica para la proteína 2 del dominio BTB relacionada con Rho, una pequeña Rho GTPasa atípica, que es un adaptador específico de sustrato o un sustrato en sí mismo para el complejo ubiquitín ligasa de la proteína Cullin-3 (CUL3) (72). Aunque el papel de las Rho GTPasas típicas y otras proteínas unidas a Rho en la plasticidad sináptica y en la disfunción cognitiva es ampliamente reconocido, el papel de las Rho GTPasas atípicas (como *RHOBTB2*) en el neurodesarrollo apenas se ha caracterizado (73).

Se encontraron mutaciones *de novo missense* en cierto dominio de *RHOBTB2*. Los experimentos de transfección en células neuronales revelaron que la forma mutante de *RHOBTB2* era más abundante que la *RHOBTB2* de tipo salvaje (*wild type*), debido al funcionamiento anormal del proteosoma. Este estudio, tanto genético como funcional, parece indicar que las mutaciones en *RHOBTB2* son una **causa genética rara de encefalopatía epiléptica**, en la que la encefalopatía aguda podría ser un rasgo característico. Además, la regulación precisa de los niveles de RHOBTB2 parece ser esencial para un funcionamiento normal del cerebro (72).

Por otro lado, se ha visto que cantidades elevadas de RhoBTB (familia de proteínas a la que pertenece *RHOBTB2*) *in vivo* se asocian con susceptibilidad a ataques y defectos locomotores severos en *Drosophila*. La **disminución de los niveles de RhoBTB en las dendritas** resultó en un **menor nivel de desarrollo dendrítico** (73).

En un estudio reciente (72), se identificaron tres variantes *de novo* mediante WES en *RHOBTB2* en tres pacientes con encefalopatías epilépticas. Curiosamente, los tres pacientes mostraron encefalopatía aguda (**estado epiléptico febril**), con una RMN en la que se observaba inflamación del hemisferio o **difusión reducida en varias regiones del cerebro**, seguida de **atrofia cerebral** posterior (72). Esto coincide con el fenotipo del probando afecto 3, que sufrió a los 5 años un status convulsivo a causa de un infarto isquémico cerebral.

En otro estudio relacionado con el mismo gen (73), se han identificado variantes *de novo* y de cambio de sentido (*missense*) en la región que codifica el dominio BTB de *RHOBTB2* en **diez individuos con un fenotipo similar**, incluyendo epilepsia de inicio temprano, discapacidad intelectual severa, microcefalia postnatal y trastornos del movimiento. Además, se hallaron imágenes que mostraban anomalías atróficas e infarto cerebral (73). Todas estas manifestaciones clínicas son coincidentes con el fenotipo del probando afecto 3.

## 7. CONCLUSIONES

El principal objetivo de este trabajo ha sido realizar un análisis de exoma completo en 3 tríos de TEA (un probando afecto y dos progenitores sanos), en busca de variantes genéticas que sirvan para proporcionar un **diagnóstico genético** de cada uno de los probandos. Se han utilizado diferentes bases de datos y criterios de filtrado para llevar a cabo la **priorización y la clasificación de las variantes**, según los criterios del ACMG. Tras estos procesos, obtuvimos los siguientes **resultados**:

En el **probando afecto 1**, no se identificaron variantes patogénicas. Sin embargo, destacamos una serie de variantes, localizadas en los **genes**:

- **SRD5A3**: La variante se clasificó como “patogénica” en Varsome. Sin embargo, al estar asociada a trastornos AR (“Trastorno congénito de la glicosilación tipo Iq” y “Síndrome de Kahrizi”) y no haber detectado una segunda mutación patogénica en el otro alelo del gen, no puede ser diagnóstica, y se clasifica como “de significado incierto”. Puede que exista una segunda variante patogénica aún no detectada, por estar localizada en una región que no hemos analizado con la WES. Por tanto, para **completar el estudio**, primero se realizaría un análisis de las glucoformas de transferrina en suero, y posteriormente se podría hacer una secuenciación del genoma completo, para cubrir el espectro total de la variabilidad genética.
- **LAMC3**: Esta variante presenta criterios de patogenicidad; sin embargo, al estar asociada a un trastorno AR (“Malformaciones corticales occipitales”) y no encontrarse una segunda variante patogénica, se clasifica como “de significado incierto”.
- **LGII**: Esta variante genética justifica la epilepsia, pero al estar asociada a un trastorno AD y de penetrancia incompleta (“Epilepsia familiar del lóbulo temporal”) y heredarse de un progenitor sano, se clasificó como “de significado incierto”.
- **SLC1A2**: Esta variante genética justifica la epilepsia, pero al asociarse a un trastorno AD y de penetrancia incompleta (“Encefalopatía epiléptica infantil temprana”), y ser heredada de un progenitor sano, se clasificó como “de significado incierto”.

En el **probando afecto 2**, no se identificaron variantes patogénicas. Sin embargo, se puede destacar una variante localizada en el **gen ABAT**. Al estar asociada a un trastorno de herencia AR (“Deficiencia de GABA transaminasa”) y no haber detectado una segunda mutación patogénica en el otro alelo del gen, esta mutación por sí sola no explica el fenotipo del paciente, por lo que se clasifica como “de significado incierto, probablemente benigna”. El trastorno asociado a este gen tiene muchas anomalías metabólicas asociadas, que no se han detectado en nuestro probando. Por tanto, parece muy poco probable que esta sea la causa de la patología. De todas formas, ante el fenotipo sindrómico que presenta el paciente, la causa de su trastorno probablemente sea genética, por lo que el siguiente paso sería la secuenciación de genoma completo, sin limitarnos a las regiones codificantes únicamente.

En el **probando afecto 3**, conseguimos llegar a su **diagnóstico genético**. Se ha encontrado una variante patogénica de novo que explica la patología del paciente, localizada en el gen **RHOBTB2**, asociado a un trastorno AD (“Encefalopatía epiléptica infantil temprana”). Se ha visto en estudios recientes que las mutaciones en **RHOBTB2** son una causa genética rara de encefalopatía epiléptica y que es un gen implicado en el desarrollo dendrítico. Además, se ha

estudiado a 3 pacientes con variantes *de novo* en *RHOBTB2* que mostraron **estado epiléptico febril**, con difusión reducida en varias regiones cerebrales en la RMN, seguida de atrofia cerebral. En otro estudio, se encontró un fenotipo similar en 10 individuos, que incluía epilepsia de inicio temprano, discapacidad intelectual severa, microcefalia y trastornos del movimiento, además de imágenes que mostraban anomalías atróficas e infarto cerebral. Estas manifestaciones son coincidentes con la clínica del probando afecto 3.

En conclusión, en este trabajo llegamos al **diagnóstico genético** del probando afecto 3 y, por otro lado, conseguimos hacer una **orientación de futuras pruebas analíticas y estudios genéticos** necesarios para un posible diagnóstico genético en los probandos afectados 1 y 2.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) Gyawali S, Patra BN. Autism spectrum disorder: Trends in research exploring etiopathogenesis. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019; 73(8):466-475.
- (2) American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington DC: American Psychiatric Publishing; 2013.
- (3) Hervás Zúñiga A, Balmaña N, Salgado M. Los trastornos del espectro autista. *Pediatría Integral*. 2017; XXI(2): 92-108.
- (4) Christensen DL, Baio J, Braun KV, et al., 2016. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR. Surveill Summaries*, 6 (No. SS-3) (No. SS-3): 1-23.
- (5) Estimated Prevalence of Autism and Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey.
- (6) USA National Health Statistics Report 2015. 87, noviembre 2013.
- (7) Christensen DL, Baio J, Braun KV, et al., 2016. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR. Surveill Summaries*, 6 (No. SS-3) (No. SS-3): 1-23.
- (8) Daniels AM, Halladay AK, Shih A, Elder LM, Dawson G. Approaches to enhancing the early detection of autism spectrum disorders: a systematic review of the literature. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014; 53(2): 141-52.
- (9) Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet*. 2018;392(10146):508-520.
- (10) Zwaigenbaum L, Bauman ML, Stone WL, et al. Early Identification of Autism Spectrum Disorder: Recommendations for Practice and Research. *Pediatrics*. 2015; 136(Suppl 1): S10-S40.
- (11) Gabrielsen TP, Farley M, Speer L, et al. Identifying Autism in a Brief Observation. *Pediatrics*. 2015; 135(2): 330-38.
- (12) Siu AL, and the US Preventive Services Task Force. Screening for Autism Spectrum Disorder in Young Children. US Preventive Services Task Force Recommendation Statement (USPSTF). *JAMA*. 2016; 315(7): 691-6.

- (13) Al- Qabandi M, Gor ter JW, Rosenbaum P. Early autism detection: are we ready for routine screening? *Pediatrics*. 2011; 128(1).
- (14) Alcantud F, Alonso Y & Rico D. Herramientas de cribado para la detección de retrasos o trastornos del desarrollo. Una revisión sistemática de la literatura. *Revista Española de Discapacidad*. 2015; 3(2): 7-26.
- (15) Robins DL, Casagrande K, Barton M, et al. Validation of the Modified Checklist for Autism in Toddlers, Revised With Follow-up (M-CHAT-R/F). *Pediatrics*. 2014; 133: 1.
- (16) Dietz C, Swinkels S, van Daalen E, van Engeland H, Buitelaar JK. Screening for autistic spectrum disorder in children aged 14-15 months. Design and general findings. *J Autism Dev Disord*. 2006; 36(6): 713-722.
- (17) Dealhanty C. Development delays and autism. Screening and surveillance. *Cleveland Clinical Journal of Medicine*. 2015; 82(Suppl 1): 29-32.
- (18) Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr. Res.* 65, 591–598.
- (19) Green J, Charman T, McConachie H, et al. PACT Consortium. Parentmediated communication-focused treatment in children with autism (PACT): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2010; 375(9732): 2152-60.
- (20) Ivanov HY, Stoyanova VK, Popov NT, Vachev TI. Autism Spectrum Disorder – A Complex Genetic Disorder. *Folia Med (Plovdiv)*. 2015;57(1):19-28.
- (21) Reynoso C, Rangel MJ, Melgar V. El trastorno del espectro autista: aspectos etiológicos, diagnósticos y terapéuticos [Autism spectrum disorder: Etiological, diagnostic and therapeutic aspects]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2017;55(2):214-222.
- (22) Bretones A, Calvo RM. Factores de riesgo del Trastorno del Espectro Autista. Hospital Universitari Clínic Barcelona. PortalCLÍNICA. Feb 2018. Disponible en: <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/trastorno-del-espectro-autista/factores-de-riesgo>
- (23) Alonso-Gonzalez A, Rodriguez-Fontenla C, Carracedo A. *De novo* Mutations (DNMs) in Autism Spectrum Disorder (ASD): Pathway and Network Analysis. *Front Genet*. 2018;9:406. Published 2018 Sep 21.
- (24) Steffeneburg, S. (1989). A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway, and Sweden. *J. Child Psychol. Psychiatry* 30, 405–416.

- (25) Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Hultman, C., Larsson, H., and Reichenberg, A. (2017). The heritability of autism spectrum disorder analysis method B. *JAMA* 318, 1182–1184
- (26) Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., et al. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat. Genet.* 46, 881–885.
- (27) Grove, J., Ripke, S., Als, T. D., Mattheisen, M., Bybjerg-grauholm, J., Bækvedhansen, M., et al. (2017). Common risk variants identified in autism spectrum disorder. *bioRxiv*.
- (28) De Rubeis S, He X, Goldberg AP, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 2014; 515(7526):209-215.
- (29) Uddin, M., Tammimies, K., Pellecchia, G., Alipanahi, B., Hu, P., Wang, Z., et al. (2014). Brain-expressed exons under purifying selection are enriched for de novo mutations in autism spectrum disorder. *Nat. Genet.* 46, 742–747.
- (30) Stein, J. L., Parikshak, N. N., and Geschwind, D. H. (2013). Rare inherited variation in autism: beginning to see the forest and a few trees. *Neuron* 77, 209–211.
- (31) Robinson, E. B., Samocha, K. E., Kosmicki, J. A., McGrath, L., Neale, B. M., Perlis, R. H., et al. (2014). Autism spectrum disorder severity reflects the average contribution of de novo and familial influences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 15161–15165.
- (32) Marshall, C. R., Noor, A., Vincent, J. B., Lionel, A. C., Feuk, L., Skaug, J., et al. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *J. Hum. Genet.* 82, 477–488.
- (33) Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-, C., Walsh, T., et al. (2010). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445–449.
- (34) Sanders, S. J., He, X., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., Samocha, K. E., Cicek, A. E., et al. (2015). Insights into autism spectrum disorder genomic architecture and biology from 71 risk loci. *Neuron* 87, 1215–1233.
- (35) Buxbaum, J. D., Daly, M., Devlin, B., Lehner, T., Roeder, K., and State, M. (2013). The autism sequencing consortium: large scale, high throughput sequencing in autism spectrum disorders. *Neuron* 76, 1052–1056.
- (36) Betancur, C. (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.* 1380, 42–77.

- (37) Sener, E. F., Canatan, H., and Ozkul, Y. (2016). Recent advances in autism spectrum disorders: applications of whole exome sequencing technology. *Psychiatry Investig.* 13, 255–264.
- (38) Neale, B. M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K. E., Sabo, A., et al. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485, 242–245.
- (39) Merico, D., Nicolson, R., Patel, R. V., Whitney, J., Deflaux, N., Bingham, J., et al. (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* 20, 602–611.
- (40) Iossifov, I., O'Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., et al. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515, 216–2
- (41) Patel, Z. H., Kottyan, L. C., Lazaro, S., Williams, M. S., Ledbetter, D. H., Tromp, G., et al. (2014). The struggle to find reliable results in exome sequencing data: filtering out Mendelian errors. *Front. Genet.* 5:16.
- (42) Geisheker, M. R., Heymann, G., Wang, T., Coe, B. P., Turner, T. N., Stessman, H. A. F., et al. (2017). Hotspots of missense mutation identify neurodevelopmental disorder genes and functional domains. *Nat. Neurosci.* 20, 1043–1051.
- (43) O'Roak, B. J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J. J., Girirajan, S., et al. (2011). Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat. Genet.* 43, 585–589.
- (44) Sanders, S. J., Murtha, M. T., Gupta, A. R., Murdoch, J. D., Raubeson, M. J., Willsey, A. J., et al. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 485, 237–241.
- (45) Ronemus, M., Iossifov, I., Levy, D., and Wigler, M. (2014). The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nat. Rev. Genet.* 15, 133–141.
- (46) Ozonoff, S., Young, G. S., Carter, A., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L., et al. (2011). Recurrence risk for autism spectrum disorders: a baby siblings research consortium study. *Pediatrics* 128, e488–e495.
- (47) de Kluiver, H., Buizer-Voskamp, J. E., Dolan, C. V., and Boomsma, D. I. (2016). Paternal age and psychiatric disorders: a review. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 174, 202–213.

- (48) Janecka, M., Mill, J., Basson, M. A., Goriely, A., Spiers, H., Reichenberg, A., et al. (2017). Advanced paternal age effects in neurodevelopmental disorders - review of potential underlying mechanisms. *Transl. Psychiatry* 7:e1019.
- (49) Atsem, S., Reichenbach, J., Potabattula, R., Dittrich, M., Nava, C., Depienne, C., et al. (2016). Paternal age effects on sperm FOXP1 and KCNA7 methylation and transmission into the next generation. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4996–5005.
- (50) Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., et al. (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285–299.
- (51) Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., et al. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471–475.
- (52) Gratten, J., Wray, N. R., Peyrot, W. J., McGrath, J. J., Visscher, P. M., and Goddard, M. E. (2016). Risk of psychiatric illness from advanced paternal age is not predominantly from de novo mutations. *Nat. Genet.* 48, 718–724.
- (53) Brandler, W. M., Antaki, D., Gujral, M., Noor, A., Rosanio, G., Chapman, T. R., et al. (2016). Frequency and complexity of de novo structural mutation in autism. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 667–679.
- (54) Human Mutation Landrum MJ, Kattman BL. ClinVar at five years: Delivering on the promise. *Hum Mutat.* 2018 Nov;39(11):1623-1630. doi: 10.1002/humu.23641.
- (55) DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. Firth, H.V. et al., 2009. *Am.J.Hum.Genet* 84, 524-533 (DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010))
- (56) VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. Christos Kopanos, Vasilis Tsiolkas, Alexandros Kouris, Charles E. Chapple, Monica Albarca Aguilera, Richard Meyer, and Andreas Massouras. Oxford Bioinformatics, bty897, 30 October 2018. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
- (57) Lim, E. T., Uddin, M., De Rubeis, S., Chan, Y., Kamumbu, A. S., Zhang, X., et al. (2017). Rates, distribution and implications of postzygotic mosaic mutations in autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* 20, 1217–1224.
- (58) Sebastian Köhler, Leigh Carmody, Nicole Vasilevsky, Julius O B Jacobsen, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Research.* (2018) doi: 10.1093/nar/gky1105

- (59) Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581, 434–443 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- (60) He, X., Sanders, S.J., Liu, L., De Rubeis, S., Lim, E.T., Sutcliffe, J.S., Schellenberg, G.D., Gibbs, R.A., Daly, M.J., Buxbaum, J.D., et al. (2013). Integrated model of de novo and inherited genetic variants yields greater power to identify risk genes. *PLoS Genet.* 9, e1003671.
- (61) Ben-Shalom, R., Keeshen, C.M., Berrios, K.N., An, J.Y., Sanders, S.J., and Bender, K.J. (2017). Opposing effects on NaV1.2 function underlie differences between SCN2A variants observed in individuals with autism spectrum disorder or infantile seizures. *Biol. Psychiatry* 82, 224–232.
- (62) Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stessman, H.A., Coe, B.P., Penn, O., Witherspoon, K., Gerds, J., Baker, C., Vulto-van Silfhout, A.T., et al. (2014). Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* 158, 263–276.
- (63) Ruzzo, E.K., Pe´ rez-Cano, L., Jung, J.Y., Wang, L.K., Kashef-Haghighi, D., Hartl, C., Singh, C., Xu, J., Hoekstra, J.N., Leventhal, O., et al. (2019). Inherited and de novo genetic risk for autism impacts shared networks. *Cell* 178, 850-866.e26.
- (64) Willsey, A.J., Sanders, S.J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A.T., Muhle, R.A., Reilly, S.K., Lin, L., Fertuzinhos, S., Miller, J.A., et al. (2013). Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell* 155, 997–1007.
- (65) Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*. 2020;180(3):568-584.e23.
- (66) Abrahams BS, Arking DE, Campbell DB, et al. SFARI Gene 2.0: a community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs). *Mol Autism*. 2013;4(1):36.
- (67) Dong Z, Chen W, Chen C, et al. CUL3 Deficiency Causes Social Deficits and Anxiety-like Behaviors by Impairing Excitation-Inhibition Balance through the Promotion of Cap-Dependent Translation. *Neuron*. 2020;105(3):475-490.e6.
- (68) Gonatopoulos-Pournatzis T, Niibori R, Salter EW, et al. Autism-Misregulated eIF4G Microexons Control Synaptic Translation and Higher Order Cognitive Functions. *Mol Cell*. 2020;77(6):1176-1192.e16.

- (69) Matsumura K, Seiriki K, Okada S, et al. Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes. *Nat Commun.* 2020;11(1):859. Published 2020 Feb 26.
- (70) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.
- (71) Sparks SE, Krasnewich DM. Congenital Disorders of N-Linked Glycosylation and Multiple Pathway Overview. 2005 Aug 15 [Updated 2017 Jan 12]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1332/>
- (72) Belal H, Nakashima M, Matsumoto H, et al. De novo variants in RHOBTB2, an atypical Rho GTPase gene, cause epileptic encephalopathy. *Hum Mutat.* 2018;39(8):1070-1075.
- (73) Straub J, Konrad EDH, Grüner J, et al. Missense Variants in RHOBTB2 Cause a Developmental and Epileptic Encephalopathy in Humans, and Altered Levels Cause Neurological Defects in Drosophila. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):44-57.
- (74) Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* 2017;136:1093–111.
- (75) Bick D, Jones M, Taylor SL, Taft RJ, Belmont J. Case for genome sequencing in infants and children with rare, undiagnosed or genetic diseases. *J Med Genet.* 2019;56(12):783-791.
- (76) Szego MJ, Zawati MH. Whole Genome Sequencing as a Genetic Test for Autism Spectrum Disorder: From Bench to Bedside and then Back Again. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2016;25(2):116-121.
- (77) Webber EM, Hunter JE, Biesecker LG et al. Evidence-based assessments of clinical actionability in the context of secondary findings: updates from ClinGen's Actionability Working Group. *Human Mutation* 2018; 39:1677–85.
- (78) Friedman JM, Bombard Y, Cornel MC, Fernandez CV, Junker AK, Plon SE, Stark Z, Knoppers BM. Genome-wide sequencing in acutely ill infants: genomic medicine's critical application? *Genet Med* 2018 (published Online First: 2018/06/14).