



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

“Estudio de rendimiento diagnóstico y análisis de resultados de la secuenciación del exoma clínico en pacientes con discapacidad intelectual”

Autor:

María Juliana Ballesta Martínez

Directoras:

Dra. D^a. Encarnación Guillén Navarro

Dra. D^a Virginia Pérez Fernández

Murcia, 28 enero de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

“Estudio de rendimiento diagnóstico y análisis de resultados de la secuenciación del exoma clínico en pacientes con discapacidad intelectual”

Autor:

María Juliana Ballesta Martínez

Directoras:

Dra. D^a. Encarnación Guillén Navarro

Dra. D^a Virginia Pérez Fernández

Murcia, 28 enero de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Encarnación Guillén Navarro y la Dra. D^a. Virginia Pérez Fernández como directoras de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de rendimiento diagnóstico y análisis de resultados de la secuenciación del exoma clínico en pacientes con discapacidad intelectual” realizada por D^a María Juliana Ballesta Martínez en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 28 de enero de 2020.

Dra. D^a. Encarnación Guillén Navarro

Dra. D^a. Virginia Pérez Fernández

RESUMEN

Introducción: La discapacidad intelectual (DI) se define como una limitación significativa en el funcionamiento intelectual y en la conducta adaptativa que se evidencia a lo largo del desarrollo de un individuo. Su prevalencia es de un 1-3% y afecta al individuo, a su familia, y a la comunidad en la que vive, por lo que es una patología con impacto en salud pública. Las causas pueden ser genéticas, adquiridas, ambientales y socioculturales.

Las causas genéticas son responsables de un 30-50% de los casos, siendo éstas muy heterogéneas (cromosómicas, epigenéticas, monogénicas...). Dentro de las causas genéticas de DI, el 15% son atribuidas a alteraciones cromosómicas y un 25-30% de los casos a causas monogénicas. En los últimos años ha habido una descripción masiva de nuevos genes asociados a DI, de nuevos fenotipos clínicos, así como la identificación de fenotipos atípicos o leves de síndromes monogénicos clásicos, lo que demuestra la dificultad cada vez mayor para la orientación clínica y el abordaje del diagnóstico molecular de estas entidades.

El desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico genético molecular, como la secuenciación de nueva generación (NGS) permiten el estudio de todo el genoma (WGS) o bien de todo el exoma (WES) y dentro de éste el exoma clínico, con un potencial diagnóstico elevado. Aun así, cerca del 50% de pacientes con DI quedan sin una etiología conocida tras la aplicación de estas tecnologías.

Llegar al diagnóstico etiológico del paciente con DI es muy importante por el impacto que tiene a nivel del individuo, de sus familias y a nivel sanitario y social.

Objetivos: El objetivo principal de este estudio fue evaluar el rendimiento diagnóstico de la secuenciación del exoma clínico en los pacientes con DI atendidos en la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, así como evaluar el impacto económico de su incorporación en la práctica clínica. Secundariamente se quiso evaluar qué variables clínicas podían asociarse a un mayor rendimiento del

exoma clínico para establecer un protocolo de diagnóstico eficiente del paciente con DI en la Sección.

Material y métodos: Se realizó un estudio observacional retrospectivo de 188 pacientes con DI valorados en la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, en los que se procedió al estudio de exoma clínico en su proceso diagnóstico. Como criterio de inclusión, todos los pacientes debían tener una valoración clínica completa sin detectar una causa que explicara su DI, así como estudio de array-CGH y estudio molecular de X frágil con resultado normal. Se recogieron las variables de interés mediante revisión de las historias clínicas y se realizó un análisis estadístico buscando asociación con la obtención de un diagnóstico molecular en el exoma clínico. Se recogieron también los costes derivados de los estudios genéticos realizados para un análisis económico en relación a la incorporación del exoma clínico en la práctica clínica habitual.

Resultados: Hubo un predominio de pacientes varones (1,8:1). La edad media de los pacientes en su primera valoración fue de 5.2 años. Se detectaron antecedentes familiares de primer grado de DI en el 24% y consanguinidad en el 15%. El 45.2% fueron clasificados como DI moderada y el 83.5% se trató de DI sindrómica.

Se obtuvo un rendimiento del exoma clínico en la población de estudio de un 34%. En el análisis realizado, no se detectó asociación entre ninguna de las variables clínicas con un mayor rendimiento del exoma. La detección de rasgos dismórficos fue la variable que más se acercó a la significación estadística. No hubo diferencias en cuanto a rendimiento diagnóstico del exoma según las distintas clasificaciones establecidas (gravedad de la DI o si se trató de DI aislada o sindrómica), aunque sí hubo un porcentaje algo más elevado de diagnósticos en la DI moderada (41.6%) y sindrómica (39%).

Se observó una amplia heterogeneidad genética, con detección de variantes causales en 59 genes distintos, siendo el 63.5% variantes nuevas no descritas en la literatura. La mayoría fueron detectadas en genes con herencia autosómica dominante (62.5%) y en la mayoría de los casos ocurrieron *de novo* (90%). En caso de obtener un resultado molecular, la presencia de consanguinidad se asoció con la detección de variantes en un gen con herencia autosómica recesiva. El porcentaje de variables de significado incierto fue considerable (46.2%) al realizar

un abordaje individual del exoma clínico. Tras estudio de segregación en progenitores el 17.2% se clasificaron como patogénicas, lo que contribuyó con un 7.4% al rendimiento diagnóstico final. El 53.2% de los diagnósticos detectados fueron entidades difícilmente orientables por el clínico.

Se observó un acortamiento del tiempo al diagnóstico y una disminución de costes respecto a los estudios diagnósticos del 62% con la incorporación del exoma clínico en el proceso diagnóstico de los pacientes.

Discusión: El rendimiento diagnóstico del exoma clínico para determinar la base molecular de la DI (34%) fue significativo y similar al descrito en otros estudios publicados, lo que lo respalda como herramienta diagnóstica útil en el paciente con DI. En la literatura se describen rendimientos similares tras la aplicación de WES o WGS, por lo que en la práctica asistencial es más eficaz la utilización del exoma clínico.

La amplia heterogeneidad molecular identificada, así como el predominio de variantes genéticas causales en genes con herencia dominante *de novo* coinciden con publicaciones previas. El estudio de segregación de las VOUS es imprescindible para su correcta interpretación y clasificación en caso de no realizar un abordaje del estudio mediante trio.

Ninguna de las variables analizadas mostró asociación con un mayor rendimiento del exoma; este hecho junto con que más de la mitad de los diagnósticos obtenidos no se hubieran podido orientar clínicamente, y el acortamiento del tiempo al diagnóstico y la disminución de costes demostrada tras la utilización del exoma clínico, demuestra la importancia de incorporarlo en el proceso diagnóstico del paciente con DI de forma precoz.

PALABRAS CLAVE: discapacidad intelectual, retraso global del desarrollo, secuenciación masiva, NGS, exoma clínico, rendimiento, eficiencia.

ABSTRACT

Introduction: Intellectual disability (ID) is characterized by significant limitations in both intellectual functioning and in adaptive behaviour, which originates before the age 18. It has a prevalence of 1-3% and affects the individual, its family and the community he lives in, therefore being a public health concern. ID can be caused by genetic, acquired, environmental and sociocultural factors.

Approximately 30-50% of ID cases are due to a genetic cause, which are very heterogeneous (chromosomal, epigenetic, monogenic...). Chromosomal abnormalities are responsible of 15% of genetic causes, and 25-30% are due to genetic variants in single genes. In the recent years there has been a massive description of new ID-related genes, new phenotypes, as well as identification of mild or atypical phenotypes of known clinical entities. These facts show how clinical detection of all these entities is increasingly difficult and the complexity towards a molecular approach of ID cases.

Development of next-generation sequencing (NGS) techniques, which allow the study of the whole genome (WGS), or the whole exome (WES) or other diagnostic approaches such as clinical exome sequencing, have shown a high diagnostic potential. Even so after the application of these diagnostic techniques, around 50% of ID patients remain without an etiological diagnosis.

Reaching the etiological diagnosis of a patient with ID is essential due to its impact for the individual, his family and at health and social level.

Objectives: The aim of this work was to evaluate the diagnostic yield of clinical exome sequencing in ID patients evaluated in the Medical Genetics Department of the Hospital Virgen de la Arrixaca in Murcia, Spain, and the economic impact of its introduction in clinical practice. An analysis of diagnostic yield according to the different clinical variables was performed in order to establish an efficient diagnostic protocol for ID patients in the Department.

Material and methods: This is a retrospective observational study of 188 ID patients in which clinical exome sequencing was been performed in their diagnostic process. All patients had undergone a complete clinical evaluation in order to exclude possible non-genetic causes for ID, as well as normal array-CGH

and fragile X molecular analysis, as inclusion criteria. Clinical variables were collected from medical reports, and a statistical analysis was performed looking for association with obtaining a molecular diagnosis on clinical exome sequencing. Costs derived from the genetic studies performed prior to exome sequencing application were also collected in order to analyze the economic impact of introducing clinical exome sequencing in clinical practice.

Results: A predominance of male sex was observed (1.8:1 ratio). Median age of first clinical assessment was of 5.2 years. Positive family history of ID was detected in 24% and parents were consanguineous in 15% of cases. 45.2% were classified as moderate ID and 83.5% were syndromic.

The diagnostic yield of clinical exome sequencing in the population was 34%. No association was detected between any of the clinical variables with a higher diagnostic yield of clinical exome. The detection of dysmorphic features almost reached statistical significance. The diagnostic yield proved equally for all severity grades and both syndromic and non-syndromic ID. Though, there was a slightly higher percentage of diagnoses in the moderate (41.6%) and syndromic (39%) ID groups of patients.

Causal variants were detected in 59 different genes, of which 63.5% were new, not previously described variants, thus remarking the wide genetic heterogeneity in ID patients. 62.5% of the molecular diagnosis detected occurred in autosomal dominant genes and 90% of these occurred *de novo*. In case of obtaining a diagnosis, if parents were consanguineous, this was associated with obtaining a variant in an autosomal recessive gene. Variants of unknown significance (VOUS) were detected in 46.2% of cases due to a singleton approach. After VOUS segregation analysis 17.2% were finally classified as causal, contributing to a 7.4% of the diagnostic yield. 53.2% of the diagnosis weren't clinically detectable.

Time to diagnosis was shortened and diagnostic study costs decreased in a 62% after clinical exome sequencing implementation.

Discussion: Diagnostic yield of clinical exome sequencing was significant (34%) and similar to other studies, supporting its utility in diagnosis of ID patients. Different articles show similar diagnostic yields in ID patients after using WES or WGS, therefore clinical exome sequencing is an effective approach for clinical practice.

Wide genetic heterogeneity and predominance of autosomal dominant *de novo* variants in ID patients was observed, which overlaps with other studies. VOUS segregation analysis is crucial for final interpretation of exome sequencing results in case of singleton approach.

No association was found between any of the variables analyzed and a higher diagnostic yield; added to the fact that many of the diagnoses weren't clinically detectable, the reduction of time to diagnosis and the economic savings with respect to classical diagnostic studies, strengthen the early implementation of clinical exome sequencing in the diagnostic process of ID patients in clinical practice.

KEYWORDS: Intellectual disability, global developmental delay, exome sequencing, NGS, clinical exome, diagnostic yield, efficiency.

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo completo una etapa de mi vida, en la cual he contado con la ayuda y el apoyo de muchas personas, y ahora llega el momento de poder agradecer a todos aquellos que de una forma u otra han sido imprescindibles para que haya podido ser así.

Primero agradecer a mis directoras de tesis, Encarna Guillen y Virginia Pérez su apoyo y guía para la realización de esta tesis. Mi dedicación al mundo de la genética se la debo a Encarna Guillén quien me brindó la oportunidad de formarme en esta disciplina durante mi residencia como Pediatra. A pesar de mis dudas iniciales, he descubierto un mundo interesantísimo y motivador, del que disfruto todos los días en mi trabajo. Gracias por confiar en mí. Ella me ha inculcado la perseverancia, el espíritu de trabajo y la lucha para conseguir los objetivos que uno se propone. A Virginia, quiero agradecer su apoyo y paciencia conmigo con los análisis estadísticos, así como su disposición, tranquilidad y ayuda siempre que la he necesitado. Gracias, siempre has estado ahí.

También agradecer a todo el equipo de Genética Médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, mis compañeras, el apoyo y motivación durante todo mi trabajo. A mis compañeras genetistas, Vanesa, María José, AnaTe y Lidia, por sus ánimos y frases de apoyo durante estos meses de trabajo; así como a su participación en el estudio de pacientes con discapacidad intelectual en la Sección, base del trabajo de esta tesis. A Reme, nuestra enfermera, por su disposición siempre a nuestras solicitudes y encargarse diligentemente de todos los envíos de las muestras de los pacientes del estudio. A nuestras auxiliares, Ada y Loli, por su estupenda organización y exquisito control de todo lo relacionado con las agendas y la organización de la consulta, sin ellas nada sería posible. Agradecer especialmente a Ada el enorme apoyo y ayuda desinteresada en esta tesis, consiguiéndome todas las historias clínicas, resultados de exoma clínica y cualquier documento que he necesitado en tiempo récord. Su ayuda me ha servido de motor de fórmula uno para la elaboración de este trabajo. En resumen, todas, desde auxiliares, enfermera y facultativas sois excelentes personas y profesionales.

Agradecer también a María Barreda, compañera en la Universidad, excelente profesional y amiga por su inestimable ayuda a lo largo de todo mi proceso de tesis; siempre transmitiendo tranquilidad y haciéndolo todo fácil.

No quiero olvidarme de agradecer también a los pacientes con discapacidad intelectual que acuden a nuestras consultas, su perseverancia y confianza en nosotras, ya que a veces el camino hasta el diagnóstico es largo; por no tirar la toalla y seguir confiando en nuestro trabajo.

Sin embargo, todo este trabajo ha sido también llevadero gracias a todas aquellas personas de mi entorno que me han arropado personalmente durante estos años. A mi familia, mi madre y mi maina, mi marido Arturo y mis hijos Sergio, Javier y Álvaro, así como otros familiares; todos habéis prestado vuestro interés en cómo me iba con el doctorado, me habéis animado y siempre habéis pensado que hago un gran trabajo, eso me ha dado ánimos y fuerza para continuar en momentos de flaqueza. En especial a mi madre, gran profesional y mujer revolucionaria en su trabajo, formando parte de los inicios de la genética en España, luchadora por el reconocimiento de esta especialidad. Tanto ella como mi maina son las responsables de que yo sea como soy, con su cariño, su educación en valores, y su apoyo infinito en todos los aspectos de mi vida. Por la formación que me han dado y su dedicación personal, inculcándome el trabajar “hasta el final” y enseñarme a ser feliz.

A mi marido Arturo, por su apoyo y acompañamiento todos estos años, por su confianza ciega en mí. Viéndome a través de sus ojos me ha dado la fuerza para seguir adelante en muchos aspectos de mi vida; por su clarividencia y ayuda en momentos de flaqueza. Sin tu apoyo incondicional, tus ánimos, tu comprensión, tu admiración y tu cariño todo lo que he hecho no hubiese salido así de bien. Soy muy afortunada de tenerte a mi lado.

A mis hijos, Sergio, Javier y Álvaro, que son el motor de mi vida. Por entender por qué mamá tenía que estar siempre trabajando, por todos esos besos y abrazos que me dabais mientras estaba sentada frente al ordenador, por no echarme en cara mi ausencia en ciertos momentos. Finalizo diciéndoos, que espero que entendáis y comprendáis la recompensa que espera a cada sacrificio que realizamos. El tiempo será el mejor juez, y esta carta será el mejor testigo entre el sacrificio y el éxito. Espero poder compensaros con todo el cariño y devoción que os tengo.

“La simplicidad es lo más difícil de conseguir en este mundo, es el último límite de la experiencia y el último esfuerzo del genio.”

George Sand

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	25
ÍNDICE DE FIGURAS.....	27
ÍNDICE DE TABLAS.....	29
I - INTRODUCCIÓN.....	31
1.1. DISCAPACIDAD INTELECTUAL (DI). DEFINICIÓN.....	33
1.2. DISCAPACIDAD INTELECTUAL. EPIDEMIOLOGÍA E IMPACTO.....	35
1.3. DISCAPACIDAD INTELECTUAL. CLASIFICACIÓN.....	37
1.4. DISCAPACIDAD INTELECTUAL. ETIOLOGÍA.....	40
1.4.1 Trastornos hereditarios.....	41
1.4.1.1 <i>Anomalías cromosómicas.....</i>	<i>42</i>
1.4.1.2 <i>Anomalías monogénicas.....</i>	<i>42</i>
1.4.1.3 <i>Patrones de herencia no mendelianos.....</i>	<i>42</i>
1.4.2 Alteraciones tempranas del desarrollo embrionario.....	43
1.4.2.1 <i>Síndromes de influencia prenatal.....</i>	<i>43</i>
1.4.2.2 <i>Infecciones maternas.....</i>	<i>43</i>
1.4.2.3 <i>Exposición a tóxicos, fármacos, radiaciones.....</i>	<i>43</i>
1.4.3 Problemas durante la gestación y perinatales.....	44
1.4.4 Enfermedades adquiridas en la infancia.....	44
1.4.5 Factores ambientales y socioculturales.....	45
1.5. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL.....	46
1.5.1 Historia clínica.....	47
1.5.2 Exploración física.....	48
1.5.3 Síntesis clínica.....	50
1.5.4 Pruebas de imagen.....	50
1.5.5 Estudios metabólicos.....	52
1.6. ESTUDIOS GENÉTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL.....	53

1.6.1.	Cariotipo.....	54
1.6.2.	FISH (Hibridación In Situ Fluorescente)	55
1.6.3.	MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)....	56
1.6.4.	Estudio molecular X frágil y DI ligada a X	56
1.6.5.	Array-CGH (Array-based Comparative Genomic Hybridization)	57
1.6.6.	Secuenciación Sanger	59
1.7.	SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS; NEXT GENERATION SEQUENCING).....	60
1.7.1.	Rendimiento diagnóstico en Discapacidad Intelectual.....	63
1.7.2.	Hallazgos incidentales.....	64
1.7.3.	Consentimiento informado	65
II – JUSTIFICACIÓN.....		67
III – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....		71
3.1	HIPÓTESIS	73
3.2	OBJETIVOS.....	73
IV – MATERIAL Y MÉTODOS		75
4.1	TIPO DE ESTUDIO	77
4.2	POBLACIÓN DE ESTUDIO	77
4.2.1	Tamaño muestral	78
4.2.2	Criterios específicos de inclusión y exclusión	79
4.3	RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.....	80
4.4	ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DEL EXOMA	81
4.4.1	Obtención de muestras.....	81
4.4.2	Consentimiento informado	82
4.4.3	Metodología del exoma realizado	82
4.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	84
V - RESULTADOS		87
5.1	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	89
5.1.1.	Datos demográficos.....	89
5.1.2.	Características clínicas de los pacientes:.....	90

5.1.3.	Estudios solicitados previo a la realización exoma clínico	92
5.1.4.	Descripción de tiempos hasta realización de exoma clínico y tiempo hasta diagnóstico	93
5.2	RESULTADOS DE EXOMA CLÍNICO	94
5.2.1	Tipos de variantes detectadas en el exoma clínico	94
5.2.2	Hallazgos incidentales	96
5.3	RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL EXOMA CLÍNICO.....	97
5.3.1	Heterogeneidad genética de la población	98
5.3.2	Análisis clínico de los diagnósticos	103
5.4	RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO SEGÚN VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS Y AÑO DE ESTUDIO	104
5.4.1	Datos demográficos y rendimiento del exoma	104
5.4.1.1	<i>Sexo y rendimiento diagnóstico del exoma</i>	104
5.4.1.2	<i>Edad de los padres y detección de mutación causal de novo</i>	105
5.4.1.3	<i>Origen y consanguinidad</i>	105
5.4.1.4	<i>Consanguinidad y rendimiento diagnóstico del exoma / patrón de herencia de los casos diagnosticados</i>	106
5.4.1.5	<i>Antecedentes familiares de DI y rendimiento diagnóstico del exoma / relación con grado de severidad de la DI</i>	106
5.4.2.	Datos clínicos y rendimiento del exoma	106
5.4.2.1	<i>Rendimiento diagnóstico del exoma según grado de DI</i>	107
5.4.2.2	<i>Rendimiento diagnóstico del exoma y solicitud de estudios previo a exoma según clasificación de DI en sindrómica o aislada</i>	107
5.4.2.3	<i>Rendimiento diagnóstico del exoma según presencia y número de malformaciones asociadas</i>	107
5.4.2.4	<i>Rendimiento diagnóstico del exoma clínico según anomalías clínicas y comorbilidades</i>	108
5.4.2.5	<i>Rendimiento diagnóstico del exoma según antecedentes personales</i>	109
5.4.3	Análisis de tiempo hasta diagnóstico y rendimiento diagnóstico según el momento de evaluación (casos nuevos / reevaluados)	110
5.5	ESTUDIO DE COSTES	111

5.5.1	Costes previos a la realización del exoma clínico.....	112
5.5.2	Costes del exoma clínico	113
5.5.3	Costes tras exoma clínico	113
5.5.4	Análisis económico	114
5.5.4.1	<i>Análisis de costes según pacientes nuevos/reevaluados</i>	<i>115</i>
5.5.4.2	<i>Análisis de costes según grado de DI</i>	<i>115</i>
5.5.4.3	<i>Análisis de costes según pacientes con DI aislada o sindrómica.....</i>	<i>115</i>
5.5.4.4	<i>Análisis de costes según diagnóstico final.....</i>	<i>115</i>
VI	- DISCUSIÓN	117
6.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS.....	120
6.1.1	Datos demográficos:.....	120
6.1.2	Características clínicas de los pacientes:.....	123
6.1.3	Estudios solicitados previo a la realización exoma clínico	125
6.1.4	Tiempo hasta diagnóstico	128
6.2	RESULTADOS DE EXOMA CLÍNICO	129
6.2.1	Tipos de variantes detectadas en el exoma.....	130
6.2.2	Patrón de herencia y tipo de herencia de los diagnósticos confirmados	131
6.2.3	Tipos de diagnósticos	132
6.2.4	Hallazgos incidentales.....	135
6.3	RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL EXOMA CLÍNICO.....	135
6.3.1	Rendimiento del exoma clínico según distintas variables	141
6.4	ANÁLISIS DE COSTES	143
6.5	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	145
6.6	FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	146
VII	- CONCLUSIONES	149
VIII	- BIBLIOGRAFÍA.....	153
IX	- ANEXOS	173
	ANEXO 1. DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.....	175

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE NGS.....	181
ANEXO 3. VARIABLES RECOGIDAS EN EL ESTUDIO.	187
ANEXO 4. RECOMENDACIONES PARA CLASIFICAR LAS VARIANTES DETECTADAS EN EXOMA SEGÚN LA ACMG (141).....	193
ANEXO 5. APROBACIÓN DEL ESTUDIO POR EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HCUVA	197
ANEXO 6. PROPUESTA DE ALGORITMO DIAGNÓSTICO EN DI.....	199

ABREVIATURAS

AADI	Asociación Americana de Discapacidad Intelectual
ACMG	American College of Medical Genetics
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AD	Autosómica Dominante
AF	Antecedentes Familiares
AR	Autosómica Recesiva
CBGC	Centro de Bioquímica y Genética Clínica
CGH	Hibridación Genómica Comparada
CI	Coficiente Intelectual
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades
CMV	Citomegalovirus
CNV	Variante de número de copia (copy number variant)
DI	Discapacidad Intelectual
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	Exploración física
ECM	Errores congénitos del metabolismo
FISH	Hibridación in situ fluorescente (Fluorescence In Situ Hybridization)
FIV-ICSI	Fecundación in vitro – inyección intracitoplasmática
HCUVA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
HPO	Human Phenotype Ontology
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays
IA	Inseminación artificial
LOF	Pérdida de función (Loss of Function)

MLPA	Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
NGS	Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ORL	Otorrinolaringología
PC	Perímetro Craneal
PCR	Prueba de proteína C Reactiva
RCIU	Retraso de Crecimiento Intrauterino
RGD	Retraso Global del Desarrollo
RM	Resonancia Magnética
RPM	Retraso Psicomotor
SAICAR	Deficiencia de adenilosuccinato liasa
SNC	Sistema nervioso central
SNV	Variante de nucleótido único (Single nucleotide variant)
TDAH	Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad
TEA	Trastorno del Espectro Autista
TAC	Tomografía Axial Computarizada
VOUS	Variante de significado incierto (Variant of unknown significance)
WES	Secuenciación del genoma (Whole Exome Sequencing)
WGS	Secuenciación del exoma (Whole Genome Sequencing)
WISC	Escala de Inteligencia para niños de Weschler (Weschler Intelligence Scale for Children)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Visión pluridimensional de la DI	34
Figura 1.2: Distribución de la DI según gravedad.....	37
Figura 1.3: Factores que intervienen en el neurodesarrollo.	45
Figura 1.4: Simbología estandarizada para la realización del árbol familiar	48
Figura 1.5: Ideograma del cromosoma 1 con cinco niveles de resolución de bandas G.....	54
Figura 1.6: Imagen de delección 22q11.2 mediante FISH.....	55
Figura 4.1: Proceso de análisis bioinformático de los datos de exoma.....	84
Figura 5.1: Características clínicas de los pacientes con DI sindrómica.....	92
Figura 5.2: Estudios solicitados previo al exoma clínico	93
Figura 5.3: Resultados de exoma clínico.....	94
Figura 5.4: Tipos de variantes detectadas en el exoma.....	95
Figura 5.5: Clasificación final de las VOUS según tipo de variante.....	94
Figura 5.6: Rendimiento diagnóstico del exoma clínico y patrones de herencia..	97
Figura 5.7: Tipo de herencia de los casos diagnosticados	96
Figura 5.8: Análisis de variables de tiempo en pacientes nuevos / reevaluados	111
Figura 5.9: Distribución de los costes de los estudios realizados previo al exoma clínico.....	113
Figura 5.10: Distribución del coste de los estudios diagnósticos en pacientes con discapacidad intelectual.....	114
Figura 5.11: Media de costes de estudios genéticos solicitados previo al exoma clínico según las distintas clasificaciones de los pacientes con DI.	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Gravedad de la DI según el DSM-V.....	39
Tabla 1.2: Objetivos del diagnóstico del paciente con DI.....	46
Tabla 1.3: Hallazgos incidentales a informar según las recomendaciones de la ACMG versión 2.0 (2016)	64
Tabla 5.1: Características demográficas de la población.....	90
Tabla 5.2: Distribución de los pacientes según las distintas clasificaciones	91
Tabla 5.3: Hallazgos incidentales detectados en el exoma clínico.....	96
Tabla 5.4: Resultados moleculares patogénicos del exoma clínico.....	99
Tabla 5.5: Rendimiento diagnóstico del exoma según sexo	104
Tabla 5.6: Relación entre origen y consanguinidad	105
Tabla 5.7: Relación entre consanguinidad y patrón de herencia de los casos diagnosticados	106
Tabla 5.8: Variables clínicas y rendimiento del exoma I.....	108
Tabla 5.9: Variables clínicas y rendimiento del exoma II.....	109
Tabla 5.10: Antecedentes personales y rendimiento del exoma	110
Tabla 6.1: Comparativa de rendimiento de WES con paneles dirigidos en pacientes con DI	136
Tabla 6.2: Comparativa de rendimiento diagnóstico de WES/WGS en pacientes con DI.....	141

I - INTRODUCCIÓN

I – INTRODUCCIÓN

1.1. DISCAPACIDAD INTELECTUAL (DI). DEFINICIÓN

La discapacidad intelectual (DI) se caracteriza por una limitación significativa tanto en el funcionamiento intelectual como en la conducta adaptativa de un individuo, que se origina antes de los 18 años, definición acuñada por la Asociación Americana de Discapacidad Intelectual (AADI) y el Manual Diagnóstico y Estadístico de enfermedades Mentales (DSM V) (1-3).

El *funcionamiento intelectual*, o bien inteligencia, hace referencia a la capacidad mental del individuo, en cuanto a razonamiento, aprendizaje y resolución de problemas. El funcionamiento intelectual puede medirse mediante los test de inteligencia o cálculo de coeficiente intelectual (CI). Un cálculo de CI inferior a 70 indica una limitación en el funcionamiento intelectual del individuo (4).

La *conducta adaptativa* es el conjunto de habilidades conceptuales, sociales y prácticas que se aprenden y ejecutan en la vida diaria. Habilidades conceptuales como son el lenguaje, la lectura, la escritura, los conceptos numéricos, dinero, distribución del tiempo, el razonamiento, la memoria y la autodirección. Las habilidades sociales hacen referencia a las habilidades de comunicación interpersonal, la empatía, candidez, autoestima, concepto de responsabilidad social, resolución de problemas, cautela, seguimiento de reglas y obediencia de normas. Dentro de las habilidades prácticas se incluyen las actividades de cuidado personal (aseo, vestirse, comer), cuidado de la salud, habilidades ocupacionales y de organización, seguimiento de rutinas, transporte, uso del teléfono...etc. También existen test estandarizados para la evaluación de la conducta adaptativa (5, 6).

Además del funcionamiento intelectual y de la conducta adaptativa, deben tenerse en cuenta otros factores cuando valoramos la DI en un individuo como son los factores sociales y culturales. La diversidad lingüística y cultural pueden influir en el modo que un individuo se comporta, se mueve o se comunica. También es importante valorar que los individuos pueden presentar limitaciones

en ciertas esferas, así como habilidades en otras y que el funcionamiento de un individuo puede modificarse en el tiempo con ayudas o apoyos (7). Por lo que la valoración de la capacidad de un individuo puede ser distinta o modificarse en distintos momentos de su vida.

Tras esta definición, se evidencia que la valoración de un individuo con DI precisa de muchas evaluaciones en distintas áreas de funcionamiento y que sólo tras la valoración de todas ellas se podrá establecer si un individuo presenta o no DI, su gravedad y organizar la estrategia de apoyos individualizados para cada persona. Se trata por tanto de una visión pluridimensional de la DI en sus aspectos biológicos, psicológicos, pedagógicos, familiar y social (Figura 1.1).

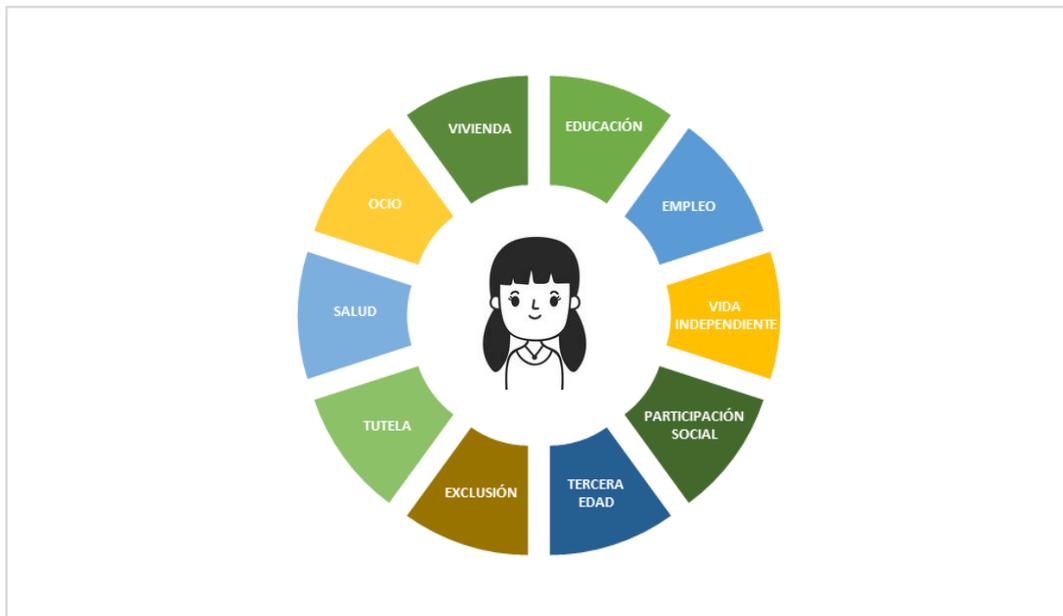


Figura 1.1: Visión pluridimensional de la DI

La DI se detecta a lo largo del desarrollo de un individuo, de forma variable, según el grado de afectación, por lo que está incluida dentro del grupo de los desórdenes del neurodesarrollo en el DSM V.

Existen diversas escalas y test de valoración del coeficiente de desarrollo en niños pequeños, para intentar identificar a aquellos que van a desarrollar una DI, aunque el diagnóstico de DI se establece a partir de los 5 años, cuando ya existen pruebas estandarizadas para su diagnóstico (4, 8).

En menores de 5 años, se puede realizar el diagnóstico de retraso psicomotor (RPM) o del desarrollo (RGD) cuando se evidencia un retraso en dos o más de las áreas del desarrollo (motricidad gruesa, motricidad fina, lenguaje, cognitivo, social/personal...), lo cual es predictivo de una DI posterior (9). Cuando se afecta un solo dominio puede ser transitorio y carecer de capacidad de predicción respecto al desarrollo de una discapacidad cognitiva posterior (10).

1.2. DISCAPACIDAD INTELECTUAL. EPIDEMIOLOGÍA E IMPACTO

La prevalencia de la DI en la población general es de un 1-3% (1, 4, 11-14). La DI afecta al individuo, a su familia, y a la comunidad en la que vive. Las personas con DI presentan necesidades de apoyo en diferentes ámbitos, como el desarrollo personal, la educación, las actividades de la vida cotidiana, el empleo, las relaciones sociales y la salud, (15), por lo que es una patología con impacto en salud pública (16, 17).

Muchos estudios epidemiológicos confirman la prevalencia mundial de DI en torno al 1%, siendo más cercana al 3% en países con ingresos medios o bajos o con alta natalidad (13, 18-20). Las cifras de prevalencia son distintas cuando se valora la DI según su gravedad, estimándose una prevalencia de la DI grave en torno a 6/1000 (2), comparada con la de la DI leve, más cercana al 3%. La prevalencia de la DI leve es mayor, puesto que se ve más influida por factores externos (sistema sanitario materno-infantil más precario, con peor manejo gestacional, perinatal y neonatal e infantil, deficiencias alimentarias, nivel educativo de los padres, acceso a la educación) y en cambio la prevalencia de la DI grave es más estable y se le atribuye una etiología genética en una mayor proporción (13, 20-24).

La prevalencia también varía con la edad y el sexo, siendo más prevalente en varones (ratio varón: mujer 1.6:1) atribuido a los genes responsables de la discapacidad intelectual ligada a X (19, 22, 25, 26). También se ve afectada por la edad, siendo más prevalente el diagnóstico de la DI en edad escolar, debido que es a esta edad donde se identifican el mayor número de casos por los mayores requerimientos cognitivos en el aprendizaje. La prevalencia disminuye en la edad adulta dado que en casos de DI grave o profunda la esperanza de vida puede estar disminuida (13). A pesar de la menor esperanza de vida y/o la menor

probabilidad de descendencia en los pacientes con DI grave, la incidencia de la DI en la población general se mantiene estable, debido a la gran heterogeneidad genética causal y a la mayor frecuencia de variantes patogénicas *de novo* en genes con herencia autosómica dominante en estos pacientes (23, 27).

No hay muchos datos sobre incidencia, pero algunos autores estiman una incidencia de 9.1-12.6 por 1000 habitantes (28, 29) y una incidencia acumulada de 0.62-1.58% (30). Si lo aplicamos a la población murciana con una media de 15.290 recién nacidos/año en los años de estudio 2015-2018, según los datos obtenidos del Centro Regional de Estadística de Murcia (31, 32), podemos estimar que la incidencia anual de la DI en la Región de Murcia es de entre 139-192 niños/año. Aun así, hablar de incidencia en la DI es un concepto algo confuso puesto que el momento de diagnóstico de DI en un individuo es variable y depende de diversos factores, entre ellos, el grado de DI.

Los pacientes con DI asocian comorbilidades tanto físicas (malformaciones o anomalías congénitas), sensoriales, como neurológico-conductuales (trastornos de conducta, autismo y epilepsia), lo que hace más complejo el manejo de estos pacientes (33-38). Suelen asociarse también la estigmatización y la discriminación (17, 39, 40). Todos estos factores demuestran el impacto que tiene la DI en la sociedad y refuerza la importancia de medir su carga. Existen estudios en los que se ha realizado una estimación del coste que representa un individuo con DI a lo largo de su vida, estimando un coste sanitario de 1 millón de dólares por paciente (14, 41). Otros autores europeos han estimado un coste global de 16.000-20.000 euros por paciente referente a gastos previos al diagnóstico, de los cuales el 40-42% es atribuido a los estudios diagnósticos (14, 42-44).

Llegar al diagnóstico etiológico del paciente con DI es muy importante por el impacto que tiene a nivel del propio individuo, ya que va a permitir conocer la causa, el pronóstico, posibles tratamientos y/o participación en ensayos clínicos; en su familia, con la detección de familiares en riesgo y la posibilidad de aplicación de opciones reproductivas para futuras gestaciones en caso de deberse a una causa genética con riesgo de recurrencia, así como a nivel social y económico. (12, 14, 45, 46). Es por ello que es y debe ser un reto para los facultativos que trabajan con pacientes con DI, así como para los sistemas sanitarios, el seguir trabajando en mejorar los métodos diagnósticos y la

realización de protocolos para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes (10, 12, 14, 45).

1.3. DISCAPACIDAD INTELECTUAL. CLASIFICACIÓN

La DI se puede clasificar según su forma de presentación o su gravedad. Según la primera, la DI puede ser no sindrómica, cuando aparece de forma aislada o sindrómica, cuando aparece combinada con signos físicos (malformaciones, rasgos dismórficos), alteración de la somatometría y/o alteraciones neurológicas (epilepsia, trastornos de conducta o trastorno del espectro autista (TEA))(14, 24, 38).

Respecto a la clasificación según gravedad, se clasifica como DI leve, moderada, grave o profunda (13, 16). La distribución en la población general es la reflejada en la Figura 1.2.

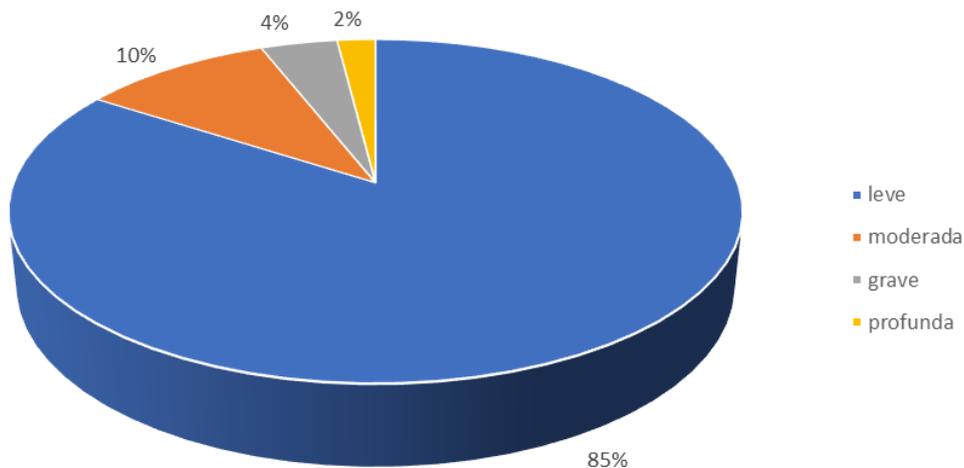


Figura 1.2: Distribución de la DI según gravedad

En el pasado, la determinación de la gravedad de la DI se basaba tan solo en el CI. Existen pruebas estandarizadas clásicas para establecer el valor del CI, como son las pruebas Weschler para la inteligencia en niños (WISC) en sus diferentes formatos (47, 48). En base a estos resultados, los sistemas clasificatorios DSM-IV y CIE-10, establecían la siguiente clasificación: DI leve: CI 69-50, DI moderada: CI 49-35, DI grave: CI 34-20 y DI profunda: CI <20 (49-51). Según

escalas de WISC, el CI medio poblacional es de 100 con una desviación típica de 10 (4).

En la práctica clínica habitual, la clasificación en cuanto a gravedad en pacientes con DI suele hacerse en relación con la adquisición de los hitos del desarrollo motor, del lenguaje y autonomía, o requerimientos de apoyo a nivel escolar, sin tener en muchas ocasiones un cálculo formal del CI. Esto es debido a las dificultades que presentan muchos pacientes con DI para la ejecución de los test debido a las comorbilidades que suelen asociar (epilepsia, trastornos de conducta, TEA), así como su mayor imprecisión en casos de DI grave y profunda donde es difícil la colaboración del paciente (52, 53).

Es importante clasificar la DI en cuanto a su gravedad ya que de esta forma se van a ajustar mejor las necesidades de cada individuo en todos los ámbitos (social, educacional, sanitario) (2, 13). Esta clasificación también tiene implicaciones en cuanto a las posibilidades diagnósticas, ya que según algunas publicaciones, es dos veces más probable identificar la causa en pacientes con DI grave (aproximadamente en el 50% de los casos) que en la DI leve (se encuentra a causa en menos del 20%) (4, 24, 54, 55). También, en casos de DI leve, es más frecuente la existencia de antecedentes familiares de DI, así como de influencia de factores ambientales y socioculturales (24, 56, 57) como se ha mencionado con anterioridad.

La clasificación basada tan solo en el CI es obsoleta, ya que no contempla los dominios social y práctico de los individuos. Con la publicación del DSM-V se estableció una nueva conceptualización de la DI con la valoración de tres dominios de déficits adaptativos: el conceptual, el social y el práctico (18). Se incluyó a la DI dentro de los Desórdenes del Neurodesarrollo como ya se ha comentado previamente, definiéndola como una afectación cognitiva de inicio precoz que secundariamente ocasiona déficits de aprendizaje y en el funcionamiento adaptativo. Se valora al paciente con DI considerando tanto la capacidad cognitiva, como las funciones ejecutivas para poder determinar mejor las necesidades de forma individualizada y orientar de forma más acertada las ayudas que requieren.

Con la nueva clasificación se establecen los siguientes criterios para definir los grados de DI (Tabla 1.1):

Tabla 1.1: Gravedad de la DI según el DSM-V. Adaptado de (2).

Gravedad	Prevalencia	Habilidades adaptativas		
		Campo conceptual	Campo social	Campo práctico
Leve	85%	Los niños requieren ayuda académica para aprender las habilidades esperadas para su edad. Los adultos pueden tener dificultades y déficits en habilidades como leer, planificar y manejo del dinero.	Las habilidades sociales y el juicio personal son inmaduros para su edad. Existe riesgo de manipulación por personas externas (ingenuidad).	La mayoría son independientes en las actividades de la vida diaria, poseen trabajos que requieren de habilidades básicas y, normalmente, viven de manera independiente. Necesitan ayuda en decisiones relacionadas con el cuidado de la salud, nutrición, compras, finanzas y el cuidado de la familia.
Moderada	10%	En niños, las habilidades conceptuales y académicas van muy por detrás de las de sus compañeros. En adultos, el desarrollo de habilidades se encuentra en un nivel primario, necesitan ayuda en actividades como el manejo del dinero.	Relaciones de amistad con familia/amigos gracias al lenguaje hablado, pero con limitaciones por déficits sociales y comunicativos. Necesitan apoyo en decisiones y juicio sociales.	La mayoría pueden realizar las actividades de cuidado personal con ayuda y enseñanza como la disponible en un hogar grupal. Los adultos pueden ser contratados en lugares con un ambiente de apoyo.

Grave	3-4%	Déficit en la comprensión del lenguaje escrito y de los conceptos relacionados con números, cantidad, tiempo y dinero. Precisan ayuda de cuidadores para la resolución de problemas.	Uso del lenguaje para la relación social, más que para explicaciones. Utilizan palabras o frases simples. Entienden discursos breves y la comunicación gestual. La comunicación con gente que les es familiar les resulta agradable.	Necesitan ayuda para todas las actividades de la vida diaria. Continua supervisión. Pueden ser entrenados en algunas actividades básicas, pero con supervisión y ayuda para llevarlas a cabo.
Profunda	1-2%	Pueden utilizar objetos para el cuidado personal o el entretenimiento, de manera dirigida. Pueden adquirir ciertas habilidades visoespaciales como el emparejamiento o la clasificación en función de las características físicas, sin embargo, los déficits motores y sensoriales impiden el uso funcional de los objetos.	La comunicación está muy limitada, pero pueden ser capaces de entender ciertos gestos o señas emocionales y pueden expresarlas de manera no verbal.	Dependen del apoyo para todas las actividades de la vida diaria. En muchas ocasiones coexisten limitaciones sensoriales y físicas.

1.4. DISCAPACIDAD INTELECTUAL. ETIOLOGÍA

La DI puede originarse por diversas causas, entre las que podemos incluir causas infecciosas, ambientales, metabólicas, nutricionales, tóxicas, traumáticas o genéticas (4, 10, 20, 45, 46, 52, 58, 59). Se estima que las causas genéticas podrían

llegar a estar implicadas en un 30-50 % de los casos en occidente (12, 30, 53, 60); siendo clásicamente las causas más frecuentes la trisomía 21 (síndrome de Down) (61), el síndrome de X frágil (24, 62, 63) y anomalías en las regiones subteloméricas de los cromosomas (10, 55, 64). Se estima que dentro de las causas genéticas, las monogénicas, son responsables de un 25-30% de la DI (65). Por ello, en la investigación etiológica de la DI, los aspectos genéticos son esenciales y nos pueden dar información acerca de su origen, pronóstico, complicaciones, manejo y riesgo de recurrencia (12, 14, 45, 46).

Los grandes grupos etiológicos de la DI pueden clasificarse por tanto en: genéticos, adquiridos, ambientales y socioculturales (45, 46, 58) (Figura 1.3) En ocasiones estos factores etiológicos pueden coexistir en un mismo paciente, pudiendo modificar el fenotipo clínico y dificultar el diagnóstico etiológico (60, 66). Por ello, es difícil estimar el porcentaje de implicación de cada uno de los grupos etiológicos por sí mismo, y estos datos varían según las publicaciones revisadas. Distintos autores atribuyen a los factores exógenos, incluyendo por tanto los adquiridos, ambientales y socioculturales, entre un 5 hasta un 20% de causalidad (4, 59). Del mismo modo, la implicación de estos factores también varía según el grado de DI como se ha mencionado previamente, siendo más prevalentes los factores exógenos socioculturales y ambientales en la DI leve y los genéticos en la grave.

El DSM-V clasifica los factores etiológicos de la DI en:

- Trastornos hereditarios
- Alteraciones tempranas en el desarrollo embrionario.
- Problemas durante el embarazo o perinatales
- Afecciones médicas adquiridas durante la infancia o niñez
- Factores ambientales como falta de estímulo, nutrición inadecuada o exposición a tóxicos.

1.4.1 Trastornos hereditarios

Hace referencia a las causas genéticas de DI. Según el mecanismo de producción pueden ser debidos a alteraciones cromosómicas, monogénicas o bien a otros mecanismos mutacionales como son la expansión de tripletes, las

alteraciones de metilación o epigenéticas (67, 68), o alteraciones del ADN mitocondrial (53).

1.4.1.1 *Anomalías cromosómicas*

Según si afecta a todo un cromosoma o solo a una parte serán:

- Numéricas: se añade o pierde material genético de un cromosoma entero, como es el caso de las trisomías (trisomía 21-síndrome de Down o trisomía 18- síndrome de Edwards) o monosomías (monosomía X-síndrome de Turner).
- Estructurales: se produce una pérdida o duplicación de un fragmento cromosómico. (deleción terminal 5p-síndrome Cri du Chat o del maullido de gato).

1.4.1.2 *Anomalías monogénicas*

Debidas a un cambio en la secuencia de ADN en un gen que altera la proteína resultante. Según el patrón de herencia se clasificarán en: autosómico dominante, autosómico recesivo y ligado al cromosoma X.

Se han descrito más de 100 genes en el cromosoma X y más de 300 genes con herencia autosómica recesiva (30, 45, 69-72), implicados en DI, siendo los genes con herencia autosómica dominante con variantes patogénicas *de novo*, los más frecuentes en estos pacientes (27, 73, 74). Todo ello, refleja la gran heterogeneidad genética de la DI, con más de 1000 genes implicados (24, 27, 30, 73, 75).

1.4.1.3 *Patrones de herencia no mendelianos*

Como son los síndromes de anticipación génica por expansión de tripletes (síndrome de X frágil), alteraciones epigenéticas por defectos de metilación o por disomía uniparental (síndromes de Angelman, Prader-Willi, o síndrome de Temple)(24, 67, 68, 76). En este grupo también estarían las alteraciones del ADN mitocondrial (77).

1.4.2 Alteraciones tempranas del desarrollo embrionario

En este apartado se incluyen factores que influyen en las primeras etapas del desarrollo y que pueden dar lugar a un individuo con DI.

1.4.2.1 Síndromes de influencia prenatal

En este grupo es importante destacar el síndrome alcohólico fetal que se caracteriza por DI, retraso de crecimiento pre y postnatal, rasgos dismórficos y anomalías congénitas derivados del efecto del alcohol sobre el embrión en crecimiento. Es la causa prevenible más frecuente de DI en el mundo occidental (53, 78, 79). También es importante destacar en este grupo la embriofetopatía por fenilcetonuria materna, caracterizada por DI, microcefalia, epilepsia y anomalías congénitas por niveles elevados de fenilalanina en el feto en caso de mal control dietético materno durante el embarazo.

1.4.2.2 Infecciones maternas

El feto no tiene una respuesta inmunológica demostrada en la gestación temprana, por lo que, en esta etapa es muy vulnerable al ataque de agentes infecciosos. Si la madre pasa por un proceso infeccioso durante la gestación, el agente infeccioso pasa al feto a través de la placenta y puede producir anomalías congénitas y afectar al neurodesarrollo. Ejemplo: infección congénita por citomegalovirus (CMV). Si la madre padece una primoinfección por CMV durante la gestación, mayor probabilidad si esto ocurre durante el primer trimestre de embarazo, puede producir en el feto malformaciones cardíacas, visuales y auditivas con riesgo también de retraso psicomotor y del desarrollo.

1.4.2.3 Exposición a tóxicos, fármacos, radiaciones

En general, los efectos de estas sustancias producidos sobre el feto van a ser irreversibles y van a dar lugar a retraso en el crecimiento intrauterino (RCIU), y alteraciones en el neurodesarrollo. En este grupo destacan el grupo de madres consumidoras de sustancias (opiáceos, cocaína, anfetaminas, ...) o aquellas que toman medicaciones debido a patologías médicas (madres afectas de epilepsia en

tratamiento con ciertos anticonvulsivantes, tratamientos para el hipertiroidismo, fármacos inmunomoduladores, ...).

1.4.3 Problemas durante la gestación y perinatales

En este grupo se incluyen las alteraciones en el desarrollo fetal durante los dos últimos trimestres del embarazo o en el momento del nacimiento. En este grupo son frecuentes las anomalías neurológicas. Se incluyen en este grupo:

- Malnutrición fetal: aportes subóptimos de nutrientes, agua u oxígeno para un adecuado desarrollo fetal que puede ser secundario a alteraciones placentarias, trastornos vasculares, infecciosos o carencias nutricionales de la madre.
- Alteraciones perinatales: en este grupo se incluyen las complicaciones derivadas de problemas de reanimación durante el parto en caso de sufrimiento fetal, o dificultad respiratoria neonatal, infecciones congénitas como son la meningitis o sepsis neonatal precoz, hipoglucemia, o hemorragia cerebral.

1.4.4 Enfermedades adquiridas en la infancia

Son aquellos eventos en los primeros años de vida, que pueden influir en una alteración del neurodesarrollo en un niño previamente sano. Las enfermedades incluidas en este grupo tienen carácter agudo y son potencialmente reversibles y evitables. Cabe destacar en este grupo las infecciones y los accidentes (traumatismos, intoxicaciones, atragantamientos, ahogamientos). A destacar:

- Infecciones: destacan en este grupo las meningitis y las encefalitis.
- Traumatismos craneales: son frecuentes en niños, debido a accidentes de tráfico o caseros. Aunque clásicamente se afirma que el cerebro del niño resiste mejor los traumatismos, y existe evidencia de su mejor capacidad de regeneración respecto a la población adulta, hay que señalar la posibilidad y riesgo de consecuencias graves, desde trastornos psicoafectivos, impulsividad, hipercinesia y también trastornos intelectuales y epilepsia.

-Otros: Otras causas pueden estar relacionadas con tumores intracraneales, enfermedades neuroendocrinas, hipotiroidismo, etc.

1.4.5 Factores ambientales y socioculturales

Existen circunstancias ambientales y socioculturales como el abandono y carencia de estímulos, la pobreza, desnutrición, madres adolescentes, padres con bajo CI, asociado a entornos marginales, que pueden propiciar enfermedades psiquiátricas e insuficiente aprendizaje y escolaridad en los niños que lo padecen. En estos casos podríamos hablar de cierta reversibilidad si se actúa a tiempo.

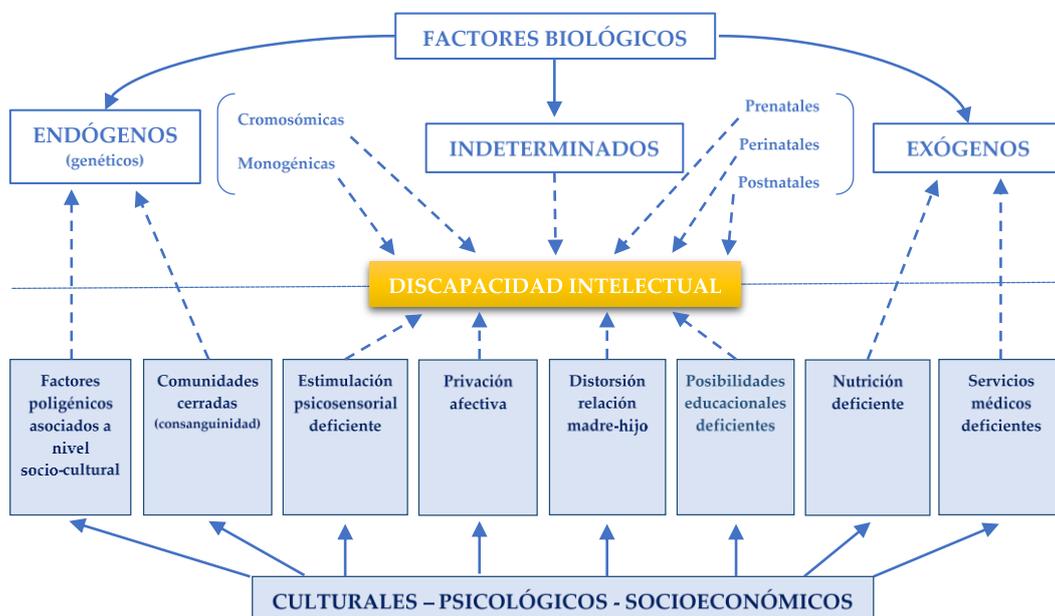


Figura 1.3: Factores que intervienen en el neurodesarrollo. Adaptado de (80)

En un grupo de pacientes considerable, aproximadamente el 50%, no se detecta ningún factor causal, siendo su DI de etiología desconocida. Este grupo de pacientes sin diagnóstico conocido, son los que motivan el desarrollo continuo de nuevas tecnologías diagnósticas para identificar nuevos genes implicados en DI y generan grupos de investigación con colaboración nacional e internacional unidos con el mismo objetivo.

1.5. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL

La valoración diagnóstica del paciente con DI es compleja e interdisciplinar, por lo que debe ser abordada por personal cualificado para ello (12, 14, 81). El equipo interdisciplinar básico debe estar formado por un neuropediatra o neurólogo (según la edad en la que se valora al paciente), un genetista clínico y un genetista de laboratorio. Este equipo se verá ampliado por otros especialistas según el paciente asocie o no otras anomalías congénitas o alteraciones que precisen de su integración en el equipo (cardiólogos, endocrinólogos, oftalmólogos, otorrinolaringólogos, psicólogos...).

El llegar a establecer una etiología en los pacientes con DI es de gran ayuda tanto para las familias como para los facultativos que intervienen en el diagnóstico. Los beneficios obtenidos de ello son el conocer la etiología, poder ofrecer un pronóstico o posible evolución clínica, explicar el mecanismo genético de su ocurrencia y el riesgo de recurrencia, opciones posibles de tratamiento, evitar otros estudios complementarios redundantes e innecesarios, manejo de síntomas o detección precoz de complicaciones asociadas a la entidad, y acceso a asociaciones de pacientes y a ensayos clínicos, así como opciones reproductivas. Los objetivos del diagnóstico de un paciente con DI se resumen en la Tabla 1.2. Un diagnóstico etiológico específico junto con el apoyo de los facultativos responsables es un factor que influye en los resultados psicosociales de un individuo con DI y sus familias (14)

Tabla 1.2: Objetivos del diagnóstico del paciente con DI

1. Conocer la causa / etiología
2. Establecer un pronóstico o evolución clínica esperable
3. Asesoramiento sobre el mecanismo genético causal y riesgos de recurrencia
4. Opciones de tratamiento específicas
5. Evitación de otras pruebas diagnósticas innecesaria o redundantes
6. Información sobre tratamiento, manejo de síntomas o seguimiento de complicaciones esperables
7. Contacto con asociaciones de pacientes específicas de la entidad diagnosticada
8. Acceso a ensayos clínicos
9. Posibilidad de manejo multidisciplinar y atención integral (social, educativa, familiar) del paciente más apropiado según el diagnóstico

La valoración inicial del paciente con DI parte de la herramienta básica de todo médico que es la historia clínica y la exploración física, siendo estos elementos los más críticos para el diagnóstico del paciente con DI (12, 45, 46, 58, 82).

1.5.1 Historia clínica

La historia clínica debe ser exhaustiva y completa, deben recogerse datos prenatales (tipo de gestación, curso de la gestación, complicaciones o enfermedades durante la gestación, toma de fármacos o tóxicos, datos ecográficos...) y perinatales (edad gestaciones, tipo de parto, complicaciones en el parto, test de Apgar, datos de periodo neonatal inmediato, y muy importante la somatometría al nacimiento con tablas percentiladas para edad y sexo.). Posteriormente se recogerán datos del periodo neonatal (meconiorrexis, onfalorrexis, resultados de estudio de screening neonatal de metabolopatías, otoemisiones acústicas neonatales), problemas de alimentación en primeros meses de vida, y desarrollo psicomotor hasta el momento de la consulta, haciendo hincapié en el momento de la adquisición de los hitos del desarrollo. Se recogerán también datos de enfermedades que haya padecido el paciente, así como de todas las consultas médicas que haya tenido por distintos problemas de salud. Posteriormente se dirigirá la anamnesis a otros datos que el facultativo considere oportuno según la orientación clínica del paciente. Es muy importante intentar cuantificar el CI del niño con un análisis adecuado a su edad para intentar clasificar el grado de DI que tiene el paciente ya que eso también puede ayudar al facultativo en su orientación diagnóstica.

Dentro de la historia clínica en la primera visita, es imprescindible la recogida de la historia familiar. Debe recogerse una historia familiar de al menos 3 generaciones según las recomendaciones establecidas (83) (Figura 1.4). La recogida de datos de la historia familiar requiere tiempo y dedicación para realizarlo de forma adecuada, ya que en ocasiones va a precisar la revisión de la historia clínica de otros familiares, de informes clínicos, pruebas de imagen, e incluso fotografías.

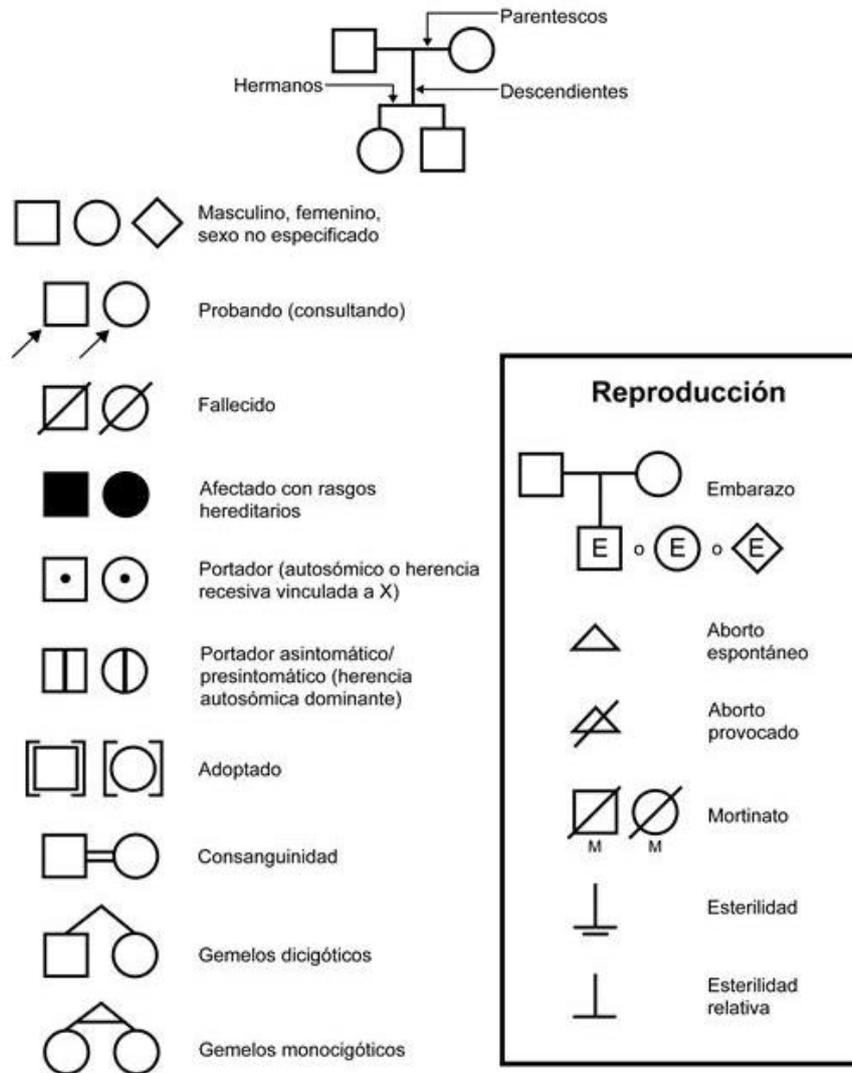


Figura 1.4: Simbología estandarizada para la realización del árbol familiar (83).

1.5.2 Exploración física

La exploración física al valorar a un paciente con DI es otra de las herramientas básicas para el clínico, puesto que puede dar muchos datos que orienten al diagnóstico del paciente.

Se inicia con la somatometría, utilizando tablas percentiladas para edad y sexo. Posteriormente se realizará una exploración ordenada y sistemática para no

pasar ningún dato por alto. Se inicia por la impresión general (hábito general, gestalt), cráneo (forma y tamaño), cabello, se describen los rasgos dismórficos o anomalías detectadas en la cara, paladar, dientes, cuello, tórax (incluye descripción anatómica, y auscultación cardiopulmonar), abdomen (inspección, palpación y auscultación), exploración de genitales, aparato locomotor (espalda, miembros), datos neurológicos (tono, fuerza, reflejos osteotendinosos, lenguaje, contacto con el explorador, comportamiento) y piel (discromías, elasticidad, tumores) En los pacientes con DI, la exploración dismorfológica así como la conductual y neurológica adquieren un papel muy importante y debe realizarse por personal cualificado.

Es importante utilizar una terminología estandarizada para la descripción morfológica de manera que las descripciones clínicas sean más precisas y consensuadas y así facilitar las comparaciones de los fenotipos clínicos entre médicos, genetistas de laboratorio e investigadores. En esta línea existen grupos de trabajo internacionales que se han encargado de establecer una nomenclatura estándar como son los dirigidos por Hennekam y colaboradores (84-90). Con la introducción de la secuenciación masiva (NGS), esta necesidad de homogeneizar la descripción y denominación de los fenotipos clínicos se ha hecho todavía más evidente. Es necesario disponer de una herramienta clínica potente para la interpretación de las variantes genéticas detectadas por la NGS y poder progresar en la predicción de diagnósticos etiológicos basados en las características morfológicas. Así lo describe Hennekam diciendo como la NGS requiere también de un fenotipado de nueva generación (91). Con este objetivo se creó un proyecto internacional para la integración semántica de datos biomédicos y de organismos modelo con el objetivo de optimizar la investigación biomédica (The Human Phenotype Ontology o HPO) (92, 93). El objetivo es generar una terminología estandarizada para la información fenotípica en publicaciones y bases de datos para poder utilizar algoritmos computacionales que puedan explotar estos datos junto con análisis de expresión génica y otros fenómenos celulares asociados a enfermedad en humanos. Esta terminología es de libre acceso <http://www.human-phenotype-ontology.org>.

Una herramienta muy importante en la exploración de un paciente con DI, incluye la realización de fotografías clínicas. Se precisa de un consentimiento informado para ello. Es muy importante la realización de las fotografías ya que va

a permitir la revisión y estudio del paciente por parte del facultativo fuera del tiempo de visita, así como valorar la evolución fenotípica, dato muy importante en dismorfología. En este sentido, la evolución de las tecnologías informáticas incorporadas a las ciencias de la salud, tienen su impacto en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas. En los últimos años se han desarrollado herramientas basadas en la inteligencia artificial deep learning o machine learning para la correlación entre fotografías clínicas y diagnósticos, como es el Face2Gene (94-96). Dicha herramienta está en proceso de desarrollo y en un futuro, con el enriquecimiento de su contenido por parte de los profesionales que trabajan en el campo de la genética, pueda ser una herramienta cada vez más útil (97, 98).

1.5.3 Síntesis clínica

Tras la historia clínica y exploración física del paciente es importante realizar una adecuada síntesis clínica para una aproximación diagnóstica pertinente. Se deben recoger los síntomas específicos y los datos dismorfológicos o neurológico conductuales que nos sirvan de signo guía.

Será entonces cuando el facultativo decidirá los estudios a realizar para confirmar el diagnóstico. Dada la amplia heterogeneidad etiológica de la DI, estos estudios incluirán estudios bioquímicos, metabólicos, pruebas de imagen (radiografías, ecografía (abdominal, cerebral, ecocardiografía), resonancia magnética cerebral (RM)), y en ocasiones valoración por otros facultativos especialistas para descartar anomalías asociadas; que se realizará a la vez o previo a la solicitud de los estudios genéticos pertinentes según el caso (46).

1.5.4 Pruebas de imagen

No existe actualmente un consenso de cuándo realizar pruebas de imagen cerebral en pacientes con DI o de la prueba de imagen indicada (tomografía axial computarizada (TAC) o RM). Hay grupos en los que recomienda la realización de prueba de imagen cerebral en cualquier niño con DI (99) y otros que solo la recomiendan en caso de detectar alteraciones en la exploración física, dejándola como prueba de segunda línea (14, 100).

La detección de algún tipo de alteración morfológica cerebral (disgenesia del sistema nervioso central (SNC)) en un paciente con DI, es por supuesto un dato de utilidad, pero no suele ser un dato que oriente hacia una etiología específica de la causa de la DI del paciente.

La realización de TAC craneal tiene un rendimiento bajo de detección de *atrofia cerebral* en pacientes con DI, que además no contribuye a aclarar la etiología específica de la DI (101). La realización de RM cerebral tiene mayor sensibilidad en la detección de anomalías en pacientes con DI (9-80% de anomalías detectadas) (102). Otros estudios indican mayor prevalencia de detección de anomalías en el SNC en pacientes con DI moderada-grave con respecto a pacientes con DI leve-límite (30% vs 21.2% respectivamente)(103-105). Cuando se realiza RM cerebral en casos seleccionados por detección en la exploración física (EF) de micro/macrocefalia o focalidad neurológica el porcentaje de detección de anomalías es claramente mayor (13.9% cuando se realiza a todos vs 41.2% en pacientes seleccionados) (102)

La Academia Americana de Neurología y la Sociedad de Neurología Infantil recomiendan que la neuroimagen (RM mejor que TAC) es una prueba recomendada en la evaluación diagnóstica del paciente con DI, particularmente a realizar cuando se encuentren anomalías en la EF de tipo micro/macrocefalia, focalidad motora y signos piramidales / extrapiramidales (14).

Dentro de los estudios realizados respecto al rendimiento diagnóstico de la RM espectroscópica, no se han evidenciado beneficios respecto a su realización en cuanto a ayuda diagnóstica en pacientes con DI (104, 106).

En resumen, se detectan anomalías en la RM cerebral en alrededor de un 30% de pacientes con RGD/DI, pero este hallazgo no suele ser de ayuda en cuanto al diagnóstico etiológico de la DI (100, 107). Se debe valorar su realización tras este análisis y teniendo en consideración la necesidad de sedación/anestesia para su realización en niños pequeños.

1.5.5 Estudios metabólicos

Los errores congénitos del metabolismo (ECM) son enfermedades monogénicas que afectan a los procesos bioquímicos y celulares. Los ECM son responsables del 1% de la DI en la población general, llegando a un 5% en algunas publicaciones (53, 108). Algunas de estas enfermedades tienen tratamiento y se siguen describiendo nuevos tratamientos en los últimos años para otras de ellas, por lo que son un grupo importante de diagnóstico en los pacientes con DI dada la posibilidad de actuación para modificar el curso de la enfermedad (108, 109). No todas estas enfermedades causantes de DI están incluidas en el cribado metabólico neonatal.

Se ha demostrado un beneficio en la evolución de estos pacientes con distintos tratamientos como son la utilización de modificaciones dietéticas, cofactores/vitaminas complementarias, inhibidores de sustrato, terapia de reemplazamiento enzimático y trasplante de células madre hematopoyéticas. Se ha demostrado una mejoría en cuanto a la progresión (entendida la mejoría como lentificación de la evolución natural de la enfermedad) respecto al CI, desarrollo, alteraciones conductuales, epilepsia y alteraciones en la RM cerebral (109).

El abordaje tradicional de la DI incluía la realización de un estudio metabólico de primera línea en todo paciente con DI de etiología desconocida, capaz de detectar el 60% de los ECM tratables. Este estudio de primera línea incluye: en sangre estudio de aminoácidos, homocisteína, acilcarnitinas, cobre y ceruloplasmina; y en orina estudio de ácidos orgánicos, creatina, purinas y pirimidinas, oligosacáridos y glucosaminoglicanos. En los casos en los que no se alcanzaba un diagnóstico tras estos estudios de primera línea, se podía continuar con estudios de segunda línea si persistía la sospecha de ECM que detectarían el 40% restante de ECM tratables, requiriendo la realización de estudios más específicos y con una orientación dirigida. Estos estudios serían: sialotransferrinas y esteroides (7 y 8-dehidrocolesterol), neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo, estudios de actividad enzimática y otros (108).

Con la incorporación de las nuevas tecnologías de diagnóstico genético, el abordaje de estas enfermedades está cambiando, sustituyendo los complejos estudios bioquímicos y enzimáticos por la NGS para su detección (110).

1.6. ESTUDIOS GENÉTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL

Cuando tras una valoración inicial no se ha podido detectar una causa que justifique la DI en el paciente, se procederá a la solicitud de estudios genéticos. Hace unos años, los análisis genéticos para la identificación de alteraciones cromosómicas se realizaban mediante cariotipo fundamentalmente, posteriormente FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) y MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) y el estudio de las patologías monogénicas se basaba en la secuenciación Sanger del gen candidato. Debido a la heterogeneidad genética en la DI, estos métodos mostraban un rendimiento diagnóstico limitado.

En los últimos años el campo de la genética ha vivido una revolución tecnológica con el desarrollo de nuevas tecnologías genómicas para el diagnóstico genético de pacientes con discapacidad intelectual (30, 111, 112). Con el uso de técnicas como el array-CGH (hibridación genómica comparativa) en la primera década de este siglo, el rendimiento diagnóstico para la detección de desequilibrios cromosómicos causante de DI aumentó; con un rendimiento diagnóstico aproximado de un 15% (113-123). Más recientemente, las técnicas de NGS, que permiten el análisis simultáneo de múltiples genes, se han identificado como técnicas de gran importancia y muy costo-efectivas (56, 111, 124, 125). La gran heterogeneidad descrita con más de 1000 genes asociados a DI, así como la baja prevalencia y la amplia variabilidad fenotípica reflejan la dificultad en el abordaje del estudio genético de la DI. La NGS ha revolucionado la estrategia diagnóstica molecular del paciente con DI, al permitir analizar un grupo de genes en un mismo estudio analítico, el exoma o bien todo el genoma. Aun así, a pesar de los grandes avances en la tecnología del estudio del genoma al menos la mitad de los pacientes con DI no poseen un diagnóstico etiológico (12, 14, 46).

1.6.1. Cariotipo

El cariotipo se utiliza para el estudio de los cromosomas. Se realiza mediante bandeo GTG (tripsina y giemsa). Consiste en una digestión enzimática con una proteasa (tripsina), que digiere parcialmente las proteínas cromosómicas, y una tinción posterior con Giemsa. El resultado es una alternancia de bandas oscuras y claras a lo largo del cromosoma que ofrece un patrón característico para cada par cromosómico. El cariotipo habitual consigue una resolución de 400-500 bandas, detectando deleciones y duplicaciones de tamaño superior a 5-8 Mb. Con el estudio del cariotipo mediante sincronización del cultivo obteniendo mayor número de células en profase o prometafase, se consigue el cariotipo de alta resolución con 800 bandas, detectando anomalías de unas 5 Mb (Figura 1.5).

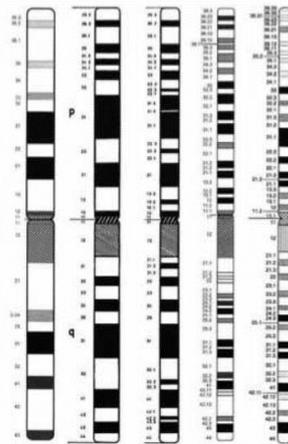


Figura 1.5: Ideograma del cromosoma 1 con cinco niveles de resolución de bandas G. De izquierda a derecha, 300, 400, 500, 700 y 850 bandas (46).

Clásicamente el estudio del cariotipo era una prueba inicial para el estudio del paciente con DI con un rendimiento global de un 3.7% (9). (detecta trisomía 21, 13, 18 y desequilibrios de más de 3-5 Mb).

Hoy en día, las indicaciones del cariotipo en el estudio del paciente con DI se limitan al estudio del paciente con sospecha de aneuploidía, trisomías o monosomías, o para la detección de reordenamientos equilibrados en parejas con abortos de repetición o con descendencia afectada de desequilibrio cromosómico. En

el estudio del paciente con DI, el cariotipo ha sido sustituido por el array-CGH, por su mayor poder de resolución para la detección de desequilibrios cromosómicos (126).

1.6.2. FISH (Hibridación In Situ Fluorescente)

La técnica FISH se utiliza para detectar y localizar secuencias específicas de ADN en los cromosomas. Detectan alteraciones menores de 5Mb que no pueden detectarse utilizando el cariotipo convencional. Se exponen estos cromosomas (en metafase o interfase) a una sonda (secuencia de ADN que contiene una molécula fluorescente en ella) hibridándose la sonda en la región a estudiar (Figura 1.6).

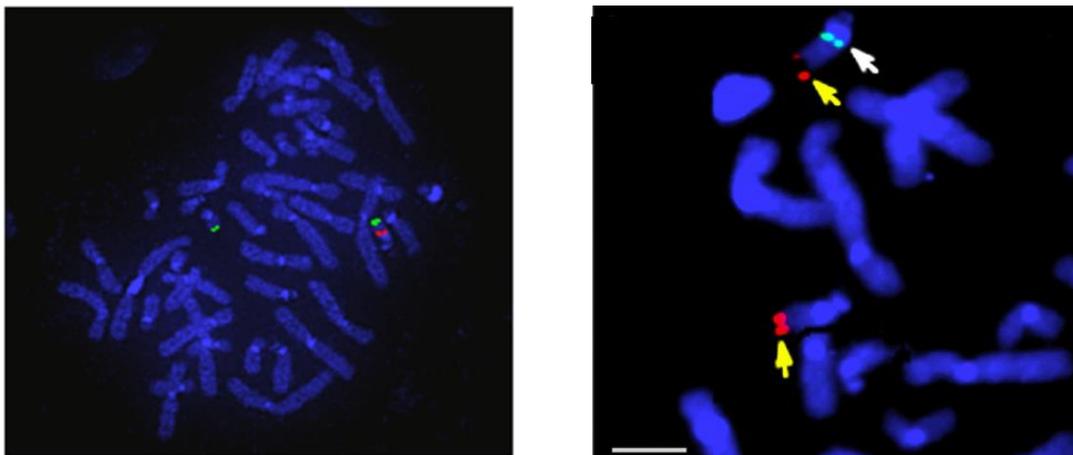


Figura 1.6: Imagen de delección 22q11.2 mediante FISH

Esta técnica se utilizaba para investigar síndromes de microdelección/microduplicación clínicamente reconocidos, los cuales constituyen la segunda causa más común de DI. Cada uno de estos síndromes tiene una sonda FISH específica por lo que se requiere una orientación clínica inicial para realizar la prueba. El rendimiento global de esta técnica en pacientes con DI moderada-grave es del 6,8% y en pacientes con DI en general de un 5% adicional respecto al cariotipo (45, 55).

Algunos ejemplos de síndromes asociados a microdeleciones son el síndrome de delección 22q11.2 (OMIM 611867 / ORPHA:567) o el síndrome de Williams (OMIM 194050 / ORPHA:904). Estas entidades también se detectan

mediante el estudio de array-CGH sin la necesidad de una indicación específica por el clínico y a un menor coste, por lo que en la actualidad también ha sido sustituido por el array-CGH en el estudio del paciente con DI.

1.6.3. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

La técnica de MLPA es una técnica complementaria, sensible y específica en la detección de cambios en el número de copias genómicas, no detectados por los métodos convencionales de laboratorio.

Esta técnica se basa en la hibridación con sondas de la región de interés, ligación y posterior amplificación por PCR. Permite el análisis de regiones específicas para detectar pequeñas deleciones y duplicaciones, así como fenómenos de metilación. Existen equipos o kits diseñados para distintas patologías, por ejemplo, el MLPA de regiones subteloméricas zonas ricas en reordenamientos en pacientes con DI, con rendimiento adicional de un 3-5% respecto al cariotipo y FISH (45, 55). Su ventaja respecto a los anteriores fue el poder identificar un cierto número de patologías a costes relativamente bajos. Aun así, por el mismo motivo que en el caso que los anteriores, esta técnica se ha sustituido por el array-CGH en el estudio del niño con DI, salvo para los fenómenos de metilación.

1.6.4. Estudio molecular X frágil y DI ligada a X

El síndrome X frágil se considera la causa de DI heredada más frecuente (127). El gen FMR1 en el cromosoma Xq27.3 contiene entre 5 y 40 repeticiones consecutivas del trinucleótido CGG. Cuando hay entre 40 y 200 repeticiones, se considera una premutación inestable, que puede expandirse durante la meiosis y transmitirse a la descendencia. Mas de 200 repeticiones se asocian a las alteraciones fenotípicas, DI y trastornos conductuales descritos en este síndrome. Las últimas revisiones publicadas hablan de una prevalencia de un 2% en los pacientes con DI, considerando ambos sexos. En aquellos que presentan una DI más grave la proporción que se encuentra es mayor 4.1%, comparando con aquellos que presentan DI leve que se aproxima al 1%(10, 14, 62, 70).

El Colegio Estadounidense de Genética Medica recomienda realizar el estudio molecular de X frágil en todo niño (de ambos sexos) con DI inexplicable que presenten antecedentes familiares de DI, algún rasgo físico o conductual reconocido en esta enfermedad y ausencia de otras anomalías fenotípicas mayores (4).

El gen MECP2, asociado a síndrome de Rett en mujeres, puede tener una expresividad variable, presentándose también con DI leve o dificultades de aprendizaje. En varones, presenta un fenotipo clínico más grave con encefalopatía neonatal o síndrome de parkinsonismo, signos piramidales y macroorquidismo. La mayoría de los casos es debido a mutaciones puntuales, y en un 10-15% de los casos a deleciones o duplicaciones intragénicas. Diversos autores detectan un 1,5% de variantes patogénicas en MECP2 en niñas con DI moderada-grave; recomendando el estudio del gen MECP2 (secuenciación y MLPA del gen) como abordaje de primera línea en el estudio de las niñas con DI junto con el array-CGH y el estudio molecular de X frágil (45, 128). Otros autores no detectan variantes patogénicas en este gen en pacientes con DI inespecífica con un porcentaje suficiente como para sugerir su estudio de forma generalizada (129, 130).

La mayor frecuencia de DI en varones es indicativa de la relevancia del cromosoma X, donde se describe un enriquecimiento en genes implicados en funciones cognitivas y por ello, a la contribución etiológica de la DI sindrómica y no sindrómica (12, 70). Hasta la fecha se han identificado 215 entidades responsables de DI ligada al cromosoma X (131). El 10-13% de la DI en varones es debido a variantes patogénicas en genes ligados a X (14, 45, 70).

1.6.5. Array-CGH (Array-based Comparative Genomic Hybridization)

El array-CGH se considera una herramienta de primer nivel para el estudio diagnóstico del paciente con DI por su capacidad de detección de desequilibrios cromosómicos a lo largo de todo el genoma, siendo éstos una de las causas más frecuentes de DI. El array-CGH es en este momento la prueba diagnóstica más eficiente, tras la valoración clínica y la exploración física del paciente, para la orientación diagnóstica del paciente con DI (114, 132, 133).

Esta técnica permite la comparación de miles de segmentos de ADN de un paciente con respecto a un control para la identificación de deleciones y duplicaciones genómicas. Utiliza un microchip de ADN con lo que es capaz de analizar de forma simultánea todo el genoma o todos los cromosomas. Las muestras del paciente y el control marcadas con distintas moléculas fluorescentes, son hibridadas en el microchip y un scanner automático detecta la señal fluorescente emitida que es analizada por un programa informático para detectar desbalances que indican la presencia de deleciones y/o duplicaciones en una región concreta del genoma.

El array-CGH es capaz de detectar desequilibrios menores de 1 Mb, según el diseño del array-CGH y detecta desequilibrios cromosómicos en aproximadamente un 15% de pacientes con DI (134). Sin embargo, no es capaz de detectar anomalías cromosómicas equilibradas, por lo que no podrá detectar inversiones o translocaciones, así como mosaicismos de bajo grado.

Existen diferentes tipos o diseños de array-CGH, los *whole genome arrays* los cuales están diseñados para cubrir todo el genoma, y los *targeted arrays*, diseñados para cubrir loci patogénicos como los telómeros y regiones pericentroméricas.

Los factores que definen la resolución del array-CGH son el tamaño de las sondas utilizadas y la densidad de cobertura en el genoma. A menor tamaño de la sonda y los más contiguas que estén unas sondas de otras, mayor resolución del array-CGH. En función del número de sondas empleadas en el microarray, la resolución del estudio puede ser mayor o menor siendo habitual emplear diseños de entre 60.000 y 180.000 sondas específicas (llamadas comercialmente 60K o 180K respectivamente).

Los resultados obtenidos tras un estudio de array-CGH son variantes de número de copia (CNVs-copy number variations), puesto que se están detectando deleciones o duplicaciones en el genoma. Estas CNVs podrán ser informadas como patogénicas, cuando estén relacionadas con un fenotipo clínico, probablemente patogénicas, cuando o bien por su contenido génico o por su tamaño podrían ser causales, benignas o neutras, no causantes de patología, o de significado incierto.

La especificidad del array-CGH es menor a su sensibilidad, debido a la detección de CNVs de significado incierto, muy prevalentes en el genoma humano. La detección de CNVs de significado incierto, no descritas en la

literatura e incluso siendo *de novo*, dificultan en muchas ocasiones la interpretación de los resultados de array-CGH. Se creó un Consorcio Internacional (ISCA-International Standard Cytogenomic Array Consortium) donde se han desarrollado bases de datos internacionales para utilizar como referencia para la interpretación de las CNVs (132, 135). Las colaboraciones internacionales ayudan en la clasificación de las variantes identificadas en el array-CGH, pero en muchos casos su significado continúa siendo incierto y es función del genetista interpretar su significado para una adecuada aplicabilidad en la práctica clínica.

Otra dificultad añadida es que no todas las CNVs presentan penetrancia completa y a veces se relacionan con susceptibilidad a trastornos del neurodesarrollo incluyendo DI, autismo, y trastornos psiquiátricos, lo que hace que el asesoramiento en estos casos sea difícil. Cuanto mayor resolución tenga el array-CGH, más número de CNVs de significado incierto se van a detectar. Una de las herramientas utilizadas para valorar la patogenicidad de estas CNVs de significado incierto, es el estudio de segregación en padres o bien el array-CGH directamente en tríos (madre, padre y afectado). La interpretación de estas variantes es compleja y precisa de un abordaje interdisciplinar con clínicos, bioinformáticos y facultativos de laboratorio.

1.6.6. Secuenciación Sanger

La secuenciación del ADN es el método utilizado para identificar el orden preciso de los nucleótidos en la molécula de ADN. En concreto, la secuenciación tipo Sanger, desarrollada en 1970 y usada sistemáticamente en los laboratorios desde 1990, es muy efectiva para identificar variantes patogénicas en genes con función bien conocida. Se utiliza para confirmar una sospecha clínica y realizar estudios familiares. Durante 25 años se ha mantenido como *gold-standard* para la detección de variantes patogénicas por su sensibilidad, exactitud, robustez y fiabilidad. Se usó para obtener la primera secuencia del genoma, proyecto que requirió más de diez años del trabajo de miles de investigadores a nivel mundial (136).

En el caso de la DI, la utilización de la secuenciación Sanger debe ir precedida por una alta sospecha clínica del posible gen causal para que tenga un

adecuado rendimiento y relación coste-beneficio óptima; cosa cada vez más difícil dada la heterogeneidad genética de la DI. La demanda de técnicas de secuenciación de bajo coste, ha motivado el desarrollo de la NGS, en cuyo proceso se producen miles o millones de secuencias al mismo tiempo, dejando la secuenciación Sanger para casos concretos.

1.7. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS; NEXT GENERATION SEQUENCING)

Al igual que la secuenciación Sanger, la NGS es un proceso cuyo objetivo final es la determinación de los nucleótidos de una molécula de ADN. Esta tecnología ha permitido aumentar la velocidad y disminuir el coste de la secuenciación, por lo que actualmente podemos secuenciar secuencias genómicas individuales. Las técnicas de NGS, también denominadas secuenciación paralela masiva, consisten en la secuenciación de múltiples, pero pequeños fragmentos de ADN en paralelo. Los análisis bioinformáticos posteriores unen estos fragmentos mapeando las lecturas individuales sobre la secuencia del genoma humano de referencia. Cada una de los millones de bases del genoma humano se secuencian varias veces, para obtener datos más precisos (137)

La tecnología de NGS puede utilizarse para secuenciar el genoma completo (whole genome sequencing-WGS), el exoma completo, esto es los 22.000 genes codificantes, (whole exome sequencing-WES), o paneles de genes en los que se analizan un número determinado de genes asociados a una patología concreta. En base al tipo de análisis de los datos obtenidos tras de secuenciación del exoma (WES), se pueden plantear distintas modalidades de estudio, como un exoma dirigido a un grupo concreto de genes, exoma clínico o exoma trío. Llamamos exoma clínico al conjunto de cerca de 5.000 genes incluidos en el catálogo OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) y asociados a fenotipos clínicamente relevantes (<https://www.omim.org>) (138).

El genoma completo equivale a 3.3×10^9 bases mientras que el exoma representa entre 1.5-2%, estando el resto del genoma formado por intrones y zonas reguladoras que controlan funciones genéticas (139). Aproximadamente el 85% de las enfermedades genéticas conocidas se deben a variantes patogénicas en el exoma, que se van a detectar mediante WES (82, 139, 140). Por tanto, el estudio

del exoma reduce significativamente el coste y el espacio de almacenaje de la información obtenida en una secuenciación completa del genoma, además las variantes exónicas son más fáciles de interpretar que las genómicas, lo que aumenta también su utilidad clínica. La principal desventaja de la secuenciación del exoma con respecto a la del genoma es que no se van a detectar variantes patogénicas de las regiones no codificantes.

Los resultados de la NGS van a ser cambios detectados entre la muestra del probando frente al genoma de referencia, llamados variantes. Estas variantes pueden ser de cambio de un nucleótido (SNV, single nucleotide variant), o inserciones/delecciones (*indels*) de un pequeño número de nucleótidos. Las SNV pueden no tener consecuencias sobre la proteína (variante sinónima), producir un cambio de aminoácido (variante *missense*) o producir la aparición o pérdida de un codón stop (variante *nonsense* o *stop*). Son las variantes más comunes. Las *indels* pueden alterar la pauta de lectura produciendo la aparición de un codón stop (variantes *frameshift*) o provocar la inclusión o exclusión de algún aminoácido en la secuencia proteica (variante *nonframeshift*). Las variantes de *splicing* van a alterar la secuencia de ARNm maduro. Las variantes que tienen como consecuencia que un alelo no pueda generar una proteína, se llaman variantes de pérdida de función (LOF), e incluyen las variantes *nonsense*, *frameshift* y de *splicing*. Suelen ser consideradas deletéreas y candidatas a ser patogénicas, aunque no siempre es así y va a depender del gen al que afecte y de su posición en la proteína. La evaluación de las variantes *missense* requiere un análisis de la información relativa a la variante en sí, la información del gen, el tipo de variantes previamente descritas en dicho gen asociadas a enfermedad, el tamaño del gen o la presencia de secuencias homólogas.

Tras los análisis de filtrado y priorización de las variantes obtenidas de un estudio de NGS, se emitirán los resultados clasificándolas en 5 categorías posibles en base a las recomendaciones de la ACMG: patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto, probablemente benigna y benigna (141) (Anexo 4). El informe de los resultados contendrá aquellas variantes sospechosas de estar implicadas en la enfermedad, que serán las patogénicas, probablemente patogénicas, y también se informarán las de significado incierto (VOUS) que afecten a un gen que pueda estar relacionado con el fenotipo del paciente. La interpretación de resultados de la NGS requiere de personal cualificado así como

de un equipo interdisciplinar formado por clínicos y facultativos de laboratorio para que los resultados sean aplicables y de ayuda para el paciente y sus familiares. Las variantes informadas habitualmente requerirán de una confirmación mediante secuenciación Sanger (aunque en los últimos años esto ya no es siempre así) y un estudio de segregación en padres para comprobar el patrón de herencia esperado en las variantes patogénicas/probablemente patogénicas. El abordaje del estudio mediante trio (muestra de individuo y padres) permite este análisis desde el inicio.

Para el estudio de las VOUS se utilizan herramientas para intentar atribuir una posible patogenicidad a dicha variante (142-146). Algunas de estas herramientas son los predictores bioinformáticos que informan del efecto que podría tener la variante en la proteína, estudios funcionales, o estudios de segregación en familiares, entre otros. Aun así, en muchas ocasiones, tras estos análisis el facultativo no es capaz de atribuir absolutamente una patogenicidad a la variante detectada. Será preciso mantener un seguimiento y actualización de la literatura por si nuevas publicaciones permiten la reclasificación de la variante detectada o bien compartir los datos en plataformas nacionales e internacionales para la detección de otros pacientes en la misma situación.

La NGS es una herramienta que se está incorporando en la práctica clínica como herramienta de primer nivel para el estudio de DI, dado su potencial rendimiento diagnóstico, así como la progresiva disminución en los costes lo que la posiciona en una situación muy competitiva respecto al procedimiento diagnóstico habitual en pacientes con DI. El estudio del exoma clínico o el uso de paneles dirigidos son los más utilizados en la práctica clínica por su mayor facilidad en la interpretación de resultados, dejando el WES y WGS en un contexto de investigación (52, 69, 137, 139, 147-149). La utilización del WES y WGS, va a permitir la identificación de nuevos genes, nuevas variantes patogénicas, nuevas rutas moleculares, su asociación con patologías, ampliando el conocimiento de las causas moleculares de la discapacidad intelectual (27, 69, 72, 112, 139, 140). La cantidad de datos obtenidos, el complejo proceso bioinformático derivado y la necesidad de estudios complementarios para demostrar la patogenicidad de las variantes detectadas (estudios funcionales y otros), hacen su utilización menos operativa en la práctica clínica habitual (12, 30, 45, 52, 147, 149-152). Con las mejoras de la NGS y los avances en bioinformática, esta tecnología

está siendo capaz también de detectar CNVs, por lo que en un futuro no muy lejano, es posible que con un solo análisis seamos capaces de analizar las variantes puntuales de la secuencia del exoma o genoma, así como las variantes de número de copia (153-156).

1.7.1. Rendimiento diagnóstico en Discapacidad Intelectual

Existen muchas publicaciones en las que se analiza el rendimiento diagnóstico de las distintas aplicaciones de la NGS en pacientes con DI tanto en el contexto clínico como en el contexto de la investigación. Algunos autores apuestan por utilizar la NGS para el estudio dirigido de un número determinado de genes (*targeted NGS*), o el exoma clínico, con un rendimiento diagnóstico entre el 25-39% (52, 74, 111). El rendimiento diagnóstico de la secuenciación del exoma completo (WES) en pacientes con DI se encuentra entre el 20-40% aproximadamente (12, 27, 75, 111, 124, 157, 158). Algunos autores plantean el uso del WES o WGS en la clínica (73, 159-161) y otros consideran que deben mantenerse en el campo de la investigación por el momento por las dificultades en la interpretación de los resultados obtenidos como se ha mencionado con anterioridad (147, 162-164).

A pesar de la utilización de todas estas herramientas diagnósticas aproximadamente en el 50% de los casos de DI no obtienen un diagnóstico genético en el momento actual, como se ha mencionado previamente (12, 73, 75, 82, 139, 140).

Es importante mantener el seguimiento de los pacientes que quedan sin diagnóstico tras la aplicación de la NGS, puesto que, en ocasiones, las características fenotípicas que nos pueden dar la clave del diagnóstico se desarrollan a una edad más avanzada, o bien dado que las técnicas de secuenciación avanzan muy rápidamente así como la descripción de nuevos genes causantes de DI, puedan en unos años posteriores ser diagnosticados mediante reanálisis del exoma o bien aplicación de WGS (12, 160, 165).

1.7.2. Hallazgos incidentales

Otro factor que debe tenerse en cuenta cuando se utiliza la NGS, es la detección de hallazgos incidentales o secundarios, que no son objeto del motivo por el que se solicita el estudio. La utilización de este tipo de tecnologías, en las que estudiamos el exoma en un mismo análisis va a detectar variantes en genes causantes de enfermedades que no son las que han indicado la solicitud del estudio, pero que tienen un impacto en la salud del individuo (166-169). La ACMG publicó una guía con las recomendaciones sobre el manejo responsable de hallazgos incidentales tras la realización de WES o WGS en un contexto clínico (168, 170-173). Dicha guía es reevaluada periódicamente modificando la inclusión o exclusión de genes según la experiencia de los profesionales en su aplicabilidad clínica. En la última versión de dichas guías de 2016 se establece un listado de 59 genes causantes de enfermedad que deben informarse siempre que se detecten variantes patogénicas o probablemente patogénicas, independientemente de la edad, excepto en el caso de muestras fetales (174). Se hace también hincapié en la importancia del asesoramiento pretest, previo a la firma del consentimiento informado (175).

Tabla 1.3: Hallazgos incidentales a informar según las recomendaciones de la ACMG versión 2.0 (2016)(174)

Hereditary breast and ovarian cancer	604370 612555	20301425	Adult	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	113705 600185	AD	KP and EP
Li-Fraumeni syndrome	151623	20301488	Child/adult	<i>TP53</i>	191170	AD	KP and EP
Peutz-Jeghers syndrome	175200	20301443	Child/adult	<i>STK11</i>	602216	AD	KP and EP
Lynch syndrome	120435	20301390	Adult	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i>	120436 609309 600678 600259	AD	KP and EP
Familial adenomatous polyposis	175100	20301519	Child/adult	<i>APC</i>	611731	AD	KP and EP
<i>MYH</i> -associated polyposis; adenomas, multiple colorectal, <i>FAP</i> type 2; colorectal adenomatous polyposis, autosomal recessive, with pilomatricomas	608456 132600	23035301	Adult	<i>MUTYH</i>	604933	AR ^a	KP and EP
Juvenile polyposis	174900	20301642	Child/adult	<i>BMPR1A</i> <i>SMAD4</i>	601299 600993	AD	KP and EP
Von Hippel-Lindau syndrome	193300	20301636	Child/adult	<i>VHL</i>	608537	AD	KP and EP
Multiple endocrine neoplasia type 1	131100	20301710	Child/adult	<i>MEN1</i>	613733	AD	KP and EP
Multiple endocrine neoplasia type 2	171400 162300	20301434	Child/adult	<i>RET</i>	164761	AD	KP
Familial medullary thyroid cancer ^d	1552401	20301434	Child/adult	<i>RET</i>	164761	AD	KP
<i>PTEN</i> hamartoma tumor syndrome	153480	20301661	Child/adult	<i>PTEN</i>	601728	AD	KP and EP
Retinoblastoma	180200	20301625	Child	<i>RB1</i>	614041	AD	KP and EP
Hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndrome	168000 (PGL1) 601650 (PGL2) 605373 (PGL3) 115310 (PGL4)	20301715	Child/adult	<i>SDHD</i> <i>SDHAF2</i> <i>SDHC</i> <i>SDHB</i>	602690 613019 602413 185470	AD	KP and EP KP KP and EP
Tuberous sclerosis complex	191100 613254	20301399	Child	<i>TSC1</i> <i>TSC2</i>	605284 191092	AD	KP and EP
WT1-related Wilms tumor	194070	20301471	Child	<i>WT1</i>	607102	AD	KP and EP
Neurofibromatosis type 2	101100	20301380	Child/adult	<i>NF2</i>	607379	AD	KP and EP

Tabla 1.3: (continuación)

Ehlers-Danlos syndrome, vascular type	130050	20301667	Child/adult	<i>COL3A1</i>	120180	AD	KP and EP
Marfan syndrome, Loey-Dietz syndromes, and familial thoracic aortic aneurysms and dissections	154700 609192 608967 610168 610380 613795 611788	20301510 20301312 20301299	Child/adult	<i>FBN1</i> <i>TGFBR1</i> <i>TGFBR2</i> <i>SMAD3</i> <i>ACTA2</i> <i>MYH11</i>	134797 190181 190182 603109 102620 160745	AD	KP and EP
Hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy	115197 192600 601494 613690 115196 608751 612098 600858 301500 608758 115200	20301725	Child/adult	<i>MYBPC3</i> <i>MYH7</i> <i>TNNT2</i> <i>TNNI3</i> <i>TPM1</i> <i>MYL3</i> <i>ACTC1</i> <i>PRKAG2</i> <i>GLA</i> <i>MYL2</i> <i>LMNA</i>	600958 160760 191045 191044 191010 160790 102540 602743 300644 160781 150330	AD XL AD	KP and EP KP KP and EP KP KP and EP (hemi, het, hom) KP KP and EP
Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	604772			<i>RYR2</i>	180902	AD	KP
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	609040 604400 610476 607450 610193	20301310	Child/adult	<i>PKP2</i> <i>DSP</i> <i>DSC2</i> <i>TMEM43</i> <i>DSG2</i>	602861 125647 125645 612048 125671	AD	KP and EP KP KP and EP
Romano-Ward long-QT syndrome types 1, 2, and 3, Brugada syndrome	192500 613688 603830 601144	20301308	Child/adult	<i>KCNQ1</i> <i>KCNH2</i> <i>SCN5A</i>	607542 152427 600163	AD	KP and EP
Familial hypercholesterolemia	143890 603776	24404629	Child/adult	<i>LDLR</i> <i>APOB</i> <i>PCSK9</i>	606945 107730 607786	SD SD AD	KP and EP KP
Wilson disease	277900	20301685	Child	<i>ATP7B</i>	606882	AR ^c	KP and EP
Ornithine transcarbamylase deficiency	311250	24006547	Newborn (male), child (female)	<i>OTC</i>	300461	XL	KP and EP (hemi, het, hom)
Malignant hyperthermia susceptibility	145600	20301325	Child/adult	<i>RYR1</i> <i>CACNA1S</i>	180901 114208	AD	KP

1.7.3. Consentimiento informado

Siempre que se va a proceder a la realización de un estudio genético debe solicitarse al paciente o a sus padres o tutor legal un consentimiento informado. El consentimiento informado en el caso de la NGS varía respecto al de otros estudios genéticos dirigidos, puesto que en este tipo de estudios se va a encontrar información no relacionada con la patología que ha ocasionado la solicitud del estudio (DI en nuestro caso). El tipo de información que deriva de un WES puede tener trascendencia en la salud actual o futura del individuo, así como para otros familiares. Algunos ejemplos son la detección de estado de portador de una enfermedad AR o ligada a X, que puede tener implicaciones reproductivas, predisposición o susceptibilidad a padecer enfermedades, o de enfermedades no conocidas en ese momento (175-179).

La ACMG estableció unas recomendaciones respecto a los puntos que debe incluir el consentimiento informado para la utilización de NGS (WES/WGS) (175), lo cual es extrapolable a la utilización del exoma clínico. Estos puntos son:

- Antes de realizar un estudio de NGS el paciente debe recibir asesoramiento por un médico genetista o un asesor genético y debe quedar un consentimiento por escrito.
- Los hallazgos incidentales que se informen al paciente, sea niño o adulto, deben tener un impacto significativo en su salud, para la cual exista un tratamiento para prevenir o mejorar el pronóstico o gravedad de la enfermedad. Esta información debe proporcionarse como parte del proceso de asesoramiento genético.
- El asesoramiento pretest debe incluir una explicación de los posibles resultados del estudio, la posibilidad y tipo de hallazgos incidentales que se pueden identificar y los tipos de resultados que se informarán y cuáles no.
- Se informará de los beneficios, limitaciones e implicaciones para otros familiares del uso de WES y WGS, y alternativas posibles a este estudio.
- Debe distinguirse entre el estudio en contexto clínico y en contexto de investigación.
- Se debe informar de la inclusión de los datos del estudio en bases de datos y ofrecer el ser incluidos o no.
- Se debe explicar también que dada la evolución del conocimiento en el campo de la genética es posible que el clínico recontacte al paciente en caso de que existan novedades respecto a los hallazgos detectados en su estudio.
- Todos estos puntos son recomendaciones y queda en manos de cada facultativo la redacción de éste en su práctica habitual.

En este estudio todos los pacientes firmaron un documento de consentimiento informado elaborado en la Sección de Genética Médica del HCUVA redactado acorde a las recomendaciones establecidas por la ACMG, para la utilización de la NGS previo a la extracción analítica para tal fin. (Anexo 2).

II – JUSTIFICACIÓN

II – JUSTIFICACIÓN

La DI es un problema de salud pública, con una prevalencia poblacional del 1-3%. El abordaje del diagnóstico genético es una prioridad en estos pacientes, puesto que en un 30-50% de los casos puede identificarse una causa genética. El conseguir un diagnóstico etiológico en el paciente con DI tiene un gran impacto a nivel sanitario, social y económico tanto para el individuo afecto como para sus familiares.

En los últimos años ha habido una revolución tecnológica en cuanto a las técnicas de diagnóstico molecular con el desarrollo de la NGS, lo que permite un abordaje genómico para el estudio de los pacientes con DI. Estas tecnologías deben ser utilizadas por personal cualificado y precisan de un abordaje interdisciplinar por los facultativos implicados en las distintas áreas de la genética humana para obtener un rendimiento diagnóstico adecuado.

Tradicionalmente, tras un estudio de array-CGH para descartar desequilibrios cromosómicos y estudio molecular de X frágil con resultado normal en un paciente con DI, se realizaba un abordaje molecular dirigido por el clínico responsable. La gran heterogeneidad genética descrita en la DI en los últimos años, con la descripción masiva de nuevos genes causantes de DI, nuevos fenotipos clínicos, así como la descripción de fenotipos atípicos o leves de síndromes monogénicos clásicos, hacen que la detección clínica de todas estas entidades sea cada vez más compleja. Un abordaje molecular mediante NGS va a permitir la detección de casos atípicos, fenotipos leves, formas no sindrómicas o de entidades nuevas en un único ensayo.

La interpretación de los resultados de la NGS en el estudio diagnóstico del paciente con DI es compleja, ya que se generan una inmensidad de datos bioinformáticos, que van a precisar de una adecuada descripción clínica y orientación dirigida por el facultativo médico para optimizar el rendimiento diagnóstico del estudio. Del mismo modo, tras el análisis de los resultados de la NGS en muchas ocasiones se precisará de una reevaluación clínica del paciente para atribuir o no una posible patogenicidad a los resultados obtenidos (91).

Todo esto ilustra la gran revolución clínica y tecnológica que está viviendo en este momento el mundo de la genética y su potencial aplicación en el diagnóstico de los pacientes con DI. Como clínicos tenemos la responsabilidad de mantenernos actualizados y adecuadamente formados respecto a las nuevas herramientas de diagnóstico para utilizar aquellas pruebas que puedan ser más útiles y eficaces y disminuir la variabilidad en el estudio de pacientes con DI. Como gestores debemos establecer protocolos de diagnóstico eficientes a través de análisis coste-eficiencia de las distintas herramientas diagnósticas disponibles y como científicos es nuestra responsabilidad avanzar en el conocimiento de la DI.

En base a estas premisas se ha motivado la realización de este trabajo, en el que se analiza el rendimiento diagnóstico y el impacto de la utilización de la secuenciación del exoma clínico en el estudio de pacientes con DI en la Sección de Genética Médica, Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. Del mismo modo se realiza un análisis de los resultados y de los factores clínicos que puedan asociarse a un mayor rendimiento de esta técnica para intentar establecer un protocolo de actuación más eficaz y eficiente para el estudio diagnóstico del paciente con DI.

III – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

El uso del exoma clínico mejora el rendimiento diagnóstico en pacientes con discapacidad intelectual y reduce tanto el tiempo como los costes del proceso diagnóstico.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo principal es evaluar el rendimiento diagnóstico de la secuenciación del exoma clínico en los pacientes con DI valorados en la Sección de Genética Médica, Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

Los objetivos secundarios son:

- Conocer las características epidemiológicas, demográficas y fenotípicas de los pacientes con DI en nuestra población.
- Analizar los resultados del estudio de secuenciación del exoma clínico en nuestra población de DI (diagnósticos específicos, VOUS, hallazgos incidentales).
- Comparar el rendimiento diagnóstico del exoma clínico según diferentes variables clínicas.
- Identificar las causas de la ausencia, desde el punto de vista clínico, de orientación etiológica específica previa al exoma.
- Analizar la duración y los costes del proceso diagnóstico en DI antes y después de la aplicación del exoma clínico.
- Establecer un protocolo diagnóstico actualizado para pacientes con DI en nuestro medio.

IV – MATERIAL Y MÉTODOS

IV – MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional retrospectivo de pacientes con DI valorados en la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, en los que se realizó estudio de secuenciación del exoma clínico en su proceso diagnóstico.

El estudio se ha llevado a cabo siguiendo las normas deontológicas reconocidas por la Declaración de Helsinki (59ª Asamblea General, Seúl, Corea, Octubre 2008)(180), las Normas de Buena Práctica Clínica (181) y cumpliendo la legislación vigente y la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica)(182). Los datos serán protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación, considerando la información generada en este estudio como estrictamente confidencial, permitiéndose, sin embargo, su inspección por las Autoridades Sanitarias. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HCUVA (Anexo 5).

4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron 188 individuos, con diagnóstico clínico de DI, valorados en la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) entre los años 2015 y 2018, en los que se solicitó exoma clínico como herramienta diagnóstica.

El HCUVA pertenece a la red pública de hospitales y es centro de referencia del Área 1 de Salud de la Región de Murcia y la Sección de Genética Médica es referencia regional para la evaluación y seguimiento de enfermedades genéticas y raras en niños y adultos. El periodo de estudio se inició en el año 2015, puesto que fue entonces cuando se empezó a utilizar el exoma clínico como herramienta diagnóstica en la Sección.

Los pacientes presentaban DI como signo clínico principal, sin diagnóstico etiológico conocido previo a la solicitud del exoma clínico. Se clasificó a los

pacientes atendiendo al nivel de gravedad de su DI, presencia o no de anomalías asociadas, o según el momento de evaluación.

Se incluyeron los pacientes según los criterios establecidos en el DSM V atendiendo a sus limitaciones en los ámbitos conceptual, social y práctico, y se clasificaron en: leve, moderada o grave/profunda (2). En menores de 5 años, se incluyeron aquellos con un retraso global del desarrollo, afectando al menos a 2 áreas, puesto que es predictivo de una DI posterior (12, 183). A partir de los 5-6 años, se utilizaron cuando los tenían realizados, los análisis estandarizados para el diagnóstico de DI (CI<70), WISC o similar, y en su defecto con diagnóstico clínico de DI por el neuropediatra o neurólogo y/o según requerimientos especiales en su escolarización (18, 52, 58, 184).

Respecto a la clasificación de los pacientes en DI sindrómica o aislada, se consideró DI sindrómica aquella que asoció algún otro tipo de anomalía: alteración del crecimiento (>2 DE para peso y talla según edad y sexo), alteración del perímetro cefálico, presencia de anomalías congénitas y/o rasgos dismórficos.

Se realizó una tercera clasificación de los pacientes según si se trataba de pacientes valorados por primera vez en la Sección en los años del estudio (casos nuevos) o bien valorados en años previos, sin haber podido filiar la etiología de su DI, siendo evaluados nuevamente durante el periodo de estudio (casos reevaluados). Esta clasificación se realizó para el análisis del impacto de la incorporación de la NGS en la práctica clínica.

4.2.1 Tamaño muestral

Dada la prevalencia de la DI de un 1-3% (13) y partiendo de los datos demográficos de la población murciana en los años de estudio (2015-2018) con una media de 1.470.000 habitantes (31), se ha estimado un tamaño muestral de 180 pacientes para una precisión del 1,5% al 2,5%.

4.2.2 Criterios específicos de inclusión y exclusión

Inclusión:

- Pacientes de ambos sexos con DI sindrómica o aislada, en los que se haya realizado secuenciación del exoma clínico en su estudio diagnóstico, independientemente de la edad y grado de DI.
- Todos los pacientes debían tener realizada una evaluación médica completa en la Sección, con recogida de antecedentes familiares, personales, exploración física y realización de estudios complementarios cuando fueron necesarios.
- Pacientes en los que se había descartado una causa no genética de su DI.

En algunos pacientes existió el antecedente de algún factor etiológico exógeno asociado a posible alteración en el neurodesarrollo, pero tras la valoración del caso, no se consideró que pudiera claramente justificar su DI o bien por la asociación de otros factores que apoyaban una posible etiología genética-molecular, fueron también incluidos en el estudio. De hecho, los factores etiológicos de la DI, no son excluyentes entre sí, si no que en algunos casos pueden coexistir, modificando el fenotipo clínico y dificultando en ocasiones el diagnóstico etiológico (66). En concreto, se hace referencia a algunos casos de niños nacidos prematuros, que o bien porque el grado de prematuridad o la asistencia perinatal requerida no justificaban totalmente una DI o bien porque asociaban otras características que sugerían una posible etiología molecular (anomalías congénitas, rasgos particulares...) se incluyeron en el estudio.

- Pacientes con array-CGH y estudio molecular de X Frágil normales.
- El exoma clínico debía haber sido realizado en un único laboratorio para garantizar la homogeneidad de la muestra y consistencia interna, en el periodo de estudio, años 2015-2018.

Exclusión:

- Pacientes con CI límite o donde no estuviera claro si existía o no DI franca.
- Pacientes en los que se hubiera detectado otra posible causa para la DI del paciente tras su valoración en la Sección (teratógenos, patología perinatal,

- prematuridad, traumatismos o accidentes, infecciones: sepsis, meningitis...).
- Pacientes con detección de un desequilibrio cromosómico que justificara la DI en el estudio de array-CGH o bien diagnóstico de síndrome de X frágil.
 - Pacientes con detección de la etiología de su DI tras la realización de estudios analíticos (bioquímicos, metabólicos, enzimáticos o moleculares) realizados en la Sección.
 - Criterios de pérdida, no se preveían al tratarse de un estudio retrospectivo.

4.3 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

Se ha realizado un análisis retrospectivo mediante la revisión de las historias clínicas de los pacientes (historia física e historia electrónica) recogiendo de forma sistemática los datos y variables del estudio (Anexo 3).

Los datos y las variables que se utilizaron para el presente estudio fueron los siguientes:

- Datos de filiación: nombre-iniciales, fecha de nacimiento, número de historia clínica.
- Variables demográficas: sexo y edad.
- Datos familiares: edad de los padres en el momento de nacimiento del consultante, antecedentes familiares de DI, consanguinidad, origen geográfico o nacionalidad.
- Datos prenatales y perinatales: tipo de gestación, anomalías prenatales, edad gestacional, patología en periodo neonatal inmediato.
- Datos somatométricos y de la exploración física: peso, talla, perímetro craneal (PC), rasgos particulares.
- Datos clínicos: desarrollo psicomotor, grado de DI, tipo de escolarización, presencia de otras patologías del neurodesarrollo (trastornos de conducta, trastorno del espectro autista (TEA), trastorno del sueño, epilepsia), presencia de anomalías congénitas asociadas (cardíacas, renales, cerebrales, oftalmológicas, auditivas...).
- Estudios diagnósticos realizados y costes: estudios cromosómicos (cariotipo, FISH, array-CGH), metabólicos, estudios de metilación y

estudios moleculares dirigidos (secuenciación o MLPA de un gen, paneles NGS).

-Variables de tiempo: fecha de primera visita, edad de primera visita, número de visitas hasta solicitar exoma, número de visitas tras exoma, edad al diagnóstico.

-Resultados del exoma clínico: variantes detectadas (patogénicas, probablemente patogénicas, VOUS), tipo de variante, patrón de herencia, realización de estudios de segregación familiar, clasificación de VOUS tras estudio de segregación, detección de hallazgos incidentales.

-Motivo de no diagnóstico previo al exoma clínico: no sindrómico, atípico, no conocido, dentro de entidades sugeridas.

4.4 ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DEL EXOMA

Los estudios de secuenciación del exoma clínico en la Sección de Genética Médica del HCUVA se realizan en distintos laboratorios externos previo a solicitud de autorización a la dirección del Hospital. Para conseguir una muestra homogénea y con consistencia interna, se seleccionaron los pacientes cuyo estudio de exoma clínico se realizó en un solo laboratorio. El abordaje del estudio de exoma fue de forma individual en el paciente, enviando posteriormente muestra de los padres u otros familiares cuando fue necesario, según los hallazgos detectados.

4.4.1 Obtención de muestras

Para la obtención del ADN se llevó a cabo una extracción de sangre periférica en 2 tubos con EDTA de 5 ml, por el personal de enfermería de la Sección de Genética Médica (dentro de la práctica asistencial habitual de la Sección). En caso que el paciente ya tuviera realizados otros estudios moleculares y hubiera ADN almacenado en el Centro de Bioquímica y Genética Clínica (CBGC), se realizó el estudio sobre ese ADN para evitar tener que volver a realizar extracción analítica al paciente.

El envío de la muestra del paciente o bien del ADN al laboratorio de estudio del exoma se realizó mediante el sistema de transporte habitual del Hospital.

4.4.2 Consentimiento informado

Previo a la realización del estudio de exoma clínico se procedió en todos los casos, a la explicación de la tecnología que se iba a utilizar y firma del consentimiento informado para utilización de pruebas de NGS. Dicho consentimiento informado ha sido elaborado en la propia Sección de Genética Médica siguiendo las recomendaciones de la ACMG y de la Comisión de Bioética (54-56).(Anexo 2).

4.4.3 Metodología del exoma realizado

El proceso de análisis bioinformático de los datos de exoma puede observarse en la Figura 4.1. Inicialmente se realizó una captura y secuenciación masiva de los exones de genes humanos. Se utilizó el Kit de captura SeqCap EZ MedExome Enrichment Kit, de Roche Nimblegen y el equipo de secuenciación NextSeq (Illumina) con una profundidad de cobertura promedio superior a 70-80X. Tras el proceso de secuenciación y revisados los controles de calidad, se realizó el alineamiento de las secuencias con el genoma de referencia versión NCBI37/GRCh37 (hg19).

Cuando hubo una sospecha clínica u orientación diagnóstica dirigida por el clínico solicitante del estudio, se realizó en primer lugar un filtrado para los genes sugeridos (exoma dirigido). En segundo lugar, se procedió al filtrado de variantes de todo el exoma clínico, que incluye alrededor de 5000 genes, en base a la versión de OMIM utilizada. Puesto que la información de genes mórbidos de OMIM está en constante evolución (<https://www.omim.org/statistics/update>), durante el periodo de estudio se emplearon distintas versiones del exoma clínico (versión de junio 2015, septiembre 2015, junio 2016 y febrero 2017).

La depuración de las variantes se realizó empleando los siguientes parámetros:

- Profundidad de cobertura mínima para detección de variantes: 6x
- Número de secuencias con la variante (para heterocigotas): > 20%
- Detección de variantes sobre las regiones de interés capturadas: +/- 75 pares de bases flanqueantes

-Se anotaron como variantes de *splicing* aquellas encontradas hasta +/- 20 pares de bases desde el límite del exón-intrón

Cuando se suponía un modelo de herencia recesivo, en la identificación de variantes candidatas se excluyeron las variantes con frecuencias >0.5% en la base de datos Genome Aggregation Database y >1% en la base de datos propia del laboratorio y se recuperaron aquellas variantes reportadas en ClinVar como patogénicas o probablemente patogénicas.

Cuando se analizaron los resultados de acuerdo con un modelo de herencia dominante, se excluyeron las variantes con frecuencias >0.05% en la base de datos Genome Aggregation Database y >0.2% en la base de datos propia del laboratorio y se recuperaron las variantes reportadas en la base de datos ClinVar como patogénicas o probablemente patogénicas.

La anotación de variantes se realizó añadiendo la información relevante a cada variante detectada mediante un completo análisis bioinformático de los datos del exoma, incluyendo: gen afectado (nombre completo del gen y resumen RefSeq), tipo de mutación (*missense*, *nonsense*, *frameshift*, *splicing*...), cambio en mRNA y en la proteína, frecuencia en población control en bases de datos públicas (dbSNP, 1000Genomes, Exome Variant Server) y privadas (propia del laboratorio, exomas de población española), predicción de patogenicidad de variantes *missense* con varios algoritmos, e información OMIM.

Para la priorización de las variantes patogénicas se seleccionaron las variantes en los genes seleccionados según el fenotipo. Si existía un modelo de herencia conocido para la enfermedad se analizaron las variantes de acuerdo con el modelo sugerido. Las variantes candidatas se validaron por Sanger.

Para la elaboración del informe se categorizaron las variantes según las recomendaciones de la ACMG (141), y se incluyeron las variantes sospechosas de estar implicadas en la enfermedad y los hallazgos incidentales (Anexo 4).

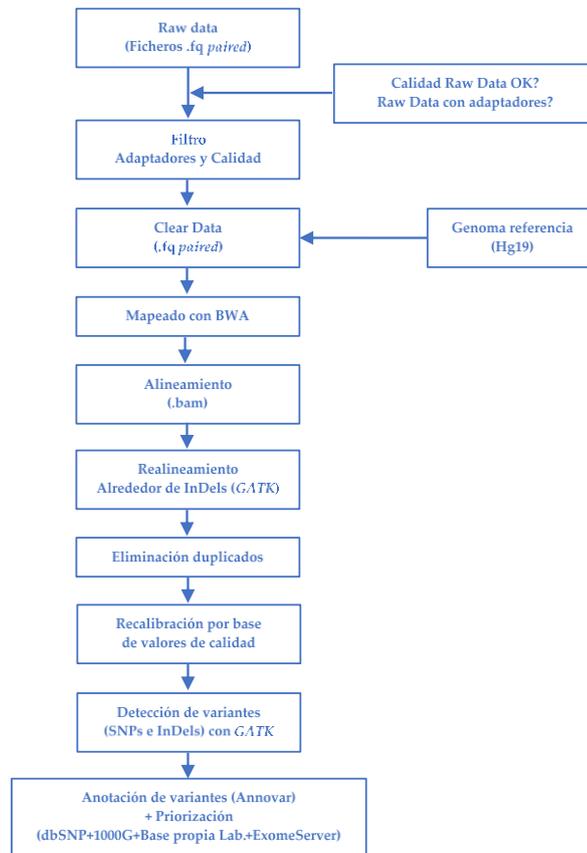


Figura 4.1: Proceso de análisis bioinformático de los datos de exoma.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de las variables analizadas. Para las variables cualitativas, se obtuvieron las frecuencias absoluta y relativa y su intervalo de confianza (95%); y para las variables cuantitativas, los valores mínimo, máximo, media y desviación estándar.

Se realizó un análisis univariante para las variables de interés. Se usó el test de la Chi cuadrado para estudiar la independencia de las variables cualitativas en tablas 2xN y el test exacto de Fisher en tablas 2x2. Para el análisis de las variables cuantitativas y tras realizar un estudio de normalidad, se usó el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Se consideraron estadísticamente significativos los resultados de los test con p-valor menor que 0,05 (nivel de significación alfa del 5%). Para el análisis de los datos se ha usado el programa estadístico Stata V.15

En los estudios analíticos, cuando se utilizó la variable de diagnóstico final, se consideraron los casos con diagnóstico final certero, para evitar sesgo de selección.

Se definió el término *rendimiento del exoma*, como el porcentaje obtenido de la división entre el número de casos con confirmación molecular y el número de casos total de la variable a analizar.

V - RESULTADOS

V – RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

5.1.1. Datos demográficos

Las características demográficas de la población a estudio se describen en la tabla 5.1.

Hubo un predominio del sexo masculino con una ratio de 1.8:1. La media de edad de los pacientes en la primera visita en consulta fue de 5.2 ± 5.7 años, y la media de edad en la que se solicitó el exoma fue de 8.7 ± 6.6 años. De los casos con resultado patogénico en el exoma, la edad media al diagnóstico fue de 10.4 ± 8 años.

La edad media de la madre al nacimiento del paciente fue de 30.3 ± 5.4 y la del padre de 34 ± 6.6 años. La mayoría de los pacientes estudiados fueron de origen caucásico, aunque hubo representación de otras nacionalidades, sobre todo marroquí.

En cuanto a los datos gestacionales y perinatales, en el 95.2% de los casos, la gestación se consiguió de forma natural y en un 2.6% se precisó algún tipo de reproducción asistida (inseminación artificial (IA), fecundación in vitro con inyección intracitoplasmática (FIV-ICSI)). Hubo donación de gametos en 4 casos (2.1%).

Se detectó algún tipo de anomalía durante la gestación en el 17.6% de los casos (RCIU 8%, anomalías congénitas 5.9%, translucencia nucal aumentada o riesgo de aneuploidías (2.1%)), siendo la mayoría gestaciones sin incidencias destacables (82.5%). El nacimiento se produjo a término en el 88% de los casos, y el resto fueron prematuros; no hubo ningún caso de posmadurez. De los prematuros (23/188), el 78% fueron prematuros de entre 32-37 semanas, y el 17% (4/23) prematuros menores de 32 semanas de gestación, solo hubo un caso de prematuridad extrema (<29 semanas de gestación).

Tabla 5.1: Características demográficas de la población.

Variables	Proporción	%
Sexo		
<i>Masculino</i>	121/188	64.4
<i>Femenino</i>	67/188	35.6
Edad		
<i><5 años</i>	112/188	59.6
<i>5-18 años</i>	69/188	36.7
<i>>18 años</i>	7/188	3.7
Origen		
<i>Caucásico (español)</i>	142/188	75.5
<i>Marroquí</i>	24/188	12.8
<i>Sudamericano</i>	10/188	5.3
<i>Gitano</i>	5/188	2.7
Antecedentes familiares		
<i>Familiar primer grado afecto</i>	45/188	24
<i>Consanguinidad</i>	28/188	15

5.1.2. Características clínicas de los pacientes:

Se clasificó a los pacientes según tres criterios: grado de DI (leve, moderada, grave), momento de primera visita en la Sección (casos nuevos o reevaluados) y asociación de anomalías (aislada o sindrómica) (Tabla 5.2).

Prácticamente la mitad de los casos (45.2%) fueron clasificados con DI moderada. Solo en un 28.7% existió un análisis estandarizado para el diagnóstico de la DI, siendo el resto clasificados por criterio del neuropediatra o neurólogo y/o según el tipo de escolarización recibida atendiendo a los criterios del DSM V. El 71.3% fueron pacientes valorados por primera vez en la Sección durante el periodo de estudio (casos nuevos) y la mayoría cumplían criterios de DI sindrómica.

Las características clínicas de los pacientes con DI sindrómica pueden observarse en la Figura 5.1. Las anomalías asociadas con mayor frecuencia en los pacientes con DI sindrómica fueron la presencia de rasgos dismórficos detectados

en la exploración física y las alteraciones del crecimiento craneal. De los pacientes con alteración del crecimiento craneal, el más frecuente fue la microcefalia o microcefalia relativa (59.7%). A destacar también las alteraciones en el crecimiento, la talla baja.

El 43% de los pacientes presentaron malformaciones o anomalías estructurales, con una media de 1.4 anomalías/paciente. De éstas, las más frecuentes fueron las cardiológicas, seguidas de las malformaciones genitourinarias. Se detectaron alteraciones morfológicas en la RM cerebral en un 41.5% de los pacientes, pero la mayoría fueron hallazgos inespecíficos no relevantes para el diagnóstico del paciente (agenesia/disgenesia de cuerpo caloso, agenesia del esplenio, atrofia corticosubcortical, aumento del espacio subaracnoideo, asimetría ventricular, colpocefalia...).

Los datos referentes a la adquisición de los hitos del desarrollo y presencia de comorbilidades asociadas se reflejan también en la figura 5.1.

Tabla 5.2: Distribución de los pacientes según las distintas clasificaciones.

Clasificación	Proporción	%
Grado de DI		
<i>leve</i>	61/188	32.5
<i>moderada</i>	85/188	45.2
<i>grave</i>	42/188	22.3
Casos nuevos/Reevaluados		
<i>nuevos</i>	134/188	71.3
<i>reevaluados</i>	54/188	28.7
DI aislada / sindrómica		
<i>aislada</i>	31/188	16.5
<i>sindrómica</i>	157/188	83.5

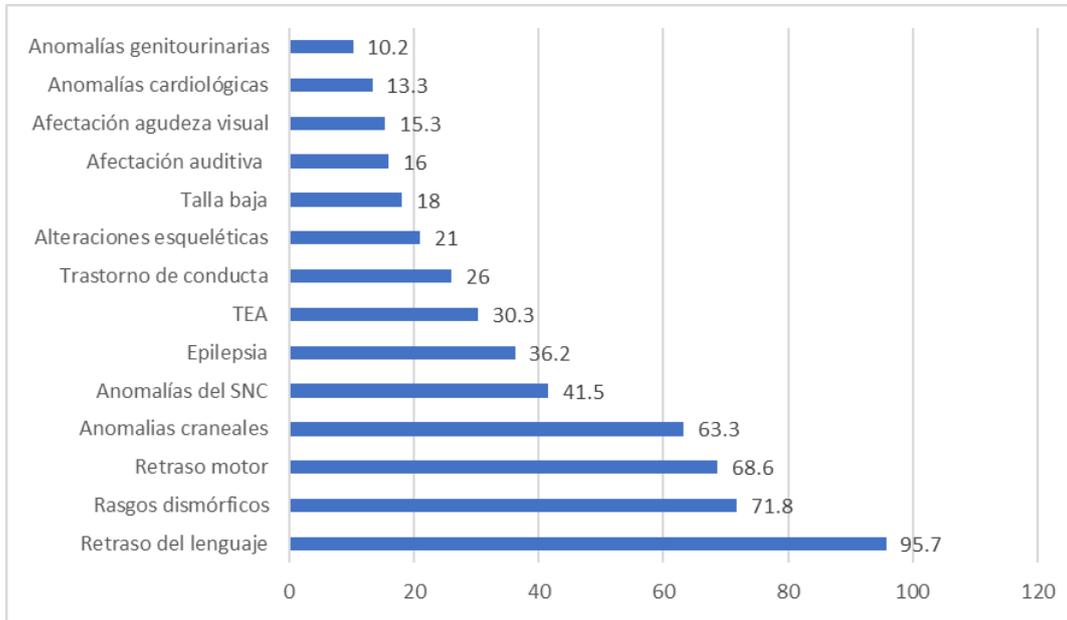


Figura 5.1: Características clínicas de los pacientes con DI sintromica.

5.1.3. Estudios solicitados previo a la realización exoma clínico

Además de los estudios básicos de inclusión (array-CGH y X frágil), los pacientes tenían otros estudios realizados previos al exoma clínico (Figura 5.2).

La mayoría de los pacientes tenían solicitado estudio de cariotipo y un grupo menor estudios de FISH (22q11.2, 1p36, 7q11.2, 5p, 17p11.2).

Los pacientes tenían solicitados también estudios metabólicos (aminoácidos en sangre y orina, ácidos orgánicos en orina, acilcarnitinas, sulfiteo, SAICAR, estudio de glucosaminoglicanos y oligosacáridos en orina, purinas y pirimidinas, esteroles y sialotransferrinas), y estudios de metilación (para el despistaje de síndrome de Prader-Willi, Angelman, Temple, Kagami-Ogata) previo a la realización del estudio de exoma clínico en un porcentaje considerable de pacientes.

Se solicitaron estudios moleculares dirigidos en la mayoría de los pacientes (70.7%) previo a la realización del exoma clínico, con una media de 2.3 estudios moleculares por paciente. Los tipos de estudios solicitados fueron, secuenciación dirigida de un gen (43%), MLPA de un gen (27%) o panel NGS dirigido (21%).

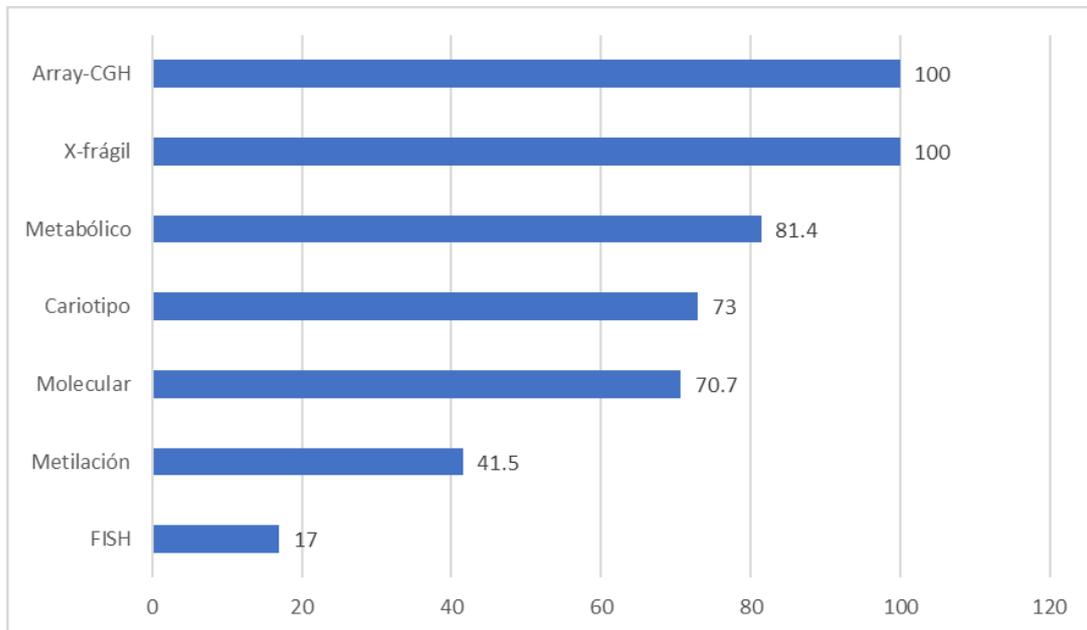


Figura 5.2: Estudios solicitados previo al exoma clínico.

5.1.4. Descripción de tiempos hasta realización de exoma clínico y tiempo hasta diagnóstico

El tiempo medio transcurrido desde la primera visita del paciente en la Sección de Genética Médica hasta la solicitud del exoma clínico fue de 42 meses, con una media de 4.5 ± 3 visitas desde la primera valoración hasta la solicitud del exoma.

De los casos con diagnóstico etiológico molecular confirmado, la media de tiempo hasta diagnóstico fue de $4.9 \pm 3,8$ años. Tras la realización del exoma clínico, el número medio de visitas hasta poder confirmar el diagnóstico fue de 1.2 visitas por paciente, derivado del estudio de segregación de variantes y/o de la comprobación del patrón de herencia de las variantes patogénicas con muestras de los padres.

5.2 RESULTADOS DE EXOMA CLÍNICO

De los 188 pacientes estudiados con secuenciación de exoma clínico se hallaron variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el 27.6% (52/188), y VOUS en un porcentaje considerable de pacientes (87/188) (Figura 5.3).

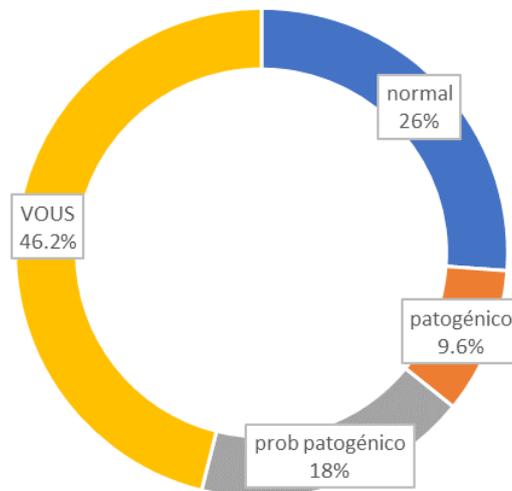


Figura 5.3: Resultados de exoma clínico.

5.2.1 Tipos de variantes detectadas en el exoma clínico

Las variantes detectadas en el exoma fueron informadas siguiendo los criterios de la ACMG (141) (Anexo 4).

De las variantes patogénicas o probablemente patogénicas el 36% fueron de tipo *frameshift*, el 34.6% *nonsense*, y el 27% *missense*. El 3.7% afectaban al *splicing* y hubo una de tipo *nonframeshift* (Figura 5.4). El 63.5% fueron variantes nuevas, no descritas previamente, en genes asociados a DI.

De las VOUS informadas, la gran mayoría fueron variantes *missense*, y en un menor porcentaje fueron de tipo *frameshift* y *nonsense*. Hubo 2 que podían alterar el *splicing* y una *nonframeshift* (Figura 5.4).

Tras estudios de segregación de las VOUS en progenitores y otros familiares cuando fue preciso, se clasificaron finalmente como patogénicas el 17.2%, descartándose como causales el 69.5%. 6 variantes (4%) se consideraron

posiblemente patogénicas, por ser compatible el patrón de herencia tras el estudio de segregación en padres, pero la correlación con el fenotipo clínico fue dudosa, por lo que no se consideraron dentro del grupo de diagnósticos confirmados para el estudio analítico. En un 9% de los casos no se pudo concluir el análisis por falta de muestras parentales.

Según el tipo de variante, al menos la mitad de las *frameshift* y *nonsense* se clasificaron finalmente como patogénicas y un porcentaje considerablemente menor en el caso de las *missense* (Figura 5.5). De las dos que podían alterar el *splicing*, una fue clasificada como patogénica y la otra no se pudo concluir por falta de muestras parentales. La de tipo *nonframeshift* fue clasificada como no patogénica.

Las VOUS clasificadas finalmente como patogénicas contribuyeron al rendimiento diagnóstico del exoma clínico en un 7.4%, confirmándose como causales 5 variantes en genes con herencia AD, 5 de herencia AR y 4 ligados a X.

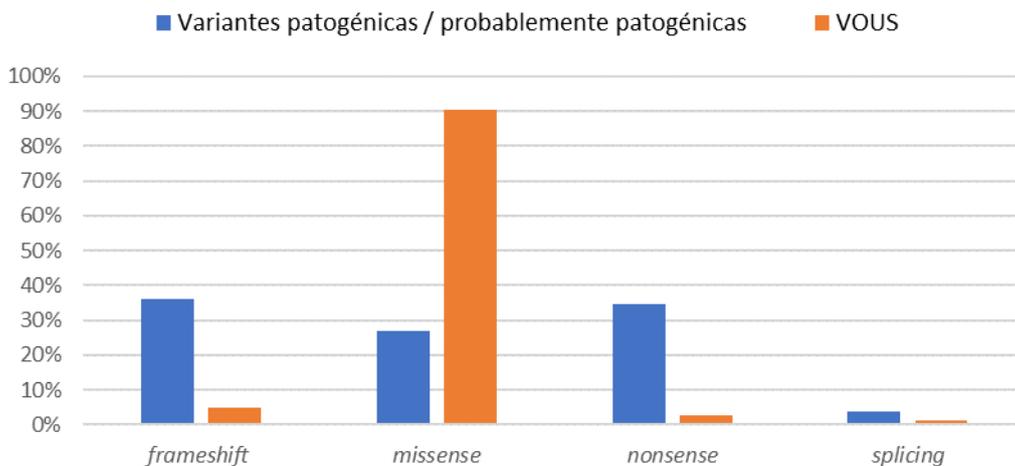


Figura 5.4: Tipos de variantes detectadas en el exoma.

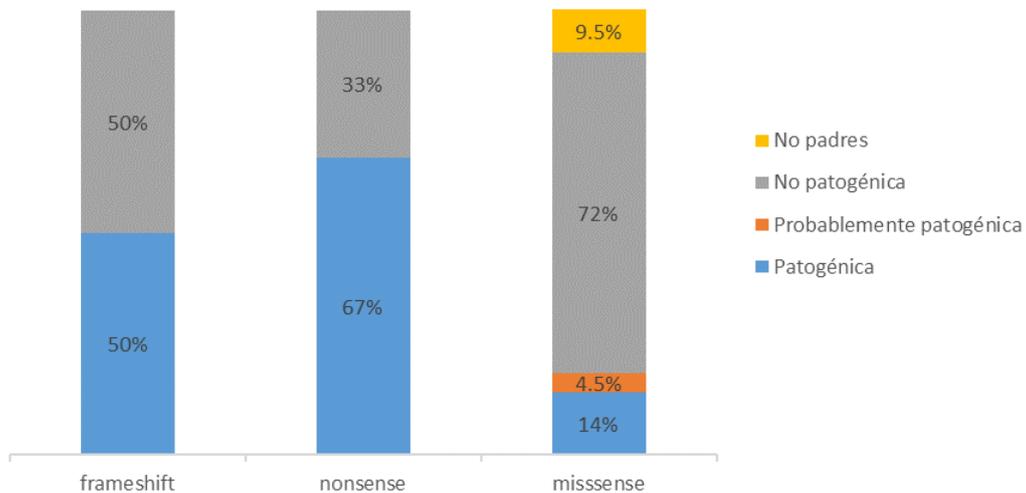


Figura 5.5: Clasificación final de las VOUS según el tipo de variante.

5.2.2 Hallazgos incidentales

Se detectaron variantes patogénicas en genes incluidos en el listado publicado por la ACMG como hallazgos incidentales a informar en estudios de secuenciación masiva en un 3.2% de los casos (6/188). Se detallan en la Tabla 5.3.

Se detectaron de forma incidental, estados de portador de enfermedades AR o ligadas a X en un 15.4% de los pacientes, en genes no implicados en el fenotipo del paciente (CFTR, ATB7B, GJB2, ABCA4, USH2A, MCAD, FANCE, MAN2B1, DHCR7, BBS12, NPHS1, RECQL4).

Tabla 5.3: Hallazgos incidentales detectados en el exoma clínico.

Gen	Enfermedad	OMIM	Número de pacientes
BRCA2	Cáncer de mama/ovario familiar 2	612555	3
MSH2	Síndrome de Lynch	120435	1
SCN5A	Síndrome de Brugada 1	6001144	1
APOB	Hipercolesterolemia familiar	143890	1

5.3 RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL EXOMA CLÍNICO

El rendimiento diagnóstico de la secuenciación de exoma clínico en pacientes con DI en esta población fue de un 34% (64/188). El 57.5% (108/188) continuaron sin diagnóstico molecular, y en un 5.3% existió un diagnóstico molecular probable, o bien por tratarse de una variante probablemente patogénica o VOUS en la que no se pudo realizar estudio de segregación en familiares para concluir su patogenicidad, o bien de una VOUS que, tras un estudio de segregación compatible, no existió suficiente soporte bibliográfico o correlación clínica para atribuirle absolutamente la patogenicidad. Si se hubiera incluido finalmente este 5.3% en los casos, el rendimiento final del exoma clínico del estudio hubiera sido de un 39.3%. El 3.2% restante, se trató de VOUS que no pudieron aclararse por no disponer de muestras de los padres, pero que a priori no parecían justificar claramente el fenotipo del paciente.

De los casos diagnosticados, más de la mitad fueron en genes con patrón de herencia autosómico dominante y de éstos la gran mayoría fueron *de novo*. De los genes con herencia autosómica dominante que fueron heredados, uno estuvo presente en mosaico en uno de los progenitores. En las Figuras 5.6 y 5.7 se ilustra la distribución de los casos diagnosticados según el patrón de herencia del gen y si fueron heredados o *de novo*.

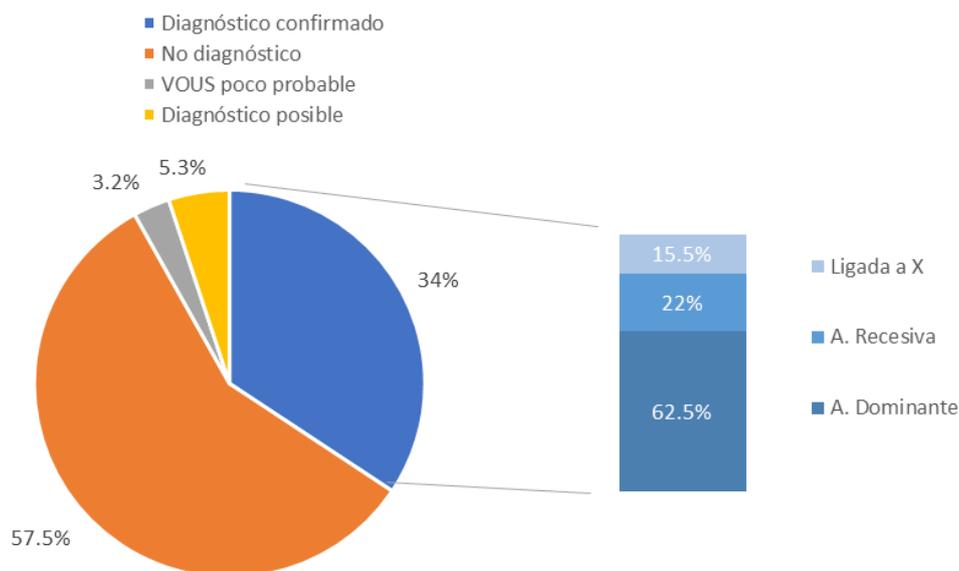


Figura 5.6: Rendimiento diagnóstico del exoma clínico y patrones de herencia.

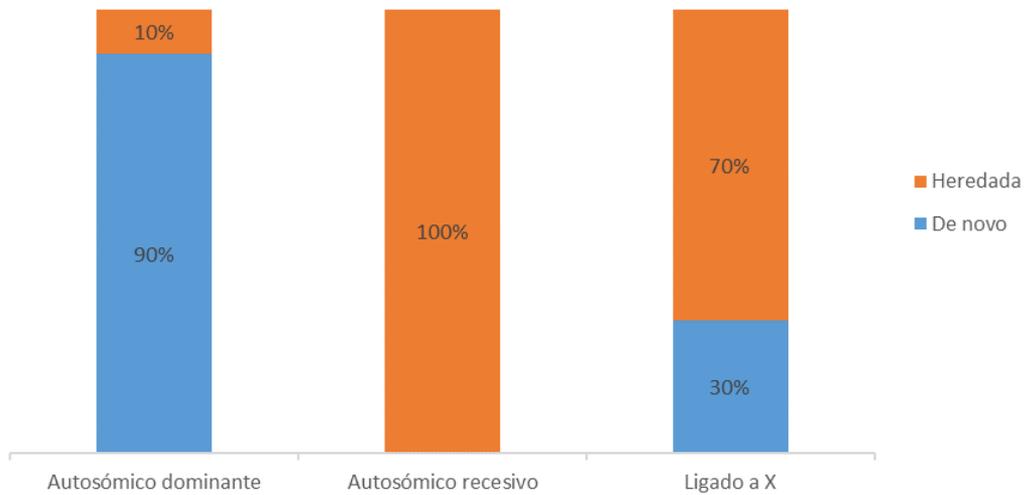


Figura 5.7: Tipo de herencia de los casos diagnosticados.

5.3.1 Heterogeneidad genética de la población

Tras la aplicación y análisis de resultados del exoma clínico, se detectaron 65 variantes causales en 59 genes distintos asociados a DI, observándose una amplia heterogeneidad genética en la población de estudio (Tabla 5.4).

Se detectó una variante causal en más de un paciente en 6 genes distintos (10%), siendo el resto variantes detectadas en genes únicos. Estos genes recurrentes en nuestra población han sido: AHDC1 (en tres pacientes), EFTUD2, SHANK3, NDST1, HACE1 y MECP2 (en dos pacientes cada uno). Un paciente presentó variantes causales en dos genes distintos (doble diagnóstico), ambos influyendo en su fenotipo clínico (genes SOX10 y DDX3X).

Tabla 5.4: Resultados moleculares patogénicos del exoma clínico.

Gen	Locus	Variante patogénica	Síndrome asociado	OMIM
Herencia autosómica dominante: heredada				
RAD21	8q24.11	NM_006265: c.589C>T, p.Gln197Ter mat	Síndrome de Cornelia Lange 4	614701
SUFU	10q24.32	NM_016169: c.157C>T, p.Gln53Ter mat	Síndrome de Gorlin / nevus basocelular	109400
NF1	17q11.2	NM_000267: c.3437T>G, p.Val1146Gly mat	Síndrome Neurofibromatosis-Noonan	601321
SCN2A	2q24.3	NM_001040143: c.3631G>A, p.Glu1211Lys mat (mosaico)	Encefalopatía epiléptica infantil temprana 11	613721
Herencia autosómica dominante: <i>de novo</i>				
AHDC1	1p36.1	NM_001029882: c.2062C>T, p.Arg688Ter	Síndrome de Xia Gibbs	615829
AHDC1	1p36.1	NM_001029882: c.2565del, p.Phe855LeuFsTer	Síndrome de Xia Gibbs	615829
AHDC1	1p36.1	NM_001029882: c.2260T>C, p.Gln754Ter	Síndrome de Xia Gibbs	615829
EFTUD2	17q21.31	NM_001258354: c.2531+1G>A	Disostosis mandibulofacial- microcefalia	610536
EFTUD2	17q21.31	NM_001142605: c.560C>G, p.Ser187Ter	Disostosis mandibulofacial- microcefalia	610536
SHANK3	22q13.33	NM_033517: c.3382_3383del, p.Leu1128fs	Síndrome de Phelan McDermid	606232
SHANK3	22q13.33	NM_033517: c.2246dup; p.Leu749fs	Síndrome de Phelan McDermid	606232
KANSL1	17q21.31	NM_001193466: c.1816C>T, p.Arg606Ter	Síndrome de Koolen de Vries	610443
KCNB1	20q13.13	NM_004975: c.1230del, p.Phe410fs	Encefalopatía epiléptica de inicio en la infancia precoz tipo 26	616056
MBD5	2q23.1	NM_018328: c.2190del, p.Leu730fs	Discapacidad intelectual AD tipo 1	156200
GRIN2B	12p13.1	NM_000834: c.2459G>C, p.Gly820Ala	Discapacidad intelectual AD tipo 6	613970
EP300	22q13.2	NM_001429: c.5798_5799del, p.Gln1933fs	Síndrome Rubinstein-Taybi tipo 2	613684

Tabla 5.4 (continuación)

Gen	Locus	Variante patogénica	Síndrome asociado	OMIM
ZBTB18	1q44	NM_205768: c.943_944del, p.Arg315fs	Retraso mental AD tipo 22	612337
ARID1B	6q25.3	NM_020732: c.5356A>T, p.Lys1786Ter	Síndrome de Coffin Siris	135900
KAT6B	10q22.2	NM_001256468: c.2474_2475ins, p.Ala825fs	Síndrome de Say Barber Biesecker	603736
SMC1A	2q24.3	NM_006306: c.1117A>T, p.Lys373Ter	Encefalopatía epiléptica de debut precoz infancia	607208
ACTB	7p22.1	NM_001101: c.547C>T, p.Arg183Trp	Síndrome de Baraitser Winter-distonía juvenil	243310
SHANK2	11q13.3	NM_133266: c.902dup, p.Pro302fs	Susceptibilidad a Autismo 17	613436
PURA	5q31.3	NM_005859: c.678del, p.Val226fs	Retraso Mental AD 31	616158
STXBP1	9q34.11	NM_001032221: c.504del, p.Ile168fs	Encefalopatía epiléptica infantil temprana 4	612164
GRIN1	Pq34.3	NM_000832: c.2413C>T, p.Pro805Ser	Alt del neurodesarrollo con/sin crisis AD	614254
SMAD4	18q21.2	NM_005359: c.1498A>G, p.Ile500Val	Síndrome de Myhre	139210
ZEB2	2q22.3	NM_001171653: c.3099T>A, p.Cys1033Ter	Síndrome de Mowat Wilson	235730
RAF1	3p25.2	NM_002880: c.782C>T, p.Pro261Leu	Síndrome de Noonan 5	611553
SYNGAP1	6p21.32	NM_006772: c.2895del, p.His965fs	Retraso Mental AD 5	612621
HNRNPK	9q21.32	NM_002140: c.1347T>G, p.Tyr449Ter	Síndrome Au-Kline	616580
KMT2A	11q23.3	NM_001197104: c.7255G>T, p.Glu2419Ter	Síndrome de Wiedemann Steiner	605130
CTNNB1	3p22.1	NM_001098209: c.1603C>T, p.Arg535Ter	Trastorno del desarrollo con diplejía espástica y trastornos visuales	615075
NSD1	5q35.3	NM_022455: c.3964C>T, p.Arg1322Ter	Síndrome de Sotos	117550
TCF4	18q21.2	NM_001243234: c.1017dup, p.Gly340fs	Síndrome de Pitt Hopkins	610954
CDK13	7p14.1	NM_003718: c.2525A>G, p.Asn842Ser	Cardiopatía, rasgos particulares y DI	617360

Tabla 5.4 (continuación)

Gen	Locus	Variante patogénica	Síndrome asociado	OMIM
CHD2	15q26.1	NM_001271: c.5225G>A; p.Arg1742Gln	Encefalopatía epiléptica de inicio en la infancia	615369
AFF4	5q31.1	NM_014423: c.772C>T; p.Arg258Trp	Síndrome CHOPS	616368
KMT2B	10q13.12	NM_014727: c.4903C>T, p.Arg1635Ter	Distonía infantil 28	617284
KCNQ2	20q13.33	NM_004518: c.913_915del; p.Phe305del	Encefalopatía epiléptica infantil precoz 7	613720
SOX10	22q13.1	NM_006941: c.743_744del, p.Glu248fs	Síndrome de Waardenburg tipo 2E	611584

Tabla 5.4 (continuación)

Gen	Locus	Variante patogénica	Síndrome asociado	OMIM
Herencia autosómica recesiva				
NDST1	5q33.1	NM_001301063: c.1831G>A; p.Gly611Ser homocigosis	DI AR tipo 46	616116
NDST1	5q33.1	NM_001301063: c.1831G>A; p.Gly611Ser homocigosis	DI AR tipo 46	616116
HACE1	6q16.3	NM_020771: c.697_703del; p.Leu233fs homocigosis	Paraplejia espástica con RPM con/sin crisis	616756
HACE1	6q16.3	NM_020771: c.587C>G, p.Ser196Ter homocigosis	Paraparesia espástica y RPM con/sin crisis	616756
LRP5	11q13.2	NM_002335: c.1282C>T, p.Arg428Ter homocigosis	Osteoporosis-pseudoglioma	259770
DHCR7	11q13.4	NM_001163817: c.452G>A, p.Trp151Ter / c.1A>G, p.Met1Val	Síndrome de Smith Lemli Opitz	270400
OTUD6B	8q21.3	NM_016023: c.433C>T, p.Arg145Ter homocigosis	DI, rasgos dismórficos, epilepsia y anomalías de miembros	617452
LAMA1	18p11.31	NM_005559: c.5369del; p.Arg1790fs / c.2935del; p.Arg979fs	Síndrome de Poretti Boltshauser	615960
AHI1	6q23.3	NM_017651: c.2488C>T, p.Arg830Trp / c.1-22T>C	Síndrome de Joubert tipo 3	608629
CSPP1	8q13.1	NM_001291339: c.1979C>G, p.Thr660Ser homocigosis	Síndrome de Joubert tipo 21	611654
LARS2	3p21.31	NM_015340: c.1565C>A, p.Tht522Asn / c.632A>T, p.Asp211Val	Síndrome de Perrault 4	615300
DENND5A	11p15.4	NM_015213: c.1011G>A, p.Trp337Ter homocigosis	Encefalopatía epiléptica infantil 49	617281
ERCC3	2q14.2	NM_000122: c.1631G>A; p.Cys544Tyr homocigosis	Tricotiodistrofia tipo 2	616390
MASP1	3q27.3	NM_139125: c.199G>A; p.Gly665Ser homocigosis	Síndrome 3MC	257920

Tabla 5.4 (continuación)

Gen	Locus	Variante patogénica	Síndrome asociado	OMIM
Herencia ligada a X				
MECP2	Xq28	NM_001110792: c.459C>G, p.Tyr153Ter	Síndrome de Rett	312750
MECP2	Xq28	NM_001110792: c.313C>T; p.Pro105Ser	Síndrome de Rett	312750
PIGA	Xp22.2	NM_002641: c. 348A>G, p.Ile116Met	Síndrome de ACM, hipotonía y convulsiones tipo 2	300868
SLC9A6	Xq26.3	NM_001042537: c.1176_1177; p.Gln394ArgfsTer6	Síndrome de Christianson	300243
IQSEC2	Xp11.22	NM_001111125: c.3470A>C; p.Asn1157Thr	DI ligada a X 1	309530
DDX3X	Xp11.4	NM_001193417: c.1939_1940del, p.*647fs	DI ligada a X tipo 102	300958
RPS6KA3	Xp22.12	NM_004586: c.53del; p.Pro18ArgfsTer38	Síndrome de Coffin Lowry	303600
AFF2	Xq28	NM_001170628: c.932G>A; p.Arg311His	DI ligada a X tipo FRAXE	309548
MED12	Xq13.1	NM_005120: c.6440A>G; p.Gln2147Arg	Síndrome de Opitz Kaveggia	305450
OPHN1	Xq12	NM_002547: c.313-1G>T	DI ligada X con hipoplasia cerebelosa	300486
KLHL15	Xq22.11	NM_030624: c.417_418del, p.Leu139fs	DI ligada a X 103	300982

5.3.2 Análisis clínico de los diagnósticos

Se agrupó a los casos diagnosticados según el motivo de no diagnóstico previo al exoma clínico con el objetivo de realizar un análisis de los fenotipos clínicos presentes en el grupo de diagnósticos.

El 37.5% se consideraron diagnósticos no sindrómicos y por tanto difícilmente orientables por el clínico en una primera visita. En el 28% el diagnóstico estuvo dentro de las entidades sugeridas por el clínico al solicitar el exoma clínico, pero que se abordó mediante NGS por ser una entidad con heterogeneidad genética o bien por tener un diagnóstico diferencial amplio. El

9.4% se consideraron como entidades de descripción reciente y por tanto no conocidas hasta el momento del diagnóstico tras la NGS y el 6.3% fueron diagnósticos conocidos, pero que tuvieron una presentación atípica. El 18% se consideraron entidades conocidas, no identificadas por el clínico en la visita, pero que tras el diagnóstico si se consideró que cumplían las características clínicas de la entidad.

5.4 RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO SEGÚN VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS Y AÑO DE ESTUDIO

5.4.1 Datos demográficos y rendimiento del exoma

Se realizó un estudio analítico con el objetivo de valorar si existía correlación entre distintas variables demográficas (sexo, edad de los padres, origen, consanguinidad, antecedentes familiares) y el rendimiento del exoma u otras variables de interés.

5.4.1.1 Sexo y rendimiento diagnóstico del exoma

En este estudio se observó un predominio de individuos de sexo masculino tanto en el grupo global de pacientes, como en los casos diagnosticados. De los casos diagnosticados, el 66% fueron hombres y el 34% mujeres. Este predominio fue debido a las enfermedades genéticas con patrón de herencia ligada a X, presentes en un 15.5% de los pacientes, ocurriendo en este estudio, todos los casos confirmados en pacientes varones. Aun así, no hubo un rendimiento diagnóstico significativamente mayor en hombres que en mujeres (Tabla 5.5).

Tabla 5.5: Rendimiento diagnóstico del exoma según sexo.

Sexo	Rendimiento del exoma	Valor p
Varón	38.2%	0.75
Mujer	35.5%	

5.4.1.2 Edad de los padres y detección de mutación causal *de novo*

Se analizó la posible correlación entre la edad de los padres y la posibilidad de detectar una variante causal *de novo* en el exoma, por grupos de edades, valorando edades >35, >38 y >40 años, así como <25 años, sin detectarse asociación significativa.

El motivo de este análisis fue la asociación descrita entre mayor frecuencia de variantes patogénicas *de novo* a mayor edad de progenitores (185-188) clásicamente descrito en el caso de padre de edad avanzada, pero también en el caso de la madre (189). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pero si se observó que, en el grupo de madres mayores de 40 años, los casos diagnosticados (3 casos) fueron todos en genes de herencia AD, *de novo* y en el rango de madres mayores de 38 años, de 8 casos, 6 fueron también en genes con patrones de herencia AD *de novo*. En el caso de los padres, no se observó ninguna relación.

5.4.1.3 Origen y consanguinidad

Respecto al origen de los pacientes y la posible relación con la consanguinidad, se observó que en la población marroquí y gitana hubo un porcentaje mayor de consanguinidad respecto a la población caucásica, alcanzando significación estadística como se observa en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6: Relación entre origen y consanguinidad.

Origen	Consanguinidad según origen	Valor p
Caucásico	5%	
Marroquí	67%	< 0.001
Sudamericano	10%	
Gitano	80%	

5.4.1.4 Consanguinidad y rendimiento diagnóstico del exoma / patrón de herencia de los casos diagnosticados

No hubo asociación estadística entre la presencia de consanguinidad y conseguir un diagnóstico molecular ($p=0.07$), no observándose un mayor rendimiento del exoma en familias consanguíneas; aunque si se observó un ligero mayor rendimiento en las familias consanguíneas (54%) respecto a las no consanguíneas (34%).

Se analizó la correlación entre la presencia de consanguinidad en los padres y el patrón de herencia de los casos diagnosticados para ver si había asociación con la detección de variantes patogénicas en genes con herencia autosómica recesiva (en homocigosis o heterocigosis compuesta) en caso de consanguinidad, observándose relación estadísticamente significativa con una $p=0,008$ (Tabla 5.7).

Tabla 5.7: Relación entre consanguinidad y patrón de herencia de los casos diagnosticados.

Consanguinidad	Casos diagnosticados con herencia AR / casos diagnosticados	Valor p
No	17%	0.008
Si	54%	

5.4.1.5 Antecedentes familiares de DI y rendimiento diagnóstico del exoma / relación con grado de severidad de la DI

En este estudio, la existencia de antecedentes familiares (AF) positivos de DI no se relacionó con un mayor rendimiento en el exoma. Tampoco se observó un mayor número de casos con AF positivos en el grupo de DI leve como está descrito en la literatura.

5.4.2. Datos clínicos y rendimiento del exoma

Se realizó un estudio analítico de las variables clínicas recogidas (grado de DI, clasificación según presencia o ausencia de anomalías, variables prenatales,

perinatales, hitos del desarrollo psicomotor, comorbilidades, estudios solicitados), con el rendimiento del exoma clínico para intentar identificar qué variables podían asociarse a un resultado diagnóstico molecular en el exoma clínico (Tabla 5.8).

5.4.2.1 Rendimiento diagnóstico del exoma según grado de DI

Se observó un discreto mayor rendimiento del exoma en los casos de DI moderada y grave respecto a la leve, pero sin hallarse diferencias estadísticamente significativas.

5.4.2.2 Rendimiento diagnóstico del exoma y solicitud de estudios previo a exoma según clasificación de DI en sindrómica o aislada

Se observó una mayor proporción de diagnósticos en los casos de DI sindrómica (11% más de diagnósticos en los casos sindrómicos respecto a los no sindrómicos), aunque sin hallarse tampoco significación estadística según esta clasificación.

Dentro de esta clasificación, se valoró también el número de estudios moleculares solicitados previo a exoma en los dos grupos, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Se solicitaron una media de 1.2 estudios por paciente en el grupo de pacientes con DI aislada y una media de 1.7 estudios por paciente en pacientes con DI sindrómica.

5.4.2.3 Rendimiento diagnóstico del exoma según presencia y número de malformaciones asociadas

Se valoró la relación entre la presencia y número de malformaciones congénitas (cardiopatía, malformación cerebral, renal, ocular, del área ORL o de miembros) con un diagnóstico molecular en el exoma. Del mismo modo que en el caso anterior, no se hallaron diferencias significativas en cuanto a la existencia de malformaciones congénitas con un mayor rendimiento diagnóstico del exoma clínico, aunque también se observó una ligera mayor proporción de casos diagnosticados en el grupo con anomalías congénitas. El número de anomalías congénitas no se relacionó con mayor rendimiento del exoma.

Tabla 5.8: Variables clínicas y rendimiento del exoma I.

Variables clínicas (I)	Rendimiento del exoma	Valor p
<i>Grado de DI</i>		
Leve	30%	0.4
Moderada	42%	
Grave	39%	
<i>DI Aislada o Sindrómica</i>		
Aislada	28%	0.2
Sindrómica	39%	
<i>Malformaciones</i>		
No	32.7%	0.14
Si	43.7%	
<i>Malformaciones: número</i>		
1	40.4%	0.7
2	50%	
3	40%	
<i>Malformaciones: tipo</i>		
Cardiológicas	40%	0.8
SNC	37.5%	0.8
Renales	59%	0.06
Oftalmológicas	40%	0.8
ORL	33%	0.7
Esqueléticas	47.5%	0.13

5.4.2.4 Rendimiento diagnóstico del exoma clínico según anomalías clínicas y comorbilidades

Se valoró la relación entre anomalías clínicas asociadas como alteraciones de la somatometría, rasgos dismórficos, anomalías sensoriales, así como comorbilidades (epilepsia, trastorno de conducta y TEA) habituales en pacientes

con DI con el rendimiento diagnóstico del exoma clínico. Ninguna de las variables se asoció estadísticamente a un mayor rendimiento del exoma, pero la presencia de rasgos dismórficos fue la variable que más se acercó a la significación estadística con una $p=0.05$. Al contrario, la presencia de bajo peso y/ o microsomía se presentó en mayor proporción en los casos sin diagnóstico, aunque sin alcanzar significación estadística (Tabla 5.9)

Tabla 5.9: Variables clínicas y rendimiento del exoma II.

Variables clínicas (II)	Rendimiento del exoma	Valor p
<i>Anomalías clínicas</i>		
Rasgos dismórficos	42%	0.05
Alteración del PC		0.5
Microcefalia	38.5%	
Macrocefalia	43.2%	
Alteración del peso		0.07
Bajo peso	17%	
Sobrepeso	20%	
Alteración de la talla		0.4
Talla baja	14%	
Talla alta	28.7%	
Alteraciones sensoriales		
Visuales	42.6%	0.6
Auditivas	48.3%	0.2
<i>Comorbilidades</i>		
Epilepsia	40%	0.6
TEA	33.3%	0.5
T. Conducta	30%	0.2

5.4.2.5 Rendimiento diagnóstico del exoma según antecedentes personales

Se valoró la relación entre las variables recogidas referentes a antecedentes personales del paciente (tipo de gestación, datos prenatales, momento de parto)

con el rendimiento diagnóstico del exoma clínico. Ninguna de las variables se asoció estadísticamente a un mayor rendimiento del exoma (Tabla 5.10).

Tabla 5.10: Antecedentes personales y rendimiento del exoma.

Antecedentes personales	Rendimiento del exoma	Valor p
Gestación		0.6
Espontánea	37.8%	
TRA	20%	
Anomalías prenatales		0.29
No	35%	
Si	47%	
Tipo de parto		1
A término	37%	
Pretérmino	38%	

5.4.3 Análisis de tiempo hasta diagnóstico y rendimiento diagnóstico según el momento de evaluación (casos nuevos / reevaluados)

Se realizó un análisis entre las variables de tiempo (edad de primera valoración en consulta, número de visitas y tiempo desde primera visita hasta solicitud de exoma clínico, edad de solicitud del exoma clínico, tiempo hasta diagnóstico, edad al diagnóstico, número de estudios moleculares solicitados previo al exoma) y la clasificación de los pacientes en casos nuevos/reevaluados para valorar el impacto de la incorporación de la NGS en el diagnóstico del paciente con DI en cuanto a la obtención de un diagnóstico de forma más precoz (Figura 5.8).

Se observó un tiempo hasta el diagnóstico significativamente menor en pacientes nuevos frente a pacientes reevaluados (media de 3.4 años versus 8.6 años respectivamente), así como en tiempo y número de visitas previo a la solicitud del exoma. con una $p < 0.001$.

En cambio, no hubo diferencias en cuanto a la edad de primera valoración en ambos grupos (media de 4.6 años en casos nuevos y de 5.5 años en los reevaluados). No se detectaron diferencias significativas cuando se valoró la media de estudios moleculares dirigidos solicitados previo al exoma clínico, siendo de 1.5 estudios/paciente en el grupo de pacientes nuevos y de 2 estudios/paciente en el grupo de los reevaluados. A destacar, que tampoco hubo diferencias significativas respecto a la edad de diagnóstico, siendo de media 9.7 años en el grupo de pacientes nuevos y de 12.3 en el caso de los reevaluados.

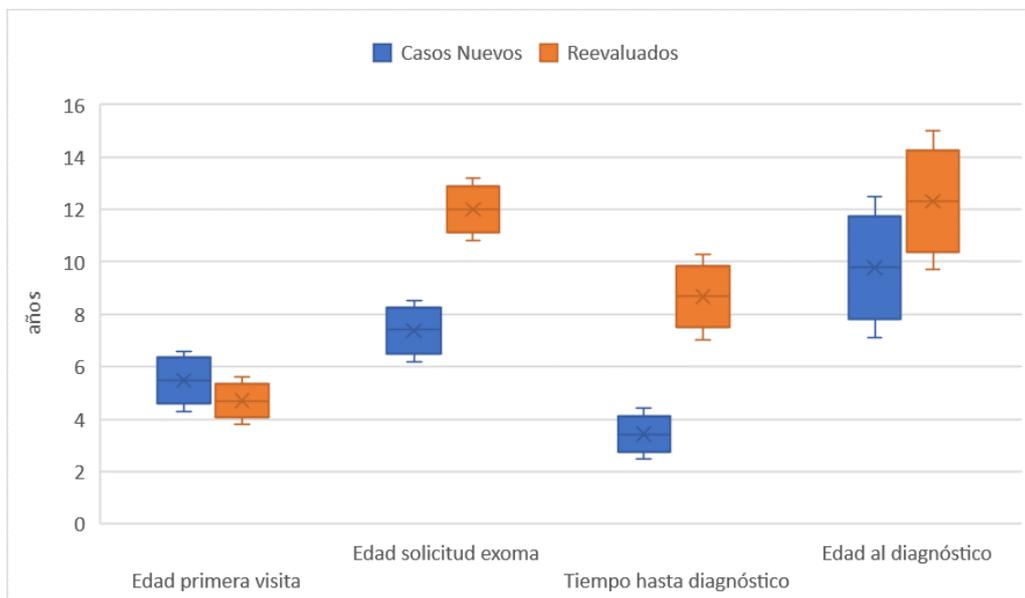


Figura 5.8: Análisis de variables de tiempo en pacientes nuevos / reevaluados.

Se comparó el rendimiento diagnóstico en pacientes nuevos y en pacientes reevaluados, siendo de un 38% y 34.6% respectivamente, por lo que, en caso de haber utilizado el exoma clínico desde años anteriores, el rendimiento diagnóstico hubiera sido similar, eliminando así un posible sesgo de selección que podría aumentar falsamente el rendimiento final del estudio.

5.5 ESTUDIO DE COSTES

Se realizó un estudio económico para valorar la eficiencia de la utilización del exoma clínico en el proceso diagnóstico del paciente con DI.

Se hizo un cálculo aproximado de los costes procedentes de estudios realizados previo al exoma. Se clasificaron los estudios diagnósticos en dos grupos, el primer grupo fueron estudios previos necesarios o no sustituibles por el exoma. En este grupo se incluyeron el estudio de array-CGH y el estudio molecular de X frágil, puesto que era criterio de inclusión tener realizados dichos estudios con resultado normal para poder ser candidato a estudio de exoma. En este grupo se incluyeron también los estudios de metilación, puesto que el exoma no iba a ser capaz de detectar alteraciones de *imprinting*. En el segundo grupo se consideraron otros estudios solicitados durante el proceso diagnóstico que pudieran ser evitables con la utilización del exoma clínico como herramienta diagnóstica precoz. En este grupo se incluyeron estudios metabólicos, y estudios moleculares dirigidos, puesto que, al tratarse de enfermedades de causa monogénica, en ambos casos, el estudio de exoma clínico iba a ser capaz de detectarlos. Todos los pacientes tenían realizado el screening metabólico neonatal, con el despistaje precoz de enfermedades metabólicas con tratamiento urgente.

El objetivo de este análisis fue identificar qué estudios podrían haberse evitado, o bien que estudios podrían considerarse innecesarios o redundantes en caso de utilizar el exoma clínico de forma más precoz en el proceso diagnóstico de un paciente con DI y el impacto económico de ello.

5.5.1 Costes previos a la realización del exoma clínico

Se gastaron una media de 2.702 ± 1.385 euros por paciente en estudios solicitados previo a la realización del exoma. La distribución de los costes según el tipo de estudio fue la reflejada en la Figura 5.9.

En el grupo de estudios cromosómicos se contabilizaron los gastos de array-CGH así como otros estudios cromosómicos realizados previamente en algunos pacientes como cariotipo o FISH. Al ser el array-CGH y el estudio de X frágil ambos criterios de inclusión, el coste del estudio molecular de X frágil se incluyó en los cromosómicos para minimizar los subapartados.

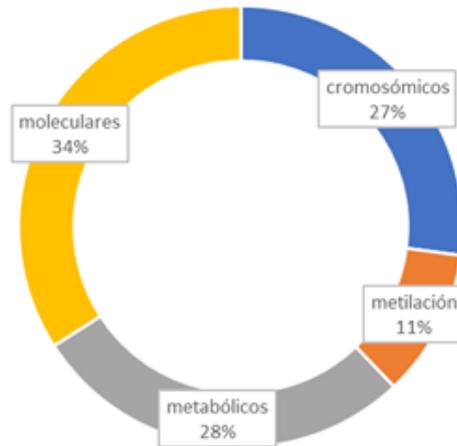


Figura 5.9: Distribución de los costes de los estudios realizados previo al exoma clínico.

5.5.2 Costes del exoma clínico

El coste del exoma clínico fue de 1.100 ± 300 euros. Se consideró incluir dentro del gasto de exoma también el gasto de segregación de variantes cuando fue necesario, ya que cuando se detectó una variante patogénica, probablemente patogénica o VOUS, se realizó estudio de segregación para completar asesoramiento familiar o bien completar estudio de patogenicidad según el caso. El coste del estudio de segregación de variantes fue de 300 euros por trio.

Se realizó estudio de segregación en padres en el 70.2% de los pacientes, y en un 4.3% adicional, no se pudo realizar por no contar con muestras parentales. Se precisó realizar estudios de segregación en otros familiares en el 13.8% de los casos.

5.5.3 Costes tras exoma clínico

Tras la valoración de los resultados del exoma clínico y el análisis de segregación de las variantes detectadas, en el 5.3% de los pacientes se solicitó algún otro estudio genético posterior. Los estudios genéticos que se solicitaron tras el exoma fueron o bien para completar análisis de patogenicidad, como por ejemplo estudio de inactivación del X en mujeres portadoras de una variante en

un gen ligado a X, o en caso de no haberse identificado una etiología causal en el exoma, como por ejemplo estudios de metilación no solicitados anteriormente. Estos estudios supusieron un gasto promedio de 266 euros/paciente.

5.5.4 Análisis económico

Tras el estudio de costes, puede observarse la distribución del coste de los estudios diagnósticos en pacientes con DI según la clasificación explicada anteriormente, en la Figura 5.10.

La media del coste total del estudio del paciente con DI en esta población (estudios previos a exoma y de exoma) fue de unos 4.000 euros. Se determinó que los estudios metabólicos y moleculares dirigidos que representaron el 62% de los costes, podrían haberse evitado con la utilización del exoma de forma precoz. Los costes inevitables corresponden a los estudios incluidos en el primer grupo de estudios diagnósticos clasificados como necesarios o no sustituibles por el exoma.

En caso de haber utilizado el exoma clínico tras el estudio de array-CGH y X frágil, se hubiera producido un ahorro medio de 2.082 ± 1.191 euros por paciente.

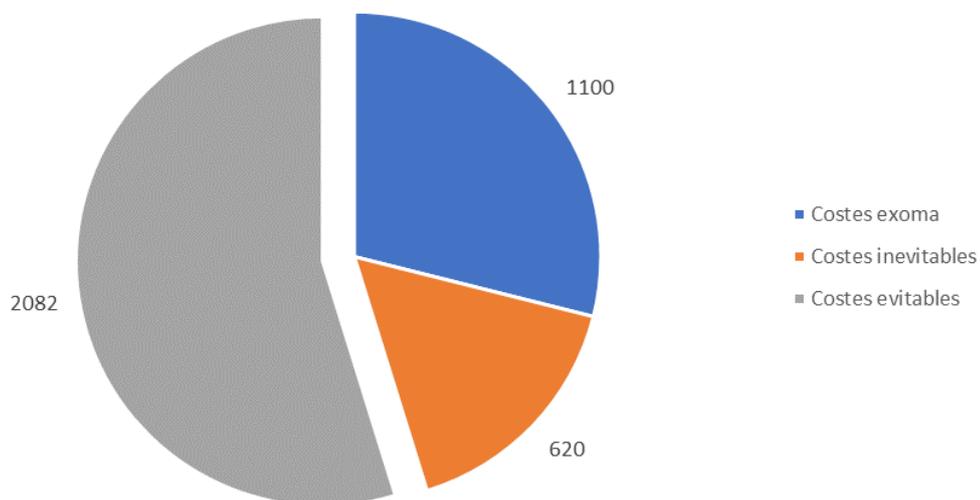


Figura 5.10: Distribución del coste de los estudios diagnósticos en pacientes con discapacidad intelectual.

Para finalizar, se realizó un análisis de la media de costes de estudios solicitados previo al exoma según las distintas clasificaciones de los pacientes (Figura 5.11)

5.5.4.1 Análisis de costes según pacientes nuevos/revaluados

No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la media de costes de estudios previo a exoma atendiendo a esta clasificación. El coste medio en pacientes reevaluados fue de 3.082 ± 1.125 euros *versus* 2.548 ± 1.452 euros en los pacientes nuevos. A destacar que, en el grupo de pacientes nuevos, fue donde el rango de coste máximo fue más elevado.

5.5.4.2 Análisis de costes según grado de DI

Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas según esta clasificación, pero se observó una tendencia al alza según el grado de DI. El coste medio en el caso de la DI leve fue de 2.339 euros, en la DI moderada 2.634 euros, y en la DI grave 3.367 euros. También se observó la misma tendencia al alza según mayor grado de DI en el rango máximo de costes (4.957 euros en DI leve, 5.855 euros en DI moderada y 6.670 euros en la DI grave).

5.5.4.3 Análisis de costes según pacientes con DI aislada o sindrómica

El coste medio de los pacientes con DI aislada fue de 2.399 euros y de 2.762 euros en el caso de la DI sindrómica, prácticamente superponibles en ambos casos.

5.5.4.4 Análisis de costes según diagnóstico final

Se valoró si hubo diferencias en cuanto a la media de costes de estudios previo a exoma según el diagnóstico final (casos confirmados *versus* sin diagnóstico), sin hallarse diferencias estadísticamente significativas, con un coste prácticamente superponible en ambos casos. Coste medio de 2.758 euros en los casos sin diagnóstico y de 2.783 euros en los casos con diagnóstico molecular confirmado.

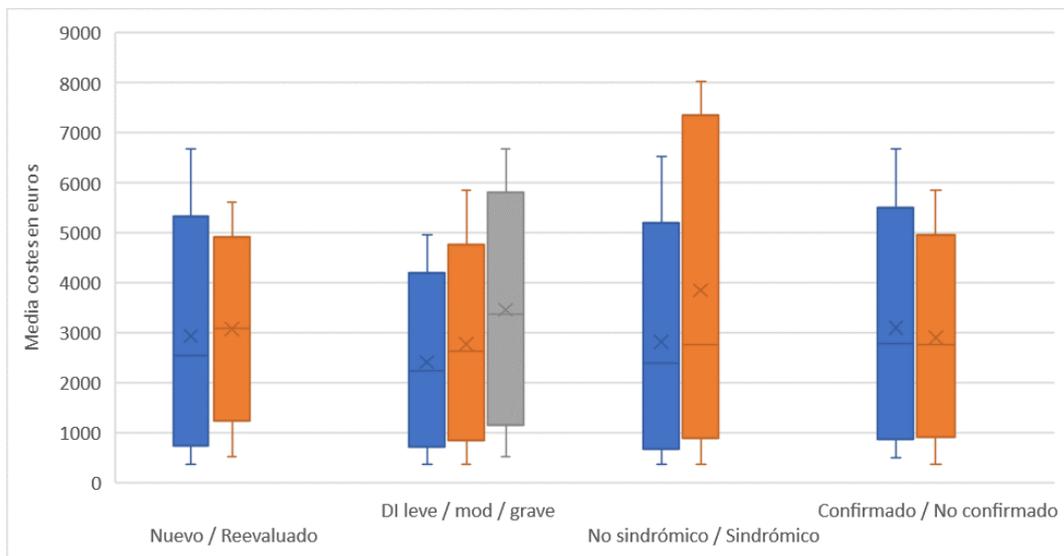


Figura 5.11: Media de costes de estudios genéticos solicitados previo al exoma clínico según las distintas clasificaciones de los pacientes con DI.

VI – DISCUSIÓN

VI-DISCUSIÓN

La DI afecta al 1-3% de la población, con un gran impacto individual, familiar, social y económico. Puede originarse por causas infecciosas, ambientales, metabólicas, nutricionales, tóxicas, traumáticas o genéticas (4, 10, 20, 45, 46, 52, 58, 59). Se estima que las causas genéticas podrían explicar alrededor de un 30-50 % de los casos (12, 30, 53, 60) por lo que es evidente la importancia en la mejora de las técnicas de diagnóstico molecular y su aplicabilidad a la práctica clínica.

La etiología molecular de la DI es muy heterogénea, con más de 1000 genes asociados a DI. Además, estas entidades son de baja prevalencia y con una amplia variabilidad fenotípica, hechos que reflejan la dificultad en el reconocimiento clínico de todas las entidades y en el abordaje del estudio molecular de la DI.

En los últimos años el campo de la genética ha vivido una revolución tecnológica con el desarrollo de nuevas tecnologías genómicas para el diagnóstico genético de pacientes con discapacidad intelectual (30, 111, 112). La NGS ha revolucionado la estrategia diagnóstica molecular del paciente con DI al permitir analizar todo el genoma, el exoma o bien un grupo de genes en un mismo estudio analítico destacando como técnicas de gran potencial diagnóstico y muy coste-efectivas (56, 111, 124, 125). La secuenciación del exoma clínico se sugiere como una herramienta de primera línea en el diagnóstico genético de la DI. Aun así, a pesar de los grandes avances en la tecnología del estudio del genoma al menos la mitad de los pacientes con discapacidad intelectual no poseen un diagnóstico etiológico (12, 14, 46).

El objetivo principal de esta investigación fue determinar el rendimiento diagnóstico de la secuenciación del exoma clínico en los pacientes con DI atendidos en la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del HCUVA de Murcia.

Partiendo de los datos de prevalencia de la DI, se realizó un cálculo de tamaño muestral suficiente para que los resultados obtenidos fueran extrapolables a la población general.

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS

6.1.1 Datos demográficos:

Se observó un predominio de sexo masculino en la población estudiada y en el grupo de pacientes con diagnóstico molecular. Esta mayor prevalencia de varones en la DI está descrita ampliamente en la literatura, atribuido en su mayoría a genes responsables de la DI ligada a X (12, 14, 45, 69, 70, 139, 148). Muchos autores describen el enriquecimiento del cromosoma X con genes causantes de DI, con aproximadamente un 10% de sus genes implicados en DI, frente a aproximadamente el 4% calculado a nivel genómico general. Se conocen unos 800 genes presentes en el cromosoma X, siendo más de 100 asociados a DI (12, 25, 30). Algunos autores hablan de hasta un 40% de exceso en varones en estudios de prevalencia de DI (14, 21). Todo ello justifica porqué el estudio de la DI en varones y el estudio de genes responsables de DI ligados a X han sido motivo de muchos estudios y publicaciones (25, 26, 70, 190). En la mayoría de los trabajos revisados donde se analiza el estudio de exoma dirigido en pacientes con DI, se observa también esta mayor proporción de varones (21, 52, 66, 74, 165, 191).

En el presente estudio, de los varones con DI en los que se obtuvo una causa molecular, el 24% fueron debidos a variantes patogénicas en genes ligados a X. Si referimos el dato a los varones totales del estudio, estos casos representaron el 9.1%, similar al descrito en la literatura, donde refieren que entre un 10-12% de la DI en varones es debida a variantes patogénicas en genes ligados a X (45, 70, 190).

La mayoría de estudios describen las variantes patogénicas *de novo* en genes de herencia AD como la causa principal de DI (23, 188, 192) y otros asocian la mayor prevalencia de variantes patogénicas *de novo* en hijos de padres añosos (185-187, 189, 193). Por este motivo se valoró en el estudio si hubo relación entre la edad de los padres al nacimiento del hijo y una mayor frecuencia de hijos con DI debido a variantes patogénicas *de novo* en genes con herencia AD, sin encontrarse dicha asociación; lo que concuerda con otras publicaciones que no relacionan las variantes patogénicas *de novo* con la edad parental (193, 194). En el presente estudio si se observó, aunque sin alcanzar significación estadística, que en caso de edad de la madre mayor de 40 años, todos los casos detectados fueron debidos a variantes patogénicas *de novo* en genes AD. Estos resultados pueden

deberse probablemente a que son pocos el número de casos diagnosticados en ese rango de edad de la madre, junto a que las variantes patogénicas en genes *AD de novo* son también las más frecuentes en este estudio.

Respecto a la consanguinidad, se ha detectado un 15% de consanguinidad en la población, a expensas de la población marroquí y gitana atendida en nuestra Sección, cifra algo elevada comparada con otros estudios. En la mayoría de publicaciones se describe consanguinidad en un porcentaje relativamente bajo de la población a estudio, dado que la mayoría de publicaciones sobre utilización de NGS en DI se realizan en países occidentales, donde la consanguinidad no es tan frecuente (13). Algunas de las publicaciones revisadas en las que se utiliza NGS en el estudio de pacientes con DI describen cifras de consanguinidad entre el 3-8% (111, 159, 165). Si comparamos los porcentajes de consanguinidad en las distintas poblaciones, con la proporción de genes causales detectados con herencia AR, no se observa ninguna relación. En el caso de Martínez y colaboradores (111) si podría sugerirse una menor proporción de casos con diagnóstico con herencia AR (7%) que pudiera atribuirse a un porcentaje bajo de consanguinidad en su población (3%); pero en el caso de Xiao y colaboradores (165) así como Stavropoulos y colaboradores (159), no se observa esta relación. Xiao describe un 6% de consanguinidad en su población y un porcentaje de genes causales con herencia AR muy similar al de este estudio (21%) e incluso Stavropoulos describe un porcentaje mayor de genes causales con herencia AR (37%) partiendo de una población con una consanguinidad menor a la presente (8%). Estos datos apoyan los resultados del presente estudio donde no se ha detectado un mayor rendimiento del exoma en pacientes provenientes de familias consanguíneas.

Si se observó, con asociación estadística, que en caso de haber obtenido un diagnóstico confirmado en el exoma y provenir de una familia consanguínea, es entonces más probable la identificación de las variantes causales en genes con herencia autosómica recesiva. Estos resultados se observan en otras publicaciones donde distintos autores estudian el rendimiento del exoma en pacientes con DI en poblaciones consanguíneas, donde si bien el rendimiento global es similar al descrito en la literatura, el porcentaje de genes causales de herencia AR es más elevado. Reuter y colaboradores (72) analizan el rendimiento del estudio de exoma (WES) en 152 pacientes provenientes de familias consanguíneas, con un rendimiento diagnóstico global del 36.8%, similar al descrito en otros estudios y

en el presente. De los diagnósticos, el 90% fueron en genes con herencia AR. A la inversa, Rauch y colaboradores (195) estudian el rendimiento del WES en una población de pacientes con DI grave no sindrómica en la que no había ningún caso de consanguinidad, con una representación muy baja de genes con herencia AR en sus resultados. Los estudios centrados en poblaciones consanguíneas han ayudado a la identificación de nuevos genes con herencia AR asociados a DI (72, 112); hay múltiples publicaciones que insisten en el estudio de genes de DI en familias consanguíneas, puesto que sugieren que hay muchos genes con herencia AR causantes de DI no conocidos, estimándose por el momento más de 300 (30, 45, 71, 72, 112).

Es necesario comentar en este apartado los pacientes incluidos con antecedente de prematuridad. La prematuridad es un factor independiente que puede ser causa de DI, puesto que de por sí es un factor de riesgo de alteración del neurodesarrollo (12, 14, 46, 58). Los pacientes incluidos en este estudio fueron pacientes en los que se realizó previamente un análisis y estudio exhaustivos de todas las posibles causas no genéticas de su DI, seleccionando por tanto aquellos que tras el estudio de dichos factores no tenían una causa justificada de su DI. Los pacientes prematuros, fueron incluidos porque o bien la prematuridad no se consideró suficiente para explicar la DI, al tratarse de una prematuridad por encima de las 32 semanas en el 78% de los prematuros incluidos, sin haber tenido ningún proceso asistencial significativo asociado a dicha prematuridad; o bien en el caso en que la prematuridad si fue significativa (5 pacientes fueron menores de 32 semanas), estos pacientes presentaron otros factores que sugirieron una posible etiología molecular de su DI como fueron presencia de rasgos particulares o asociación de malformaciones por lo que fueron incluidos en el estudio. Es evidente y así está descrito en la literatura que las distintas causas de DI no son excluyentes, y pueden coexistir en un mismo paciente (53, 60, 66). De los 5 pacientes con prematuridad <32 semanas, dos tuvieron finalmente un diagnóstico molecular (MECP2 y HNRNPK ambas *de novo*). De los otros tres, uno presentó un cuadro de anomalías congénitas múltiples (ventrículo derecho de doble salida y comunicación interventricular, poliesplenia y atrofia renal), otro estaba afecto de encefalopatía epiléptica y el tercero presentó rasgos dismórficos y un cuadro de regresión neurológica, no propia de los pacientes prematuros.

Se comentó en el estudio analítico como la presencia de AF de primer grado de DI se ha asociado en algunos artículos a una mayor probabilidad de detectar una causa genética para la DI (72). Otros artículos hacen la asociación inversa, argumentando que en la mayoría de casos en los que hay AF positivos, se trata de casos de DI leve, donde se estima que la etiología multifactorial o exógena es más prevalente, o bien otros donde encuentran un menor rendimiento diagnóstico del exoma, dando como posible explicación la dificultad de la interpretación de VOUS en casos familiares de DI leve (53, 73). En nuestra población, no hubo asociación entre la presencia de AF de DI con un mayor rendimiento del exoma. Tampoco se observó que hubiera más frecuencia de AF positivos en los pacientes con DI leve, no apoyando dichos datos.

6.1.2 Características clínicas de los pacientes:

Se clasificó a los pacientes del estudio en distintos subgrupos para poder comparar el rendimiento diagnóstico del exoma clínico partiendo de lo publicado en la literatura, clasificándolos según grado de DI y asociación o no de anomalías. De cara al estudio de tiempos y costes, se clasificó de una tercera forma a los pacientes (reevaluados o casos nuevos), para poder valorar el impacto de la incorporación de la NGS en el proceso diagnóstico del paciente con DI en la Sección.

Respecto a la clasificación de la DI según gravedad, nuestra población no sigue la distribución habitual en la población general según la AADI donde se describe un 85% DI leve, 10% moderada y 5% grave y profunda (2, 3). Ésto es debido a que los pacientes remitidos a la Sección de Genética Médica del HCUVA de Murcia para estudio por DI suelen ser valorados previamente por otros especialistas, habitualmente neuropediatras que realizan una selección previa, no siendo remitidos habitualmente pacientes con DI leve en los que no se detectan otras anomalías como alteración en la somatometría, anomalías congénitas o rasgos particulares; por lo que la prevalencia de DI leve en nuestra población es menor a la esperada. Este hecho también explica porqué la mayoría de la población de estudio fue clasificada como DI sindrómica.

A destacar que sólo un 28.7% de los pacientes tenían realizado un análisis estandarizado para el diagnóstico de la DI (estudio retrospectivo). A priori pudo

parecer un porcentaje bajo para el esperado, partiendo de la importancia de la clasificación de la DI para optimizar la organización de las ayudas que precisan estos pacientes a nivel educativo, social y económico como ya se explicó con anterioridad (2, 13). Si bien, en la literatura también se describe esta situación y se justifica por diversos motivos (14, 52-54, 58). Muchos pacientes con DI no tienen realizado o no es posible realizar un análisis estandarizado para cuantificar el CI debido a las comorbilidades que asocian con mucha frecuencia como son trastornos conductuales o TEA. En los casos de DI grave o profunda no es posible que los pacientes realicen ninguna prueba de este tipo dada su afectación y por tanto suelen clasificarse según criterios clínicos. La mayoría de los pacientes de este estudio que tenían realizado un test estandarizado eran pacientes con DI leve-moderada, donde son más útiles, ya que son menos sensibles para valorar los extremos (DI límite o grave/profunda) (53, 196).

Respecto a la clasificación de los pacientes en DI aislada o sindrómica ya se justificó anteriormente porque en este estudio hay un porcentaje mayor de pacientes con DI sindrómica. Las anomalías que se asociaron con mayor frecuencia en dicho grupo de pacientes fueron similares a las descritas en otros estudios, siendo las anomalías de crecimiento del PC, sobre todo microcefalia, y las malformaciones cardíacas las más frecuentes (27, 52, 66, 165, 191). La talla baja, aunque también presente en nuestra población en un porcentaje a considerar, ha sido menos prevalente que en otras publicaciones.

En este estudio se ha observado que la presencia de rasgos dismórficos detectados por el clínico evaluador del caso ha sido la variable que más se ha asociado a un diagnóstico molecular, casi rozando la significación estadística. Este dato es relevante ya que indica que la evaluación clínica del paciente sigue siendo un buen método de cribado para el diagnóstico del paciente con DI (82, 91). Otros artículos también asocian la presencia de rasgos dismórficos con mayor rendimiento de la NGS, aunque el diagnóstico final detectado por el exoma no fuera el sugerido por el clínico (66). Argumentan que el hecho de presentar unos rasgos dismórficos, sea el clínico capaz o no de incluirlos en un fenotipo específico, ya es un dato clínico con una fuerte asociación a una causa genética en el paciente (66, 165), lo que coincide con nuestros resultados.

Se detectaron anomalías en la RM cerebral en un 41.5% de los pacientes, cifras similares a la literatura, siendo los hallazgos en su mayoría inespecíficos y

no relevantes para el diagnóstico del paciente, también descrito así en distintos artículos (52, 73, 195). Por ello, se sugiere el no realizar esta prueba de imagen de forma rutinaria en pacientes con DI, si no en casos seleccionados (focalidad neurológica, micro o macrocefalia), ya que los hallazgos no suelen ayudar a orientar el diagnóstico y se precisa en muchas ocasiones sedar a los pacientes debido a la edad (12, 14, 102, 107).

Respecto a las comorbilidades habituales en pacientes con DI, como son la epilepsia, el autismo y los trastornos de conducta, los porcentajes detectados han sido similares a lo observado en la literatura. Se describen rangos amplios según los criterios de selección de los pacientes con DI en cada estudio, con presencia de epilepsia en un 26-50%, autismo 10-32% y trastorno de conducta en 5-15% de los pacientes con DI (56, 72, 195).

6.1.3 Estudios solicitados previo a la realización exoma clínico

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el rendimiento diagnóstico del exoma clínico en los pacientes con DI de etiología no conocida, en una población de pacientes candidatos a una causa monogénica para su DI. Todos los pacientes tuvieron una valoración clínica y analítica previa que descartó posibles causas adquiridas y ambientales que pudieran justificar su DI, realizando así una selección de aquella población con una posible causa genética.

Dentro de las posibles causas genéticas de DI, en todos los pacientes de este estudio se descartaron desequilibrios cromosómicos mediante array-CGH y el síndrome de X frágil como criterio de inclusión, siendo este criterio utilizado de forma generalizada en los estudios donde se evalúa el rendimiento de la NGS en pacientes con DI (27, 30, 52, 56, 66, 72, 74, 75, 111, 157, 159, 165, 191). La necesidad o coherencia de la realización de estos estudios previo a la NGS es evidente, puesto que son pruebas de primera línea para detectar causas genéticas no monogénicas frecuentes en pacientes con DI, que pueden detectarse mediante los estudios mencionados, siendo menos costosos que la NGS. Su utilización previa también está justificada por las limitaciones iniciales de la NGS para la detección de CNVs; las cuales se han ido superando en los últimos años. Causas cromosómicas en el caso del array-CGH, presentes en el 15% de pacientes con DI, y la causa más frecuente debida a expansión de tripletes (síndrome de X frágil)

presente en el 2-3% varones con DI y 1-2% de mujeres con DI (127). En el presente estudio, los pacientes tenían también realizados otros estudios cromosómicos como cariotipo y FISH, puesto que se habían valorado por primera vez en consulta previo a la utilización del array-CGH como herramienta de primera línea en la Sección a partir de 2010, o bien habían sido remitidos a la Sección con dichas pruebas ya realizadas. Todos los pacientes valorados por primera vez en la sección a partir del año 2010 ya no tenían realizado cariotipo ni estudios de FISH. Estos datos se recogieron también para el análisis económico realizado en este estudio.

Muchos de los pacientes incluidos en el estudio tenían realizados otros estudios dirigidos a la detección de enfermedades genéticas responsables de DI previo a la realización del exoma clínico, como son estudios metabólicos, estudios de metilación y estudios moleculares dirigidos. La realización de estos estudios no se consideró como criterio de inclusión, aunque si fueron excluidos todos aquellos pacientes que tras estos estudios se detectó la causa de su DI y por tanto ya no fueron candidatos a exoma. Esto refleja que la población de estudio se trata de una población muy seleccionada con un despistaje previo amplio de posibles causas de DI, tanto no genéticas como genéticas. Se consideró importante el recoger estos datos para evaluar la estrategia diagnóstica en la Sección y para el estudio de impacto de la incorporación de la NGS en el estudio del paciente con DI.

Está ampliamente descrito y debatido en la literatura, la necesidad de realizar estudios metabólicos como prueba de primera línea en pacientes con DI, junto con el array-CGH, puesto que este tipo de enfermedades son potencialmente tratables y se benefician de un diagnóstico precoz (10, 12, 14, 45, 46, 58, 108, 109). A pesar de ser enfermedades poco frecuentes de forma independiente, de forma global pueden representar un 1-5% de los pacientes con DI (12, 108). Algunas publicaciones recientes reflexionan, que en centros donde existe la posibilidad de acceder a la NGS, podría considerarse su aplicación inicial para el diagnóstico de estas patologías asegurando una adecuada cobertura de los genes responsables de estas enfermedades, obviando así los múltiples y costosos estudios metabólicos previos (12, 44, 197). Muchos artículos también evalúan la implicación de la NGS en el estudio de los ECM y su utilidad para la detección de casos clínica o analíticamente atípicos y en la detección de nuevos genes causales

(110, 198, 199). Como aportación en cuanto a experiencia personal en la Sección, se detectó un caso de síndrome de Smith-Lemli-Opitz mediante exoma clínico con un fenotipo atípico, con estudio de colesterol normal y esteroides discretamente elevados, y una paciente con trastorno congénito de glicosilación tipo 1a, con estudio de sialotransferrinas previo normal (este último caso no incluido en el estudio, realizado diagnóstico en año 2019). Tras este análisis y revisión de la literatura, concluimos que tras el despistaje habitual de las patologías metabólicas tratables más frecuentes detectadas en el screening neonatal de metabolopatías a fecha de hoy, la estrategia de estudio del resto podría abordarse mediante NGS, por lo que se han incluido como estudios sustituibles por el exoma clínico.

Respecto a los estudios de metilación, van a detectar anomalías epigenéticas que, al no deberse a un cambio en el ADN, no van a ser identificadas mediante NGS (159). Las alteraciones epigenéticas se han descrito como causantes de DI (67, 68). Existen entidades clásicas debidas a alteraciones en la metilación y expresión génica (síndrome de Angelman, Prader-Willi) y en los últimos años se han descrito nuevas alteraciones epigenéticas como causa de DI (síndrome de Temple o Kagami-Ogata) (200). En nuestra población se solicitaron estudios de metilación en el 41% de los pacientes, previo al estudio de exoma clínico. En la mayoría de publicaciones donde se analiza el rendimiento de la NGS en sus distintas modalidades respecto a pacientes con DI, no se hace referencia a los estudios de metilación, y en los que se hace referencia, se refieren habitualmente al despistaje de síndrome de Prader-Willi y Angelman (74). En una publicación en la que se realizó WGS en una población de pacientes con DI, dos pacientes, uno con síndrome de Silver-Russell y el otro con DUP14 no fueron detectados por la NGS, precisándose la solicitud dirigida del estudio para su diagnóstico (159). Se han incluido en la recogida de estudios solicitados previo a exoma en este estudio por el mismo motivo que los estudios metabólicos, para valorar su impacto en el estudio del paciente con DI de etiología desconocida, aunque no se han considerado un estudio sustituible por el exoma clínico.

La mayoría de los pacientes tenían solicitado algún estudio molecular en su proceso diagnóstico previo a la solicitud del exoma clínico con una media de 2.3 estudios moleculares por paciente, siendo algo más elevado en pacientes reevaluados respecto a pacientes nuevos, pero sin alcanzar significación estadística. Esto refleja una estrategia diagnóstica contenida o sensata por parte

de los facultativos en el grupo de pacientes reevaluados, con decisión en un momento dado de no solicitar más estudios y recomendación de nueva valoración en unos años para aplicación de nuevas tecnologías, conociendo ya la futura aplicabilidad del exoma en la práctica clínica. Los datos respecto a la solicitud de estudios moleculares coinciden con los descritos en la literatura, donde en estudios similares describen la realización de 2-3 estudios moleculares por paciente (52, 159) previo a la NGS. Otros estudios lo definen en porcentajes, con realización de estudios moleculares en un 38-56% de los pacientes (56, 73) algo menor del descrito en este estudio. En dichos estudios, la población de estudio no era tan seleccionada, incluyendo pacientes con alteraciones en el neurodesarrollo, lo que podría explicar las diferencias. Este dato fue recogido también con el propósito de valorar el impacto económico del abordaje molecular del paciente con DI y el impacto de la incorporación de la NGS en estos pacientes.

6.1.4 Tiempo hasta diagnóstico

Los resultados obtenidos demuestran el impacto de la utilización del exoma clínico en cuanto a un diagnóstico más precoz en los pacientes con DI. Se observó un tiempo al diagnóstico significativamente menor en el grupo de pacientes nuevos donde ya estaba incorporada la utilización de la NGS en la práctica clínica. Del mismo modo, hubo diferencias significativas en cuanto a número de visitas previo al exoma. Esta reducción de visitas en el grupo de pacientes nuevos, donde se tuvo un acceso precoz al exoma, refleja el impacto de su utilización respecto a la llamada *odisea diagnóstica* del paciente con DI, con múltiples visitas, realización de múltiples estudios, sin conseguir alcanzar un diagnóstico etiológico (157). Así mismo, se observó en este estudio una disminución tanto en el número de visitas tras exoma como en el número de estudios solicitados tras exoma, lo que refleja el concepto de *fin de trayecto* tras la utilización de la NGS en el proceso diagnóstico del paciente con DI también descrito en la literatura (43).

No hubo diferencias en cuanto a la edad de primera valoración en ambos grupos lo que demuestra que los pacientes han sido remitidos a la Sección de Genética con un criterio similar a lo largo del tiempo. Un dato para destacar es que tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a la edad al diagnóstico en los dos grupos; dato inicialmente no esperado, al haber detectado diferencias

significativas respecto a tiempo a diagnóstico en ambos grupos. Este hecho se explica por el rango de edades en los dos grupos, con pacientes de edad más elevada en el grupo de casos nuevos (de 6 meses a 40 años, desviación estándar 9 años) respecto al grupo de reevaluados (de 5 a 24 años, desviación estándar de 5 años).

El rendimiento diagnóstico del exoma en ambos grupos (nuevos y reevaluados) fue similar, por lo que en la población estudiada, 17 pacientes reevaluados podrían haber sido diagnosticados antes si se hubiera tenido acceso a la NGS en el momento de su primera valoración, con el impacto sanitario, social, educativo y familiar que eso tiene en un paciente con DI (12, 14).

6.2 RESULTADOS DE EXOMA CLÍNICO

Tras los resultados iniciales del exoma clínico, se hallaron variantes patogénicas y probablemente patogénicas en el 27.6% de los casos, similar a los hallazgos obtenidos en publicaciones previas (125). Todas ellas se confirmaron como causales tras el estudio de segregación familiar, salvo dos casos, por falta de muestras parentales.

En este estudio, el exoma clínico se realizó sobre el ADN del caso índice y se enviaron muestras de padres u otros familiares cuando fue necesario, según los hallazgos del exoma. Se enviaron muestras de los padres en caso de detección de variantes patogénicas y probablemente patogénicas para confirmar el patrón de herencia esperado, y en caso de VOUS, para completar el estudio de patogenicidad observando la segregación de la variante en los familiares. Diversos estudios refieren un mayor rendimiento del exoma al realizar el estudio en trío, debido a que se pueden filtrar mejor las variantes detectadas partiendo del patrón de herencia conocido de dicho gen (30, 56, 73, 125, 195). En las publicaciones revisadas en las que se han realizado los estudios de WES mediante trío no muestran un rendimiento diagnóstico superior (27-30.7%) al del presente estudio (56, 73, 125). Dichos estudios son sobre una población de un número considerable de pacientes e incluyendo pacientes con DI o alteraciones en el neurodesarrollo. Existen dos publicaciones con rendimiento mayor (45-60%), donde se ha realizado el estudio de exoma mediante trío. En estos casos se trata de estudios con un número reducido de pacientes y con una población

seleccionada de DI moderada-grave, donde *a priori* el rendimiento pueda ser mayor (30, 195). Dados estos resultados, afirmamos que si bien, el abordaje más completo y adecuado para el estudio de NGS en pacientes con DI es el exoma clínico en trío, en este estudio no ha habido un menor rendimiento ya que en todos los casos en los que se ha detectado una variante candidata o una VOUS se ha completado con el estudio familiar, por lo que el resultado final en cuanto a rendimiento diagnóstico es similar a haber hecho el análisis mediante trío desde un inicio. Si se hubiera realizado el abordaje inicial en trío en este estudio, seguramente habría disminuido el número de VOUS informadas reduciéndose el número de estudios de segregación realizados (en el 70% de los casos), así como el tiempo al diagnóstico al disponer de la muestra de los padres en el proceso inicial de interpretación de las variantes. Del mismo modo, el porcentaje final de VOUS clasificadas como no patogénicas sería también menor.

6.2.1 Tipos de variantes detectadas en el exoma

La distribución según el tipo de variante en el caso de las variantes patogénicas o probablemente patogénicas en este estudio coincide con otras publicaciones donde predominan las variantes *frameshift* y *nonsense* (52-72%) respecto a las *missense* (28%) (74, 111). Otras publicaciones describen resultados distintos, siendo las variantes *missense* más frecuentes, responsables de alrededor del 50-52% de los casos, siendo el porcentaje de variantes *frameshift* y *nonsense* menor (alrededor del 20-23%)(73, 124, 191). En nuestro caso, la mayoría de las variantes deletéreas fueron *frameshift* y *nonsense*, seguramente porque los genes a los que afectaban fueron genes cuyo mecanismo patogénico es por pérdida de función, ya que estas variantes originan una proteína trunca.

La mayoría de las variantes probablemente patogénicas eran variantes no descritas en la literatura, lo que apoya la gran heterogeneidad alélica/molecular de la DI como está ampliamente descrito en la literatura (56, 125). Trujillano (125) realizó estudio de WES en 1000 pacientes donde un 77% tenían alteraciones en el neurodesarrollo, y en sus resultados, el 59.7% de las variantes patogénicas detectadas fueron nuevas, no descritas previamente en la literatura. Este dato justifica la necesidad de generar bases de datos nacionales e internacionales para compartir los datos y ayudar al conocimiento de variantes patogénicas o

probablemente patogénicas contribuyendo a su caracterización mediante el *data sharing*. Este hecho también explica la dificultad para la interpretación de muchos resultados de la NGS, puesto que la mayoría al ser variantes no descritas previamente, van a requerir de estudios de segregación, estudios funcionales u otros para confirmar su patogenicidad.

Se detectaron VOUS en casi la mitad de los pacientes. Otros autores describen un porcentaje algo menor, alrededor de un 25% de VOUS (125), posiblemente por el abordaje en trío del exoma en dichos estudios, descartándose en ese primer análisis las variantes heredadas de un progenitor sano. Aun así, otros estudios describen un 41% de VOUS a pesar de un abordaje en ese caso de WES en trío (43). Tras el análisis de las VOUS, finalmente se clasificaron como patogénicas el 17.2%, lo que contribuyó al rendimiento diagnóstico del exoma clínico en un 7.4%, lo que destaca la importancia de completar el estudio de las VOUS y de realizar un análisis y estudio minucioso de los resultados de exoma. Otros estudios describen porcentajes similares, con un 11.3% de las VOUS finalmente clasificadas como patogénicas (73).

Dentro de las VOUS, la mayoría fueron *missense* y tras el análisis y categorización final, se observó que las de tipo *frameshift* y *nonsense* se clasificaron como patogénicas en un porcentaje considerablemente mayor que en el caso de las *missense*. Estos datos nuevamente refuerzan la patogenicidad de las variantes de tipo *frameshift* y *nonsense* respecto a las de tipo *missense* (74, 75, 111).

6.2.2 Patrón de herencia y tipo de herencia de los diagnósticos confirmados

Las variantes patogénicas en genes de herencia autosómica dominante *de novo* son la causa más frecuente de DI, descrito así ampliamente en la literatura (27, 30, 52, 55, 56, 66, 73, 74, 111, 124, 150, 158, 159, 192), lo que coincide con los resultados del estudio. Por ello, la incidencia de la DI en la población general se mantiene a pesar de las estrategias sanitarias y educativas dirigidas a minimizar causas conocidas evitables de DI como son el abuso de alcohol y otros tóxicos o el manejo perinatal del recién nacido (13), e incluso tras la aplicación de opciones reproductivas en familias donde se ha identificado la causa molecular de un hijo previo con DI.

La distribución respecto al resto de patrones de herencia en pacientes con DI es similar a la descrita en la literatura (66, 73, 74, 124, 125, 159, 191). Otros artículos difieren en sus resultados en cuanto a la distribución respecto a los patrones de herencia y tipo de herencia (*de novo* o heredado) de los casos diagnosticados. Redin et. al. (52) detecta una mayor frecuencia de genes con herencia ligada a X respecto a AD, pero debemos considerar que en su población, el 90% eran pacientes varones lo que puede aumentar la proporción de casos debidos a genes ligados a X y además utiliza un panel dirigido de 217 genes asociados a DI que probablemente pudo estar enriquecido de genes ligados a X. Martínez et. al. (111) coincide en cuanto a la distribución de los patrones de herencia, pero en el caso de las enfermedades ligadas a X, describe mayor frecuencia de variantes patogénicas *de novo*, al contrario que en este estudio donde han sido más frecuentes las formas heredadas. El estudio de Yang (124) sí coincide con nuestros resultados siendo el 60% de los casos con herencia ligada a X heredadas. Reuter (72) en sus resultados presenta un predominio de genes con herencia AR (90%), pero parte de una población de DI en familias consanguíneas con DI severa y sindrómica.

6.2.3 Tipos de diagnósticos

Un hallazgo a destacar es la alta heterogeneidad genética en esta cohorte, con detección de 65 variantes causales en 59 genes distintos asociados a DI. Se ha encontrado una mutación causal en el mismo gen en más de un paciente (10%): AHDC1 (en tres pacientes), SHANK3, EFTUD2, HACE1, NDST1 y MECP2 (en dos pacientes cada uno), siendo el resto de variantes patogénicas en genes únicos. Un paciente obtuvo un diagnóstico molecular en dos genes distintos, ambos influyendo en su fenotipo de DI (SOX10 y DDX3X); estos *dobles diagnósticos* se han descrito en otras series de pacientes con DI y diagnóstico mediante WES o WGS donde llegan a sugerir hasta un 4-6% de pacientes con variantes patogénicas en más de un gen asociado a DI (56, 124, 159).

Hubo también dos casos donde no se detectó una causa molecular para la DI del paciente, pero si se detectó una causa molecular para una anomalía congénita también presente en el cuadro clínico y por tanto separada

etiológicamente de la DI. En ambos casos se detectó una causa molecular para una malformación ocular (genes PAX6 y PITX2).

La heterogeneidad genética en la DI está ampliamente descrita en la literatura con más de 1000 genes distintos asociados a DI, lo que como ya se ha explicado, dificulta el proceso diagnóstico y apoya el abordaje molecular mediante la NGS del paciente con DI. Varios artículos analizan los genes recurrentes asociados a DI en sus series, describiendo algunos genes como más prevalentes como causa de DI. Así Redin (52) detecta 4 genes repetidos en 26 pacientes (15%) diagnosticados (KDM5C, MECP2, DYRK1A y TCF4), Martínez (111) de 25 genes distintos, 3 son repetidos en dos pacientes cada uno (12%) (KMT2D, KMT2A y MED13L). Geldon (66) detecta 2 genes repetidos de 36 diagnósticos (5%) (SYNGAP1 y MED13L). Grozeva (74) 5 genes repetidos de 107 en los que detecta una causa molecular (4,7%) (SETD5, ATRX, CUL4B, ARID1B y MECP2), Yang (124) 7 de 62 causales (11%) (ANKRD11, ARID1B, ATL1, KRAS, SACS, ATRX, OFD1) y Rauch (195) 8 de 51 (15,6%) (SYNGAP1, STXBP1 y SCN2A). Tanto Redin como Grozeva incluyen al gen MECP2 como recurrente, lo que también ocurre en nuestra serie. El resto de los genes recurrentes en nuestra cohorte no están incluidos como recurrentes por otros autores. Entre ellos si coinciden en el gen MED13L, citado como recurrente tanto por Martínez como por Geldon. Algunos de los genes citados como recurrentes por dichos autores se han detectado al menos en un paciente en nuestra serie (TCF4, SYNGAP1, STXBP1, SCN2A), siendo por tanto genes habituales. El bajo porcentaje de casos recurrentes detectado en este estudio (10%) y en los otros publicados, así como la lista distinta de genes recurrentes en unos estudios y otros de nuevo refuerzan la gran heterogeneidad genética de la DI.

Se agrupó a los casos resueltos según el motivo de no diagnóstico previo al exoma clínico con varios objetivos: realizar un análisis clínico de los diagnósticos en la población, valorar el rendimiento clínico en la Sección de Genética Médica y valorar nuevamente el impacto del exoma en el rendimiento diagnóstico de estos pacientes.

Tras este análisis se observó que algo más de la mitad de los pacientes (53.2%) fueron pacientes cuyo diagnóstico no hubiera sido posible sin la aplicación del exoma clínico, incluyendo los pacientes diagnosticados afectos de entidades no sindrómicas, atípicas o en genes de reciente descripción. En un 28%

hubo una orientación sindrómica acertada por parte del clínico y un 18% se podrían considerar fallos de diagnóstico clínico que también se detectaron gracias a la NGS. Diversos artículos hacen mención a conceptos similares, por ejemplo Gieldon (66) describe un 13.9% de diagnósticos clínicos correctos previo al WES. Yang (124) menciona diagnósticos mediante WES de entidades como RASopatías o cohesinopatías, secundario a presentaciones atípicas remarcando también la implicación de la NGS en el mejor conocimiento del espectro clínico de las enfermedades genéticas. En nuestra serie también se detectaron dos pacientes afectos de síndrome de Noonan / Neurofibromatosis 1-Noonan por mutación en los genes RAF1 y NF1 respectivamente, así como un caso de una cohesinopatía-síndrome de Cornelia de Lange con mutación en RAD21. En los tres casos el diagnóstico estuvo dentro de las entidades sugeridas por el clínico, pero si bien, no fueron fenotipos clásicos.

Este análisis nuevamente refuerza la necesidad de un abordaje molecular mediante NGS del paciente con DI ya que no solo existe un gran heterogeneidad genética, sino también una amplia variabilidad clínica derivada de fenotipos atípicos, descripción continua de nuevas entidades, así como genes asociados a DI no sindrómica, por lo que la estrategia diagnóstica molecular clásica del paciente con DI mediante solicitud de secuenciación o MLPA de un gen candidato orientado por el clínico no es abordable en la actualidad (69, 82).

La valoración y orientación clínica del paciente con DI sigue siendo el primer escalón para el diagnóstico del paciente, describiéndose en la literatura un diagnóstico clínico acertado en la primera visita en un 14% de los casos en una población con DI seleccionada para WES, descartándose causas no genéticas y cromosómicas previamente (66), o hasta un 41% cuando se parte de una población sin un escrutinio previo, incluyéndose todas las posibles causas de DI (82). En este estudio, de los casos diagnosticados, el gen causal estuvo dentro de las entidades sugeridas por el clínico en un 28% de los casos. Además, está más que demostrada y descrita la necesidad de la descripción correcta y estandarizada de los fenotipos con términos HPO para la correcta interpretación de las variantes detectadas en la NGS (82, 91, 148). Pero, partiendo de estas premisas, dada la amplia heterogeneidad clínica y molecular de la DI hoy en día, la NGS permite un abordaje diagnóstico más eficaz.

6.2.4 Hallazgos incidentales

Se detectaron hallazgos incidentales en un porcentaje similar a otras publicaciones con utilización de WES o WGS en el diagnóstico de pacientes con DI. En dichas publicaciones describen detección de hallazgos incidentales entre un 3-7% y algunas describen también detección de portadores sanos de enfermedades genéticas con herencia AR o ligada a X de un 4.5-14% (66, 73, 124, 159). En nuestro caso se detectaron estado de portadores en un 15% similar a lo publicado en la literatura. En el consentimiento informado, previo a la realización del exoma clínico, se informó de la posibilidad de detección de dichos hallazgos.

Se informó de los hallazgos incidentales y se extendió el estudio a otros familiares en riesgo, con la posterior derivación para seguimiento clínico protocolizado de los portadores de la variante patogénica detectada.

En cuanto a los estados de portador, se informaron las variantes patogénicas descritas en genes causales de enfermedades potencialmente graves e invalidantes. Se asesoró a las familias según la frecuencia de portadores en la población para dichas patologías cuando fue posible y se ofreció despistaje de otros familiares en riesgo cuando fue preciso, asesorando de forma independiente a cada individuo y/o pareja.

6.3 RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL EXOMA CLÍNICO

Existen numerosos estudios en los que se utiliza la NGS para el abordaje diagnóstico de pacientes con DI. Se han seleccionado algunos artículos donde han utilizado paneles o exomas dirigidos a un número mayor o menor de genes asociados a DI en pacientes con DI para comparar los rendimientos y realizar un análisis de dichos resultados. En nuestro caso se utilizó un exoma clínico con alrededor de 5.000 genes, en base a la versión de OMIM utilizada. De dichos estudios, destacamos los siguientes (Tabla 6.1):

Tabla 6.1: Comparativa de rendimiento de WES dirigido en pacientes con DI

Estudio	Nº diagnósticos/ Nºcasos	% rendimiento	Panel NGS utilizado
HCUVA 2019	64/188	34	Exoma clínico
Han et al 2018 (191)	10/35	29	Panel de 4813 genes
Gieldon et al 2018 (66)	36/106	34	Panel 4800 genes
Xiao et al 2018 (165)	19/33	57	Exoma clínico (enero 2017)
Martínez et al 2016 (111)	29/92	39	Panel 1256 genes
Grozeva et al 2015 (74)	107/986	11	Panel 565 genes
Redin et al 2014 (52)	26/106	25	Panel 217 genes

Como se aprecia en la tabla, la mayoría de los autores describen un rendimiento muy similar al que se ha obtenido en este estudio.

Los estudios de Redin (52) y Grozeva (74) presentan un rendimiento más bajo, probablemente debido a que utilizan un panel dirigido a un grupo reducido de genes asociados a DI, de 217 y de 565 genes respectivamente. Ambos son estudios realizados hace 4-5 años, utilizando paneles dirigidos a genes recurrentes en DI. Muy probablemente el reanálisis de dichos paneles actualizados con los genes implicados en DI según el conocimiento actual, lograría un mayor rendimiento en dichas poblaciones. Ambos estudian una población de DI moderada-grave. En el caso de Redin (52) excluye pacientes con anomalías congénitas, por lo que esto también podría explicar un menor rendimiento y en el caso de Grozeva (74), el análisis se hace únicamente en los pacientes, sin tener acceso a muestras parentales, lo que también se ha descrito como un factor importante en la interpretación de variantes y por tanto en el rendimiento del exoma.

En otros artículos como el de Martínez (111) y Xiao (165), el rendimiento diagnóstico es más elevado que el de este estudio, siendo del 39% y 57% respectivamente. Este discreto mayor rendimiento que detecta Martínez (111) es probablemente atribuido a que estudia pacientes con DI sindrómica esporádica y realiza el análisis en trios, factores relacionados a priori, con un mayor rendimiento de la NGS. Xiao (165) selecciona un número reducido de pacientes (33 pacientes) con DI moderada-grave, siendo un 94% sindrómicos, y realiza un exoma clínico similar al de nuestro estudio (según base de datos OMIM versión

Enero 2017). En nuestro estudio, si valoramos el rendimiento diagnóstico solo en el grupo de pacientes con DI moderada-grave y pacientes sindrómicos, el rendimiento hubiera sido de un 42%.

El artículo más similar al presente en cuanto a diseño y resultados es el de Gieldon y colaboradores (66), puesto que incluye pacientes con DI de todos los niveles de gravedad, así como DI sindrómica y aislada. Utiliza un exoma clínico que contiene 4.813 genes, con un rendimiento del 34%, igual al obtenido en este estudio. En sus resultados, no detecta mayor rendimiento del exoma según la gravedad de la DI (36% en DI grave vs 44% en DI leve) ni en el caso de DI sindrómica o no; resultados superponibles con el presente.

El 57.5% de los pacientes de este estudio continuaron sin diagnóstico molecular, lo que coincide con lo descrito en la literatura, donde a pesar de los avances en los estudios diagnósticos de la DI, en un 50-60% continúan sin diagnóstico (12, 14, 73, 82, 124, 139, 140). Los casos que quedan sin diagnóstico pueden deberse a la presencia de variantes en zonas mal cubiertas por el exoma utilizado, o bien localizadas en zonas intrónicas o regiones reguladoras, como variantes en genes no asociados a DI por el momento, así como modelos poligénicos que combinan CNVs con SNPs, o alteraciones de la metilación o multifactoriales no evidenciadas previamente, según describen distintos autores (12, 100).

Dada la continua descripción de nuevos genes asociados a DI, los resultados tanto de los paneles dirigidos como los del WES en un momento dado, quedan anticuados. Se ha descrito hasta un 25% de rendimiento adicional tras reanálisis de exoma en plazos de 1-2 años (66, 73, 75, 125, 157, 160, 165). Por tanto, los casos que quedaron sin diagnóstico en el momento del análisis inicial podrían resolverse mediante reanálisis del exoma clínico actualizado en unos años o bien la utilización de WES o WGS para la detección de genes nuevos no descritos.

Es importante recordar en este apartado que dentro del propio estudio se han utilizado distintas versiones del exoma clínico basado en la base de datos de OMIM. Es preciso que los laboratorios realicen actualizaciones periódicas de su exoma clínico para adaptarse al avance del conocimiento y descripción de nuevos genes en OMIM como criterio de calidad. En el periodo de estudio se utilizaron las versiones de exoma clínico de junio 2015, septiembre 2015, junio 2016 y febrero 2017 (en el 56% de los pacientes se utilizó esta última versión) que pueden tener

pequeñas diferencias en cuanto a su contenido de genes asociados a DI. En la Sección se optó por el abordaje del paciente con DI mediante exoma clínico (con captura del exoma completo) para poder reanalizar los datos en un tiempo y poder obtener nueva información sin necesidad de realizar nueva extracción analítica al paciente.

No debemos olvidar que un 5.3% de los pacientes tuvieron un diagnóstico molecular probable que no se incluyó dentro de los diagnósticos ya que no se pudo concluir definitivamente su patogenicidad por diversos motivos, para evitar incrementar falsamente el rendimiento del exoma. Se trató de variantes probablemente patogénicas o VOUS en las que no se pudo realizar estudio de segregación en padres, pero que podrían explicar el fenotipo del paciente. En otros casos se trató de VOUS que tras el estudio de segregación coincidía el patrón de herencia esperado para dicho gen, pero que el fenotipo clínico no era claramente compatible o bien se trataba de una entidad de reciente descripción donde no existía suficiente soporte bibliográfico para atribuirle absolutamente patogenicidad. Algunos autores describen situaciones similares, donde aún tras la detección de variantes en el estudio del exoma no es posible atribuirles una relación absolutamente causal con el conocimiento actual. Rauch et al (195) describe la detección de variantes que no se asociaban con el fenotipo esperado, y recomienda el uso del WES no dirigido, argumentando que solo así se va a poder detectar y llegar a conocer el abanico fenotípico asociado a variantes patogénicas en un gen. En caso de haber incluido estos pacientes dentro de los diagnósticos, el rendimiento del exoma clínico en esta población hubiera sido de un 39.3%.

Se han revisado también artículos en los que se ha realizado la secuenciación del exoma completo (WES) o del genoma (WGS) en pacientes con DI, para comparar los resultados de su rendimiento con los de este estudio (Tabla 6.2). Hay múltiples estudios que describen un rendimiento diagnóstico del WES en torno al 16-45% (27, 30, 56, 72, 73, 77, 112, 124, 125, 157, 195). Otros estudios de pacientes con DI mediante WGS describen un diagnóstico de variantes patogénicas en un 27-34% (73, 159). En ambos casos los datos de rendimiento son similares al del exoma clínico, lo que apoya la aplicación del exoma clínico en la práctica clínica habitual como herramienta diagnóstica más eficaz, como también apoyan otros autores (52, 66, 111, 165, 191). El exoma clínico, al limitar el análisis al filtrado de genes descritos en OMIM como ya asociados a patología, hace algo

más sencillo el estudio bioinformático derivado de un estudio de NGS. En el WES se estudian todos los exones (1% del genoma), en el WGS se secuencian tanto intrones como exones lo que hace que sea una técnica mucho más costosa tanto económicamente, como en términos de tiempo (191). La utilización del WES o WGS genera muchísimos más resultados y variantes nuevas, variantes en genes no descritos asociados a patología, que requieren de estudios adicionales (estudios funcionales, ensayos...etc) para completar el estudio su posible patogenicidad y/o asociación a patología clínica, algo que tiene sentido en un ámbito de investigación, pero que carece de utilidad en una rutina clínica. Gracias a la utilización del WES y WGS se está progresando en el conocimiento de las causas moleculares de DI con la descripción de nuevos genes, asociación con fenotipos clínicos...etc siendo muy útiles en el campo de la investigación, aunque es evidente que este tipo de estudios no pueden adaptarse a la presión asistencial derivada de la práctica clínica habitual. Dado que el rendimiento diagnóstico del WES y WGS es similar al del exoma clínico, la utilización del exoma clínico es una técnica más óptima en la práctica clínica.

Los pacientes que tras dicho estudio queden sin diagnóstico generarán un grupo de pacientes candidatos a continuar su proceso de diagnóstico en el campo de la investigación mediante la aplicación de WES o WGS en la búsqueda de nuevos genes asociados a DI. Los artículos que utilizan WGS, añaden a los beneficios de su utilización frente al WES, el que detecta también todas las CNVs, aunque también hay artículos recientes que informan de la progresión en la detección de CNVs con el WES (153); por lo que podrían en un futuro próximo sustituir también al array-CGH y convertirse en una única prueba diagnóstica de la etiología genética de la DI (73, 159).

Las poblaciones de estudio de los artículos revisados son distintas, en cuanto a número de pacientes estudiados y a características clínicas, lo que debe tenerse en cuenta para el análisis crítico de los resultados. Estudios como los de Thevenon (157), de Ligt (27), Wright (56), Vissers (201) y Rauch (195) se centran en pacientes con DI grave o sindrómica; otros grupos analizan pacientes con DI en familias consanguíneas como Reuter (72) y Najmabadi (112). Otros analizan poblaciones más heterogéneas caracterizadas por alteraciones del neurodesarrollo o sospecha de enfermedad genética, si bien un porcentaje elevado incluye pacientes con DI, como son los estudios de Trujillano (125), Yang (75, 124),

Bowling (73) o Stavropoulos (159). También debe tenerse en cuenta el año de estudio, puesto que el conocimiento de los genes asociados a DI ha aumentado de forma exponencial desde el uso de estas tecnologías en los últimos años. Esto podría justificar el rendimiento del 16-17% de Ligt (27) y Najmabadi (112) al ser estudios realizados en los años 2011-2012, los que podrían tener un rendimiento mayor si se reanalizara a fecha actual. En el estudio de Najmabadi (112), tras la realización de WES en pacientes con DI moderada-grave en familias consanguíneas, sugieren 50 genes candidatos responsables de DI AR, exponiendo la utilidad del WES para la identificación de nuevos genes responsables de DI. El estudio realizado por Schuurs Hoejmakers y colaboradores (77) también presenta un rendimiento algo inferior al esperado, aunque el número bajo de pacientes incluidos y el año del estudio podrían justificar este hecho. A la inversa, Vissers y colaboradores (200) publican un rendimiento algo más elevado que el resto, de un 60% aunque solo estudia a 10 pacientes, muy seleccionados y con DI moderada grave, lo que podría explicar sus resultados. El resto de artículos presentan rendimientos similares entre ellos y entre los resultados de utilización de paneles dirigidos o exoma clínico en pacientes con DI.

El presente estudio parte de una población muy seleccionada de pacientes con DI candidatos a una causa monogénica, que lo diferencia de muchos de los estudios mencionados. No solo se habían descartado minuciosamente causas exógenas, así como causas cromosómicas y síndrome de X frágil, si no que muchos de ellos tenían ya un despistaje molecular de la etiología monogénica más plausible en el paciente. Por lo que el rendimiento obtenido debe entenderse en dicho marco. Muchos estudios de los mencionados partían de poblaciones menos seleccionadas de pacientes con DI, alteración en el neurodesarrollo, e incluso de sospecha de patologías pediátricas en general, por lo que muchos de los diagnósticos detectados fueron entidades clásicas, que en este estudio probablemente fueron previamente diagnosticados y por tanto no incluidos.

Cuando se evalúa el rendimiento de una prueba diagnóstica es importante tener en cuenta el momento de inclusión de los pacientes. Si no se considera esta variable, podría aumentar falsamente el rendimiento obtenido, ya que se estarían incluyendo un grupo de pacientes diagnosticables mediante dicha prueba, que no se van a diagnosticar hasta su utilización. Para controlar dicho sesgo de selección, se comparó el rendimiento diagnóstico en pacientes nuevos y en pacientes

reevaluados. Las cifras en cuanto a rendimiento diagnóstico fueron similares, incluso algo mayor en el grupo de pacientes nuevos, por lo que no se consideró esta clasificación en los resultados y análisis de rendimiento final.

Tabla 6.2: Comparativa de rendimiento de WES/WGS en pacientes con DI.

Estudio	Diagnósticos/casos	%	Población de estudio	WES/WGS
HCUVA 2019	64/188	34	DI	Exoma Clínico
Reuter et al 2017 (72)	56/152	36.8	Familias consanguíneas	WES
Trujillano et al 2017 (125)	307/1000	30.7	Enf genética (77% SNC)	WES
Thevenon et al 2016 (157)	14/43	32.5	DI grave	WES
Wright et al 2015 (56)	311/1133	27	DI grave / sindrómica	WES
Schuurs Hoejmakers et al 2013 (77)	19	16	DI familias no consanguíneas con más de 2 afectos	WES
Yang et al 2013 (124)	51/200	26	Sospecha enfermedad genética (80% DI)	WES
Rauch et al 2012 (195)	16/51	45	DI grave no sindrómica	WES
de Ligt et al 2012 (27)	16/100	16	DI grave	WES
Najmabadi et al 2011 (112)	23/136	17	DI moderada-grave y consanguinidad	WES
Vissers et al 2017 (201)	6/10	60	DI moderada-grave	WES
Bowling et al 2017 (73)	100/371	27	Alt. Neurodesarrollo (90% DI)	WGS
Stavropoulos et al 2016 (159)	26/100	38.6	Sospecha enfermedad genética (57% DI)	WGS

6.3.1 Rendimiento del exoma clínico según distintas variables

Se realizó un análisis estadístico para buscar si había relación entre alguna variable clínica de los pacientes y un mayor rendimiento del exoma y en base a los resultados, elaborar una estrategia diagnóstica respecto al abordaje del estudio molecular del paciente con DI en la Sección. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas respecto al rendimiento diagnóstico del exoma

clínico asociado a ninguna de las variables analizadas, lo que indica que se debe realizar estudio de exoma clínico en todos los pacientes con DI, independientemente de sus características clínicas.

Sí se ha observado un ligero mayor rendimiento en casos de DI moderada/grave o DI sindrómica respecto a la DI leve o aislada respectivamente, pero sin alcanzar diferencias significativas que permitan establecer un criterio distinto de actuación en unos u otros pacientes. El ligero mayor rendimiento en la DI moderada-grave respecto a la leve podría explicarse porque la distribución de la DI según gravedad en la población de este estudio no sigue la descrita en la población general, con un mayor número de pacientes con DI moderada, y el mismo criterio podría aplicarse al mayor rendimiento en la DI sindrómica.

Hay artículos que también describen un mayor rendimiento en DI grave respecto a la leve, en casos de DI sindrómica o presencia de anomalías asociadas, o en caso de antecedentes familiares positivos. Reuter y colaboradores (72) detectan mayor rendimiento en la DI grave (45.5%), sindrómica (42.9%) y en caso de AF positivos (39%), pero sin detectar asociación estadística; aunque le ocurre como en este estudio, ya que la mayoría de pacientes son sindrómicos (90%) y además con DI grave (50%). A la inversa, Bowling y colaboradores (73) detectan menor rendimiento en casos con AF positivos argumentando mayor presencia de éstos en casos de DI leve, donde hay menor detección de causas moleculares y más influencia de factores ambientales. En este estudio no se detectó una mayor presencia de AF positivos en los casos de DI leve ni en relación con mayor rendimiento diagnóstico. Trujillano (125) también detecta un mayor rendimiento en casos de consanguinidad de los padres (45% de consanguinidad en su población) y, como otros autores, en DI severa y fenotipo sindrómico, aunque nuevamente sin hallar diferencias estadísticamente significativas (72, 157). Otros estudios concluyen tras el análisis estadístico, que no existe mayor rendimiento del exoma según grado de DI ni asociación de anomalías congénitas, como son Gieldon y Redin (52, 66), resultados similares a los del presente estudio.

Tras el análisis de nuestros resultados y la revisión de la literatura, no existe ninguna variable clínica que permita discriminar en que pacientes realizar o no un estudio de NGS para el estudio diagnóstico de su DI y por tanto debe aplicarse en todos los pacientes con DI.

6.4 ANÁLISIS DE COSTES

Está descrito en la literatura que la DI se asocia a un gasto sanitario elevado, prácticamente igualando el impacto económico de patologías como el ictus, la patología cardíaca o el cáncer (12, 100). Se estima un gasto de hasta 900.000 euros en cuanto a costes de por vida de un paciente con DI (14, 42, 202). Dichos estudios valoran en cuanto al cálculo de gastos, las visitas médicas a distintas especialidades, ingresos hospitalarios, transporte sanitario, y estudios analíticos, de imagen o genéticos que precisan estos pacientes. Otros estudios realizan un análisis del impacto económico de un paciente con DI referente a su proceso diagnóstico estimándose un gasto de 14-15.000 euros por paciente (43, 44).

En el presente estudio se ha querido realizar un estudio económico respecto a los costes derivados de los estudios genéticos que se solicitan en un paciente con DI en su proceso diagnóstico, para valorar el impacto y eficiencia de la incorporación del exoma clínico de forma más precoz en la práctica clínica habitual.

No se incluyeron en el análisis económico los costes de tipo asistencial, como número de visitas en distintas especialidades, ingresos hospitalarios...ni los costes derivados de pruebas de imagen, como la ecografía abdominal, ecocardiograma o la RMN cerebral que suelen solicitarse como despistaje de anomalías asociadas en el proceso diagnóstico del paciente. Es cierto que el tener un diagnóstico molecular específico de forma precoz, podría repercutir en la minimización del impacto económico derivado de estudios redundantes o innecesarios que se solicitan de forma habitual en el proceso diagnóstico clásico como son pruebas de imagen (ecografía abdominal, RMN cerebral), Interconsultas a otras especialidades para despistaje de posibles anomalías asociadas (valoración cardiológica, ecocardiograma, valoración oftalmológica, potenciales auditivos....) o bien número de visitas en la Sección derivadas de la realización de distintos estudios con resultado de normalidad. En contraposición, el diagnóstico molecular de un paciente, también conlleva la realización de pruebas de imagen e interconsultas médicas para descartar anomalías asociadas a dicha entidad. Por ello no hemos considerado analizar dichos factores y realizar un estudio focalizado en el impacto económico correspondiente a los estudios genéticos.

Tras el análisis de costes, se demostró la eficiencia de la utilización del exoma clínico como herramienta de primera línea en el estudio diagnóstico del paciente con DI. En caso de haber utilizado el exoma clínico tras un resultado de array-CGH y X frágil normales, se hubiera producido un ahorro medio de 2082 euros por paciente, lo que representa un 62% de ahorro en cuanto a los costes de estudios genéticos solicitados en el proceso diagnóstico de un paciente con DI. Otros estudios que analizan el impacto económico de la utilización del WES en el proceso diagnóstico del paciente con DI obtienen cifras similares, estimando un ahorro de 774–2300 euros por paciente (43, 44, 82, 201) refiriéndose también al coste en cuanto a estudios analíticos. En dichos estudios, como el de Vrijenhoek y colaboradores (43) y Monroe y colaboradores (44), mencionan también el efecto de la utilización del exoma en cuanto a *final de trayectoria* independientemente del resultado obtenido. Realizan un análisis de costes preWES y postWES, siendo estos últimos un 80% más bajos y observan una reducción en el número de visitas, ingresos y estudios analíticos al 50%. Vrijenhoek (43) analiza dentro de los costes, tanto los costes analíticos como los asistenciales, hospitalizaciones y estudios complementarios, pero observa que el mayor porcentaje de dichos costes corresponde a los estudios analíticos-genéticos. Dicho efecto de final de trayectoria también se observa en nuestro estudio, con un gasto pre-exoma clínico de 2.702 euros/paciente y un gasto post-exoma clínico de 266 euros por paciente (80.7% menor tras exoma clínico), por lo que apoya lo sugerido por Vrijenhoek, que la utilización del WES de forma precoz no solo reduce el gasto medio por paciente, sino que también reduce los costes de estudios tras su utilización independientemente del diagnóstico molecular.

Tras el análisis global de los resultados de este estudio, tanto el rendimiento diagnóstico obtenido de un 34% como el impacto en cuanto a tiempo al diagnóstico y la reducción de costes demostrada al utilizar la NGS de forma precoz, demuestran la eficacia y eficiencia de la incorporación del exoma clínico en el proceso diagnóstico del paciente con DI. Se propone un algoritmo diagnóstico para el paciente con DI en la Sección de Genética Médica del HCUVA en base a los resultados obtenidos en este estudio (Anexo 6).

6.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Al tratarse de un estudio retrospectivo y descriptivo, presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, no se trata de un estudio de las causas de la DI en la población murciana, puesto que la población a estudio eran pacientes en los que no se conocía la causa de su DI tras haber descartado posibles causas de DI, a través de una valoración clínica y analítica iniciales, con el objetivo de valorar el impacto de la utilización de la NGS en el grupo de pacientes con un probable diagnóstico molecular de su DI. Por lo que los datos obtenidos y las conclusiones derivadas de ello deben analizarse en dicho contexto. Diversos artículos definen que la valoración clínica inicial del paciente con DI en primera visita obtiene un diagnóstico causal estimado en un 17-33% de los casos, debido a causas ambientales, adquiridas o genéticas derivadas de una orientación sindrómica dirigida (14, 66, 82). En este estudio no se ha estudiado el número de pacientes que se diagnostican en la Sección tras una valoración inicial en la consulta o tras un estudio molecular dirigido, por lo que no se trata de un estudio del rendimiento del diagnóstico clínico del paciente con DI ni las causas de DI de forma general en la población murciana.

En segundo lugar, la distribución de los grados de DI no es la representativa de la población general, puesto que los pacientes eran seleccionados previamente por otros facultativos, remitiendo en su mayoría pacientes sindrómicos y con DI moderada o grave, por lo que los valores de rendimiento han podido verse influidos por estas variables.

En tercer lugar, ha habido un 6% de pacientes donde no se ha podido realizar segregación de las VOUS detectadas por ausencia de muestras parentales, bien por tratarse de una gestación conseguida mediante donación de gametos o bien por fallecimiento de alguno de los progenitores o no deseo de extracción analítica por parte de los progenitores. Por tanto, algunos de los resultados del exoma no se han podido concluir.

6.6 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Como se ha mencionado a lo largo del texto, la mejoría en el rendimiento diagnóstico del paciente con DI debe ser una prioridad a nivel sanitario y social. Por ello, el estudio del paciente con DI de etiología no filiada debe ser una continua línea de investigación para los facultativos dedicados a la genética.

De esta forma los pacientes que han quedado sin diagnóstico tras este estudio son nuestro grupo de pacientes candidatos a continuar trabajando en su proceso diagnóstico. En primer lugar, son candidatos a reanálisis del exoma, sobre todo los analizados al principio del estudio, donde se utilizaron versiones anteriores de OMIM. En la literatura se describe un rendimiento añadido de un 15-25% (160, 165) tras reanálisis de exoma en un plazo de 1-2 años.

Otro abordaje tras reanálisis del exoma clínico con resultado normal, sería el estudio mediante WES o WGS para detectar variantes en genes nuevos hasta el momento no asociados a DI.

Las tecnologías de diagnóstico molecular evolucionan de una forma exponencial, lo que está cambiando el paradigma del estudio de las enfermedades genéticas y es un privilegio el poder trabajar en este campo y poder participar de esta transformación del diagnóstico en Medicina. El manejo interdisciplinar entre genetistas moleculares y genetistas clínicos en la aplicación de la NGS para el diagnóstico del paciente con DI es necesaria e imprescindible para conseguir su máximo rendimiento y aplicabilidad al paciente como bien describen muchos autores, como Hennekam y colaboradores (12, 91). El estudio y análisis de las múltiples variantes detectadas en los estudios de NGS (estudios funcionales, ensayos..), la exhaustiva y homogénea descripción de los fenotipos clínicos mediante términos HPO y la colaboración nacional e internacional, son elementos imprescindibles para progresar en el conocimiento de las causas moleculares de la DI (91).

En este sentido, la Sección de Genética Médica del HCUVA forma parte de un proyecto nacional de investigación de pacientes con DI sin diagnóstico para la aplicación de WES / WGS (Proyecto de COHORTES) y en el proyecto ENOD para el estudio de enfermedades raras no diagnosticadas dentro de la estructura del CIBER de Enfermedades Raras o CIBERER del Instituto de Salud Carlos III

(ISCIII), como participación activa en el aprendizaje e investigación de las causas genéticas de la DI.

Es importantísimo seguir trabajando en el diagnóstico molecular del paciente con DI, puesto que hay un porcentaje considerable de pacientes que continúan sin diagnóstico, con el objetivo de poder proporcionar un manejo apropiado, mejorar la calidad de vida, investigar posibles vías terapéuticas y prevenir nuevos casos a través del asesoramiento genético.

VII – CONCLUSIONES

VII-CONCLUSIONES

- 1.El rendimiento diagnóstico de la secuenciación del exoma clínico en pacientes con DI en la población estudiada es del 34%, similar a los descritos en la literatura para el exoma clínico, WES y WGS; lo que favorece su priorización como herramienta diagnóstica.
- 2.En la muestra poblacional de DI estudiada predominan los varones y la DI moderada y sindrómica.
3. Se observa gran heterogeneidad genética, identificando variantes patogénicas en 59 genes distintos asociados a DI; un 63.5% son variantes nuevas, no descritas previamente en la literatura. La mayoría de variantes patogénicas detectadas han sido de pérdida de función y en genes con herencia AD (62.5%), tratándose la mayoría de mutaciones *de novo* (90%).
- 4.El estudio de segregación de VOUS del exoma clínico aumenta un 7.4% su rendimiento diagnóstico por lo que es imprescindible para su correcta interpretación y clasificación en caso de no realizar un abordaje del estudio mediante trío.
- 5.No se ha demostrado correlación significativa entre el rendimiento del exoma y las características clínicas de los pacientes con DI, sugiriendo su indicación de primera línea en todos los pacientes con DI.
- 6.Un 53.2% de las etiologías detectadas en el exoma no eran orientables a nivel clínico, lo que demuestra la dificultad de un abordaje diagnóstico dirigido.
- 7.La utilización del exoma clínico en el estudio del paciente con DI se ha mostrado eficiente, con un ahorro aproximado del 50% respecto al procedimiento diagnóstico habitual.
- 8.Estos resultados permiten diseñar un protocolo diagnóstico de DI que disminuya la variabilidad clínica y aumente la eficiencia en nuestra Sección para ser aplicado y reevaluado en el futuro.

VIII – BIBLIOGRAFÍA

VIII – BIBLIOGRAFÍA

1. Shogren KA, Turnbull HR. Public policy and outcomes for persons with intellectual disability: extending and expanding the public policy framework of AAIDD's 11th Edition of Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Support. *Intellect Dev Disabil*. 2010;48(5):375-86.
2. Dilip Jeste P V, Jeffrey Lieberman P-EA DFT, Rcxser Peele S, Speaker Scott Benson, AR AJ. DSM-5. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. Quinta ed2018.
3. Schallock RL. Intellectual disability: Definition, Classifications and Systems of Supports - 11th Edition. 11th Edition ed2010.
4. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet*. 1997;72(4):468-77.
5. Pepperrine CR, McCrimmon AW. Vineland Adaptive Behavior Scales, 3rd edition, (Vineland-3). *Canadian Journal of School Psychology*. 2018;33(2):157-63.
6. Saleem M, Beail N, Roache S. Relationship between the Vineland Adaptive Behaviour Scales and the Wechsler Adult Intelligence Scale IV in adults with intellectual disabilities. *Journal of intellectual disability research : JIDR*. 2019.
7. Szymanski L, King BH. Practice parameters for the assessment and treatment of children, adolescents, and adults with mental retardation and comorbid mental disorders. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry Working Group on Quality Issues. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1999;38(12 Suppl):5s-31s.
8. Moeschler JB. Medical genetics diagnostic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability. *Current Opinion in Neurology*. 2008;21(2):117-22.
9. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, et al. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay - Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2003;60(3):367-80.
10. Gonzalez Alvaredo S, Sanz Rojo R, Garcia Santiago J, Gaztanaga Exposito R, Bengoa A, Perez-Yarza EG. Genetic diagnostic criteria in cases of mental

- retardation and development of idiopathic origin. *Anales de pediatria* (Barcelona, Spain : 2003). 2008;69(5):446-53.
11. Sachdev PS, Mohan A, Taylor L, Jeste DV. DSM-5 and Mental Disorders in Older Individuals: An Overview. *Harv Rev Psychiatry*. 2015;23(5):320-8.
 12. van Karnebeek CDM. Evaluation of the Child With Developmental Impairments. *Continuum (Minneap Minn)*. 2018;24(1, Child Neurology):228-47.
 13. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil*. 2011;32(2):419-36.
 14. Moeschler JB, Shevell M. Comprehensive Evaluation of the Child With Intellectual Disability or Global Developmental Delays. *Pediatrics*. 2014;134(3):E903-E18.
 15. Thompson JR, Bradley VJ, Buntinx WH, Schalock RL, Shogren KA, Snell ME, et al. Conceptualizing supports and the support needs of people with intellectual disability. *Intellect Dev Disabil*. 2009;47(2):135-46.
 16. Committee to Evaluate the Supplemental Security Income Disability Program for Children with Mental D, Board on the Health of Select P, Board on Children YaF, Institute of M, Division of Behavioral and Social Sciences and E, The National Academies of Sciences EaM. In: Boat TF, Wu JT, editors. *Mental Disorders and Disabilities Among Low-Income Children*. Washington (DC): National Academies Press (US) Copyright 2015 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.; 2015.
 17. Mercadante MT, Evans-Lacko S, Paula CS. Perspectives of intellectual disability in Latin American countries: epidemiology, policy, and services for children and adults. *Curr Opin Psychiatry*. 2009;22(5):469-74.
 18. Papazoglou A, Jacobson LA, McCabe M, Kaufmann WE, Zabel TA. To ID or Not to ID? Classification of Intellectual Disability Using DSM-V. *Clinical Neuropsychologist*. 2011;25(4):597-8.
 19. Boyle CA, Boulet S, Schieve LA, Cohen RA, Blumberg SJ, Yeargin-Allsopp M, et al. Trends in the prevalence of developmental disabilities in US children, 1997-2008. *Pediatrics*. 2011;127(6):1034-42.
 20. Camp BW, Broman SH, Nichols PL, Leff M. Maternal and neonatal risk factors for mental retardation: defining the 'at-risk' child. *Early Hum Dev*. 1998;50(2):159-73.
 21. Leonard H, Wen XY. The epidemiology of mental retardation: Challenges and opportunities in the new millennium. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. 2002;8(3):117-34.

22. Drews CD, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P, Murphy CC. Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. *Am J Public Health*. 1995;85(3):329-34.
23. Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(8):565-75.
24. van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet*. 2011;45:81-104.
25. Chiurazzi P, Hamel BC, Neri G. XLMR genes: update 2000. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(2):71-81.
26. Glass IA. X linked mental retardation. *J Med Genet*. 1991;28(6):361-71.
27. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012;367(20):1921-9.
28. Heikura U, Taanila A, Olsen P, Hartikainen AL, von Wendt L, Jarvelin MR. Temporal changes in incidence and prevalence of intellectual disability between two birth cohorts in Northern Finland. *Am J Ment Retard*. 2003;108(1):19-31.
29. Katusic SK, Colligan RC, Beard CM, O'Fallon WM, Bergstralh EJ, Jacobsen SJ, et al. Mental retardation in a birth cohort, 1976-1980, Rochester, Minnesota. *Am J Ment Retard*. 1996;100(4):335-44.
30. Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet*. 2016;17(1):9-18.
31. Instituto Nacional de Estadística (INE) [Available from: www.ine.es/].
32. Centro Regional de Estadística de Murcia (CREM) [Available from: [hhttps://www.econet.carm.es](https://www.econet.carm.es)].
33. Hassiotis A. Psychiatric and behavioural disorders in developmental disabilities and mental retardation. *Journal of Intellectual Disability Research*. 2000;44:181-2.
34. Tasse MJ. Psychiatric and behavioural disorders in developmental disabilities and mental retardation. *American Journal on Mental Retardation*. 2001;106(3):287-91.
35. Gillberg C, Persson E, Grufman M, Themner U. Psychiatric disorders in mildly and severely mentally retarded urban children and adolescents: epidemiological aspects. *Br J Psychiatry*. 1986;149:68-74.
36. Gustavson KH, Umb-Carlsson O, Sonnander K. A follow-up study of mortality, health conditions and associated disabilities of people with intellectual disabilities in a Swedish county. *J Intellect Disabil Res*. 2005;49(Pt 12):905-14.

37. Martinez-Leal R, Salvador-Carulla L, Ruiz Gutierrez-Colosia M, Nadal M, Novell-Alsina R, Martorell A, et al. Health among persons with intellectual disability in Spain: the European POMONA-II study. *Revista De Neurologia*. 2011;53(7):406-14.
38. Matson JL, Shoemaker M. Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. *Res Dev Disabil*. 2009;30(6):1107-14.
39. Krahn GL, Hammond L, Turner A. A cascade of disparities: health and health care access for people with intellectual disabilities. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006;12(1):70-82.
40. Baxter H, Lowe K, Houston H, Jones G, Felce D, Kerr M. Previously unidentified morbidity in patients with intellectual disability. *Br J Gen Pract*. 2006;56(523):93-8.
41. Economic costs associated with mental retardation, cerebral palsy, hearing loss, and vision impairment--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004;53(3):57-9.
42. Polder JJ, Meerding WJ, Bonneux L, van der Maas PJ. Healthcare costs of intellectual disability in the Netherlands: a cost-of-illness perspective. *J Intellect Disabil Res*. 2002;46(Pt 2):168-78.
43. Vrijenhoek T, Middelburg EM, Monroe GR, van Gassen KLI, Geenen JW, Hovels AM, et al. Whole-exome sequencing in intellectual disability; cost before and after a diagnosis. *Eur J Hum Genet*. 2018;26(11):1566-71.
44. Monroe GR, Frederix GW, Savelberg SM, de Vries TI, Duran KJ, van der Smagt JJ, et al. Effectiveness of whole-exome sequencing and costs of the traditional diagnostic trajectory in children with intellectual disability. *Genet Med*. 2016;18(9):949-56.
45. Puri RD, Tuteja M, Verma IC. Genetic Approach to Diagnosis of Intellectual Disability. *Indian J Pediatr*. 2016;83(10):1141-9.
46. *Revista Española de Pediatría Clínica e Investigación*. Número Monográfico Genética. In: Garcia-Miñaur S, editor. Valoración y aproximación diagnóstica al niño con retraso mental. Ergon ed2009.
47. Canivez GL, Watkins MW, Dombrowski SC. Structural Validity of the Wechsler Intelligence Scale for Children-Fifth Edition: Confirmatory Factor Analyses With the 16 Primary and Secondary Subtests. *Psychological Assessment*. 2017;29(4):458-72.
48. Canivez GL, Watkins MW, McGill RJ. Construct validity of the Wechsler Intelligence Scale For Children - Fifth UK Edition: Exploratory and confirmatory factor analyses of the 16 primary and secondary subtests. *The British journal of educational psychology*. 2019;89(2):195-224.

49. Bunday S, Thake A, Todd J. The recurrence risks for mild idiopathic mental-retardation. *Journal of Medical Genetics*. 1989;26(4):260-6.
50. Battaglia A, Bianchini E, Carey JC. Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *American Journal of Medical Genetics*. 1999;82(1):60-6.
51. Lamont MA, Dennis NR. Etiology of mild mental-retardation. *Archives of Disease in Childhood*. 1988;63(9):1032-8.
52. Redin C, Gerard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet*. 2014;51(11):724-36.
53. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:161-87.
54. Crow YJ, Tolmie JL. Recurrence risks in mental retardation. *J Med Genet*. 1998;35(3):177-82.
55. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006;140(19):2063-74.
56. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet*. 2015;385(9975):1305-14.
57. Patel DR, Greydanus DE, Calles JL, Jr., Pratt HD. Developmental Disabilities Across the Lifespan. *Dm Disease-a-Month*. 2010;56(6):305-97.
58. Katz G, Lazcano-Ponce E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud Publica Mex*. 2008;50 Suppl 2:s132-41.
59. van Karnebeek CDM, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JMN, et al. Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: A prospective study. *American Journal on Mental Retardation*. 2005;110(4):253-67.
60. Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability. *F1000Res*. 2016;5.
61. Parker SE, Mai CT, Canfield MA, Rickard R, Wang Y, Meyer RE, et al. Updated National Birth Prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(12):1008-16.
62. Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowrey J, Sherman SL, et al. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet*. 2009;85(4):503-14.

63. de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):660-7.
64. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of Neurodevelopmental Disorders.* 2010;2(4):182-209.
65. Stromme P. Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Dev Med Child Neurol.* 2000;42(2):76-86.
66. Geldon L, Mackenroth L, Kahlert A-K, Lemke JR, Pörrmann J, Schallner J, et al. Diagnostic value of partial exome sequencing in developmental disorders. *Plos One.* 2018;13(8).
67. Kramer JM, van Bokhoven H. Genetic and epigenetic defects in mental retardation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):96-107.
68. van Bokhoven H, Kramer JM. Disruption of the epigenetic code: an emerging mechanism in mental retardation. *Neurobiol Dis.* 2010;39(1):3-12.
69. Carvill GL, Mefford HC. Next-Generation Sequencing in Intellectual Disability. *Journal of Pediatric Genetics.* 2015;4(3):128-35.
70. Stevenson RE, Schwartz CE. X-linked intellectual disability: unique vulnerability of the male genome. *Dev Disabil Res Rev.* 2009;15(4):361-8.
71. Musante L, Ropers HH. Genetics of recessive cognitive disorders. *Trends Genet.* 2014;30(1):32-9.
72. Reuter MS, Tawamie H, Buchert R, Hosny Gebiril O, Froukh T, Thiel C, et al. Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders. *JAMA Psychiatry.* 2017;74(3):293-9.
73. Bowling KM, Thompson ML, Amaral MD, Finnila CR, Hiatt SM, Engel KL, et al. Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay. *Genome Med.* 2017;9(1):43.
74. Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O, Tejada MI, Gecz J, Shaw M, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability. *Hum Mutat.* 2015;36(12):1197-204.
75. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *Jama-Journal of the American Medical Association.* 2014;312(18):1870-9.
76. Gropman AL, Batshaw ML. Epigenetics, copy number variation, and other molecular mechanisms underlying neurodevelopmental disabilities: new insights and diagnostic approaches. *J Dev Behav Pediatr.* 2010;31(7):582-91.

77. Schuurs-Hoeijmakers JH, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE, van de V, II, van Bon BW, de Ligt J, et al. Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *J Med Genet*. 2013;50(12):802-11.
78. Niccols A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. *Brain Cogn*. 2007;65(1):135-42.
79. May PA, Gossage JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res Health*. 2001;25(3):159-67.
80. J NG, J AP. *Trastornos del neurodesarrollo*: Viguera Editores; 2011.
81. Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Evidence Report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2011;77(17):1629-35.
82. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K, Vellore K, McDonald M, et al. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med*. 2014;16(2):176-82.
83. Bennett RL, French KS, Resta RG, Doyle DL. Standardized human pedigree nomenclature: update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2008;17(5):424-33.
84. Allanson JE, Biesecker LG, Carey JC, Hennekam RC. Elements of morphology: introduction. *Am J Med Genet A*. 2009;149a(1):2-5.
85. Hennekam RC, Allanson JE, Biesecker LG, Carey JC, Opitz JM, Vilain E. Elements of morphology: standard terminology for the external genitalia. *Am J Med Genet A*. 2013;161a(6):1238-63.
86. Hennekam RC, Biesecker LG, Allanson JE, Hall JG, Opitz JM, Temple IK, et al. Elements of morphology: general terms for congenital anomalies. *Am J Med Genet A*. 2013;161a(11):2726-33.
87. Hunter A, Frias JL, Gillessen-Kaesbach G, Hughes H, Jones KL, Wilson L. Elements of morphology: standard terminology for the ear. *Am J Med Genet A*. 2009;149a(1):40-60.
88. Carey JC, Cohen MM, Jr., Curry CJ, Devriendt K, Holmes LB, Verloes A. Elements of morphology: standard terminology for the lips, mouth, and oral region. *Am J Med Genet A*. 2009;149a(1):77-92.
89. Hall BD, Graham JM, Jr., Cassidy SB, Opitz JM. Elements of morphology: standard terminology for the periorbital region. *Am J Med Genet A*. 2009;149a(1):29-39.

90. Hennekam RC, Cormier-Daire V, Hall JG, Mehes K, Patton M, Stevenson RE. Elements of morphology: standard terminology for the nose and philtrum. *Am J Med Genet A*. 2009;149a(1):61-76.
91. Hennekam RC, Biesecker LG. Next-generation sequencing demands next-generation phenotyping. *Hum Mutat*. 2012;33(5):884-6.
92. Robinson PN, Mundlos S. The human phenotype ontology. *Clin Genet*. 2010;77(6):525-34.
93. Robinson PN, Kohler S, Bauer S, Seelow D, Horn D, Mundlos S. The Human Phenotype Ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease. *Am J Hum Genet*. 2008;83(5):610-5.
94. Gurovich Y, Hanani Y, Bar O, Nadav G, Fleischer N, Gelbman D, et al. Identifying facial phenotypes of genetic disorders using deep learning. *Nature Medicine*. 2019;25(1):60-+.
95. Hurst ACE. Facial recognition software in clinical dysmorphology. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(6):701-6.
96. Jang D-H. Application of facial dysmorphology analysis technology (Face2gene) in Korean rare genetic diseases. *Annals of translational medicine*. 2017;5.
97. Mishima H, Suzuki H, Doi M, Miyazaki M, Watanabe S, Matsumoto T, et al. Evaluation of Face2Gene using facial images of patients with congenital dysmorphic syndromes recruited in Japan. *J Hum Genet*. 2019;64(8):789-94.
98. Dudding-Byth T, Baxter A, Holliday EG, Hackett A, O'Donnell S, White SM, et al. Computer face-matching technology using two-dimensional photographs accurately matches the facial gestalt of unrelated individuals with the same syndromic form of intellectual disability. *BMC Biotechnol*. 2017;17(1):90.
99. Schaefer GB, Bodensteiner JB. Radiological findings in developmental delay. *Seminars in pediatric neurology*. 1998;5(1):33-8.
100. van Karnebeek CDM, Jansweijer MCE, Leenders AGE, Offringa M, Hennekam RCM. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *European Journal of Human Genetics*. 2005;13(1):6-25.
101. Lingam S, Read S, Holland IM, Wilson J, Brett EM, Hoare RD. Value of computerized-tomography in children with nonspecific mental-subnormality. *Archives of Disease in Childhood*. 1982;57(5):381-3.
102. Soto-Ares G, Joyes B, Lemaitre MP, Vallee L, Pruvo JP. MRI in children with mental retardation. *Pediatric Radiology*. 2003;33(5):334-45.

103. Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic yield of subspecialists' evaluation of young children with global developmental delay. *Journal of Pediatrics*. 2000;136(5):593-8.
104. Griffiths PD, Batty R, Warren D, Hart A, Sharrard M, Mordekar SR, et al. The use of MR imaging and spectroscopy of the brain in children investigated for developmental delay: What is the most appropriate imaging strategy? *European Radiology*. 2011;21(9):1820-30.
105. Verbruggen KT, Meiners LC, Sijens PE, Lunsing RJ, van Spronsen FJ, Brouwer OF. Magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in the diagnostic evaluation of developmental delay. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2009;13(2):181-90.
106. Martin E, Keller M, Ritter S, Largo RH, Thiel T, Loenneker T. Contribution of proton magnetic resonance spectroscopy to the evaluation of children with unexplained developmental delay. *Pediatric Research*. 2005;58(4):754-60.
107. Decobert F, Grabar S, Merzoug V, Kalifa G, Ponsot G, Adamsbaum C, et al. Unexplained mental retardation: is brain MRI useful? *Pediatric Radiology*. 2005;35(6):587-96.
108. van Karnebeek CDM, Stockler-Ipsiroglu S. Early identification of treatable inborn errors of metabolism in children with intellectual disability: The Treatable Intellectual Disability Endeavor protocol in British Columbia. *Paediatrics & Child Health*. 2014;19(9):469-71.
109. van Karnebeek CDM, Stockler S. Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability: A systematic literature review. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;105(3):368-81.
110. Shakiba M, Keramatipour M. Effect of Whole Exome Sequencing in Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism and Neurogenetic Disorders. *Iran J Child Neurol*. 2018;12(1):7-15.
111. Martinez F, Caro-Llopis A, Rosello M, Oltra S, Mayo S, Monfort S, et al. High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *J Med Genet*. 2017;54(2):87-92.
112. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011;478(7367):57-63.
113. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*. 2010;12(11):742-5.
114. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical

- Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *American Journal of Human Genetics*. 2010;86(5):749-64.
115. Coulter ME, Miller DT, Harris DJ, Hawley P, Picker J, Roberts AE, et al. Chromosomal microarray testing influences medical management. *Genetics in Medicine*. 2011;13(9):770-6.
116. Nowakowska B, Stankiewicz P, Obersztyn E, Ou Z, Li J, Chinault AC, et al. Application of metaphase HR-CGH and targeted Chromosomal Microarray Analyses to genomic characterization of 116 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*. 2008;146a(18):2361-9.
117. Pickering DL, Eudy JD, Olney AH, Dave BJ, Golden D, Stevens J, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. *Genet Med*. 2008;10(4):262-6.
118. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*. 2007;143a(13):1431-41.
119. Saul RA, Moeschler JB. How best to use CGH arrays in the clinical setting. *Genet Med*. 2009;11(5):371; author reply -2.
120. Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, et al. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat*. 2007;28(11):1124-32.
121. Bar-Shira A, Rosner G, Rosner S, Goldstein M, Orr-Urtreger A. Array-based comparative genome hybridization in clinical genetics. *Pediatr Res*. 2006;60(3):353-8.
122. Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet*. 2010;47(5):289-97.
123. Taylor MR, Jirikowic J, Wells C, Springer M, McGavran L, Lunt B, et al. High prevalence of array comparative genomic hybridization abnormalities in adults with unexplained intellectual disability. *Genet Med*. 2010;12(1):32-8.
124. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*. 2013;369(16):1502-11.
125. Trujillano D, Bertoli-Avella AM, Kandaswamy KK, Weiss MER, Koester J, Marais A, et al. Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(2):176-82.

126. Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogenet.* 2013;6(1):16.
127. Hersh JH, Saul RA. Health supervision for children with fragile X syndrome. *Pediatrics.* 2011;127(5):994-1006.
128. Kleefstra T, Yntema HG, Nillesen WM, Oudakker AR, Mullaart RA, Geerdink N, et al. MECP2 analysis in mentally retarded patients: implications for routine DNA diagnostics. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(1):24-8.
129. Tejada MI, Penagarikano O, Rodriguez-Revenga L, Martinez-Bouzas C, Garcia B, Badenas C, et al. Screening for MECP2 mutations in Spanish patients with an unexplained mental retardation. *Clin Genet.* 2006;70(2):140-4.
130. Lesca G, Bernard V, Bozon M, Touraine R, Gerard D, Edery P, et al. Mutation screening of the MECP2 gene in a large cohort of 613 fragile-X negative patients with mental retardation. *Eur J Med Genet.* 2007;50(3):200-8.
131. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature.* 2005;434(7031):325-37.
132. Bartnik M, Wisniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska B, Smyk M, Kedzior M, Sobocka K, et al. The usefulness of array comparative genomic hybridization in clinical diagnostics of intellectual disability in children. *Dev Period Med.* 2014;18(3):307-17.
133. Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, et al. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013;17(6):589-99.
134. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjold M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *Journal of Medical Genetics.* 2005;42(9):699-705.
135. Riggs ER, Wain KE, Riethmaier D, Savage M, Smith-Packard B, Kaminsky EB, et al. Towards a Universal Clinical Genomics Database: The 2012 International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium Meeting. *Human Mutation.* 2013;34(6):915-9.
136. Hood L, Rowen L. The human genome project: big science transforms biology and medicine. *Genome Medicine.* 2013;5.
137. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8.

138. Online Mendelian inheritance in Man (OMIM) [Available from: <https://www.omim.org>].
139. Harripaul R, Noor A, Ayub M, Vincent JB. The Use of Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics for Intellectual Disability. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(3).
140. Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet*. 2011;80(2):117-26.
141. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
142. Isakov O, Perrone M, Shomron N. Exome sequencing analysis: a guide to disease variant detection. *Methods Mol Biol*. 2013;1038:137-58.
143. Seaby EG, Pengelly RJ, Ennis S. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Brief Funct Genomics*. 2016;15(5):374-84.
144. Di Resta C, Galbiati S, Carrera P, Ferrari M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *Ejifcc*. 2018;29(1):4-14.
145. Knoppers BM, Minh Thu N, Senecal K, Tasse AM, Zawati MnH. Next-Generation Sequencing and the Return of Results. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016;6(10).
146. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(1):2-5.
147. Johansen Taber KA, Dickinson BD, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Intern Med*. 2014;174(2):275-80.
148. Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med*. 2012;366(8):733-43.
149. Taylor JC, Martin HC, Lise S, Broxholme J, Cazier JB, Rimmer A, et al. Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders. *Nat Genet*. 2015;47(7):717-26.
150. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509):344-7.
151. Raymond FL, Whibley A, Stratton MR, Gecz J. Lessons learnt from large-scale exon re-sequencing of the X chromosome. *Human Molecular Genetics*. 2009;18:R60-R4.

152. Ali-Khan SE, Daar AS, Shuman C, Ray PN, Scherer SW. Whole genome scanning: resolving clinical diagnosis and management amidst complex data. *Pediatr Res*. 2009;66(4):357-63.
153. Sathirapongsasuti JF, Lee H, Horst BAJ, Brunner G, Cochran AJ, Binder S, et al. Exome sequencing-based copy-number variation and loss of heterozygosity detection: ExomeCNV. *Bioinformatics*. 2011;27(19):2648-54.
154. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(8):1023-32.
155. Pfundt R, del Rosario M, Vissers LELM, Kwint MP, Janssen IM, de Leeuw N, et al. Detection of clinically relevant copy-number variants by exome sequencing in a large cohort of genetic disorders. *Genetics in Medicine*. 2017;19(6):667-75.
156. Yao R, Zhang C, Yu T, Li N, Hu X, Wang X, et al. Evaluation of three read-depth based CNV detection tools using whole-exome sequencing data. *Molecular Cytogenetics*. 2017;10.
157. Thevenon J, Duffourd Y, Masurel-Paulet A, Lefebvre M, Feillet F, El Chehadeh-Djebbar S, et al. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin Genet*. 2016;89(6):700-7.
158. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *Jama*. 2014;312(18):1880-7.
159. Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, Bowdin S, Monfared N, Thiruvahindrapuram B, et al. Whole Genome Sequencing Expands Diagnostic Utility and Improves Clinical Management in Pediatric Medicine. *NPJ Genom Med*. 2016;1.
160. Bick D, Fraser PC, Gutzeit MF, Harris JM, Hambuch TM, Helbling DC, et al. Successful Application of Whole Genome Sequencing in a Medical Genetics Clinic. *J Pediatr Genet*. 2017;6(2):61-76.
161. Jacob HJ, Abrams K, Bick DP, Brodie K, Dimmock DP, Farrell M, et al. Genomics in clinical practice: lessons from the front lines. *Sci Transl Med*. 2013;5(194):194cm5.
162. Szego MJ, Meyn MS, Shuman C, Zlotnik Shaul R, Anderson JA, Bowdin S, et al. Views from the clinic: Healthcare provider perspectives on whole genome sequencing in paediatrics. *Eur J Med Genet*. 2018.
163. Dewey FE, Grove ME, Pan C, Goldstein BA, Bernstein JA, Chaib H, et al. Clinical Interpretation and Implications of Whole-Genome Sequencing. *Jama- Journal of the American Medical Association*. 2014;311(10):1035-44.

164. Beale S, Sanderson D, Sanniti A, Dundar Y, Boland A. A scoping study to explore the cost-effectiveness of next-generation sequencing compared with traditional genetic testing for the diagnosis of learning disabilities in children. *Health Technol Assess*. 2015;19(46):1-90.
165. Xiao B, Qiu W, Ji X, Liu X, Huang Z, Liu H, et al. Marked yield of re-evaluating phenotype and exome/target sequencing data in 33 individuals with intellectual disabilities. *Am J Med Genet A*. 2018;176(1):107-15.
166. 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.
167. Wolf SM, Lawrenz FP, Nelson CA, Kahn JP, Cho MK, Clayton EW, et al. Managing incidental findings in human subjects research: analysis and recommendations. *J Law Med Ethics*. 2008;36(2):219-48, 1.
168. Green RC, Berg JS, Berry GT, Biesecker LG, Dimmock DP, Evans JP, et al. Exploring concordance and discordance for return of incidental findings from clinical sequencing. *Genetics in Medicine*. 2012;14(4):405-10.
169. Johnston JJ, Rubinstein WS, Facio FM, Ng D, Singh LN, Teer JK, et al. Secondary variants in individuals undergoing exome sequencing: screening of 572 individuals identifies high-penetrance mutations in cancer-susceptibility genes. *Am J Hum Genet*. 2012;91(1):97-108.
170. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15(7):565-74.
171. Kohane IS, Hsing M, Kong SW. Taxonomizing, sizing, and overcoming the incidentalome. *Genetics in Medicine*. 2012;14(4):399-404.
172. Lohn Z, Adam S, Birch P, Townsend A, Friedman J. Genetics professionals' perspectives on reporting incidental findings from clinical genome-wide sequencing. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161A(3):542-9.
173. Hahir-Kwa JY, Claustres M, Hastings RJ, van Ravenswaaij-Arts C, Christenhusz G, Genuardi M, et al. Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(12):1601-6.
174. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2017;19(2):249-55.

175. Directors ABo. Points to consider for informed consent for genome/exome sequencing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2013;15(9):748-9.
176. Fowler SA, Saunders CJ, Hoffman MA. Variation among Consent Forms for Clinical Whole Exome Sequencing. *Journal of Genetic Counseling*. 2018;27(1):104-14.
177. Ayuso C, Millan JM, Mancheno M, Dal-Re R. Informed consent for whole-genome sequencing studies in the clinical setting. Proposed recommendations on essential content and process. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(10):1054-9.
178. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing (vol 24, pg 2, 2016). *European Journal of Human Genetics*. 2016;24(10):1515-.
179. Meller R. Addressing Benefits, Risks and Consent in Next Generation Sequencing Studies. *Journal of clinical research & bioethics*. 2015;6(6).
180. General Assembly of the World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *The Journal of the American College of Dentists*. 2014;81(3):14-8.
181. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Guideline for Good Clinical Practice. *Journal of postgraduate medicine*. 2001;47(3):199-203.
182. Law 14/2007, 3 July, on biomedical research (BOE, 4 July 2007). *Revista de derecho y genoma humano = Law and the human genome review*. 2007(26):283-325.
183. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2003;60(3):367-80.
184. Sattler JM. *Assesment of children: Behavioural and clinical applications*. 4th Edition 2002.
185. Malaspina D, Reichenberg A, Weiser M, Fennig S, Davidson M, Harlap S, et al. Paternal age and intelligence: implications for age-related genomic changes in male germ cells. *Psychiatr Genet*. 2005;15(2):117-25.
186. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012;488(7412):471-5.

187. Goldmann JM, Wong WS, Pinelli M, Farrah T, Bodian D, Stittrich AB, et al. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nat Genet.* 2016;48(8):935-9.
188. Rahbari R, Wuster A, Lindsay SJ, Hardwick RJ, Alexandrov LB, Turki SA, et al. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nat Genet.* 2016;48(2):126-33.
189. Wong WSW, Solomon BD, Bodian DL, Kothiyal P, Eley G, Huddleston KC, et al. New observations on maternal age effect on germline de novo mutations. *Nature Communications.* 2016;7.
190. Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2005;6(1):46-57.
191. Han JY, Jang JH, Park J, Lee IG. Targeted Next-Generation Sequencing of Korean Patients With Developmental Delay and/or Intellectual Disability. *Front Pediatr.* 2018;6:391.
192. Wang WD, Corominas R, Lin GN. De novo Mutations From Whole Exome Sequencing in Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders: From Discovery to Application. *Frontiers in Genetics.* 2019;10.
193. Taylor JL, Debost JPG, Morton SU, Wigdor EM, Heyne HO, Lal D, et al. Paternal-age-related de novo mutations and risk for five disorders. *Nat Commun.* 2019;10(1):3043.
194. Gratten J, Wray NR, Peyrot WJ, McGrath JJ, Visscher PM, Goddard ME. Risk of psychiatric illness from advanced paternal age is not predominantly from de novo mutations. *Nat Genet.* 2016;48(7):718-24.
195. Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayer T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet.* 2012;380(9854):1674-82.
196. Simonoff E, Pickles A, Chadwick O, Gringras P, Wood N, Higgins S, et al. The Croydon Assessment of Learning Study: prevalence and educational identification of mild mental retardation. *J Child Psychol Psychiatry.* 2006;47(8):828-39.
197. Ghosh A, Schlecht H, Heptinstall LE, Bassett JK, Cartwright E, Bhaskar SS, et al. Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing. *Arch Dis Child.* 2017;102(11):1019-29.
198. Jones MA, Rhodenizer D, da Silva C, Huff IJ, Keong L, Bean LJ, et al. Molecular diagnostic testing for congenital disorders of glycosylation (CDG): detection rate for single gene testing and next generation sequencing panel testing. *Mol Genet Metab.* 2013;110(1-2):78-85.

199. Tarailo-Graovac M, Wasserman WW, Van Karnebeek CD. Impact of next-generation sequencing on diagnosis and management of neurometabolic disorders: current advances and future perspectives. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(4):307-9.
200. Kagami M, Yanagisawa A, Ota M, Matsuoka K, Nakamura A, Matsubara K, et al. Temple syndrome in a patient with variably methylated CpGs at the primary MEG3/DLK1:IG-DMR and severely hypomethylated CpGs at the secondary MEG3:TSS-DMR. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):42.
201. Vissers L, van Nimwegen KJM, Schieving JH, Kamsteeg EJ, Kleefstra T, Yntema HG, et al. A clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. *Genet Med.* 2017;19(9):1055-63.
202. Soden SE, Saunders CJ, Willig LK, Farrow EG, Smith LD, Petrikin JE, et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):265ra168.

IX – ANEXOS

ANEXO 1. DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.

Publicaciones

-Sánchez Soler MJ, Serrano Antón AT, López González V, Ballesta Martínez MJ, Guillen Navarro E. Primer caso español de discapacidad intelectual sindrómica con dismorfia facial, crisis y anomalías de extremidades por mutaciones bialélicas en el gen OTUD6B. *An Pediatr (Barc)*, 2019 May 27.

Comunicaciones a congresos

-MJ Ballesta Martínez. Análisis de resultados de secuenciación masiva en 60 pacientes con discapacidad intelectual. V Jornadas de Investigación y Doctorado: EIDUCAM Campus de los Jerónimos. UCAM. Murcia. Mayo 2019

-L. Alías, L. González-Quereda, MJ. Ballesta, A. Nascimento, N. Bejarano, F. Munell, M. Tirado, F. March, E. Martínez, M. Baena, A. Lasa, E. F. Tizzano, M. Gallano, S. Bernal. Translation of the research to diagnosis through next generation sequencing. European Human Genetics Conference, Gothenburg, Junio 15-18, 2019.

-MJ Sanchez Soler, AT Serrano Anton, V Lopez Gonzalez, MJ Ballesta Martínez, L Rodriguez, M Segura, B Rodriguez, Ll Armengol, E Guillen Navarro. Nuevo caso de discapacidad intelectual sindrómica con crisis y dismorfia por mutaciones bialélicas en el gen OTUD6B. II Congreso Interdisciplinar de Genética Humana Madrid. 3-5 Abril 2019.

-V Lopez Gonzalez, MJ Sanchez Soler, F Santos, P Carbonell, K Heath, M Aza, AT Serrano Anton, MJ Ballesta Martínez, E Guillen Navarro. Síndrome Myhre. Importancia de la valoración fenotípica evolutiva. II Congreso Interdisciplinar de Genética Humana Madrid. 3-5 Abril 2019.

- MJ Ballesta Martínez, V Lopez Gonzalez, MJ Sanchez Soler, AT Serrano Anton, L Rodriguez Peña, R Gil Ferrer, M Barreda Sanchez, E Guillen Navarro. Síndrome de retraso del desarrollo-talla baja-rasgos particulares-cabello escaso (MIM#616901): caracterización clínica y molecular de un caso clínico. III Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca 19-20 Noviembre 2018
- MC Martinez Romero, MJ Ballesta Martinez, V Lopez Gonzalez, M Barreda Sanchez, L Rodriguez. T Martinez Menchón, E Guillen Navarro. Identification of novel mutations in FGFR2 gene in two families with LADD syndrome by next-generation sequencing. European Human Genetics Conference, Milan. 16-19 Junio 2018.
- MJ Sanchez Soler, AT Serrano Anton, V Lopez Gonzalez, MJ Ballesta Martínez, M Segura, B Rodriguez, L Armengol, E Guillen Navarro. New case of S. Sifrim-Hirz-Weiss (#617159) caused by de novo mutation in CHD4 gene. European Human Genetics Conference, Milan. 16-19 Junio 2018.
- AT Serrano Anton, V Lopez Gonzalez, MJ Sanchez Soler, MJ Ballesta Martínez, L Rodriguez Peña, E Guillen Navarro. Autosomal recessive Intellectual disability type 46, caused by homozygous mutation in NSDT1 gene (OMIM#616116): a case report. European Human Genetics Conference, Milan. 16-19 Junio 2018.
- MJ Ballesta Martínez. Rendimiento diagnóstico de la secuenciación masiva en pacientes con discapacidad intelectual. IV Jornadas de Investigación y Doctorado: Women in Science de la EIDUCAM. Campus de los Jerónimos. UCAM. Murcia. 18 mayo 2018
- M. Ballesta-Martinez, V. López-Gonzalez, A. Andreo-Vidal, M. Barreda-Sánchez, MJ. Sánchez-Soler, L. Rodríguez-Peña, A.T. Serrano-Antón, T.Martínez-Menchón, R, Gil-Ferrer, MC Martínez-Romero, G. Glóver5 P. Sánchez-Pedreño, J. Frias, E. Guillen-Navarro Family with lacrimo-auriculo-dento-digital syndrome: clinical description and molecular characterization. 7th International Conference on Ectodermal Dysplasia. I International Course on Ectodermal Dysplasia. Murcia 12-14 Abril 2018

- M. Ballesta-Martínez, V. López-González, A. Andreo-Vidal, M. Barreda-Sánchez, MJ. Sánchez-Soler, L. Rodríguez-Peña, A.T. Serrano-Antón, T. Martínez-Menchón, R. Gil-Ferrer, MC Martínez-Romero, P. Sánchez-Pedreño, J. Frias, E. Guillen-Navarro. Clinical description of two cases of Trichothiodystrophy 4 due to homozygous mutation in MLPKIP in two unrelated families from the same geographical area, suggesting a common founder. 7th International Conference on Ectodermal Dysplasia. I International Course on Ectodermal Dysplasia. Murcia 12-14 Abril 2018
- MJ Ballesta Martínez. Nueva mutación en gen KAT6B en paciente con diagnóstico clínico de síndrome de Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson. X Congreso Internacional de Enf Raras. V Simposium Internacional de Lipodistrofias.III Congreso Nacional de sdme de Xfrágil. UCAM, Murcia. 24-25 Noviembre 2017
- AT Serrano Anton, MJ Sanchez Soler, V Lopez Gonzalez, MJ Ballesta Martinez, E Guillen Navarro. Rendimiento diagnóstico de la secuenciación exómica en discapacidad intelectual y /o anomalías congénitas múltiples de etiología no filiada. X Congreso Internacional de Enf Raras.V Simposium Internacional de Lipodistrofias.III Congreso Nacional de sdme de Xfragil. UCAM, Murcia. 24-25 Noviembre 2017
- MJ Sanchez Soler, V Lopez Gonzalez, AT Serrano Anton, MJ Ballesta Martinez, E Guillen Navarro. Nuevo caso de S. Wiedemann-Steinert por variante en gen KMT2A de novo no descrita previamente. X Congreso Internacional de Enf Raras.V Simposium Internacional de Lipodistrofias.III Congreso Nacional de sdme de Xfragil. UCAM, Murcia. 24-25 Noviembre 2017
- MJ Ballesta Martínez, V Lopez Gonzalez, MJ Sanchez Soler, AT Serrano Anton, E Guillen Navarro. Discapacidad Intelectual y anomalías congénitas: ¿Qué rendimiento diagnóstico nos ofrece el arrayCGH? III Jornadas de Investigación y Doctorado: Doctorado Industrial de la EIDUCAM Campus de los Jerónimos. UCAM. Murcia. 16 junio 2017

- MJ Sanchez Soler, V Lopez Gonzalez, MJ Ballesta Martínez, AT Serrano Anton, E Guillen Navaro. Síndrome de Smith-Lemli-Opitz: dos casos sin discapacidad intelectual asociada. 66 Congreso de la Asociación Española de Pediatría. Zaragoza. 7-9 junio 2017
- AT Serrano Antón, AM Martínez Álvarez, V López González, M José Sánchez Soler, B Rodríguez Santiago, M J Ballesta Martínez. Rendimiento diagnóstico de secuenciación exómica en una cohorte de 72 pacientes con discapacidad intelectual y/o anomalías congénitas múltiples de etiología no filiada. 65 Congreso de la Asociación Española de Pediatría. Santiago de Compostela. 1-3 junio 2017
- M. Ballesta-Martinez, V. López-González, M. Sánchez-Soler, L. Rodríguez-Peña, A. Serrano-Antón, B. Rodríguez-Santiago, L. Armengol-Dulcet, M. Garcia-Hoyos, E. Guillen-Navarro. SOX10 mutations in Waardenburg syndrome: clinical and molecular characterization of three new patients. European Human Genetics Conference, Copenhagen, Dinamarca. 27-30 Mayo 2017
- MJ Ballesta Martínez, V López González, MJ Sánchez Soler, AT Serrano Antón, L Rodríguez Peña, R Gil Ferrer, B Rodríguez, Ll Armengol Dulcet, E Guillén Navarro. Paciente con Cutis Laxa AR tipo IIIA: Importancia de la combinación de estudios genómicos para el diagnóstico. I Congreso Interdisciplinar de Genética Humana. Madrid. 25-28 abril 2017
- S.D. Tatu, A. Medrano, M.J. Ballesta-Martínez, J. Dopazo, S. García-Miñaur, B. Gener, E. Guillén, F. Ramos, J. Rosell, A. Sánchez, F. Santos, I. Tejada, M. Milà, L.A. Pérez-Jurado. Grupo CIBERER: U735 Unidad de Genética, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona. Otros grupos: U726; U753; U715. Programa CIBERER de Enfermedades raras No Diagnosticadas (ENoD): Contribución al diagnóstico molecular preciso de pacientes no resueltos mediante una aproximación colaborativa. X Reunión Anual CIBERER, San Lorenzo del Escorial, Madrid. 23-24 Marzo 2017.

- M Ballesta Martínez, V. López-Gonzalez, M. Sánchez-Soler, L. Rodríguez-Peña, B. Rodríguez-Santiago, T.Martínez-Menchón, J. Ferrando-Barbera, L. Armengol-Dulcet, E. Guillen-Navarro Clinical description of two cases of trichothiodystrophy 4 (OMIM#234050) due to homozygous mutation in MLPKIP in two unrelated families from the same geographical area, suggesting a common founder European Human Genetics Conference. 21-24 Mayo 2016 Barcelona
- V. López-González, M. J. Ballesta-Martínez, M. J. Sánchez-Soler, L. Rodríguez-Peña, B. Rodríguez-Santiago, L. Armengol-Dulcet, E. Guillén-Navarro. Exome sequencing uncovers homozygous mutation in PCDHB10 in two brothers with syndromic intellectual disability and palmoplantar lipomatosis European Human Genetics Conference.21-24 Mayo 2016 Barcelona
- M. Sánchez Soler, I. Valenzuela, L. Fernández, E. Vallespín, T. Vendrell, M. Ballesta-Martínez, V. López-González, V. Fernández-Montaño, F. Nieto, K. Ibañez, J. Silla-Castro, A. del Pozo, F. Santos-Simarro. Further evidence of the c.314G>A (p.Arg105Gln) mutation in the SMARCE1 gene as a rare cause of Coffin-Siris syndrome European Human Genetics Conference. 21-24 Mayo 2016 Barcelona.

Premios

A la mejor comunicación oral en congresos:

- F Santos Simarro, A Martinez, I Valenzuela, V Lopez, MJ Ballesta, MJ Sanchez, S Sousa, A Cueto, B Gener, A Barcia, E Vallespin, A del Pozo, L Fernández, S Garcia, M Palomares. Caracterización clínica y molecular de una cohorte de 52 pacientes con alteraciones del complejo BAF II Congreso Interdisciplinar de Genética Humana. Madrid. 3-5 Abril 2019.

Proyectos

- Participación como investigador colaborador en el proyecto coordinado de "caracterización y contribución al diagnóstico genético en una cohorte de pacientes con discapacidad intelectual, autismo y/o epilepsia" concedido por la Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, por parte del CIBERER. Inicio 2016 y final 2018.

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE NGS

**CONSENTIMIENTO INFORMADO (C-GEN-HCUVA-004)
ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA NGS**

SECCIÓN GENÉTICA MÉDICA. HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO VIRGEN
ARRIXACA

ESTUDIO GENÉTICO MEDIANTE TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)**Descripción de la técnica**

Se trata de una tecnología molecular que es capaz de determinar la secuencia del ADN de un número variable de genes *de forma simultánea*. Este tipo de abordaje diagnóstico del estudio de los genes es útil en aquellas enfermedades genéticas causadas por más de un gen. Cuando estamos ante un paciente con sospecha de una enfermedad genética pero que no se es capaz de orientar clínicamente el gen candidato, esta tecnología resulta idónea, ya que ofrece la posibilidad de estudiar la totalidad de los 22.000 genes, mediante la secuenciación del exoma, con el fin de intentar identificar la posible causa de la enfermedad o del trastorno genético.

¿Cómo se realiza?

Habitualmente el estudio se dirige inicialmente al análisis de un grupo o panel de genes relacionados con la enfermedad que ha motivado el estudio. En el caso de no identificar ninguna alteración, si existe indicación médica, se puede completar con el estudio del exoma completo. Aun así, tras la aplicación de estos estudios, es posible que no se pueda encontrar la causa de la enfermedad.

Limitaciones de la NGS

Los estudios de secuenciación masiva son estudios complejos que generan muchos datos que precisaran de una exhaustiva evaluación para determinar cuáles pueden ser o no relevantes. También existen limitaciones técnicas, como regiones en los genes que pueden resultar difíciles de analizar y es importante conocerlo para poder interpretar correctamente los resultados.

Si se ha realizado el estudio de un panel de genes, solo se van a detectar variantes en los genes incluidos, no detectando variantes posiblemente causales en otros genes. Es

importante por tanto conocer el listado de genes que se han analizado para completar el estudio diagnóstico.

¿Qué tipos de resultados podemos obtener en la NGS?

Hay 4 tipos de resultados posibles:

1. Detección de una variante patogénica, causal, que explique el fenotipo del paciente.
2. Detección de variantes de significado incierto. Estos resultados van a ocasionar la necesidad de estudiar a otros miembros de la familia (estudio de segregación de la variante), así como solicitar en ocasiones, estudios complementarios para intentar atribuir una posible patogenicidad a la variante.
3. No detección de ninguna variante causal ni de significado incierto.
4. En caso de realizar secuenciación del exoma, se pueden detectar hallazgos incidentales: detección de variantes patogénicas no relacionados con la enfermedad que motivó el estudio, pero que pueden tener implicaciones para la salud del paciente y/o de sus familiares.

¿Qué hallazgos se van a informar tras un estudio de NGS?

Se informan:

- Variantes causales o relacionadas con la enfermedad que indicó el estudio.
- Si el paciente o el tutor legal lo autoriza, se informarán los hallazgos incidentales que pudieran tener consecuencias importantes para la salud del paciente o de sus familiares (ejemplo, mutaciones en genes causantes de enfermedades cardiovasculares que predisponen a muerte súbita o en genes que predisponen al desarrollo de cáncer hereditario).
- Variantes que confirman el estado de portador (sano) de una enfermedad (ejemplo, fibrosis quística del páncreas), en aquellas enfermedades en las que la frecuencia de portadores en nuestra población sea mayor o igual a 1/50.

No se informan:

- Variantes de significado incierto sin relación causal aparente con el motivo del estudio.
- Variantes que confirman el estado de portador (sano) de una mutación causante de una enfermedad, en enfermedades en las que la frecuencia de portadores en nuestra población sea baja, salvo en casos en los que haya consanguinidad en la pareja.

Relevancia de revisar los estudios de secuenciación masiva en el tiempo, según el avance el conocimiento en genética

El estudio sobre la función de los genes y su papel en determinadas enfermedades genéticas avanza de forma muy rápida. Una variante considerada de significado incierto en un momento dado deberá ser revisada más adelante, puesto que puede haber cambios en su clasificación con el avance del conocimiento. Por ello se recomienda la reevaluación del caso en un tiempo (2-3 años) para revisar la situación clínica así como realizar un reanálisis del estudio de NGS por si se dispone de nueva información que

podiera modificar la clasificación de la variante o bien la identificación de variantes en genes de reciente descripción no detectados con anterioridad.

Procedimiento para la realización de la NGS:

Es necesario obtener una muestra de sangre (3-6 ml) o de cualquier otro tejido del que se pueda extraer ADN. La muestra de sangre se obtiene mediante una punción de una vena de la parte interior del codo o del dorso de la mano.

No es preciso acudir en ayunas para el análisis.

Una vez obtenida la muestra, se extrae el ADN de las células (en una muestra de sangre, los leucocitos o glóbulos blancos), parte del cual se utiliza para realizar el estudio y el resto se almacena por si se precisaran estudios posteriores. En algunas ocasiones, como ya se ha mencionado, se precisa la obtención de muestra de sangre de los padres o de otros familiares para la interpretación de los resultados.

Tiempos para resultados El plazo estimado de resultados se estima en unos 6 meses, según la extensión del estudio.

Riesgos

1. Riesgos generales: Los riesgos asociados a la punción venosa, si los hay suelen ser leves (hematoma en el punto de punción, mareo o desmayo).

2. Riesgos personalizados: si la enfermedad que padece el individuo genera algún riesgo añadido a los anteriores.

Indicaciones del estudio: Identificar la causa genética de la enfermedad del paciente.

Este hecho además de confirmar el diagnóstico, genera otros beneficios como conocer información sobre el pronóstico de la enfermedad así como permitir ofrecer opciones reproductivas a los pacientes y sus padres y el estudio de otros miembros de la familia en riesgo.

Con este documento se solicita su autorización para realizar el procedimiento, y para tener acceso a la información de la Historia Clínica con fines docentes o científicos, ya que está siendo atendido en un Hospital Universitario. Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y será tratada en conformidad con la Ley Orgánica de Protección de Datos 11/2018 y los derechos conlleva de acceso, cancelación, rectificación y oposición.

En caso de obtener su autorización, los resultados de los estudios de secuenciación masiva serán almacenados y custodiados en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca – IMIB Arrixaca y podrán ser compartidos, de forma anónima con otros grupos de investigación con el fin de aumentar el conocimiento sobre las enfermedades genéticas.

CONSENTIMIENTO INFORMADO (C-GEN-HCUVA-004)**ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA NGS**

Autorizo a que el ADN extraído de mí / mi hijo / la persona bajo mi tutela legal sea analizado mediante técnicas de secuenciación masiva para el estudio molecular de su problema médico:

Tipo de análisis a realizar:

- A) Análisis de un panel de genes: se analizarán exclusivamente los genes conocidos y relacionados con la enfermedad genética.
- B) Análisis ampliado: se realizará un análisis inicial de los genes conocidos y relacionados con la enfermedad, seguido de un análisis ampliado de otros genes en caso de no detectar la causa, pudiendo llegar al exoma completo, si existe indicación médica.

He entendido que en cualquiera de las dos opciones es posible encontrar hallazgos de significado incierto.

Si he optado por el análisis ampliado, he entendido que además pueden encontrarse hallazgos incidentales no relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que ha indicado el estudio:

En tal caso quiero / no quiero ser informado de los hallazgos incidentales que se pudieran detectar y que pudieran tener consecuencias importantes para mi salud o la de mis familiares.

Quiero / No quiero que la muestra se destruya tras realizar el estudio.

Autorizo / No autorizo a que el excedente de la muestra de ADN conservada en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca – IMIB Arrixaca, pueda ser compartida de forma anónima con otros grupos que investiguen sobre la misma enfermedad.

He entendido que el conocimiento médico avanza con el paso del tiempo y que sería conveniente en caso de no haber obtenido un diagnóstico molecular, solicitar una revisión en un tiempo para reevaluar la situación y comprobar si se dispone de nueva información que pudiera modificar la interpretación inicial de los resultados.

1. Firma del/la paciente:

D./D.^a con D.N.I.

He sido informado de la prueba que se me va a realizar, me han explicado los riesgos, y tipos de resultados posibles, lo he comprendido y estoy satisfecho con la información recibida.

Doy mi consentimiento para que se realice la prueba y a ser informado/a de los resultados según lo arriba dispuesto. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno, sin que esta decisión repercuta en mis cuidados posteriores.

Fecha: / /

Firma:

2. Firma de familiar o tutores

El paciente D./Dña. no tiene capacidad para decidir en este momento.

D. /D.^a. con D.N.I., y en calidad de....., he sido informado/a suficientemente de la prueba que se va a realizar al paciente y doy expresamente mi consentimiento en su nombre. Acepto de forma voluntaria y puedo retirar este consentimiento si lo creo oportuno.

Fecha: / /

Firma del tutor o familiar

ANEXO 3. VARIABLES RECOGIDAS EN EL ESTUDIO.

**ESTUDIO DE RENDIMIENTO DE EXOMA CLINICO EN PACIENTES CON
DISCAPACIDAD INTELECTUAL EN MURCIA**

Número de Historia Clínica (NHC)

Iniciales PACIENTE

Fecha de Nacimiento

SEXO: Varón-mujer

DATOS FAMILIARES:

EDAD DE LA MADRE (al nacimiento del paciente)

EDAD DEL PADRE (al nacimiento del paciente)

CONSANGUINIDAD no-si

ANTECEDENTES FAMILIARES de DI: no - si

ETNIA: caucásico-marroquí-sudamericano-gitano-otros

ANTECEDENTES PERSONALES:

TIPO DE GESTACIÓN: espontánea-TRA (IA, FIV-ICSI)-donación de gametos

DATOS PRENATALES: No- TN aumentada - riesgo aneuploidías - CIR -
malformación fetal - alteración del líquido amniótico

PARTO/EDAD GESTACIONAL: término-pretérmino-postérmino

PERINATAL: normal-reanimación superficial o profunda

DATOS CLÍNICOS:

RASGOS PARTICULARES: no-si

ANOMALÍAS EN PC: no-microcefalia relativa - microcefalia - macrocefalia -
macrocefalia relativa

ALTERACIONES DEL PESO: no-bajo peso (<2DE)-sobrepeso (>2DE)

ALTERACIONES DE LA TALLA: no-talla baja (<2DE) - talla alta (>2DE)

HIPERCRECIMIENTO GRAL / MICROSOMIA:

DESARROLLO MOTOR: normal - retraso

DESARROLLO DEL LENGUAJE: normal - retraso

DISCAPACIDAD INTELECTUAL: leve – moderada - grave

TEST/ESCALA DE DESARROLLO y puntuación

TIPO DE ESCOLARIZACIÓN: mismo curso con apoyo – adaptación curricular leve - adaptación curricular significativa – Aula Abierta – no escolarizado

EPILEPSIA: no - si

TRASTORNO DE CONDUCTA: no - si

TEA: no - si

ALTERACION DEL SUEÑO: no - si

ANOMALÍAS ASOCIADAS:

VALORACION CARDIOLÓGICA: normal – cardiopatía estructural - alteración del ritmo – no realizada

Tipo de cardiopatía estructural

RMN CEREBRAL: normal – malformación - no realizada

Tipo de alteración cerebral

EEG: normal – alterado – no realizado

ECOGRAFIA ABDOMINAL: normal – malformación – no realizada

Tipo de alteración en ecografía abdominal

VALORACION OFTALMOLÓGICA: normal – afectación agudeza visual – malformativo – no realizada

VALORACION AUDITIVA: normal – hipoacusia – sordera congénita – no realizado

APARATO RESPIRATORIO: normal – anormal - no realizado

Tipo de alteración respiratoria

ALTERACION ORL: normal – malformación paladar – fisura labial – malformación auricular

TRAUMATOLOGIA: normal – malformación columna - extremidades – paraparesia - no realizada

CLASIFICACIONES:

SINDRÓMICO: no -si

PRESENCIA DE ANOMALÍAS CONGÉNITAS: no - si

NUMERO de ANOMALIAS (número ordinal)

REEVALUADO: no - si

ESTUDIOS SOLICITADOS PREVIO A EXOMA:

CARIOTIPO: si – no -no realizado

ARRAYCGH: si – no

FISH: si - no

Tipo estudio FISH

ESTUDIO METABÓLICO: si - no

Tipo de estudio metabólico

ESTUDIOS DE METILACION: si - no

ESTUDIOS MOLECULARES DIRIGIDOS: si - no

Número de estudios moleculares dirigidos

Tipo de estudio molecular 1: MLPA, secuenciación, panel NGS

Tipo de estudio molecular 2: MLPA, secuenciación, panel NGS

Tipo de estudio molecular 3: MLPA, secuenciación, panel NGS

Tipo de estudio molecular 4: MLPA, secuenciación, panel NGS

ESTUDIOS TRAS EXOMA: no - si

Cuáles?

COSTES:

COSTES ESTUDIOS METABOLICOS

COSTES ESTUDIOS MOLECULARES

COSTES TOTALES PREVIOS A WES: COSTES

COSTES ESTUDIOS TRAS EXOMA

VARIABLES DE TIEMPO:

FECHA DE PRIMERA VISITA EN CONSULTA

EDAD PRIMERA VALORACIÓN EN CONSULTA (AÑOS)

EDAD A LA QUE SE SOLICITA EXOMA CLÍNICO (AÑOS)

FECHA SOLICITUD EXOMA CLINICO

NUMERO DE VISITAS HASTA PEDIR EXOMA CLINICO

MESES DESDE PRIMERA VISITA HASTA PEDIR EXOMA CLINICO

FECHA ULTIMA VISITA

FECHA DIAGNOSTICO MOLECULAR

EDAD DIAGNOSTICO MOLECULAR (AÑOS)

NUMERO VISITAS TRAS EXOMA PARA CONFIRMAR DIAGNOSTICO

EXOMA CLINICO

RESULTADOS DEL EXOMA CLÍNICO: Normal-VOUS-Patogénica-
Probablemente patogénica

VARIANTES PATOGENICAS O PROB PATOGENICAS:

TIPO: *frameshift* – *nonsense* – *missense* – *splicing* - *nonframeshift*

LITERATURA: descrita – no descrita

Codón/proteína

Gen

PATRON DE HERENCIA GEN: AD – AR – lig X

HERENCIA: heredada - de novo – no posible, no padres

VOUS 1

TIPO: *frameshift*- *missense* - *nonsense* - *splicing* - *nonframeshift*

GEN VOUS 1

P HERENCIA VOUS 1: AD – AR – lig X

VOUS 2

TIPO: *frameshift*- *missense* - *nonsense* - *splicing* - *nonframeshift*

GEN VOUS 1

P HERENCIA VOUS 1: AD – AR – lig X

VOUS 3

TIPO: *frameshift*- *missense* - *nonsense* - *splicing* - *nonframeshift*

GEN VOUS 1

P HERENCIA VOUS 1: AD – AR – lig X

VOUS 4

TIPO: *frameshift*- *missense* - *nonsense* - *splicing* - *nonframeshift*

GEN VOUS 1

P HERENCIA VOUS 1: AD – AR – lig X

INCIDENTAL FINDINGS: no – portador sano – predisposición a cáncer -
patología edad adulta

Cuáles?

ESTUDIOS DE SEGREGACION EN PADRES: no – si – no acuden

ESTUDIOS DE SEGREGACION EN OTROS FAMILIARES: no - si

CLASIFICACION FINAL DE LA VOUS 1: no patogénica – patogénica – VOUS –
no posible

CLASIFICACION FINAL DE LA VOUS 2: no patogénica – patogénica – VOUS –
no posible

CLASIFICACION FINAL DE LA VOUS 3: no patogénica – patogénica – VOUS – no posible

CLASIFICACION FINAL DE LA VOUS 4: no patogénica – patogénica – VOUS – no posible

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO:

DIAGNÓSTICO FINAL: confirmado – no confirmado – diagnóstico probable – VOUS sin segregación probable – VOUS sin segregación improbable

MOTIVO DE NO DIAGNOSTICO PREVIO A WES: no sindrómico - descripción reciente - presentación atípica – no reconocido – dentro de entidades sugeridas

PATRÓN DE HERENCIA FINAL: AD – AR – lig X

HERENCIA FINAL: AD de novo – AD heredada - AR de novo - AR heredada – ligada a X de novo – ligada a X heredada – AD mosaico

ANEXO 4. RECOMENDACIONES PARA CLASIFICAR LAS VARIANTES DETECTADAS EN EXOMA SEGÚN LA ACMG (141)

Criteria for Classifying Pathogenic Variants

Very strong evidence of pathogenicity

PVS1 Null variant (nonsense, frameshift, canonical +/-1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multi-exon deletion) in a gene where loss of function (LOF) is a known mechanism of disease

Caveats:

- Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g. *GEAP*, *MYH7*)
- Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene
- Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact
- Use caution in the presence of multiple transcripts

Strong evidence of pathogenicity

PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change

Example:

Val->Leu caused by either G>C or G>T in the same codon

Caveat:

Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level

PS2 *De novo* (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history

Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, *etc.* can contribute to non-maternity

PS3 Well-established *in vitro* or *in vivo* functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product

Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well-established

PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared to the prevalence in controls

Note 1: Relative risk (RR) or odds ratio (OR), as obtained from case-control studies, is >5.0 and the confidence interval around the estimate of RR or OR does not include 1.0. See manuscript for detailed guidance.

Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.

Moderate evidence of pathogenicity

PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g. active site of an enzyme) without benign variation

PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (see Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes or ExAC

Caveat: Population data for indels may be poorly called by next generation sequencing

PM3 For recessive disorders, detected in *trans* with a pathogenic variant

Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase

PM4 Protein length changes due to in-frame deletions/insertions in a non-repeat region or stop-loss variants

PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before

Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys

Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level

PM6 Assumed *de novo*, but without confirmation of paternity and maternity

Supporting evidence of pathogenicity

- PP1 Co-segregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease
Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data
- PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and where missense variants are a common mechanism of disease
- PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc)
Caveat: As many *in silico* algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.
- PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology
- PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation

Criteria for Classifying Benign Variants

Stand-Alone evidence of benign impact

- BA1 Allele frequency is above 5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes, or ExAC

Strong evidence of benign impact

- BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see table 6)
- BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder with full penetrance expected at an early age
- BS3 Well-established *in vitro* or *in vivo* functional studies shows no damaging effect on protein function or splicing
- BS4 Lack of segregation in affected members of a family
Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (*i.e.* cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.

Supporting evidence of benign impact

- BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease
- BP2 Observed in *trans* with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder; or observed in *cis* with a pathogenic variant in any inheritance pattern
- BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function
- BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc)
Caveat: As many *in silico* algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.
- BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease
- BP6 Reputable source recently reports variant as benign but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation
- BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved

 Rules for Combining Criteria to Classify Sequence Variants

Pathogenic

- 1 1 Very Strong (PVS1) *AND*
 - a. ≥ 1 Strong (PS1–PS4) *OR*
 - b. ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) *OR*
 - c. 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 Supporting (PP1–PP5) *OR*
 - d. ≥ 2 Supporting (PP1–PP5)
- 2 ≥ 2 Strong (PS1–PS4) *OR*
- 3 1 Strong (PS1–PS4) *AND*
 - a. ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) *OR*
 - b. 2 Moderate (PM1–PM6) *AND* ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) *OR*
 - c. 1 Moderate (PM1–PM6) *AND* ≥ 4 Supporting (PP1–PP5)

Likely Pathogenic

- 1 1 Very Strong (PVS1) *AND* 1 Moderate (PM1–PM6) *OR*
- 2 1 Strong (PS1–PS4) *AND* 1–2 Moderate (PM1–PM6) *OR*
- 3 1 Strong (PS1–PS4) *AND* ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) *OR*
- 4 ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) *OR*
- 5 2 Moderate (PM1–PM6) *AND* ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) *OR*
- 6 1 Moderate (PM1–PM6) *AND* ≥ 4 Supporting (PP1–PP5)

Benign

- 1 1 Stand-Alone (BA1) *OR*
- 2 ≥ 2 Strong (BS1–BS4)

Likely Benign

- 1 1 Strong (BS1–BS4) and 1 Supporting (BP1–BP7) *OR*
 - 2 ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
-

* Variants should be classified as Uncertain Significance if other criteria are unmet or the criteria for benign and pathogenic are contradictory.

ANEXO 5. APROBACIÓN DEL ESTUDIO POR EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HCUVA



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 17/12/2019, acta 11/2019 ha evaluado la propuesta de la investigadora **Dra. M^a Juliana Ballesta Martínez** referida al estudio:

Título: Estudio de rendimiento diagnóstico y análisis de resultados de la secuenciación del exoma clínico en pacientes con discapacidad intelectual.

Código Interno: 2019-12-7-HCUVA

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIm emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta que dicho estudio sea realizado por la **Dra. M^a Juliana Ballesta Martínez** como investigadora principal en el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*

Lo que firmo en Murcia, a 19 de diciembre de 2019

Fdo:

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca

ANEXO 6. PROPUESTA DE ALGORITMO DIAGNÓSTICO EN DI

