



Análisis genético mediante la técnica del MLPA aplicada al estudio de la discapacidad intelectual

Memoria realizada por:

Dra Loreto Martorell, adjunto Laboratorio de Genética Molecular.

Dra Pilar Póo, jefe de sección de Neuropediatría.

Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona

Enero 2011

RETRASO MENTAL / DISCAPACIDAD INTELECTUAL

INTRODUCCION

El retraso mental (RM) o Discapacidad Intelectual, término más utilizado en la actualidad, se define como un cociente intelectual (CI) inferior a 70 y que se acompaña de limitaciones significativas de la actividad adaptativa. Esta discapacidad ocasiona un profundo impacto en quien la padece, en su familia y en la sociedad.

Se consideran cuatro grados de discapacidad, de acuerdo con el nivel de deficiencia intelectual. Clasificación del RM según el DSM-IV: **leve** cuando el CI varía entre 50-55 y aproximadamente 70; **moderado**: CI entre 35-40 y 50-55; **grave** CI entre 20-25 y 35-40; **profundo** CI inferior a 20 o 25.

El RM es la discapacidad más frecuente en niños. Se estima que alrededor de un 3% de la población presenta un cociente Intelectual (CI<70).

El RM es motivo frecuente de consulta en neuropsiquiatría, junto con las cefaleas y la epilepsia; Ocupa el segundo o tercer lugar tanto de las primeras consultas como de las visitas sucesivas en las consultas de los servicios de Neurología infantil en el ámbito hospitalario.

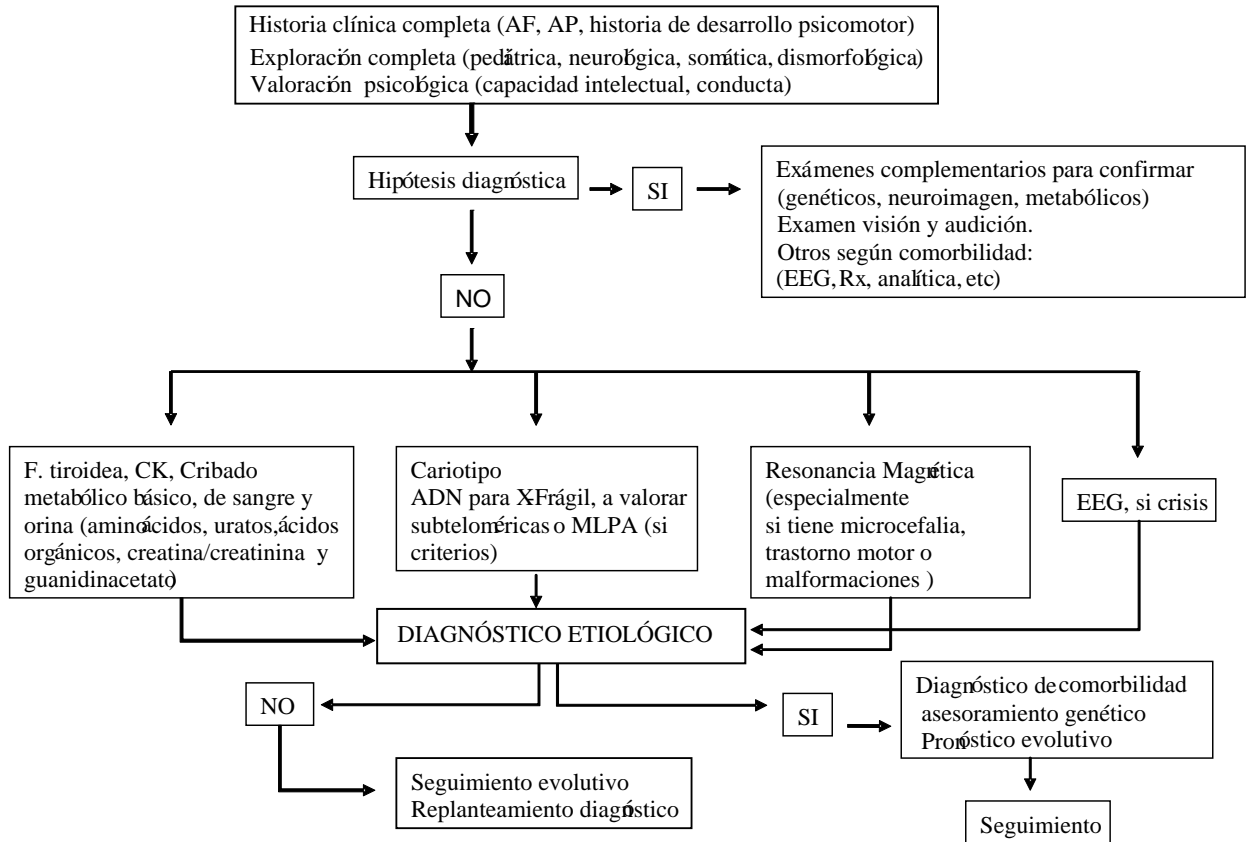
Etiología

A pesar de los avances en los diferentes medios para el diagnóstico, **los estudios más recientes refieren una etiología desconocida en aproximadamente un 50% de los casos.** Las causas más frecuentes conocidas son la trisomía 21 (S. de Down), el síndrome X-frágil y anomalías en las regiones subteloméricas.

Aproximación diagnóstica

El diagnóstico de una persona con sospecha de RM requiere una valoración clínica minuciosa, que incluya una historia clínica completa, una exploración somática y neurológica, una evaluación psicológica (realizada por profesional con experiencia) y la realización de exámenes complementarios según la hipótesis diagnóstica:

EVALUACION DE UN PACIENTE CON RETRASO MENTAL



RENDIMIENTO DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Varía según los diferentes estudios, desde algunos que alcanzan un 63,3% de diagnóstico etiológico, hasta rendimientos inferiores al 20%. En general cuanto mayor es el retraso mayor es la probabilidad de llegar a conocer la etiología.

Establecer la causa del RM en estas personas no cambia la orientación terapéutica, en la mayoría de los casos, pero ayuda en el asesoramiento clínico y pronóstico, además permite ofrecer asesoramiento genético a las familias.

ESTUDIO METABÓLICO

La importancia de los errores congénitos del metabolismo (ECM) como causa de RM es reconocida, sin embargo, la prevalencia es baja (1-5%). En los casos que no se llega a tener una sospecha diagnóstica se pueden plantear pruebas de cribado metabólico: función tiroidea, CK, cribado metabólico básico de sangre y orina (aminoácidos, ácidos orgánicos), creatinina,

guanidinacetato y estudio de purinas, especialmente si presentan trastorno autista u otro trastorno de conducta.

ESTUDIO DE NEUROIMAGEN (Resonancia magnética y/o TAC)

La indicación no está clara en los casos leves con exploración neurológica normal, con un rendimiento inferior al 2% en estos casos.

The Consensus Conference of the American College of Medical Genetics recomienda realizar neuroimagen siempre que presenten microcefalia o macrocefalia, convulsiones, regresión o se encuentren signos anormales en la exploración neurológica. En los pacientes con RM trastorno espectro autista (TEA) y/o crisis epilépticas, se recomienda la realización de resonancia magnética con espectroscopia.

ESTUDIOS GENÉTICOS

Recomendaciones del “*Consensus Conference of the American College of Medical Genetics*”:

1. Realizar estudio citogenético (cariotipo de alta resolución) en todos los casos de RM sin causa conocida.
2. Si no se evidencian alteraciones, en el paciente con RM no sindrómico, se recomienda realizar también el estudio del ADN para descartar el síndrome del cromosoma X-frágil. **Cuando se aplica a todos los casos de RM se encuentra la mutación en un 2% y cuando se realiza en pacientes que cumplan algunos criterios fenotípicos, en un 10%.**
3. Si ambos resultados son normales se ha de considerar la realización de otras pruebas como el estudio de los reordenamientos subteloméricos, especialmente en pacientes con RM asociado a dismorfias.

Con las nuevas técnicas de estudio genético se ha visto que al menos 10-15% de los niños con RM y una citogenética normal, tienen un reordenamiento críptico responsable de su afectación. **Una estimación precisa de la prevalencia de las alteraciones subteloméricas en pacientes con RM, se calcula que es entre 3-8% de casos.** La mayor proporción de alteraciones subteloméricas corresponde a deleciones y más raramente a duplicaciones submicroscópicas.

Para la detección de estas reestructuraciones submicroscópicas se utilizan técnicas especiales, como la Hibridación in Situ Fluorescente (FISH), la *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) y la técnica de *Microarrays de Hibridación Genómica Comparada* (CGH arrays).

Algunos de estos avances en los estudios genéticos han permitido la identificación de varios genes implicados en el RM ligado a X. Además del síndrome X-Frágil, hay otras formas de RM también ligadas a X no sindrómicas. Desde el 1996 han sido identificados más de 20 genes causantes de RM sin afectación sistémica ni rasgos dismórficos (GDI1, OPHN1, PAK3, etc). Algunos de estos genes (NLGN3, NLGN4) están relacionados con las sinapsis neuronales del SNC y se han encontrado mutaciones en el RM y en el autismo.

El estudio de microdeleciones y microduplicaciones que afectan a las bandas distales (telómeros), ha abierto un campo muy prometedor en el estudio del RM. Las regiones subteloméricas son ricas en genes por lo que, incluso pequeñas deleciones y duplicaciones de material genético en estas regiones, pueden tener consecuencias fenotípicas severas.

ESTUDIO GENÉTICO DEL RETRASO MENTAL MEDIANTE MLPA

Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) es una técnica muy reciente, descrita por primera vez en 2002, y comercializada por la compañía Holandesa MRC-Holland. Básicamente se trata de la combinación de las técnicas de hibridación, ligación y amplificación por PCR, requiriendo para su ejecución un aparato termociclador (PCR) y un equipo de electroforesis capilar (secuenciador).

El uso del MLPA permite un notable incremento en la detección de patologías de origen genético, pues presenta muchas ventajas sobre otras técnicas usadas rutinariamente; por ejemplo la secuenciación, DHPLC o SSCE no detectan cambios en el número de copias, el Southern-blot es laborioso, requiere mucho DNA y no siempre detecta pequeñas deleciones; el FISH no detecta pequeñas mutaciones, y el RT-PCR es menos sensitiva y no es una técnica multiplex. Con esta técnica se pueden detectar en una simple reacción de PCR hasta 40 anomalías en DNA genómico.

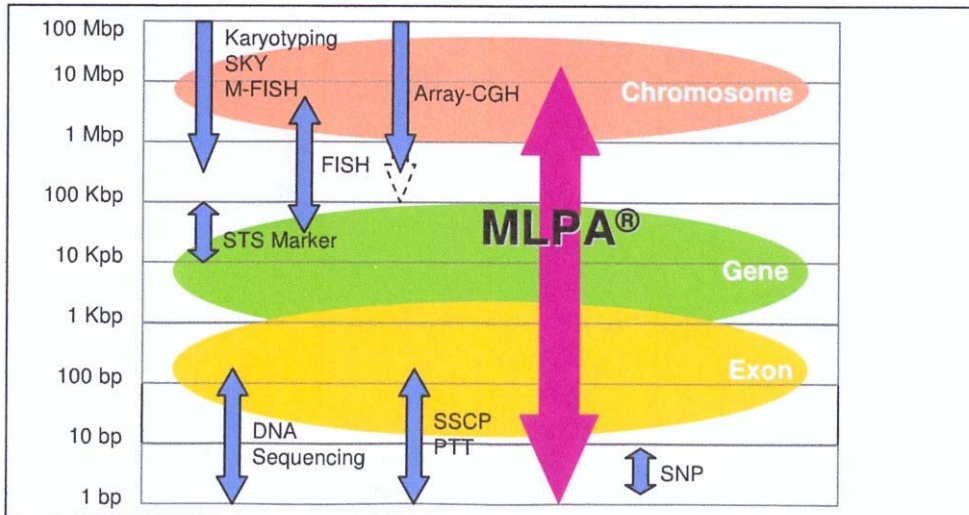
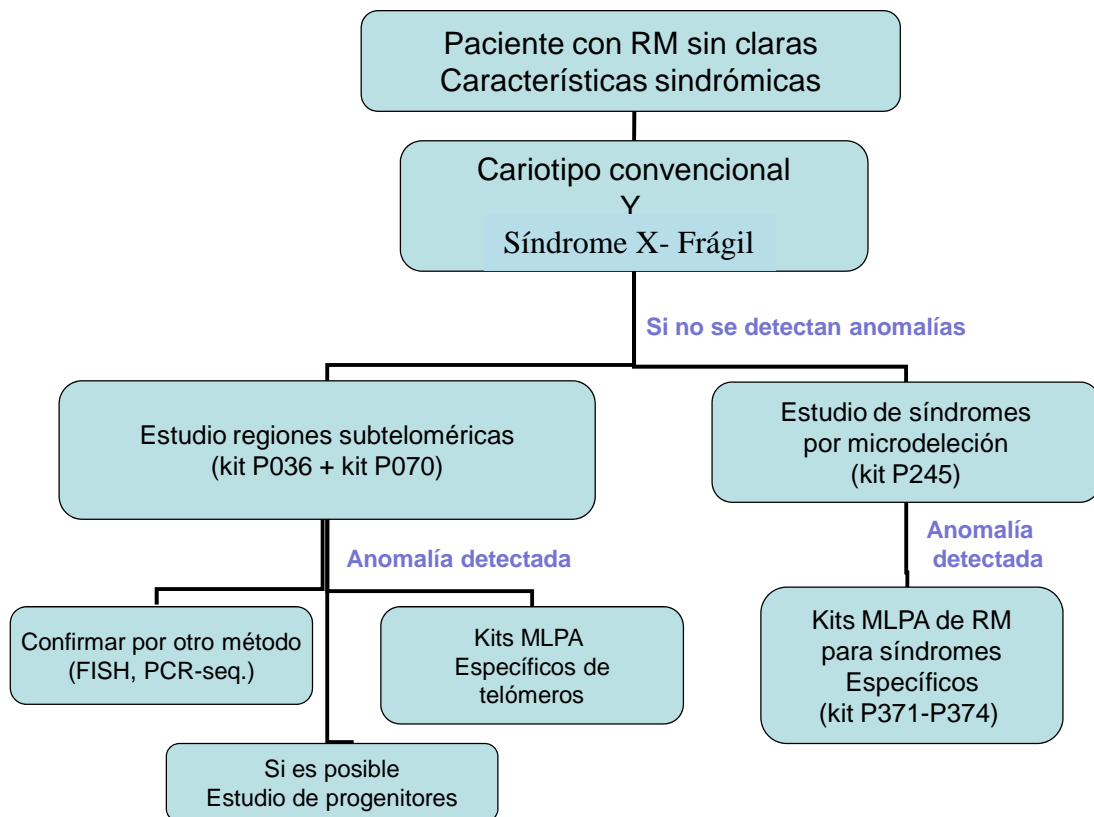


Figure 1 – MLPA[®] compared to other techniques. MLPA[®] can detect a wide range of genomic alterations, from single point mutations to large chromosomal deletions/duplications.

A continuación se detalla el algoritmo recomendado para el estudio genético de retraso mental:



Todo y las grandes ventajas sobre los demás métodos de detección comentados anteriormente, esta técnica también presenta una serie de limitaciones, como son la necesidad de utilizar DNAs de alta calidad. El MLPA no detecta translocaciones balanceadas. El resultado obtenido con esta técnica debería ser confirmado con otra técnica diferente, para evitar falsos positivos.

POBLACIÓN CANDIDATA PARA REALIZAR EL ESTUDIO GENÉTICO

Inicialmente se realizará el estudio en 100 pacientes con RM y unos criterios clínicos determinados, procedentes del Servicio de Neuropediatría del Hospital o de Genética Clínica.

Para empezar se incluirán en el estudio MLPA los niños con RM moderado o grave, cuya etiología no se haya determinado por el estudio de cariotipo de alta resolución ni se haya encontrado alteración en el estudio del Síndrome X Frágil, y que presentan uno o más de los siguientes criterios: 1) dismorfias faciales y una o más anomalías congénitas o dismorfias no faciales, 2) antecedente de retraso mental en la familia, 3) retraso de crecimiento prenatal, 4) pobre o excesivo crecimiento postnatal.

En el paciente con RM sindrómico se realizará, como hasta ahora, el estudio citogenético o técnicas específicas dirigidas (por ejemplo, en un niño con retraso global, hipotonía e hipogonadismo sugestivo de síndrome de Prader Willi, se realizará el estudio de metilación o la técnica de FISH en el cromosoma 15q11-13).

El número de pacientes y los criterios de inclusión se revisarían en función del funcionamiento del laboratorio, de los resultados obtenidos.

JUSTIFICACIÓN DE LA NECESIDAD DE PONER EN MARCHA LA TÉCNICA MLPA.

El kit MLPA permite trabajar con pequeñas cantidades de DNA. El coste del uso de esta técnica es muy inferior al de las demás técnicas convencionales, habiéndose calculado un coste de 15€reacción (según casa comercial).

Los kits se comercializan de forma general para detección de 96 muestras, pero se pueden adquirir ciertos kits específicos para un número de 25 muestras. El estudio del máximo número

de pacientes por tanda, permite abaratar costes. El precio de cada kit, para el análisis de 96 muestras es de 1.400€ (con IVA); necesitándose 2 kits para el primer screening de regiones subteloméricas y un kit para los síndromes por microdelección.

El precio que se está pagando actualmente a distintos laboratorios que realizan estudios de MLPA, varía entre los 200 y 550€ dependiendo del tipo de Kit MLPA utilizado y patología analizada.

El coste de los estudios de FISH solicitados por el Hospital en el año 2010, y que se derivan a laboratorios externos, asciende a unos 120.000€, de los cuales 70.800€ corresponden al estudio de regiones subteloméricas, y al menos 10.500€ corresponden a síndromes por microdelección. Considerando dichos números, el ahorro que realizaría el Hospital si se hacen los estudios por MLPA en nuestro laboratorio es muy importante.

En un futuro, si el funcionamiento se considera óptimo, se puede plantear ofrecer el servicio a clientes externos, con la consiguiente generación de ingresos, tal y como se está realizando actualmente para distintas patologías.

Para cualquier consulta referente a estos estudios contactar directamente con:

Dra. Loreto Martorell. Laboratorio de Genética Molecular; Para cuestiones técnicas o de laboratorio:

Tel.93-6009759 e-mail: lmartorell@hsjdbcn.org

Dra. Pilar Poo. Servicio de Neurología Sección Neuropediatría; Para cuestiones clínicas:

Tel.93-2532100 ext 2450 e-mail: pilarpoo@hsjdbcn.org