

Mesa Redonda: Avances en Neurología pediátrica

Diagnóstico genético en la Pediatría actual

P. PRIETO MATOS¹, M.J. GARCÍA SALGADO²

¹Servicio de Pediatría. Hospital Universitario de Salamanca. Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico. Universidad de Salamanca. Pediatría Clínica. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca. ²Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Salamanca. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la genética ha experimentado un rápido avance con la introducción de nuevas técnicas de diagnóstico genómico que están revolucionando la medicina. Es probable que la especialidad médica que más esté notando estos cambios sea la pediatría, ya que la gran mayoría de las enfermedades genéticas muestran sus primeros síntomas en los primeros años de vida. Actualmente, existen técnicas que permiten una evaluación precisa y rápida de la información genética de los pacientes, mejorando significativamente la capacidad diagnóstica para identificar enfermedades genéticas. En este artículo, revisaremos unos conceptos básicos de genética que todo pediatra debe conocer y exploraremos las técnicas clásicas y los avances más recientes que incluyen la secuenciación de nueva generación con acceso a la información de todo el genoma, y cómo estas técnicas han transformado y están transformando el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades genéticas.

CONCEPTOS IMPORTANTES

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Es la molécula básica que posee la información genética de los seres vivos. Está compuesto por una combinación de cuatro nucleótidos distintos que son adenina, citosina, guanina y timina, los cuales están unidos a un grupo fosfato y a una pentosa. Se encuentra en el núcleo de las células, formando una doble cadena complementaria unida por

puentes de hidrógeno unidos dos a dos (Adenina-Timina y Citosina-Guanina).

Gen

Es la unidad básica que tiene la información que está codificada en una secuencia de ADN. De forma general, los genes están compuestos por los exones y los intrones. Los exones son secciones del ADN que tienen su representación en el ARN y que codifican las proteínas, mientras que los intrones, son eliminados en el proceso de formación del ARN, y por tanto no tienen representación directa en la síntesis de la proteína, pero por el contrario tienen funciones reguladoras de todo el proceso.

Genoma

Es el conjunto de toda la información genética que se encuentra en el ADN de las células y fue secuenciado en su totalidad en el proyecto genoma humano^(1,2). En la raza humana está compuesto por más de 6.000 millones de nucleótidos (más de 3.000 millones de pares de bases) que dan lugar a más de 20.000 genes (compuestos de exones e intrones) y otra información genética no codificante. Es el responsable de determinar las características y funciones de todos los organismos

Exoma

Es el conjunto de todos los exones de los genes presentes en el genoma, es decir toda la información codificante que da lugar a las proteínas. Apenas llega al 2% de toda la información del genoma, pero cambios en esta secuencia

son los responsables de un porcentaje muy importante de las enfermedades genéticas.

Variante genética

Es cualquier cambio que exista en el ADN de un organismo al compararlo con una secuencia considerada de referencia. En general puede ser una “variante de un solo nucleótido” (SNV), cuando en el DNA se ha cambiado un nucleótido por otro, o puede ser una “variante en el número de copias” (CNV) en la cual existen una pérdida (delección) o ganancia (duplicación) de más de un nucleótido. Se clasifican como patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto, probablemente benigna o benigna⁽³⁾, según su capacidad para causar un enfermedad genética, sustituyendo estos conceptos a los de mutación y polimorfismo.

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Cariotipo

Fue la primera técnica diagnóstica que apareció y aún hoy sigue teniendo mucha utilidad en medicina. No es directamente una técnica de genética molecular ya que valora exclusivamente la forma y característica de los cromosomas bajo un microscopio. El cariotipo convencional o de bandas tiñe los cromosomas con sustancias químicas de manera que permite identificar bandas claras y oscuras, lo que facilita su diferenciación, clasificación y ayudan a la interpretación cuando existe pérdidas o ganancias de partes de cromosomas. El cariotipo FISH aumenta la resolución ya que utiliza sondas fluorescentes que se unen a secuencias específicas del ADN en los cromosomas. Las utilidades del cariotipo en pediatría son las siguientes:

- El cariotipo es útil para identificar pérdidas o ganancias en el número de cromosomas. Es por tanto de obligada realización ante una niña con talla baja, ya que es la técnica ideal de diagnóstico del Síndrome de Turner (X0 y sus variantes), y ante sospecha de trisomías o monosomías, como pueden ser Síndrome de Klinefelter (XXY y sus variantes), síndrome de Edwards (trisomía del 18), síndrome de Patau (trisomía del 14) y otros.
- Delecciones o duplicaciones: la capacidad de detectar estas variantes en el cariotipo estará en función principalmente del tamaño, por lo que dada su baja resolución no tendrá capacidades de detectar delecciones o duplicaciones pequeñas. Es clásico el diagnóstico del Síndrome del Maullido de gato (delección parcial del brazo largo del cromosoma 5), siendo posible el diagnóstico de otros síndromes como el Síndrome de Williams o el Síndrome

de DiGeorge, entre otros, si la delección causante es suficientemente grande.

- Traslocaciones: al visualizar el DNA en su forma habitual es ideal para detectar traslocaciones, superando a técnicas más modernas. Es clásico el cromosoma Filadelfia (traslocación entre cromosomas 9 y 22).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica de genética molecular que permite amplificar de manera exponencial un fragmento de ADN de interés. Está basada en el diseño de unos oligonucleótidos que son complementarios a la secuencia que queremos estudiar, y mediante una enzima (Taq Polimerasa) se amplifica la secuencia diana, repitiéndose en ciclos sucesivos, dando lugar a una amplificación exponencial del fragmento de interés.

- Secuenciación Sanger: es una técnica de secuenciación que permite determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. Fue descrita a finales del siglo XX⁽⁴⁾ y esta basada en la PCR permitiendo detectar con gran precisión cambios pequeños en el DNA (SNVs), así como pequeñas delecciones, duplicaciones o inserciones (CNVs), pero siempre referidos a una zona pequeña del genoma. Es decir, es la técnica ideal para estudiar pequeñas variaciones en genes concretos o en zonas concretas de un gen. Por el contrario no tienen capacidad de detectar grandes CNVs.
- MLPA (Multiple Ligation-dependant Probe Amplification): es una técnica de genética molecular que permite detectar delecciones o duplicaciones de fragmentos de ADN. Se basa⁽⁵⁾ en la hibridación de sondas específicas diseñadas para reconocer la región del ADN de interés y su posterior amplificación. Posteriormente, se realiza una PCR para amplificar los fragmentos que contienen las sondas ligadas y se analizan mediante electroforesis. Si hay una delección o duplicación en la región diana, se observa una variación en la intensidad de las bandas en comparación con un control normal, lo que indica la presencia de una alteración en el número de copias.

CGH arrays

Los CGH arrays (*Comparative Genomic Hybridization arrays*) son una técnica de análisis genómico que se utiliza para detectar CNVs de segmentos de ADN. A día de hoy se considera la prueba ideal para detectar duplicaciones o delecciones a nivel genómico. Fue desarrollada en 1997⁽⁶⁾ a partir de la técnica de CGH, apareciendo las primeras soluciones comerciales en 2005. Permite comparar dos secuencias completas de DNA, habitualmente la secuencia del paciente

que queremos estudiar y una secuencia de referencia. Ambas muestras son marcadas con multitud de sondas fluorescentes que se unen a regiones específicas del ADN genómico, para posteriormente medir la fluorescencia resultante. De manera que si predomina la unión al DNA del paciente se inferirá la presencia de una duplicación, mientras que si predomina la unión al DNA de referencia existirá una delección.

Coinciden con el cariotipo en muchas de sus indicaciones, pero los CGH arrays tienen una mayor resolución, que podrá ser tanta como el tamaño de las sondas diseñadas, que habitualmente se encuentra entre 64-256 kilobases. Esta resolución es suficiente para detectar delecciones y duplicaciones responsables de la gran mayoría de los "Síndromes por genes contiguos" como la delección 22q11 (DiGeorge y sus variantes), delección 1q37, duplicación 16q11 y otros síndromes causados por CNVs que en muchos casos el cariotipo no tiene capacidad de diagnosticar. Debido a la prevalencia de estas alteraciones como causa de discapacidad intelectual y de trastornos del espectro autista, los CGH arrays son la técnica ideal para iniciar el estudio de estas enfermedades⁽⁷⁻⁹⁾. Sin embargo, dado que la técnica se basa en la medición de fluorescencia, no es capaz de detectar las traslocaciones.

Secuenciación de nueva generación (NGS)

La secuenciación masiva es una tecnología de secuenciación de ADN que ha revolucionado el diagnóstico médico genético en los últimos años. Desde su descripción⁽¹⁰⁾ hasta ahora se ha convertido en la forma más rápida y económica para secuenciar el ADN. Se basa en la fragmentación del ADN de interés y su posterior amplificación por PCR. La gran ventaja de esta técnica es la capacidad de secuenciar en poco tiempo y a un bajo costo una gran cantidad de datos genéticos. La evolución constante de la NGS, con unos secuenciadores cada vez con mayor rendimiento, eficiencia y precisión, está permitiendo la secuenciación de muestras de DNA de un tamaño cada vez más grandes, con datos más completos y en un tiempo menor. En función de la cantidad de información genética que se secuenciará la NGS puede estar basada en:

- Paneles concretos: en este caso la técnica de NGS se basa en el diseño de paneles personalizados de genes concretos para determinadas enfermedades. De esta manera se secuenciarán los genes relacionados con la enfermedad de interés. Es de utilidad para aquellas enfermedades con una base genética conocida y limitada. En este grupo podemos incluir las Rasopatías (20-30 genes), miocardiopatías (20-100 genes), tumores tiroideos (10-20 genes) o ataxias (10-100 genes) entre otros. Como ventaja, tiene que al ser pocos genes, la fiabilidad y rapidez es alta y el costo menor. Sin embargo, como desventaja, es preciso

diseñar cada estudio y que cualquier nuevo gen que se agregue a la etiología de la enfermedad precisará de una nueva secuenciación.

- Exoma: mediante el exoma se secuencian todos los exones y la zona del *splicing* de los genes del ADN, pudiendo incluir los más de 20.000 genes conocidos (exoma completo) o todos los relacionados con alguna enfermedad (exoma clínico). Las ventajas del estudio mediante exoma vienen determinadas por la propia capacidad de secuenciar todos los genes, por lo que es de utilidad para enfermedades con mucha variabilidad genética, e incluso permite el reanálisis de la prueba cuando se añaden nuevos genes a la etiología de la enfermedad. Sus principales desventajas principales son la económica y que, dado el número de genes a secuenciar, la fiabilidad del estudio no suele ser tan alta como en los paneles, y pueden existir zonas del estudio con poca profundidad. No obstante, con la continua actualización de los secuenciadores las desventajas desde el punto de vista económico y de la profundidad de la secuenciación cada vez son menores. Actualmente ya puede considerarse de elección en muchos casos de sospecha de enfermedad genética^(11,12).
- Genoma: mediante NGS se secuenciar toda la información del ADN, exones de todos los genes (al igual que el exoma), intrones completos (incluyendo la zona de *splicing*) y todas las zonas no codificantes. Su gran ventaja respecto al exoma es que, dado que es capaz de secuenciar todo el genoma, tiene capacidad de encontrar variantes genéticas responsables de enfermedad que se encuentren en zonas intrónicas profundas o no codificantes. Por otro lado, dado que secuenciar todo el DNA, sin necesidad de cortar el DNA y preparar las librerías, la secuenciación es más rápida que en el exoma. Las desventajas vienen marcadas por el precio⁽¹³⁾ y las dificultades de interpretación del estudio dadas las cantidades de variantes encontradas (millones) y la falta de datos de normalidad. Los avances en bioinformática y la realización de cada vez más genomas irán disminuyendo estas desventajas.

SITUACIÓN ACTUAL DE LAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Las nuevas técnicas diagnósticas han revolucionado la medicina actual y es un campo novedoso y en constante evolución que hace que cada pocos años, e incluso meses, todo cambie radicalmente. En poco tiempo hemos pasado de la secuenciación gen a gen a la secuenciación masiva con

paneles amplios o mediante el exoma completo. Se espera en los próximos años, que el genoma, que actualmente está accesible a pocos pacientes y hospitales, se generalice y consiga sustituir a los CGH arrays y al exoma o paneles amplios que se están manejando en el momento actual. Sin embargo, este progreso desde el punto de vista genómico se está acompañando, y cada vez más, de la detección de multitud de variantes de significado incierto (que podrían estar, o no, relacionadas con enfermedad), de hallazgos incidentales (aquellos no relacionados con la enfermedad del estudio) y otros problemas⁽¹⁴⁾. Por tanto, es esencial una continua actualización por parte de los médicos y hacen necesario un correcto asesoramiento genético al paciente y a sus familiares, tanto antes como después de las pruebas, así como a la creación de unidades de referencia que sean capaces de interpretar y comunicar de manera efectiva los resultados de las pruebas genómicas a los pacientes y a sus familias. Además, las implicaciones éticas y legales de la genómica diagnóstica deben ser consideradas y reguladas adecuadamente. En resumen, aunque la genómica diagnóstica tiene un gran potencial para mejorar el diagnóstico de las enfermedades, su uso seguro y efectivo en la práctica clínica requiere la resolución de importantes desafíos.

BIBLIOGRAFÍA

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822): 860-921.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; 291(5507): 1304-51.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5): 405-24.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12): 5463-7.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(12): e57.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 20(4): 399-407.
- Castells-Sarret N, Cueto-González AM, Borregan M, López-Grondona F, Miró R, Tizzano E, et al. Array CGH como primera opción en el diagnóstico genético: 1.000 casos y análisis de coste-beneficio. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2018; 89(1): 3-11.
- Pinheiro MI, Silva C, Lourenço L, Gonçalves D, Dória S, Guardiano M, et al. Relevancia de los arrays de hibridación genómica comparada en el estudio de los retrasos del desarrollo en pediatría. *Rev Neurol*. 2020; 71(5): 171-6.
- Annunziata S, Bulgheroni S, D'Arrigo S, Esposito S, Taddei M, Saletti V et al. CGH findings in children with complex and essential autistic spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*. 2023; 53(2): 615-23.
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuiire A, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*. 2008; 452(7189): 872-6.
- Dillon OJ, Lunke S, Stark Z, Yeung A, Thorne N; Melbourne Genomics Health Alliance; Gaff C, White SM, Tan TY. Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders. *Eur J Hum Genet*. 2018; 26(5): 644-51.
- Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, Schofield D, Alam K, Shrestha R, et al. Diagnostic Impact and Cost-effectiveness of Whole-Exome Sequencing for Ambulant Children With Suspected Monogenic Conditions. *JAMA Pediatr*. 2017; 171(9): 855-62.
- van Nimwegen KJ, van Soest RA, Veltman JA, Nelen MR, van der Wilt GJ, Vissers LE, et al. Is the \$1000 genome as near as we think? A cost analysis of next-generation sequencing. *Clin Chem*. 2016; 62(11): 1458-64.
- Blackburn HL, Schroeder B, Turner C, Shriver CD, Ellsworth DL, Ellsworth RE. Management of incidental findings in the era of next-generation sequencing. *Curr Genomics*. 2015; 16(3): 159-74.