



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Traballo de
fin de grao

Secuenciación de exomas en trastornos do neurodesenvolvemento de especial dificultade diagnóstica

Secuenciación de exomas en trastornos del neurodesarrollo de especial dificultad diagnóstica

Exome sequencing in neurodevelopmental disorders of special diagnostic difficulty

Autora: Ana López Penedo

Titor: Ángel María Carracedo Álvarez

Cotitor: Julio Rodríguez López

Departamento: Medicina Xenómica. Pediatría

Curso académico: 2020-2021

Convocatoria Xuño 2021

Resumen.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Trastornos del neurodesarrollo.....	6
1.1.1 Discapacidad intelectual.....	6
1.1.2 Trastorno de la comunicación.....	7
1.1.3 Trastorno del espectro del autismo (TEA).....	9
1.1.4 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH).....	10
1.1.5 Trastorno específico del aprendizaje.....	11
1.1.6 Trastorno motor.....	12
1.2 Comorbilidad de los trastornos del neurodesarrollo.....	13
1.2.1 Epilepsia como comorbilidad.....	15
1.2.2 Modelo del doble impacto (two-hit) y expresividad variable.....	15
1.3 Etiología de los trastornos del neurodesarrollo.....	16
1.3.1 Factores ambientales.....	16
1.3.2 El papel de la genética en los trastornos del neurodesarrollo.....	16
1.4 Utilidad del diagnóstico genético en los trastornos del neurodesarrollo:.....	17
1.4.1 Variantes genéticas.....	18
1.4.2 Técnicas de investigación genética.....	18
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Probando afecto 1.....	17
2.2 Probando afecto 2.....	17
2.3 Probando afecto 3.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
4.1 Columnas de anotación de variantes:.....	21
4.1.1 Definición de la variante:.....	21
4.1.2 Anotaciones de posición genómica con respecto al gen y cambios en la secuencia de aminoácidos:.....	22
4.1.3 Anotaciones de frecuencia poblacional:.....	24
4.1.4 Anotaciones internas:.....	25
4.1.5 Anotaciones clínicas:.....	25
4.1.6 Anotaciones de la predicción de patogenicidad:.....	26
4.2 Criterios para el filtrado inicial de variantes:.....	27
4.3 Priorización de variantes:.....	28
4.4 Clasificación de las variantes:.....	28

4.5	Aspectos éticos del estudio.....	31
5.	RESULTADOS.....	32
5.1	Probando afecto 1.....	32
5.2	Probando afecto 2.....	33
5.3	Probando afecto 3.....	34
6.	DISCUSIÓN.....	35
6.1	Probando afecto 1.....	35
6.2	Probando afecto 2.....	36
6.3	Probando afecto 3.....	37
7.	CONCLUSIONES.....	38
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

Resumen

Antecedentes: los trastornos del neurodesarrollo (TND), son un conjunto heterogéneo de cuadros clínicos que tienen en común la presencia de alteraciones cognitivas y del comportamiento de comienzo en el período del desarrollo y que producen limitaciones funcionales en varios ámbitos de la vida de quien lo padece. Si bien su etiología es compleja y múltiple, tienen una base genética predominante. En ellos puede existir una variación común que contribuye a la enfermedad pero también variantes raras, la mayoría de las cuales son mutaciones puntuales que requieren de paneles de genes o análisis de exomas o genomas completos.

Objetivo: El objetivo principal de este trabajo consiste llevar a cabo un análisis del exoma completo de tres pacientes con TND complejos, los cuales muestran un fenotipo grave, claramente sindrómico, lo que puede indicar una posible causa genética subyacente, y cuyo diagnóstico no ha sido esclarecido con otros test genéticos de rutina previos.

Métodos: Partiendo de la clínica de cada sujeto, se utilizaron un conjunto de herramientas *in silico* para aplicar una serie de criterios de filtrado de variantes, teniendo en cuenta criterios de calidad, la posición genómica, los cambios de aminoácidos, las frecuencias poblacionales y la clínica asociada de cada una. Posteriormente, se consultaron diferentes bases de datos (OMIM, ClinVar, Varsome) para el análisis y priorización de las variantes candidatas tras el filtrado inicial y se clasificaron las variantes según su patogenicidad atendiendo a los criterios propuestos por la *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Finalmente, se llevó a cabo una caracterización bibliográfica de los genes en relación con la historia clínica de los individuos.

Resultados: Hallamos variantes que explican el fenotipo de los tres probandos afectos aportándonos el diagnóstico genético de cada uno de ellos.

Palabras clave: trastorno del neurodesarrollo, trastorno del espectro autista, trastorno por déficit de atención/hiperactividad, discapacidad intelectual, comorbilidad, fenotipo sindrómico, genética del neurodesarrollo, medicina genómica, medicina de precisión, Next Generation sequencing, secuenciación de exomas, variantes puntuales, genética clínica, priorización de variantes, análisis genómico, biomedicina.

Resumo

Antecedentes: Os trastornos do neurodesenvolvemento (TND) son un conxunto heteroxéneo de cadros clínicos que teñen en común a presenza de alteracións cognitivas e do comportamento que comezan no período do desenvolvemento e que producen limitacións funcionais en varias áreas da vida da persoa. Aínda que a súa etiloxía é complexa e múltiple, teñen unha base xenética predominante. Neles, hai unha variación común que contribúe á enfermidade pero tamén variacións raras, a maioría das cales son mutacións puntuais que requiren paneis xénicos ou análise de exomas ou xenomas completos.

Obxectivos: o principal obxectivo deste traballo é realizar unha análise do exoma completo de tres pacientes con TND complexo, que amosan un fenotipo grave claramente sindrómico, que pode indicar unha posible causa xenética subxacente e cuxo diagnóstico non foi aclarado con outras probas xenéticas de rutina anteriores.

Métodos: partindo da clínica de cada suxeito, utilizáronse un conxunto de ferramentas in silico para aplicar unha serie de criterios de filtrado de variantes, tendo en conta criterios de calidade, posición xenómica, cambios de aminoácidos, frecuencias poboacionais e a clínica asociada de cada un. Posteriormente, consultáronse diferentes bases de datos para a análise e priorización das variantes candidatas despois do filtrado inicial e clasificáronse as variantes segundo a súa patoxenicidade de acordo cos criterios propostos pola *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Finalmente, levouse a cabo unha caracterización bibliográfica dos xenes en relación coa historia clínica dos individuos.

Resultados: atopamos variantes que explican o fenotipo dos tres probandos afectados, proporcionándonos o diagnóstico xenético de cada un deles.

Palabras clave: trastorno do neurodesenvolvemento, trastorno do espectro autista, déficit de atención/hiperactividade, discapacidade intelectual, comorbilidade, fenotipo sindrómico, xenética do neurodesenvolvemento, medicina xenómica, medicina de precisión, Next Generation Sequencing, secuenciación de exomas, variantes puntuais, xenética clínica, priorización de variantes, análise xenómico, biomedicina.

Abstract

Background: Neurodevelopmental disorders (NDDs) are an heterogeneous set of clinical features that have in common the presence of cognitive and behavioral impairments that begin early onset in the developmental period and produce functional limitations in several situations of the person's daily life. Although their etiology is complex and multiple, they have a predominant genetic basis. Some of them have common variations that contribute to the disease, but there are also rare ones, most of which are point mutations that require gene panels or analysis of exomes or even complete genomes in order to achieve the diagnosis.

Objective: The main objective of this project is to carry out an analysis of the complete exome of three patients with complex NDDs. They show a severe phenotype, which may indicate a possible underlying genetic cause, and their diagnosis has not been clarified with other previous routine genetic tests.

Methods: Starting from the phenotype of each subject, a set of in silico tools were used to apply some variant filtering criteria, taking into account quality criteria, genomic position, amino acid changes, population frequencies and associated clinic of each one. Subsequently, different databases were consulted for the analysis and prioritization of the candidate variants that remained after the initial filtering, and they were classified according to their pathogenicity using the criteria proposed by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Finally, a bibliographic characterization of the genes was carried out considering the clinical history of the individuals.

Results: We found variants that may explain the phenotype of the three affected children, providing us with the genetic diagnosis for each one of them.

Keywords: neurodevelopmental disorder, autism spectrum disorder, attention-deficit hyperactivity disorder, intellectual disability, comorbidity, syndromic phenotype, neurodevelopmental genetics, genomic medicine, precisión medicine, Next Generation sequencing, point variants, clinical genetics, variant prioritization, genomic analysis, biomedicine.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO.

Bajo el nombre de trastornos del neurodesarrollo (TND), se engloban un conjunto heterogéneo de cuadros clínicos que tienen en común la presencia de alteraciones cognitivas y del comportamiento de comienzo en el período del desarrollo (en la mayoría de los casos antes del inicio de la etapa escolar). Estos déficits dificultan la adquisición y ejecución de funciones intelectuales, motoras y sociales específicas, que se valoran como inferiores a las esperadas para la edad cronológica del paciente y terminan afectando al terreno personal, al de las relaciones sociales, al ámbito académico y posteriormente, al ocupacional del paciente. Su etiopatogenia, en muchos casos desconocida, es muy compleja y se basa esencialmente en la variación en el crecimiento y desarrollo del cerebro, asociando una alteración funcional del mismo (1, 2, 3).

El diagnóstico clínico pueda ser dificultoso e insuficiente, jugando un papel importante la valoración neuropsicológica y multidisciplinar debido a la ausencia de biomarcadores específicos, la presencia aislada de manifestaciones clínicas de los respectivos en individuos “normales” no considerándose por ello patológico y teniendo que atender a su gravedad o presentación en una edad que no le corresponde para determinar su inclusión en un TND; así como la ausencia de límites claros entre unos y otros trastornos debido a la concurrencia de síntomas entre ellos y la frecuente comorbilidad asociada (4, 5).

El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5, en inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) establece una clasificación que organiza a estos trastornos en seis entidades diferentes y con frecuencia coexistentes en un mismo individuo: discapacidad intelectual (DI), trastornos de la comunicación, trastorno del espectro del autismo (TEA), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno específico del aprendizaje y trastornos motores (1).

1.1.1 Discapacidad intelectual.

La discapacidad intelectual (DI) se define como un trastorno con inicio en el período del desarrollo definido por déficits de las funciones intelectuales y adaptativas que provocan una limitación funcional en una o más actividades de la vida diaria.

Las limitaciones en el comportamiento adaptativo se basan en la afectación de al menos una de las siguientes tres esferas: conceptual (incluye competencias en lenguaje, lectura o escritura), práctico (cuidado personal, organización de las tareas de trabajo) y social (empatía, habilidades de comunicación interpersonal). Tras el estudio de estos tres dominios, se establece un diagnóstico de gravedad en cuatro grados: leve, moderado, grave y profundo.

Si bien la DI no suele ser progresiva, tiende a mantenerse a lo largo de toda la vida del paciente, con niveles de severidad que pueden fluctuar en el tiempo (1).

Su estudio debe basarse en una evaluación clínica individualizada y en el uso de test neuropsicológicos y de inteligencia estandarizados. Las personas con DI manifiestan una puntuación de aproximadamente dos o más desviaciones estándar por debajo de la media para individuos de la misma edad, sexo y contexto sociocultural del paciente y un coeficiente intelectual (CI) menor de 70 (1). Muchos artículos hablan a favor de un abordaje multidisciplinar y psicológico más amplio que el tradicional uso exclusivo de la puntuación del CI para definir a una persona como discapacitada intelectualmente (1, 6, 7).

De acuerdo con los resultados aportados en 2014 por el “*Centers for Disease Control and Prevention*” (CDC), su prevalencia es de en torno el 1,10% siendo más frecuente en varones (1,5:1) (8).

Mención a parte merece el denominado retraso del desarrollo global, reservado de acuerdo con la DSM para “*individuos menores de cinco años cuando el nivel de severidad clínico no puede ser valorado de forma fiable durante la infancia temprana*”, requiriendo una reevaluación posterior (1).

1.1.2 Trastorno de la comunicación.

La comunicación se define como cualquier comportamiento verbal o no verbal que influya en la conducta, ideas o actitudes hacia otro individuo de manera intencionada o involuntaria.

Los trastornos de la comunicación se dividen a su vez en: trastornos del lenguaje, trastornos fonológicos, trastornos de fluidez de inicio en la infancia, o tartamudeo, y trastornos de la comunicación.

Es de especial importancia tener en cuenta el contexto sociocultural del individuo.

1.1.2.1 Trastorno del lenguaje.

Por lenguaje se entiende el uso, forma y función de un conjunto convencional de símbolos en una manera ordenada por reglas para el acto comunicativo.

Dentro de este subgrupo se engloban déficits en la comprensión o producción del lenguaje debido a dificultades en su adquisición y empleo. Estas limitaciones afectan al léxico (como un vocabulario reducido) y a la gramática (estructuras de oraciones limitadas) y pueden alterar predominantemente a la habilidad expresiva (capacidad de emitir señales vocales, gestuales o verbales) o receptiva (recepción y comprensión de mensajes), en cuyo caso el pronóstico es más infausto y con mayor resistencia al tratamiento. Interfieren en las esferas académica, ocupacional o social y no pueden ser atribuibles a otras condiciones médicas (1, 9).

Se inicia en el período del desarrollo, mas no es hasta pasados los cuatro años cuando las diferencias se hacen más evidentes y más fácilmente medibles.

El diagnóstico se basa en la historia y observación del niño en diferentes contextos, información que puede ser aportada por los padres o profesores y, por otro lado, la realización de test de habilidades del lenguaje estandarizados, que ayudan a establecer la severidad de la situación (1, 9).

1.1.2.1 Trastorno fonológico.

Se caracterizan por dificultades para la articulación clara de fonemas alterando la inteligibilidad del habla. Se sustenta en mecanismos muy heterogéneos que incluyen un conocimiento de los sonidos y una capacidad de coordinación de los movimientos articulatorios. Ocasiona limitaciones en la comunicación eficaz de mensajes verbales que interfieren con los ámbitos académico-socio-ocupacionales del paciente. Como en todo TND, es de inicio temprano en el período del desarrollo y no es atribuible a otra causa médica subyacente (1). Un correcto diagnóstico y tratamiento eficaz permite en ocasiones mejorar las dificultades que pueden no estar presentes a lo largo de toda la vida del paciente.

1.1.2.2 Trastorno de la fluidez de inicio en la infancia (tartamudeo).

Inadecuación para la edad del paciente de la fluidez y organización temporal normal del habla. Estas perturbaciones producen ansiedad en el paciente al hablar, sobre todo en determinados contextos como la presentación de un proyecto en público. Situaciones de estrés o ansiedad pueden exacerbar los síntomas que llegan a limitar la comunicación eficaz y con ello el rendimiento académico, laboral y las interrelaciones personales. Se inicia en el período del desarrollo, en la mayoría de los casos entre los 2 y 7 años. A medida que el niño crece y se hace consciente de su limitación, tiende a crear mecanismos de evitación de las situaciones incómodas y exacerbadoras de sus disfluencias, como no hablar en público o hacerlo con expresiones cortas (1).

1.1.2.4 Trastorno de la comunicación social (pragmático).

Los trastornos de la comunicación social incluyen cuadros clínicos donde el paciente a pesar de haber desarrollado una expresión del lenguaje correcta manifiesta dificultades para un uso adecuado de él en la comunicación social tanto verbal como no verbal, con dificultades para adaptarse al contexto en el que se encuentra, incapacidad de seguir las normas de conversación, como respeto del turno de palabra y limitaciones para comprender significados no literales o ambiguos, entre otros. Todo esto condiciona las funciones del individuo en ciertos ámbitos. (1, 9)

Debido a su dependencia en el desarrollo del lenguaje, es raro el diagnóstico antes de los cuatro años si bien el inicio debe tener lugar en la infancia temprana. En las formas más leves, el diagnóstico puede demorarse incluso hasta la adolescencia.

1.1.3 Trastorno del espectro del autismo (TEA).

El TEA es la segunda discapacidad del desarrollo más frecuente, por detrás de la DI (10).

Bajo este nombre, se engloban diagnósticos según la anterior guía, la DSM-IV-TR, de: trastorno autista, enfermedad de Asperger o trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otro modo (11). Con la nueva clasificación vigente en su versión más actual (DSM-5) y la empleada para la realización de este Trabajo de Fin de Grado, se pasa de una conceptualización categorial a una perspectiva más dimensional y apoyando una denominación genérica de TEA para expresar el concepto de autismo, entendido ahora como un espectro de trastornos que manifiestan una severidad diversa (12).

Se distinguen dos tipos de síntomas y signos diferentes necesarios para establecer el diagnóstico del trastorno (1, 12):

- A. Déficits en la comunicación e interacción social: persistentes en diversos contextos, se manifiesta por: (i) carencia de reciprocidad socioemocional (p.e. incapacidad para compartir emociones), (ii) deficiencias en las conductas comunicativas no verbales (p.e. uso atípico del contacto visual), (iii) alteraciones en el desarrollo, mantenimiento y comprensión de las relaciones (p.e. preferencia por actividades en solitario)
- B. Patrones de comportamiento, intereses o actividades restrictivos y reiterativos: con rechazo al cambio, son manifestados por dos o más de los siguientes puntos: (i) movimientos, empleo de objetos o habla estereotipados o repetitivos, (ii) monotonía e inflexibilidad de rutinas, (iii) intereses muy limitados y fijos anormales y (iv) hipo o hiperactividad ante estímulos sensoriales del entorno.

Estos criterios deben ir acompañados de lo citado a continuación para emitir un juicio clínico de TEA:

- C. Presencia de los síntomas en las primeras fases del desarrollo, por lo general, entre los 12 y 24 meses de vida si bien intervenciones posteriores pueden provocar un enmascaramiento de las manifestaciones en ciertos contextos.
- D. Como consecuencia, se produce un deterioro en la participación social, los logros académicos o el desempeño laboral.
- E. Se debe descartar que estos síntomas puedan ser debidos a una discapacidad intelectual o por el retraso global del desarrollo.

Es importante para el diagnóstico la información aportada por los padres y/o cuidadores sumado a los resultados de test psicométricos estandarizados como el ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule), uno de los más utilizados (10). Con todo esto, se establecen diferentes grados de gravedad. Se debe tener en cuenta que la severidad puede variar dependiendo del contexto y fluctuar en el tiempo. Así mismo, se debería evaluar por separado los síntomas asociados al criterio A y aquellos relacionados con el B.

Categoría dimensional del TEA en el DSM-5	Comunicación social	Comportamientos restringidos y repetitivos
Dentro de la normalidad	Peculiar o aislado pero carente de interferencias	No interferencia
Síntomas subclínicos	Ciertos síntomas en esta o ambas dimensiones pero sin alteraciones significativas	Presencia de atípico o excesivo interés sin que llegue a interferir
Grado 1 “Necesita ayuda”	Alteraciones significativas pero sin apoyo in situ	Interferencia significativa en uno o más contextos
Grado 2 “Necesita ayuda notable”	Marcado déficit: respuestas breves o atípicas limitada iniciación	Inflexibilidad y dificultades del cambio de foco que interfieren con frecuencia
Grado 3 “Necesita ayuda muy notable”	Mínima comunicación social	Notable alteración en la vida diaria por inflexibilidad y dificultades de cambio y fijación de atención

Tabla 1: Niveles de gravedad del TEA (1, 12).

Existe una gran variabilidad fenotípica del cuadro, que debe ser reflejada mediante la utilización de especificadores que actúan como factores influyentes en la gravedad e indican, entre otros, si existe relación con un síndrome genético concreto o si están presentes comorbilidades asociadas como DI o alteraciones del lenguaje (12).

A medida que los niños con TEA crecen, tienden a enmascarar sus dificultades en público mediante el desarrollo de estrategias de compensación e imitación de mecanismos, pero a cambio, sufren un gran estrés y esfuerzo en mantener esa “fachada social” aceptable. Recientes estudios han demostrado la existencia de una tendencia con la edad a la mejora de los síntomas y de la adaptación funcional (1).

El TEA es un trastorno con prevalencia en aumento, en probable relación con la introducción de cambios en los criterios diagnósticos en la nueva versión de la DSM y una mejora en la detección y evaluación de los pacientes (13). Los últimos datos reflejan una prevalencia en la población general de entorno el 1% (14).

Así mismo, el CDC en el año 2012 ha estimado una proporción significativamente mayor de TEA entre los niños de ocho años (23,6 por 1.000) en comparación con las niñas de la misma edad (5,3 por 1.000) (8) considerándose una probabilidad en aquellos tres veces mayor de estar afectados (14). Característicamente, la DI asociada a TEA, tiene una prevalencia mayor en proporción en el sexo femenino (12).

1.1.4 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH).

El TDAH es un TND representado por un patrón comportamental y de funciones cognitivas susceptible de provocar dificultades en el funcionamiento cognitivo, educacional y/o laboral.

Se caracteriza por dos tipos principales de síntomas persistentes: inatención (falta de persistencia, concentración dificultosa o desorganización no achacada a deficiencia ni falta de comprensión) y/o hiperactividad (actividades motoras excesivas e inapropiadas, inquietud, habla excesiva...) e impulsividad (acciones precipitadas, deseo de

gratificación inmediata). Pueden coexistir o predominar uno de ambos, en cuyo caso debe ser indicado cuál (1).

La manifestación es evolutiva, con un inicio anterior a los 12 años, aunque la disfunción asociada puede aparecer después. A excepción del sexo femenino, donde las primeras manifestaciones pueden corresponder con un cuadro de inatención, en la gran mayoría de los casos los primeros síntomas son de excesiva actividad motora (15). Suelen tener un patrón oscilante que puede continuar hasta la edad adulta (16).

Su manifestación tiene lugar en más de un contexto si bien varían dependiendo de la situación, llegando incluso a estar ausentes cuando reciben constante estimulación externa o interactúan con una sola persona.

Existen pruebas claras que demuestran que estas alteraciones interfieren con la actividad académica del sujeto, con menor proporción de escolarización, reducción del funcionamiento escolar, peores resultados etc. Se evidencia una baja y pobre ocupación profesional y la presencia de conflictos interpersonales, rechazo social... Es mayor la presencia de trastornos de personalidad antisocial, el riesgo de abuso de sustancias y encarcelamiento, de conductas autolíticas, y otros comportamientos problemáticos (1).

En determinados pacientes se han observado incremento de ondas lentas en el electroencefalograma (EEG) y volumen total cerebral reducido en la resonancia magnética (RM) (1), pero estos hallazgos no son diagnósticos, por lo que el abordaje es principalmente clínico, mediante el uso de escalas para la evaluación de los síntomas en diferentes ámbitos (16).

La prevalencia del TDAH es un tema de gran controversia (16). Estudios recientes reflejan una prevalencia de entre el 5 y el 10% en la población mundial que disminuye con la edad (15, 17, 18). En España, la prevalencia para niños y adolescentes se estima ser del 6,8%, con una mayor proporción en el sexo masculino (la ratio oscila entre 2:1 y 4:1) (19). Estas diferencias se han asociado con la histórica mayor relevancia diagnóstica de la clínica conductual en comparación con la inatención, perfil más asociado a las niñas y que tiende a pasar más desapercibido (1, 15).

1.1.5 Trastorno específico del aprendizaje.

Dificultades en el aprendizaje y en las capacidades académicas, que son inferiores a las esperadas para la edad cronológica del paciente e interfieren sustancialmente en su rendimiento escolar y posteriormente laboral pudiendo llegar a influir en su vida cotidiana. Aunque pueden no manifestarse hasta más adelante, su inicio tiene lugar en la edad escolar. Se puede ver alterado tanto el ámbito de las letras (dificultades en la expresión escrita, en la ortografía o limitaciones para comprender lo que lee) como el de los números (problemas para la comprensión numérica, del cálculo y del razonamiento matemático). Se mantienen al menos durante seis meses a pesar de las intervenciones dirigidas. No son mejormente explicables por otro tipo de trastorno o enfermedad ni pueden ser atribuidos a factores externos como falta de educación o desventajas económicas (1, 20).

Las limitaciones son cuantificables mediante medidas estandarizadas (p.e, una desviación estándar de al menos 1.5 por debajo de la media para la edad) sumadas a una evaluación clínica integral teniendo en cuenta los datos aportados por la familia, informes escolares, valoraciones psicoeducativas etc. En contraposición a habilidades como andar o hablar, logros obtenidos durante la etapa del desarrollo consecuentemente a la maduración cerebral, los trastornos del aprendizaje solo pueden ser diagnosticados tras el inicio de la formación académica puesto que las competencias involucradas deben ser enseñadas y aprendidas. Es importante especificar las destrezas afectas y la gravedad del trastorno (1).

Tiene una prevalencia en torno al 5-15% en niños en edad escolar (20). Aunque en adultos no es del todo conocida, se cree que aproximadamente es del 4%. En cuanto al género, juega en contra del sexo masculino con una proporción hombre-mujer del 2-3:1 (1).

1.1.6 Trastorno motor.

Los trastornos motores del neurodesarrollo se subclasifican en diferentes categorías explicadas a continuación y pueden ser simples, si afectan a un músculo aislado o grupo muscular localizado, o complejos, si están involucrados diversos músculos o realizan una secuencia más compleja de movimientos (21).

1.1.6.1 Trastorno del desarrollo de la coordinación.

Torpeza, imprecisión, lentitud en la realización de habilidades motoras coordinadas que se encuentran muy por debajo de las esperables para la edad del paciente e interfieren en las actividades sociales, académicas y de otra índole. Se inician en la infancia temprana pero no se suelen diagnosticar antes de los 5 años dada la diferencia en la edad de adquisición de las competencias que entra dentro de lo normal. Deben ser descartadas otras causas. Tienen una prevalencia entre los 5 y los 11 años del 5-6% con una mayor afectación del sexo masculino con una ratio variable entre 2:1 y 7:1 (1).

1.1.6.2 Trastorno de movimientos estereotipados.

Comportamientos motores repetitivos, presuntamente sin finalidad y que asemejan ser dirigidos. Pueden o no responder a esfuerzos por parte del individuo por pararlos. En ocasiones se asocian a comportamientos potencialmente autolesivos si no se emplean medidas de prevención. La combinación de movimientos puede ser múltiple y se manifiesta en diferentes contextos muchas veces al día, con duración variable de pocos segundos a varios minutos o más. Se inicia en los primeros tres años de vida siendo necesario descartar otras posibles causas. La prevalencia de los movimientos estereotipados complejos se estima que es de en torno el 3-4% (1).

1.1.6.3 Trastorno de tics.

Un tic, se define como un movimiento o vocalización rápido, repentino, arrítmico y recurrente presente durante al menos un año. Como indica su definición, puede ser motor o vocal, si involucra a la musculatura laringofaríngea o diafragmática (2, 21).

A diferencia de los trastornos de movimientos estereotipados, en los tics la duración es inferior y su forma y localización no suelen ser tan fijas y repetitivas. Son automáticos y pueden ser suprimidos voluntariamente por un período de tiempo. El inicio puede ser posterior a los 3 años, pero no más allá de los 18, (frecuentemente comienzan entre los 4 y los 6 años), con evolución y gravedad cambiante y alcanzándose el pico de mayor severidad normalmente en torno a los 10-12 años, con tendencia a disminuir en la adolescencia. Son frecuentes en la infancia, pero tienen un carácter transitorio en la mayoría de los casos. En una gran parte de los casos pueden pasar desapercibidos dado que no alteran las actividades habituales. Cuando el niño es más mayor, suelen ir precedidos de la llamada urgencia premonitoria, sensación subjetiva no placentera que anticipa la aparición del tic, el cual calma este malestar (21). Debe descartarse que sean consecuencia del efecto de una sustancia u otra afectación médica (1).

Se clasifican a su vez en trastorno de la Tourette, caracterizado por tics motores múltiples asociados, aunque no necesariamente de manera concurrente, con al menos un tic vocal durante un año o más pudiendo cursar de manera intermitente; trastorno de tics motores o vocales persistente, definido por tics motores o vocales de más de un año de duración sin que ambos tipos hayan concurrido en el mismo período de tiempo. El tercer tipo dentro de esta categoría son los trastornos de tics transitorios, donde tics motores y/o vocales únicos o múltiples se manifiestan durante menos de un año. Los trastornos de Tourette tienen una prevalencia de entre 3 y 8 casos por cada 1.000 niños en edad escolar. La prevalencia es superior en los hombres, en proporción 2:1-4:1 (1).

1.2 COMORBILIDAD DE LOS TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO.

Existe una muy elevada concurrencia de diferentes TND entre sí o con otras condiciones médicas, tanto neurológicas como extraneurológicas (3, 22).

La presencia en un mismo individuo de diferentes TND supone dos problemas añadidos. El primero se relaciona con una mayor dificultad en el diagnóstico de estos pacientes, dado que muchos de estos trastornos interfieren en las actividades de la vida diaria de manera independiente, dificultando evaluar qué síntomas y alteraciones son debidas a un trastorno u otro. El segundo problema tiene que ver con la evolución y el pronóstico del individuo, ya que la comorbilidad asociada puede contribuir a una peor calidad de vida del paciente (1, 3).

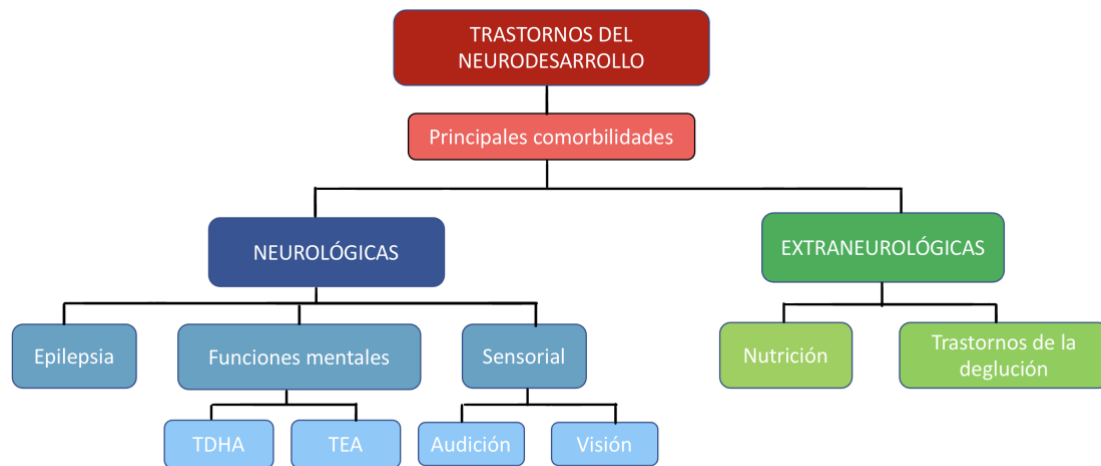


Fig. 1. Principales comorbilidades de los trastornos del neurodesarrollo (3).

También son frecuentes los síndromes genéticos relacionados con los TND o, dicho de otra manera, los TND que se presentan como un rasgo fenotípico más dentro de un síndrome genético (4). Por ejemplo, estereotipias autolesionales como manifestación de enfermedad de Lesch-Nyhan (21), el TEA en el síndrome del X frágil (12), el TDAH en el síndrome de Prader-Willi (3) o la DI con el síndrome de Down, pudiendo manifestar además un característico fenotipo físico (1).

El 8-16% de los pacientes con DI manifiestan concomitantemente TDAH (3, 5) y un 4-16% estereotipias y comportamientos autolesivos (1).

En cuanto al TDAH, diversos estudios han demostrado que su comorbilidad con otros TND se encuentra en torno al 60-70% (5). Cabe mencionar que es una de las condiciones que más frecuentemente se implica con el detrimento de la calidad de vida de quien lo padece (3). Destaca la concomitancia de trastornos motores, como el del desarrollo de la coordinación, presentes entre el 33-47% o los trastornos por tics, en el 18% (5). Dentro de los trastornos de la comunicación, los del lenguaje están presentes en el 12% de los casos, y de entre los específicos del aprendizaje, que coexisten en el 45% de los casos, el de la lectura es el más frecuente (3, 5) y hace que el pronóstico de salud mental en los últimos sea peor que si se manifestasen sin TDAH (1).

Otro TND con gran comorbilidad es el TEA. Se estima que el 70% de los pacientes con autismo serán diagnosticados en algún momento de un trastorno coexistente neuroevolutivo, de salud mental o física, o incluso comorbilidades múltiples. Entre los más frecuentes se encuentran los trastornos de ansiedad (42%), DI (31-33%) (23, 24); TDAH (31%), epilepsia (20%) o los trastornos por tics (11%) (23). Es frecuente así mismo su asociación con trastornos del lenguaje estructural (1).

Trastornos del aprendizaje, TDAH y otros TND están presentes en el 30% de los pacientes con trastornos del lenguaje (5).

1.2.1 Epilepsia como comorbilidad.

Si tuviésemos que destacar un proceso neurológico que tiene una elevada comorbilidad con los TND, este sería la epilepsia (3).

Se define como una enfermedad cerebral crónica debida a descargas anómalas de neuronas de la corteza cerebral que ocasionan convulsiones recurrentes. Tiene una prevalencia en España de 62,7 casos por cada 100.000 habitantes/año (3, 25).

Concurre en un tercio de los casos de TEA y de DI, sugiriendo una etiología común al menos en algunas formas (22, 26). Sin embargo, en ocasiones es difícil saber si es la epilepsia causa de una alteración del neurodesarrollo o si por el contrario ambas condiciones derivan de una lesión inicial del SNC (3). Por un lado, se han descrito genes responsables de alteraciones en el correcto desarrollo del SNC implicados en procesos como la neurogénesis cortical o alteraciones moleculares de canales iónicos, y por otra parte se ha constatado la implicación de las crisis epilépticas en cambios de la expresión génica o en la liberación de neurotransmisores, efectos que resultan en un impacto negativo sobre la cognición y la conducta (27).

Un estudio llevado a cabo en el 2016 por Casanova EL *et al.* evaluó la comorbilidad de una lista de casos de DI con origen molecular conocido extraído de la base de datos de Mendelian Inheritance in Man (MIM). Sus resultados reflejaron que el 45% de los casos de DI tenían TEA asociado, el 44% manifestaban una elevada comorbilidad con epilepsia y que el 55% de las situaciones relacionadas con autismo tenían como característica común a la epilepsia (22).

1.2.2 Modelo del doble impacto (two-hit) y expresividad variable.

En un intento de dar explicación a la elevada comorbilidad de los TND y al hallazgo de una misma variante en individuos sanos y en pacientes con un determinado fenotipo o entre personas con cuadros clínicos diferentes, se puede recurrir al modelo del doble impacto propuesto por Knudson AG *et al* en 1973. En él, se explica la heredabilidad de una mutación con capacidad oncogénica, pero para que el tumor se manifieste, deben tener lugar dos fenómenos: por un lado, la presencia del gen tumoral y por otro, una mutación en el alelo homólogo encargado de anular la capacidad oncogénica en condiciones normales y cuya inactivación supondría la pérdida de la capacidad supresora y la expresión del tumor (28).

Esto, extrapolado a los TND, podría explicar que la aparición de diversos fenotipos ante una variante concreta haría alusión a la presencia de otras variantes asociadas (28).

Sin embargo, este concepto con frecuencia se ve mezclado con el de expresividad variable, o grado de expresión individual de un fenotipo para un genotipo dado. Con este término, se alude al hecho de que un mismo genotipo produce manifestaciones clínicas diferentes en cuanto a tipo y grado de severidad dependiendo de la persona que lo porte (incluso dentro de una misma familia), con la teoría de que esto se pueda deber a la relación del gen con el resto del genoma y a la existencia de otras variantes no detectadas que serían las determinantes del fenotipo, pero también a una posible involucración de factores medioambientales y su interacción con el genoma.

La expresividad variable no debe ser confundida con el concepto de penetrancia, que se refiere a la proporción de individuos con una mutación patogénica que manifiestan alguna clínica asociada a ella, pudiendo ser esta completa, si en todo aquel que tenga la mutación, esta se expresa fenotípicamente; o bien incompleta, donde el porcentaje de expresión en la población varía.

1.3 ETIOLOGÍA DE LOS TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO.

Gran parte de los TND no tienen un origen etiopatogénico único, sino que es la interacción entre genética, epigenética y ambiente, la responsable de su aparición, demostrándose un carácter etiológico multifactorial (4, 29). Por lo tanto, en la mayoría de los casos se postula una herencia poligénica donde diferentes condicionantes exógenos y/o endógenos juegan un importante papel modulador (17, 21, 30).

1.3.1 Factores ambientales.

Se han estudiado eventos intrauterinos que afectan al temprano desarrollo fetal y otros insultos neonatales como posibles factores de riesgo para la aparición de TND (31). Así, la edad elevada parental, la exposición prenatal del feto a sustancias tóxicas como la nicotina, el ácido valproico o el alcohol o el crecimiento intrauterino retardado y el bajo peso al nacer, se han asociado a mayores tasas de TND (1, 22, 31, 32). Se estima que el 15% de los recién nacidos pretérmino presentarán un TND (1, 3, 31). Además, factores perinatales como accidentes obstétricos que lleguen a producir hipoxia fetal también han demostrado una asociación con este tipo de trastornos (1, 17). Mención necesaria merece el hecho de que estos factores por sí solos no son causa de TND, sino que es su actuación sobre el componente genético la que puede influir sobre su etiopatogenia.

1.3.2 El papel de la genética en los trastornos del neurodesarrollo.

Las bases del desarrollo del SNC se sustentan en el material genético. Mutaciones que alteren su correcto funcionamiento pueden predisponer a la aparición de TND, en las llamadas formas sindrómicas. En ellas es frecuente la confluencia de diferentes manifestaciones sistémicas, rasgos dismórficos y otras alteraciones que apoyan, sobre todo en los casos más graves, la complementación de la evaluación clínica con un correcto estudio genético (4). En prácticamente todos ellos se ha identificado la región genética responsable y se ajustan a un patrón de herencia de tipo mendeliano (28).

La coexistencia de diferentes TND en una misma persona ha llevado al planteamiento de la hipótesis de un posible origen común y heredabilidad compartida entre ellos. Estudios de hermanos gemelares corroboran la elevada correlación genética. Gracias a los nuevos avances, se ha visto que diferentes variantes se relacionan con diversos trastornos y que una misma alteración genética se asocia a más de un fenotipo distinto, quedando obsoleto el modelo de “un gen para una enfermedad” (3, 4, 5, 28).

La mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha señalan una heredabilidad de en torno al 0,77-0,88 y se centran en tres entidades en concreto: la DI, el TEA y el

TDAH, siendo escasas las referencias literarias de estudios científicos en lo que respecta al resto de TND (4).

Estudios genéticos, de adopción y de hermanos gemelares han establecido una alta heredabilidad del TDAH, de en torno el 75% (16, 17).

Por su parte, la del TEA se estima ser de entre el 37 al 90% (1, 12). Un análisis llevado a cabo en 2017 por Sandin *et al.*, proporcionó un porcentaje de herencia más preciso, del 83% (33). En el 15% de ellos, se asociaban a una mutación genética conocida (12) y en un 50% de los casos, la herencia puede ser explicada por los SNPs (34). La mayoría de los genes relacionados con el autismo se localizan en el núcleo y funcionan como reguladores epigenéticos nucleares, formando parte integral del desarrollo neural (22).

Sin embargo, también son frecuentes las mutaciones *de novo* o espontáneas, aquellas identificadas en el paciente sin haber sido heredadas de sus progenitores (18).

1.4 UTILIDAD DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN LOS TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO:

La rentabilidad diagnóstica de los TEA y la DI ha pasado de ser del 3-5% al 30-40% con la aparición de nuevas técnicas de mayor resolución como los microarrays cromosómicos los cuales se postulan como una de las técnicas de referencia de estos trastornos. Mención especial merecen también las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación como la secuenciación exómica, de ayuda en la resolución del origen genéticos de alta sospecha clínica donde los estudios previos reflejan conclusiones normales o no del todo aclaratorias (4).

Así mismo, estos avances han aumentado nuestros conocimientos sobre el TDAH, el mayormente estudiado en las últimas décadas, permitiendo identificar genes que previamente se relacionaban con otros TND, epilepsia o esquizofrenia en estos sujetos y patrones de heredabilidad y variantes presentes en la población general pero cuya prevalencia es mayor en pacientes con TDAH (4).

A parte de la tipificación etiológica de parte de los TND, su estudio genético permite descartar hipótesis diagnósticas alternativas, evitar la realización de pruebas innecesarias, o estudiar y prevenir afectaciones multisistémicas. Además, proporciona la posibilidad de ofrecer un consejo genético familiar y asesoramiento preconcepcional y prenatal para ayudar a comprender la naturaleza del proceso y a tomar decisiones en ocasiones muy difíciles como si tener o no más hijos o la realización de una intervención intrauterina. Esta decisión dependerá en parte de si ha sido identificada la causa genética del TND en su primer hijo. De ser así, y si la detectada es una mutación *de novo*, los hijos posteriores tendrán el mismo riesgo de TND que la población general. Permite también la anticipación terapéutica y la elección de nuevas líneas de tratamiento (4).

Las evidencias hasta la fecha demuestran la importancia de un diagnóstico y una intervención temprana y continua, con mejoría en muchos casos de los comportamientos adaptativos del individuo a lo largo de su vida (1).

1.4.1 Variantes genéticas.

Las diferencias individuales en relación con el material genético tienen que ver tan solo con el 1% de los genes, lo que quiere decir que el 99% restante será igual entre individuos (28).

Esta variabilidad genética está relacionada con la presencia de variantes, que pueden estar presentes en la población en una frecuencia superior al 1%, en cuyo caso se denominarán polimorfismos o variantes comunes; o en menos del 1%, las cuales reciben el nombre de variantes raras (28).

Los polimorfismos juegan un papel fundamental en el riesgo de TND, pero son las variantes raras las que confieren un riesgo individual más elevado por su mayor magnitud de efecto. Se establecen así dos modelos, el derivado de estas últimas, de gran tamaño e impacto superior, así como mayor tasa de mutaciones; y el derivado de variantes comunes, de pequeño tamaño, estables evolutivamente y cuya influencia génica se debe al sumatorio de varias variantes de baja magnitud de efecto (28, 35).

A parte de las variantes heredadas, son frecuentes las mutaciones *de novo* (DNM). Una DNM tiene una mayor probabilidad de patogenicidad sobre un individuo que la porta que, por ejemplo, una variante en el número de copias (CNV: *copy number variant*) heredada (36). Debido a esto, crece el interés por su detección y estudio.

Las variantes se dividen a su vez en variantes de secuencia, donde se afecta el orden en que los nucleótidos se ubican en la cadena de ADN, y las variantes estructurales (28). De las primeras, destacan las variantes de secuencia de un solo nucleótido (SNV: *single nucleotide variant*), denominándose polimorfismos de un solo nucleótido (SNP: *single nucleotide polymorphism*) cuando son vistas en más del 1% de la población. La mayor parte de las investigaciones genéticas hasta la fecha de TND se han centrado en las SNV, pues algunas de ellas se localizan en regiones del genoma que alteran la proteína codificada (28, 37).

Sin embargo, también se ha visto una fuerte asociación de TND con las variantes estructurales más habituales: las CNVs (12, 22). Afectan a una región de la cadena de ADN superior a 1kb, donde se ha producido una delección o inserción de un par de bases. Para su estudio se utilizan técnicas de *microarrays* (28).

1.4.2 Técnicas de investigación genética.

La citogenética ha sido una de las primeras técnicas desarrolladas en el ámbito de la genética. En ella, a través de métodos de tinción se permite ver con microscopía óptica la estructura de cada cromosoma, permitiendo conocer el cariotipo del paciente y la detección de variaciones estructurales de gran tamaño como delecciones, duplicaciones o traslocaciones. Permiten la identificación de TND en el contexto de síndromes como el

de Down o el X frágil. Su mayor limitación es que solamente permite reconocer alteraciones relativamente grandes (28).

Gracias a la aparición de la genética molecular, se puede realizar un estudio de la estructura y la función de los genes a través de secuencias de ADN o ARN con una resolución de hasta un nucleótido. Las dos técnicas más utilizadas son la hibridación *in situ*, basada en la capacidad de los ácidos nucleicos de unirse entre ellos, de modo que para identificar una secuencia de nucleótidos concreta se marca con fluoróforos y se observa si está presente en el material genético del paciente; y la reacción en cadena de polimerasa (PCR), cuyo objetivo es la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN concreto para su estudio (28).

Con el desarrollo de los *microarrays*, se ha conseguido el genotipado simultáneo de miles de variantes, de modo que se puede realizar un estudio de frecuencia de todos los marcadores genéticos en un grupo con una determinada enfermedad y otro que no la presentan y establecer hipótesis en caso de diferencias significativas. Son los llamados estudios de asociación global del genoma (GWA: *genome-wide association study*). Sin embargo, para su empleo se requiere el conocimiento *a priori* del genoma, lo que supone una limitación a la hora de estudiar variantes muy raras, de frecuencia poblacional inferior al 1%.

Para dar respuesta a estas limitaciones de los métodos anteriores nacen las técnicas de secuenciación masiva paralela, también conocidas como de nueva generación (NGS: *Next Generation Sequencing*). Estos nuevos procedimientos computacionales permiten la secuenciación masiva de nucleótidos de exomas e incluso del genoma completo y la identificación de estas SNV raras (28, 38).

2. ANTECEDENTES

Como hemos visto, muchas variantes genéticas pueden resultar en una amplia gama de expresividad fenotípica variable, no existiendo una probabilidad del 100% de que se desarrolle la enfermedad, lo que se denomina, penetrancia incompleta. Por ello, es importante proporcionar datos clínicos comprensivos al laboratorio para ayudar a la interpretación de la variante (37).

2.1 PROBANDO AFECTO 1

Paciente varón de 16 años que presenta Epilepsia, déficit cognitivo, trastorno del lenguaje expresivo y TDAH combinado. No se reportan antecedentes familiares.

2.2 PROBANDO AFECTO 2

Paciente varón de 11 años y 1 mes que presenta retraso global del desarrollo, déficit cognitivo leve, rasgos TEA y TDAH, cardiopatía congénita (CIV), fenotipo peculiar, facies sindrómica. No se reportan antecedentes familiares.

2.3 PROBANDO AFECTO 3

Paciente varón de 17 años que presenta rasgos dismórficos, retraso de crecimiento prenatal y postnatal, discapacidad intelectual y TEA. Ha sido diagnosticado previamente con “Síndrome de Dubowitz”, un trastorno malformativo caracterizado por retraso del crecimiento intrauterino, estatura baja, microcefalia, retraso mental leve con problemas de comportamiento, eccema y facies sindrómicas (39). No se han indicado antecedentes familiares.

3. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo principal llevar a cabo un análisis del exoma completo de tres pacientes con TND complejos, los cuales muestran un fenotipo grave, lo que puede indicar una posible causa genética subyacente, y cuyo diagnóstico no ha sido esclarecido con otros test genéticos de rutina previos.

Para ello, se partirá de la clínica de cada sujeto y, mediante la utilización de diferentes herramientas para la secuenciación del exoma y el empleo de criterios de filtrado, se buscarán variantes genéticas que permitan realizar un diagnóstico genético en cada uno de los probandos, todo ello apoyándose en la información recogida en diversas bases de datos.

Finalmente, tras la filtración y priorización de las variantes halladas, se llevará a cabo una caracterización bibliográfica de los genes candidatos en relación con la historia clínica de los individuos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de los probandos 1 y 2, el primer paso a realizar ha sido la búsqueda de mutaciones mediante la secuenciación NGS (Ion Proton) de toda la región codificante y de las regiones intrónicas flanqueantes de los genes incluidos en el exoma. Aquellas regiones de interés han sido capturadas en el probando 1, mediante SureSelectXT Clinical Research Exome (Agilent) el cual se basa en objetivos presentes en un conjunto de bases de datos (de las que hablaremos más adelante) tales como Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), the Human Genome Mutation Database (HGMD) y NCBI's ClinVar, sumado a regiones objetivo seleccionadas por la Universidad Emory y el Children's Hospital de Philadelphia; y en el probando 2 a través de SureSelectXT Focused Exome (Agilent). Gracias a estas herramientas se permite, partiendo del material genético extraído de una muestra en este caso de sangre, la informatización de la información obtenida del genoma de los probandos y su estudio *in silico*. Las lecturas de la NGS han sido en un primer momento filtradas para la eliminación de posibles errores o sesgos mediante su análisis con las herramientas informáticas TMAP 5.4.11, TVC 5.4-11, GATK v3.8-0, Picard 2.10.2-SNAPSHOT, BEDtools v2.26.0 y SAMtools 1.5 y ExomeDepth 1.1.10.

En el caso del probando 3, el método de preparación de librerías ha sido el TruSeq DNA Library Prep Kit (Illumina). Una vez preparado el material, tuvo lugar su secuenciación mediante el equipo Illumina NextSeq y la captura de las regiones de interés a través de las sondas xGen Exome Research Panel (Integrated DNA Technologies). Para analizar los datos obtenidos, se emplearon las siguientes herramientas informáticas: fastp v0.19.7, bwa 0.7.17-r1188, GATK v3.8-0, GATK v4.1.0.0, Picard 2.18.25, BEDTools v2.27.1, SAMtools 1.9, ExomeDepth 1.1.10, ANNOVAR 2018Apr16

Para la visualización de todos los datos que nos aporta la secuenciación genómica, se utiliza la herramienta Integrative Genomics Viewer (IGV) en su versión 2.3.90 (40, 41).

A continuación, las lecturas filtradas por la NGS deben ser alineadas con un genoma de referencia para realizar el análisis y la comparativa de la secuencia a estudio. En nuestro caso hemos utilizado el hg19 o GRCh37. Este genoma está compuesto por clones secuenciados primariamente como parte del Proyecto Genoma Humano (37, 42).

Basándonos en las puntuaciones de calidad y en el conteo de los alelos de las lecturas alineadas en un determinado locus, se utiliza un algoritmo para predecir la probabilidad de variantes en cada locus. Uno de los puntos que se tienen en cuenta son el promedio de cobertura horizontal y la profundidad de lectura o cobertura vertical. La cobertura horizontal se define como la información genómica expresada como porcentaje de lectura

mapeada contra su referencia, en este caso los exones y regiones intrónicas flanqueantes hasta 10pb (pares de bases). Cuanto mayor sea el porcentaje, más cubierto estará nuestro ADN a estudio. Por su parte, la profundidad de lectura media refleja cuántas veces fue secuenciado un locus concreto. Se expresan con la letra x precedido de un número que indica dicho número de lecturas. Cuanto mayor sea la profundidad, mayor será la confianza en la detección de variantes de baja frecuencia (43).

PROBANDOS	1	2	3
NÚMERO GENES ANALIZADOS	18 873	5 555	19 113
COBERTURA DE ANÁLISIS	86,60%	92,80%	97,20%
PROFUNDIDAD LECTURA MEDIA	93,8X	235,1X	144,4X
NÚMERO DE VARIANTES ANALIZADAS	81 643	28 891	53 344

Tabla 2: Número de genes, variantes, cobertura y profundidad.

Para la detección de aquellas variantes clínicamente significativas, partimos de 3 archivos de texto con extensión .tab, que contienen todas las variantes genéticas identificadas en cada individuo. Inicialmente, el probando 1 presentaba 81 643 variantes; el probando 2, 28 891; y el probando 3, 53 344 variantes.

Para reducir el campo de búsqueda, se lleva a cabo un filtrado de variantes teniendo en cuenta la información proporcionada con anterioridad y la información de calidad asociada a cada una. Para ello, hemos utilizado el software RStudio (44). Con él, en primer lugar hemos seleccionado aquellas columnas de información más relevantes y que se exponen en el punto 4.1, pasando de 180 a 44, y posteriormente hemos realizado una priorización de variantes, mencionada en el punto 4.2. Todos los datos se pasarán a un archivo en formato Excel con extensión .xlsx, donde la información de cada variante se expone en diferentes columnas, cada una de las cuales correspondiente a un aspecto determinado de la variante.

4.1 COLUMNAS DE ANOTACIÓN DE VARIANTES:

4.1.1 Definición de la variante:

- ❖ **Chr:** indica el cromosoma en el que se encuentra la variante.
- ❖ **Start:** se refiere a la posición de inicio del sitio de la variante en el cromosoma.
- ❖ **End:** marca la posición final de la variante en el cromosoma.

- ❖ **Ref:** señala la base genómica del nucleótido de referencia, monómero del ADN y ARN. Estos se dividen según su base nitrogenada en purinas y pirimidinas. Dentro de las purinas tenemos la adenina (A) y la guanina (G); las pirimidinas engloban a la timina (T), citosina (C) y uracilo (U) (45).
- ❖ **Alt:** indica el tipo de base variante por la cual se produjo el cambio. Si la variación se produce por una base del mismo tipo (purina por purina o pirimidina por pirimidina), entonces hablamos de una transición. En cambio, si el cambio es de una purina por una pirimidina o viceversa, entonces estaríamos ante una transversión. Las primeras son diez veces más frecuentes que las últimas.
- ❖ **Technology:** señala la tecnología que se utiliza.
- ❖ **Zygosity:** se refiere al grado en el que las dos copias (también conocidas como alelos) de un mismo gen tienen o no la misma secuencia genética. Hablamos de homocigoto cuando ambos alelos son idénticos y heterocigoto cuando son diferentes. Por último, el término hemocigoto hace referencia a la presencia de un único alelo para un determinado gen, lo que sucede con los cromosomas sexuales del varón XY (solo hay una copia de cada uno) o por la eliminación de un alelo, lo que produce una mutación (46).
- ❖ **Filter:** estado de filtrado de la variante (PASS, nada, o la razón por la que no PASS)
- ❖ **Depth:** indica la profundidad de lectura (43).
- ❖ **RefCount:** señala la profundidad de lectura del alelo de referencia (43).
- ❖ **AltCount:** en este caso, la profundidad de lectura se refiere a la del alelo variante (43).
- ❖ **Qual:** valor de calidad de la detección de la variante.

4.1.2 Anotaciones de posición genómica con respecto al gen y cambios en la secuencia de aminoácidos:

Para este apartado, se ha utilizado la base de datos The Reference Sequence (RefSeq) la cual, basándose en un conjunto de genomas y, a partir de éstos, transcritos y proteínas, se utiliza de referencia para la anotación genómica, la identificación y caracterización genética y el análisis de mutaciones y polimorfismos (47, 48).

- ❖ **Gene.Ref.Seq:** indica el gen de referencia donde se sitúa la variante a estudio, basándose en genes bien caracterizados que se encuentran en la base de datos RefSeq.
- ❖ **Impact.RefSeq:** orienta del posible impacto que tiene la variante de modo que, si puede ser modificadora, se indica con la palabra *modifier* y su intensidad, alta (*high*), moderada (*moderate*) o baja (*low*).
- ❖ **Annotation.RefSeq:** región donde se localiza el sitio de la variante. Pueden ser intrónicas, o de región no codificante; del sitio de *splicing* o *splice site*, (lugar de unión entre un exón y un intrón); UTR3 y UTR5 (*untranslated regions*, hacen mención al extremo 3' y 5' de los genes, que son regiones no traducidas) o bien de la región codificante o exón, que corresponde a menos del 2% del genoma humano (49). En el caso de las exónicas, un SNV puede producir: una mutación sin sentido o *nonsense*, una mutación con cambio de sentido o *missense*, una mutación silente o sinónima o una mutación de cambio del marco de lectura o *frameshift*. En las *nonsense*, se puede producir un codón de parada prematuro (*stop-gain*) resultando en una proteína anormalmente acortada o bien puede suceder una mutación en el codón AUG de inicio que reduzca o elimine la producción de la proteína (*start-loss*). Las mutaciones *missense* son aquellas cuyo cambio de nucleótido supone un nuevo codón que implica la codificación de un aminoácido diferente del original, pudiendo originar una pérdida completa de función de la proteína resultante. En las mutaciones silentes el cambio de nucleótido no supone la codificación de un aminoácido diferente, por lo que la función proteica no se ve afectada. Finalmente, en las mutaciones *frameshift*, se produce una deleción o inserción (*indels*) de un número de nucleótidos determinado que hace al ADN no divisible entre tres, lo que provoca que, debido a la expresión del gen en codones de tripletes de nucleótidos, estas *indels* produzcan un cambio en el marco de lectura, resultando en una traducción completamente diferente. Cuanto más temprano en la secuencia tenga lugar, mayor será la alteración de la proteína (46, 50).

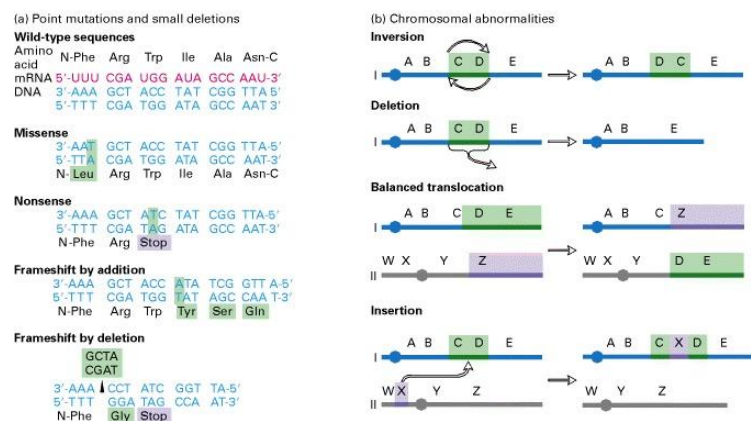


Fig.2. Diferentes tipos de mutaciones (46)

- ❖ **AAChange.RefSeq**: indica el cambio de aminoácido que provoca la variante. La columna solo manifestará el resultado si la variante se encuentra en el exón o en el *splice site*, pues serán las regiones que se transcriben.
- ❖ **LOF.RefSeq**: señala el posible valor que puede tener la variante en la pérdida de función de un determinado gen.
- ❖ **NMD.RefSeq**: explican la posible implicación de la variante en la degradación del ARN mensajero (*mRNA*).

4.1.3 Anotaciones de frecuencia poblacional:

Para el estudio de frecuencias poblacionales recurriremos a bases de datos como *Genome Aggregation Consortium (GnomAD*, previamente conocido como *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*), formada por un compendio de información sobre una amplia variedad de proyectos de secuenciación con el fin de aunar y hegemonizar los datos de secuenciación genómica y exómica existentes hasta la fecha (51), o bien *The 1000 Genomes Project (1000g)* el cual fue creado con el objetivo de descubrir y entender las variantes causantes de la patogenicidad (52, 53).

- ❖ **MaxPopFreq**: se trata de una base de datos que contiene información sobre la frecuencia poblacional general de cada variante, basada en la recopilación de información disponible en bases de datos de diferentes consorcios como *GnomAD* (51).
- ❖ **MaxPopSemiFreq**: traducción a semifrecuencia (1-frecuencia, si frecuencia>0.05) de la MaxPopFreq. En esta columna también nos quedaremos con las variantes cuya frecuencia sea inferior o igual a 0,05.
- ❖ **gnomad211_genome.AF**: frecuencia de la variante según la base de datos *gnomad211* en exomas.
- ❖ **X1000g2015aug_eur**: frecuencia de la variante recogida en *1000g2015aug* en población europea.
- ❖ **gnomad211_exome.AF_nfe**: frecuencia de *gnomad211* en exomas de población europea sin tener en cuenta la finlandesa.
- ❖ **gnomad211_genome.AF_nfe**: frecuencia de *gnomad211* en genomas de población europea sin incluir la finlandesa.

4.1.4 Anotaciones internas:

Reciben el nombre de *vardb* y corresponden al número de veces que se ha identificado la variante en pacientes de la Fundación de Medicina Xenómica. Solo se tendrán en cuenta aquellas registradas hasta un máximo de 10 veces o aquellas no registradas nunca. Para el registro se utilizan diferentes analizadores de genomas como GATK o LifeScope.

4.1.5 Anotaciones clínicas:

Basadas en bases de datos específicas de enfermedad.

- ❖ **OMIM_Disorder:** *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* es un compendio que contiene información de entorno a 15.000 genes y de los trastornos mendelianos conocidos. Se centra sobre todo en la relación entre un genotipo determinado y su fenotipo asociado. Si un gen no se encuentra registrado en *OMIM*, significa que no se ha encontrado una enfermedad asociada a él (54). Basándonos en la información aportada por la historia clínica de cada paciente recogida en el apartado 2. *Antecedentes*, podremos ir descartando aquellos síndromes que no se correspondan con el fenotipo de nuestros probandos hasta llegar a la variante problema.
- ❖ **CGD_Inheritance:** la *Clinical Genomic Database (CGD)* incluye condiciones con una causa genética conocida, centrándose sobre todo en datos genéticos de relevancia médica (55). En el caso de nuestro análisis, a través de los datos reportados de la *CGD* se infiere la heredabilidad de la variante, la cual puede ser autosómica recesiva, en la que ambos alelos deben presentar la variante para que se observe el fenotipo alterado, es decir, deben manifestarse en homocigosis; autosómica dominante, donde basta un alelo mutado para manifestar el fenotipo clínico, por lo que sería suficiente con una presentación en heterocigosis (46); y, por último, la herencia ligada a X.
- ❖ **CLASS_HGMD_PRO_2020.3:** se basa en la clasificación que ofrece *The Human Gene Mutation Database (HGMD)*. En ella, se presenta también un registro de variantes de la línea germinal y su asociación con enfermedades hereditarias (56). La *HGMD* clasifica a las variantes en seis categorías: a) mutaciones causantes de enfermedad (*DM: disease-causing mutation*), b) mutación probable/posiblemente patológica (*DM?: probable/possible pathological mutation*); c) polimorfismos asociados a enfermedad (*DP: disease-associated polymorphisms*), d) polimorfismos funcionales (*FP: functional polymorphisms*), e) polimorfismos asociados a enfermedad con evidencia funcional (*DFP: disease-associated polymorphisms with supporting functional evidence*) y f) variantes de cambio del marco de lectura o truncadas (*FTV: frameshift or truncated variants*) (57).

- ❖ **ClinVar_Significance:** se centra en la clasificación de las variantes que ofrece la base de datos ClinVar siguiendo las normas de la ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) que serán explicadas más adelante (37), las cuales clasifican a las variantes en: patogénicas, probablemente patogénicas, de significado incierto, probablemente benignas y benignas; e incluye el nivel de evidencia con el que se ha clasificado la variante. ClinVar contiene además información de las variantes junto con su interpretación clínica y fenotipo asociado (58).

- ❖ **InterVar_ACMG_verdict:** Partiendo de los criterios de la ACMG, InterVar es una herramienta *in silico* con métodos complementarios para ofrecer una interpretación clínica más precisa en una de las 5 posibles categorías de la ACMG, siendo esta conclusión lo que se refleja en la columna en cuestión (59).

- ❖ **InterVar_ACMG_criteria:** seguimos con la herramienta InterVar. En este caso se manifiesta en cuál de los 18 criterios se basa la evidencia para establecer el veredicto reflejado en la columna anterior (59).

- ❖ **regsnp_disease:** RegSNP es una estrategia informática integrada por diferentes herramientas con el fin de priorizar SNPs basándose en un enfoque fenotipo-específico, identificando SNP y factores de transcripción que son más probable que influyeran un determinado fenotipo (60).

- ❖ **avsnp154:** se trata de un número localizador de la variante.

4.1.6 Anotaciones de la predicción de patogenicidad:

Las siguientes columnas se centran en diferentes modelos y herramientas que permiten evaluar la potencial patogenicidad de una variante. Para ello, nos basamos en la base de datos *dbscSNV*, la cual contiene las SNVs posibles de las regiones de splicing de consenso (61); y la *dbNSFP v4.1*, donde se recoge la predicción funcional y la anotación de las potenciales SNV no sinónimas de regiones exónicas (62, 63).

- ❖ **dbscSNV_ADA_SCORE:** partiendo de la base de datos *dbscSNV*, en esta columna se refleja el valor de patogenicidad estimado utilizando un modelo predictivo llamado AdaBoost.

- ❖ **dbscSNV_RF_SCORE:** al igual que en la columna anterior, se refleja el valor predictivo de patogenicidad estimado por el modelo en este caso Random Forest de la base de datos *dbscSNV*.

- ❖ **CADD_phred:** *The Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)* puntúa la patogenicidad predicha de SNVs e indels. Aquellas variantes con una puntuación superior a 30, son “probablemente deletéreas” y las inferiores, “probablemente benignas” (64).
- ❖ **REVEL_score:** la puntuación de *Rare Exome Variant Ensemble Learner (REVEL)* se basa en 13 calificaciones individuales para predecir la patogenicidad de variantes *missense*. Las calificaciones tienen un rango de entre 0 y 1. Aquellas por encima de 0.5 son “probablemente causantes de la enfermedad” y aquellas por debajo, “probablemente benignas”. Son calculadas a través del proyecto de la *dbNSFP* (65).
- ❖ **DANN_score:** DANN emite también una puntuación de predicción funcional a partir de datos de CADD (66).

4.2 CRITERIOS PARA EL FILTRADO INICIAL DE VARIANTES:

La cantidad de datos obtenidos con estos pasos iniciales conlleva la necesidad de filtrar los resultados predichos. Para ello se realiza un filtrado de variantes que incluye la combinación de los siguientes criterios:

1. Variantes no presentes en bases de datos o con frecuencias alélicas $<0,05$ en las columnas de frecuencias poblacionales.
2. Variantes exónicas (excepto sinónimas) y de splicing (intrónicas hasta ± 5)
3. Variantes clasificadas como “patogénicas” en ClinVar y en su defecto, o bien si en ellas el fenotipo no es concordante con el del probando, las “probablemente patogénicas” y “de significado incierto”.
4. Variantes clasificadas por InterVar como “patogénicas” o en su ausencia o no concordancia con el fenotipo, como “probablemente patogénicas” y “de significado incierto”.
5. Genes cuyos fenotipos en OMIM podrían estar relacionados con el fenotipo del paciente.

PROBANDOS	CRITERIOS	1	2	3
Número inicial de variantes	-	81 643	28 891	53 344
MaxPopSemiFreq	"me quedo con <0,05"	20 089	7 072	13 394
ClinVar_Significance (1)	"quito benignas y probablemente benignas"	18 371	5 523	11 947
Annotation.RefSeq	"quito las sinónimas"	16 448	5 045	9 856
ClinVar_Significance (2)	"me quedo con las patogénicas"	3	1	2

Tabla 3: Número de variantes genéticas restantes tras cada filtrado.

4.3 PRIORIZACIÓN DE VARIANTES:

Tras aplicar estos criterios de filtrado, conseguimos reducir considerablemente las variantes candidatas. Antes de pasar a analizar cada una de ellas, podemos comparar los datos obtenidos con los presentes en la base de datos interna de la Fundación para detectar errores de secuenciación, los cuales aparecerían en todas las muestras.

Así mismo, la variante o variantes seleccionadas deben ser inspeccionadas visualmente a través del software mencionado con anterioridad IGV. Con él, podemos comprobar si la variante está bien cubierta, si no es un artefacto que sale en muchas muestras y ver si está bien leída en todas las cadenas del ADN.

Una vez realizadas estas comprobaciones de calidad, iremos analizando las variantes una por una, buscando información sobre ellas y comprobando si algún síndrome asociado al gen en el que se localiza nuestra variante coincide con el fenotipo expresado por cada uno de nuestros pacientes.

Para ello nos serviremos de bases de datos previamente comentadas como gnomAD, para las frecuencias poblacionales, ClinVar para su significación funcional y OMIM para su fenotipo asociado. Finalmente, también estudiaremos a las variantes a través de la plataforma VarSome. Esta última contiene un sistema de búsqueda de variantes y una base de conocimiento integrado de más de 70 fuentes de datos, con referencias cruzadas e información de cualquier variante. El sistema clasifica también las variantes siguiendo los criterios de la ACMG y explica minuciosamente todos los criterios de evidencia desglosados en los que se ha basado (67).

4.4 CLASIFICACIÓN DE LAS VARIANTES:

Teniendo en cuenta todo lo comentado en los dos apartados anteriores, las variantes deben ser clasificadas de acuerdo con la probabilidad de que sean las causantes de la enfermedad. Para ello, en el 2013, un grupo de trabajo formado por el American College

of Medical Genetics and Genomics (ACMG), la Association for Molecular Pathology (AMP) y el College of American Pathologists, se reúne con el fin de crear una guía de recomendaciones para el uso de una terminología estándar a la hora de clasificar a las variantes. Así, se crean las guías de la ACMG, aplicables a todos los genes de herencia mendeliana (37).

Las recomendaciones de la ACMG evalúan 28 tipos diferentes de evidencia asociados a características inherentes a cada variante, como la frecuencia alélica, los análisis funcionales, las predicciones *in silico*, análisis de segregación, relación genotipo-fenotipo... Con todos estos datos, se asigna un código alfanumérico que valora su contribución a la patogenicidad. Hay 1 código para *Pathogenic very strong* (PVS1), 4 para *Pathogenic Strong* (PS1-4), 6 para *Pathogenic Moderate* (PM1-6), 5 para *Pathogenic Supporting* (PP1-5), 1 para *Benign Stand Alone* (BA1), 4 para *Benign Strong* (BS1-4) y 7 para *Benign Supporting* (BP1-7) (37).

Para valorar la evidencia existente para un número significativo de variantes, se debe seguir un esquema sistemático:

1. Primero se realiza una valoración de la frecuencia poblacional de cada variante en poblaciones de referencia. Para ello, se recurre a bases de datos como *gnomAD* o *1000g*. Si la frecuencia del alelo es >5% o es superior a la esperada para la prevalencia de un trastorno o se observa para enfermedades AD en individuos sanos, se considera un fuerte indicador de benignidad. Por el contrario, la ausencia o frecuencia muy baja de la misma en estas bases de datos, será evidencia a favor de patogenicidad.
2. Por otro lado, se realiza un análisis de segregación de la variante dentro del grupo familiar, ya que la presencia de una variante concreta con el fenotipo en una misma familia evidencia la vinculación entre el locus y la enfermedad, pero no necesariamente implica que sea por sí misma patogénica. Se debe tener en cuenta si existe una concordancia con el modelo de herencia propuesto para la patología.
3. Resulta relevante el análisis de la maternidad y paternidad, para averiguar si estamos ante una mutación *de novo*, en cuyo caso, la evidencia estaría más a favor de un efecto deletéreo.
4. Las anotaciones y predicciones del efecto molecular conforman el cuarto grupo de evidencia. En ellas se contempla el tipo de variante (*nonsense*, *missense*, *frameshift*...), la posición de la misma en el gen y en la proteína, la existencia de estudios funcionales, las predicciones *in silico* y el mecanismo molecular a través del cual se desarrolla la enfermedad.
5. Se deben tener en cuenta así mismo otros datos y reportes previos, donde se haya analizado la misma variante en un contexto clínico y se hubiese obtenido una asignación de “patogénica” o “benigna”.

La combinación de estos códigos, dan lugar a la clasificación final de cada variante en 5 categorías:

P	PATOGÉNICA	<i>(pathogenic)</i>	Clase 5
LP	PROBABLEMENTE PATOGÉNICA	<i>(likely pathogenic)</i>	Clase 4
VUS	VARIANTE DE SIGNIFICADO INCIERTO	<i>(variant of uncertain significance)</i>	Clase 3
LB	PROBABLEMENTE BENIGNA	<i>(likely benign)</i>	Clase 2
B	BENIGNA	<i>(benign)</i>	Clase 1

Tabla 4: Categorías de la ACMG (37)

No obstante, se debe tener en cuenta que los criterios asignados a una variante pueden cambiar en relación con la valoración, el juicio profesional y la evidencia existente que está en continua evolución.

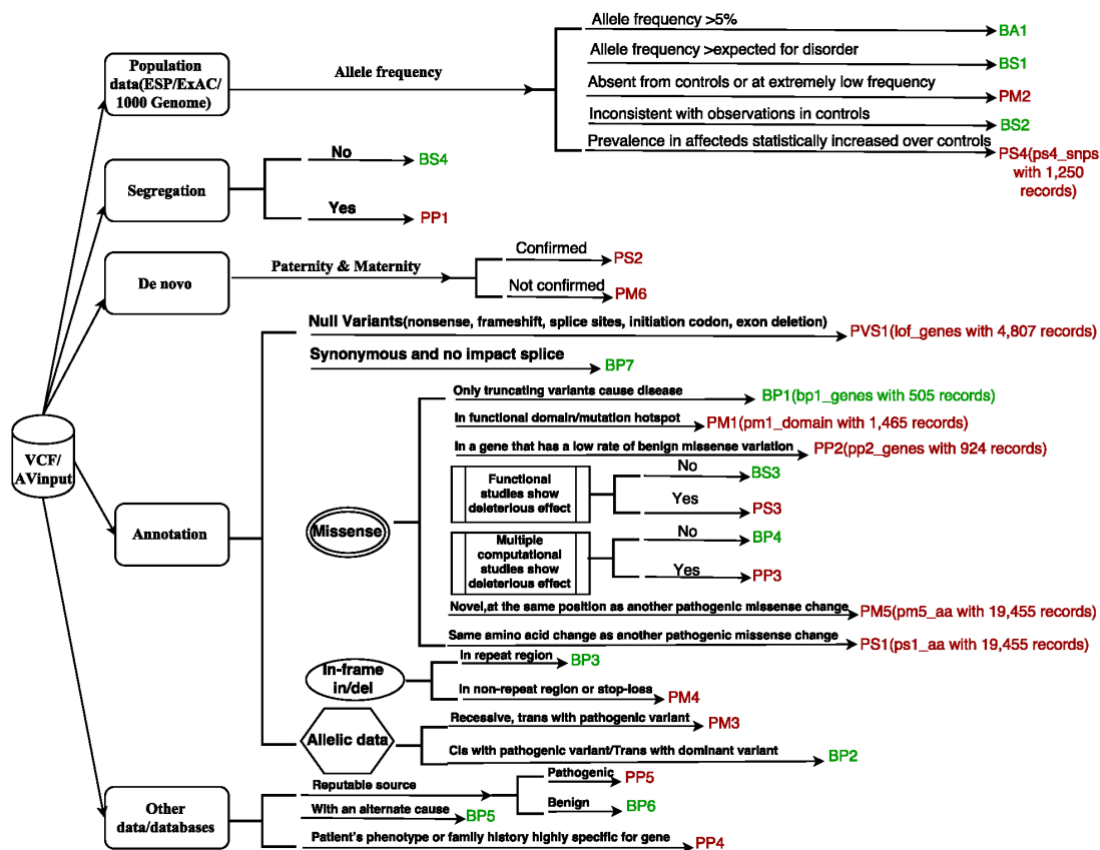


Fig. 3. Diagrama de los 28 criterios de las últimas guías de la ACMG (37, 59)

4.5 ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO

Este TFG se enmarca dentro de los trabajos llevados a cabo por el Grupo de Medicina Xenómica en la Línea de Trastornos del Neurodesarrollo dentro del estudio titulado “*Enfoque integral y traslacional del diagnóstico y tratamiento de los trastornos del neurodesarrollo (TEA, TDAH, DI) y del TOC: una aproximación genética y funcional*”; el cual pretende descifrar las bases genéticas, moleculares y neurocognitivas del Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC) y los Trastornos del Neurodesarrollo (TND), así como sus comorbilidades y manifestaciones fenotípicas asociadas, mediante estudios de asociación, metilación y de secuenciación del genoma completo. Ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo con código 2020/400 y tiene como objetivo evaluar la utilidad de las nuevas tecnologías de genotipado y secuenciación masiva en el diagnóstico genético del TOC y de los TND.

El desarrollo del estudio se ha realizado respetando la Ley 14/2007, Declaración de Helsinki y Convenio de Oviedo. Las leyes vigentes en materia de Protección de datos: Ley Orgánica 3/2018 (LOPD y GDD), RD 1720/2007 y Reglamento (UE) 2016/679; las leyes que regulan el acceso a la Historia Clínica y Consentimiento Informado: Ley 3/2001, Ley 3/2005, Ley 41/2002, Decreto 29/2009 (Galicia), Decreto 164/2013 (Galicia) y la Instrucción 6/2007 (Galicia). También se atenderá a las normas de buena Práctica Clínica, la Orden SAS/3470/2009 así como la Ley 14/2007 y el RD 1716/2011.

5. RESULTADOS

Tras la realización del filtrado, priorización y clasificación inicial de las variantes, procedemos a analizar estudiar las variantes candidatas que nos quedan una a una.

5.1 PROBANDO AFECTO 1

En este paciente, se han detectado las siguientes variantes tras los pasos previos:

❖ Encontramos una variante en el gen *CBS*:

NM_001178008.2 (*CBS*): c.833T>C (p.Ile278Thr) en heterocigosis.

Se trata de un cambio de nucleótido el cromosoma 21q22 en el gen *CBS*, que provoca el cambio del aminoácido Isoleucina por Treonina. Estudios previos han asociado esta variante con homocistinuria debida a déficit de cistationina beta-sintasa (OMIM: 236200) (68).

La homocistinuria es un trastorno con herencia autosómica recesiva caracterizado por la presencia de hiperhomocisteinemia en sangre, retraso mental, trastornos psiquiátricos, autismo, convulsiones, ectopia lentis, osteoporosis y neumotórax espontáneo. Así mismo, se relaciona con la aparición de eventos tromboembólicos como TVP, embolias pulmonares, ictus, infarto agudo de miocardio entre otros (69, 70).

Así pues, las manifestaciones clínicas se asemejan relativamente al fenotipo del probando afecto 1 y ha sido clasificada como “patogénica” por ClinVar, según los criterios de la ACMG (71). Sin embargo, al estar asociada a un trastorno de herencia AR y no haber detectado una segunda mutación patogénica en el otro alelo del gen, por sí sola no explica el fenotipo del paciente, motivo por el cual se descarta.

❖ Se observa una variante patogénica en el gen *HNF1A*:

Se descarta por haberse asociado en estudios previos a diferentes tipos de diabetes mellitus como la diabetes MODY tipo III (OMIM: #600496) (72), la no insulino-dependiente tipo II (OMIM: #125853) (73) o la diabetes mellitus tipo 1 20 (OMIM: #612520) (74). Ninguno de estos cuadros clínicos no sería concordante con el fenotipo del probando afecto 1, por lo que se rechaza como causa.

❖ Se ha detectado la siguiente variante patogénica en el gen *SCN3A*:

NM_006922.4 (*SCN3A*): c.4114A>G (p.Met1372Val) en heterocigosis.

Se trata de una transición situada en el cromosoma 2q24, en el gen *SCN3*, que provoca el cambio de un aminoácido Metionina por Valina.

Variantes de este tipo se han descrito como patogénicas en estudios previos asociadas a “Epilepsia focal familiar con focos variables 4” (FFEVF4) (OMIM: #617938) (75)

El FFEVF4, es un síndrome de herencia autosómica dominante asociada a retraso del desarrollo psicomotor y presencia de un trastorno convulsivo caracterizado por la aparición de convulsiones focales en los primeros años de vida, en general bien controlables. Asocia además defecto cognitivo leve, incluyendo retraso del habla, déficit de atención-hiperactividad, discapacidad intelectual, dificultades de aprendizaje y características autísticas. También se presentan casos con hipotonía, microcefalia, disfunción autonómica y crecimiento general deficiente (76, 77). La variante es considerada por ClinVar como patogénica (78).

Por todo esto, se considera que la variante en el gen *SCN3A* c.4114A>G (p.Met1372Val) en heterocigosis y herencia autosómico dominante, probablemente sea la variante causal del fenotipo observado en el paciente, que encaja con el descrito por la “Epilepsia focal familiar con focos variables 4”.

5.2 PROBANDO AFECTO 2

Se ha detectado la siguiente variante patogénica:

NM_017780.4 (*CHD7*): c.5405-17G>A en heterocigosis.

Se trata de una variante del cromosoma 8q12, en la región intrónica 25 del gen *CHD7*, situada en la posición -17 del sitio de splicing más próximo. La variante crea un nuevo sitio aceptor de corte y empalme que afecta al procesamiento del ARN del gen *CHD7*, adicionando cinco aminoácidos a la proteína traducida, pudiendo afectar a su función. Se manifiesta con herencia autosómica dominante. No está presente en las bases de datos de frecuencias poblacionales y estudios previos han asociado esta variante con el “Síndrome de CHARGE” (OMIM: #214800) (79).

El Síndrome de CHARGE se caracteriza por un patrón de anomalías congénitas que incluye: Coloboma ocular (C), malformaciones cardíacas (H) tales como CIV, CIA, defectos del septo atrial, tetralogía de Fallot, atresia de coanas (A); retraso psicomotor y/o en el crecimiento (R) así como retraso mental; hipoplasia de genitales (solo en

hombres) (G): hipogonadismo hipogonadotropo, microfalosomía y malformaciones auriculares y/o sordera (E). También se presenta con discapacidad intelectual, problemas de comportamiento como comportamientos repetitivos, obsesivo-compulsivos, agresivos y autolesivos, rasgos autistas o TDAH (79).

Suelen manifestar fenotipo característico con facies sindrómicas consistente en orejas displásicas y de implantación baja, cara cuadrada, aplanamiento malar, retrogenia, fosas nasales pinzadas con narinas antevertidas, inclinación antimongoloide de las fisuras palpebrales, paladar hendido o labio leporino (79).

ClinVar ha catalogado a esta variante como patogénica (80).

Por todo lo detallado, la variante intrónica detectada en el gen *CHD7*: c.5405-17 G>A en heterocigosis y de herencia autosómica dominante, probablemente sea la variante causal del fenotipo observado en el paciente, que encaja con el descrito por el “Síndrome de CHARGE”.

5.3 PROBANDO AFECTO 3

Se ha detectado la siguiente variante descrita como patogénica:

NM_005710.2 (*PQBPI*): c.461_462del (p.Glu154Alafs*12) en hemicigosis.

Se trata de una delección de dos nucleótidos a partir de la posición 461 del gen. Este cambio conlleva un desplazamiento en la pauta de lectura en el gen *PQBPI*. Esto implica que la lectura de los codones en la secuencia posterior a la variante codifique para aminoácidos diferentes, provocando en este caso el cambio del aminoácido Glutamato por Alanina en el codón 154 y originando un codón de parada prematuro en la posición 12 del nuevo marco de lectura. La proteína resultante puede perder su funcionalidad o esta verse notablemente afectada.

La variante ha sido asociada en estudios previos al “Síndrome de Renpenning 1” (RENS1) (OMIM: #309500) (81). Se trata de un síndrome de retraso mental ligado al X de herencia recesiva, caracterizado por deficiencia de crecimiento postnatal, retraso del desarrollo global, retraso mental; hiperactividad y anomalías de comportamiento (82).

También se han visto características fenotípicas reconocibles como talla baja, dismorfismos faciales, paladar hendido, microcefalia, cara larga y estrecha, configuración nasal anormal, orejuelas ahuecadas y fíltreme corto; defectos cardíacos congénitos, hipoplasia renal, testes pequeños...

Tanto ClinVar como Varsome clasifican la variante como patogénica (83).

Por todo esto, la variante detectada del gen (*PQBPI*): c.461_462del (p.Glu154Alafs*2) en hemicigosis probablemente sea la causa del fenotipo del paciente a estudio, compatible con el “Síndrome de Renpenning 1”

6. DISCUSIÓN

6.1 PROBANDO AFECTO 1

En el caso del primer probando, habiendo descartado las variantes asociadas a los genes *CBS* y *HNF1A*, en el primer caso por estar asociada a un trastorno de herencia AR y no haberse detectado una segunda mutación patogénica en el otro alelo del gen, y en el segundo por relacionarse con un fenotipo incongruente con el del paciente, nos quedamos con la tercera variante, la del gen *SCN3*, como diagnóstica del cuadro clínico.

En 2014, Vanoye et al. realiza un estudio del gen en cuestión, donde observa que el susodicho codifica para la subunidad alfa de un canal de sodio voltaje-dependiente Na(v)1.3. La mutación en este gen había sido detectada en 179 pacientes pediátricos con epilepsia focal y estudios *in vitro* han demostrado defectos en la función de los canales consistentes en un aumento de las corrientes de entrada durante una rampa de voltaje de despolarización lenta, promoviendo redes de hiperexcitabilidad. Las imágenes cerebrales eran anodinas (77). Por otra parte, los estudios de Lamar et al. han mostrado que los canales mutados no tenían corrientes de sodio detectables y se manifestaban en menor número en la superficie celular, con el consecuente detrimento de la magnitud de la corriente de entrada todo ello resultando en un efecto de pérdida de función (84).

La variante en heterocigosis de este gen *SCN3A* se ha asociado a “Epilepsia focal familiar con focos variables 4” (FFEVF4), un trastorno convulsivo AD caracterizado por crisis focales de comienzo en los primeros años de vida, en algunos casos con generalización secundaria y déficits del desarrollo tales como discapacidad cognitiva, que incluye retraso del lenguaje, TDAH y dificultades del aprendizaje (77). Lamar et al. lo relacionó también con retraso global del desarrollo, hipotonía y microcefalia (84) sumado a retraso severo del lenguaje y características autísticas, según indican estudios como el de Celle et al. (85). Este cuadro clínico concuerda con el de nuestro probando afecto 1, un varón de 16 años con epilepsia, déficit cognitivo, trastorno del lenguaje expresivo y TDAH combinado.

Mutaciones heterocigóticas en este mismo gen también se han asociado a “Encefalopatía Epiléptica y del desarrollo-62” (DEE62), un trastorno epiléptico de mayor gravedad, con crisis multifocales de inicio antes del año de vida y alteraciones en pruebas de imagen y electroencefalograma (EEG) (76).

6.2 PROBANDO AFECTO 2

En el segundo probando, se detecta una variante patogénica en el gen *CHD7*, pro un lado un regulador transcripcional que se une para potenciar elementos del nucleoplasma, y por otro un regulador positivo en la biogénesis del ARN ribosomal (ARNr) del nucléolo (86). Se localiza en el cromosoma 8q12.2 y se manifiesta en heterocigosis con una herencia que es AD.

Los estudios de Nagase et al. demostraron una mayor presencia del gen en el cerebro, riñón y músculo esquelético (87). Por su parte, Sanlaville et al. analizaron su expresión en las primeras etapas del desarrollo fetal, donde se mostraba una amplia expresión en el neuroepitelio indiferenciado y el mesénquima de la cresta neural (88).

Más adelante, en el 2010, Bajpai et al. demostró que el *CDH7* tenía un rol evolutivamente conservado en la promoción de la expresión de los genes de la cresta neural y su migración celular y cuya alteración podría explicar la patogénesis del trastorno asociado con este gen, el “Síndrome de CHARGE” (89).

Cabe destacar también el estudio de Van Nostrand et al. donde analizaron el rol crítico en general en varios síndromes del desarrollo y en concreto en este en cuestión, de la proteína de supresión tumoral p53. *CHD7* se une a p53 regulándola negativamente. Mutaciones en dicho gen dejan de suprimir a la proteína con su consecuente activación, con un resultado letal en la última etapa gestacional y asociada a características fenotípicas del “Síndrome de CHARGE” (90).

La mayoría de las mutaciones del gen *CDH7* asociadas a CHARGE son mutaciones *de novo* (DNM) (79). Pauli et al. identificó un polimorfismo cercano a la mutación en *CHD7* en 13 familias. En un intento de analizar su conexión detectó que, en 12 de las 13 familias, la mutación afectaba al alelo paterno (92.3%) (91). Esta mayor afectación paterna no es un hecho aislado. Varios estudios demuestran que la mayoría de las DNMs se originan en el padre (debido al gran número de divisiones celulares que presentan las células germinales masculinas existiendo una cantidad de espermatozoides producidos a lo largo de la vida en comparación con el número de óvulos mucho mayor); y se estima que, por cada año adicional de edad paterna en el momento de la concepción, aparecen 2 DNMs extra en cada hijo (92).

El fenotipo asociado a CHARGE (coloboma ocular, malformaciones cardíacas, atresia de coanas, retraso psicomotor y/o en el crecimiento y retraso mental, hipoplasia de genitales, hipogonadismo hipogonadotrofo y malformaciones auriculares y/o sordera asociado a TEA, TDAH, DI...) (79), es compatible con el de nuestro paciente: un varón de 11 años y 1 mes con retraso global del desarrollo, déficit cognitivo leve y rasgos de TDAH y TEA, cardiopatía congénita y facies sindrómicas.

6.3 PROBANDO AFECTO 3

En el último sujeto, la variante patogénica se sitúa en el cromosoma Xp11.23, en el gen *PQBPI*. Dicho gen codifica para una proteína nuclear unidora de poliglutamina que contiene un dominio N-terminal WW idéntico en sus cuatro transcritos (*PQBPIa-PQBPId*), difiriendo en su extremo C-terminal. Se localiza fundamentalmente en el cerebro, sobre todo en el cerebelo, hipocampo y bulbo olfatorio (93, 94). Se trata de una variante de herencia ligada al cromosoma X, manifestada en hemicigosis.

PQBPI se une a trectos de poliglutamina para mediar funciones celulares. Su sobreexpresión suprime el crecimiento celular y aumenta su susceptibilidad al estrés (93). Se propone una posible involucración del gen en la patología de la “Ataxia Espino-cerebellar 1” (SCA1) al demostrarse una interacción de *PQBPI* con ataxina-1 (95). Para corroborar dicha asociación, Okuda et al. generó ratones trasngénicos que sobreexpresaban el *PQBPI* humano, resultando en un genotipo gradualmente similar a una enfermedad de motoneurona, con pérdida de dichas neuronas en el asta espinal anterior y causando una disfunción neuronal por su excesiva acción, lo que concluye su posible implicación con la patología de SCA1.

En cambio, la variante que nos atañe es una delección de dos nucleótidos que provoca un codón de parada prematuro, descrita por primera vez por Kalscheuer et al. en 2003 (82). Un estudio llevado a cabo 6 años después por Ito et al. al generar ratones con expresión de *PQBPI* bloqueada, demostraba la posible asociación de la disfunción en la regulación de la expresión genética con problemas de comportamiento y cognición que demostraban estos ratones y relacionaba la recuperación de la función con una mejoría de los síntomas en pacientes adultos que manifestaban “Síndrome de Renpenning” y retraso mental asociado a *PQBPI* (96).

Existe una considerable variabilidad fenotípica entre las familias con diferentes mutaciones del gen e incluso entre familias con la misma mutación. La microcefalia, el retraso mental y la talla baja parece que son características constantes entre individuos con mutaciones en *PQBPI*. Cabe destacar que la microcefalia es el rasgo físico más comúnmente encontrado entre varones con retraso mental de causa desconocida (97).

No obstante, la patología asociada a la variante mencionada con anterioridad es el “Síndrome de Renpenning”, un tipo de retraso mental ligado a X asociado a deficiencia de crecimiento postnatal, retraso del desarrollo global, retraso mental; hiperactividad, anomalías de comportamiento y características fenotípicas reconocibles (82). Esta clínica concuerda con la de nuestro paciente, un adolescente varón de 17 años con rasgos dismórficos, retraso de crecimiento prenatal y postnatal, discapacidad intelectual y TEA diagnosticado en un principio como “Síndrome de Dubowitz”.

7. CONCLUSIONES

Mediante la realización de este trabajo, hemos conseguido realizar el análisis del exoma completo en 3 pacientes con TND de especial dificultad diagnóstica, en busca de variantes genéticas que pudieran proporcionar un diagnóstico genético de cada uno. Para ello, partiendo de diferentes herramientas *in silico* y utilizando criterios de filtrado y la información registrada en diferentes bases de datos, se ha llevado a cabo una priorización y clasificación de las variantes atendiendo a los criterios de la ACMG. Con esto, llegamos al diagnóstico genético de los tres casos clínicos.

Resulta conveniente, sin embargo, tener en cuenta las limitaciones de los estudios y una serie de consideraciones a mayores:

Por una parte, la técnica utilizada puede no detectar otras mutaciones tales como deleciones, inserciones o inversiones. Además, este análisis no excluye la presencia de mutaciones en regiones no examinadas como intrones, regiones reguladoras o no accesibles a la hibridación.

Así mismo, se debe tener en cuenta que el análisis de variantes actualmente es imperfecto, y que la categoría asociada no implica un 100% de certeza. Por ello, se sugiere que la evaluación clínica se realice atendiendo a las características fenotípicas y bioquímicas asociadas a cada uno de los genes, contextualizando la interpretación del resultado al fenotipo del paciente y antecedentes familiares. Por ello, es también conveniente el estudio de portadores de los padres del probando, para poder proporcionar un mejor asesoramiento genético y establecer si la variante es de novo, si se cosegrega con la enfermedad dentro de la familia o si se manifiesta en trans con una variante patogénica en el mismo gen causante de una enfermedad recesivo. Son los llamados “test de tríos” (madre, padre e hijo afecto) (37).

La genética ha avanzado considerablemente en los últimos años, permitiendo un refinamiento de los métodos de detección de variantes genéticas y un incremento de los estudios y con ello del conocimiento acerca de este campo. Proyectos como la NGS, han abaratado los costes de secuenciación y el número de genomas humanos y exomas secuenciados cada año está en un aumento imparable. Todo ello ha permitido un creciente número de diagnósticos genéticos y un mejor asesoramiento a las familias, así como la aparición de terapias guiadas.

Dado el gran volumen de diagnósticos que se están realizando resulta necesario la creación de un lenguaje común y universal guiado por unas mismas normas que permita la estandarización de los resultados e informes emitidos.

Con este fin surgen las guías de la ACMG, si bien de alta subjetividad por la certeza de que el significado de las variantes cambia con el tiempo por el incremento de evidencia científica (37, 98, 99).

Los avances informáticos como el aprendizaje automático han introducido modelos que mejoran la representación de patogenicidad, la estimación de la penetrancia y la identificación, priorización y clasificación de miles de variantes que pueden ser causa de un determinado efecto. Sin embargo, su interpretación, generalización y validez clínica es todavía limitada. Resulta crucial que los nuevos modelos continúen siendo desarrollados y rigurosamente testados para que la información genética sea utilizada de manera efectiva en la clínica (60, 99).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013
2. World Health Organization (2020). International statistical classification of diseases and related problems (ICD), 11th ed. Available from: <https://icd.who.int/>
3. García García RJ, Robinson Agramonte M. Comorbilidad en pacientes con trastornos del neurodesarrollo (Comorbidity in patients with neurodevelopmental disorders) *Revista Cubana de Pediatría*, [S.l.], 2020 Aug [cited 2021 Feb 1]; 92(4): 1561-3119. Available from: <http://www.revpediatria.sld.cu/index.php/ped/article/view/1108>
4. García García RJ, Robinson Agramonte M. Comorbilidad en pacientes con trastornos del neurodesarrollo (Comorbidity in patients with neurodevelopmental disorders) *Revista Cubana de Pediatría*, [S.l.], 2020 Aug [cited 2021 Feb 1]; 92(4): 1561-3119. Available from: <http://www.revpediatria.sld.cu/index.php/ped/article/view/1108>
5. Fernández-Jaén A, Martín Fernández- Mayoralas D, Fernández-Perrone AL, Jiménez A, Albert J, López-Martín S, et al. Neurodesarrollo y fenocopias del trastorno por déficit de atención/ hiperactividad: diagnóstico diferencial. *Rev Neurol* 2018 [cited 2021 Feb 22]; 66 (Supl 1): S103-7.
6. Aznar AS, González Castanon D. La autodeterminación como eje de evaluación e intervención en la Discapacidad Intelectual (Self determination as an axis to evaluate and intervene with intellectually disabled people) *Vertex* (Buenos Aires, Argentina) 2010 Mar-Apr [cited 2021 Feb 02]; 21(90) :126-135. Available from: <http://www.itineris.org.ar/files/La%20autodeterminaci%C3%B3n%20como%20e~.pdf>
7. Alles, Elisiane Perufo; Castro, Sabrina Fernandes de; Menezes, Eliana da Costa Pereira and Dickel, Cláudia Adriane Graeff. (Re)Significações no Processo de Avaliação do Sujeito Jovem e Adulto com Deficiência Intelectual ((Re)signification in the assessment process of Young and adult subjects with intellectual disability). *Rev. bras. educ. espec.* [online]. 2019 [cited 2021 Feb 02], vol.25, n.3 pp.373-388. Doi: <https://doi.org/10.1590/s1413-65382519000300002>.
8. 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): 1-23.

9. Andrés-Roqueta,C.; Garcia-Molina, I.; Flores-Buils, R. Association between CCC-2 and Structural Language, Pragmatics, Social Cognition, and Executive Functions in Children with Developmental Language Disorder. *Children* 2021 [cited 2021 Feb 03], 8, 123. Doi: <https://doi.org/10.3390/children8020123>
10. González MC, Vásquez M, Hernández-Chávez M. Trastorno del espectro autista: Diagnóstico clínico y test ADOS (*Autism spectrum disorder: Clinical diagnosis and ADOS Test*) *Rev Chil Pediatr.* 2019 [cited 2021 Feb 20]; 90 (5):485-491. Doi: <https://doi.org/10.32641/rechped.v90i5.872>
11. American Psychiatric Association (2002). Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV-TR), 1ª Ed. Barcelona: Editorial MASSON.
12. Hervás Zúñiga A, Balmaña N, Salgado M. Los trastornos del espectro autista (Autism Spectrum Disorders). *Pediatr Integral.* 2017 Mar [cited: 2021 Jan 30]; XXI (2): 92-108. Available from: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2017-03/los-trastornos-del-espectro-autista-tea/>
13. Zablotsky B, Black LI, Maenner MJ, Schieve LA, Blumberg SJ. Estimated Prevalence of Autism and Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey. *Natl Health Stat Report.* 2015 Nov 13 [cited on 2021 Jan 30]; (87):1-20. PMID: 26632847.
14. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric.* 2009 Jun [cited: 2021 Jan 24]; Res 65: 591-598. Doi: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203>
15. Rucklidge JJ, Tannock R. Psychiatric, psychosocial, and cognitive functioning of female adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2001 May [cited: 2021 Jan 31]; 40(5): 530-40. Doi: <https://doi.org/10.1097/00004583-200105000-00012>.
16. Quintero J, Castaño de la Mota C. Introducción y etiopatogenia del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH). *Pediatr Integral* 2014 Nov [cited: 2021 Jan 30]; XVIII (9): 600-608. Available from: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2014-11/introduccion-y-etiotopogenia-del-trastorno-por-deficit-de-atencion-e-hiperactividad-tdah/>
17. Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 2005 Jul 16-22 [erratum in *Lancet* 2006 Jan 21; cited: 2021 Jan 30]; 366 (9481): 237-48. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66915-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66915-2).
18. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry.* 2007 Jun [cited: 2021 Jan 31]; 164(6):942-8. Doi: <https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.6.942>. PMID: 17541055.

19. Catalá-López F, Peiró S, Ridaó M, Sanfélix-Gimeno G, Gènova-Maleras R, Catalá MA. Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder among children and adolescents in Spain: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *BMC Psychiatry*. 2012 Oct 12 [cited: 2021 Jan 31]; 12: 168. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-168>.
20. Sans A, Boix C, Colomé R, López-Sala A, Sanguinetti A. Trastornos del aprendizaje. *Pediatr Integral* 2017 [cited 2021 Feb 26]; XXI (1): 23-31.
21. Eiris-Puñal J. Trastornos motores en los trastornos del neurodesarrollo. Tics y estereotipias. *Rev Neurol* 2014 [cited 2021 Mar 01]; 58 (Supl 1): S77-82.
22. Casanova EL, Sharp JL, Chakraborty H, Sumi NS, Casanova MF. Genes with high penetrance for syndromic and non-syndromic autism typically function within the nucleus and regulate gene expression. *Mol Autism*. 2016 Mar [cited 2021 Mar 01] 15;7:18. doi: 10.1186/s13229-016-0082-z. PMID: 26985359; PMCID: PMC4793536
23. Hervás Zúñiga A, Maraver García N. Los trastornos del espectro del autismo (Autism Spectrum Disorders). *Pediatr Integral* 2020 Sep [cited 2021 Feb 20]; XXIV (6): 325.e1 – 325.e21. Available from: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2020-09/los-trastornos-del-espectro-autista-2/>
24. Wingate M, Kirby RS, Pettygrove S, Cunniff C, Schulz E, Ghosh T, et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ*. 2014;63(2):1–21.
25. Organización Mundial de la Salud. *Epilepsia*. 2019 Jun 20 [cited 2021 Mar 01]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
26. McDermott S, Moran R, Platt T, Wood H, Isaac T, Dasari S. Prevalence of epilepsy in adults with mental retardation and related disabilities in primary care. *Am J Ment Retard*. 2005 [cited 2021 Mar 01];110(1):48–56.
27. Tuchman RF, Moshé SL, Rapin I. Trastornos del neurodesarrollo y epilepsia (*Neurodevelopmental disorders and epilepsy*). *Rev Neurol (Ed impr)* 2005 Jan 15 [cited 2021 Mar 8]; 40 (supl.1): s3-s10. Available from: <https://www.neurologia.com/articulo/2004649>
28. Artigas-Pallarés J, Guitart M, Gabau-Vila E. Bases genéticas de los trastornos del neurodesarrollo. *Rev Neurol* 2013 [cited 2021 Mar 02]; 56 (Supl 1): S23-34.
29. Fernández-Jaén A, López-Martín S, Albert J, Martín Fernández-Mayoralas D, Fernández-Perrone AL, Calleja-Pérez B, et al. TDAH: perspectiva desde el neurodesarrollo. *Rev Neurol* 2017; 64 (1): S101-4.

30. Cardó E, Servera M. Trastorno por déficit de atención/hiperactividad: estado de la cuestión y futuras líneas de investigación. *Rev Neurol*. 2008 Mar 16 [cited: 2021 Jan 31]; 46: 365-72. Doi: <https://doi.org/10.33588/rn.4606.2007529>.
31. Indredavik MS, Vik T, Heyerdahl S, Kulseng S, Fayers P, Brubakk AM. Psychiatric symptoms and disorders in adolescents with low birth weight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004 Sep [cited: 2021 Jan 31]; 89(5): F445-50. Doi: <https://doi.org/10.1136/adc.2003.038943>.
32. Hultman CM, Sparén P, Cnattingius S. Perinatal risk factors for infantile autism. *Epidemiology*. 2002 Jul [cited: 2021 Feb 1]; 13(4): 417-23. Doi: <https://doi.org/10.1097/00001648-200207000-00009>.
33. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Hultman C, Larsson H, Reichenberg A. The Heredability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA*. 2017 Sep 26 [cited 2021 Mar 8]; 318(12):1182-1184. Doi: 10.1001/jama.2017.12141
34. 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.
35. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 2014; 515(7526):209-215.
36. 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.
37. 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 Mar 05 [cited 2021 Jan 30]; 17, 405–423. Doi: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
38. Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, Song YS. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet*. 2011 Jun [cited 2021 Mar 8]; 12 (6): 443-51. Doi: 10.1038/nrg2986. PMID: 21587300.
39. Dubowitz V. Familial Low Birthweight Dwarfism with an Unusual Facies and a Skin Eruption. *Journal of Medical Genetics* 1965 [cited: 2021 Apr 2]; 2: 12-17. Doi: <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2.1.12>
40. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W et al. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology*. 2011 [cited 2021 Mar 8]; 29, 24-26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346182/>
41. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*. 2013 [cited 2021 Mar 8]; 14, 178-192

42. Church DM, Schneider VA, Graves T, et al. Modernizing reference genome assemblies. *PLoS Biol.* 2011 Jul [cited 2021 Mar 15]; 9(7): e1001091. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001091>.
43. Jauk F. Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones (*Next-Generation Sequencing (NGS): basic concepts and applications*) In: Brodsky A, Deana A, Guanchiale L, Martinuzzo M, Verón D editors. *Hematología Volumen 23 Número Extraordinario XXIV Congreso Argentino de Hematología*: 21-38; 2019 Oct; Mendoza, Argentina.
44. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA. 2020. URL <https://www.rstudio.com/>
45. Lodis H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 4.1, Structure of Nucleic Acids. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21514/>
46. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 8.1, Mutations: Types and Causes. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21578/>
47. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4 [cited 2021 Mar 10]; 44(D1): D733-45. Doi: 10.1093/nar/gkv1189.
48. Pruitt K, Brown G, Tatusova T, et al. The Reference Sequence (RefSeq) Database. 2002 Oct 9 [Updated 2012 Apr 6; cited 2021 Mar 10]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Chapter 18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
49. Elgar G, Vavouri T. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends Genet.* 2008 Jun [cited 2021 Mar 11]; 24: 344-352. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.04.005>
50. Losick, R, Watson JD, Baker TA, et al. *Molecular biology of the gene*. 6th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings; 2008.
51. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. The mutational constraint spectrum quantified from ariation in 141.456 humans. *Nature.* 2020 Mai 17 [cited 2021 Mar 10]; 581, 434-443. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
52. 1000 Genomes Project Consortium et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015 Oct 1 [cited 2021 Mar 10]; 526 (7571): 68-74. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>

53. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, et al. An integrated map of structural variation in 2.504 human genomes. *Nature*. 2015 Oct 1 [cited 2021 Mar 10]; 526 (7571): 75-81. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature15394>
54. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. McKusick-Nathans Institutw of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 2021 Mar 11. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
55. Solomon BD, Nguyen AD, Bear KA, Wolfsberg TG. Clinical genomic database. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Jun 11 [cited 2021 Mar 11]; 10 (24): 9851-5. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1302575110>. Epub 2013 May 21. PMID: 23696674
56. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD[®]): optimizing its use in a clinical diagnostic r research setting. *Hum Genet*. 2020 Oct [cited 2021 Mar 11]; 139 (10): 1197-1207. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3>. Epub 2020 jun 28. PMID: 32596782.
57. Stenson PD, Mort M, Ball RV et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*. 2014 Jan [cited 2021 Mar 11]; 133 (1): 1-9. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1358-4>. PMID: 24077912
58. Landrum MJ, Kattman BL. ClinVar at five years: Delivering on the promise. *Hum Mutat*. 2018 Nov [cited 2021 Mar 11]; 39 (11): 1623-1630. doi: 10.1002/humu.23641.
59. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *AJHG*. 2017 Feb 2 [cited 2021 Mar 11]; vol. 100, issue 2: 267-280. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.004>
60. Teng M, Ichikawa S, Padgett LR, et al. regSNPs: a strategy for prioritizing regulatory single nucleotide substitutions. *Bioinformatics* 2012 Jul 15 [cited 2021 Mar 11]; 28 (14): 1879-86. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts275>.
61. Jian X, Boerwinkle E, Liu X. *In silico* prediction of splice-altering single nucleotide variantes in the human genome. *Nucleic Acids Research*. 2014 Dec 16 [cited 2021 Mar 15]; 42(22): 13534-13544. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1206>.
62. Liuy X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human non-synonimous SNPs and their functional predictions. *Human Mutation*. 2011 Apr 21 [cited 2021 Mar 15]; 32: 894-899. Doi: <https://doi.org/10.1002/humu.21517>.
63. Liu X, Li C, Mou C, et al. dbNSFP v4: a comprehensive database of transcript-specific functional predictions and annotations for human nonsynonymous and splice-site SNVs. *Genome Medicine*. 2020 Dec 02 [cited 2021 Mar 15]; 12: 103. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00803-9>.

64. Kircher M, Witten DM, Jain P, et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014 Feb 2 [cited 2021 Mar 15]. Doi: <https://doi.org/10.1038/ng.2892>.
65. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, et al. REVEL: an ensemble of method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am. J. Hum. Genet.* 2016 Oct 6 [cited: 2021 Mar 15]; 99(4): 877-885. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.016>.
66. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics.* 2015 Mar 1 [cited 2021 Mar 15]; 31(5): 761-3. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu703>.
67. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. *Bioinformatics.* 2019 Jun 1 [cited 2021 Mar 15]; 35(11): 1978-1980. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>.
68. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number 236200: 1986 Jun 3 [last edited: 2016 Aug 3; cited 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.omim.org/entry/236200>.
69. Reish O, Townsend D, Berry SA, et al. Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1995 Jul [cited 2021 Mar 28]; 57: 127-132. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7611281/> PMID: 7611281.
70. Testai FD, Gorelick PB. Inherited metabolic disorders and stroke part 2: homocystinuria, organic acidurias, and urea cycle disorders. *Arch Neurol.* 2010 Feb [cited 2021 Mar 28]; 67(2): 148-53. Doi: <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.333>.
71. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000000120.23], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000000120.23> (accessed March 28, 2021).
72. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 600496: 1995 Apr 17 [last edited: 2009 Feb 19; cited 2021 March 29]. Available from: <https://www.omim.org/entry/600496>.
73. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 125853: 1993 May 14 [last edited: 2020 Sep 2; cited: 2021 Mar 29]. Available from: <https://www.omim.org/entry/125853>
74. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 612520: 2009 Jan 7 [last edited: 2020 Sep 3; cited: 2021 Mar 29]. Available from: <https://www.omim.org/entry/612520>.

75. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. John Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 617935. 2018 Apr 11 [last edited: 2020 Dec 4; cited 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.omim.org/entry/617935>.
76. Zaman T, Helbig I, Babic Bozovic I, et al. Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* 2018 Feb 21 [cited 2021 Mar 28]; 83:703-717. Note: Erratum: *Ann Neurol.* 2019 Apr 19; 85(6): 948 only. Doi: <https://doi.org/10.1002/ana.25188>.
77. Vanoye CG, Gurnett CA, Holland KD, et al. Novel SCN3A variantes associated with focal epilepsy in children. *Neurobiol. Dis.* 2014 Feb [cited 2021 Mar 28]; 62: 313-322. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.015>.
78. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000522565.5], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000522565.5> (accessed March 28, 2021).
79. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins university, Baltimore, MD. MIM Number: 214800: 1986 Jun 3 [last edited: 2016 Sep 1; cited: 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.omim.org/entry/214800>.
80. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000195978.6], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000195978.6> (accessed March 28, 2021).
81. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 309500: 1986 Jun 4 [last edited: 2016 Sep 13; cited: 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.omim.org/entry/309500>
82. Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, et al. Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nature Genet.* 2003 Nov 23 [cited: 2021 Mar 28]; 35: 313-315. Doi: <https://doi.org/10.1038/ng1264>.
83. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000010981.3], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000010981.3> (accessed March 28, 2021).
84. Lamar T, Vanoye CG, Calhoun J, et al. SCN3A deficiency associated with increased seizure susceptibility. *Neurobiol Dis.* 2017 Jun [cited: 2021 Mar 29]; 102: 38-48. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.02.006>.
85. Celle ME, Cuoco C, Porta S, et al. Interstitial 2q24.3 deletion including SCN2A and SCN3A genes in a patient with autistic features, psychomotor delay, microcephaly and no history of seizures. *Gene.* 2013 Dec 15 [cited: 2021 Mar 29]; 532(2): 294-6. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.073.

86. Zentner GE, Hurd EA, Schnetz MP, et al. CHD7 functions in the nucleolus as a positive regulator of ribosomal RNA biogenesis, *Human Molecular Genetics*. 2010 Sep 15 [cited: 2021 Apr 1]; 19(18): 3491-3501. Doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq265>
87. Nagase T, Kikuno R, Ishikawa K, et al. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XVI. The Complete Sequences of 150 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins *in vitro*. *DNA Research*. 2000 [cited: 2021 Apr 1]; 7(1): 65-73. Doi: <https://doi.org/10.1093/dnares/7.1.65>
88. Sanlaville D, Etchevers HC, Gonzales M, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with *CHD7* truncating mutations correlates with expression during human development. *Journal of Medical Genetics*. 2006 [cited: 2021 Apr 1]; 43: 211-317. Doi: <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2005.036160>
89. Bajpai R, Chen D, Rada-Iglesias A, et al. CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature*. 2010 Feb 3 [cited: 2021 Apr 1]; 463: 958-962. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature08733>
90. Van Nostrand J, Brady C, Jung H, et al. Inappropriate p53 activation during development induces features of CHARGE syndrome. *Nature*. 2014 Aug 3 [cited: 2021 Apr 1]; 514: 228-232. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature13585>
91. Pauli S, Von Velsen N, Burfeind P, et al. CHD7 mutations causing CHARGE síndrome are predominantly of paternal origin. *Clinical Genetics*. 2012 Mar [cited: 2021 Apr 2]; 81(3): 234-239. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01701>
92. Kong A, Frigge M, Masson G, et al. Rate of *de novo* mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012 Aug 22 [cited: 2021 Apr 2]; 488: 471-475. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature11396>
93. Waragai M, Lammers CH, Takeuchi S, et al. PQBP-1, a Novel Polyglutamine Tract-Binding Protein, Inhibits Transcription Activation By Brn-2 and Affects Cell Survival, *Human Molecular Genetics*, 1999 Jun [cited: 2021 Apr 2]; 8(6): 977-987. Doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/8.6.977>
94. Iwamoto K, Huang YT, Ueda S. Genomic organization and alternative transcripts of the human PQBP-1 gene. *Gene*. 2000 Dec 23 [cited: 2021 Apr 2]; 259 (1-2): 69-73. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00437-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00437-6).
95. Okazawa H, Rich T, Chang A, et al. Interaction between Mutant Ataxin-1 and PQBP-1 Affects Transcription and Cell Death. *Neuron*. 2002 May 30 [cited: 2021 Apr 2]; 34(5): 701-713. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00697-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00697-9)

96. Ito H, Yoshimura N, Kurosawa M, et al. Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse, *Human Molecular Genetics*. 2009 Nov 15 [cited: 2021 Apr 2]; 18(22): 4239–4254. Doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp378>
97. Lenski C, Abidi F, Meindl A, et al. Novel Truncating Mutations in the *Polyglutamine Tract Binding Protein 1* Gene (*PQBP1*) Cause Renpenning Syndrome and X-Linked Mental Retardation in Another Family with Microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* 2004 Apr 1 [cited: 2021 Apr 2]; 74(4): 777-780. Doi: <https://doi.org/10.1086/383205>
98. Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, et al. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet.* 2016 Jun 2 [cited: 2021 Apr 2]; 98(6): 1067-1076. Doi: 10.1016/j.ajhg.2016.03.024.
99. Diao JA, Kohane IS, Manrai AK. Biomedical informatics and machine learning for clinical genomics. *Human. Mol. Genet.* 2018 Mar [cited: 2021 Apr 2]; 27(R1): R29-R34. Doi: <https://doi.org/10.193/hmg/ddy088>.