

Contribución de las nuevas técnicas de genética al diagnóstico del TEA



NIM Genetics
New Integrated Medical Genetics

KaryoNIM[®] Stem Cells

OncoNIM[®]

KaryoNIM[®] Postnatal

Liderando el diagnóstico genético

KaryoNIM[®] Prenatal

The image is a collage of various scientific and medical illustrations. It includes a micrograph of cells, a 3D model of a virus or cell, a microscopic view of cells, a photograph of a baby, a photograph of a pregnant woman, a microscopic view of chromosomes, and a microscopic view of bacteria. The text 'NIM Genetics' is prominently displayed at the top, with the tagline 'New Integrated Medical Genetics' below it. The services listed are 'KaryoNIM[®] Stem Cells', 'OncoNIM[®]', 'KaryoNIM[®] Postnatal', 'Liderando el diagnóstico genético', and 'KaryoNIM[®] Prenatal'.

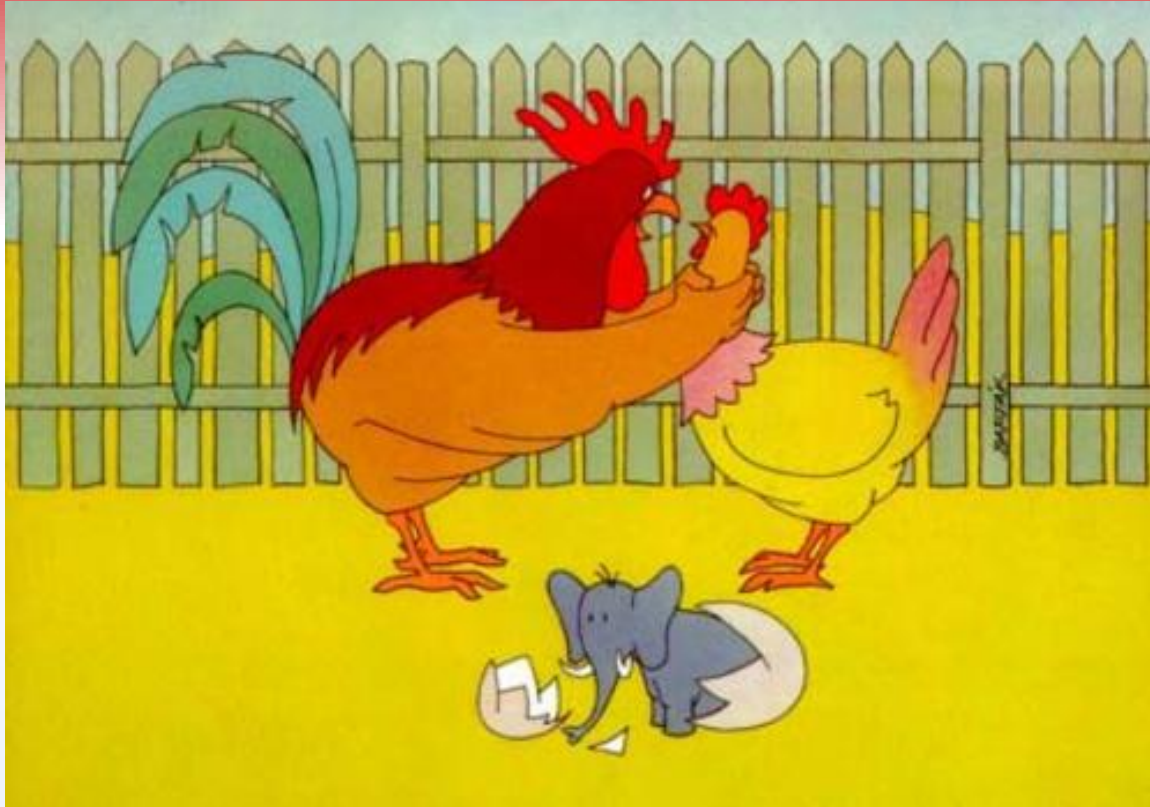
Dr. Javier Suela

Contribución de las nuevas técnicas de genética al diagnóstico del TEA

Programa:

1. Introducción: ¿Qué es la genética médica?
 1. El cariotipo
 2. Mutaciones génicas
 3. VNC
 4. Array-CGH
2. Descripción del autismo
 1. Introducción
 2. Bases genéticas
3. El autismo como enfermedad genética
 1. Síndromes asociados a TEA.
 2. VNCs asociadas a TEA no sindrómico.
 3. Alteraciones génicas.
4. Futuras herramientas de diagnóstico: secuenciación masiva

1. Introducción: ¿Qué es la genética médica?



La genética es el estudio de la herencia en las especies vivas

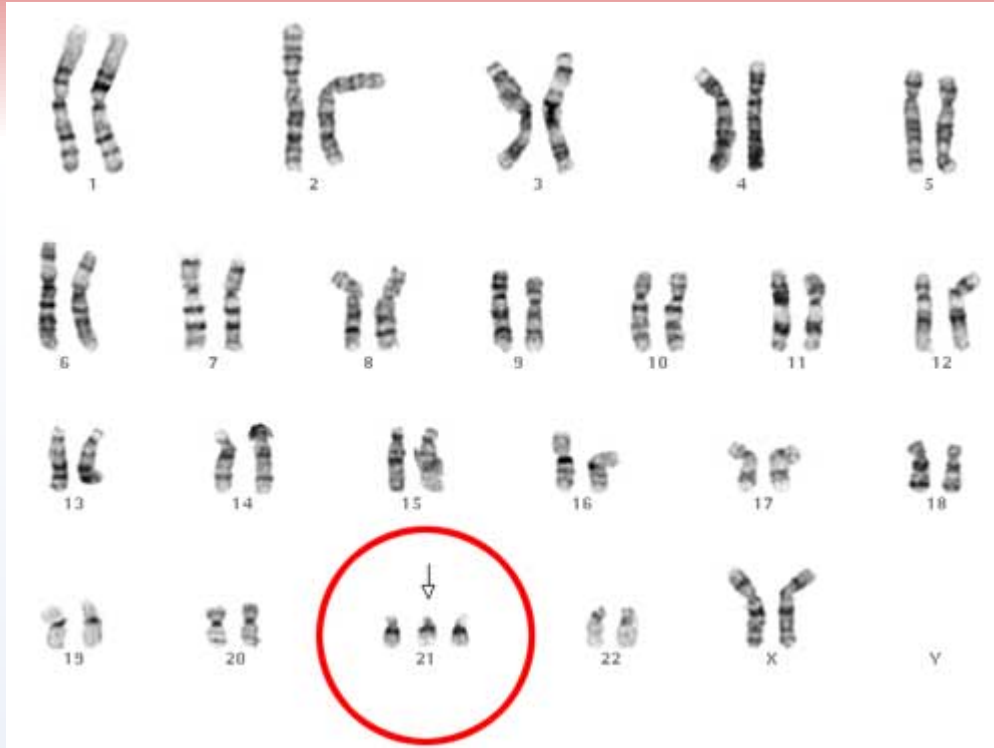
La unidad básica de la genética es el nucleótido (A, C, G, T)

Mediante los nucleótidos, se codifican los genes y secuencias que forman la información genética

1. Introducción: ¿Qué es la genética médica?

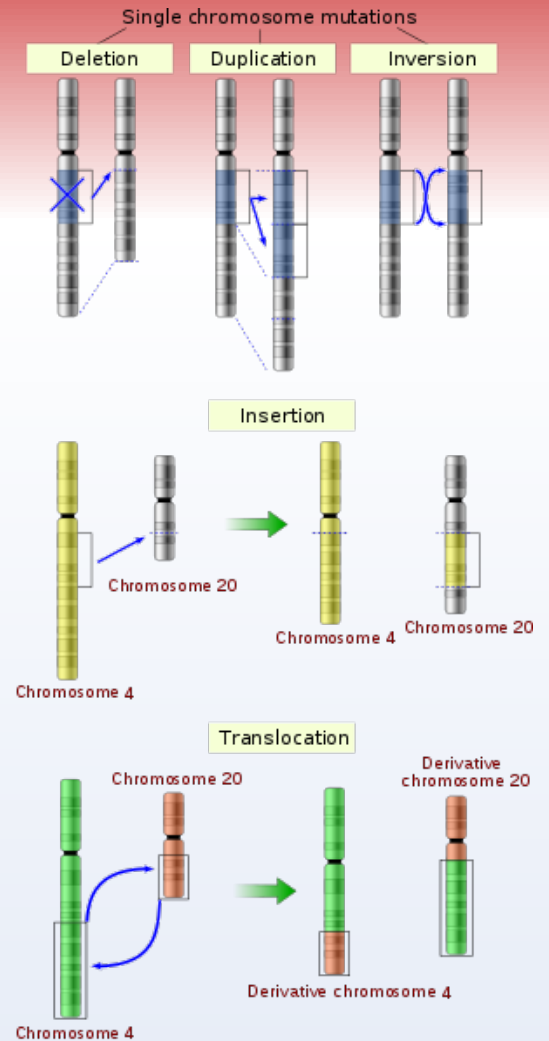
- La genética médica aplica los conocimientos de la genética al mundo médico
- El objetivo de la genética médica es:
 - La asociación genotipo-fenotipo (búsqueda de alteraciones genéticas)
 - El estudio de heredabilidad de las enfermedades
- En general, existen diversos cambios genéticos detectables con significado clínico:
 - Alteraciones cromosómicas (o citogenéticas)
 - Variantes de Número de Copia (VNCs)
 - Mutaciones puntuales

1. Introducción: ¿Qué es la genética médica? – El cariotipo

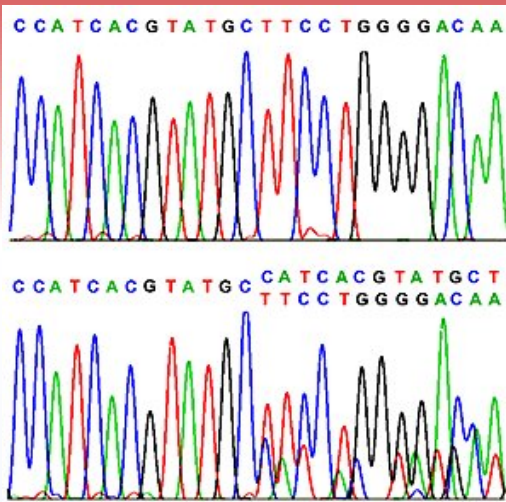


Trisomía 21 (S. Down) descubierta por Lejeune en 1958

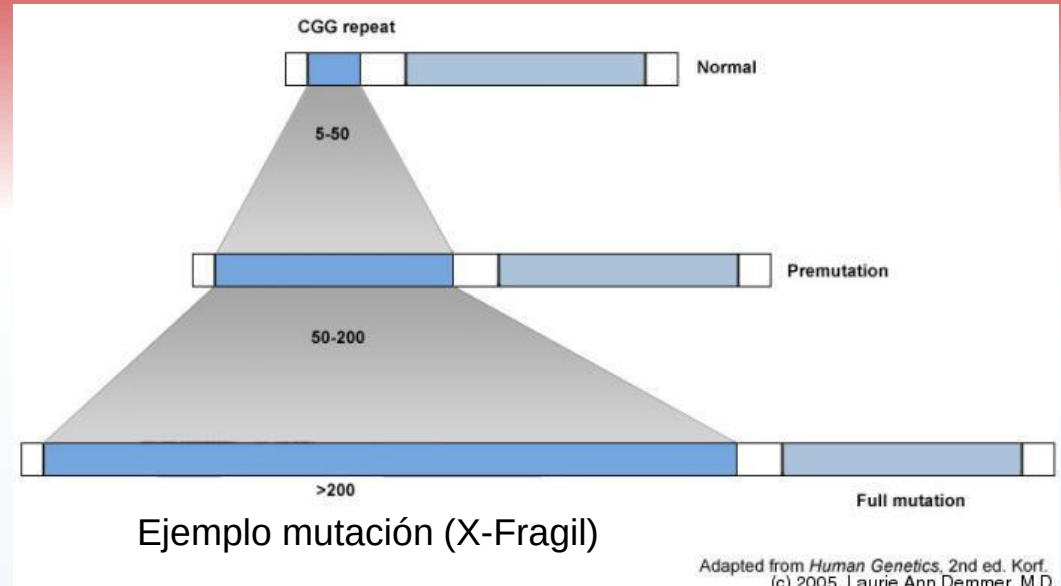
Son alteraciones de gran tamaño, asociadas a síndromes complejos



1. Introducción: ¿Qué es la genética médica? – Mutaciones génicas



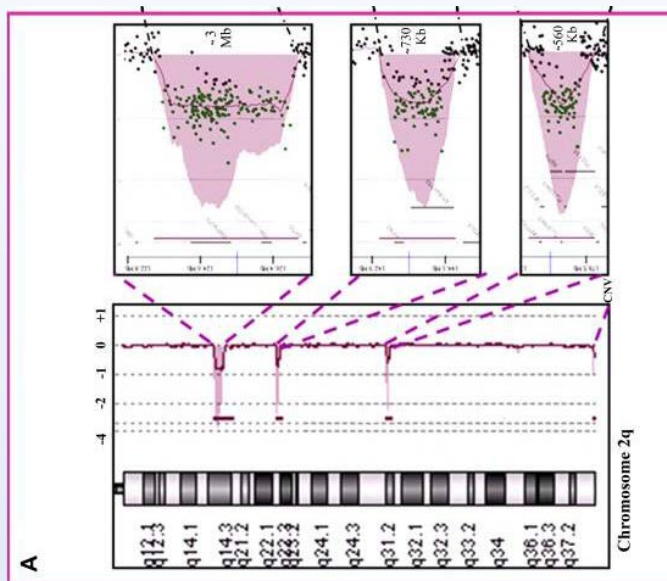
Duplicación intragénica



- Las mutaciones intragénicas pueden ser de diversos tipos (puntuales, inserciones, deleciones...)
- Generan cambios en la estructura o en la producción de un gen, alterando su funcionamiento
- Existen dos tipos de mutaciones: heterocigotas (un alelo) y homocigotas (los dos alelos)
- Depende de la enfermedad, puede ser suficiente una mutación heterocigota o no
- Además, existen variantes polimórficas de dichos eventos (por ejemplo SNPs)

1. Introducción: ¿Qué es la genética médica? – VNCs

- Las variantes de número de copia (VNCs, o CNVs, en inglés) son alteraciones del número de copia
- Se considera VNC a un cambio de más 1 kilobase en adelante (varias megabases)
- Las VNC pueden ser eventos *de novo* o adquiridos, duplicaciones o deleciones
- Las VNC se clasifican como:
 - Causales (asociadas a patología)
 - Benignas (no asociadas a patología conocida, presentes en población sana)
 - Significado incierto (ninguna de las anteriores, su significado en el fenotipo no está determinado)
- La herramienta más universal de detección de VNCs es el array-CGH.

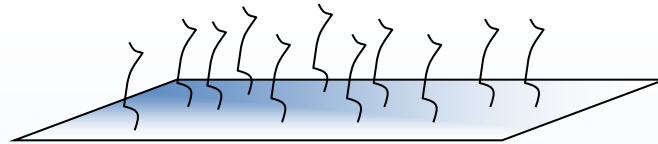


Variantes de número de copia
(deleciones) en cromosoma 2

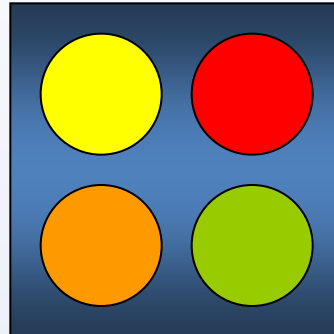
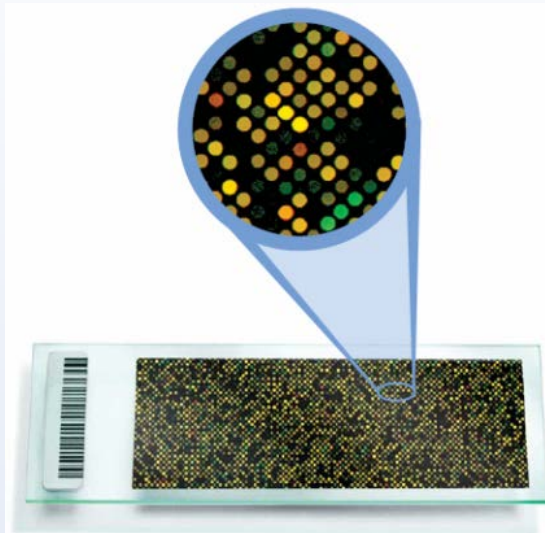
1. Introducción: ¿Qué es la genética médica? – array-CGH

ADN test   ADN ref

Array-CGH



$$\frac{\text{ADN Test}}{\text{ADN Referencia}} = \text{ratio}$$

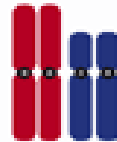


$\frac{\text{4 blue bars}}{\text{2 blue bars}} = 1$	$\frac{\text{6 blue bars}}{\text{4 blue bars}} = 1,5$
$\frac{\text{8 blue bars}}{\text{4 blue bars}} = 2$	$\frac{\text{2 blue bars}}{\text{4 blue bars}} = 0,5$

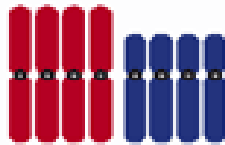
1. Introducción: ¿Qué es la genética médica? – array-CGH

a

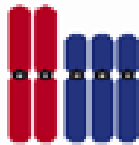
Normal diploid genome



Polyploid



Aneuploid



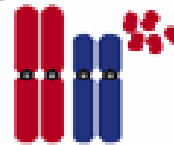
Reciprocal translocation



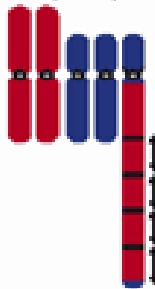
Non-reciprocal translocation



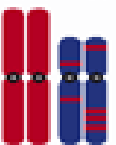
Amplification (double minutes)



Amplification (HSR)



Amplification (distributed insertions)

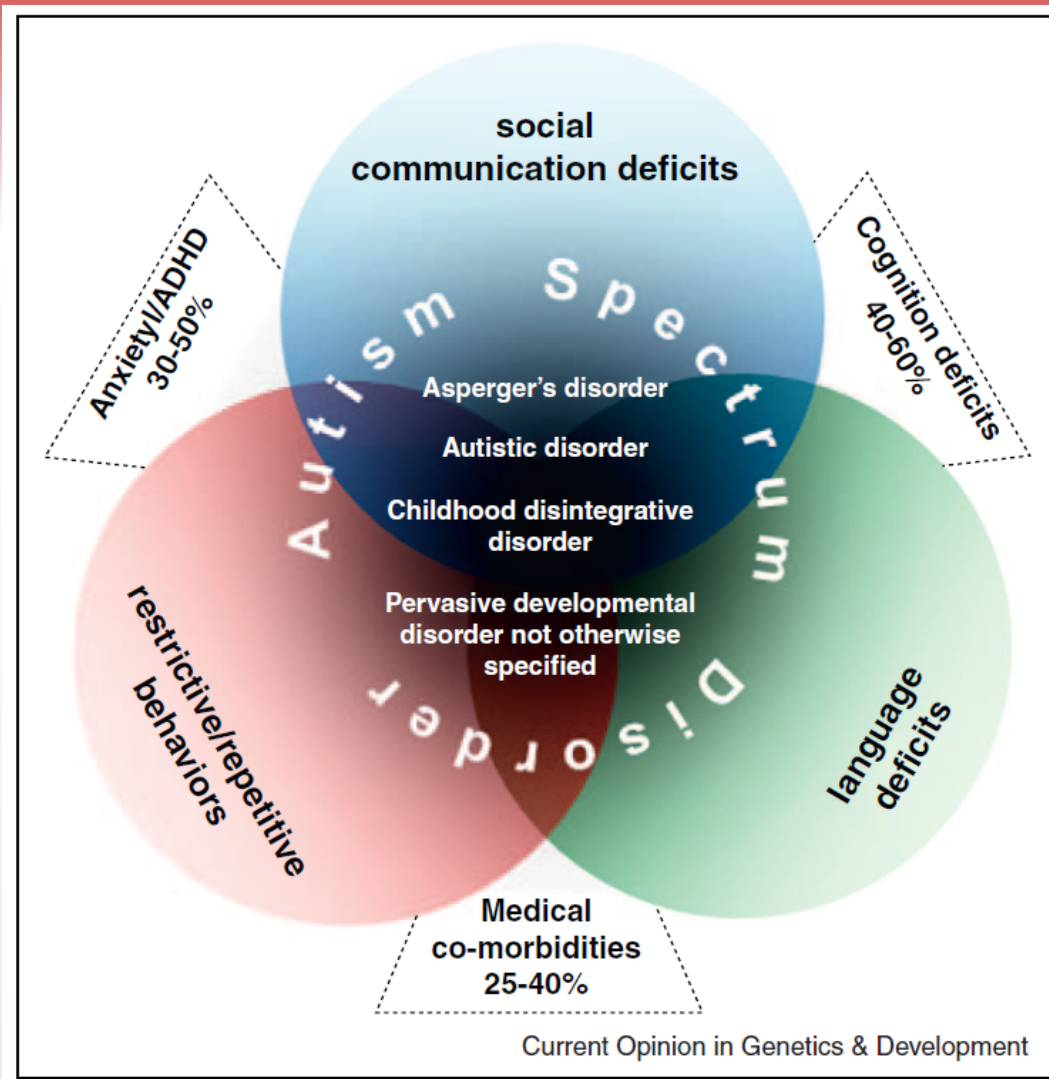


Technique	Detection						
Banding	+	+	+	+	+	+	—
SKY	+	+	+	+	+	+	—
CGH	—	+	—	+	+	+	+
LOH	—	+	—	+	+	+	+

2. Descripción del autismo – Introducción

- El trastorno de espectro autista (TEA) es una anomalía en el desarrollo que puede afectar a 1/100 – 1/150 niños en la actualidad.
- Su aparición se da antes de los tres años de edad.
- Como hallazgos fenotípicos, el TEA se caracteriza por problemas en las relaciones sociales, comunicación y lenguaje, un abanico de interés muy estrecho y la presencia de esterotipias.
- Existe un alto componente de variabilidad entre los afectos de TEA, lo que parece ser justificado por un patrón complejo de factores de predisposición genética
- A menudo, el TEA viene acompañado de discapacidad intelectual, o asociado a un cuadro genético sindrómico.
- En definitiva, el autismo es una enfermedad fenotípica y genéticamente heterogénea

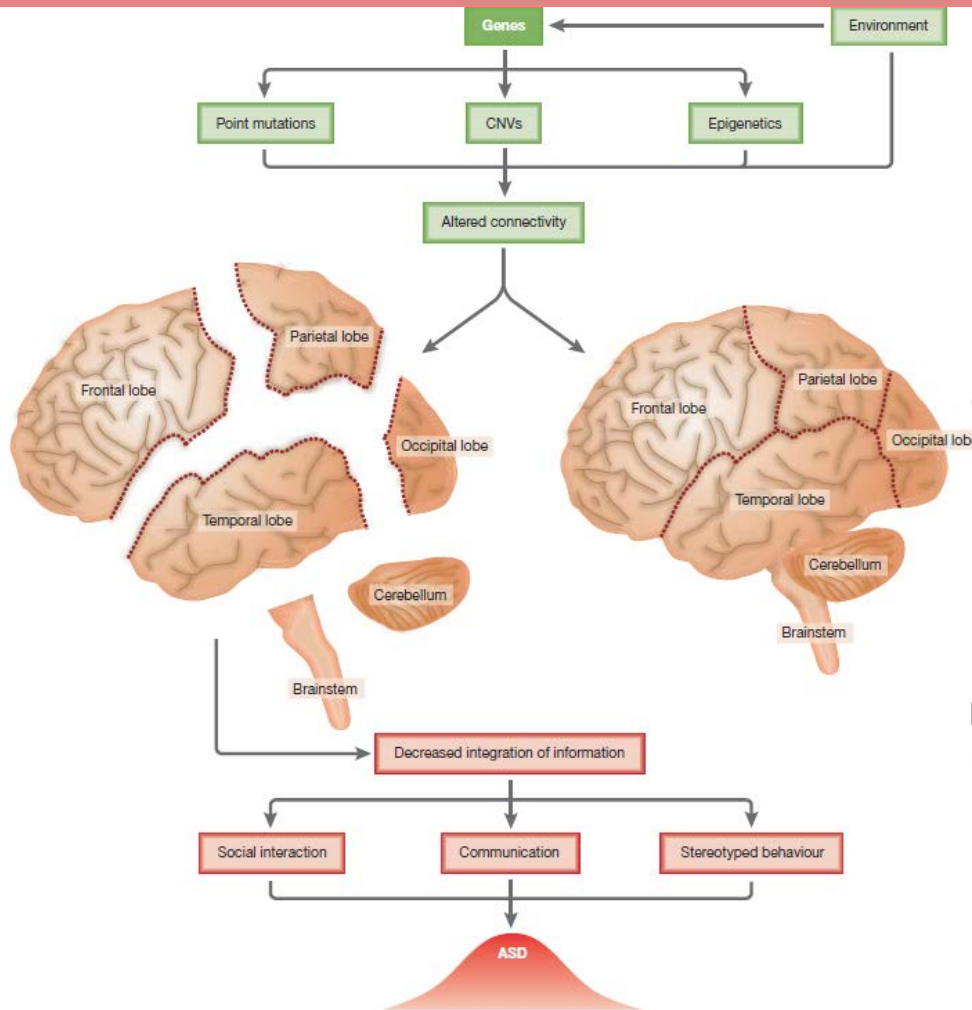
2. Descripción del autismo – Introducción



El trastorno de espectro autista conforma un cajón desastre de síntomas (lenguaje, social y estereotipias) que conducen a la descripción del trastorno (Asperger, Autismo, síndrome desintegrativo infantil, TGD)

Adicionalmente, esos trastornos pueden acompañarse de complicaciones, tales como déficit cognitivo, trastornos comportamentales (ansiedad, TDAH y otras complicaciones médicas complejas asociadas)

2. Descripción del autismo – Bases genéticas

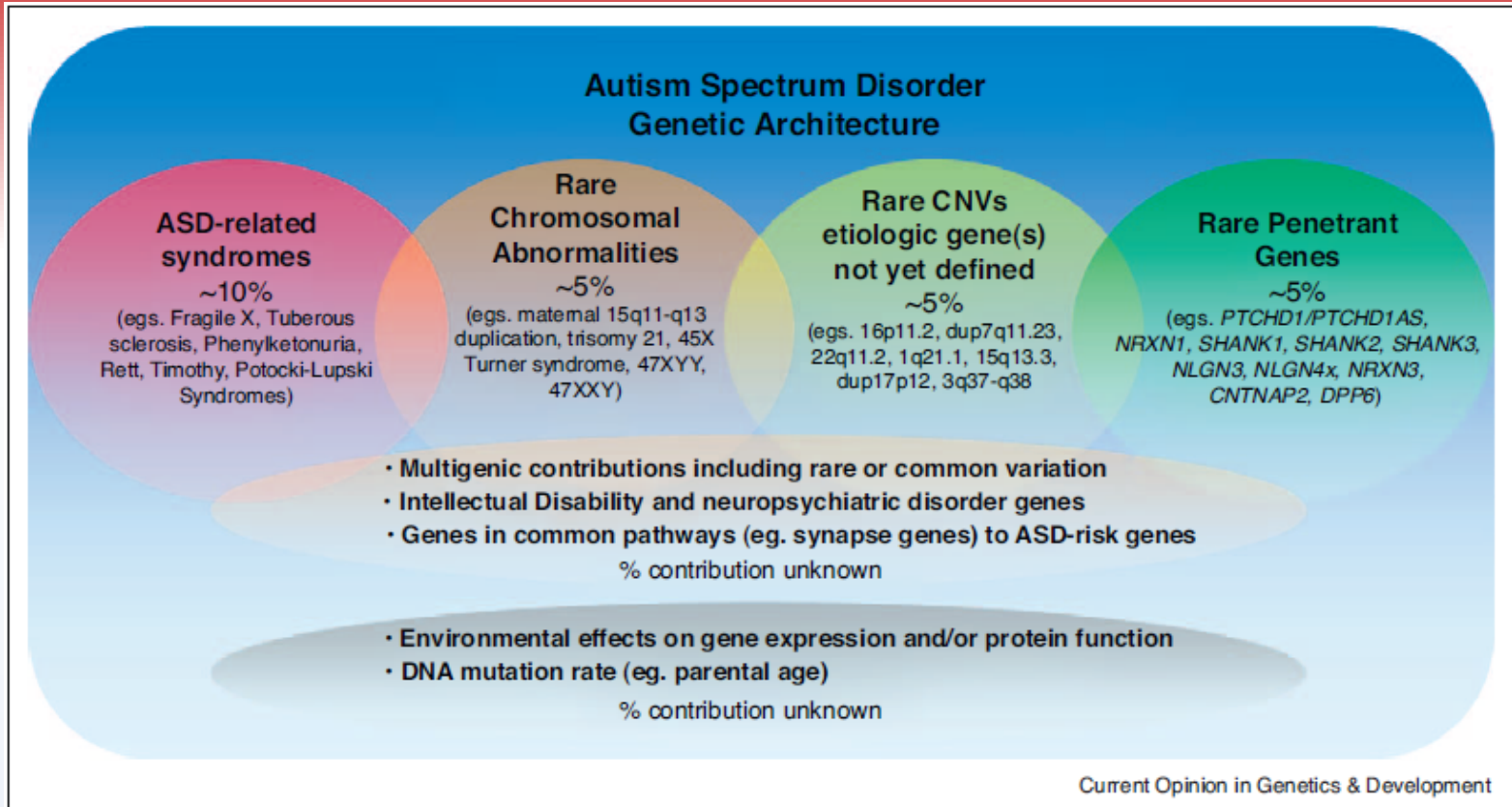


Las alteraciones genéticas y el entorno modifican la conectividad cortical en el desarrollo del cerebro, produciendo los desórdenes neurológicos relacionados con el autismo

Por lo tanto, los genes de interés son neurotransmisores, genes de migración neuronal, receptores sinápticos, etc.

Pueden producirse diversas alteraciones de la conectividad que generen, conjuntamente, el autismo, aumentando la complejidad funcional de la enfermedad

2. Descripción del autismo – Bases genéticas

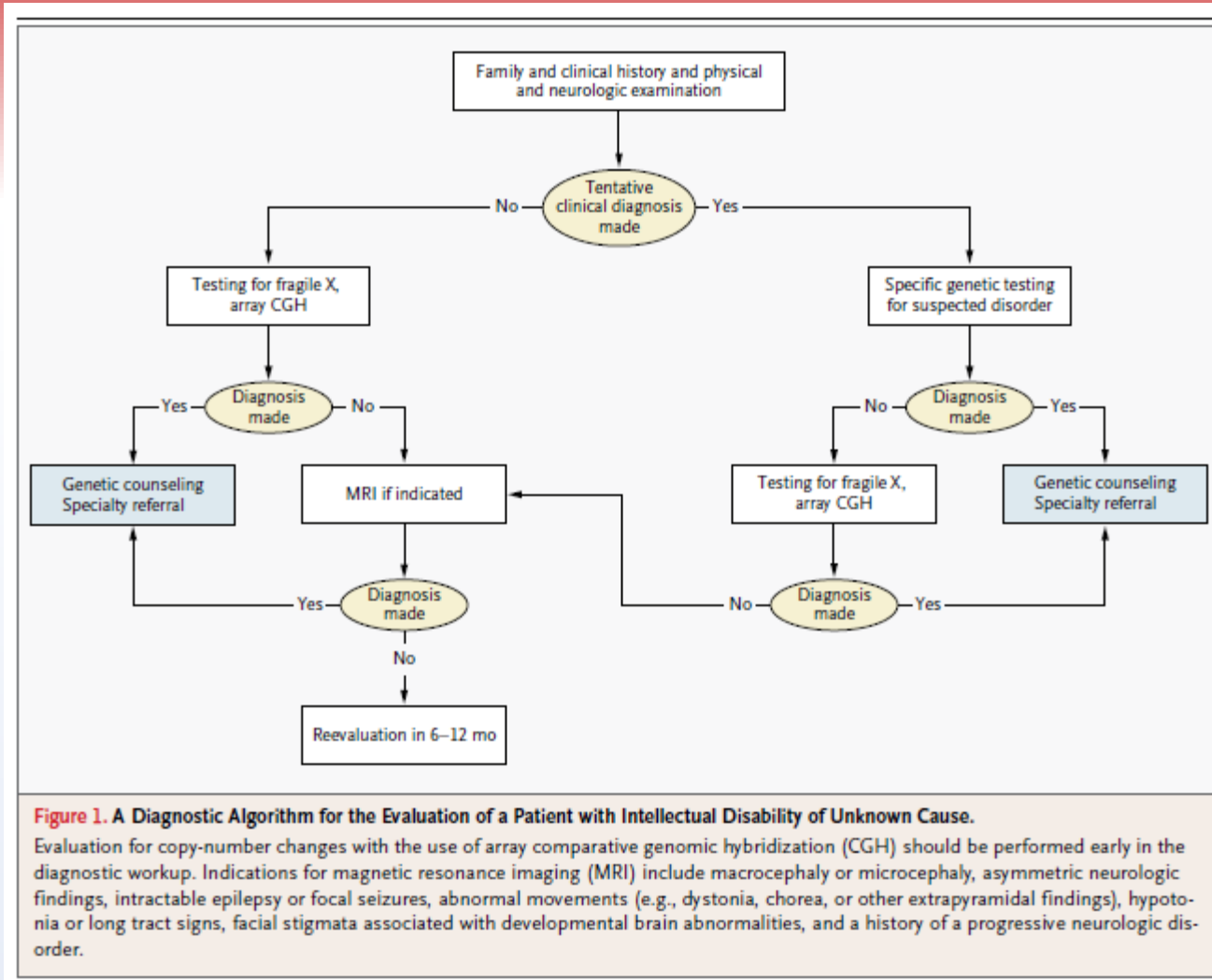


A nivel genético, el autismo parece ser producido por:

- Síndromes genéticos relacionados con el autismo
- Anomalías cromosómicas raras
- Alteración de locus específicos de autismo (algunos con penetrancia incompleta)
- Alteraciones intragénicas de genes con penetrancia incompleta

EXISTEN AGENTES MODULADORES (Enf. Poligénica, efecto ambiental....)

2. Descripción del autismo – Bases genéticas



3. El autismo como enfermedad genética – Síndromes asociados a TEA

- Aproximadamente un 10% de los casos con TEA tienen un síndrome genético conocido
- Enfermedades mendelianas: X-fragil (1-2% TEA), esclerosis tuberosa (1%), S. Rett (0.5%)...
- Deleción genes contiguos: S. Williams-Beuren, S. Sotos, S. Phelan-McDermid...
- Un 5% adicional de TEA se causan por alteraciones cromosómicas (Trisomía 21, Turner, dup 15q11q13).
- Estos síndromes tienen efectos adicionales (discapacidad intelectual, dismorfias, etc.). Esto es especialmente patente en los síndromes de genes contiguos o en las alteraciones cromosómicas. En estos casos, el fenotipo suele ser recurrente (por ejemplo, facies característica del síndrome).

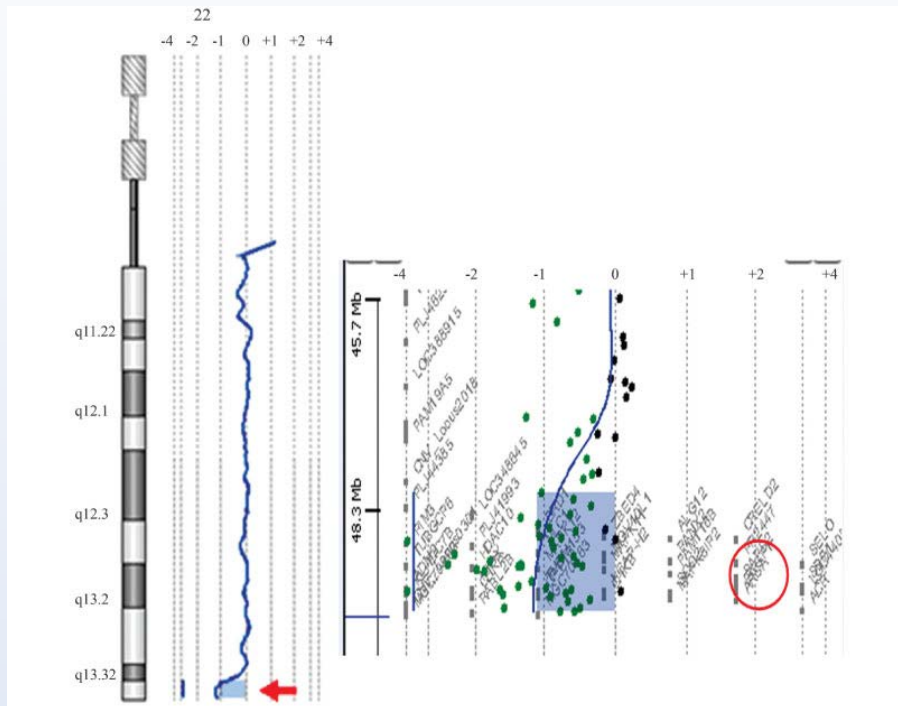
3. El autismo como enfermedad genética – Síndromes asociados a TEA

Síndrome de Phelan-McDermid, delección distal 22q13.3 (OMIM #606232)

Los pacientes presentan un cuadro autista con retraso del lenguaje severo, problemas comportamentales (hiperactividad, explosiones agresivas) e hipotonía. Pueden aparecer dismorfias faciales (estas pueden ser sutiles y variables).

En algunos casos, aparece sobrecrecimiento

La delección puede ser terminal o intersticial, afecta al gen SHANK3 (variable en tamaño, 160kb-9 Mb). Las delecciones mayores se asocian a un cuadro más sindrómico. Es un evento *de novo*.



4. El autismo como enfermedad genética – VNCs asociadas a TEA no sindrómico

- Aproximadamente un 5% del TEA se asocia a VNCs no sindrómicas
- Afectan a regiones con genes relacionados con el neurodesarrollo (CHRNA7, NIPA2, KCTD13)
- Dichas alteraciones aparecen también en casos con incapacidad intelectual
- Muchas de ellas son regiones de penetrancia incompleta, esto quiere decir:
 - Hereditarias en muchos de los casos
 - Provenientes de progenitor sano (o, como mucho afectado menormente)
 - Podrían necesitar un segundo evento genético
- Las alteraciones tienen muy pequeño tamaño (<1 Mb), invisibles al cariotipo
- Requieren una revisión genotípica y fenotípica familiar

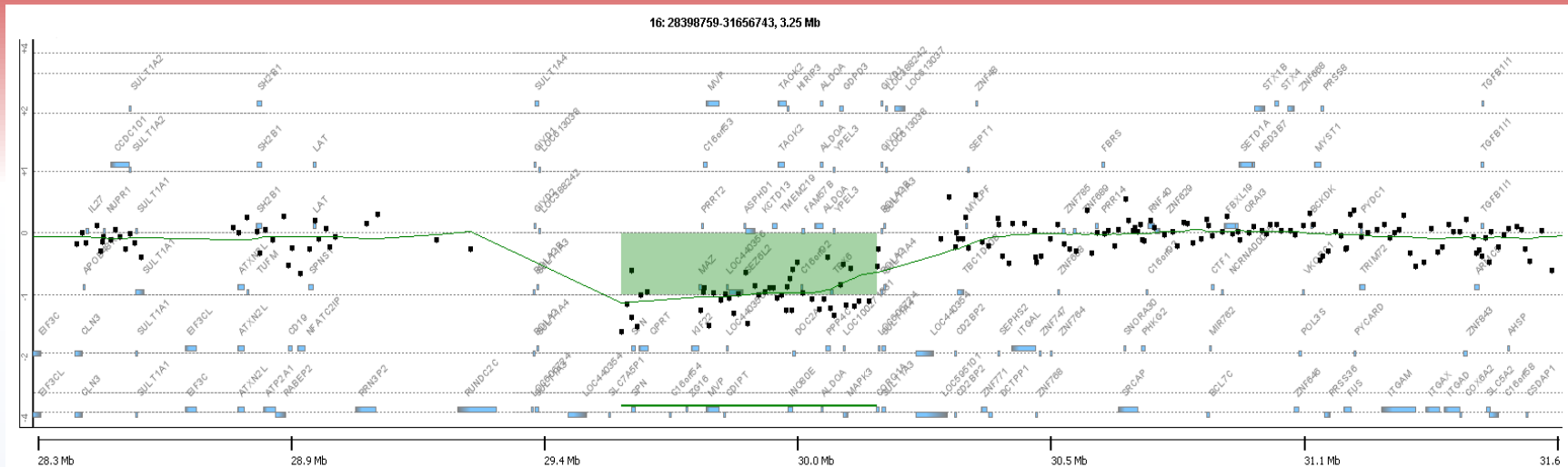
4. El autismo como enfermedad genética – VNCs asociadas a TEA no sindrómico

Table 1. Novel Recurrent Copy-Number Changes Associated with Intellectual Disability and Related Disorders.*

Chromosome Region	Coordinates in Mb†	Deletion or Duplication Associated with Disorder	Selected References
1q21.1	Chromosome 1: 145.0–146.35	Deletion: intellectual disability, schizophrenia, multiple congenital anomalies Duplication: intellectual disability, autism	Brunetti-Pierri et al., ³² Mefford et al., ³³ International Schizophrenia Consortium, ³⁴ Stefansson et al., ³⁵ Greenway et al., ³⁶ Haldeman-Englert and Jewett ³⁷
3q29	Chromosome 3: 197.4–198.9	Deletion: intellectual disability, schizophrenia Duplication: intellectual disability	Ballif et al., ³⁸ Lisi et al., ³⁹ Willatt et al. ⁴⁰
10q22-q23	Chromosome 10: 81.12–89.07	Deletion: intellectual disability	Balciuniene et al., ⁴¹ van Bon et al. ⁴²
15q11.2	Chromosome 15: 20.3–20.7	Deletion: intellectual disability, schizophrenia, epilepsy	Stefansson et al., ³⁵ de Kovel et al., ⁴³ Mefford et al., ⁴⁴ Burnside et al., ⁴⁵ Doornbos et al., ⁴⁶ Murthy et al., ⁴⁷ von der Lippe et al. ⁴⁸
15q13.3	Chromosome 15: 28.7–30.2	Deletion: intellectual disability, epilepsy, schizophrenia, autism	Stefansson et al., ³⁵ Helbig et al., ⁴⁹ Sharp et al., ⁵⁰ van Bon et al., ⁵¹ Ben-Shachar et al., ⁵² Pagnamenta et al., ⁵³ Miller et al. ⁵⁴
15q24	Chromosome 15: 72.2–73.8	Deletion: intellectual disability, autism	Andrieux et al., ⁵⁵ Sharp et al., ⁵⁶ Mefford et al., ⁵⁷ El-Hattab et al. ⁵⁸
16p11.2 (a)	Chromosome 16: 29.5–30.1	Deletion: intellectual disability, autism, obesity Duplication: schizophrenia	Weiss et al., ²⁹ Battaglia et al., ⁵⁹ Bijlsma et al., ⁶⁰ Hempel et al., ⁶¹ Shinawi et al., ⁶² Jacquemont et al., ⁶³ Walters et al., ⁶⁴ McCarthy et al. ⁶⁵
16p11.2 (b)	Chromosome 16: 28.7–29.0	Deletion: intellectual disability, obesity	Bachmann-Gagescu et al., ⁶⁶ Bochukova et al. ⁶⁷
16p12	Chromosome 16: 21.8–22.4	Deletion: intellectual disability	Girirajan et al. ⁶⁸
16p13.11	Chromosome 16: 15.4–16.4	Deletion: intellectual disability, epilepsy, autism, schizophrenia Duplication: intellectual disability, ADHD, autism	de Kovel et al., ⁴³ Mefford et al., ⁴⁴ Heinzen et al., ⁶⁹ Williams et al., ⁷⁰ Ullmann et al., ⁷¹ Kirov et al. ⁷²
17q12	Chromosome 17: 31.8–33.3	Deletion: intellectual disability, autism, schizophrenia	Moreno-De-Luca et al., ⁷³ Loirat et al. ⁷⁴
17q21.3	Chromosome 17: 41.0–41.7	Deletion: intellectual disability	Koolen et al., ²⁰ Sharp et al., ²³ Shaw-Smith et al., ²⁴ Koolen et al. ⁷⁵

Ejemplo de regiones de asociación a autismo e incapacidad intelectual

4. El autismo como enfermedad genética – VNCs asociadas a TEA no sindrómico



Un ejemplo real:

Delección 16p11.2 de 540kb chr16:29652799-30197490. 17 genes incluidos en OMIM.

Se asocia con la microdelección 16p11.2 (OMIM 611913), o región de susceptibilidad a autismo 14 (AUTS14). Los portadores de la delección se asocian a un fenotipo autista acompañado, o no, por otros síntomas (retraso mental, obesidad y/o anomalías congénitas como macrocefalia, frente prominente, micrognatia e hipertelorismo).

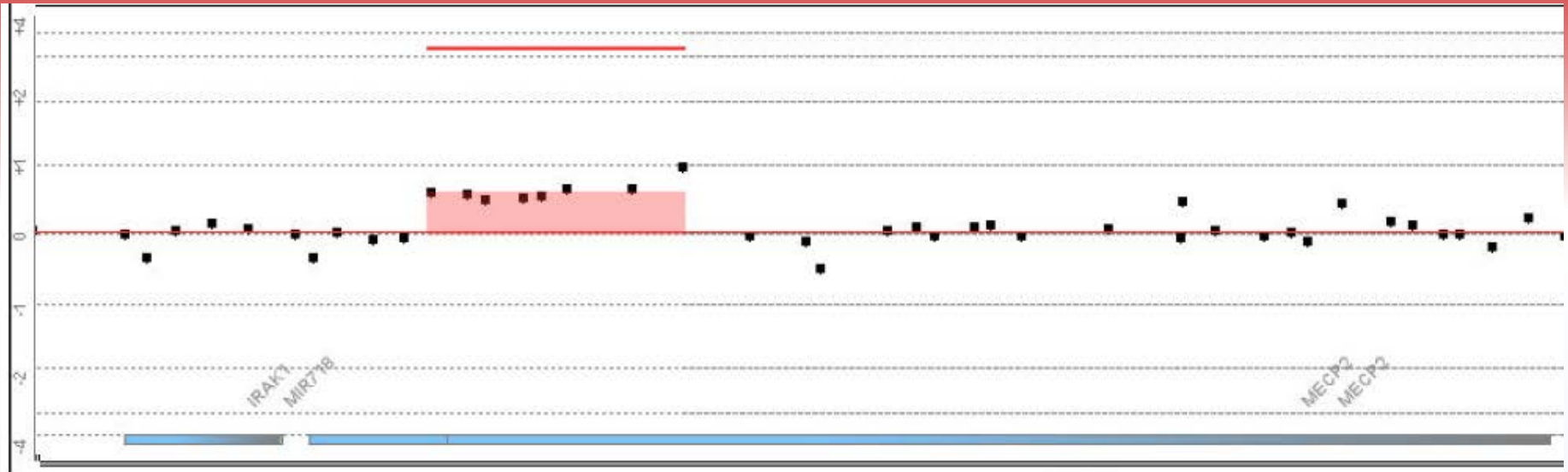
La región es de asociación, al tener penetrancia incompleta y expresividad variable.

La delección estaba heredada del progenitor, cuya familia tenía un cuadro familiar de casos afectos similares (en estudio).

2. El autismo como enfermedad genética – Alteraciones génicas

- La alteración de un único gen (o varios) puede producir un 5% de los casos de TEA
- A nivel mutacional es imposible acometer dicho trabajo con las técnicas tradicionales (SANGER)
- Las alteraciones pueden ser del gen completo o de fragmentos del gen (SHANK2, GRIA3, ...)
- Las alteraciones tienen muy pequeño tamaño (<200 kb), invisibles al cariotipo
- Actualmente el array-CGH se usa para ver la dup o del de estos genes del neurodesarrollo
- La lista está en continua actualización en diversas bases de datos:
 - The Autism Genome Project (www.autismgenome.org)
 - The UK10K Project (www.uk10k.org)
 - The Simons Foundation Autism Research Initiative (<http://sfari.org>)
- Necesaria una revisión previa de la función de dichos genes y su asociación a CNV
- Tras el hallazgo, se requiere una revisión genotípica y fenotípica familiar

3b. KaryoNIM[®] 180k Autismo. Casos Prácticos



Probando de sexo femenino

Fenotipo autista, reminiscencias de síndrome de RETT

Cariotipo normal, subteloméricas normales, MECP2 sin mutación

Duplicación Xq28 de 15.45 kilobases, afecta parcialmente el gen MECP2, duplicando los exones 3 y 4 (este último parcialmente)

La duplicación se asocia fenotípicamente con un síndrome de RETT (#312750), cuyo fenotipo solapa con un trastorno de espectro autista

4. Futuras Herramientas de Diagnóstico: Secuenciación Masiva (o NGS)

-Tecnología reciente de secuenciación de grandes regiones genómicas (pasa de aprox 1000 pb en Sanger a megabases)

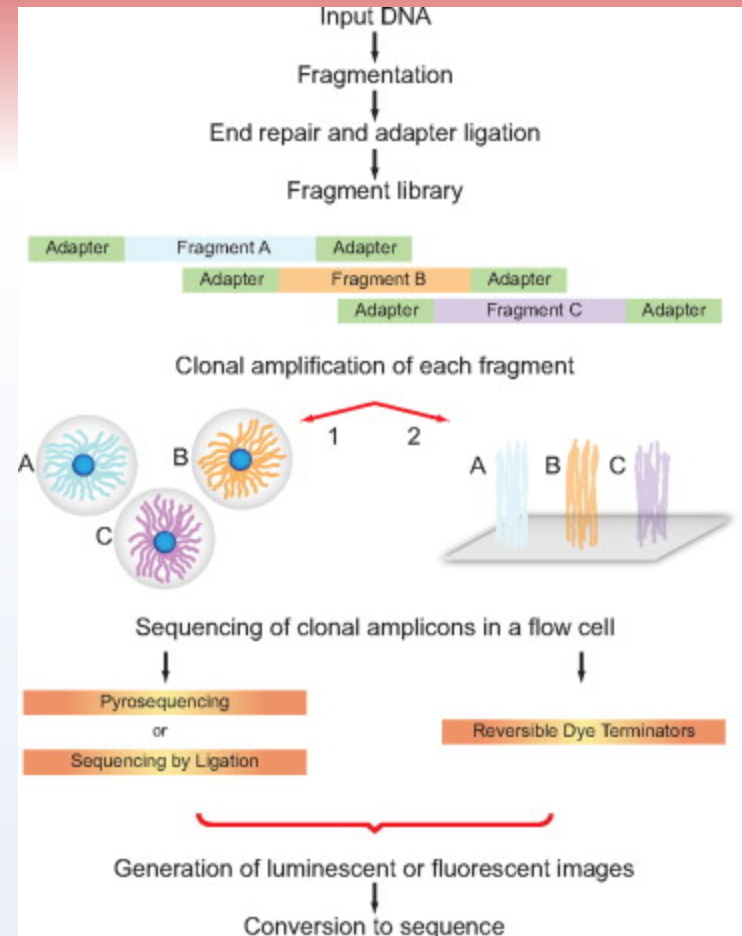
-Se basa en la producción de una librería genómica (de fragmentos pequeños, según técnica), y la secuenciación, a la vez, de toda la librería

- La bioinformática se encarga de alinear todas las secuencias fragmentadas para dar una secuencia completa (por ejemplo, el exoma completo de una muestra)

- Mediante técnicas de captura se puede personalizar lo secuenciado (cientos de genes a la vez)

- A nivel de coste, permite analizar más genes a la vez por menos dinero que la secuenciación Sanger.

- Gran problema de sobreinformación si la pregunta no es dirigida



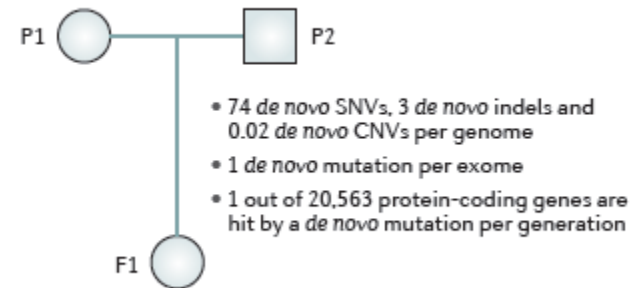
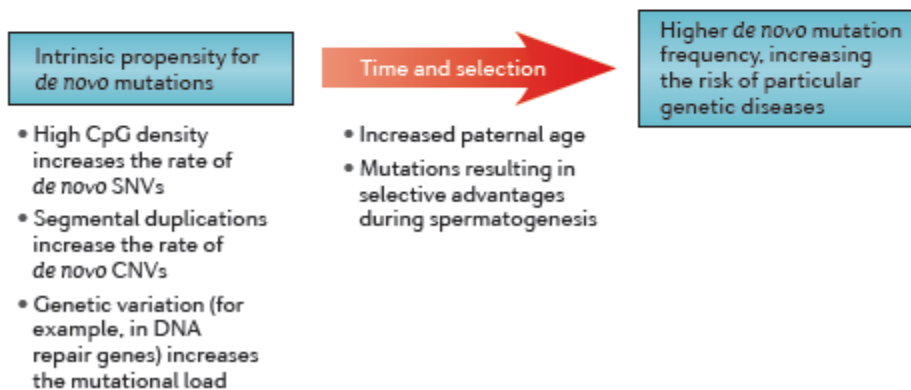
ANTES LA PREGUNTA ERA: ¿QUÉ GEN SECUENCIO?

AHORA ES: ¿CÓMO INTERPRETO LO QUE VEO?

4. Futuras Herramientas de Diagnóstico: Secuenciación Masiva (o NGS)

Frequency of disorder		
Rare ($<1/10,000$)	Low frequency ($1/10,000$ – $1/100$)	Common ($>1/100$)
Mutational target		
e.g. CHARGE syndrome ($1/10,000$)	e.g. Noonan syndrome ($1/2,000$)	e.g. intellectual disability ($2/100$)
CHD7	PTPN11, RAF1, SOS1, KRAS, BRAF, MAP2K1, NRAS	
Single gene	2–100 genes	>100 genes

Examples of factors affecting *de novo* mutation frequencies

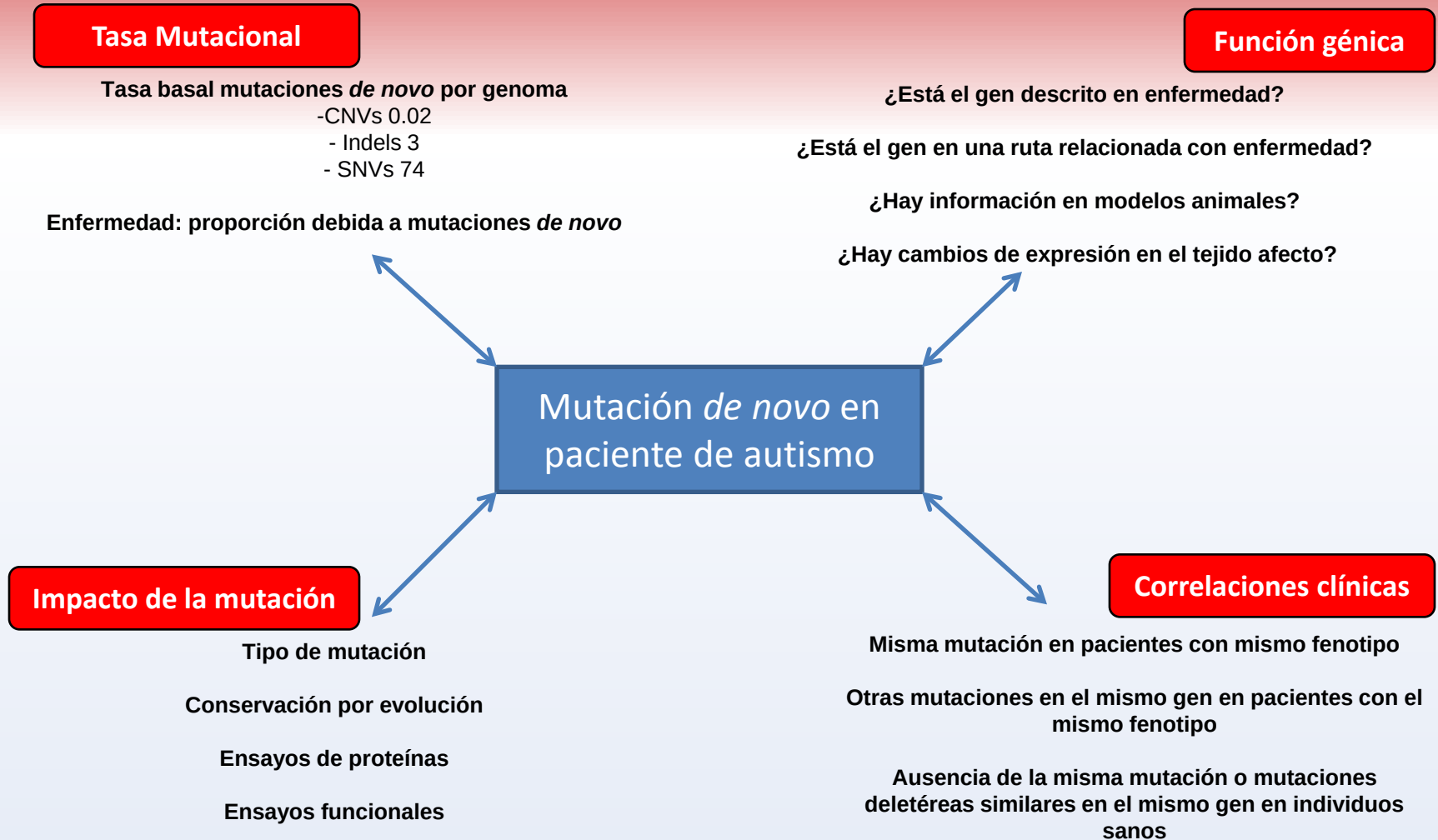


Las mutaciones relacionadas con el autismo podrían ser variantes raras presentes en la población sana.

Es importante un desglose clínico y genético para considerar las mutaciones responsables del autismo, sin saturar esa información de variantes sin sentido.

Es necesario contar con una *n* de pacientes altas para designar los genes de interés en paneles de NGS

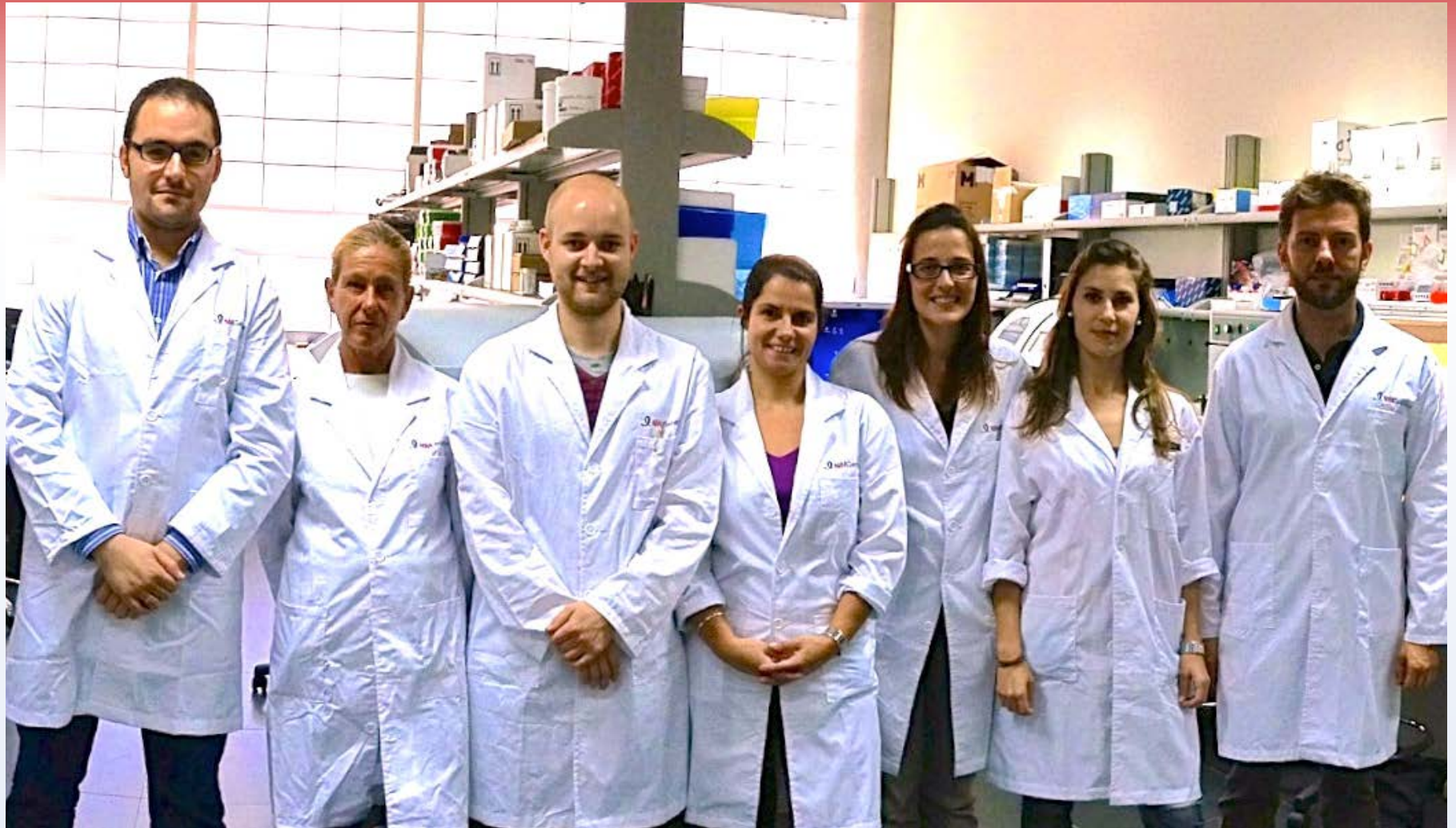
4. Futuras Herramientas de Diagnóstico: Secuenciación Masiva (o NGS)



Contribución de las nuevas técnicas de genética al diagnóstico del TEA

Conclusiones

1. El autismo es una enfermedad genética, aunque compleja.
2. La tecnología de VNCs (array-CGH) permite detectar, aproximadamente, un 15% de los casos autistas (hay que diferenciar sindrómicos de no sindrómicos)
3. Es fundamental un consejo genético adecuado en base a los hallazgos genéticos
4. Las nuevas herramientas (como NGS) ayudarán al diagnóstico del autismo, aunque es necesario conocer qué se debe analizar y filtrar adecuadamente la información obtenida.



GRACIAS A TODOS!!!!