



Facultad de Medicina y Odontología

Universitat de València

Programa de Doctorado en Medicina 3139

Departamento de Medicina

**“ANÁLISIS FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE LOS PACIENTES CON TRASTORNOS DEL  
NEURODESARROLLO EN LOS QUE SE HA DETECTADO ALTERACIONES PATOGENICAS  
EN EL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA”**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: Dña. Ana Victoria Marco Hernández

**Dirigida por:**

Dr. Isidro Vitoria Miñana

Dr. Francisco Martínez Castellano

Dr. Miguel Tomas Vila

Valencia. Abril 2022.

**INFORME DIRECTORS/AS, TUTOR/A PER A DIPÒSIT DE TESI**

**Director (es) / Codirector (es):**

1.- Cognoms, Nom. Isidro Vitoria Miñana. N.I.F: 19980086D, Departament/Institut: Sección de Metabolopatías y Nutrición, Servicio de Pediatría Centre: Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

2.- Cognoms, Nom. Francisco Martínez Castellano. N.I.F: 16015751T, Departament/Institut Servicio de Genética, Centre Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

3.- Cognoms, Nom. Miguel Tomás Vila. N.I.F: 22657269S Departament/Institut: Sección de Neuropediatría, Servicio de Pediatría Centre: Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

**Tutor o tutora (si pertoca)**

Cognoms, Nom Julia Colomer Revuelta N.I.F: 22635714B, Departament/Institut: Pediatría Centre: Universitat de València.

Com a director (a) /codirector (a), tutor(a) de la tesi doctoral **"ANÁLISIS FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE LOS PACIENTES CON TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO EN LOS QUE SE HA DETECTADO ALTERACIONES PATOGÉNICAS EN EL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA"**

de D/D<sup>a</sup> Ana Victoria Marco Hernández,

estudiant del programa de doctorat **3139 Medicina (RD99/2011)**, de la Universitat de València, emeten informe favorable per a la realització del dipòsit i defensa de la tesi doctoral.

Data: 8 de abril de 2022

Signat: <sup>S</sup>  
Isidro Vitoria Miñana  
  
Director/a

Signat:  
Francisco Martínez Castellano  
  
Director/a

Signat:  
Miguel Tomás Vila  
  
Director/a

Signat:  
Julia Colomer Revuelta  
MARIA JULIA  
COLOMER  
REVUELTA  
Firmado digitalmente  
por MARIA JULIA  
COLOMER/REVUELTA  
Fecha: 2022.04.13  
13:01:39 +02'00'  
Tutor/a

**ESCOLA DOCTORAL  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**



# PRÓLOGO

## PRÓLOGO

Los Doctores D. Isidro Vitoria Miñana, D. Miguel Tomás Vila y D. Francisco Martínez Castellano como directores de tesis,

EXPONEN:

Que los cuatro artículos que se recogen en la tesis están publicados en revistas indexadas con los siguientes factores de impacto:

1. **Marco-Hernández AV**, Caro A, Montoya-Filardi A, Tomás Vila M, Monfort S, Beseler Soto B, Nieto-Barceló J, Martínez, F. Extending the clinical phenotype of SPTAN1: from DEE5 to migraine, epilepsy and subependymal heterotopias without intellectual disability. 2022 Jan;188(1):147-159.  
DOI: 10.1002/ajmg.a.62507. PMID: 34590414  
Indicadores de calidad: *American Journal of Medical Genetics*. Factor de Impacto 2020: 2.125. Q2.
2. **Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Caro A, Monfort S, Martínez, F. Novel homozygous likely pathogenic SCN1A variant with autosomal recessive inheritance and review of the literature. 2021 Nov 30;12:784892.  
DOI: 10.3389/fneur.2021.784892. PMID: 34917021 PMCID: PMC8669891  
Indicadores de calidad: *Frontiers in Neurology*. Factor de Impacto 2020: 4.003 Q2.
3. **Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Barranco-González, H, Vilchez Padilla JJ, Azorín I, Smeyers Dura P, Monfort S, Pitarch-Catellano I, Martínez, F. Mitochondrial Developmental encephalopathy with bilateral optic neuropathy related to homozygous likely pathogenic variants in the IMMT gene in an extended family with high consanguinity. 2022 Feb;101(2):233-241.  
DOI: 10.1111/cge.14093. PMID: 34842280  
Indicadores de calidad: *Clinical Genetics*. Factor de Impacto 2020: 4.438 Q1.

4. **Marco-Hernández AV**, Caro A, Rubio-Sánchez P, Martínez-Martínez JC, Tomás Vila M, Monfort S, Martínez, F. Extending the phenotype related to SCN1A gene: Arthrogryposis, movements disorder and malformations of cortical development. 2022 Jan 24;8830738211072694.  
DOI: 10.1177/08830738211072694. PMID: 35072530  
Indicadores de calidad: *Journal of Child Neurology*. Factor de Impacto 2020: 1.72. Q2.

Artículos en revisión realizados a partir de los datos y resultados obtenidos en la presente tesis que se encuentran en revisión:

5. **Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Blázquez A, Cano-Sánchez A, Martín MA, Monfort S, Martínez, F. Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic variants in the SUCLG2 gene. *BMC Medical Genetics*. 2022. **En revisión.**
6. **Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Matamoros JM, Beseler Soto B, Monfort S, Martínez, F. Short report: SRGAP3 as a possible genetic modifier of the phenotype associated to de novo mutation in ZNF292: autistic regression and severe conduct disorder. *Frontiers in Genetics*. 2022. **En revisión.**

Otras publicaciones relacionadas con los datos obtenidos en la elaboración de la tesis en los que la doctoranda no es primera autora:

- Kegele J, Krüger J, Koko M, Lange L, **Marco-Hernández AV**, Martínez F, Münchau A, Lerche H, Lauxmann S. Genetics of Paroxysmal Dyskinesia: Novel Variants Corroborate the Role of KCNA1 in Paroxysmal Dyskinesia and Highlight the Diverse Phenotypic Spectrum of KCNA1- and SLC2A1-Related Disorders. 2021 Jul 8;12:701351.  
DOI: 10.3389/fneur.2021.701351. PMID: 34305802 PMCID: PMC8297685  
Indicadores de calidad: *Frontiers in neurology*. Factor de Impacto 2020: 4.003. Q2.

- Martínez-Matilla M, Ferré-Fernández JJ, Aparisi MJ, **Marco-Hernández AV**, et al. Apparent Radiological Improvement in an Infant With Labrune Syndrome Treated With Bevacizumab. 2020 Nov;112:53-55. doi: Factor de Impacto: DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.07.011. PMID: 32911264  
Indicadores de calidad: *Pediatric Neurology*. Factor de Impacto 2020. 2.89 Q1.
- Nieto-Barceló JJ, González Montes, Gonzalo Alonso I, Martinez F, Aparisi MJ, Martínez-Matilla M, **Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M. Variant in CACNA1G as a Possible Genetic Modifier of Neonatal Epilepsy in an Infant with a De Novo SCN2A Mutation. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1723958>.  
Indicadores de calidad: *Journal of Pediatric Genetics*. Factor de Impacto 2018: 3.0.

Así mismo, EXPONEN:

Que la Doctoranda, Ana Victoria Marco Hernández, ha participado en cada uno de los 9 artículos planificando el estudio, escribiendo el proyecto y solicitando su aceptación por el comité ético. Ana Victoria Marco Hernández evaluó a todos los pacientes y recogió todos los datos clínicos. Junto con los directores realizó el análisis sistemático del estudio genético así como la correlación con el fenotipo presentado en los pacientes. La Doctoranda escribió el primer borrador de los artículos y el resto de autores lo revisaron. Todos los autores aceptaron la versión final del manuscrito.

Los datos expuestos en los artículos han sido explícitamente recogidos para esta Tesis Doctoral y no han sido utilizados para otros proyectos ni estudios.

Para la realización de la Tesis Doctoral presentada, la investigadora Ana Victoria Marco Hernández ha disfrutado de:

- El Contrato Rio Hortega, financiado por el **Instituto de Salud Carlos III.**  
CM19/00181

## **AGRADECIMIENTOS**

## A TODOS LOS QUE CONFIASTEIS EN MI

A mis compañeros neurofisiólogos, radiólogos, genetistas, pediatras, neurólogos y neuropediatras. En especial a mis directores de tesis, que me han enseñado tanto y sin los que este proyecto no hubiese sido posible.

A los pacientes y sus familias, por su colaboración y apoyo.

A la meua familia, especialment a Josep, que sempre em dona suport en les meues decisions i m'acompanya en el camí de la vida. Als meus fills, Mercé, Bernat i Laia, els meus millors projectes, la meua font de motivació i la meua alegria de viure. Vos desitje que disfruteu tant com jo de l'aprenentatge i que sigau molt feliços.



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA [ ]  
Facultat de Medicina i Odontologia

LaFe  
HOSPITAL  
UNIVERSITARI



**“Quien no sabe lo que busca, no entiende lo que encuentra”**

Claude Bernard. Fundador de la Medicina Experimental

# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	27
	<u>I.1. HITOS DE LA GENÉTICA</u> .....	29
	<u>I. 2. DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA PRÁCTICA CLÍNICA EN NEUROPEDIATRÍA. ELEMENTOS CLAVE</u> .....	31
	I. 2.1. Proyecto Genoma Humano (PGH).....	31
	I. 2.2. Secuenciación de nueva generación (NGS).....	32
	I. 2.3. ENCODE.....	32
	I. 2.4. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (OMIM®).....	34
	I. 2.5. Interpretación de las variantes: Recomendaciones de la <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i> . ....	40
	<u>I.3. EL RETO DE ALCANZAR UN DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO EN NEUROPEDIATRÍA</u> .....	43
	I. 3.1. Los trastornos del neurodesarrollo (TND).....	43
	I. 3.2. Enfermedades raras/enfermedades ultra-raras.....	49
	I. 3.3. Rendimiento de las técnicas de secuenciación masiva.....	50
	I. 3.4. Expansión del fenotipo. Genotipo y fenotipado inverso.....	53
	I. 3.5. Relevancia biomédica: la utilidad y el impacto de la NGS en neuropediatría.....	55
	I. 3.6. Nuevos genes candidatos y nuevas entidades nosológicas.....	58
<b>II.</b>	<b>RAZÓN FUNDAMENTAL DE LA TESIS</b> .....	65
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	68
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	70
<b>V.</b>	<b>POBLACIÓN Y MÉTODOS</b> .....	71
	<u>V.1. DISEÑO DEL ESTUDIO</u> .....	72
	<u>V.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN</u> .....	73

	<u>V.3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE PACIENTES.....</u>	74
	V. 3.1. Fenotipado de los pacientes.....	74
	V. 3.2. Genotipado de los pacientes.....	76
	V. 3.3. Estudio de la literatura científica.....	77
	V. 3.4. Clasificación de los pacientes.....	77
	V. 3.5. Preparación de publicaciones científicas.....	78
	<u>V.4. DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS PACIENTES RECLUTADOS EN LOS DIFERENTES OBJETIVOS.....</u>	78
	<u>V.5. ASPECTOS ÉTICOS.....</u>	78
<b>VI.</b>	<b>CAPÍTULOS/RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
	<b>a. CAPÍTULO I. NUESTRA SERIE. ANEXO 5.....</b>	<b>82</b>
	<b>b. CAPÍTULO II. FENOTIPOS TÍPICOS.....</b>	<b>84</b>
	○ Marco-Hernández AV, Tomás Vila M, Caro A, Monfort S, Martínez, F. Novel homozygous likely pathogenic <i>SCN1A</i> variant with autosomal recessive inheritance and review of the literature. <i>Frontiers in Neurology</i> . 2021.....	86
	○ ANEXO 6. Martínez-Matilla M, Ferré-Fernández JJ, Aparisi MJ, Marco- Hernández AV, et al. Apparent Radiological Improvement in an Infant With Labrune Syndrome Treated With Bevacizumab. <i>Pediatric Neurology</i> . 2020.....	279
	<b>c. CAPÍTULO III. FENOTIPOS ATÍPICOS.....</b>	<b>94</b>
	○ Marco-Hernández AV, et al. Extending the clinical phenotype of <i>SPTAN1</i> : from DEE5 to migraine, epilepsy and subependymal heterotopias without intellectual disability. <i>American Journal of Medical Genetics</i> . 2021.....	96
	○ Marco-Hernández AV, et al. Extending the phenotype related to <i>SCN1A</i> gene: Arthrogyrosis, movements disorder and malformations of cortical development. <i>Journal of Child Neurology</i> . 2022.....	109

○ ANEXO 7. Kegele J, Krüger J, Koko M, Lange L, Marco-Hernández AV, Martínez F, Münchau A, Lerche H, Lauxmann S. Genetics of Paroxysmal Dyskinesia: Novel Variants Corroborate the Role of KCNA1 in Paroxysmal Dyskinesia and Highlight the Diverse Phenotypic Spectrum of KCNA1- and SLC2A1-Related Disorders. <i>Frontiers in neurology</i> . 2021.....	279
○ ANEXO 8. Nieto-Barceló JJ, González Montes, Gonzalo Alonso I, Martínez F, Aparisi MJ, Martínez-Matilla M, Marco-Hernández AV, Tomás Vila M. Variant in CACNA1G as a Possible Genetic Modifier of Neonatal Epilepsy in an Infant with a De Novo SCN2A Mutation. <i>Journal of Pediatric Genetics</i> . 2021.....	290
<b>d. CAPÍTULO IV. NUEVOS GENES CANDIDATOS.....</b>	<b>123</b>
○ Marco-Hernández AV, et al. Mitochondrial Developmental encephalopathy with bilateral optic neuropathy related to homozygous likely pathogenic variants in the IMMT gene in an extended family with high consanguinity. <i>Clinical Genetics</i> . 2021.....	124
○ Marco-Hernández AV, et al. Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic variants in the SUCLG2 gene. En revision.....	153
○ Marco-Hernández AV, et al. SRGAP3 as a possible genetic modifier of the phenotype associated to de novo mutation in ZNF292: autistic regression and severe conduct disorder. En revision.....	180
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>200</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>234</b>
Conclusiones concretas.....	235
Conclusiones generales.....	236
<b>IX. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>237</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>240</b>
<b>XI. ANEXO. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</b>	<b>260</b>
XI.1. <u>ANEXO 1</u> . Carta de aprobación del CEIM.....	262
XI.2. <u>ANEXO 2</u> . Hoja de recogida de datos.....	264
XI.3. <u>ANEXO 3</u> . Consentimiento informado.....	269

XI.4. <u>ANEXO 4</u> . Hoja de información a los pacientes.....	271
XI.5. <u>ANEXO 5</u> . Listado de pacientes incluidos en el estudio.....	277
XI.6. <u>ANEXO 6</u> . Martínez-Matilla <i>et al</i> .....	279
XI.7. <u>ANEXO 7</u> . Kegele <i>et al</i> .....	282
XI.8. <u>ANEXO 8</u> . Nieto-Barceló <i>et al</i> .....	290

## TABLA DE CONTENIDOS

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagen original del artículo de Franklin <i>et al</i> : Crystallographic photo of Sodium Thymonucleate, Type B <sup>4</sup> .....	30
<b>Figura 2.</b> Imagen original del artículo de Watson y Crick en la que se representa la estructura doble helicoidal del ADN <sup>3</sup> .....	30
<b>Figura 3.</b> Hitos de la genética (original).....	31
<b>Figura 4.</b> De: <a href="https://www.encodeproject.org/">https://www.encodeproject.org/</a> .....	33
<b>Figura 5.</b> Número de entradas en OMIM 27/12/21 en OMIM <i>Entry Statistics</i> .....	34
<b>Figura 6.</b> OMIM <i>Entry Statistics</i> el día 27/12/21.....	35
<b>Figura 7.</b> Diagrama de contenido OMIM. Las líneas discontinuas indican que no todos los genes tienen variantes alélicas, ni se mapean todos los fenotipos; ni tampoco los fenotipos mapeados son necesariamente parte de una serie fenotípica <sup>10</sup> .....	35-36
<b>Figura 8.</b> (A) Ejemplo de entrada OMIM al realizar la búsqueda del gen Spectrin, alpha, nonerythrocytic 1, <i>SPTAN1</i> (*182810). (B) Gráfico generado en los que se representa que otros genes puede producir el fenotipo principal descrito actualmente asociado a variantes patogénicas en el gen <i>SPTAN1</i> .....	36-37
<b>Figura 9.</b> (A) Ejemplo de entrada OMIM al realizar la búsqueda del fenotipo “DEVELOPMENTAL AND EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY 5” (# 613477)	

asociada a variantes en *SPTAN1*. (B) Captura de pantalla del apartado de *Clinical Synopsis* asociado a *DEVELOPMENTAL AND EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY 5*.....37-38

**Figura 10.** Imagen original del artículo Richards *et al*<sup>18</sup> .....42

**Figura 11.** Enfoque clínico y de investigación para determinar el espectro de TND. Con este modelo trata de descifrar el vínculo entre los mecanismos biológicos que subyacen al desarrollo del cerebro y el comportamiento. Representa cuatro dominios de investigación principales que investigan los TND que van desde el comportamiento o análisis funcional del fenotipo, para evaluar las redes neuronales subyacentes y examinar la estructura celular y los fundamentos moleculares de estas redes y la identificación de sus fundamentos genéticos y epigenéticos. Dentro de cada dominio, hay niveles de investigación que abordan la estructura y / o la función del sistema nervioso de ese dominio en particular (columna de la izquierda). La columna central enumera las herramientas clínicas que se utilizan para investigar cada uno de estos niveles dentro de un dominio. La columna de la derecha enumera ejemplos de herramientas preclínicas correspondientes<sup>27</sup> .....48

**Figura 12.** Organoide cerebro humano de Lancaster *et al.*<sup>100</sup> .....62

**Figura 13.** Diagrama de flujo de los pacientes reclutados en el proyecto de la tesis. ....78

**Figura 14.** Tabla extraída de la página OMIM<sup>9</sup>. Distribución de los fenotipos entre los genes. ....201

**Figura 15.** Diagrama de flujo propuesto para el neuropediatra: ante un paciente con TND se procede a realizar un fenotipado extenso (con una anamnesis e historia clínica rigurosa, una exploración neurológica y la

evaluación de las exploraciones complementarias). Con estos datos en la mayoría de casos podemos realizar un diagnóstico sindrómico y en muchos casos un diagnóstico etiológico. En los casos en los que no se obtiene diagnóstico etiológico se realizará estudio genético (CGH array o NGS según sospecha clínica). Aquellos en los que obtenemos variantes patogénicas debemos reevaluar el fenotipo (fenotipado inverso) y determinar si se trata de un fenotipo típico (ya descrito previamente en OMIM y/o Orphanet), un fenotipo atípico (no descrito o descrito en casos aislados) o bien, si la variante encontrada se encuentra en un nuevo gen candidato deberemos estudiar en profundidad si los síntomas del paciente son debidos a esa variante (nueva entidad nosológica).....204

**Figura 16.** Captura de la búsqueda en plataforma OMIM de los fenotipos asociados a *SCN1A*<sup>9</sup>. .....207

**Figura 17.** De Guangzhou. Esquema del canal de sodio que codifica el gen *SCN1A*<sup>123</sup> .....208

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Objetivos alcanzados del PGH <sup>8</sup> .....	32
<b>Tabla 2.</b> Terminología estándar propuesta por ACMG <sup>17</sup> .....	40
<b>Tabla 3.</b> Trastornos del neurodesarrollo según DSM-5 <sup>26</sup> .....	45
<b>Tabla 4.</b> Utilidad del diagnóstico genético en neuropediatría.....	55
<b>Tabla 5.</b> Implicaciones terapéuticas en trastornos metabólicos que se presentan como epilepsia grave de inicio precoz.....	57
<b>Tabla 6.</b> Implicaciones terapéuticas en epilepsias genéticas.....	58
<b>Tabla 7.</b> Relación de pacientes de la serie publicada. Variantes en nomenclatura NM_001165963 <sup>104</sup> .....	209

## **ABREVIATURAS**

**ACMG:** *American College of Medical Genetics and Genomics.*

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AMP:** Asociación de Patología Molecular.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ATP:** adenosine trifosfato.

**CADD:** *Combined Annotation Dependent Depletion.*

**CAP:** Colegio de Patólogos Americanos.

**CEIM:** Comité Científico para la Investigación Biomédica.

**CIE-10:** ICD Clasificación Internacional de Enfermedades

**CLB:** clonazepam.

**CNVs:** *copy number variants*; variantes del número de copias.

**DE:** desviación estándar.

**DEE:** *Developmental and epileptic encephalopathy.*

**DS +AE:** *Dravet Syndrome and Acute encephalopathy.*

**DSM-5:** *Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5*

**DTI:** imágenes con tensor de difusión

**EED:** Encefalopatía epiléptica y del desarrollo

**EEG:** electroencefalograma

**ENCODE:** ENCyclopedia of DNA Elements

**ER:** enfermedad rara

**FHM:** migraña hemipléjica familiar

**FISH:** hibridación in situ por fluorescencia

**FS+PS:** *febrile seizure and partial seizure*

**GEFS+:** *genetic epilepsy with febrile seizures plus*; epilepsia genética con convulsiones febriles plus

**HPO:** *Human Phenotype Ontology*

**ID:** *intellectual disability*

**ID-CS:** Discapacidad intelectual con síndrome cerebeloso

**IPSC:** células madre pluripotentes inducidas

**LCM:** lacosamida

**MTDPS:** síndrome de depleción del ADN mitocondrial

**MDC:** malformaciones del desarrollo cortical

**MEG:** magnetoencefalografía

**NIH:** *National Institutes of Health*

**NIRS:** espectroscopia de infrarrojo cercano

**NGS:** *Next generation sequencing*; secuenciación masiva de nueva generación

**NHGRI:** *Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano*

**OMIM:** *Online Mendelian Inheritance in Man.*

**OXC:** oxcarbazepina

**PCI:** parálisis cerebral infantil

**PCR:** *polymerase chain reaction*

**PET:** tomografía por emisión de positrones

**PGH:** proyecto genoma humano

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**SD:** síndrome de Dravet

**SNC:** sistema nervioso central

**SNP:** polimorfismo de un solo nucleótido

**SrGAP:** GTAasa Slit-Robo

**TAC:** tomografía axial computerizada

**TDAH:** trastorno por déficit de atención e hiperactividad

**TEA:** trastorno del espectro autista

**TMS:** estimulación magnética transcraneal

**TND:** Trastornos del neurodesarrollo

**TPM:** topiramato

**VNC:** variaciones en el número de copias

**VPA:** valproato

**WGS:** secuenciación del genoma completo

**WES:** secuenciación del exoma completo

## GLOSARIO

**Variante *Missense*:** mutación puntual en la que un único cambio de nucleótido da como resultado un codón que codifica un aminoácido diferente

**Variante *Frameshift*:** tipo de **variante** que genera un desplazamiento o cambio en el marco de lectura. Ocurre por una inserción o deleción de un número de nucleótidos que no es múltiplo de tres en una secuencia de DNA

**CADD** es un acrónimo formado por las iniciales de *Combined Annotation-Dependent Depletion*. Es una herramienta informática que nos permite evaluar cuan deletéreas son las variantes de un único nucleótido, deleciones e inserciones en el genoma humano.

**CIE-10** es el acrónimo de la Clasificación internacional de enfermedades, 10.<sup>a</sup> edición correspondiente a la versión en español de la versión en inglés ICD, siglas de *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* y determina la clasificación y codificación de las enfermedades y una amplia variedad de signos, síntomas, hallazgos anormales, denuncias, circunstancias sociales y causas externas de daños y/o enfermedad

**DECIPHER** es un recurso basado en la web y una base de datos de variación genómica del análisis del ADN del paciente. Documenta anomalías cromosómicas submicroscópicas y variantes de secuencia patogénicas, de más de 25000 pacientes y las mapea al genoma humano usando *Ensemble* o *UCSC Genome Browser*.

**“Oh Dios, llena mi alma de amor por mi arte y por todas las criaturas.**

**Que no admita que la sed de ganancia y el afán de gloria me influencien en el ejercicio de mi arte, porque los enemigos de la verdad y del amor de los hombres podrían fácilmente hacerme abusar y apartarme de hacer bien a tus hijos.**

**Sostén la fuerza de mi corazón para que esté siempre pronto a servir al pobre y al rico, al amigo y al enemigo, al bueno y al malo. Haz que no vea en el hombre más que al que sufre. Que mi espíritu se mantenga claro en el lecho del enfermo, que no se distraiga por cualquier pensamiento extraño, para que tenga presente todo lo que la experiencia y la ciencia le enseñaron; porque grandes y sublimes son los progresos de la ciencia que tienen como finalidad conservar la salud y la vida de todas las criaturas.**

**Haz que mis pacientes tengan confianza en mí y en mi arte y que sigan mis consejos y prescripciones. Aleja del lecho de mis pacientes a los charlatanes, al ejército de parientes que dan mil consejos y a aquéllos que saben siempre todo; porque es una injerencia peligrosa que, por vanidad, hace malograr las mejores intenciones y lleva muchas veces a la muerte. Si los ignorantes me censuran y escarnecen, otórgame que el amor de mi arte, como una coraza, me torne invulnerable, para que pueda perseverar en la verdad sin atender al prestigio, al renombre y a la edad de mis detractores.**

**Otórgame, Dios mío, la indulgencia y la paciencia necesaria al lado de los pacientes apasionados o groseros.**

**Haz que sea moderado en todo, pero insaciable en mi amor por la ciencia. Aparta de mí la idea de que lo puedo todo. Dame la fuerza, la voluntad y la ocasión para ampliar cada vez más mis conocimientos. Que pueda hoy descubrir en mi saber cosas que ayer no sospechaba, porque el arte es grande, pero el espíritu del hombre puede avanzar siempre más adelante”**

**Oración de Maimónides**



## **I.INTRODUCCIÓN**

## I.INTRODUCCIÓN.

La Neuropediatría es el área de la Pediatría que estudia y trata a los pacientes con patología neurológica de menos de 18 años. Por tanto, engloba el conocimiento sobre los pacientes con gran diversidad de patologías neurológicas y en diferentes fases del neurodesarrollo. La anamnesis y la exploración neurológica son la base para establecer el diagnóstico clínico en Neuropediatría.

Entre la patología neurológica en la infancia, se encuentran los trastornos del neurodesarrollo, incluyendo discapacidad intelectual (DI) y trastornos del espectro autista (TEA), pero también la epilepsia, los trastornos del movimiento, los cuadros polimalformativos, o las enfermedades neurometabólicas, entre otras. Hasta hace relativamente poco tiempo, una gran proporción de estos pacientes no llegaban a tener un diagnóstico etiológico. La incorporación de diferentes exploraciones complementarias ha ido aportando las claves para entender la causa de muchos de estos pacientes. Un ejemplo, sería la incorporación de pruebas de neuroimagen, inicialmente la tomografía axial computarizada o TAC, y posteriormente la resonancia magnética nuclear (RMN), que permitieron detectar malformaciones del desarrollo del sistema nervioso que dan lugar a epilepsia y DI, entre otros síntomas<sup>1</sup>.

Sin embargo, hay que destacar que en las últimas tres décadas se ha producido una revolución en el estudio etiológico de los trastornos del neurodesarrollo gracias, fundamentalmente, a los avances de la biología molecular. En la nueva era de la secuenciación de nueva generación o *next generation sequencing* (NGS) ha cambiado la manera de estudiar la genética humana. La capacidad de realizar NGS, actualmente más rápida y con mejor coste-efectividad, mejora la identificación de genes y los sistemas informáticos permiten filtrar por múltiples criterios (modelo de herencia, tipos de mutaciones, ausencia en población de control, frecuencia alélica y patogenicidad predecible) lo que permite seleccionar pequeños subconjuntos de genes candidatos. Comparado con el esfuerzo y tiempo que llevaba hace dos décadas la identificación de variantes genéticas, ahora se pueden identificar variantes individuales en todo el exoma en cuestión de semanas. Estas técnicas han supuesto la

identificación extensa de gran cantidad de nuevas variantes alélicas causantes de enfermedades genéticas.

Entre las ventajas de la utilización de las técnicas de NGS destaca su alta sensibilidad y la aceleración de descubrimientos biológicos y biomédicos. Esto permite comprender mejor la patogénesis, precisar el diagnóstico y realizarlo más rápidamente e identificar nuevas mutaciones patogénicas.

### **I.1. Hitos de la Genética:**

Probablemente el primer gran hito de la genética se remonta al año 1865, cuando Johann Gregor Mendel presentó *Versuche über Pflanzenhybriden* (Experimentos sobre hibridación de plantas). En este tratado describía su trabajo durante 8 años realizando cruces experimentales entre diferentes variedades del guisante de jardín, *Pisum sativum*. Con este estudio se sentaron las bases de las conocidas Leyes de Mendel.

Sin embargo, no fue hasta 1938, cuando se acuñó por primera vez el término “biología molecular” por Warren Weaver. En ese momento, se utilizaba para describir fenómenos biológicos relacionados con la estructura de las moléculas y sus interacciones. A medida que esta área de la biología se expandió, el ácido desoxirribonucleico (ADN) se volvió su foco principal<sup>2</sup>.

El ADN había sido descubierto en 1869 por el médico Johann Friedrich Miescher. A inicios del siglo XX, estudios realizados por los bioquímicos Albrecht Kossel y Phoebus Levene establecieron que el ADN está compuesto de nucleótidos formados por una desoxirribosa (una molécula de azúcar), un grupo fosfato y una de las bases de nitrógeno (adenina, timina, guanina y citosina). Pero no fue hasta principios de la década de 1950, cuando Watson y Crick describieron la estructura de la molécula de ADN. Esto fue posible gracias a las imágenes proporcionadas por Rosalind Franklin, que confirmaban que la estructura del ADN consta de una doble hélice formada por dos hebras antiparalelas<sup>3</sup> (ver figuras 1, 2).

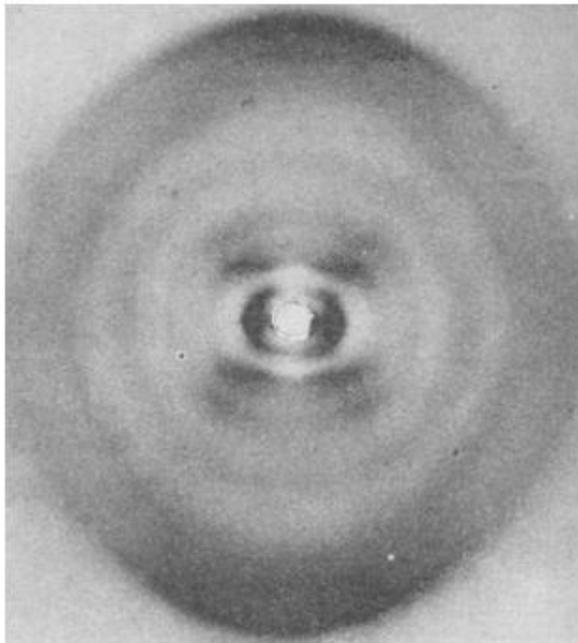


Fig. 1. Fibre diagram of deoxyribonucleic acid from *B. coli*.  
Fibre axis vertical



This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis

**Figura 1** Imagen original del artículo de Franklin *et al*: *Crystallographic photo of Sodium Thymonucleate, Type B*<sup>4</sup>.

**Figura 2:** Imagen original del artículo de Watson y Crick en la que se representa la estructura doble helicoidal del ADN<sup>3</sup>.

En la segunda mitad de la década de los 1970, aparecieron las principales tecnologías que permitieron avanzar en el estudio de la biología molecular. Concretamente la técnica de secuenciación por Sanger, que se basa en la interrupción de la síntesis del ADN mediante la incorporación de bases nitrogenadas modificadas, es decir, con análogos de los nucleótidos naturales<sup>5</sup>. En 1986 Kary Mullis desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), más conocida como PCR (*polymerase chain reaction*), con la que se obtenía un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de pequeñas cantidades<sup>6</sup>.

En la década de 1990 se automatizó la PCR y se utilizó para secuenciar el genoma humano en el *Proyecto Genoma Humano* (PGH) (1990-2003)<sup>7</sup>.

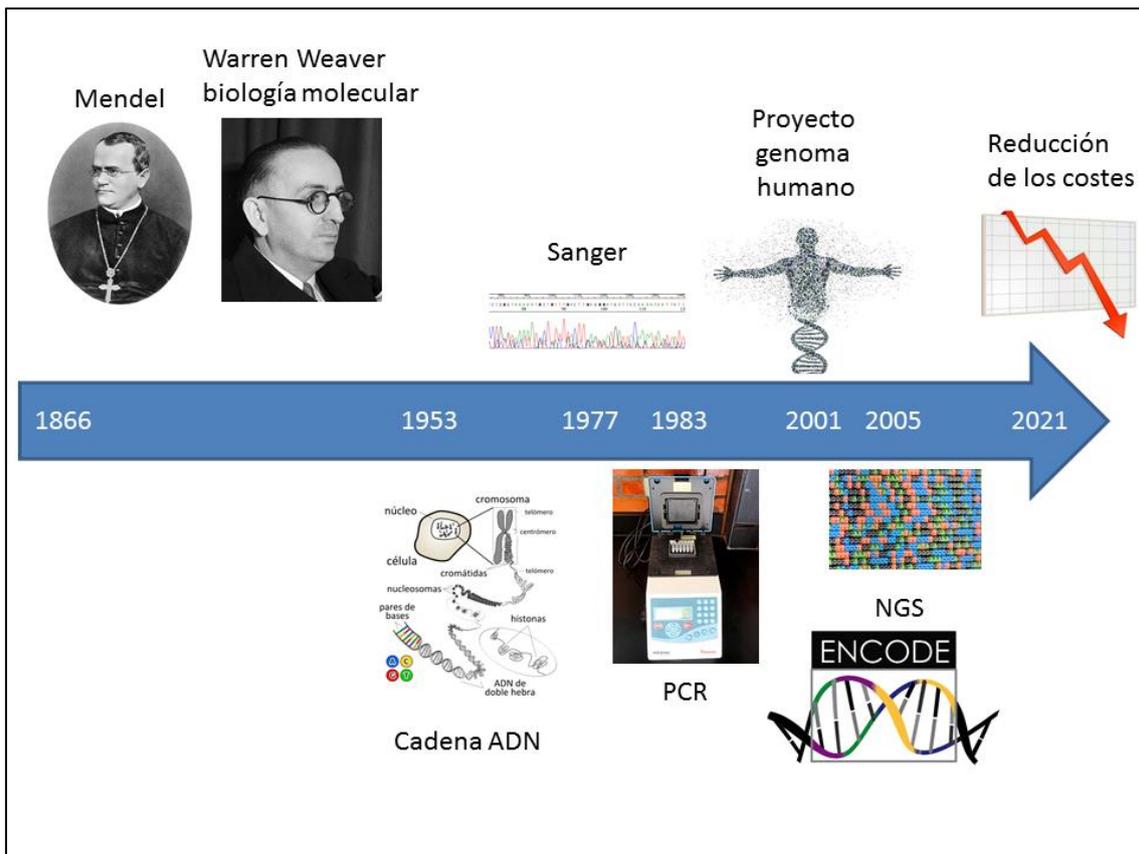


Figura 3. Hitos de la genética (original).

## I.2. De la Biología Molecular a la práctica clínica en Neuropediatría. Elementos clave.

### I.2.1. Proyecto Genoma Humano (PGH)

El Proyecto Genoma Humano (*Human Genome Project*, HGP) (PGH), se inició en 1990 y se completó en 2003. En él participaron investigadores de todo el mundo. Fue un trabajo colaborativo de gran envergadura en el que se consiguió secuenciar el genoma humano al completo. Fue el primer proyecto de biología a escala genómica y, en ese momento, algunos lo consideraron controvertido. Ahora se reconoce como una de las grandes hazañas de la investigación, y ha revolucionado la ciencia y la medicina<sup>8</sup>.

Objetivos alcanzados del PGH
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ secuencia del genoma humano, gratuita y accesible universalmente</li> <li>✓ desarrollo de nuevas de tecnologías de secuenciación: NGS</li> <li>✓ generación de mapas genéticos físicos y de transcripción del genoma de varios organismos</li> <li>✓ programa paralelo de investigación en bioética</li> <li>✓ creación de leyes que legislaron la no-discriminación genética en Estados Unidos</li> </ul>

**Tabla 1. Objetivos alcanzados del PGH<sup>8</sup>.**

### I.2.2. Secuenciación de nueva generación (NGS)

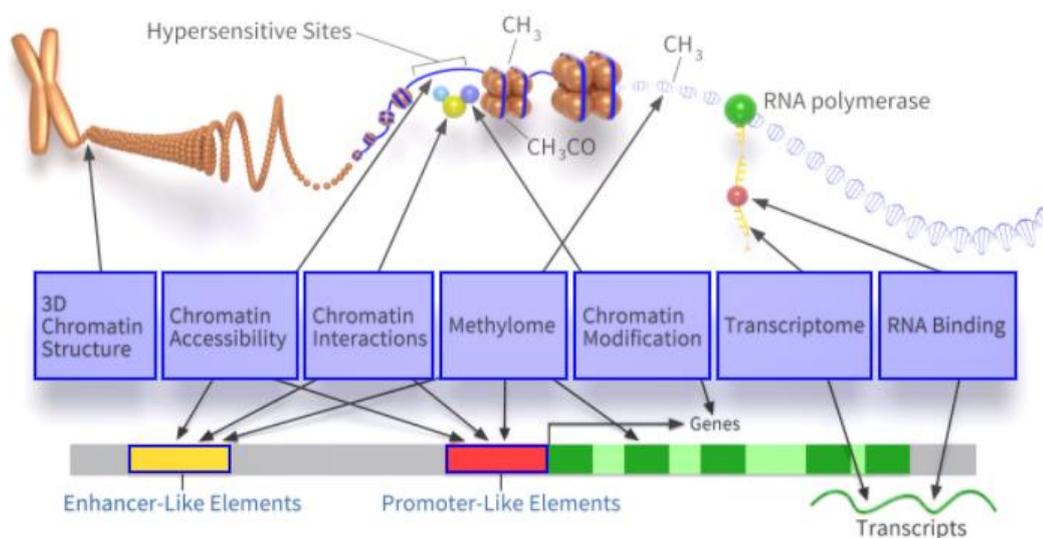
Las técnicas de secuenciación masiva o *next-generation sequencing* (NGS) son sistemas de alto rendimiento que permiten secuenciar un genoma completo en unas 27 horas. Un genoma completo está compuesto por  $3200 \times 10^6$  pb, es decir, que secuencian unas  $118 \times 10^6$  pb en una hora en relación a las técnicas de Sanger que permiten secuenciar unas 600pb en una hora. Por tanto NGS supone la obtención de una gran cantidad de datos rápidamente, pero que requieren de un análisis complejo posterior. La mejoría en los dispositivos y la reducción exponencial de los costes, ha supuesto en los países occidentales la democratización del acceso a la genética molecular.

### I.2.3. ENCODE

El conocimiento de la secuenciación del genoma humano supuso el paso previo e imprescindible para descifrar la información genética que nos determina como especie. El siguiente paso, mucho más complejo, es entender el mecanismo por el cual se expresa este código y su traducción funcional. Ante la necesidad apremiante de dirigir esfuerzos coordinados a gran escala similares al PGH, se creó ENCyclopedia of DNA Elements (*ENCODE*). Este proyecto fue iniciado en 2003 y su objetivo era mapear

los elementos funcionales del genoma humano. Este proyecto reveló que el genoma humano se transcribe de forma generalizada. Por lo tanto, se determinó que una gran parte de las regiones no-codificantes eran funcionales. ENCODE proporciona divulgación sin restricciones de datos biológicos clave en la comunidad científica.

Por tanto, *ENCODE* es una colaboración internacional en curso de grupos de investigación financiados por el *Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI)*. El objetivo de *ENCODE* es crear una lista completa de elementos funcionales del genoma humano, incluidos los elementos que actúan a nivel de proteínas y ARN, y los elementos reguladores que controlan las células y las circunstancias en las que un gen está activo. Los investigadores de *ENCODE* emplean una variedad de ensayos y métodos para identificar elementos funcionales. El descubrimiento y la anotación de elementos genéticos se logran principalmente mediante la secuenciación de una amplia gama de fuentes de ARN, genómica comparativa, métodos bioinformáticos integradores y genética clínica. Los elementos reguladores se investigan típicamente a través de ensayos de hipersensibilidad del ADN, ensayos de metilación del ADN e inmunoprecipitación (IP) de proteínas que interactúan con el ADN y el ARN, modificación de histonas, factores de transcripción, remodeladores de cromatina y proteínas de unión al ARN, seguidas de secuenciación.



Based on an image by Darryl Leja (NHGRI), Ian Dunham (EBI), Michael Pazin (NHGRI)

Figura 4. De: <https://www.encodeproject.org/>

Actualmente se sabe que existen entre 20.000-26.000 genes desde un punto de vista físico y funcional. Cada uno de estos genes contiene información necesaria para la síntesis de una o varias proteínas (o ARN funcionales, en el caso de los genes no codificantes). Aún se desconoce la función de una gran parte del genoma y es un área del conocimiento que está viviendo una expansión enorme.

#### 1.2.4. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®)<sup>9</sup>

De los aproximadamente 26.000 genes humanos, se considera que unos 5000 genes tienen una implicación clínica conocida (genes OMIM). OMIM es un repositorio primario que recoge información tanto de los genes humanos como de fenotipos descritos. La web oficial es <https://omim.org>, y ha estado en línea y se puede consultar desde 1987. OMIM sintetiza y resume información nueva e importante basada en la revisión de expertos de la literatura biomédica publicada<sup>10</sup>. Su objetivo es crear un portal de búsqueda de uso fácil y fiable para ayudar en la investigación genética clínica y molecular.

A día 27 de diciembre de 2021, OMIM se compone de más de 26.216 entradas que describen 16.648 genes y 9.541 fenotipos (ver figura 5 y 6).

MIM Number Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
Gene description *	15,813	748	50	37	16,648
Gene and phenotype, combined +	27	0	0	0	27
Phenotype description, molecular basis known #	5,865	358	5	34	6,262
Phenotype description or locus, molecular basis unknown %	1,406	112	4	0	1,522
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,652	102	3	0	1,757
Totals	24,763	1,320	62	71	26,216

**Figura 5. Número de entradas en OMIM 27/12/21 en OMIM Entry Statistics.**

## OMIM Gene Map Statistics

OMIM Morbid Map Scorecard (Updated December 27th, 2021) :

Total number of phenotypes* for which the molecular basis is known	7,057
Total number of genes with phenotype-causing mutation	4,561

\* Phenotypes include (1) single-gene mendelian disorders and traits; (2) susceptibilities to cancer and complex disease (e.g., BRCA1 and familial breast-ovarian cancer susceptibility, [113705.0001](#), and CFH and macular degeneration, [134370.0008](#)); (3) variations that lead to abnormal but benign laboratory test values ("nondiseases") and blood groups (e.g., lactate dehydrogenase B deficiency, [150100.0001](#) and ABO blood group system, [110300.0001](#)); and (4) select somatic cell genetic disease (e.g., GNAS and McCune-Albright syndrome, [139320.0008](#) and IDH1 and glioblastoma multiforme, [147700.0001](#).)

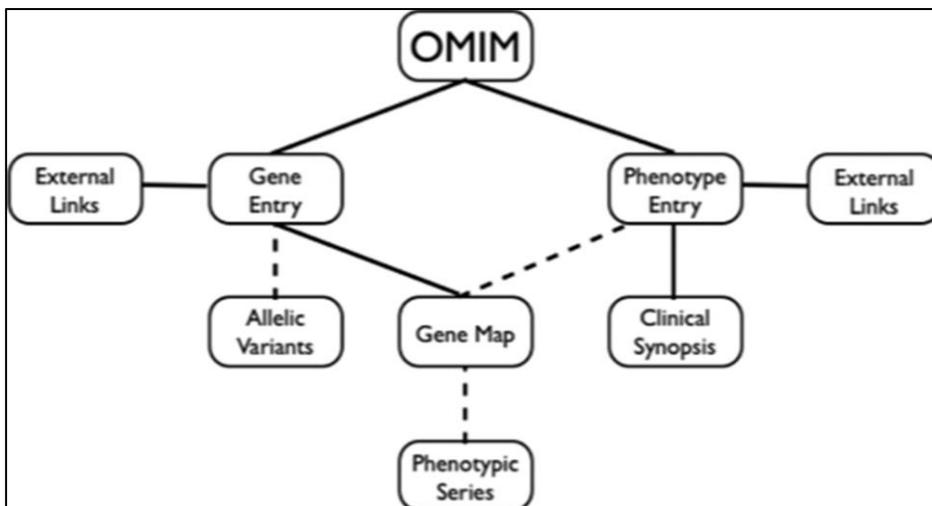
Dissected OMIM Morbid Map Scorecard (Updated December 27th, 2021) :

Class of phenotype	Phenotype	Gene *
Single gene disorders and traits	5,989	4,189
Susceptibility to complex disease or infection	693	503
"Nondiseases"	152	119
Somatic cell genetic disease	231	130

\*Some genes may be counted more than once because mutations in a gene may cause more than one phenotype and the phenotypes may be of different classes (e.g., activating somatic BRAF mutation underlying cancer, [164757.0001](#), and germline BRAF mutation in Noonan syndrome, [164757.0022](#).)

Figura 6. *OMIM Entry Statistics* el día 27/12/21.

Además, contiene una amplia variedad de recursos externos, que están dirigidos a información específicamente relacionada con los datos en la entrada OMIM.



**Figura 7. Diagrama de contenido OMIM.** Las líneas discontinuas indican que no todos los genes tienen variantes alélicas, ni se mapean todos los fenotipos; ni tampoco los fenotipos mapeados son necesariamente parte de una serie fenotípica<sup>10</sup>.

Los genes y los fenotipos se describen en entradas separadas, ya que distintas mutaciones en un gen pueden causar diferentes fenotipos y un fenotipo puede ser debido a diferentes genes. Se les asigna identificadores estables de seis dígitos (números MIM). Las entradas OMIM tienen un formato de texto libre estructurado que proporciona flexibilidad necesaria para describir las complejas relaciones entre los genes y los fenotipos.

Cuando buscamos un determinado gen en OMIM, la información obtenida viene estructurada con un esquema común que incluye el número asignado al gen, los nombres alternativos u otros símbolos con los que se denomina, el gen que la codifica, su localización y coordenadas genómicas. Además, se presenta una tabla donde se presenta la relación gen-fenotipo. Por último, en el texto libre podremos encontrar la descripción de la proteína, la clonación y expresión, la estructura del gen, la localización genómica, la función del gen, información sobre la genética molecular de la proteína o ARN, los modelos animales, información sobre las variantes alélicas publicadas, lo que incluye un enlace a ClinVar, y variantes alélicas tanto patogénicas como de significado incierto. Por último, podemos encontrar las referencias utilizadas y el enlace a las mismas (ver figura 8)<sup>10</sup>

\*182810  
Table of Contents

- Gene-Phenotype Relationships
- Text
- Description
- Cloning and Expression
- Gene Structure
- Mapping
- Gene Function
- Molecular Genetics
- Animal Model
- Allelic Variants
- Table View
- References
- Contributors
- Creation Date
- Edit History

A

\* 182810

SPECTRIN, ALPHA, NONERYTHROCYTIC 1; **SPTAN1**

*Alternative titles; symbols*

SPECTRIN, NONERYTHROID, ALPHA SUBUNIT; NEAS  
SPECTRIN, ALPHA-II  
FODRIN, ALPHA

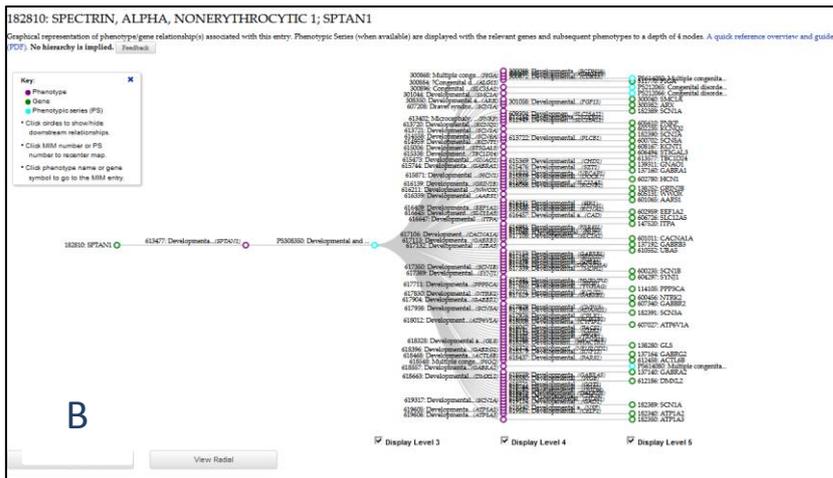
*HGNC Approved Gene Symbol:* **SPTAN1**

*Cytogenetic location:* [9q34.11](#) *Genomic coordinates (GRCh38):* [9:128,552,563-128,633,661](#) (from NCBI)

Gene-Phenotype Relationships

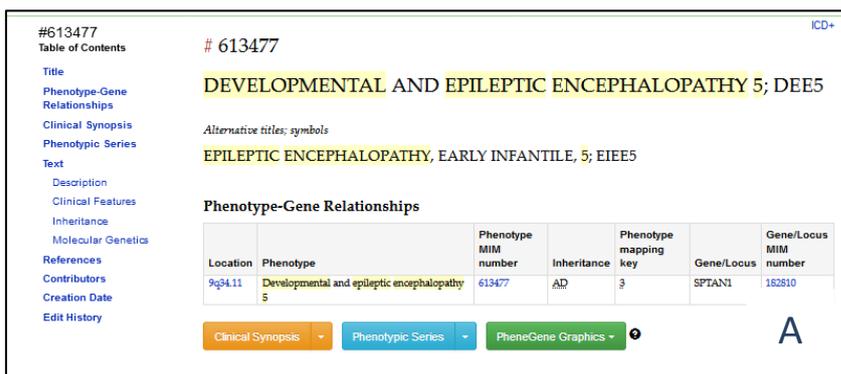
Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
<a href="#">9q34.11</a>	Developmental and epileptic encephalopathy 5	613477	AD	3

PheneGene Graphics ?



**Figura 8. (A) Ejemplo de entrada OMIM al realizar la búsqueda del gen Spectrin, alpha, nonerythrocytic 1, *SPTAN1* (\*182810). (B) Gráfico generado en los que se representa que otros genes pueden producir el fenotipo principal descrito actualmente asociado a variantes patogénicas en el gen *SPTAN1*<sup>9</sup>.**

Quando se realiza la búsqueda por fenotipo, obtendremos inicialmente el número asignado, la tabla con las relaciones fenotipo-gen, y tres enlaces adicionales. El primer enlace ofrece una sinopsis clínica, el segundo *Phenotypic Series*, es decir, las series de fenotipos similares y por último los gráficos (ver B de figura 8). Posteriormente en el texto, se recoge una descripción del fenotipo, los rasgos clínicos, el tipo de herencia, la genética molecular y por último las referencias (ver figura 9).



#613477  
Table of Contents  
MIM Entry

# 613477

**DEVELOPMENTAL AND EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY 5; DEE5**

**INHERITANCE**  
- Autosomal dominant

**HEAD & NECK**  
*Head*  
- Microcephaly, progressive (in some patients)   
*Eyes*  
- No visual attention  
- Coloboma-like optic discs (1 patient)

**NEUROLOGIC**  
*Central Nervous System*  
- Seizures, tonic, intractable  
- Mental retardation, severe to profound  
- Lack of speech development  
- Lack of visual attention  
- Hypsarhythmia  
- Spastic quadriplegia  
- Hyperreflexia  
- Lack of independent ambulation  
- Hypotonia  
- Diffuse hypomyelination  
- Widespread brain atrophy  
- Thin corpus callosum  
- Cerebral atrophy  
- Brainstem atrophy  
- Cerebellar atrophy

**MISCELLANEOUS**  
- Onset in infancy  
- Variable severity  
- De novo mutation

**MOLECULAR BASIS**  
- Caused by mutation in the nonerythrocytic alpha-spectrin 1 gene (SPTAN1, 182810.0001)

Contributors: Cassandra L. Kniffin - updated : 5/20/2015  
Creation Date: Cassandra L. Kniffin : 7/12/2010  
Edit History: joanna : 10/14/2020

**B**

**Figura 9. (A) Ejemplo de entrada OMIM al realizar la búsqueda del fenotipo “DEVELOPMENTAL AND EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY 5” (# 613477) asociada a variantes en *SPTAN1*. (B) Captura de pantalla del apartado de *Clinical Synopsis* asociado a *DEVELOPMENTAL AND EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY 5*<sup>9</sup>.**

Las sinopsis clínicas son breves descripciones fenotípicas estructuradas, vinculadas a las entradas del fenotipo. Son representaciones tabulares de las características fenotípicas de un trastorno y están organizadas. Se crean principalmente para genetistas clínicos, para su uso en la práctica clínica. Son útiles para delimitar los trastornos superpuestos y rasgos característicos distintivos (ver B de figura 9)<sup>10</sup>.

Cuando las entradas de varios fenotipos se superponen significativamente en sus manifestaciones clínicas, pueden ser seleccionadas en una serie fenotípica. Las características clínicas utilizadas en OMIM se asignan mediante identificadores únicos del *Unified Medical Language System (UMLS)*<sup>11</sup>, *Human Phenotype Ontology (HPO)*<sup>12</sup>, *SNOMED CT*<sup>13, 14</sup> y *Elements of Morphology (EoM)*<sup>15</sup>.

OMIM ha supuesto una herramienta clave en la genética molecular y también en la genética clínica y juega un papel esencial en el nombramiento y clasificación de

fenotipos genéticos. La eclosión de las tecnologías NGS, está generando una gran cantidad de información y un aumento de los informes de presuntas relaciones gen-fenotipo. Por esto desde enero de 2013 OMIM estableció unos criterios para establecer la relación gen-fenotipo:

- 1) La existencia de múltiples individuos no emparentados con variantes patogénicas en el mismo gen.
- 2) Las variantes segregan con el mismo fenotipo en varias familias.
- 3) Las variantes ocurren *de novo* en un número estadísticamente significativo de los individuos con trastornos de herencia dominante.
- 4) Hay datos funcionales de apoyo como modelos animales, estudios *in vitro* o *in vivo*, experimentos de función génica, o ubicación de la mutación en una región o vía funcional relacionada con el fenotipo.

Basándose en la información que aporta OMIM, en los exomas clínicos que se realizan en la práctica clínica habitual se secuencian unos 5000 genes. En los estudios exoma completo (WES), secuencian todos los exones, es decir, unos 25.000 genes y en la secuenciación del genoma completo (WGS), se secuencian todos los genes incluyendo zonas intergénicas, el total de unas  $3.200 \times 10^6$  pb.

Después de la secuencia del genoma humano de referencia haploide eucromático "terminado", el rápido desarrollo de tecnologías de secuenciación nuevas, más rápidas y más baratas está haciendo posible la era de la genómica humana personalizada. Se han generado secuencias del genoma humano diploide personal, y cada una ha contribuido a nuestra mejor comprensión de la variación en el genoma humano. Consecuentemente, hemos comenzado a apreciar la inmensidad de la variación genética individual desde un solo nucleótido hasta variantes estructurales. Sin embargo, la traducción de la variación a escala del genoma en información de utilidad médica está en sus inicios. Se necesitan mejores herramientas de análisis y una comprensión más profunda de la biología de nuestro genoma para descifrar, interpretar y optimizar la utilidad clínica de lo que la variación en el genoma humano puede enseñarnos<sup>16</sup>.

I.2.5. Interpretación de variantes: Recomendaciones de la *American College of Medical Genetics and Genomics*

Una vez secuenciado el ADN, es importante la interpretación de los datos. La *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) publicó en 2007 una guía para la interpretación de variantes genómicas<sup>17</sup>. La guía fue actualizada en 2015 por los representantes de la ACMG, la Asociación de Patología Molecular (AMP) y el Colegio de Patólogos Americanos (CAP) con el objetivo de revisar los estándares y las pautas para la interpretación de variantes detectadas en la secuenciación<sup>17</sup>. Las decisiones se basaron en la práctica habitual realizada por más de 75 laboratorios de genética molecular que colaboraron con el proyecto mediante encuestas y compartiendo sus protocolos. En esta guía se actualizó la terminología estándar (ver tabla 2).

Clasificación de las variantes según ACMG				
Benigna	Probablemente benigna	Significado incierto	Probablemente patógena	Patógena

**Tabla 2. Terminología estándar propuesta por ACMG.**

Además, esta guía describe un proceso para la clasificación de variantes en estas cinco categorías basado en criterios que utilizan diferentes parámetros como los datos de frecuencia poblacional, datos computacionales, datos funcionales, datos de segregación, entre otros<sup>18</sup>.

En los últimos años, los laboratorios clínicos moleculares están detectando nuevas variantes de secuencia en el curso de las pruebas de muestras de pacientes para un número cada vez mayor de genes asociados con trastornos genéticos. Si bien algunos fenotipos están asociados con un solo gen, muchos están asociados con múltiples genes. Nuestra comprensión de la importancia clínica de cualquier variante de secuencia dada se ubica en un gradiente, que va desde aquellas en las que la variante es con certeza patogénica (causante de enfermedad) para un trastorno hasta aquellas que son casi con certeza benignas.

El enfoque de clasificación de variantes está destinado a ser aplicable a variantes en todos los genes mendelianos, ya sea que se identifiquen mediante pruebas de un solo gen, paneles de múltiples genes, secuenciación del exoma o secuenciación del genoma.

Esta guía es general, pero hay que tener muy en cuenta que un determinado gen puede tener su propia guía, y se debe de seguir trabajando en la elaboración de guías específicas para determinadas enfermedades y genes en los que puede variar el peso asignado a ciertos criterios.

Al secuenciar un genoma humano encontraremos centenares sino miles de variantes en cada individuo. Clásicamente se definía mutación como un cambio permanente en la secuencia de nucleótidos, mientras que polimorfismo se definía como una variante con frecuencia superior al 1%. Estos términos en sí mismos no implican patogenicidad ni benignidad respectivamente. Por este motivo, actualmente se recomienda sustituir estos términos por el término “variante” con los siguientes modificadores: (1) patogénica, (2) probablemente patogénica, (3) significado incierto, (4) probablemente benigna, y (5) benigna.

Solo definiremos una variante como “probablemente patógena” o “probablemente benigna” cuando exista más del 90% de certeza de que es la causante de enfermedad o si, por el contrario, se trata de un cambio neutro sobre el fenotipo. Actualmente aún no existe suficiente evidencia científica para asignar una certeza cuantitativa de como de benigna o maligna es una variante, esto es debido a la naturaleza heterogénea de las enfermedades. Sin embargo, se espera que con el tiempo se desarrollen enfoques experimentales y estadísticos para asignar objetivamente la confianza de patogenicidad de las variantes en términos de probabilidades<sup>18</sup>.

Es importante considerar las diferencias entre identificar una variante como patógena, es decir, causante de enfermedad, y una variante que puede predecir que es disruptiva/dañina para la proteína que codifica pero que no está necesariamente implicada en la enfermedad que se está estudiando.

Las recomendaciones ACMG se basan en dos conjuntos de criterios: uno para la clasificación de variantes patógenas o probablemente patógenas y otro para la clasificación de variantes benignas o probablemente benignas. Cada criterio

patogénico se pondera como muy fuerte (PVS1), fuerte (PS1-4), moderado (PM1-6) o de apoyo (PP1-5), y cada criterio benigno se pondera como independiente (BA1), fuerte (BS1-4) o de apoyo (BP1-6). Para una variante determinada, el usuario selecciona los criterios basándose en la evidencia observada para la variante. Se combinan los criterios obtenidos para clasificarlas según los 5 niveles preestablecidos. Si una variante no cumple los criterios de patogenicidad o benignidad utilizando cualquiera de estos criterios, o si la evidencia es contradictoria, la variante toma como valor predeterminado “de significado incierto” (ver figura 10).

Todas estas herramientas han permitido la identificación etiológica de muchos pacientes, incluyendo aquellos con fenotipos sutiles o atípicos, y también variantes de baja penetrancia o hipomórficas.

Obviamente, aunque no se han elaborado con este objetivo específico, también han ayudado a la identificación de nuevas variantes en genes implicados en el neurodesarrollo y en genes candidatos.

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very Strong
<b>Population Data</b>	MAF is too high for disorder <i>BA1/BS1</i> OR observation in controls inconsistent with disease penetrance <i>BS2</i>			Absent in population databases <i>PM2</i>	Prevalence in affecteds statistically increased over controls <i>PS4</i>	
<b>Computational And Predictive Data</b>		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product <i>BP4</i> Missense in gene where only truncating cause disease <i>BP1</i> Silent variant with non predicted splice impact <i>BP7</i>	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product. <i>PP3</i>	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before <i>PM5</i> Protein length changing variant <i>PM4</i>	Same amino acid change as an established pathogenic variant <i>PS1</i>	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease <i>PVS1</i>
<b>Functional Data</b>	Well-established functional studies show no deleterious effect <i>BS3</i>		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common <i>PP2</i>	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation <i>PM1</i>	Well-established functional studies show a deleterious effect <i>PS3</i>	
<b>Segregation Data</b>	Non-segregation with disease <i>BS4</i>		Co-segregation with disease in multiple affected family members <i>PP1</i>	Increased segregation data →		
<b>De novo Data</b>				<i>De novo</i> (without paternity & maternity confirmed) <i>PM6</i>	<i>De novo</i> (paternity & maternity confirmed) <i>PS2</i>	
<b>Allelic Data</b>		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant <i>BP2</i> Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant <i>BP2</i>		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant <i>PM3</i>		
<b>Other Database</b>		Reputable source w/out shared data = benign <i>BP6</i>	Reputable source = pathogenic <i>PP5</i>			
<b>Other Data</b>		Found in case with an alternate cause <i>BP5</i>	Patient's phenotype or FH highly specific for gene <i>PP4</i>			

Figura 10. Imagen original del artículo Richards *et al*<sup>18</sup>.

### **I.3. El reto de alcanzar un diagnóstico etiológico en Neuropediatría.**

#### **I.3.1. Los trastornos del neurodesarrollo.**

Los trastornos del neurodesarrollo (TND) son un grupo heterogéneo de condiciones que se caracterizan por presentar alteraciones en el adecuado funcionamiento personal, social, académico u ocupacional del individuo y que se producen por déficit del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) de inicio temprano en edad pediátrica.

Se manifiestan por disfunciones cerebrales que afectan a la capacidad para el aprendizaje y la competencia social, entre otras aptitudes, impidiendo el desarrollo normal en la infancia. Los TND, además, tienen un componente evolutivo o madurativo propio de la fase del desarrollo en la que se manifiestan, lo que supone un reto para su evaluación. Frecuentemente es difícil discernir entre un TND y la normalidad. En la población sana pueden aparecer síntomas que caracterizan los diferentes TND. Según el consenso actual, la gravedad de los síntomas, la aparición de síntomas a edades inapropiadas, la persistencia en el tiempo o la pobre compensación de los síntomas que se vinculan a la discapacidad adaptativa del paciente determinarán su tipificación como trastorno. Esta discapacidad adaptativa también está sujeta a cierta subjetividad, ya que vendrá dada en parte, por las exigencias impuestas en una determinada sociedad. Médicamente, utilizamos la estadística para determinar el rango de normalidad de las variables cuantitativas, estableciendo como normal aquello que se encuentra dentro de los percentiles 3 hasta el 97, es decir, entre -2 y +2 desviaciones estándar respecto a un valor medio.

El neurodesarrollo comienza en la etapa prenatal temprana con un proceso complejo que se inicia con la proliferación de distintos tipos de células, seguida de la diferenciación en varios destinos, la migración a sus ubicaciones adecuadas y el establecimiento e integración en los circuitos funcionales<sup>19</sup>. Estos pasos continúan evolucionando en los años posnatales debido a funciones como la plasticidad, la mielinización y la maduración de la conectividad de las células cerebrales. Por lo tanto,

el neurodesarrollo abarca un importante período de tiempo en la vida de un ser humano que va desde la vida fetal temprana hasta el comienzo de la edad adulta. Si todo va bien, el cerebro humano altamente especializado será capaz de desarrollar una serie de habilidades de gran complejidad, como el lenguaje, la cognición, la emoción y un repertorio de movimientos precisos y coordinados<sup>20</sup>. Cuando el proceso se altera pueden surgir trastornos del neurodesarrollo como problemas cognitivos, neuropsiquiátricos o motores<sup>21</sup>. En general se traduce como discapacidad intelectual, dificultades de aprendizaje, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, TEA y parálisis cerebral infantil (PCI)<sup>22</sup>. Los TND presentan un amplio espectro de manifestaciones, así como de gravedad, desde disfunciones cerebrales muy incapacitantes hasta signos neurológicos leves como dificultades del aprendizaje.

Otras características básicas de los TND son la ausencia de biomarcadores, y la presencia de síntomas comunes o similares entre los diferentes TND, y la frecuente comorbilidad entre ellos. Son afecciones complejas que no son fáciles de conceptualizar. En los últimos años muchas publicaciones han cuestionado el planteamiento teórico actual que define los TND. Thapar *et al.* abogan por un enfoque flexible en la práctica clínica que tenga en cuenta el alto nivel de heterogeneidad y la superposición de los TND, con el objetivo de que la investigación se vincule más estrechamente con lo que es observado en la práctica clínica real<sup>23</sup>. Hace décadas, otros autores sugirieron que los TND deberían ser considerados como un espectro con diversa gravedad de deterioro que va desde la disfunción cerebral mínima hasta las formas más graves de deterioro, y como un continuo donde todos los dominios del desarrollo pueden verse afectados, con diversos grados de participación<sup>24,25</sup>.

A medida que evoluciona la comprensión fisiopatológica de los TND, se hace más necesario replantear la situación del sistema de clasificación y expandirlo a una clasificación multidimensional que tenga en cuenta el perfil fenotípico pero que, además, también se tenga en consideración los mecanismos subyacentes.

La clasificación actual con mayor aceptación en la comunidad científica es la del *Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5* o DSM-5, publicado el 18 de mayo de 2013<sup>26</sup> (ver tabla 3).

Esta clasificación no se basa en identificar entidades biológicamente distintas, sino más bien en identificar grupos de pacientes que requieren servicios diferenciados. Cada trastorno puede deberse a muchas causas, entre las que se incluyen daño cerebral por hipoxia-isquemia, traumatismos, exposición a tóxicos, infecciones, inmunológicas, nutricionales, metabólicas, genéticas, estructurales, oncológicas e incluso iatrogénicas. Por tanto, los diagnósticos se basan en una constelación de comportamientos y síntomas que se especifican en el DSM-5 y en el CIE-10. De esta forma, el diagnóstico está sujeto a variabilidad interevaluador y no deja de tener cierta subjetividad<sup>27</sup>.

Trastornos del neurodesarrollo según DSM-5
Discapacidad intelectual
Trastornos de la comunicación
Trastorno del espectro autista
Trastorno por déficit de atención/hiperactividad
Trastorno específico del aprendizaje
Trastornos motores
Otros trastornos del neurodesarrollo

**Tabla 3. Trastornos del neurodesarrollo según DSM-5<sup>26</sup>**

Por tanto, etiológicamente, los TND pueden tener un origen ambiental, genético o, probablemente, multifactorial. La estructura y el funcionamiento cerebral, fuera de la influencia de los factores ambientales, están codificados en la arquitectura genética del individuo. La suma de diferentes factores ambientales y la combinación de variantes genéticas normales en la población pueden predisponer al individuo a padecer estos trastornos. La heredabilidad de los TND es elevada; se han registrado índices del 0.77-0.88 en entidades tan diferentes como los TEA<sup>28</sup>, la dislexia<sup>29</sup>, o el TDAH<sup>30</sup>. Los avances en la genética no sólo apoyan el carácter dimensional y categórico de un trastorno, sino también el carácter polisintomático de una misma anomalía

genética. Así, podemos registrar que determinadas variantes o alteraciones genéticas pueden predisponer a distintos TDN, esto se conoce como pleiotropismo fenotípico. Esta circunstancia podría estar parcialmente justificada por factores epigenéticos, estocásticos o también por la influencia de otros genes del individuo que modifican el fenotipo. Se han descrito modelos de doble impacto en la literatura<sup>31</sup>.

Como se ha mencionado antes, es poco común que un TND ocurra aisladamente, aunque en nuestra experiencia esto sí ocurre en las formas más leves, pero no tanto en las graves. La disfunción en un área a menudo se acompaña de disfunción en otras áreas que frecuentemente conducen a múltiples diagnósticos. Esto se denomina comorbilidad, y hay numerosos estudios que relacionan los diferentes TND con epilepsia, trastornos del movimiento, etc. Por otro lado, las estrategias de tratamiento también se superponen, pero a veces, el no diagnosticar las comorbilidades puede dar lugar a un abordaje terapéutico insuficiente.

Ergo, con todo esto podemos afirmar que la independencia biológica de los diferentes trastornos es más que cuestionable, lo que nos lleva a cuestionarnos el paradigma actual y a plantearnos donde se encuentran las respuestas. Probablemente intentar comprender el sustrato neurobiológico, es decir, la fisiopatología que subyace al TND esclarecerá este camino. Los vínculos biológicos entre el funcionamiento del cerebro y el comportamiento están siendo estudiados desde hace décadas. Hoy sabemos que los TND pueden ser una manifestación de conectivopatías, sinaptopatías, dendritopatías, de trastornos de la neurotransmisión y la señalización intracelular, trastornos metabólicos, o en última instancia secundarios a alteración en la función genética y también debidos a alteraciones en la epigenética<sup>32</sup>.

Sabemos que el funcionamiento cerebral es tremendamente complejo, y en él están implicados una inmensa cantidad de moléculas y sus interacciones. Comprender cómo actúa cada gen puede ayudarnos a entender los TND, pero cada paciente será único. La naturaleza dinámica del desarrollo del cerebro y su vulnerabilidad selectiva a lo largo del tiempo, a través de redes neuronales, funciones y contextos, impacta en el perfil de comportamiento.

Actualmente no se pueden curar los TND, y el objetivo de las estrategias e intervenciones de tratamiento es mejorar los síntomas intercurrentes e intermitentes, minimizar las limitaciones funcionales y aumentar la autonomía del individuo.

Abordar los mecanismos de la enfermedad vendrá supeditado a la capacidad de identificar biomarcadores y dianas genéticas para diseñar terapias específicas. Esto solo será posible conociendo bien las bases genéticas subyacentes a cada TND o enfermedad neurológica. Existen numerosos ejemplos actualmente, como es el de la atrofia muscular espinal, en la que se están aplicando terapias con oligonucleótidos, Nusinersen<sup>33</sup> o más recientemente terapia genética con onasemnogene abeparvovec (zolgesma®)<sup>34</sup>, que ha cambiado totalmente la historia natural de esta enfermedad<sup>35</sup>.

En el caso de la epilepsia, en las últimas décadas se ha comenzado a pasar de una clasificación funcional pura de las convulsiones y la epilepsia, a un enfoque más específico de la clasificación etiológica que se basa en genética molecular.

Este nuevo enfoque ha allanado el camino para terapias basadas en la causa, más concretamente para la aplicación de la terapia génica<sup>36</sup>, así como para determinar qué fármacos son más adecuados según la alteración fisiopatogénica que determinada la mutación.

En la discapacidad intelectual, existen múltiples trabajos que han estudiado la etiología genética<sup>37, 38, 39</sup>. En el TEA también se han estudiado mutaciones genéticas en las vías moleculares, de la morfología sináptica y su función<sup>40</sup>.

Actualmente estamos mejor equipados que nunca para estudiar los TND utilizando un enfoque que busca explicar la heterogeneidad del fenotipo (figura 11).

Time/Maturation and Environment	Level of investigation	Clinical/Translational tools	Pre-clinical tools
	Domain 1: Behavior/Function		
	Clinical Phenotype(s) Clinical Testing Diagnosis	Clinical Evaluation Neuropsychological testing DSM/ICD	Animal behavioral testing Paradigms
	Domain 2: Neuronal Networks		
	Structural Connectivity Functional Connectivity Effective Connectivity	Structural MRI/DTI Functional MRI, NIRS EEG, MEG, TMS	
Domain 3: Cellular and Molecular			
Neurons and Glia Synapse and Dendrites Neurotransmitters/ receptors	Electron microscopy (post mortem) PET imaging of synaptic density CSF analysis	Single neuron recordings Array Tomography/ Electron microscopy Immunohistochemistry Optogenetics	
Domain 4: Genetics/Epigenetics			
Chromosomes Genes/epigenetic machinery Protein Metabolites	Karyotyping, FISH, Telometric analysis SNP, WES, WGS Proteomics Metabolomics	Genetic knock-outs Animal Models	

**Figura 11: Enfoque clínico y de investigación para determinar el espectro de TND. Este modelo trata de descifrar el vínculo entre los mecanismos biológicos que subyacen al desarrollo del cerebro y el comportamiento. Representa cuatro dominios de investigación principales que investigan los TND que van desde el comportamiento o análisis funcional del fenotipo, para evaluar las redes neuronales subyacentes y examinar la estructura celular y los fundamentos moleculares de estas redes y la identificación de sus fundamentos genéticos y epigenéticos. Dentro de cada dominio, hay niveles de investigación que abordan la estructura y / o la función del sistema nervioso de ese dominio en particular (columna de la izquierda). La columna central enumera las herramientas clínicas que se utilizan para investigar cada uno de estos niveles dentro de un dominio. La columna de la derecha enumera ejemplos de herramientas preclínicas correspondientes<sup>27</sup>.**

Por tanto, el modelo actual que define los TND es útil para definir las características de los pacientes y posiblemente para aportarles las adaptaciones pertinentes, pero le falta una categorización de base biológica que pueda permitir descifrar los mecanismos subyacentes de estos trastornos. En el futuro un sistema multidimensional podrá clasificar a los pacientes teniendo en cuenta su perfil de

comportamiento y sus mecanismos subyacentes. Buscando un conocimiento molecular, genético y biológico más profundo, se podrán desarrollar intervenciones efectivas que puedan conducir a una mejoraría o incluso a la curación<sup>27</sup>.

### I.3.2. Enfermedades raras/enfermedades ultrarraras.

Las enfermedades raras (ER) o poco frecuentes son aquellas que tienen una baja prevalencia en la población. Para ser considerada rara, cada enfermedad específica sólo puede afectar a un número limitado de personas. No existe un consenso internacional sobre la frecuencia máxima para clasificar como ER una determinada entidad, y mientras que en Estados Unidos se considera que una enfermedad es rara si afecta a menos de 1/1630 personas, en Europa se considera que son aquellas que afectan a menos de 5 de cada 10.000 individuos en una población (1/2000). En Japón son más restrictivos y consideran que ER es aquella que afecta a menos de 1/2500<sup>41</sup>. Por otro lado, algunas enfermedades pueden ser mucho más prevalentes en determinadas regiones debido a la presencia de mutaciones fundadoras, siendo ER en la mayoría del resto de países.

El número exacto de ER tampoco tiene un consenso estándar, y el rango varía entre 5000 y 8000<sup>42</sup>, en *Orphadata* a fecha de 2018 aparecían unas 9603.

La prevalencia estimada en diferentes poblaciones es muy variable y se encuentra entre el 1.5-6.2%<sup>42, 43, 44</sup>. En la revisión realizada por Richter *et al.* refieren que hay una prevalencia media a nivel mundial de unos 40-50 casos/100.000 personas. En España, por ejemplo, se estima que hay unos 3 millones de personas con una ER. Además, existe una tendencia a que las ER sean cada vez más diagnosticadas, en parte debido al mejor diagnóstico de los pacientes gracias a las técnicas de NGS, al mejor acceso a la sanidad en países en vías de desarrollo, al incremento bruto de la población, y por último, al aumento de nuevas descripciones de ER no conocidas previamente<sup>45</sup>. Por tanto, aunque las ER son individualmente raras, colectivamente son frecuentes<sup>42</sup>.

El porcentaje de ER con etiología genética definida es del 39%<sup>42</sup>. Guillem *et al.* realizaron un estudio epidemiológico sobre enfermedades raras en niños discapacitados con DI grave, discapacidad sensorial o neuromuscular en el que se determinó que el 26% eran debidos a ER. Las cifras son incluso mayores en pacientes con patología neuromuscular, esquelética o con trastornos del movimiento (42.2%)<sup>46</sup>. Es importante destacar, por tanto, que gran cantidad de ER presentan síntomas neurológicos y a su vez, gran cantidad de enfermedades en neuropediatría son ER.

Esto supone un gran reto diagnóstico etiológico para los profesionales, ya que cuanto menos prevalente sea una enfermedad más probablemente el médico la desconozca y el diagnóstico sea mucho más dificultoso. Un paciente con ER espera una media de 4 años hasta obtener un diagnóstico, y en el 20% de los casos transcurren 10 o más años hasta lograr el diagnóstico adecuado<sup>45</sup>. Esta demora se traduce en que los pacientes no reciben apoyos ni tratamiento (29.37%), reciben tratamientos inadecuados (17.9%) o incluso que su enfermedad se agrave (31.26% de los casos).

### I.3.3. Rendimiento de las técnicas de secuenciación masiva

En las últimas tres décadas, el conocimiento de la etiología de gran número de trastornos neurológicos se ha incrementado de manera exponencial gracias a los avances de la biología molecular. De esta forma, la NGS ha cambiado la manera de estudiar la genética humana y se ha producido la identificación extensa de gran cantidad de nuevas variantes alélicas causantes de enfermedades genéticas. Actualmente la rentabilidad del diagnóstico con NGS es de hasta el 50% en determinadas patologías neurológicas<sup>47</sup>, aunque muy variable según las series estudiadas y la patología concreta. Esto ha supuesto una revolución en cuanto al manejo médico de estos pacientes e incluso un cambio en el paradigma en la práctica médica habitual.

Un ejemplo de esto es la aplicación de las pruebas genéticas en el manejo de la epilepsia. En enero de 2022, 109 entradas en OMIM hacen referencia a epilepsia. La base genética de la epilepsia se conoce desde hace décadas, de esta forma, había

evidencia con estudios de herencia basada en gemelos<sup>48,49</sup> y también su relación observacional con síndromes genéticos clásicos que asocian epilepsia como el complejo esclerosis tuberosa<sup>50</sup> el síndrome de Rett<sup>51</sup>, síndrome de X-frágil<sup>52</sup>, síndrome de DiGeorge<sup>53</sup>, o el síndrome de Angelman<sup>54</sup>. No fue hasta la década de los 90 cuando se empezaron a describir las primeras canalopatías<sup>55-58</sup>. A partir de 2017, se conocían al menos 66 genes asociados a epilepsia relacionados con canales iónicos<sup>59</sup>. Sin embargo, del total de epilepsias genéticas, los genes de los canales iónicos constituyen una minoría. Ahora se sabe que los genes involucrados en diversos procesos celulares están implicados en epilepsia. Básicamente, entre estos procesos se incluyen el transporte de iones, el crecimiento y la diferenciación celular, la regulación de procesos sinápticos, el transporte y el metabolismo de moléculas pequeñas dentro y entre las células, y la regulación de la transcripción y traducción de genes. En epilepsia la media de diagnóstico etiológico mediante NGS es de un 17%, sin embargo en determinados subgrupos de pacientes este porcentaje se incrementa significativamente. Esto ocurre en pacientes con epilepsia de inicio precoz, epilepsia fármaco-resistente, y epilepsia con trastornos del neurodesarrollo asociados. En concreto, estudios en epilepsias de inicio precoz aportan una rentabilidad diagnóstica del 47%<sup>60</sup>, 50%<sup>61</sup>, e incluso del 57%<sup>62</sup>.

Los genes más frecuentemente implicados son el *SCN1A*, *KCNQ2*, *CDKL5*, *SCN2A* y *STXBP1*, tanto es así, que se ha descrito que estos cinco genes implican al 50% de los resultados diagnósticos. Los 27 genes más comúnmente implicados en epilepsia explican el 80% de los casos diagnosticados. Cada vez existe más evidencia de que el diagnóstico genético permite elegir la mejor estrategia terapéutica. En un estudio prospectivo, se probó que en el 80% de los diagnósticos genéticos de epilepsia, el diagnóstico había tenido implicaciones en el tratamiento potencial<sup>63</sup>. Por este motivo, en epilepsia las técnicas de NGS están pasando a ser la primera opción diagnóstica.

En los pacientes con TEA, la mayor rentabilidad diagnóstica la encontramos en los casos “complejos”, es decir, aquellos que presentan otros hallazgos como microcefalia, epilepsia, anomalías congénitas o rasgos dismórficos. En el estudio realizado por Guo *et al.*, el 40.8% de los pacientes con TEA sindrómico presentaba variantes con

evidencia de riesgo de enfermedad, incluida una variante *frameshit de novo* en *NR4A2* y dos variantes de cambio de aminoácido *de novo* en *SYNCRIP*, mientras que el 21.1% presentaba variantes patogénicas o probablemente patogénicas relevantes. Los pacientes con más de una variante de riesgo (9.9%) se vieron más gravemente afectados con respecto a la capacidad intelectual en comparación a aquellos con una sola variante de riesgo<sup>64</sup>.

A pesar de la heterogeneidad clínica y genética del TEA, los estudios de expresión génica muestran que los cambios en el neocórtex de los pacientes con autismo convergen en genes y vías comunes. Velmeshev *et al.* realizaron un estudio en el que se realizó secuenciación de ARN mensajero de tejido cortical de pacientes con TEA para identificar cambios transcriptómicos asociados con el TEA en tipos de células específicos. Vieron que la señalización sináptica de las neuronas excitatorias de la capa superior y el estado molecular de la microglía se ven afectados preferentemente en el TEA<sup>65</sup>.

Gilissen C *et al.* aplicaron la secuenciación del genoma completo a 50 pacientes con DI grave hijos de padres sanos y obtuvo un rendimiento diagnóstico del 42%<sup>38</sup>. Todos los pacientes incluidos en dicho estudio no habían recibido un diagnóstico molecular después de una amplia exploración genética, incluidos los estudios de CNVs (variantes genéticas, como inserciones, deleciones y duplicaciones de segmentos de ADN) basados en microarrays, entre otros. A pesar de esta preselección, se identificaron 84 variantes de secuencia *de novo*, que afectaban a las secuencias codificantes. Mostraron un aumento estadísticamente significativo de mutaciones de pérdida de función, así como un enriquecimiento en genes previamente implicados en trastornos relacionados con el diagnóstico sindrómico. Además, se identificaron ocho CNVs *de novo*, que incluyen deleciones de un solo exón e intraexónicas, así como inserciones intercromosómicas. Estas CNVs de los genes conocidos se obtuvieron con más frecuencia de lo esperado. Sobre la base de la interpretación diagnóstica de todas las variantes *de novo*, se llegó a un diagnóstico genético concluyente en 20 pacientes. Esto resulta en un rendimiento diagnóstico de 42% en esta cohorte ampliamente estudiada, y 62% como una estimación acumulada en una cohorte no seleccionada. Estos resultados sugieren que las CNVs y las variantes de secuencia *de novo* que afectan a la

región de codificación son una causa importante de DI grave. Con este interesante estudio se llegó a la conclusión de que la secuenciación del genoma se puede aplicar como una prueba genética única para identificar y caracterizar de manera fiable el amplio espectro de variación genética, proporcionando un diagnóstico genético en una gran proporción de los pacientes con discapacidad intelectual grave.

McRae *et al.* realizaron un trabajo en el que secuenciaron 4293 familias que contenían individuos con TND y analizaron los datos con los de otros 3287 individuos con trastornos similares. Identificaron 94 genes con variantes patogénicas, incluidas 14 que anteriormente carecían de evidencia convincente en la participación del TND. En este trabajo estimaron que 1 de cada 213 a 1 de cada 448 nacimientos presentaba variantes patogénicas causantes de TND. Esta variabilidad viene determinada en parte por la edad de los padres<sup>66</sup>.

#### 1.3.4. Expansión del fenotipo. Genotipo y fenotipado inverso.

A medida que se ha ido realizando estudios de NGS de cada vez más genes y en mayor número pacientes, se ha ido ampliando el espectro fenotípico asociado con cada gen concreto. Un ejemplo ilustrativo es el gen *STXBP1*. Este gen codifica una proteína involucrada en el tráfico celular y la liberación de neurotransmisores<sup>67,68</sup>. Los primeros cuatro individuos publicados procedentes de cuatro familias no relacionadas presentaban una epilepsia grave farmacorresistente de inicio temprano con patrón de EEG de brote-supresión, compatibles con síndrome de Ohtahara<sup>69</sup>. En ese momento se pensó que se había descubierto el “gen del Síndrome de Ohtahara”. Posteriormente, una vez que *STXBP1* era considerado un gen causante de encefalopatía epiléptica estudios adicionales en diferentes cohortes de epilepsia revelaron variantes en *STXBP1* que se asociaban con otros fenotipos de epilepsia grave, incluido el síndrome de Dravet<sup>70</sup>, síndrome de West, síndrome de Lennox-Gastaut<sup>71</sup> y epilepsia con crisis mioclónico-atónicas<sup>72</sup>. Posteriormente, *STXBP1* se convirtió en un “gen de TND” cuando Suri *et al.* reportaron 11 pacientes, de entre las 4293 estudiados con DI, con variantes patológicas *de novo* en *STXBP1*, todos con DI importante, pero tres de ellos sin epilepsia y dos más, solo con crisis en la primera infancia<sup>73,74</sup>.

Otro ejemplo importante sobre la expansión del fenotipo es el gen *SCN1A*. Actualmente se considera uno de los genes más importantes relacionados con epilepsia. Inicialmente se consideró que las variantes en *SCN1A* estaban asociadas a dos fenotipos distintos. Por un lado, la epilepsia genética con convulsiones febriles plus (GEFS+) y por otro, el síndrome de Dravet<sup>75</sup>. GEFS+ es un fenotipo de epilepsia familiar predominantemente heredado en el que los individuos afectados presentan una predisposición a las convulsiones febriles y afebriles, pero no desarrollan epilepsia farmacorresistente y tienen buenos resultados cognitivos<sup>56</sup>. Por el contrario, en el síndrome de Dravet, aunque las convulsiones iniciales a menudo se asocian con fiebre, evoluciona a encefalopatía del desarrollo y epiléptica con epilepsia grave farmacorresistente que surge sobre el segundo y tercer año de vida<sup>75</sup>, y esto se asocia a una importante afectación cognitiva<sup>58,76</sup>.

Sin embargo, actualmente se sabe que el espectro asociado a *SCN1A* es mucho más amplio<sup>77-81</sup>. Incluso se asocia a otros fenotipos neurológicos que no incluyen epilepsia, como migraña hemipléjica familiar (FHM)<sup>80</sup>.

Esta misma ampliación de fenotipos se ha repetido en varios genes que inicialmente se habían asociado a epilepsias graves. Es muy probable que gran parte de la variabilidad fenotípica se explique por efectos funcionales específicos de cada variante genética concreta. Por ejemplo, el fenotipo FHM asociado a variantes patogénicas en *SCN1A*, se ha visto que se da en variantes que muestran propiedades de ganancia de función<sup>81</sup>. También es probable que modificadores genéticos<sup>82</sup> y ambientales adicionales expliquen gran parte del resto de variabilidad fenotípica e incluso que la epigenética juegue un papel determinante en muchos casos<sup>59</sup>.

Dentro de los trastornos cerebrales del desarrollo se pueden diferenciar distintas entidades clínicas por el DSM-5 y la Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10<sup>26</sup>. Sin embargo, estudios previos han proporcionado una fuerte evidencia de que existe una base molecular subyacente común, con vías y causas genéticas compartidas, como son las variaciones en el número de copias (CNV) y variantes de un solo nucleótido, entre los trastornos del neurodesarrollo aparentemente diferentes.

De este modo, existen múltiples publicaciones en las que se describe el espectro fenotípico de pacientes con alteraciones patogénicas en un mismo gen. Por ejemplo,

CNV recurrentes como las deleciones en 1q21.1, 16p11.2, 17q12 y 22q11.2 se han identificado en individuos con discapacidad intelectual, trastorno del espectro autista, esquizofrenia y epilepsia.

### 1.3.5. Relevancia biomédica: la utilidad y el impacto de NGS en neuropediatria

En cuanto a la relevancia biomédica y clínica, ya se ha comentado que tener el diagnóstico etiológico de la enfermedad supone un gran beneficio tanto para el paciente como para la familia. Es muy importante reseñar que el diagnóstico etiológico en este tipo de pacientes puede implicar cambios en el manejo práctico del enfermo y se ha visto en diversos estudios que, en pacientes con diagnóstico etiológico mediante NGS, hasta un 80% se beneficia de recibir terapia optimizada<sup>59</sup>.

Utilidad del diagnóstico genético
Tipificación etiológica
Evitación de pruebas médicas innecesarias
Descarte de hipótesis alternativas
Consejo genético familiar
Anticipación pronóstica
Estudio o prevención de afectación multisistémica
Anticipación terapéutica: avances e investigación
Aumenta el bienestar psicológico de las familias

**Tabla 4: Utilidad del diagnóstico genético en neuropediatria.**

Así, como ejemplo, en la serie de Nambotet *et al.* 9 pacientes del total de 416 se beneficiaron de tratamiento específico para su enfermedad. Un ejemplo fue una niña diagnosticada de síndrome de deficiencia de GLUT 1 (MIM 606777) por una variante en el gen *SLC2A1*. Este síndrome se trata con dieta cetogénica, en el caso de esta paciente detuvo las convulsiones y mejoró claramente su desarrollo psicomotor. En el síndrome

de déficit de GLUT 1 existe un amplio rango de síntomas, que van desde epilepsia refractaria, DI en diferentes grados, microcefalia, trastornos del movimiento que incluyen ataxias, discinesias y todo ello en diferentes grados de gravedad. Por esto, la sospecha diagnóstica no siempre es sencilla y en los casos que se consigue diagnosticar los pacientes pueden verse beneficiados del tratamiento específico<sup>83</sup>.

Al igual que el déficit de GLUT 1, los trastornos sensibles a la vitamina B6 pueden ser diagnosticados a través de investigaciones en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo si son sospechadas. Sin embargo, los niños con deficiencia en GLUT 1 pueden presentarse solo con convulsiones, lo que dificulta la sospecha diagnóstica específica<sup>63</sup>.

Esto también se ha descrito en pacientes con epilepsia, producida por mutaciones en genes que alteran diferentes canales de sodio y potasio, que conocer la etiopatogenia de su epilepsia permite seleccionar los antiepilépticos más adecuados para ellos (ver tablas 5 y 6).

Saber que un paciente está afecto de una determinada variante patogénica en un gen puede prevenirnos de su evolución posterior. Este es el ejemplo del síndrome de Dravet por mutación en *SCN1A*, en el que sabemos que a largo plazo los pacientes presentan problemas de la marcha, o en el complejo esclerosis tuberosa, en el que se desarrollan otros problemas multisistémicos, como tumores.

Las técnicas de NGS han permitido la identificación de pacientes con fenotipos sutiles o atípicos, que incluyen mutaciones de baja penetrancia o hipomorfias. También la identificación de nuevas mutaciones en genes implicados en el neurodesarrollo y descritos como causantes de enfermedad que producen fenotipos diferentes.

Los avances científicos recientes de las enfermedades del neurodesarrollo indican que la diversidad fenotípica de estas patologías genéticas es más amplia de lo que se pensaba y arrojan luz al conocimiento de la estructura y compleja conectividad del cerebro, así como de sus alteraciones.

No obstante, no debemos olvidar que cada persona tiene un genoma único, a excepción de los gemelos idénticos, y que conocer la secuencia génica de un individuo no nos permite conocer su fenotipo. Existe influencia del entorno, desde el momento

de la concepción, e incluso antes, y aún queda mucho por saber de los fenómenos epigenéticos que modifican la expresión de un gen sin modificar su secuencia.

Obtener el diagnóstico etiológico puede servir para poder determinar un pronóstico más certero para el paciente y su familia. En cualquier caso, aún estamos en el inicio del conocimiento de la interpretación del genoma humano y los espectros fenotípicos están ampliándose. Tampoco conocemos bien todos los mecanismos de interacción genética ni la epigenética, lo que hace el tema aún muy complejo.

**Tabla 5. Implicaciones terapéuticas en trastornos metabólicos que se presentan como epilepsia grave de inicio precoz.**

Gen	Tratamientos recomendados	Tratamientos desaconsejados	Otras implicaciones terapéuticas
<i>SLC1A1</i>	Dieta cetogénica	Fenobarbital	
<i>ALDH7A1</i>	Piridoxina		Dieta restringida en lisina
<i>PNPO</i>	Piridoxal fosfato		
<i>GAMT</i>	Suplementos orales de creatina		
<i>SLC6A8</i>	Suplementos orales de creatina		
<i>TPP1 (CLN2)</i>	Reemplazamiento de peptidasa tripetidil I		
<i>FOLR1</i>	Ácido folínico		
<i>SLC35A2</i>	Suplementos de galactosa		
<i>BTD</i> Déficit biotinidasa	Suplementos de biotina oral en forma libre		

**Tabla 6. Implicaciones terapéuticas en epilepsias genéticas.**

Gen	Tratamientos recomendados	Tratamientos desaconsejados	Otras implicaciones terapéuticas
<i>SCN1A</i>	VPA, estiripentol, CLB, Dieta cetogénica, cannabidiol, fenfluramina	Carbamezepina, lamotricina, OXC, LCM	
<i>SCN2A</i> *	Carbamazepina, fenitoina		Fenitoina a dosis altas en estatus epiléptico
<i>SCN8A</i>	Carbamazepina, fenitoina		
<i>KCNQ2</i>			
<i>POLG</i>		VPA	
<i>PCDH19</i>	Clobazam		
<i>PRRT2</i>	Carbamazepina		
<i>KCNT1</i>	Ensayo en crisis precoces: Quinidina Bromidas potásicas Dieta cetogénica		
TSC1/TSC2	Vigabatrina para espasmos infantiles		Evelorimus, bloqueantes vía mTOR.
ATP1A3	Flunaricina, TPM		

\*La mayoría de epilepsias *SCN2A* con crisis de inicio precoz (<3 meses) son por ganancia de función.

### I.3.6. Nuevos genes candidatos y nuevas entidades nosológicas

De los 19.000 genes codificadores de proteínas de la especie humana<sup>84,85</sup>, se sabe que la mayoría están muy conservados en los vertebrados<sup>86-88</sup>. Esto implica que en el caso en el que estos genes no sean redundantes, las variaciones que modifiquen la expresión genética se traducirán en un fenotipo clínico<sup>89</sup>. Sin embargo, actualmente

solo se estima un número de enfermedades raras de entre 6.000-8.000<sup>9,90</sup>. El estudio de fenoma humano, es decir, de la expresión fenotípica humana, se basa en muchos casos en estudios con modelos animales. Frecuentemente se utilizan modelos de ratones humanos modificados mediante ingeniería de pérdida de función genética. Los ratones de laboratorio creados para este fin, conocidos como ratones *knockout*, se les inactiva un determinado gen para poder estudiar el fenotipo asociado. Aproximadamente el 30% de estos ratones *knockout* son embriones inviábiles, y del 70% restante, el 80% están asociados con un fenotipo reconocible<sup>91</sup>. De este modo, si extrapolamos estos datos al ser humano se puede inferir que hay unas 10.640 enfermedades potenciales de causa genética que se correlacionan con un posible fenotipo y por tanto, existen gran cantidad en enfermedades por diagnosticar. Aproximadamente 300 nuevos fenotipos mendelianos se añaden en OMIM cada año, la mayoría de ellos representan nuevas asociaciones gen-enfermedad<sup>89,92</sup>.

Cuando queremos definir una nueva entidad nosológica es muy importante demostrar la causalidad entre la variante encontrada en un determinado gen y el fenotipo del paciente. Las dos grandes plataformas de enfermedades raras, Orphanet y OMIM, incluyen continuamente nuevas enfermedades y tienen unos criterios establecidos para definirlos. De esta forma Orphanet las define como presentaciones clínicas reconocibles y homogéneas que han sido descritas en al menos dos individuos no relacionados. El 25 de febrero de 2022, Orphanet recogía unas 9.347 enfermedades, de las que 7.877 presentan un correlato genotipo-fenotipo. A día de 24 de febrero de 2022, OMIM incluye 6312 fenotipos mendelianos asociados a mutaciones en un gen particular (código OMIM #), 1521 descripciones fenotípicas que probablemente son mendelianas pero con etiología molecular desconocida (código OMIM %) y 1757 entradas con categoría nula.

Los estudios de asociación de genes candidatos han sido históricamente el método más frecuentemente utilizado para determinar la asociación entre variaciones genéticas con fenotipos, dado la relativa simplicidad para adquirir muestras de pacientes y datos de genomas. Los estudios de genómica funcional y análisis de ciencia de datos se fusionan con la biología de sistemas para obtener respuestas en estos pacientes. Hay disponibles una amplia gama de programas de *software* para realizar

los análisis de asociación. Estos estudios se basan en comparar las variantes en una selección de genes encontradas en un conjunto de pacientes con las variantes en ADN genómico de una muestra de referencia. El hecho de seleccionar genes candidatos, aquellos implicados en el neurodesarrollo en nuestro caso, aumenta la fiabilidad de los datos con respecto a los estudios de genoma completo y además, es menos costoso. Como desventaja es que limitamos los resultados a nuestra preselección. Sin embargo, estos estudios son útiles solo para variantes comunes, con poco efecto patogénico, es decir, variantes de predisposición de enfermedad, y son más adecuados para detectar variantes relacionadas con trastornos con herencia no mendeliana<sup>93,94</sup>.

Por otro lado, la implicación a nivel de genes en enfermedades monogénicas se ha basado primero en la identificación de un conjunto estrecho de genes candidatos a través de datos genéticos como análisis de ligamiento o experimental, datos sobre la función bioquímica, y luego identificar variantes raras y probablemente dañinas (con potencial para alterar los niveles normales o la función bioquímica de un gen o producto génico) en uno de los genes candidatos en múltiples pacientes afectados. Este proceso de priorización mediante un fuerte apoyo genético y estadístico sobre la causalidad de cualquier gen nuevo, puede complementarse y extenderse con el apoyo auxiliar de estudios funcionales e informáticos<sup>95</sup>.

El grupo de expertos procedente de la *US National Human Genome Research Institute* realizaron una guía con las recomendaciones para investigación de variantes en el genoma humano<sup>95</sup>. En esta guía, aunque no se da una solución inequívoca para determinar la causalidad de la enfermedad asociada a una variante o gen, sí ayuda a integrar y evaluar la evidencia que respalda el papel de un gen o variante en la patogenia de cada caso determinado.

Por tanto, en el caso de nuevos genes candidatos los investigadores deben demostrar simultáneamente evidencia de que el gen está implicado en las vías fisiopatológicas alteradas en la enfermedad, y por otro, que la variante encontrada es patogénica y altera el producto funcional del gen.

También en el caso de enfermedades monogénicas es necesario comparar sistemáticamente la distribución de variantes raras posiblemente patogénicas con

controles de población o modelos nulos bien validados procedentes de bases de datos de secuenciación a gran escala. Esto permite apoyar la identificación de genes con un exceso de variantes potencialmente patogénicas para el seguimiento clínico y funcional. La estadística va a ser un soporte clave a la hora de implicar variantes y genes, junto con la bioinformática y los estudios experimentales *in vivo* o *in vitro*. La recomendación general establecida en medicina es que para realizar el cálculo formal de la significación estadística para evaluar la solidez de la evidencia de un conjunto de datos, las tasas generales de error tipo I, es decir, descubrimiento falso, estén por debajo del 5%<sup>95</sup>. Un dato relevante a tener en cuenta para estas interpretaciones estadísticas es que incluso las personas sanas tienen muchas variantes raras de alteración de proteínas<sup>96</sup> y alrededor de la mitad portan al menos una variante patogénica codificante de proteínas *de novo*<sup>97</sup>. Por tanto, encontrar una variante patogénica no es suficiente para considerarla causal<sup>98</sup>.

La anotación *in silico* y la genómica comparativa predicen si una variante es dañina en términos de función biológica. La genómica comparativa se basa en medidas de conservación de la secuencia evolutiva, cuanto más conservado esté un determinado locus, su variación apoyará más su efecto nocivo, esto se aplica tanto a regiones codificantes como las no codificantes<sup>99</sup>. En cualquier caso, los resultados derivados de la utilización de diferentes algoritmos de predicción deben de utilizarse con prudencia y no como evidencia de patogenicidad por sí mismos.

Las variantes truncantes o de procesamiento del RNA mensajero localizadas en un gen codificador tienen más probabilidades de ser patógenas, pero siempre conviene hacer estudios funcionales de forma experimental. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado para seleccionar los métodos experimentales, que dependerán de la clase de variante, contexto biológico (por ejemplo, tipo de tejido), acceso a muestras y reactivos, rendimiento deseado, tiempo y costo<sup>95</sup>. De esta forma, los estudios realizados directamente en el tejido o células del paciente suelen tener evidencia más fuerte pero no siempre están disponibles. Por ejemplo, cuando tenemos un gen que codifica fundamentalmente a nivel cerebral, como es el caso de *SPTAN1*, no es ético realizar biopsia cerebral para realizar estudios funcionales. En estos casos se puede intentar replicar los fenotipos en una línea celular heteróloga creada con la variante en

cuestión, aunque hay que tener en cuenta que el sistema nervioso central humano es muy complejo. Actualmente, en esta línea de investigación algunos laboratorios están creando cerebroides para el estudio de enfermedades del sistema nervioso central de origen genético (ver figura 12)<sup>100</sup>.



**Figura 12. Organoide de cerebro humano de Lancaster *et al.* Nature<sup>100</sup>.**

Los modelos con ratones *knockout* son también valiosos, aunque por la complejidad de su SNC no siempre podremos replicar los fenotipos humanos.

Como conclusión de la guía de la *US National Human Genome Research Institute* la evidencia experimental que puede contribuir a respaldar la implicación de genes se divide en tres amplias categorías, que se enumeran en orden de fuerza creciente:

1.- El gen está relacionado con la fisiopatogenia del trastorno. Por ejemplo, mostrando que su producto proteico se co-localiza o interactúa físicamente con los productos de otros genes previamente implicados en la enfermedad o que el gen se expresa en tejidos relevantes para la enfermedad<sup>102, 103</sup>.

2.- Estudios *in vitro*, por ejemplo con metabolómica o transcriptómica, en los que los investigadores pueden demostrar que un producto génico está funcionalmente interrumpido por mutaciones en pacientes con la enfermedad de interés.

3.- Estudios *in vivo* con animales de experimentación pueden demostrar que la interrupción del gen candidato da como resultado un fenotipo equiparable al

presentado en humanos con la enfermedad y es poco probable que ocurra con la alteración de genes seleccionados al azar<sup>104,105</sup>.

Sin embargo, el valor de los estudios experimentales depende críticamente de la idoneidad del sistema modelo para el trastorno humano que se está investigando. En este sentido, los modelos de cultivos *in vitro* pueden ser inapropiados para los trastornos del desarrollo que afecten a órganos complejos. Por razones similares, los modelos animales no son adecuados para el análisis de aspectos de la biología específicos de los humanos. Cuando un gen ya se ha implicado con certeza en la enfermedad y se sabe qué clase de variante es causal (por ejemplo, pérdida o ganancia de función representada por un ensayo específico), entonces un experimento que coloca una variante de significado desconocido en esa clase funcional puede ser particularmente informativa.

Sabemos que no todas las variantes en genes causantes de enfermedades de herencia mendeliana presentan penetrancia completa. Lo que se desconoce es el grado de penetrancia de las diferentes variantes y es un campo que aún está por explorar. El estudio de cohortes de pacientes con fenotipado exhaustivo determinarán las estimaciones precisas de la penetrancia, es decir, el correlato fenotipo-genotipo.

Dado que en neuropediatría gran parte de los pacientes tienen enfermedades raras, es importante que los datos obtenidos en investigación en cada laboratorio sean compartidos con el resto de la comunidad científica y médica. La base de datos DECIPHER<sup>106</sup> y los *International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium* (<https://www.iscaconsortium.org/>), con la ayuda de un número cada vez mayor de consorcios de recursos de enfermedades raras son plataformas para compartir datos disponibles al público investigador.

Por tanto, la revisión e interpretación crítica de variantes genéticas de todo el genoma, mediante reanálisis continuo para refinar la clasificación de variantes potencialmente implicadas, y las descripciones detalladas de fenotipos clínicos de tales pacientes en repositorios centralizados permitiría una acumulación más rápida de evidencia de genes nuevos.

El descubrimiento de la base genética de un fenotipo mendeliano determinado establece un vínculo causal entre el genotipo y el fenotipo. Esto hace posible incluir ese gen en el estudio etiológico de otros pacientes con fenotipo similar. Además, estos descubrimientos también contribuyen a nuestro conocimiento de la función de los genes, la regulación de los genes, el desarrollo y los mecanismos biológicos que pueden usarse para desarrollar nuevas terapias.

## **II. RAZON FUNDAMENTAL DE LA TESIS**

## II. RAZON FUNDAMENTAL DE LA TESIS.

Con el advenimiento de las nuevas tecnologías de NGS se está haciendo evidente que no hay una correlación simple y clara entre las alteraciones genéticas encontradas y el fenotipo clínico. Una buena definición fenotípica desde el punto de vista neuropediátrico ampliará el conocimiento de las diferentes entidades que producen disfunción en el sistema nervioso en pediatría. Además, dicho conocimiento permitirá llegar a comprender la relación entre el genotipo y las diversas manifestaciones a nivel neurológico que pueden dar lugar las alteraciones génicas.

Nuestro estudio pretende dar luz al conocimiento de las bases patofisiológicas de las diferentes patologías del neurodesarrollo de origen genético y obtener dicha información con la evaluación sistemática de los pacientes diagnosticados etiológicamente mediante el estudio de NGS.

Pensamos que dicho estudio permitirá la descripción de nuevos fenotipos producidos por genes conocidos, ya que las vías implicadas en el neurodesarrollo son comunes para muchos de estos trastornos. Compartir dicha información con el resto de la comunidad científica y médica permite la mejora diagnóstica y asistencial de nuestros pacientes y del resto de pacientes con patologías similares.

Por otro lado, la evaluación sistemática de los pacientes en los que se han detectado variantes patogénicas en nuevos genes candidatos puede ayudar a describir nuevas entidades nosológicas. Esto requiere un trabajo adicional en el que seamos capaces de demostrar que el fenotipo encontrado en nuestro paciente es debido a dichas alteraciones genéticas. Para esto se dispone en primer lugar del conocimiento actualizado de investigación básica publicada previamente en la literatura científica y, por otro lado, demostrar que efectivamente en el paciente en cuestión existe una disfunción del gen afectado, mediante estudios funcionales (medición de RNA mensajero, proteómica, etc) o bien demostrando que los tejidos afectados presentan la alteración específica descrita.

La genómica nos abre la posibilidad de poder implementar una “medicina de precisión”. Por lo que conocer el perfil genético de cada paciente puede suponer la

adaptación de las prácticas y manejo de los pacientes. Conocer bien la fisiopatogenia de la enfermedad puede llevarnos a desarrollar fármacos de forma racional, dirigidos a rutas funcionales que se ha demostrado que están implicadas en el mecanismo primario de la enfermedad. Además, una mayor comprensión de la genética, sus factores de susceptibilidad y/o la respuesta a diversas medidas terapéutica podrían tener un impacto enorme en neuropediatría.

**III. HIPOTESIS**

**IV. OBJETIVOS**

### **III.HIPOTESIS**

La evaluación extensa del fenotipo clínico de los pacientes en los que se ha detectado una alteración patogénica en el estudio de secuenciación de nueva generación puede ayudar a ampliar el fenotipo descrito previamente asociado a un determinado gen, así como a detallar nuevos fenotipos no descritos previamente. Además, el estudio del fenotipo de los pacientes con alteraciones en NGS en nuevos genes candidatos puede ayudar a ampliar la descripción de nuevas entidades nosológicas en neuropediatría causadas por alteraciones genéticas de herencia mendeliana, así como aumentar el rendimiento diagnóstico de los estudios genéticos.

Todo esto contribuirá de forma decisiva en el diagnóstico, pronóstico y el tratamiento específico de pacientes con trastornos del neurodesarrollo, incluyendo la epilepsia en la infancia.

#### IV. OBJETIVOS

Dentro de este contexto médico actual, el objetivo del proyecto de investigación es el análisis fenotípico y genotípico de los pacientes con trastornos del neurodesarrollo en los que se han detectado alteraciones patogénicas en el estudio de secuenciación masiva. Para ello, en una población de pacientes pediátricos con patología neurológica secundaria a alteraciones patogénicas en el estudio de NGS se ha realizado:

- 1) Caracterización fenotípica de los pacientes con mutaciones patológicas en el estudio de la secuenciación del exoma clínico. Determinar el **correlato fenotipo-genotipo**.
- 2) Descripción de **fenotipos atípicos** asociados a variantes patogénicas en genes conocidos. Factores modificadores de enfermedad. Variantes hipomorfias. Correlato fenotipo-genotipo.
- 3) **Descripción fenotípica de nuevos genes candidatos** en los que no se ha descrito el fenotipo asociado. Descripción de nuevas entidades nosológicas.

## **V. POBLACION Y METODOS**

## V. POBLACION Y METODOS

### V.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, analítico, transversal y unicéntrico donde se han incluido pacientes controlados en la Sección de Neuropediatría del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, España), en los que en el estudio de exoma clínico mediante secuenciación de nueva generación (NGS) se hayan detectado variantes patogénicas, de acuerdo con los criterios publicados por el *American College of Medical Genetics and Genomics*<sup>17</sup>, en el periodo comprendido entre enero de 2017 y diciembre 2020.

Los pacientes han sido seleccionados desde la base de datos de la Unidad de Genética estableciendo como requisito que cumplan los criterios de inclusión y que no estén presentes los criterios de exclusión. Por otro lado, se han seleccionado aquellos pacientes que presentan variantes en genes de interés por ser más frecuentes, por pertenecer a grupos de genes y aquellos con especial interés científico hasta obtener una muestra de 100 pacientes valorados.

Extracción de datos y síntesis:

Se pretende utilizar un enfoque de integración de datos. Reclasificar a cada paciente en diferentes categorías:

- 1) Categoría Fenotípica: discapacidad intelectual, trastorno del espectro autista, epilepsia, trastorno del movimiento, y la combinación de ellos.
- 2) Categoría genética: genes afectados, tipos de mutaciones, región del genoma.

Subclasificación de los pacientes según gen afectado o grupo de genes afectados:

-Grinpatías: *GRIN1*, *GRIN2B*, *GRIN2A*

-Sintaxinas: *STXBP1*, *STX17*, *STXBP6*

-Canales de sodio: *SCN1A*, *SCN9A*, *SCN2A*, *SCN8A*, *SCN5A*

-Canales de potasio: *KCNQ2, KCNT1, KCNB1, KCNA1, KCNQ1, KCNQ10T1, KCNMA1*

-Canales de calcio: *CACNA1A, CACNA1C, CACNA1D, CACNA2D, CACNA1G, CACNA1H*

-Otros: *GABRAB3, NAA10, IMMT, SUCLG2, SRGAP3, ZNF292, SNORD118, FARS2, TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, LIS1, DCX, DYN1H1, etc.*

Principales resultados y medidas: ampliación de fenotipo descrito para las mutaciones encontradas, así como obtención de forma global información descriptiva de nuestra serie de pacientes de neuropediatria.

#### V.1.1. TAMAÑO MUESTRAL.

100 pacientes.

Se estimó teniendo en cuenta los pacientes con TND diagnosticados de alteraciones genéticas mediante NGS, una muestra grande que permita determinar gran cantidad de pacientes y analizar de forma global los hallazgos encontrados.

### V.2.CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

#### V.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

-Pacientes con edades comprendidas entre 0 y 18 años incluidos.

-Seguimiento actual o previo en Neuropediatria del Hospital La Fe.

-Diagnóstico de enfermedad del neurodesarrollo: Trastorno del Espectro Autista (TEA), epilepsia, Encefalopatía Epiléptica y del Desarrollo (EED), Discapacidad Intelectual (DI), cuadro polimalformativo, Trastornos del Movimiento (ataxia, temblores, distonías, tics, etc), Trastornos de Conducta graves, etc.

-Estudio de NGS concluyente. Es necesario que se haya detectado variantes patogénicas, una o más, consideradas patológicas en el momento del estudio.

-En casos seleccionados se podrán incluir pacientes en seguimiento en neuropediatría de otros hospitales en los que el estudio de NGS se ha realizado en el Hospital La Fe y el resultado ha sido concluyente.

-Los padres y/o tutores legales de los pacientes deben de firmar el consentimiento informado tras explicarles verbalmente y por escrito en que consiste.

#### V.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

-Fallecimiento del paciente.

-Pacientes no controlados actual ni previamente en neuropediatría del Hospital La Fe.

-Pacientes mayores de 18 años en el momento actual.

-Pacientes en los que se ha detectado alteraciones patogénicas en el estudio genético de cariotipo o CGH-Array.

-Pacientes en los que en el estudio de secuenciación del exoma no se hayan detectado variantes patogénicas, y las variantes encontradas se consideren de significado incierto o probablemente benignas. Hallazgos no concluyentes en el estudio NGS.

-Rechazo de los padres y/o pacientes a participar.

### V.3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE PACIENTES

#### V.3.1. Fenotipado de los pacientes:

Utilizando hoja de recogida de datos (Anexo 2).

- **Análisis exhaustivo de la historia clínica.** Los datos clínicos detallados se recolectaron retrospectivamente de las historias clínicas de todos los participantes. Descripción pormenorizada del inicio de los síntomas que fueron motivo de consulta y de todo aquello que consideremos relevante a nivel neurológico: antecedentes preconceptionales (FIV, ICSI, IA, donación de ovocitos, natural); antecedentes prenatales (datos sobre patología durante el

embarazo); antecedentes perinatales (parto, ingresos, pruebas realizadas, alimentación recibida durante los primeros meses de vida); estado de salud general durante la primera infancia y desarrollo psicomotor precoz.

El funcionamiento cognitivo en el momento de la inclusión se clasificó en una escala de cinco puntos basada en los datos disponibles sobre el cociente intelectual (CI) y el nivel de desarrollo: normal cuando no hay discapacidad intelectual (DI) (CI o cociente de desarrollo (DQ) >80), DI leve (CI o DQ 50-80), DI moderado (CI o DQ 30-49), DI grave o profundo (CI o DQ <30). Cuando no se disponía de CI o DQ recientes, la evaluación se realizaba en función del funcionamiento escolar, la comunicación, la conducta adaptativa y/o la capacidad de autonomía de acuerdo a los criterios diagnósticos del DSM-5. También se evaluó la presencia de Trastorno del Espectro Autista (TEA) siguiendo el DSM 5, y diferenciando el nivel de TEA en grados 1 a 3<sup>26</sup>.

Se preguntó y examinó clínicamente sobre la presencia de trastornos motores, incluyendo ataxia, temblor, tics, estereotipias o presencia de otros trastornos del movimiento.

Si el paciente presentaba epilepsia, se clasificaba siguiendo los criterios establecidos por la ILAE<sup>107</sup>. Se recogieron los tipos de crisis que presentó el paciente a lo largo de su vida y los medicamentos que ha tomado, así como la medicación actual. Los tipos de convulsiones incluyeron ausencias atípicas, ausencias típicas, convulsiones focales, mioclonías, convulsiones hemiclónicas, convulsiones tónico-clónicas generalizadas, crisis atónicas, crisis reflejas y estado epiléptico.

- Ampliación de la historia clínica mediante **anamnesis a las familias**. Se realizó una entrevista semiestructurada a todos los padres y/o tutores. Se preguntó a los padres de los pacientes sobre todos los antecedentes médicos; también el tipo de educación que los participantes seguían o habían seguido, y si tenían algún problema de aprendizaje o problemas psicológicos. También se les preguntó si sus hijos mostraban algún problema de comportamiento o trastornos del sueño.

- **Exploración del paciente**, incluyendo exploración neurológica completa. Se utilizaron los términos de ontología de fenotipos humanos (HPO) para la descripción fenotípica de los pacientes, presencia de trastorno del movimiento en la exploración (espasticidad, distonía, estereotipias, tics, temblores u otros), y presencia de trastorno del neurodesarrollo asociado. También se les realizó un examen físico extenso con toma de datos sistematizados, somatometría y toma de una fotografía del rostro cuando los familiares dieron su consentimiento
- **Análisis de las pruebas complementarias** realizadas al paciente durante su seguimiento, realizando un análisis meticuloso de las pruebas de imagen como RMN cerebral y TAC craneal, los registros electroencefalográficos, el estudio de potenciales evocados si los hubiese, exploraciones por parte de otorrinolaringología, oftalmología, la realización de estudios metabólicos y los estudios genéticos previos al NGS. Además, también se incluyó las evaluaciones psicológicas y psicopedagógicas o por parte de los servicios de logopeda si estas estuviesen realizadas. Todos los pacientes tenían al menos una resonancia magnética cerebral, y esto fue revisado sistemáticamente por un neurorradiólogo pediátrico experimentado.

### V.3.2. Genotipado de los pacientes:

Los estudios genéticos estaban ya realizados previamente a este estudio por el servicio de Genética del Hospital La Fe. El procedimiento que se utilizó fue el siguiente: se recolectaron muestras de sangre periférica de individuos y sus padres mediante métodos estándar. El ADN genómico se aisló utilizando el extractor QIASymphony o *Qiacube* (QIAGEN, Hilden, Alemania). La pureza y la concentración del ADN se midieron con el espectrofotómetro *NanoDrop 8000* (*Thermo Scientific*) y un fluorómetro *Qubit 2.0* (*Invitrogen*), respectivamente.

La secuenciación del exoma se realizó utilizando uno de los siguientes: *SureSelect Clinical Research Exome* (*Agilent Technologies*), el exoma clínico comercial *SureSelect Focused Exome* o su actualización CCP17 (*Agilent Technologies*). Las bibliotecas se

secuenciaron en un *Illumina NextSeq 500* siguiendo el protocolo del fabricante para obtener una profundidad media de lectura superior a 100X, y una cobertura de las secuencias diana superior al 97% a 20X.

Las alineaciones de lectura de secuencias, así como la detección y anotación de variantes se realizaron en la plataforma *Alyssa Interpret (Agilent Technologies)*. Se analizaron todos los genes causantes de enfermedades relacionados con la epilepsia y/o TND descritos en diferentes bases de datos, así como genes candidatos implicados en la función y/o formación del SNC. Para evaluar el impacto clínico y evaluar la patogenicidad de las variantes en la secuenciación del exoma aplicamos los criterios descritos anteriormente por el Grupo de Investigación en Genética Traslacional La Fe<sup>108</sup>. Todas las variantes genéticas clínicamente relevantes detectadas fueron confirmadas por secuenciación de *Sanger* a partir de productos PCR purificados. Todos los cebadores para amplificación y secuenciación se diseñaron con la aplicación *ExonPrimer* (<https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>).

#### V.3.3. Estudio de la literatura científica:

-Estudio teórico de cada mutación/alteración genética detectada utilizando las herramientas de búsqueda que aplicamos en la práctica médica diaria como son OMIM, ORPHANET y Pubmed y los tratados de consulta específicos de nuestra especialidad.

Fuentes de datos: en la base de datos de PubMed se buscaron los estudios publicados hasta la fecha para definir cada entidad nosológica encontrada.

#### V.3.4. Clasificación de los pacientes:

-Pacientes con fenotipo típico: descrito previamente en OMIM y Orphanet.

-Pacientes con fenotipo atípico.

-Pacientes con nuevo fenotipo asociado a variante en gen no descrito previamente como causante de enfermedad. Nuevo gen candidato/nueva entidad nosológica.

### V.3.5. Preparación de las publicaciones científicas.

Redacción del texto, elaboración de tablas, figuras, imágenes, etc.

Selección de revistas.

Envío, corrección de revisiones.

### V.4. DIAGRAMAS DE FLUJO DE LOS PACIENTES RECLUTADOS EN LOS DIFERENTES OBJETIVOS

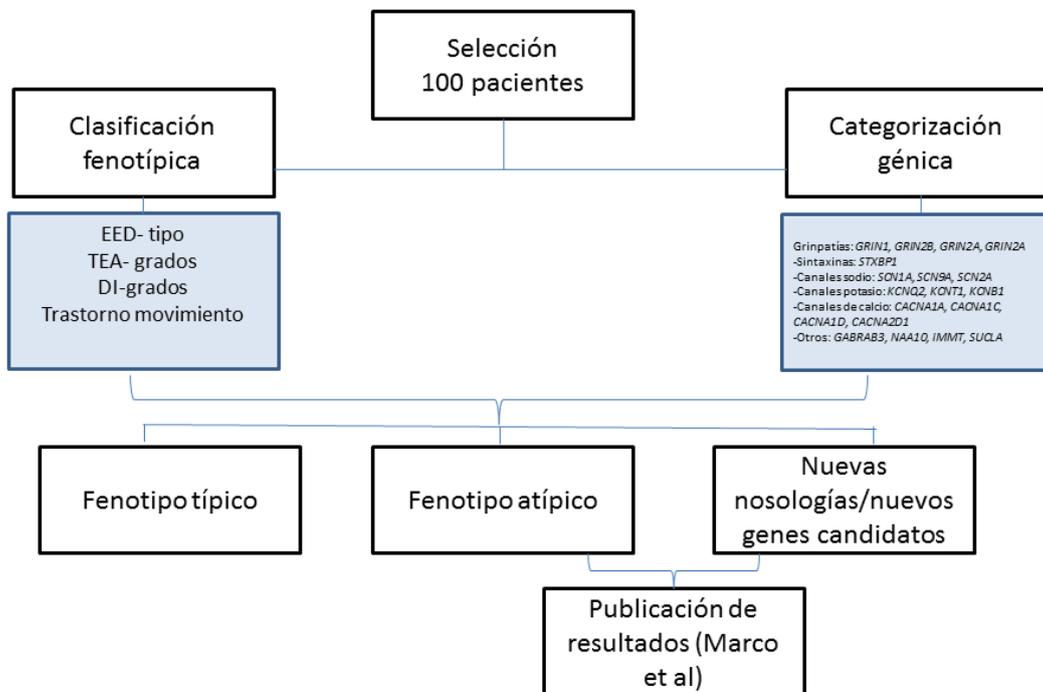


Figura 13. Diagrama de flujo de los pacientes reclutados en el proyecto de la tesis.

### V.5. ASPECTOS ÉTICOS.

El estudio fue aprobado por el Comité Científico para la Investigación Biomedica (CEIM) (#2019/0249) del Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Todos los padres que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado. En el anexo 1 se adjunta la carta de aceptación del proyecto por el Comité Ético.

## **VI. CAPÍTULOS / RESULTADOS**

## VI. CAPÍTULOS / RESULTADOS

### CAPÍTULOS

#### a. CAPÍTULO I. NUESTRA SERIE. ANEXO 5

#### b. CAPÍTULO II. Fenotipos típicos

**Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Caro A, Monfort S, Martínez, F. Novel homozygous likely pathogenic SCN1A variant with autosomal recessive inheritance and review of the literature. *Frontiers in Neurology*. 2021. DOI: doi: 10.3389/fneur.2021.784892<sup>109</sup>. eCollection 2021. Factor de Impacto: 4.003.

#### c. CAPÍTULO III. Fenotipos atípicos

**Marco-Hernández AV**, Caro A, Montoya-Filardi A, Tomás Vila M, Monfort S, Beseler Soto B, Nieto-Barceló J, Martínez, F. Extending the clinical phenotype of *SPTAN1*: from DEE5 to migraine, epilepsy and subependymal heterotopias without intellectual disability. *American Journal of Medical Genetics*. 2021. doi:10.1002/ajmg.a.62507<sup>110</sup>. Factor de Impacto 2020: 2.125.

**Marco-Hernández AV**, Caro A, Rubio-Sánchez P, Martínez-Martínez JC, Tomás Vila M, Monfort S, Martínez, F. Extending the phenotype related to *SCN1A* gene: Arthrogryposis, movements disorder and malformations of cortical development. *Journal of Child Neurology*. 2022. doi: 10.1177/08830738211072694<sup>111</sup>. Factor de Impacto 2020: 2.362

#### d. CAPÍTULO IV. Nuevos genes candidatos

**Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Barranco-González, H, Vilchez Padilla JJ, Azorín I, Smeyers Dura P, Monfort S, Pitarch-Catellano I, Martínez, F. Mitochondrial Developmental

encephalopathy with bilateral optic neuropathy related to homozygous likely pathogenic variants in the *IMMT* gene in an extended family with high consanguinity. *Clinical Genetics*. doi: 0.1111/cge.140932021<sup>112</sup>. Factor de Impacto 2020: 4.438

**Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Blázquez A, Cano-Sánchez A, Martín MA, Monfort S, Martínez, F. Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic variants in the *SUCLG2* gene. 2022. *BMC Medical Genomics* **En revisión**.

**Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Matamoros JM, Beseler Soto B, Monfort S, Martínez, F. Short report: *SRGAP3* as a possible genetic modifier of the phenotype associated to de novo mutation in *ZNF292*: autistic regression and severe conduct disorder. *Frontiers in Genetics*. **En revisión**.

Otras publicaciones relacionadas (anexos 6, 7 y 8):

- Kegele J, Krüger J, Koko M, Lange L, **Marco-Hernández AV**, Martínez F, Münchau A, Lerche H, Lauxmann S. Genetics of Paroxysmal Dyskinesia: Novel Variants Corroborate the Role of *KCNA1* in Paroxysmal Dyskinesia and Highlight the Diverse Phenotypic Spectrum of *KCNA1*- and *SLC2A1*-Related Disorders. *Frontiers in Neurology*.2021. doi: 10.3389/fneur.2021.701351<sup>113</sup>. Factor de Impacto: 4.003.
- Martínez-Matilla M, Ferré-Fernández JJ, Aparisi MJ, **Marco-Hernández AV**, et al. Apparent Radiological Improvement in an Infant With Labrune Syndrome Treated With Bevacizumab. *Pediatric Neurology*. 2020. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.07.011<sup>114</sup>.Factor de Impacto: 2.89
- Nieto-Barceló JJ, González Montes, Gonzalo Alonso I, Martinez F, Aparisi MJ, Martínez-Matilla M, **Marco-Hernández AV**, Tomás Vila M. Variant in *CACNA1G* as a Possible Genetic Modifier of Neonatal Epilepsy in an Infant with a *De Novo* *SCN2A* Mutation. *Journal of Pediatric Genetics*. DOI <https://doi.org/10.1055/s-0041-1723958><sup>114</sup>. Factor de Impacto 2018: 3.0.

## a. **CAPÍTULO I. NUESTRA SERIE. ANEXO 5**

En esta tesis hemos evaluado un total de 100 pacientes siguiendo la metodología que se explica en el apartado IV. En el anexo 5 recogemos cada uno de los pacientes evaluados, a cada uno se le ha asignado un número. Han sido ordenados por genes o tipos de genes. En el anexo consta la variante de cada paciente en el gen, así como el transcrito utilizado y el cambio en la proteína y el diagnóstico asignado a cada uno de ellos.

Del total de los 100 pacientes, el 37% han presentado datos relevantes y han sido publicados en revistas o presentados a congresos siendo además demostrativos de las hipótesis planteadas en esta tesis.

Diez pacientes han sido utilizados para realizar la comunicación titulada “Correlación fenotipo-genotipo en pacientes con alteraciones patogénicas en el gen *STXBP1*” presentada en el congreso nacional de la SENEP 2021, pacientes 80 al 89 del anexo 5.

El paciente 1 ha sido presentado a un concurso nacional, bajo el título “Dieta cetogénica en una paciente con encefalopatía epiléptica y del desarrollo por mutación en *SYNGAP1*. Caso clínico y revisión de la bibliografía” pendiente la resolución y posteriormente se publicará como *case report*.

Los datos de veintisiete pacientes han sido utilizados para elaborar publicaciones. Dos de estas publicaciones están pendientes de ser aceptadas (pacientes 90 y 99, capítulo IV de la tesis), el paciente 100 ha sido publicado en una colaboración internacional (anexo 7), el paciente 71 ha sido publicado en una colaboración dentro del equipo de investigación del grupo (anexo 8). Los veintitrés pacientes restantes han sido publicados en los títulos que conforman esta tesis (capítulo II, III y IV).

En cuanto a la distribución por genes, 10 pacientes pertenecen al grupo de los genes que codifican para canales de calcio (pacientes 2 al 11), cuatro pacientes pertenecen a las Gabrapatías (pacientes 13 al 16), diez pacientes pertenecen a las grinpatías (pacientes 17 a 26), once pacientes están dentro del grupo de los genes que codifican para canales de potasio (pacientes 30-39 y paciente 100), veintidós están englobados dentro de los canales de sodio (pacientes 54 a 75) y diez pacientes codifican para

sintaxinas (pacientes 80 a 89). El resto fueron seleccionados por presentar mayor interés clínico o genético.

## b. CAPITULO II. FENOTIPOS TÍPICOS

Nuestra primera publicación versó sobre el análisis de la correlación fenotipo con el genotipo de todos los pacientes publicados hasta la actualidad, con variantes con herencia autosómico recesiva, tanto en homocigosis como en heterocigosis compuesta, asociadas al gen *SCN1A*. En esta revisión incluimos una familia de nuestra serie con dos individuos afectados. Como conclusión detectamos que si bien, la herencia autosómica recesiva no es habitual en los pacientes con variantes en *SCN1A*, el fenotipo que presentan es del espectro fenotípico típico asociado a *SCN1A*. Por otro lado, también se confirmó que existe una correlación del genotipo con el fenotipo.

**Marco-Hernández AV, Tomás Vila M, Caro A, Monfort S, Martínez, F. Novel homozygous likely pathogenic *SCN1A* variant with autosomal recessive inheritance and review of the literature. *Frontiers in Neurology*. 2021. Nov 30;12:784892. doi: 10.3389/fneur.2021.784892. eCollection 2021**

Las variaciones patogénicas dominantes en el gen *SCN1A* están asociadas con varios trastornos del neurodesarrollo con o sin epilepsia, incluido el síndrome de Dravet (DS). Por el contrario, hay pocos casos publicados con herencia en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *SCN1A*. Aquí, describimos a dos hermanos de una familia consanguínea con epilepsia genética con convulsiones febriles plus (GEFS+) asociado con la variante probablemente patogénica en homocigosis (NM\_001165963.1):c.4513A>C(p.Lys1505Gln). Los datos clínicos y genéticos se compararon con los de otros 10 pacientes previamente publicados con epilepsia y variantes en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *SCN1A*. La mayoría de los pacientes (11/12) tenía variantes de cambio de aminoácido . Los pacientes que tenían variantes que codificaban en la proteína en un dominio localizado en el citoplasma o extracelular frecuentemente presentaban un fenotipo menos grave que los de quienes se encuentran en los dominios formadores de poros. Cinco de los

pacientes (41,7%) cumplen criterios clínicos de síndrome de Dravet (SD), uno de ellos asociado a encefalopatía aguda.

Otros cinco pacientes (41,7%) tenían un fenotipo de epilepsia con convulsiones febriles plus, mientras que los dos restantes (17%) presentaron crisis epilépticas focales. Las epilepsias relacionadas con *SCN1A* presentan en la mayoría de los casos una herencia autosómica dominante; sin embargo, hay creciente evidencia de que algunas variantes genéticas sólo manifiestan síntomas clínicos cuando están presentes en ambos alelos, siguiendo una herencia autosómica recesiva.



# Case Report: Novel Homozygous Likely Pathogenic SCN1A Variant With Autosomal Recessive Inheritance and Review of the Literature

Ana Victoria Marco Hernández<sup>1,2\*</sup>, Miguel Tomás Vila<sup>1</sup>, Alfonso Caro Llopis<sup>2,3</sup>, Sandra Monfort<sup>3</sup> and Francisco Martínez<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Neuropediatrics Section, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain, <sup>2</sup>Genetics Unit, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain, <sup>3</sup>Genomics Unit, La Fe Health Research Institute, Valencia, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Fernando Cendes,  
State University of Campinas, Brazil

### Reviewed by:

Gaetan Lesca,  
Université Claude Bernard Lyon  
1, France  
Xiaorong Liu,  
Guangzhou Medical University, China

### \*Correspondence:

Ana Victoria Marco Hernández  
marco\_anaher@gva.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Epilepsy,  
a section of the journal  
Frontiers in Neurology

**Received:** 28 September 2021

**Accepted:** 20 October 2021

**Published:** 30 November 2021

### Citation:

Marco Hernández AV, Tomás Vila M,  
Caro Llopis A, Monfort S and  
Martínez F (2021) Case Report: Novel  
Homozygous Likely Pathogenic  
SCN1A Variant With Autosomal  
Recessive Inheritance and Review of  
the Literature.  
Front. Neurol. 12:784892.  
doi: 10.3389/fneur.2021.784892

Dominant pathogenic variations in the *SCN1A* gene are associated with several neuro developmental disorders with or without epilepsy, including Dravet syndrome (DS). Conversely, there are few published cases with homozygous or compound heterozygous variations in the *SCN1A* gene. Here, we describe two siblings from a consanguineous pedigree with epilepsy phenotype compatible with genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) associated with the homozygous likely pathogenic variant (NM\_001165963.1): c.4513A > C (p.Lys1505Gln). Clinical and genetic data were compared to those of other 10 previously published patients with epilepsy and variants in compound heterozygosity or homozygosity in the *SCN1A* gene. Most patients (11/12) had missense variants. Patients in whom the variants were located at the cytoplasmic or the extracellular domains frequently presented a less severe phenotype than those in whom they are located at the pore-forming domains. Five of the patients (41.7%) meet clinical criteria for Dravet syndrome (DS), one of them associated acute encephalopathy. Other five patients (41.7%) had a phenotype of epilepsy with febrile seizures plus familial origin, while the two remaining (17%) presented focal epileptic seizures. *SCN1A*-related epilepsies present in most cases an autosomal dominant inheritance; however, there is growing evidence that some genetic variants only manifest clinical symptoms when they are present in both alleles, following an autosomal recessive inheritance.

**Keywords:** *SCN1A*, Dravet syndrome, GEFS+, homozygous, autosomal recessive inheritance

## INTRODUCTION

*SCN1A* gene encodes the alpha 1 subunit of the sodium channel, Nav1.1, an important protein that makes up the voltage-dependent sodium channels. Pathogenic variants cause a reduction in sodium currents in gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic inhibitory interneurons, leading to hyperexcitability of neuronal network and the appearance of seizures (1–3). *SCN1A* is associated with several epilepsy syndromes and a range of other diseases (4, 5). The most common is Dravet syndrome (DS), but it is also associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+), familial hemiplegic migraine (FHM), autism spectrum disorder (ASD), Sudden

Unexpected Death Epilepsy (SUDEP), and epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS) and very rarely involved in infantile spasms (4, 6–9). Genetic epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+) is a familial epilepsy syndrome in which affected individuals within a family typically have a variety of epilepsy phenotypes, varying from simple febrile seizures and febrile seizures plus with a good outcome to severe epileptic encephalopathies (10).

About 1,871 *SCN1A* pathogenic variants have been identified so far (11), almost all of them under an autosomal-dominant fashion.

An attempt has been made to explain the phenotypic variability associated with *SCN1A* based on the type of mutation or functional alteration; in general, missense mutations are negatively correlated with a severe phenotype, and mutations with severe phenotypes are more frequently located in the pore region (12). Pathogenic variants that lead to a complete loss of function of the channel are virtually always associated with severe phenotypes, whereas milder impairments in channel function usually cause milder phenotypes (5, 12). Mutations that produce gain of function have also been described, as missense p.Thr226Met variant, which associates a severe clinical phenotype of early-onset epileptic encephalopathy, with profound developmental delay and hyperkinetic movement disorder (13, 14). However, in clinical practice, it remains difficult to fully predict the effects of novel variants on channel function. Recently, Jaber et al. have published original research reporting three patients with arthrogryposis multiplex congenita (AMC) in relation to other heterozygous missense variants of *SCN1A* (15).

To date, only 10 patients with *SCN1A*-related epilepsy due to autosomal recessive inheritance have been identified. In 2015, Brunklaus et al. published for the first time two novel homozygous missense mutations of the *SCN1A* gene in four children with infantile epilepsies from two consanguineous pedigrees. In both families, the heterozygous-carrier parents remained unaffected while their homozygous children developed *SCN1A*-related epilepsies, including DS and GEFS + (14). Since then, six more patients have been published (16–20). Here, we report two siblings, sons of a family with high consanguinity, with GEFS+ associated with the homozygous c.4513A > C variant in the *SCN1A* gene.

## MATERIALS AND METHODS

### Participants

The study was carried out in patients affected by homozygous *SCN1A* pathogenic or likely pathogenic variants, according to the American College of Medical Genetics and Genomics criteria (21), from Hospital La Fe. One family was recruited for inclusion. Informed consent was obtained from the parents of both participants. A systematic search was carried out in the scientific literature for other patients diagnosed with *SCN1A*-related epilepsy with recessive inheritance. The search terms in Pubmed were “*SCN1A*,” “homozygous,” and “recessive inheritance.”

A brief clinical description of this cohort can be seen in **Table 1**.

This study was approved by the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain).

### Genetic Studies

Peripheral blood samples from individuals and their parents were collected by standard methods for the genetic studies. Genomic DNA was isolated using the Qiacube extractor (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA purity and concentration were measured using the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen), respectively.

Massive parallel sequencing for exome sequencing was performed by using the SureSelect Clinical Research Exome (Agilent Technologies). The libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 following the manufacturer's protocol to get a mean reading depth of 100 X. Sequence read alignments, variant calling, and annotation were performed in the *Alissa Interpret* platform (Agilent Technologies). All disease-causing genes related with epilepsy and/or neurodevelopmental disorders described in different databases were analyzed. To evaluate the clinical impact and to assess the pathogenicity of variants in exome sequencing, we applied the previously described criteria (22). All clinically relevant genetic variants detected were confirmed by Sanger sequencing from purified PCR products. Primers for amplification and Sanger sequencing were designed with exon-primer (primers and PCR conditions are available on request).

## CASE STUDIES

### Patient 1

Patient 1 is a 4-year-old female born to healthy consanguineous parents (see **Figure 1**). During pregnancy, no antenatal problems were detected, neither any problem during delivery. The patient lived in her country of origin (Romania) for up to 12 months. The family reported that, at 4 months of age, she presented the first febrile status epilepticus (SE) (20 min). At 7 months, she presented a 10-min febrile seizure (FS), for which phenobarbital was prescribed. She presented two more FS up to 11 months. At 11 months, she presented first generalized tonic-clonic seizure (GTCS) lasting 5 min without fever. So, treatment with valproic acid was established. At 12 months, she was assessed for the first time in our center. She presented age-appropriate psychomotor development. Brain MRI and electroencephalogram study were normal. In the metabolic study, lactic acid, ammonium, and organic acids were normal. In the acylcarnitine profile, a slight decrease in free carnitine 11.95  $\mu\text{mol/L}$  (12.92–36.88) was detected, probably secondary to treatment with valproate, so it was decided to suspend phenobarbital and valproic acid to start treatment with levetiracetam. Since then, she has presented four more FS in the context of infectious illness, and her psychomotor development and neurological examination are normal. The clinical phenotype of the patient is GEFS+.

**TABLE 1 |** Clinical information on 12 patients with pathogenic or likely pathogenic SCN1A variants with autosomal recessive inheritance NM\_001165963.1 (see Figure 2).

	Patient 1 4 y female	Patient 2 35 mo male	Patient 3 9 y male	Patient 4 7 y female	Patient 5 30 y male	Patient 6 19 y female
Variant	chr2:166852591T>G c.4513A>C (p.Lys1505Gln)	None	chr2:166915161C>T c.302G>A (p.Arg101Gln) chr2:166850781A>G c.4727T>C (p.Ile1576Thr)	chr2:166856252G>A c.4319C>T (p.Ala1440Val)	c.2768T>G, p.(Ile923Ser) Homozygous	c.824A>G, p.(Asp275Ser) Homozygous
Medical history	None	None	None	None	None	None
Family background	None	Consanguineous (Figure 1) Mother's sister and first-cousin with S Second paternal uncle with S	None	Consanguineous Sister died at 2 months from SE Asymptomatic father, mosaic	None	Consanguineous (first cousins) Brother is patient 11
Age at seizure onset	4 mo	7 mo	3 mo	11 mo	19 mo	3 mo
Seizure type at onset	FS (20 min)	FS (3 min)	GTCS and PS	GTCS and PS	FS, HCS afebrile and febrile	FS
Seizure types	FS, FSE, GTCS	FS, FSE (30 min)	MS, AS	FS, MS, AS	FS, HCS afebrile and febrile	FS, PS, AS, GTCS
Seizure triggers	Fever	Fever			Fever	Fever, LMT, CBZ
Medication trials	FB, VPA	LEV			LEV, ZNS (others)	LMT, CBZ, LEV, TPM, CLB, VPA
Actual medication	None	Sensorineural deafness	Weight and height measurements $p < 3$			ADHD
Additional clinical features	None	No Hypotonia	Yes	Yes	No, learning difficulties, slow reasoning "Clumsy"	Borderline,
Intellectual disability	No	No	Yes	Yes	No, learning difficulties, slow reasoning "Clumsy"	Borderline,
Type of movement disorder/Neurologic examination	None/Normal	None/Normal	Mild asymmetric widening of the posterior horn of the left ventricle, slight non-specific white matter change in T2 weighted images	Normal	Normal	Normal
Language disturbance	No	No				
Brain MRI	Normal	Normal	Mild asymmetric widening of the posterior horn of the left ventricle, slight non-specific white matter change in T2 weighted images	Normal	Normal	Normal
EEG	Normal	Normal		Generalized epileptiform activity with no distinctive photosensitivity	Normal, minor fronto-temporal abnormalities	Normal, diffuse spike-waves in temporal and frontal
Phenotype	GEFS+	GEFS+	DS	DS	GEFS+	GEFS+
Reference	This work Patient 7 14 y female	This work Patient 8 4.5 y male	Tuncer et al. (17) Patient 9 17 y male	Patient 10 5 y female	Moretti et al. (20) Patient 11 8 y male	Patient 12 3 y male

(Continued)

**TABLE 1 |** Continued

	Patient 7 14 y female	Patient 8 4.5 y male	Patient 9 17 y male	Patient 10 5 y female	Patient 11 8 y male	Patient 12 3 y female
Variant	chr2:166903459T>C c.1198A>G (p.Met400Val)	None	chr2:166900370G>A c.1852C>T (p.Arg618Cys)	chr2:166856252G>A c.4319C>T (p.Ala1440Val)	chr2:166850711AT>A c.4796delA (p.Tyr1599Phefs*19)	chr2:166850711AT>A c.4796delA (p.Tyr1599Phefs*19)
Medical history	None	None	None	None	None	None
Family background	Parents are first-cousins Young brother with bilateral sensorineural hearing loss Maternal first cousin with febrile seizures until age five.	None	Parents are first-cousins Older sister with sensorineural hearing impairment due to connexin 26 mutation	None	Non-consanguineous parents	Both parents are heterozygous for this variation
Age at seizure onset	5 mo	15 mo	6 mo	13 mo	6 mo	4 mo
Seizure type at onset	FS 10 min	FS 20 min	Febrile GTCS 5 min	FS 10 min	FS	Afebrile left FMS
Seizure types	FS, Hemiclonic, GTCS, FSE, AA (atypical absences)	FSE, afebrile GTCS.	FS, Short afebrile focal seizures, night-time S frontal semiology	FS, PS with ASC characterized by behavioral arrest followed by head turning and hemi-clonic jerking	FS, GTCS, afebrile HCS, febrile HCS (5–15 min), IMS ("head nodding," and "jerking of the legs"), FS, SE (>30 min), multiple types S.	FMS, AAS
Seizure triggers	CBZ, fever	Fever	Fever	Fever	Fever	Fever
Medication trials	CBZ	None	CBZ, LMT, TPM, LEV, STP, VPA, CZ	CBZ, VPA	VPA, LEV, TPM, BZD, FB, P	OXC, FTN, VPA, LEV, FB VPA, TPM, CZ
Actual medication	None	None				Hepatomegaly
Additional clinical features	Yes, profound learning disability	No	DMD Severe learning difficulties	5y No	AE: SE at 2y → FOED no eye contact Hyperactive behavior, DMD. After AE: Profound DMD, behavior problems autistic traits	Neuromotor developmental retardation
Intellectual disability	Yes, profound learning disability	No	DMD Severe learning difficulties	5y No	Hyperactive behavior, DMD. After AE: Profound DMD, behavior problems autistic traits	Neuromotor developmental retardation
Type of movement disorder/Neurologic examination	Dyskinetic movement disorder characterized by mixed spasticity and dystonia		Balance and motor coordination problems		Ataxia After AE: spastic quadriplegia	Ataxic walking without support, Hand stereotypic movements
Language disturbance					After AE: total loss of speech	Meaningless word repetitions

(Continued)

TABLE 1 | Continued

	Patient 7 14 y female	Patient 8 4.5 y male	Patient 9 17 y male	Patient 10 5 y female	Patient 11 8 y male	Patient 12 3 y female
Brain MRI	20 mo: small corpus callosum with markedly delayed myelination and an AC	15 mo: normal	8 and 12 y: normal	4 y: normal	1 y: normal	Normal
EEG	19 mo: diffusely slow 11 y: awake: slow background of low amplitude.Sleep recurrent bursts of rhythmic sharp w. 14 y: Interictal epileptiform activity	15 mo: normal		14 mo: normal 3 y: bilateral bursts of 3–4 Hz spike and wave. No photosensitivity	1 y: normal 21 mo: epileptic activity with slow waves and multifocal spike and spikes-wave discharges which tended to increase with photic stimulation	4 mo: normal 3 y: frequent repetitive generalized spike-slow waves and multiple spike-slow wave activities
Phenotype Reference	DS	FS+	FS+ PS	FS+ PS	DS and AE	DS
		Brunklaus et al. (16)			Khanh Van et al. (19)	Aslan et al. (18)

AAAS, atypical absence seizure; AC, atrophic cerebellum; AE, acute encephalopathy; AS, absence seizure; ASC, altered state of consciousness; CBZ, carbamazepine; CZ, cobazam; DS, Dravet syndrome; FSE, febrile status epilepticus; FB, febrile seizure; FS, febrile seizure; FTN, febrile tonic; GEFS+, genetic epilepsy with febrile seizures plus; GTCS, generalized tonic-clonic seizure; HCS, hemiconvulsive seizure; LEV, levetiracetam; LMT, lamotrigine; mo, months; MS, myoclonic seizures; OXC, oxcarbazepine; P, propofol; PS, partial seizure; S, seizure; STP, stiripentol; TPM, topiramate; VPA, valproate; Y, year; w, waves.

**Patient 2**

Patient 2 is a 35-month-old male, the brother of Patient 1 (see Figure 1). The child was born from uneventful eutocic delivery after a 37-week regular gestation, with a birth weight 3,580 g; Apgar score, 8/9/10. In the screening with otoacoustic emissions carried out at birth, hearing loss was detected, which was confirmed by performing auditory-evoked potentials of the trunk (response, 70 dB in both ears with dysmorphic curves). At 7 months of age, he presented the first FS (3 min). Furthermore, at that age, significant axial hypotonia was detected, without maintaining head support and little visual contact. For this reason, it was decided to perform an MRI study and electromyogram, which were normal. Metabolic study was extended to ammonium, amino acids in serum and cerebrospinal fluid, acylcarnitines, and organic acids, all in the normal range. At 10 months of age, hearing aids were placed, and early stimulation was started with very good evolution. In the following months, the patient presented a total of four more typical FS. At 20 months of life, he presented a febrile SE of 30 min in the context of high fever, so it was decided to start treatment with levetiracetam. Subsequently, he has only presented a more typical FS.

Currently, psychomotor development is at the lower limit of normality, and the neurological examination is normal. The clinical phenotype of the Patient 2 is compatible with GEFS+.

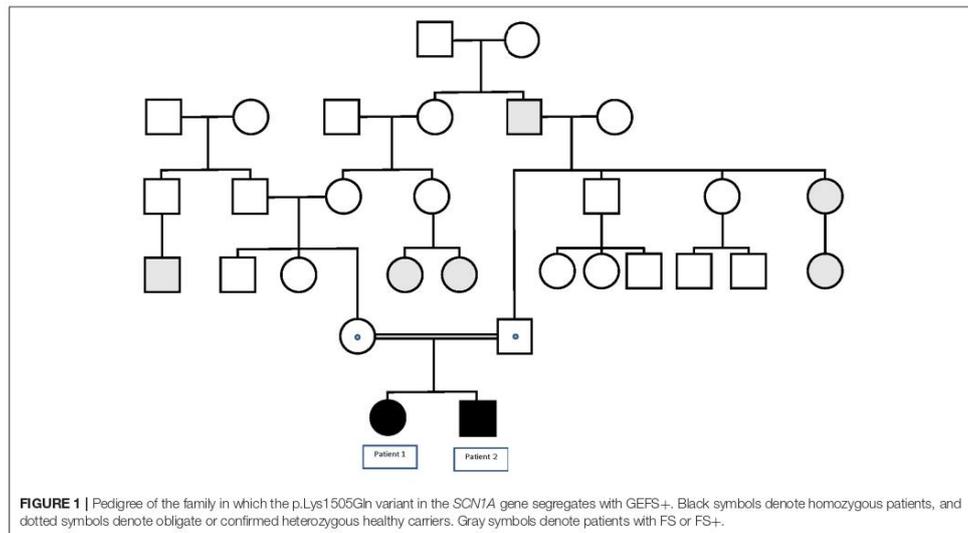
**Genetics**

Initially, Patient 2 was genetically studied due to hearing loss; only the heterozygous variant c.269T > C (p.Leu90Pro) in the GJB2 gene was considered of relevance. The inheritance pattern of hearing loss due to this gene is autosomal recessive and requires the presence of a second mutation in this gene to confirm the genetic diagnosis of hearing loss. It is possible that there might be a second undetected mutation or that there is another genetic or non-genetic cause of the hearing loss. On the other hand, Patient 2 presents the homozygous variant c.4513A > C in the SCN1A gene as the only clinically relevant result. This variant causes the substitution of the highly conserved amino acid lysine by glutamine in position 1,505 of the protein (p.Lys1505Gln), predicted as likely pathogenic by most of the *in silico* predictors (see Table 2). This variant has not been previously described. The variant is located between the repeat Domains III and IV at the cytoplasmic domain (see Figure 2). According to the ACMG criteria, this variant was classified as likely pathogenic (PP3, PM1, PM2, and PP2).

Familial segregational study by Sanger sequencing confirmed that Patient 1 shares the variant c.4513A > C in SCN1A gene in homozygous state, while the healthy parents of the two patients were heterozygous carriers.

**DISCUSSION**

So far, thousands of patients with heterozygous variants in the SCN1A gene have been published. The spectrum of the clinical phenotype associated with variations in the SCN1A gene is wide. Numerous studies have attempted to correlate the clinical phenotype according to the genotype (5, 12, 23), and there is evidence that, depending on the type and location of the



mutation in the gene, the severity of the clinical picture varies. However, predicting the clinical consequences of novel genetic variants found in routine clinical practice is not an easy task. On the other hand, new phenotypes associated with *SCN1A* are continually being published (13, 15, 24–27).

The majority of published patients with pathogenic variants in *SCN1A* have autosomal dominant inheritance, more frequently by *de novo* mutation, although there are also many inherited cases (28). However, in recent years, several individuals who presented epilepsy in relation to homozygous or compound heterozygous variants in *SCN1A*, that is, with autosomal recessive inheritance, have been published. We have collected all the published cases and added our patients in order to broaden the phenotypic and genotypic spectrum associated with *SCN1A*.

In 2015, Brunklaus et al. published for the first time two novel homozygous missense mutations of the *SCN1A* gene in four children. Then, Tuncer et al. published two brothers with compound heterozygosity in *SCN1A* with symptoms compatible with DS (17). Subsequently, Aslan et al. and Van et al. have published two more cases with homozygous variants in patients with DS (18, 19), and Moretti et al. published two novel homozygous missense variations of the *SCN1A* gene in two individuals from two different families from consanguineous pedigrees. Both of them encompassed with GEFS+ (20) (see **Tables 1, 2**).

Ten of the total 12 patients were children of families with consanguinity. Patient 11, published by Van et al. presented the variant p.Ala1440Val in homozygosity, but the authors verified that it was a *de novo* mutation, since, despite having verified the paternity of the parents, none of them were carriers (19).

Regarding the clinical phenotype, five of the patients (41.7%) are clinically encompassed by Dravet syndrome (DS), one of them associated acute encephalopathy (AE). Five (41.7%) had a phenotype of GEFS+ of familial origin. Two (16.7%) of the patients presented FS+ and focal epileptic seizures (10). In **Table 1**, we have collected the description of all the patients.

Patient 2 presented sensorineural deafness, of unknown etiology, despite having carried out an extensive etiological study. Furthermore, Patients 7 and 8 had a younger brother with sensorineural hearing loss without a specified cause, and Patients 9 and 10 had an older sister with sensorineural hearing impairment due to connexin 26 mutation. Therefore, of the eight families in the series, three of them had individuals with sensorineural deafness. There are no publications linking *SCN1A* variants with sensorineural deafness, despite the large number of published patients with variants in this gene. For this reason, we think that this finding is probably related to consanguinity of the family rather than to *SCN1A* gene. The concurrence in a family of two autosomal recessive inherited diseases is not so uncommon when it comes to consanguineous families (29). Sensorineural deafness of genetic cause is mostly (about 80%) due to genetic variants of autosomal recessive inheritance (30, 31).

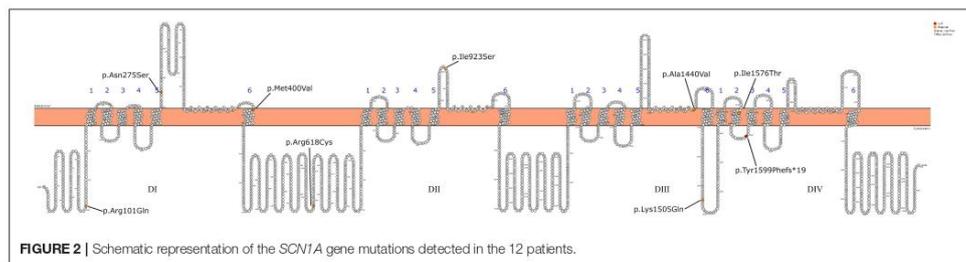
In the same way, we think that, possibly, the hepatomegaly that Patient 12 presented is unrelated to the variants in *SCN1A* gene.

Missense variants in *SCN1A* gene have variable effects, depending on the functional regions in which they occur and the nature of amino acid substitutions (11).

Missense mutations leading to disease are more likely to occur in the voltage sensor (S4) and the pore region (S5-S6

**TABLE 2 |** Genetic information on 12 patients with pathogenic or likely pathogenic *SCN1A* variants with autosomal recessive inheritance NM\_001165963.1.

Patient	Patient 1 and 2	Patient 3 and 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7 and 8	Patient 9 and 10	Patient 11	Patient 12
Variant	chr2:166852591 T>G c.4513A>C (p.Lys1505Gln)	chr2:166915161 C>T c.302G>A (p.Arg101Gln) chr2:166850781 A>G c.4727T>C (p.Ile1576Thr)	chr2:166894464 A>C c.2768T>G (p.Ile923Ser)	Chr2: 166908369 T>C c.824A>G (p.Asn275Ser)	chr2:166903459 T>C c.1198A>G (p.Met400Val)	chr2:166900370 G>A c.1852C>T (p.Arg618Cys)	chr2:166856252 G>A c.4319C>T (p.Ala1440Val)	chr2:166850711 AT>A c.4796delA (p.Tyr1599Phefs*19)
Classification	Likely pathogenic	Pathogenic Likely pathogenic	Uncertain significance	Likely pathogenic	Pathogenic	Uncertain significance/Likely pathogenic	Likely pathogenic	Pathogenic
Inheritance	Inherited homozygous (from both parents)	Compound heterozygous	Homozygous		Inherited homozygous (from both parents)	Inherited homozygous (from both parents)	Homozygous <i>de novo</i>	Inherited homozygous (from both parents)
ACMG criteria	PM1 moderate, PM2 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting	PM5 very strong, PM1 moderate, PM2 moderate, PM5 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting, PP5 supporting, PM1 moderate, PM2 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting	PM2 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting	PM1 moderate, PM2 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting	PM1 strong, PM2 moderate, PM5 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting, PP5 supporting	PM2 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting	PM1 moderate, PM2 moderate, PP2 supporting, PP3 supporting	PVS1 very strong, PM2 moderate, PP3 supporting
CADD	28.6	29.6/26.9	26.9	23.1	23.7	29.6	33	33
Phenotype	GEFS+ (both)	DS (both)	GEFS+	GEFS+	DS (p7) FS (p8)	FS+ PS (both)	DS and AE	DS
Reference	This work	Tuncer et al. (17)	Moretti et al. (20)		Brunklaus et al. (16)		Khanh et al. (19)	Aslan et al. (18)



**FIGURE 2 |** Schematic representation of the *SCN1A* gene mutations detected in the 12 patients.

segments) of the four homologous domains, as in the case of Patients 3, 4, 7, and 11 of this series (32). As an exception, Patient 8 (the brother of Patient 7) presents the variant in the pore and a mild phenotype. In some pairs of siblings, a marked heterogeneity of the phenotype is observed. It has been proposed that variations in other epilepsy genes can modify the clinical phenotype associated with variants in *SCN1A* (33). This phenomenon has also been described in other genetic epilepsies associated with other ion channels, such as *SCN2A* (34). This variability associated with the same variation in *SCN1A* has been described both in individuals from the same family and at the interfamily level. However, further unknown environmental or epigenetic factors have been also proposed to play a significant

role in the development and evolution of the epilepsy phenotype (35, 36).

All the variants described in the series are missenses, except for the frames hit variant in Patient 12, who presents a severe DS phenotype even though it is located at the intracytoplasmic level. So, due to the characteristics of the variant, the effect on the protein can be variable. Pathogenic variants that lead to a complete loss of function of the channel are virtually always associated with severe phenotypes.

It is difficult to establish a correlation between the genotype phenotype with such a small series; however, the data suggest that the variants located at the intracytoplasmic or extracellular level (Patients 1, 2, 5, 6, 9, 10, and 12) present a less severe

epileptic phenotype. Conversely, those variants found at the pore region (Patients 3, 4, 7, 8, and 11) more frequently present a more severe phenotype, with a phenotype of Dravet syndrome in most patients.

It is worth noting that heterozygous carrier parents or other relatives are asymptomatic. Therefore, the variants described in this work are probably hypomorphic, both due to their location within the gene and because of their intrinsic properties, and they are only capable of altering the function of the Nav1.1 protein when they are in homozygous state. In any case, it is also remarkable that the phenotypic spectrum of the whole series of patients presenting the autosomal recessive phenotype related to SCN1A is quite similar to the phenotypic spectrum of most patients with autosomal dominant inheritance, as well as a similar genotype-phenotype correlation.

## CONCLUSIONS

The 12 patients published so far with an autosomal recessive epileptic phenotype associated with SCN1A show that not all patients with symptoms associated with this gene have autosomal dominant inheritance. On the other hand, it is worth noting that the resulting phenotypes do not differ from those usually caused by dominant heterozygous variants. Furthermore, the analysis of the variants found in each patient, correlating it with the phenotype he or she presents, allows us to know a little better the correlation of genotype-phenotype associated with SCN1A. It is possible that hypomorphic heterozygous variants only manifest when affecting the two alleles of this gene.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this article are not readily available due to ethical and privacy restrictions. Requests to access the datasets should be directed to the corresponding author.

## REFERENCES

- Catterall WA, Kalume F, Oakley JC. Nav1.1 channels and epilepsy. *J Physiol.* (2010) 588:1984–59. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187484
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Nat Neurosci.* (2006) 9:1142–9. doi: 10.1038/nn1754
- Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapoui N, Mazaki E, Inoue I, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J Neurosci.* (2007) 27:5903–14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007
- Scheffer IE, Nabbout R. SCN1A-related phenotypes: epilepsy and beyond. *Epilepsia.* (2019) 60:S17–24. doi: 10.1111/epi.16386
- de Lange IM, Koudijs MJ, van't Slot R, Gunning B, Sonsma ACM, van Gemert LJJM, et al. Mosaicism of *de novo* pathogenic SCN1A variants in epilepsy is a frequent phenomenon that correlates with variable phenotypes. *Epilepsia.* (2018) 59:690–703. doi: 10.1111/epi.14021
- Mei D, Cetica V, Marini C, Gerrini R. Dravet syndrome as part of the clinical and genetic spectrum of sodium channel epilepsies and encephalopathies. *Epilepsia.* (2019) 60:S2–7. doi: 10.1111/epi.16054
- Carranza Rojo D, Hamiwka L, McMahon JM, Dibbens LM, Arsov T, Suls A, et al. *De novo* SCN1A mutations in migrating partial seizures

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de ética del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin. Written informed consent was obtained from the minor(s)' legal guardian/next of kin for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM: drafting of the article, clinical examination of the patients, and bibliographic search. AC and SM: substantial contributions to analysis and interpretation of genetic data. MT: revising the article for important intellectual content and contribution to clinical data analysis. FM: analysis and interpretation of genetic data and revising of the article and final approval. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work had received financial support from the CM19/00181 Grant from the Carlos III Institute (AM) and the Mutua Madrileña Foundation (held by SM). AC was supported by a research grant by Fundación Mutua Madrileña. Support for open access publication was provided by Fundación Síndrome de Dravet (Dravet Syndrome Foundation Spain) (grant number FSD-OASP-XI-III).

## ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank all the patients and their families for their involvement in this study.

- of infancy. *Neurology.* (2011) 77:380–3. doi: 10.1212/WNL.0b013e318227046d
- Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, et al. SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia.* (2013) 54:946–52. doi: 10.1111/epi.12168
- Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. *De Novo* mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet.* (2001) 68:1327–32. doi: 10.1086/320609
- Myers KA, Scheffer IE, Berkovic SF, on behalf of the ILAE Genetics Commission. Genetic literacy series: genetic epilepsy with febrile seizures plus. *Epileptic Disord.* (2018) 20:232–8. doi: 10.1684/epd.2018.0985
- SCN1A mutation database. *Institute of Neurosciences, Guangzhou Medical University.* C2021 – (2021). Available online at: <http://scn1a.caae.org.cn> (accessed July 8, 2021)
- Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, et al. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. *Hum Mutat.* (2015) 36:573–80. doi: 10.1002/humu.22782
- Sadleir LG, Moutier EI, Gill D, Davis S, Joshi C, DeVile C, et al. Not all SCN1A epileptic encephalopathies are Dravet syndrome: early profound Thr226Met phenotype. *Neurology.* (2017) 89:1035–42. doi: 10.1212/WNL.0000000000004331

14. Beck VC, Hull JM, Isom LL. Beyond dravet syndrome: characterization of a novel, more severe SCN1A-linked epileptic encephalopathy. *Epilepsy Curr.* (2019) 19:266–8. doi: 10.1177/1535759719858339
15. Jaber D, Gitiaux C, Blesson S, Marguet F, Buard D, Varela Salgado M, et al. De novo mutations of SCN1A are responsible for arthrogyriposis broadening the SCN1A-related phenotypes. *J Med Genet.* (2020) 20:1–6. doi: 10.1136/jmedgenet-2020-107166
16. Brunklaus A, Ellis R, Stewart H, Aylett S, Reavey E, Jefferson R, et al. Homozygous mutations in the SCN1A gene associated with genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome in 2 families. *Eur J Paediatr Neurol.* (2015) 19:484–8. doi: 10.1016/j.ejpn.2015.02.001
17. Tuncer FN, Gormez Z, Calik M, Uzun GA, Sagioglu MS, Yuceturk B, et al. A clinical variant in SCN1A inherited from a mosaic father cosegregates with a novel variant to cause Dravet syndrome in a consanguineous family. *Epilepsy Res.* (2015) 113:5–10. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2015.02.020
18. Aslan M, Ozgor B, Kirik S, Gungor S. A novel SCN1A mutation: a case report. *J Pediatr Neurosci.* (2020) 15:120–3. doi: 10.4103/jpn.JPN\_118\_18
19. Khanh Van LT, Hien HTD, Kieu HTT, Hieu NLT, Vinh LS, Hoa G, et al. De novo homozygous variant of the SCN1A gene in patient with severe Dravet syndrome complicated by acute encephalopathy. *Neurogenet.* (2021) 22:133–6. doi: 10.1007/s10048-021-00636-7
20. Moretti R, Arnaud L, Bouteiller D, Trouillard O, Moreau P, Buratti J, et al. SCN1A-related epilepsy with recessive inheritance: two further families. *Eur J Paediatr Neurol.* (2021) 33:121–4. doi: 10.1016/j.ejpn.2021.05.018
21. 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 genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med.* (2015) 17:405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30
22. Martínez 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) 54:87–92. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103964
23. Brunklaus A, Schorge S, Smith AD, Ghanty I, Stewart K, Gardiner S, et al. SCN1A variants from bench to bedside-improved clinical prediction from functional characterization. *Hum Mutat.* (2019) 41:363–74. doi: 10.1002/humu.23943
24. Spagnoli C, Frattini D, Rizzi S, Salerno GG, Fusco C. Early infantile SCN1A epileptic encephalopathy: expanding the genotype-phenotype correlations. *Seizure.* (2019) 65:62–4. doi: 10.1016/j.seizure.2019.01.002
25. Berecki G, Bryson A, Terhag J, Maljevic S, Gazina EV, Hill SL, et al. SCN1A gain of function in early infantile encephalopathy. *Ann Neurol.* (2019) 85:514–25. doi: 10.1002/ana.25438
26. Ohashi T, Akasaka N, Kobayashi Y, Magra S, Kawashima H, Matsumoto N, et al. Infantile epileptic encephalopathy with a hyperkinetic movement disorder and hand stereotypies associated with a novel SCN1A mutation. *Epileptic Disord.* (2014) 16:208–12. doi: 10.1684/epd.2014.0649
27. Ohtsuka Y, Ohmori I, Ogino T, Ouchida M, Shimizu K, Oka E. Paroxysmal movement disorders in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Brain Dev.* (2003) 25:401–5. doi: 10.1016/S0387-7604(03)00025-1
28. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Ghilhotto L, et al. ILAE classification of the epilepsies position paper of the ILAE commission for classification and terminology. *Epilepsia.* (2017) 58:512–21. doi: 10.1111/epi.13709
29. Romdhane L, Mezzi N, Hamdi Y, El-Kamab G, Barakat A, Abdelhak S. Consanguinity and inbreeding in health and disease in North African populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* (2019) 20:155–79. doi: 10.1146/annurev-genom-083118-014954
30. Yang T, Guo L, Wang L, Yu X. Diagnosis, intervention, and prevention of genetic hearing loss. *Adv Exp Med Biol.* (2019) 1130:73–92. doi: 10.1007/978-981-13-6123-4\_5
31. Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet.* (2006) 69:371–92. doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00613.x
32. Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology.* (2011) 76:594–600. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820c309b
33. De Lange IM, Mulder F, van't Slot R, Sonnsma ACM, van Kempen MJA, Nijman JJ, et al. Modifier genes in SCN1A-related epilepsy syndromes. *Mol Genet Genomic Med.* (2020) 8:e1103. doi: 10.1002/mgg3.1103
34. Nieto-Barceló JJ, Gonzalez Montes N, Gonzalo Alonso I, Martínez F, Aparisi MJ, Martínez-Matilla M, et al. Variant in CACNA1G as a possible genetic modifier of neonatal epilepsy in an infant with a De Novo SCN2A mutation. *J J Pediatr Genet.* (2021). doi: 10.1055/s-0041-1723958
35. Suls A, Velizarova R, Yordanova I, Deprez L, Van Dyck T, Wauters J, et al. Four generations of epilepsy caused by an inherited microdeletion of the epilepsy caused by an inherited microdeletion of the SCN1A gene. *Neurology.* (2010) 75:72–6. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e62088
36. Guerrini R, Cellini E, Mei D, Metitieri T, Petrelli C, Pucatti D, et al. Variable epilepsy phenotypes associated with a familial intragenic deletion of the SCN1A gene. *Epilepsia.* (2010) 51:2474–7. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02790.x

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Marco Hernández, Tomás Vila, Caro Llopis, Monfort and Martínez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### **CAPITULO III. FENOTIPOS ATÍPICOS.**

En este capítulo hemos buscado describir y analizar los fenotipos asociados a variantes genéticas que dan lugar a fenotipos atípicos. De esta forma dos artículos originales han sido publicados dentro de este apartado.

En el primero de ellos se realizó un análisis exhaustivo sobre tres pacientes de nuestra serie con variantes patogénicas en el gen *SPTAN1*, uno de ellos con fenotipo no descrito previamente asociado a este gen. Además, revisamos todos los pacientes publicados hasta la fecha con variantes en el gen *SPTAN1* con el objetivo de dar una visión global del fenotipo asociado a este gen.

**Marco-Hernández AV, Caro A, Montoya-Filardi A, Tomás Vila M, Monfort S, Beseler Soto B, Nieto-Barceló J, Martínez, F. "Extending the clinical phenotype of *SPTAN1*: from DEE5 to migraine, epilepsy and subependymal heterotopias without intellectual disability". *American Journal of Medical Genetics*. 2021. DOI: 10.1002/ajmg.a.62507.**

Las mutaciones en el gen *SPTAN1*, que codifica la espectrina  $\alpha$ II no eritrocítica, son responsables para una encefalopatía epiléptica y del desarrollo severa (EED-5) y un amplio espectro de trastornos del neurodesarrollo, como epilepsia con o sin discapacidad intelectual (DI) o DI con síndrome cerebeloso. Se ha propuesto una correlación genotipo-fenotipo determinada según el tipo y localización de la mutación. Aquí reportamos tres nuevos casos con mutaciones *de novo* en *SPTAN1*, uno de ellos asociado a un fenotipo leve no descrito previamente. El espectro fenotípico que presentamos va desde (1) encefalopatía del desarrollo grave con ataxia y atrofia cerebelosa leve, sin epilepsia; (2) discapacidad intelectual moderada, retraso grave del lenguaje, ataxia y temblor; (3) inteligencia normal, migraña crónica y convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Sorprendentemente, todos estos pacientes mostraron anomalías en la resonancia magnética cerebral, siendo de especial interés las

heterotopias subependimales detectadas en este último paciente. Así extendemos el espectro fenotípico relacionado con *SPTAN1*, tanto en su implicación radiológica como clínica.

Además, después del análisis sistemático de todos los pacientes reportados hasta ahora, se detectó un exceso de pacientes masculinos *versus* femeninos (20:9,  $p = 0.04$ ), más pronunciado entre los fenotipos más leves. En consecuencia, proponemos que algún factor de protección podría estar presente entre las mujeres portadoras, que si se confirma, debe ser considerado cuando se establezca la patogenicidad de las variantes genéticas más leves en este gen.

# Extending the clinical phenotype of *SPTAN1*: From DEE5 to migraine, epilepsy, and subependymal heterotopias without intellectual disability

Ana Victoria Marco Hernández<sup>1,2</sup>  | Alfonso Caro<sup>1</sup>  |  
Alejandro Montoya Filardi<sup>3</sup>  | Miguel Tomás Vila<sup>2</sup>  | Sandra Monfort<sup>1</sup>  |  
Beatriz Beseler Soto<sup>2</sup> | Juan José Nieto-Barceló<sup>2</sup>  | Francisco Martínez<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Genetics Unit, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Neuropediatrics Section, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Radiology Service, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

## Correspondence

Ana Victoria Marco Hernández,  
Neuropediatrics Section, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Av Fernando Abril Martorell, 106, Valencia 46026, Spain.  
Email: marco\_anaher@gva.es

## Funding information

Fundación Mutua Madrileña; Instituto de Salud Carlos III. Grant/Award Number: CM19/00181

## Abstract

Mutations in *SPTAN1* gene, encoding the nonerythrocyte  $\alpha$ II-spectrin, are responsible for a severe developmental and epileptic encephalopathy (DEE5) and a wide spectrum of neurodevelopmental disorders, as epilepsy with or without intellectual disability (ID) or ID with cerebellar syndrome. A certain genotype–phenotype correlation has been proposed according to the type and location of the mutation. Herein, we report three novel cases with de novo *SPTAN1* mutations, one of them associated to a mild phenotype not previously described. They range from (1) severe developmental encephalopathy with ataxia and a mild cerebellar atrophy, without epilepsy; (2) moderate intellectual disability, severe language delay, ataxia and tremor; (3) normal intelligence, chronic migraine, and generalized tonic–clonic seizures. Remarkably, all these patients showed brain MRI abnormalities, being of special interest the subependymal heterotopias detected in the latter patient. Thus we extend the *SPTAN1*-related phenotypic spectrum, both in its radiological and clinical involvement. Furthermore, after systematic analysis of all the patients so far reported, we noted an excess of male versus female patients (20:9,  $p = 0.04$ ), more pronounced among the milder phenotypes. Consequently, some protection factor might be suspected among female carriers, which if confirmed should be considered when establishing the pathogenicity of milder genetic variants in this gene.

## KEYWORDS

ataxia, cerebellar atrophy, intellectual disability, spectrin, subependymal heterotopia

## 1 | INTRODUCTION

Nonerythrocytic  $\alpha$ II-spectrin (*SPTAN1*) gene encodes for the membrane structural protein  $\alpha$ II-spectrin that forms heterotetramers with  $\beta$ -spectrin proteins involved in regulation of receptor binding and the formation of the cellular cytoskeleton (Syrbe et al., 2017; Weigand et al., 2012).  $\alpha$ II-spectrin plays important roles in the maintenance of the integrity of myelinated axons (Voas et al., 2007) and it is implicated

in critical aspects of dendritic and axonal development and synaptogenesis (Wang et al., 2018). Also, spectrin complexes in neurons participate in presynaptic vesicular release by interacting with syntaxins (Gartner et al., 2018; Nakano et al., 2001), as well as bind SHANK proteins that localize glutamate receptors in postsynaptic densities (Boeckers et al., 2002; Gartner et al., 2018). When there is a mutation in *SPTAN1*, it has been seen that there is instability in the structure of the antiparallel  $\alpha$  and  $\beta$  heterodimers what affect its function.

In 2008, Tohyama et al. initially reported individuals with severe epileptic encephalopathy, similar to West syndrome (WS), with brain hypomyelination and reduced white matter (Tohyama et al., 2008). Later in 2010, Saitsu et al. confirmed that they associated with de novo in-frame indels in *SPTAN1* (Saitsu et al., 2010). Since then, a total of 47 patients with likely pathogenic and pathogenic variants in *SPTAN1* have been published (An et al., 2014; Beijer et al., 2019; Gartner et al., 2018; Gilissen et al., 2014; Hamdan et al., 2012; Leveille et al., 2019; Nonada et al., 2013; Rapaccini et al., 2018; Ream & Mikati, 2014; Retterer et al., 2016; Saitsu et al., 2010; Stavropoulos et al., 2016; Syrbe et al., 2017; Terrone et al., 2020; Writzl et al., 2012; Yavarna et al., 2015; Ylikallio et al., 2020).

Pathogenic variants in *SPTAN1* have been associated with central or peripheral nervous systems damage. Classically, two clinical phenotypes within a broad spectrum of neurodevelopmental disorders. On one hand, DEE5, a very severe phenotype with global developmental delay and the onset of tonic seizures or infantile spasms in the first months of life, with severe intellectual disability (ID), progressive brain and cerebellar atrophy, and hypomyelination, that can be considered a hallmark of *SPTAN1*-associated encephalopathy (Syrbe et al., 2017). Affected individuals have severely impaired psychomotor development with lack of visual attention, poor head control, feeding difficulties, microcephaly, and spastic quadriplegia. It is important to highlight that in the largest series so far reported, 15% of the 20 patients died of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) between the ages of 3.6 and 4.3 years (Syrbe et al., 2017). On the other hand, a more benign phenotype with or without childhood-onset epilepsy and with mild or moderate intellectual disability.

These differences in the severity of the clinical spectrum have been tried to explain in relation to structural abnormalities as well as in relation to the type of mutation and its location. In this way, Syrbe et al. observed that when the mutation lies outside the  $\alpha/\beta$ -spectrin heterodimerization domain, 4/7 had normal brain imaging and 3/7 exhibited moderately progressive brain and/or cerebellar atrophy. On the other hand, when the mutation was located within the spectrin heterodimer contact site, the patients exhibited severe and progressive brain, brainstem, and cerebellar atrophy, with hypomyelination in most (Syrbe et al., 2017).

Recently, individuals with peripheral nervous system involvement associated with pathogenic or probably pathogenic variants in *SPTAN1* have been published. Beijer et al. reported 12 patients from three different families, with dominant hereditary motor neuropathy phenotype associated with heterozygous nonsense variations in the *SPTAN1* gene. None of these patients had central nervous system involvement such as epilepsy, intellectual disability, hearing loss, or visual loss (Beijer et al., 2019). Leveille et al. published two unrelated patients with biallelic *SPTAN1* variants with symptoms of pure hereditary spastic paraplegia (Leveille et al., 2019). Finally, Ylikallio et al. presented a patient with symptoms of sensorimotor axonal polyneuropathy, psychomotor retardation in childhood, marfanoid phenotype, and learning disabilities with normal intelligence (Ylikallio et al., 2020).

The two final spectrin repeats in *SPTAN1* have been shown to be required for  $\alpha/\beta$  heterodimerization, and deletions or duplications maintaining the reading frame give rise to a dominant-negative effect on spectrin dimer formation and function (Saitsu et al., 2010). The pathogenic variants located between Asp2303 and Met2309 in the  $\alpha 20$  repeat correspond to the  $\alpha/\beta$  heterodimerization domain in the protein, and their alteration produces spectrin aggregate formation in fibroblasts, leading to a more severe clinical phenotype with severe neurodegeneration (Syrbe et al., 2017). In contrast, those genetic variants outside the spectrin binding domains are considered less clinically devastating (Campbell et al., 2012; Saitsu et al., 2010). However, there are some cases located in critical areas that do not present the most serious phenotype (see Figure 1) (Gartner et al., 2018; Syrbe et al., 2017).

*SPTAN1* is predominantly expressed in the temporal cortex and cerebellum, which would explain the cerebral and cerebellar atrophy of patients with the more severe clinical phenotype, as well as the presence of ataxia, impaired motor coordination, and epilepsy in some patients (Gartner et al., 2018; He et al., 2016).

In the series of 20 patients described by Syrbe et al., they reported that the vast majority of patients with *SPTAN1* mutations exhibited epilepsy (95%). Of these, 74% have early infantile epileptic encephalopathy, most like infantile spasms or as a part of a West syndrome (Syrbe et al., 2017).

Here we report three unrelated patients with novel *SPTAN1* variants that expand the *SPTAN1*-associated phenotype. Only one of them has epilepsy, associated to subependymal heterotopias, but his intellectual functioning is normal. The two other patients do present moderate-severe intellectual disability, ataxia, motor clumsiness, and difficulties in feeding in the first years of life. They all have alterations in the MRI image.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

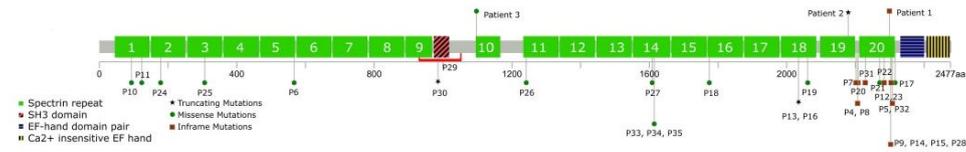
### 2.1 | Participants

The study was carried out in patients affected by *SPTAN1* pathogenic or likely pathogenic variants, according to the American College of Medical Genetics and Genomics criteria (Richards et al., 2015). Three unrelated families were recruited for inclusion. A brief clinical description of this cohort can be seen in Table 1. All patients had at least an MRI, and this was systematically reviewed by an experienced pediatric neuroradiologist.

This study was approved by the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). Informed consent was obtained from the parents of all participants.

### 2.2 | Genetic studies

Peripheral blood samples from individuals and their parents were collected by standard methods for the genetic studies. Genomic DNA



**FIGURE 1** Schematic representation of the *SPTAN1* gene mutations detected in the 35 patients. Missense mutations are represented in green dots; truncating mutations in black; in-frame mutations in red; and splice site mutations in pink; red lines represent *SPTAN1* gene deletions

was isolated using the Qiacube extractor (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA purity and concentration were measured using the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen), respectively.

Massive parallel sequencing for exome sequencing was performed by using the commercial clinical exome SureSelect Focused Exome, or its update CCP17 (Agilent Technologies). The libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 following the manufacturer's protocol to get a minimum reading depth of 100 $\times$ . Sequence read alignments; variant detection and annotation were performed in Alissa Interpret platform (Agilent Technologies). All disease-causing genes related with epilepsy and/or neurodevelopmental disorders described in different databases were analyzed. To evaluate the clinical impact and to assess the pathogenicity of variants in exome sequencing, we applied the previously described criteria (Martinez et al., 2017). All clinically relevant genetic variants detected were confirmed by Sanger sequencing from purified PCR products. All primers for amplification and sequencing were designed with exon-primer (primers and PCR conditions are available on request).

### 3 | RESULTS

A total of three patients with pathogenic or probably pathogenic de novo variants in *SPTAN1* gene were included (see Tables 1 and 2 and Figure 1).

#### 3.1 | Patient 1

Patient 1 is a 17-year old born to healthy nonconsanguineous parents. During pregnancy no antenatal problems were detected, neither any problem during delivery with APGAR 9/10/10 and weight 2720 g. From the first months of life, he presented failure to thrive, with associated psychomotor delay in neuropaediatric follow-up from 10 months of life. At 3 years of age, in the context of admission due to intussusception of the bowel, the family reported a regression of the milestones reached with significant hypotonia. He required rehabilitation with progressive recovery. He has never had epileptic seizures. Currently the patient has a moderate intellectual disability, with significant dependence for self-care activities and a very serious impairment of language with dysarthria. The neurological examination highlights clear dyspraxia, ataxia, and action and rest tremor. He also

associates behavior problems with obsessive-compulsive traits. He presents mild facial dysmorphic features such as an elongated face, triangular facies, high hair set, retrognathia with a highly pointed palate, prominent upper incisors, and pectus excavatum. The magnetic resonance image highlights the presence of minimal frontal leukomalacia and atrophy of the vermis and cerebellar hemispheres in the lower slope (see Figure 2). Genetically, he presents the de novo variant c.6908\_6916delACCAGCTGG, which maintains the frame reading but implies the loss of three amino acids in the 20 spectrin domain (p.Asp2303\_Leu2305del).

#### 3.2 | Patient 2

Patient 2 is a 15-year old who was first seen at the Neuropaediatrics Unit of Hospital La Fe in Valencia, Spain, when he was 9 years old. The reason for the initial consultation was chronic recurrent headache attacks of 6 years of evolution, with characteristics of migraine. The child was born from uneventful eutocic delivery after a 40-week regular gestation, with a birth weight 2950 g. The psychomotor development of the patient was normal. At age 13 he presented the first episode of generalized tonic-clonic seizure while awake (Scheffer et al., 2017). Later he presented new seizures, some associated with migraine episodes. The seizures subsided when initiating treatment with zonisamide.

A cerebral magnetic resonance study was carried out in which the presence of subependymal heterotopias in the posterior side of the left ventricular body was observed (see Figure 3). Genetic analysis was carried out with the aim of studying the genes related to periventricular heterotopy by massive sequencing. No clinically relevant genetic variant was found. The analysis was then extended to the rest of the genes related to different neurodevelopmental disorders. An 11-base insertion was found in the *SPTAN1* gene, c.6546\_6556dupCCCTGGAGGAG, which causes a reading frame shift and the appearance of an early stop codon (p.Thr2186Argfs\*82). This change has not been previously reported. The study of his parents by Sanger sequencing confirmed that the insertion occurred de novo in the patient.

#### 3.3 | Patient 3

Patient 3 is a 6-year old, the result of a spontaneous pregnancy without incident. He was born to healthy parents nonconsanguineous at

**TABLE 1** Clinical and genetic findings in patients with pathogenic variants in *SPTAN1*

Family no.	Age, sex	Epilepsy	Age at seizure onset	Initial symptoms	Seizure types	Development	Neurological examination	EEG	Brain MRI findings	Other	Genetic variant (protein consequence)	Phenotype	Reference
1	17 years, M	No	NA	DD Failure to thrive	NA	Moderate ID Severe LD Hyperactivity	Dyspraxia Tremor of action Ataxia	Normal	Cerebellum atrophy Hyperintensity in frontal cortex	Failure to thrive Asthma	c.6908_6916del (p.Asp2303_Leu2305del)	ID-CS	This study
2	15 years, M	Yes, ICE	12 years	Headache from 3 years	GTCs	ADHD, learning problems without ID	Exalted reflexes and clonus	Temporal spikes	Subependymal heterotopias	Headache Asthma	c.6546_6556dup (p.Asn2386Arg1516e2)	Epilepsy without ID	This study
3	6 years, M	No	NA	DD	NA	Severe ID	Mild Ataxia	Not done	Mild cerebellum atrophy	Belkosi; introduction problem	c.3292C>A (p.Arg1098Ser)	ID-CS	This study
4	27 years, F	IS, intractable	3 months	No visual attention	NA	No visual attention, gastrostomy, no head control	Profound MR, spastic quadriplegia	Hyps	Cortical atrophy, decreased WM, cerebellum and BS atrophy Thin CC	AMI GE reflux	c.6619_6624del (p.Glu2207del)	DEES	Saito et al. (2010)
5	3 years, M	IS, intractable	3 months	No visual attention	NA	No visual attention, tube feeding, no head control	Profound MR, spastic quadriplegia	Hyps	Cortical atrophy, decreased WM, cerebellum and BS atrophy Thin CC	AMI Myocarditis	c.6923_6928dup (p.Arg2308_Met2309dup)	DEES	
6	9 years, M	No	NA	ID	ID	ID	None	None	None	Macrocephaly	c.1697G>C (p.Arg564Pro)	ID without epilepsy	Hamdan et al. (2012)
7	11 years, M	Mild generalized epilepsy	16 months	Hypotonia	ASTCG	Severe ID	Axial and mild appendicular hypotonia	Normal	Ponto cerebellar atrophy		c.6605_6607del (p.Gln2202del)	Epilepsy with ID	
8	8 months, F	EOEE IS 3.5 months	6 weeks	Hypotonia, lack of visual attention	Segmental myoclonic jerks	Severe DD	Spastic, no head control, isoagastic feeding	Hyps	Diffusely reduced WM and BS volumes with hypomyelination	Bilateral dysplastic coloboma-like optic discs	c.6619_6621del (p.Glu2207del)	DEES	Witzel et al. (2012)
9	2 years died, M	SW intractable	3 months	Failure to thrive	Spasms	No head control, no social contact	Profound ID, spastic quadriplegia, dystonia	Hyps	Cortical atrophy, thin CC, hypomyelination, AC and BS 2 years	AMI CP 3	c.6908_6916dup (p.Asp2303_Leu2305dup) de novo	DEES	Nonaka et al. (2013)
10							ID				c.277G>A (p.Glu191Lys)	ID	Glissen et al. (2014)
11							ASD				c.362G>T (p.Arg121Lys)	ASD	An et al. (2014)
12							DEES				c.6910_6918dup (p.Gln2304dup)	DEES	Ream and Mikati (2014)
13							Microcephaly				c.6103C>T (p.Gln2035Ter)	Epilepsy, NA	Yavama et al. (2015)
14	2 years, F	Spasms intractable	3 weeks	Seizure	Spasms	No head control, no social contact	Profound ID, spastic quadriplegia with hypotonia	Multifocal spike	Cortical atrophy, thin CC, hypomyelination, AC and BS (5 m)	AMI P3	c.6908_6916dup (p.Asp2303_Leu2305dup) de novo	DEES	Tohyama et al. (2015)
15	6 years, M	W5 intractable	1 day	Seizure apnea	Spasms, myoclonic sz, asymmetric tonic seizure	No head control, no social contact	Profound ID, spastic quadriplegia with hypotonia, dystonia	NA	Brain atrophy, thin CC, hypomyelination, atrophy of cbl and brainstem	AMI P3	c.6908_6916dup (p.Asp2303_Leu2305dup) de novo	DEES	

TABLE 1 (Continued)

Family no.	Age, sex	Epilepsy	Age at seizure onset	Initial symptoms	Seizure types	Development	Neurological examination	EEG	Brain MRI findings	Other	Genetic variant (protein consequence)	Phenotype	Reference
16									Abnormality of the nervous system		c.6103C>T (p.Gln203Ter)	NA	Rettner et al. (2016)
17		Intractable seizures					Hypotonia			Microcephaly	c.6947A>C (p.Gln2316Pro)	DEES	Savopoulos et al. (2016)
18	6 months, F	Infantile EE with IS and focal epilepsy	9 months	NA	Spasms, focal seizures	Mild ID, ASD	Normal	Right frontotemporal SW	Normal at 2 year 10 m	NA	c.5266C>T (p.Arg176Trp) de novo	Epilepsy with ID ASD	Synbe et al. (2017)
19	3 years, F	Infantile EE with tonic spasms and FDS	7 months	NA	Persisting FDS and tonic seizures	Lack of visual attention	Profound DD, severe hypotonia	Slowing of background activity at 7 months and 1 year 3 months	Supratentorial atrophy, severe thinning of CC hypomyelination, at 2 years	AM 44 cm (-5.1)	c.6184C>T (p.Arg2062Trp) de novo	DEES	
20	4 years, F	W5	Neonatal	NA	Persisting polymorphic seizures	Lack of visual attention, thermic dysregulation		Hyps up to 3 months, background slowing with bifrontotemporal spikes at 7 months, multifocal SW and spikes at 3 years	Global brain, BS and CA, extremely thin CC, hypomyelination, at 2 years	46 cm (-2) microcephaly	c.6622_6624del (p.Asn2208del) de novo	DEES	
21	3 years, M	WS	4 m	NA	Persisting subtle IS and tonic seizures	Profound DD, microcephaly	Hypotonia, multifocal myoclonus, dyadicetic movement disorder, lack of visual attention	Hyps up to 3 years	Global atrophy, more pronounced on cerebellum/brainstem, thin CC, hypomyelination, at 10 m	At 10 m 42.3 cm (-2) AM	c.6811G>A (p.Glu2271Ily) de novo	DEES	
22	3 years, M	Infantile EE with IS evolving to myoclonic seizures	8 months	NA	IS evolving into myoclonic seizures, seizure free after 15 months	Severe DD	Hypotonia, ataxic movement disorder, dysmorphic features	At 14 months ETP in sleep during spasm, no hyps, at 22 m no ETP increased beta activity	Pontoocellar hypoplasia/atrophy, subependymal heteroplasia, thin CC, at 12 months	47.3 cm (-1.2) no microcephaly	c.6850_6852del (p.Asp2284del) de novo	DEES	
23	6 years, M	W5	4 months	NA	Seizure free after ACTH at 7 months	Mild DD, Delayed walking (26 months), mild attention deficit	Depressed nasal bridge, frontal bossing	Hyps, at 5 years normal	Mild ventricular dilatation, thin CC, at 5 months	No microcephaly	c.6910_6918del (p.Gln2304_Gln2306del) de novo	Epilepsy with ID	
24	4 years 6 months, M	Focal epilepsy	3 years	Seizures	Seizures-free on PB	Normal	Normal	Bilateral frontal spikes	Normal at 3 year	No microcephaly	c.533G>A (p.Gly778Asp) de novo	Epilepsy without ID	
25	18 years, M	Epilepsy with myoclonic and atonic seizures	2 years, 2 m	NA	Seizure-free on VPA, 1 y seizure free with no medication, till seizures relapse at 5 years	Moderate ID, able to walk	Normal	Normal at 2 years, multifocal discharges at 6 years and 16 years	Normal at 7 years 3 months	PC 60 cm at 18 years Macrocephaly	c.917C>T (p.Ala306Val) de novo	Epilepsy with ID	

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Family no.	Age, sex	Epilepsy	Age at seizure onset	Initial symptoms	Seizure types	Development	Neurological examination	EEG	Brain MRI findings	Other	Genetic variant (protein consequence)	Phenotype	Reference
26	10 years, M	No	NA	NA	NA	Mild DD, ID, ASD	Mild dysmorphic signs, no microcephaly	NA	NA	Normal	c.3716A>G (p.His1239Arg) de novo	ID, ASD no epilepsy	
27	10 years, M	Myoclonic epilepsy	2 years	NA	Fabrilic seizures	Mild-moderate DD, ID, ASD, hypotonia	Walks with mild spasticity; increased tone and deep tendon reflexes in lower limbs, autistic behavior	Persisting generalised SW, poly-SW	Cerebellar atrophy, cervical syringomyelia at 8 years	Normal	c.4828C>T (p.Arg1610Trp) de novo	Epilepsy with ID	
28	19 years, M	FDS	At 17 m	NA	Seizures-free on PB	Moderate ID, ADHD	Normal	Focal spikes	Normal at 16 years	Normal OFC	c.6908_6916del (p.Asp2303_Leu2305del) de novo	Epilepsy with ID	
29	16 years, F	Focal seizures (left arm and head shaking)	15 years	NA	No further seizures	Mild DD, ID	Mild diffuse hypotonia, slowly progressive and severe cerebellar ataxia, wheelchair bound	Normal	Severe cerebellar atrophy at 13 years 9 months and 15 years 7 months	Normal OFC	Arr[19] x9,34,11 (131,349,701-131,354,531) x1 exon20-21 deletion p.[A8927_Lys1002del] de novo	Epilepsy with ID	
30	10 years, M	No epilepsy	NA	Prenatal: microcephaly, kidney disorders	NA	Severe ID, DD	Neonatal hypotonia, GER, feeding difficulties Dysmorphic features (microcephaly 49 cm (-3.2SD), bilateral ptosis) Aggressive behavior, perseverative behavior, static	Diffuse slowing without epileptic abnormalities	Small optic nerves	Congenital anomalies (left HN, right small kidney, bilateral cryptorchidism, fifth digit)	c.2950C>T (p.Arg984Ter) de novo	ID without epilepsy	Gartner et al. (2018)
31	7 years, M	No epilepsy	NA	NA	NA	Ataxia, Severe ID, DD, Severe LD (20 words), ADHD not specified	Feeding difficulties, hypotonia, oculokinetic nistagmus, speech dyspraxia and dysarthria, dysmetria	Poorly organised background rhythm, diffusely slow, no epileptiform discharges	23 m small pons and cerebellum with left cerebellar hemisphere smaller than the right At 7 years stable global cerebellar and pontine volume loss, stable left posterior fossa arachnoid cyst	Hypothyroidism Normal OFC	c.6690-17G>A (p.Arg6229_Thr2230 insdAluA1cHsArg)	ID-CS	

TABLE 1 (Continued)

Family no.	Age, sex	Epilepsy	Age at seizure onset	Initial symptoms	Seizure types	Development	Neurological examination	EEG	Brain MRI findings	Other	Genetic variant (protein consequence)	Phenotype	Reference
32	3 years, M	DEES			Polymerphic tonic semiology tonic spasm in extension, clonus of head and left limb	Normal	Normal	Poorly organized pattern, theta-delta band rhythms, followed by intermittent repetitions of sharps waves	Pontocephalic hypoplasia, corpus callosum atrophy and simplified cortical architecture	Lavngomalacia Low aptitude for swallowing gastrostomy	c.6923_6928dup (p.A>g2308_Met2309dup)	DEES	Rapacini et al. (2018)
33	13 years, F		20 m	3 tonic-clonic seizures during an acute gastroenteritis	Seizure-free	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal OFC	c.4846G>A (p.A>sp1616Asn)	Epilepsy without ID	Torrone et al. (2020)
34	8 years, M		4 months	Generalized seizures with tonic contraction of the trunk and rolling back of the eyes	Two episodes of TCGS with GEA	Impairment of expressive language	Normal	Burst of generalized slow waves and spike and waves during sleep	At 2y dilatation of Virchow-Robin perivascular spaces and enlargement of insular and frontal subarachnoid spaces	Normal OFC	c.4846G>A (p.A>sp1616Asn)	Epilepsy without ID	
35	39 years, F	IGE	5 months	Cluster of recurrent generalized tonic-clonic seizures without fever	Generalized seizures until 4 years	Mild ID (FSIQ 55)	Normal	Normal	Normal	Normal OFC	c.4846G>A (p.A>sp1616Asn)	Epilepsy with ID	

Note: Variant nomenclature based on GenBank NM\_001130438. The transcript of reference for variant was NM\_001130438.2. Abbreviations: AMI, acquired microcephaly; AC, atrophy of the cerebellum; CCA, agenesis corpus calloso; ADHD, attention-deficit/hyperactivity disorder; DD, developmental delay; DEES, developmental and epileptic encephalopathy; EDEE, early onset epileptic encephalopathy; ETP, epileptic potentials; F, female; FDS, focal dyscognitive seizures; FSIQ, Full-Scale Intelligence Quotient; GER, gastroesophageal reflux; GCS, generalized tonic-clonic seizures; HN, hydrocephalus; Hysp, hypsarrhythmia; ID, intellectual disability; IS, infantile spasms; ICE, idiopathic generalized epilepsy; IDCS, intellectual disability and cerebellar syndrome; male, M; LD, language delay; OFC, occipitofrontal head circumference; ONH, optic nerve hypoplasia; PB, phenobarbital; RCWM, reduction in central white matter; SH, severe hypomyelination; SQ, spastic quadriplegia; S-B, suppression-burst; TCC, thinned and shortened corpus callosum; WBQ, widespread brain atrophy.

TABLE 2 Pathogenic and likely pathogenic genetic variants in *SPTAN1* gene

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Variant	c.6908_6916del p.(Asp2303_Leu2305del)	c.6546_6556dup (p.Asn2186ArgfsTer82)	c.3292C>A (p.Arg1098Ser)
Genomic position (hg19)	chr9:131394540	chr9:131388927	chr9:131356530
Classification	Pathogenic	Likely pathogenic	Likely pathogenic
Inheritance	de novo	de novo	de novo
ACMG criteria	PS2, PP5, PM1, PM2, PP3	PS2, PM2, PP3	PS2, PM2, PP3
CADD	22.4	35	28.9
Reference	Syrbe et al. (2017)	Present work	Present work

Note: None of these variants are present in the gnomAD or in the 1000 genomes databases. Variant nomenclature based on GenBank: NM\_001130438.

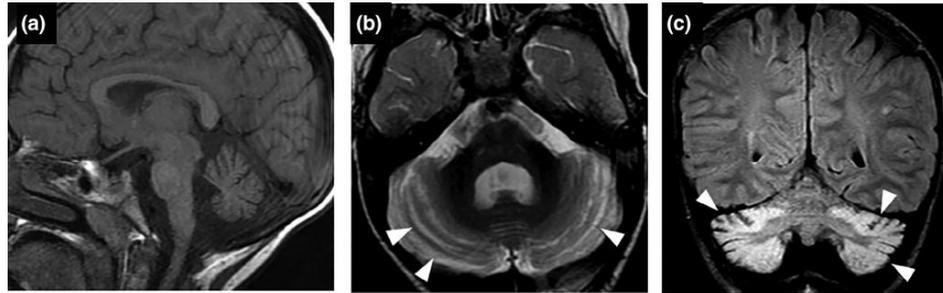


FIGURE 2 MRI images from patient 1. (a) Midsagittal T1WI demonstrating mild cerebellar vermian atrophy and severe cerebellar hemispheric atrophy. (b) Axial T2WI demonstrating abnormal fluid signal between cerebellar folia (arrowheads). (c) Coronal FLAIR showed bilateral and symmetrical cerebellar high signal associated (arrowheads). WI, weighted image

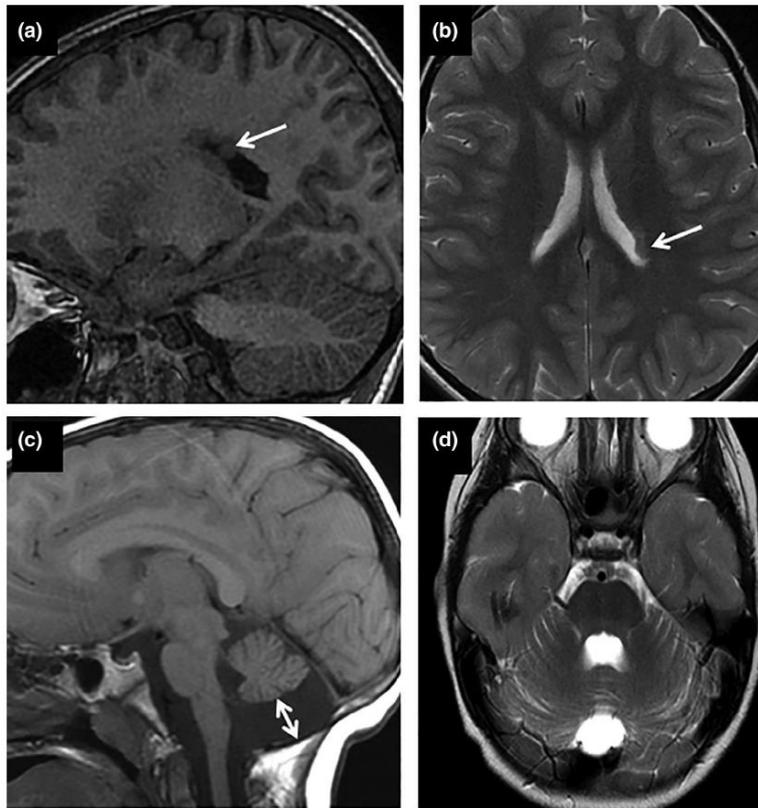
Week 40 with a weight of 3200 g. From the age of 9 months, he is under follow-up by pediatric neurology due to psychomotor retardation and later a diagnosis of autism spectrum disorder (ASD) was made in a moderate degree. In the first years of life, he presented a predominantly motor delay reaching gait at 30 months and problems with introduction of complementary feeding. The patient presents a severe language impairment, being able to say a few single words. Additionally, he presents dependence for all activities of daily life. The neurological examination highlights mild hypotonia, nonprogressive ataxia, and the presence of mild dysmorphic features such as a high forehead, bilateral clinodactyly of the fifth fingers, and elevator testes. The head circumference is normal. The MRI scan performed at 4 years of age revealed a discrete cerebellar atrophy (see Figure 3). The massive sequencing study revealed the presence of a de novo c.3292C>A variant, resulting in the substitution of the highly conserved arginine 1098 residue to a serine (p.Arg1098Ser), within the 10th spectrin repeat.

#### 4 | DISCUSSION

Patients with neurodevelopmental disorders, including those with epilepsy, may benefit from early genetic diagnosis that can save time and

overall cost by reducing the amount resources and time expended to reach a diagnosis (Lee, 2018). With the increased availability of genetic studies, especially the application of the mass sequencing study, many patients with neurodevelopmental disorders of varying degrees of severity will be etiologically diagnosed.

So far, few patients with pathogenic variants in *SPTAN1* gene have been published. For this reason, the spectrum of the associated clinical phenotype has not yet been fully delineated. In Table 1 we have collected most patients published to date with pathogenic variants in the *SPTAN1* gene associated to different neuropediatric conditions, including our three patients. In several of the publications the information is scarce, so we have had to exclude them from the analysis (Retterer et al., 2016; Yavarna et al., 2015). We have also decided to exclude those deletions at chromosomal region 9q34, affecting not only *SPTAN1*, but also other neighboring genes as *STXBP1* with neurodevelopmental implications (Aravindhan et al., 2018; Matsumoto et al., 2014; Saitsu et al., 2010). Because the *STXBP1* gene is involved in a broad spectrum of severe neurodevelopmental disorders, including epilepsy (Abramov et al., 2020; Deprez et al., 2010; Milh et al., 2011), haploinsufficiency of this gene (and possibly other neighboring genes) may affect the phenotype, masking the *SPTAN1* contribution. We have also excluded patients with pathogenic variations in *SPTAN1* with exclusive involvement of the peripheral nervous system



**FIGURE 3** MRI images from patients 2 and 3. (a) Sagittal T1WI and (b) axial T2WI demonstrating subependymal heterotopias in left atrium (white arrows). (c) Midsagittal T1WI and (d) transversal T2WI MRI images of patient 3 showed cystic posterior fossa appearance in midsagittal (double arrow) due to moderate cerebellar atrophy

(Beijer et al., 2019; Ylikallio et al., 2020), or putative recessive variants (Leveille et al., 2019).

So far, in the series we have collected from published patients along with our three new patients, 39.4% have a severe DEE5 phenotype (13/33). In order to outline the alternative forms of presentation that can be associated with pathogenic alterations in *SPTAN1*, the remaining patients were subdivided into various phenotypes (see Table 1). Altogether, 9% (3/33) of the patients have autism spectrum disorder (ASD). Other 9% (3/33) patients have a phenotype that can be described as intellectual disability with cerebellar syndrome (ID-CS), as they are patients with moderate or severe intellectual disability with tremor and ataxia. Twelve percent (4/33) have intellectual disability without epilepsy (ID without epilepsy). Twenty-one percent (7/33) have epilepsy with ID. And only 12.1% (4/33) have epilepsy without ID.

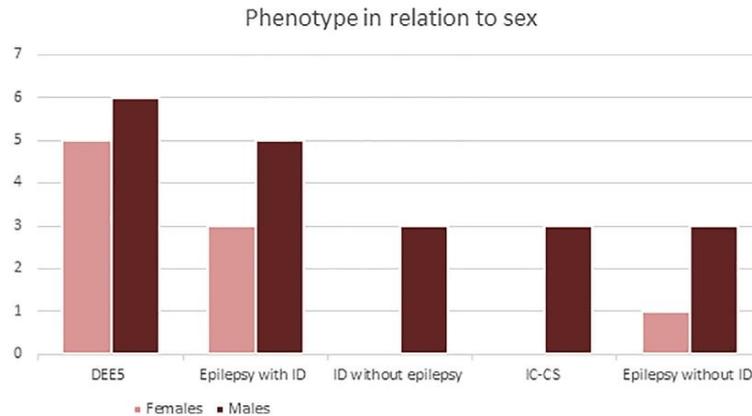
Accordingly, only 24% (8/33) of published patients do not associate any type of epilepsy, and 30% of the patients showed a mild phenotype with seizures starting after infancy, relatively good response to antiepileptic drugs and no risk of early death. It is however worth noting that patients 1 and 28 share the same mutation associated to different phenotypic consequences (ID-CS vs. epilepsy with ID), which suggests that other unknown factors may contribute to the phenotype.

Most of the severe cases are due to in-frame insertion/deletion mutations located in the last two  $\alpha$ II-spectrin repeats in the C-terminal region. As these repeats are required for  $\alpha$  $\beta$ -spectrin heterodimer association, this type of in-frame indels were proposed to cause instability and aggregation of spectrin scaffolds (Bennett & Baines, 2001).

However, the clinical impact of other types of mutations is far from clear. The distribution along the gene of the reported pathogenic

TABLE 3 Distribution of the different phenotypes depending on the location of the pathogenic variant

Domains	Type of mutation	Phenotype					
		DEE5	Epilepsy with ID	ID without epilepsy	ID-CS	Epilepsy without ID	ASD
Domains 1–19	Truncating		1	2		1	
	Missense	1	2	2	1	3	1
Domain 19 and 20	In-frame	10	2		2		
	Missense	1	1				
	Truncating					1	
Total		12	6	4	3	5	1

FIGURE 4 Distribution of the different phenotypes depending on the sex of the patient ( $n = 29$ , 9 females, 20 males)

or likely pathogenic variants can be seen in Figure 1. In Table 3 we have subclassified the patients based on the type of mutation and the domain where the variant is found. We have divided the gene into two sections, domains 1–18 and domains 19 and 20. About half of patients (14/31) present the mutation between domains 1–18, in general associated to less severe phenotypes, as only one of them presented DEE5. Furthermore, all the mutations described in these domains are missense (10/15) or truncating (4/15). Conversely, there is a clear predominance of in-frame indels among the patients with de novo mutations in domains 19 and 20 (14/16). The asymmetric distribution in terms of the number of reported variants may be due to a mutational hotspot in domains 19 and 20, but it is also possibly due to the fact that patients with milder phenotypes are less diagnosed or published.

Beijer et al. published the series of 12 individuals with juvenile onset hereditary motor neuropathy and demonstrated that their nonsense variants produced haploinsufficiency by means of NMD (nonsense-mediated RNA decay). Patients 2, 13, 16, and 30 also presented truncating variants, but associated to a different phenotype with central nervous system implications. It is conceivable that these variants,

instead of NMD, may have different consequences by giving rise to a truncated protein, which might lead to a dominant-negative effect, and would explain the different clinical expression.

We found that of the total of 29 patients of known sex, there is an excess of males (20/29) versus females (9/29), with a male/female ratio of 2.2 ( $p = 0.04$ ). Furthermore, by analyzing the distribution of the phenotypes by sex (Figure 4), instead of the rather homogeneous distribution observed in males, female patients show a clear preponderance of severe DEE5 (5/9), suggesting some deficit of female patients among the milder phenotypes ( $p = 0.018$ ). This difference between sexes may be due to the fact that patients with milder clinical phenotypes are in general not yet being genetically studied, and that this bias is greater in the case of female patients. It is however also possible that there are genetic and/or epigenetic factors in female patients that yield some level of neurological protection (Ho et al., 2018), although this sex-specific effect might be less evident when a severe mutation occurs. In any case, it must be taken into account that there are few patients diagnosed to date with neurodevelopmental disorders related to *SPTAN1*, therefore, it is difficult to draw conclusions and more studies are necessary in this regard.

It is important to highlight that one of our patients (patient 2), presented a subependymal heterotopic focus and epilepsy. As can be seen in Table 1, patient 22 also presented subependymal heterotopia with cerebellopontine atrophy and associated DEE5 clinical phenotype (Syrbe et al., 2017). Rapaccini also describes a patient, number 32, that presents simplified cortical architecture associated with cerebellar atrophy and DEE5 (Rapaccini et al., 2018). *SPTAN1* in some way may be a key factor in neuronal migration and may be a new cause of heterotopia to consider.

Patient 2 also had early-onset migraine symptoms. There is evidence of the physiopathogenic relationship between headache and epilepsy (Jancic et al., 2018). However, there are no publications that relate migraine to variants in *SPTAN1*. On the other hand, the prevalence of migraine is very high in the population, between 2.7 and 10%, depending on the study and the age range of the included subjects (Staurbe & Anderou, 2019). So, we consider that the migraine in this patient is probably unrelated with the *SPTAN1* variant.

The exhaustive analysis of patients with pathogenic variants in *SPTAN1* has increased the knowledge of the clinical spectrum related to this gene. Thus, here it is described for the first time that *SPTAN1* may be related to neuronal migration disorders. Furthermore, a varied clinical spectrum of milder phenotypes has been described, it should be noted that they are not always related to ID or to epilepsy. Although peripheral involvement has not been reported in most of these patients, we cannot rule out that axonal degeneration occurs later or even that peripheral involvement was unnoticed in some of the patients with very severe phenotypes. There is currently evidence to think that *SPTAN1* can cause alteration at the peripheral nervous system level and should be considered in new patients.

On the other hand, the differences found between both sexes make us wonder if the females are protected in some way, which would be a confounding factor when establishing the pathogenicity of those variants inherited from a healthy woman, which is usually considered as evidence of a benign impact.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III-Río Hortega (grant CM19/00181). A.C.L. is supported by a research grant by Fundación Mutua Madrileña. We warmly thank all the patients and their families for their involvement in this study.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Data acquisition:** Ana Victoria Marco Hernández and Francisco Martínez. **Analysis of cases:** Ana Victoria Marco Hernández, Miguel Tomás Vila, Alejandro Montoya Filardi, Alfonso Caro, Sandra Monfort, Beatriz Beseler Soto, Juan José Nieto-Barceló, and Francisco Martínez. **Conceptualization of study:** Ana Victoria Marco Hernández and Francisco Martínez. **Manuscript preparation:** Ana Victoria Marco Hernández and Francisco Martínez.

#### ORCID

Ana Victoria Marco Hernández  <https://orcid.org/0000-0002-6027-376X>

Alfonso Caro  <https://orcid.org/0000-0003-4187-2748>

Alejandro Montoya Filardi  <https://orcid.org/0000-0001-6489-3870>

Miguel Tomás Vila  <https://orcid.org/0000-0002-8632-3593>

Sandra Monfort  <https://orcid.org/0000-0003-2016-1410>

Juan José Nieto-Barceló  <https://orcid.org/0000-0002-4023-3111>

Francisco Martínez  <https://orcid.org/0000-0002-0589-2584>

#### REFERENCES

- Abramov, D., Guiberson, N. G. L., & Burre, J. (2020). STXPP1 encephalopathies: Clinical spectrum, disease mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Neurochemistry*, 157(2), 165–178. <https://doi.org/10.1111/jnc.15120>
- An, J. Y., Cristino, A. S., Zhao, Q., Edson, J., Williams, S. M., Ravine, D., Wray, J., Marshall, V. M., Hunt, A., Whitehouse, A. J., & Claudianos, C. (2014). Towards a molecular characterization of autism spectrum disorders: An exome sequencing and systems approach. *Translational Psychiatry*, 4(6), e394. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.38>
- Aravindhan, A., Shah, K., Pak, J., & Veerapardigan, A. (2018). Early-onset epileptic encephalopathy with myoclonia seizures related to 9q33.3-q34.11 deletion involving *STXBP1* and *SPTAN1* genes. *Epileptic Disorders*, 20(3), 214–218. <https://doi.org/10.1684/epd.2018.0969>
- Beijer, D., Deconinck, T., De Bleecker, J. L., Dotti, M. T., Malandrini, A., Urtizberea, J. A., Zulaica, M., Lopez de Munain, A., Asselberth, B., De Jonghe, P., & Baets, J. (2019). Nonsense mutations in alpha-II spectrin in three families with juvenile onset hereditary motor neuropathy. *Brain*, 142(9), 2605–2616. <https://doi.org/10.1093/brain/awz216>
- Bennett, V., & Baines, A. J. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: Metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiological Reviews*, 81, 1353–1359. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1353>
- Boeckers, T. M., Bockmann, J., Kreutz, M. R., & Gundelfinger, E. D. (2002). ProSAP/Shank proteins—A family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *Journal of Neurochemistry*, 81(5), 903–910. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00931.x>
- Campbell, I. M., Yatsenko, S. A., Hixson, P., Reimschieset, T., Thomas, M., Wilson, W., Dayal, U., Wheless, J.W., Crunk, A., Curry, C., Parkinson, N., Fishman, L., Riviello, J. J., Nowaczyk, M. J. M., Zeeman, S., Rosenfeld, J. A., Shaffer, L. G., & Scaglia, F. (2012). Novel 9q34.11 gene deletions encompassing combinations of four Mendelian disease genes: *STXBP1*, *SPTAN1*, *ENG*, and *TOR1A*. *Genetics in Medicine*, 14(10), 868–876. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.65>
- Deprez, L., Weckhuysen, S., Holmgren, P., Suls, A., Van Dyck, T., Goossens, D., Del-Favero, J., Jansen, A., Verhaert, K., Lagae, L., Jordanova, A., Van Coster, R., Yendle, S., Berkovic, S. F., Scheffer, I., Ceulemans, B., & De Jonghe, P. (2010). Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with *STXBP1* mutations. *Neurology*, 75(13), 1159–1165. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f4d7bf>
- Gartner, V., Markello, T. C., Macnamara, E., De Biase, A., Thurm, A., Joseph, L., Beggs, A., Schmahmann, J. D., Berry, G. T., Anselm, I., Boslet, E., Tiffit, C. J., Gahl, W. A., & Lee, P. R. (2018). Novel variants in *SPTAN1* without epilepsy: An expansion of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176A, 2768–2776. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40628>
- Gilissen, C., Hehir-Kwa, J. Y., Thung, D. T., van de Vorst, M., van Bon, B. W. M., Willemsen, M. H., Kwint, M., Janssen, I. M., Hoischen, A., Schenck, A., Leach, R., Klein, R., Tearle, R., Bo, T., Pfundt, R., Yntema, H. G., de Vries, B. B., Kleefstra, T., Brunner, H.

- G., & Veltman, J. A. (2014). Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*, 511(7509), 344–347. <https://doi.org/10.1038/nature13394>
- Hamdan, F. F., Saitu, H., Nishiyama, K., Gauthier, J., Dobrzeñicka, S., Spiegelman, D., Lacaille, J. C., Decarie, J. C., Matsumoto, N., Rouleau, G. A., & Michaud, J. L. (2012). Identification of a novel in-frame de novo mutation in *SPTAN1* in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. *European Journal of Human Genetics*, 20, 796–800. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.271>
- He, J., Zhou, R., Wu, Z., Carrasco, M. A., Kurshan, P. T., Farley, J. E., Simon, D. J., Wang, G., Han, B., Hao, J., Heller, E., Freeman, M. R., Shen, K., Maniatis, T., Tessier-Lavigne, M., & Zhuang, X. (2016). Prevalent presence of periodic actin-spectrin-based membrane skeleton in a broad range of neuronal cell types and animal species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 6029–6034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605707113>
- Ho, B., Greenlaw, K., Al Tuwaijri, A., Moussette, S., Martínez, F., Giorgio, E., Brusco, A., Ferrero, G. B., Linhares, N. D., Valadares, E. R., Svartman, M., Kalscheuer, V. M., Rodríguez Criado, G., Laprise, C., Greenwood, C. M. T., & Naumova, A. K. (2018). X chromosome dosage and presence of *SRY* shape sex-specific differences in DNA methylation at an autosomal region in human cells. *Biology of Sex Differences*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0169-7>
- Jancic, J., Djuric, V., Hencic, B., van den Anker, J. N., & Samardzic, J. (2018). Comorbidity of migraine and epilepsy in pediatrics: A review. *Journal of Child Neurology*, 33(12), 801–808. <https://doi.org/10.1177/0883073818788942>
- Lee, E. H. (2018). Epilepsy syndromes during the first year of life and the usefulness of an epilepsy gene panel. *Korean Journal of Pediatrics*, 61, 101–107. <https://doi.org/10.3345/kjp.2018.61.4.101>
- Leveille, E., Estiar, M. A., Krohn, L., Spiegelman, D., Dionne-Laporte, A., Dupré, N., Trempe, J. F., Rouleau, G. A., & Gan-Or, Z. (2019). *SPTAN1* variants as a potential cause for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *Journal of Human Genetics*, 64(11), 1145–1151. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0669-2>
- Martinez, F., Caro-Llopis, A., Rosello, M., Oltra, S., Mayo, S., Monfort, S., & Orellana, C. (2017). High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *Journal of Medical Genetics*, 54(2), 87–92. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103964>
- Matsumoto, H., Zaha, K., Nakamura, Y., Hayashi, A., Inazawa, J., & Nonoyama, S. (2014). Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations. *Pediatric Neurology*, 51(1), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.03.013>
- Milh, M., Villeneuve, N., Chouchane, M., Kaminska, A., Laroche, C., Barthez, M. A., Gitiaux, C., Bartoli, C., Borges-Correia, A., Cacciagli, P., Mignon-Ravix, C., Cuberos, H., Chabrol, B., & Villard, L. (2011). Epileptic and non epileptic features in patients with early onset epileptic encephalopathy and *STXBP1* mutations. *Epilepsia*, 52, 1828–1834. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03181.x>
- Nakano, M., Nogami, S., Sato, S., Terano, A., & Shirataki, H. (2001). Interaction of syntaxin with alpha-fodrin, a major component of the sub-membranous cytoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(2), 468–475. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5795>
- Nonada, Y., Saito, Y., Nagai, S., Sasaki, M., Iwasaki, T., Matsumoto, N., Ishii, M., & Saitu, H. (2013). Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to *SPTAN1* gene mutation. *Brain & Development*, 35, 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.05.002>
- Rapaccini, V., Esposito, S., Strinati, F., Allegretti, M., Manfroi, E., Miconi, F., Pitzianti, M., Prontera, P., Principi, N., & Pasini, A. (2018). A child with a c.6923\_6928dup (p.Arg2308\_Met2309dup) *SPTAN1* mutation associated with a severe early infantile epileptic encephalopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1976. <https://doi.org/10.3390/ijms19071976>
- Ream, M. A., & Mikati, M. A. (2014). Clinical utility of genetic testing in pediatric drug-resistant epilepsy: A pilot study. *Epilepsy & Behavior*, 37, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.06.018>
- Retterer, K., Juusola, J., Cho, M. T., Vitazka, P., Millan, F., Gibellini, F., Vertino-Bell, A., Smaoui, N., Neidich, J., Monaghan, K., McKnight, D., Bai, R., Suchy, S., Friedman, B., Tahillani, J., Pineda-Alvarez, D., Richard, G., Brandt, T., Haverfield, E., & Bale, S. (2016). Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genetics in Medicine*, 18(7), 696–704. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.148>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015). 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. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Saitu, H., Tohyama, J., Kumada, T., Egawa, K., Hamada, K., Okada, I., Mizuguchi, T., Osaka, H., Miyata, R., Furukawa, T., Haginoya, K., Hoshino, H., Goto, T., Hachiya, Y., Yamagata, T., Saitoh, S., Nagai, T., Nishiyama, K., Nishimura, A., & Matsumoto, N. (2010). Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause west syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *American Journal of Human Genetics*, 86, 881–891. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.013>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies position paper of the ILAE commission for classification and terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Staurbe, A., & Anderou, A. (2019). Primary headaches during lifespan. *Journal of Headache and Pain*, 20(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-0985-0>
- Stavropoulos, D. J., Merico, D., Jobling, R., Bowdin, S., Monfared, N., Thiruvahindrapuram, B., Nalpathamkalam, T., Pellicchia, G., Yuen, R. K. C., Szego, M. J., Hayeems, R. Z., Zlotnik Shaul, R., Brudno, M., Girdea, M., Frey, B., Alipanahi, B., Ahmed, S., Babul-Hirji, R., Badilla-Porras, R., & Marshall, C. R. (2016). Whole-genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in paediatric medicine. *NPJ Genomic Medicine*, 13(1), 15012. <https://doi.org/10.1038/npjgenmed.2015.12>
- Syrbe, S., Harms, F. L., Parrini, E., Montomoli, M., Mutze, U., Helbig, K. L., Polster, T., Albrecht, B., Bembeck, U., van Binsbergen, E., Biskup, S., Burglen, L., Derecke, J., Heron, B., O'Heyne, H., Hoffmann, G. F., Homemann, F., Matsushige, T., Matsuura, R., & Guerrini, R. (2017). Delineating *SPTAN1* associated phenotypes: From isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy. *Brain: A Journal of Neurology*, 140, 2322–2336. <https://doi.org/10.1093/brain/awx195>
- Terrone, G., Pinelli, M., Bernardo, P., Parrini, E., Imperati, F., Brunetti-Pierri, N., & Giudice, E. D. (2020). Intrafamilial variability in *SPTAN1*-related disorder: From benign convulsions with mild gastroenteritis to developmental encephalopathy. *European Journal of Paediatric Neurology*, 28, 237–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.07.008>
- Tohyama, J., Akasaka, N., Osaka, H., Maegaki, Y., Kato, M., Saito, N., Yamashita, S., & Ohno, K. (2008). Early onset West syndrome with cerebral hypomyelination and reduced cerebral white matter. *Brain & Development*, 30, 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2007.10.006>
- Tohyama, J., Nakashima, M., Nabatame, S., Gaik-Siew, C., Miyata, R., Rener-Primec, Z., Kato, M., Matsumoto, N., & Saitu, H. (2015). *SPTAN1* encephalopathy: distinct phenotypes and genotypes. *Journal of Human Genetics*, 60(4), 167–173. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.5>

- Voas, M. G., Lyons, D. A., Nyalor, S. G., Arana, N., Rasband, M. N., & Talbot, W. S. (2007).  $\alpha$ -Spectrin is essential for assembly of the nodes of Ranvier in myelinated axons. *Current Biology*, 17, 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.071>
- Wang, Y., Ji, T., Nelson, A. D., Glanowska, K., Murphy, G. G., Jenkins, P. M., & Parent, J. M. (2018). Critical roles of  $\alpha$ 1 spectrin in brain development and epileptic encephalopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 128(2), 760–773. <https://doi.org/10.1172/JCI95743>
- Weigand, J. E., Boeckel, J. N., Gellert, P., & Dimmeler, S. (2012). Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One*, 7(8), e42697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042697>
- Writzl, K., Primec, Z. R., Strazisar, B. G., Osredkar, D., Pecaric-Meglic, N., Kranjc, B. S., Nishiyama, K., Matsumoto, N., & Saitsu, H. (2012). Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with *SPTAN1* mutation. *Epilepsia*, 53(6), e106–e110. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03437.x>
- Yavarna, T., Al-Dewik, N., Al-Mureikhi, M., Ali, R., Al-Mesairfi, F., Mahmoud, L., Shabeck, N., Lakhani, S., AlMulla, M., Nawaz, Z., Vitazka, P., Alkuraya, F.S., & Ben-Omran, T. (2015). High diagnostic yield of clinical exome sequencing in middle eastern patients with Mendelian disorders. *Human Genetics*, 134(9), 967–980. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1575-0>
- Ylikallo, E., Ritari, N., Sainio, M., Toppila, J., Kivirikko, S., Tyynismaa, H., Auranen, M., & Isohanni, P. (2020). De novo *SPTAN1* mutation in axonal sensorimotor neuropathy and developmental disorder. *Brain*, 143(12), e104. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa344>

**How to cite this article:** Marco Hernández, A. V., Caro, A., Montoya Filardi, A., Tomás Vila, M., Monfort, S., Beseler Soto, B., Nieto-Barceló, J. J., & Martínez, F. (2021). Extending the clinical phenotype of *SPTAN1*: From DEE5 to migraine, epilepsy, and subependymal heterotopias without intellectual disability. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62507>

En este segundo trabajo del capítulo de Fenotipos Atípicos publicamos la serie de pacientes con variantes patogénicas en el gen *SCN1A* con el objetivo de describir una extensión del fenotipo relacionado con *SCN1A* descrito hasta ahora.

**Marco-Hernández AV, Caro A, Rubio-Sánchez P, Martínez-Martínez JC, Tomás Vila M, Monfort S, Martínez, F. Extending the phenotype related to *SCN1A* gene: Arthrogryposis, movements disorder and malformations of cortical development. *Journal of Child Neurology*. 2022. doi: 10.1177/08830738211072694.**

**Objetivo:** Ampliar el conocimiento sobre los fenotipos clínicos asociados a variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el gen *SCN1A*.

**Métodos:** El estudio se realizó en 15 pacientes con variantes en el gen *SCN1A*. Se evaluó el fenotipo completo de la serie de pacientes. Se realizó una búsqueda sistemática en la literatura científica de aquellos síntomas inesperados.

**Resultados:** Diez pacientes mostraron una variante de cambio de aminoácido, mientras que el resto mostró diferentes variantes de pérdida de función. Doce (80%) tenían síndrome de Dravet. Dos (13,3%) tenían Epilepsia con convulsiones febriles plus. Tres (20%) presentaron un fenotipo atípico. Uno de ellos era una encefalopatía epiléptica y del desarrollo con artrogriposis, otro un síndrome de Dravet con trastorno del movimiento asociado y por último un paciente con síndrome de Dravet y malformaciones del desarrollo cortical.

**Conclusión:** La evaluación exhaustiva de pacientes con alteraciones patogénicas detectadas en secuenciación masiva nos puede ayudar a ampliar el fenotipo, comprender la etiopatogenia asociada a cada anomalía genética, y así mejorar el pronóstico y el manejo de futuros pacientes.

# Extending the Phenotype Related to *SCN1A* Gene: Arthrogryposis, Movement Disorders, and Malformations of Cortical Development

Ana Victoria Marco-Hernández, MD<sup>1</sup> ,  
Alfonso Caro-Llopis, PhD student<sup>2</sup>, Pilar Rubio Sánchez, MD<sup>3</sup>,  
Juan Carlos Martínez Martínez, MD<sup>4</sup>, Miguel Tomás Vila, MD, PhD<sup>1</sup>,  
Sandra Monfort, PhD<sup>2</sup>, and Francisco Martínez, PhD<sup>2</sup>

Journal of Child Neurology  
1-11  
© The Author(s) 2022  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/088320738211072694  
journals.sagepub.com/home/jcn  


## Abstract

**Background:** Expand the knowledge about the clinical phenotypes associated with pathogenic or likely pathogenic variants in the *SCN1A* gene. **Methods:** The study was carried out in 15 patients with *SCN1A* variants. The complete phenotype of the patients was evaluated. A systematic search was carried out in the scientific literature for those unexpected symptoms. **Results:** Ten patients showed a missense variant, whereas the remaining showed different loss-of-function variants. Twelve (80%) had Dravet syndrome. Two (13.3%) had Epilepsy with febrile seizures plus. Three (20%) presented an atypical phenotype. One of them was developmental and epileptic encephalopathy with arthrogryposis, the other Dravet syndrome and movement disorder, and lastly one patient had Dravet syndrome and malformations of the cortical development. **Conclusion:** The exhaustive assessment of patients with pathogenic alterations detected in massive sequencing can help us to expand the phenotype, understand the etiopathogenesis associated with each genetic abnormality, and thus improve the prognosis and management of future patients.

## Keywords

arthrogryposis, Developmental and Epileptic Encephalopathy, Dravet syndrome, movement disorder, *SCN1A*

Date received: 2 September 2021; revised: 30 November 2021; accepted: 19 December 2021.

## Introduction

*SCN1A* gene encodes the alpha 1 subunit of the sodium channel, Nav1.1, an important protein that makes up the voltage-dependent sodium channels, which are responsible for the generation and propagation of the action potential. Pathogenic variants cause a reduction in sodium currents in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-ergic inhibitory interneurons, leading to hyperexcitability of neuronal network and the appearance of seizures.<sup>1-3</sup> These reduced sodium currents, further deteriorate Purkinje cells,<sup>1,4,5</sup> causing motor disorders and contributing to the development of cognitive disabilities and behavioral problems.<sup>1,6</sup> *SCN1A* is associated with several epilepsy syndromes and a range of other diseases.<sup>7,8</sup> The most common is Dravet syndrome, but it is also associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus, familial hemiplegic migraine, autism spectrum disorder, epilepsy of infancy with migrating focal seizures, and very rarely involved in infantile spasms.<sup>8-11</sup>

The association of *SCN1A* pathogenic variants with multiple syndromes can be partly explained by the consequences of different variant types: pathogenic variants that lead to a complete

loss of function of the channel are virtually always associated with severe phenotypes, whereas milder impairments in channel function usually cause milder phenotypes.<sup>7,12</sup> However, in clinical practice, it remains difficult to fully predict the effects of all variants on channel function.

The early-onset epileptic encephalopathy, profound developmental delay, and hyperkinetic movement disorder has been recently described, mainly in association with the missense variant p.Thr226Met.<sup>13-15</sup> Recently, Jaber et al published

<sup>1</sup>Neuropediatric Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Genetics Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Neurophysiology Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Radiology Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

## Corresponding Author:

Ana Victoria Marco-Hernández, Neuropediatric Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Av. Fernando Abril Martorell, 106, Valencia 46026, Valencia, Spain.

Email: marco\_anaher@gva.es

an original research reporting 3 patients with arthrogryposis multiplex congenita (AMC) in relation to other missense variants of *SCN1A*.<sup>16</sup> On the other hand, Spagnoli et al published a case with symptoms of early epileptic encephalopathy, arthrogryposis, and hyperkinetic movement disorder categorized as hyperekplexia.<sup>14</sup>

Our hypothesis is that new phenotypes not previously described are appearing with the widespread use of whole-exome sequencing and other massively parallel sequencing techniques.

## Methods

### Participants

The study was carried out in patients affected by *SCN1A*-related seizures. Fifteen families were recruited for inclusion, with 1 family member diagnosed with *SCN1A*-related seizures. The patients came from a total of 331 patients with epilepsy of onset in the early childhood and genetic study performed in our center. A brief clinical description of this cohort can be seen in Table 1.

This study was approved by the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). Informed consent was obtained from the parents of all participants.

### Clinical Features of Case Series

Detailed clinical data were retrospectively collected from medical records of all participants, and a semistructured interview was conducted when possible at the time of inclusion (n = 9), and when it was not possible, a semistructured telephone interview was conducted (n = 6). An extensive physical examination with systematized data collection, somatometry and collection of a photograph of the face was performed in the patients who attended the consultation when the families gave their consent. All patients were evaluated by the same neuropediatrician (AVMH), and interviews were conducted with parents of patients. The Human Phenotypes Ontology (HPO) terms were used for the phenotypic description of the patients. Parents of patients were asked about all previous medical history; also, the kind of education the participants were following or had followed, and whether they had any learning problems or psychological issues themselves. They were also asked whether their children showed any behavioral problems or sleep disturbances. The same information was extracted from medical files.

Cognitive functioning at the time of inclusion was classified in a consensus meeting by a neuropediatrician, and clinical geneticist and rated on a 5-point scale based on available data on Intelligence Quotient (IQ) and developmental level: normal when there is no intellectual disability (IQ or Developmental Quotient [DQ] >80), mild intellectual disability (IQ or DQ 50-80), moderate intellectual disability (IQ or DQ 30-49), severe or profound intellectual disability (IQ or DQ <30). When no recent IQ or DQ score was available, the

assessment was made based on school functioning, communication, adaptive behavior, and/or autonomy capacity.

We have assessed the presence of autism spectrum disorder following the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*, and differentiating the autism spectrum disorder level to degrees 1 to 3.

It was asked and clinically examined about the presence of motor disorders, including ataxia, tremor, tics, stereotypes, or presence of other movement disorders. All participants were categorized into the different *SCN1A*-related phenotypes: Dravet syndrome, myoclonic-atonic epilepsy, epilepsy of infancy with migrating focal seizures, early-onset developmental and epileptic encephalopathy, generalized epilepsy with and febrile seizures plus, autism spectrum disorder and hemiplegic migraine. The different *SCN1A*-related phenotypes were diagnosed based on previously published criteria.<sup>17-20</sup> The types of seizures that the patient presented throughout their lives and the medications they have taken as well as the current medication were collected. The types of seizures included atypical absences, focal seizures, myoclonias, hemiclonic seizures, generalized tonic-clonic seizures, and status epilepticus.

All patients had at least one magnetic resonance imaging (MRI), and this was systematically reviewed by an experienced pediatric neuroradiologist.

### Case Definition

Only symptomatic participants with heterozygous pathogenic or likely pathogenic variants detected between January 2017 and December 2020, according to the American College of Medical Genetics and Genomics criteria,<sup>21</sup> in *SCN1A* gene were included.

### Supplementary Methods

Peripheral blood samples from individuals and their parents were collected by standard methods for the genetic studies. Genomic DNA was isolated using the Qiacube extractor (Qiagen). DNA purity and concentration were measured using the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen), respectively.

Massive parallel sequencing for exome sequencing was performed by using one of the following: SureSelect Clinical Research Exome (Agilent Technologies), the commercial clinical exome SureSelect Focused Exome, or its update CCP17 (Agilent Technologies). The libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 following the manufacturer's protocol to get a minimum reading depth of 100X. Sequence read alignments, variant detection, and annotation were performed in *Alyssa Interpret* platform (Agilent Technologies). All disease-causing genes related with epilepsy and/or neurodevelopmental disorders described in different databases were analyzed. To evaluate the clinical impact and to assess the pathogenicity of variants in exome sequencing, we applied the previously described criteria.<sup>22</sup> All clinically relevant genetic variants detected were confirmed by Sanger sequencing from purified

**Table 1.** Clinical Information on 15 Patients with Pathogenic or Likely Pathogenic SCN1A Variants.

	Patient 1 (M, 16 mo)	Patient 2 (F, 18 y)	Patient 3 (F, 4 y)	Patient 4 (F, 9 y)	Patient 5 (F, 6 y)	Patient 6 (M, 4 y)	Patient 7 (F, 11 y)	Patient 8 (F, 2 y)
Variant	c.2853_2857delGTGGA p.Glu951Asp <sup>6</sup> 44	c.5341T>A p.Tyr1781Asn	c.4305_4308delGGAT p.Met1435Ile <sup>2</sup>	c.5383G>A p.Glu1795Lys	c.2345C>T p.Thr782Ile	c.2728C>A p.Gln910Lys	c.2589+3A>T	c.1461dupT p.Lys488Ter
Classification	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Likely pathogenic	Pathogenic	Likely pathogenic	Likely pathogenic	Pathogenic
Inheritance	n.d.	De novo (mosaicism 30%)	n.d.	Inherited from mother	De novo	n.d.	n.d.	De novo
ACMG criteria	PVS1, PM2, PP3	PS2, PM1, PM2, PMS, PP2, PP3	PVS1, PM2, PP3	PM1, PM2, PP2, PP3, PPS	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	PM2, PMS, PP2, PP3, PPS	PS1, PP5, PM2	PVS1, PM2, PP3
CADD	33	28.4	34	30	26.9	26.9	25.1	32
Reported (reference) / novel	Novel	Novel; similar mutations reported at this position: (p.Tyr1781His)(34); (p.Tyr1781Cys)(35)	Novel	(36)	Novel	(37)	(38)	Novel
Prenatal history	IVF	Normal	Normal	Normal	Normal	Oligoamniotic Chorionicionitis	IVF	Normal
Perinatal history	Fetal choroid plexus cysts HP-0011426	Normal	Normal	Normal	Neonatal asphyxia HP-0012768	Meningitis streptococci	Normal	Normal
Age at seizure onset	Maternal preeclampsia HP-0100602	6 mo	5 mo	15 mo	20 d	5.5 mo	4 mo	3 mo
Seizure type at onset	4 mo	GTCS	PSGS	GTCS	AS	GTCS	GTCS	HS
Seizure types	HP-0007359	GTCS	HP-0007359	GTCS	HP-0032807	GTCS	GTCS	GTCS, HS, AAS, SE
Seizure triggers	GTCS, AAS, PS, SE	GTCS	PS, CTCS, PSGS, MS, SE	GTCS	GTCS, AAS, SE	GTCS, AAS, MS, PS, SE	GTCS, PS, AAS, SE	GTCS, HS, AAS, SE
Medication trials	Fever	Fever, viriasis, hot	Fever	Fever	Fever	Fever	Fever, hot, vaccination	Vaccination, fever, ambient heat
Additional clinical features	VPA, CBZ, ZNS, LEV	VPA, TPM, AZT, LCM	STP, VPA, CBZ	LEV	ZNS, CBZ, GCC, LCM	VPA, STP, TPM, CBZ, LEV, CBZ	VPA, ETO, PER, LEV, CBZ, FTN	VPA, CBZ, LEV, FTN
Intellectual disability	Macroomia (HP-0001520)	Headache HP-0002315	Malnutrition HP-0004395	Abnormal thumb morphology HP-0001172	AMC HP-0002804	Patent foramen ovale HP-0001537	Patent foramen ovale HP-0001655	
Type of movement disorder/Neurologic examination	pyelic ectasia HP-0000069	Dysmenorrhea HP-0100607	HP-00001251	ID mild HP-0001256	Unilateral hernia HP-0001537	Pulmonary stenosis HP-0001642		
Language disturbance	leukemoid reaction HP-0001974	HP-0100607	HP-0001251	HP-0001256	HP-0001537	HP-0001642		
Normal (1 y old)	ID mild HP-0001256	ID mild HP-0001256	ID mild HP-0001251	ID mild HP-0001256	ID profound HP-000218	ID profound HP-0002187	ID mild HP-0001256	Mild psychomotor retardation
Hypermotoricity with continuous movements MMSS and MPPII, tongue movement, gurtural movements and axial hypotonia	HP-0001252	HP-0001252	Ataxia HP-0001251	Action tremor HP-0002345	CP HP-0100021	Ataxia HP-0001251	Ataxia HP-0001251	0
Delay	HP-0001252	HP-0001252	Hypotonia HP-0001252	Mild delay	Absence	Absence	Mild delay	Mild Delay

(continued)

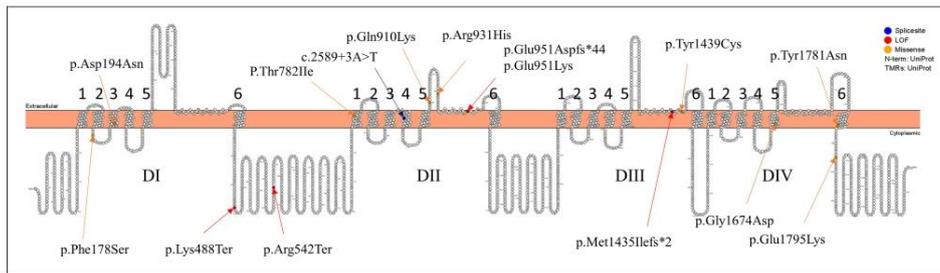
	Patient 1 (M, 16 mo)	Patient 2 (F, 18 y)	Patient 3 (F, 4 y)	Patient 4 (F, 9 y)	Patient 5 (F, 6 y)	Patient 6 (M, 4 y)	Patient 7 (F, 11 y)	Patient 8 (F, 2 y)
Behavior disorder	Irritability HP:000737	0	Abnormal temper tantrums HP:0025160	0	0	0	Abnormal temper tantrums HP:0025160	0
Sleep disorder	Awakenings HP:0031355	0	Hypersomnia HP:0100786 Sleep onset insomnia HP:0031354	0	0	0	0	0
Negative genetic investigations	Not done	PCDH19 Sanger sequencing	Not done	Not done	CGH array normal	CGH array normal	CGH array normal	Not done
Negative metabolic investigation	Not done	Not done	Normal	Not done	Normal	Normal	Normal	Not done
Brain MRI	Ventriculomegaly without signs of overpressure HP:002119	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Phenotype	DS movement disorder with hyperkinesia	DS	DS	GEFS+	DEE arthrogryposis	DS	DS	DS
	Patient 9 (F, 22 y)	Patient 10 (M, 14 y)	Patient 11 (F, 6 y)	Patient 12 (F, 2 y)	Patient 13 (M, 2 y)	Patient 14 (M, 14 y)	Patient 15 (M, 13 y)	
Pathogenic variant	c.1624C>T p.Arg542Ter	c.2792G>A p.Arg931His	c.5021G>A p.Gly1674Asp	c.4316A>G p.Tyr1439Cys	c.580G>A p.Asp194Asn	c.2851G>A p.Glu951Lys	c.533T>C p.Phe178Ser	
Classification	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Likely pathogenic	Pathogenic	
Inheritance	n.d.	De novo	De novo	De novo	n.d.	n.d.	n.d.	
ACMG criteria	PS1, PP5, PM2, PP3	PS2, PP5, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	PS2, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	PS2, PM1, PM2, PP2, PP3	PP5, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	PM1, PM2, PP2, PP3	PS1, PM1, PM2, PP3	
CADD	32	31	27.7	26.1	29.2	29.6	28.7	
Reported (reference) / novel	(34)	(22)	Novel. Similar mutations reported at this position: (p.Gly1674Ser) (39); (p.Gly1674Arg) (40)	ClinVar (classified as variant of uncertain significance)	(41)	Novel	(42)	
Prenatal history	Threat of abortion	Normal	Smoker	IVF egg donation	Smoker	Maternal diabetes HP:0009800	Nuchal fold increase first trimester HP:0000474	
Perinatal history	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Admission to I6d for mild acute gastroenteritis 4 months	AMF	
Age at seizure onset	6 mo	7 mo	9 mo	7 months	7 months	4 months	2 months	
Seizure type at onset	HS	HS	GTCS	GTCS	GTCS	GTCS	GTCS	
Seizure types	GTCS, HS, SE	GTCS, PS, SE	GTCS, AAS, ASC, SE	HS, CTCS, SE	GTCS	PS, GTCS, SE	GTCS, PS, SE	
Seizure triggers	Vaccination, fever	Fever, stress, sport	Fever	Vaccination, fever	Fever	Fever	Fever, infections	

(continued)

**Table 1. (continued)**

	Patient 9 (F, 22 y)	Patient 10 (M, 14 y)	Patient 11 (F, 6 y)	Patient 12 (F, 2 y)	Patient 13 (M, 2 y)	Patient 14 (M, 14 y)	Patient 15 (M, 13 y)
Medication trials	STP, LEV, LMT, ZNS, OXC, CBZ, CNZ, LCM	LCM, OXC, LMT, ZNG, CBZ	LEV, VPA, LCM, PER, TPM	LEV, VPA, TPM, BRV	VPA	VPA, OXC, TOMP, ZNS, CNZ, STP, LMT, LEV, FB	VPA, CBZ
Additional clinical features	Scoliosis HP: 0002650 Valgus feet, hypercholesterolemia, menstrual disturbance	Cryptorchidism, scoliosis HP:0002650, Reflux vesicoureteral	No	No	No	Scoliosis HP: 0002650	Scoliosis HP: 0002650
Intellectual disability	ID severe	ID moderate	ID mild-moderate	Normal	Normal	ID severe-profound	Flat feet HP: 0001763 ID mild- moderate
Type of movement disorder / neurologic examination	Ataxia, tremor, stereotypies	Ataxia, stereotypies	No	Tremor, mild ataxia	No	Ataxia, CP GMF2 to 3	Ataxia, motor clumsiness and poor balance
Language disturbance	Severe delay	Moderate delay	Normal	Normal	Normal	Absence	Normal
Behavior disorder	Self-harm	Aggressiveness	No	Hyperactivity	No	No	Nervousness, hyperactivity
Sleep disorder	Insomnias, awakenings	Insomnias, awakenings	No	Insomnias, awakening	Insomnias, awakenings	No	No
Negative genetic investigations	Not done	Fragile-X	Not done	Not done	Not done	Normal karyotype	Normal Karyotype
Negative metabolic investigation	Not done	Not done	Normal	Not done	Not done	Normal	Not done
Brain MRI	Normal	Alteration of hippocampal morphology, band heterotopias, suspected polymicrogyria	Normal	Normal	Normal	Normal	normal
Phenotype	DS	DS	DS	DS	GEFS+	DS	DS

Abbreviations: AAS, atypical absence seizure; AMC, arthrogryposis multiplex congenita; AMF, aspiration of meconium fluid; AS, apnea seizures; ASC, altered state of consciousness; AZT, acetazolamide; BRV, brivaracetam; CBZ, clobazam; CNZ, clonazepam; CP, cerebral palsy; DEE, developmental and epileptic encephalopathy; DS, Dravet syndrome; ETO, ethosuximide; FB, phenobarbital; FTN, phenytoin; GCC, glucocorticoids; GEFS+, genetic epilepsy with febrile seizures plus; GTCS, generalized tonic-clonic seizure; GTS, Generalized tonic seizures; HS, hemoclonic status; ID, intellectual disability; IVF, in vitro fertilization; LCM, lacosamide; LEV, levetiracetam; LMT, lamotrigine; LMT, lamotrigine; MRI, magnetic resonance imaging; MS, myoclonic seizures; OXC, oxcarbazepine; PER, perampanel; PS, partial seizure; PSGS partial secondary generalized seizure; SE, status epilepticus; STP, stripentol; TPM, topiramate; VPA, valproate; ZNS, zonisamide.



**Figure 1.** Graphic view of the *SCN1A* protein (alpha unit of the neuronal voltage-gated sodium channel Nav1.1). The location of each of the variants found in our patients has been marked. *SCN1A* is made up of 4 domains (DI-DIV). Each domain is made up of 6 segments (S1-S6). S4 is the positively charged voltage sensor of the protein and S5 and S6 form the channel pore. The domains are linked to each other by intracellular loops.

polymerase chain reaction (PCR) products. All primers for amplification and sequencing were designed with exon-primer (primers and PCR conditions are available on request). Figure 1.

## Results

A total of 15 patients with heterozygous pathogenic or likely pathogenic variants in *SCN1A* gene were included. Genetically, 10 patients showed a missense variant, whereas the remaining patients showed different loss-of-function variants: 3 frameshifts, 1 stop codon, and 1 splice site variant. Only 1 of the missense variants was overtly in somatic mosaicism (patient number 2), in a patient with typical Dravet syndrome-compatible phenotype (see Table 1).

The mean age at the time of recruitment was 9.35 years, median age was 6 years (interquartile range=2-14). Regarding sex, 9 patients were females (60%) and 6 (40%) were males. The mean age at the beginning of the seizures was 5.5 months (range 20 days to 15 months) and the median were 5½ months. Eleven patients (73.4%) showed intellectual disability, of which 36% were mild, 27% moderate, and 36% in the severe-profound range. In the remaining 4 patients, the degree of intellectual disability could not be determined owing to their young age, but one of them had moderate developmental delay, another mild developmental delay, and the other 2 had normal psychomotor development.

Twelve of these patients (80%) were framed within the Dravet syndrome, 2 were generalized epilepsy with febrile seizures plus, 1 was a developmental and epileptic encephalopathy with arthrogryposis. On the other hand, we detected rare phenotypic traits associated with *SCN1A* in 3 of our patients.

Patient 5 is a 6-year-old girl born to healthy consanguineous parents. During pregnancy, no antenatal problems were detected except breech position. During delivery, she presented with severe acute fetal distress, with an Apgar score of 1/6/9, which required admission to our hospital. Arthrogryposis was detected at birth with bilateral dislocation of both hips that

were nonreducible and dislocation of both knees and right elbow (Supplemental Figure 1). During the first days of life, the patient presented with episodes of great irritability with hypertonia and facial redness triggered by tactile stimuli. A video electroencephalogram (EEG) was performed during abnormal movements in which no epileptiform correlate was detected in the tracing.

At 20 days of life, she started to have epileptic seizures that required admission. The seizures initially consisted of episodes of central apnea and sucking movements with an electroencephalographic epileptic correlate (Figure 2). She has occasionally presented an EEG recording compatible with a continuous wave tip (Supplemental Figure 2) and has required treatment with corticosteroids. Currently, the patient is 6 years old and presents with severe epileptic encephalopathy and profound intellectual disability without language. Her epilepsy is pharmacoresistant and severe, with multiple seizure types (atypical absences and bilateral tonic seizures). She has no capacity for ambulation, and no purposeful movement of her hands.

In next-generation sequencing (NGS) a de novo variant was detected in *SCN1A* (c.2312C>T), classified as likely pathogenic. The variant modifies a highly conserved amino acid (p.Thr782Ile) of the transmembrane segment S1 in the second domain; however, it is absent from Genome Aggregation Database v2.1.1 and predicted to be deleterious by all the in silico prediction tools employed. Given the consanguinity antecedents, an exhaustive examination of all the homozygous genetic variants failed to show any potential pathogenic variant.

The second patient to highlight is patient 1, a child born to healthy nonconsanguineous parents by in vitro fertilization. It was a twin pregnancy, which ended with an urgent cesarean at week 36 of pregnancy due to mild preeclampsia. Birth weight was 2650 g, and the perinatal period was without incident. Admission occurred in the fourth month of life for presenting with focal seizures in the context of an infection. Brain MRI and EEG were normal at baseline. Initially, valproic acid was prescribed. He was readmitted a few days after discharge, because of the restart of focal seizures associated with



**Figure 2.** Record made at 1 month of life (patient 5) during a seizure clinically characterized by onset with hypopnea followed by generalized rigidity. (A) Electroencephalographic correlate, recruiting at a rapid rate at 9 Hz starting in left posterior areas. (B) At 25 seconds, generalization to the contralateral hemisphere. (C) Increase in amplitude and decrease in frequency. (D) Termination with a depression of activity. Total duration of 1 minute 43 seconds.

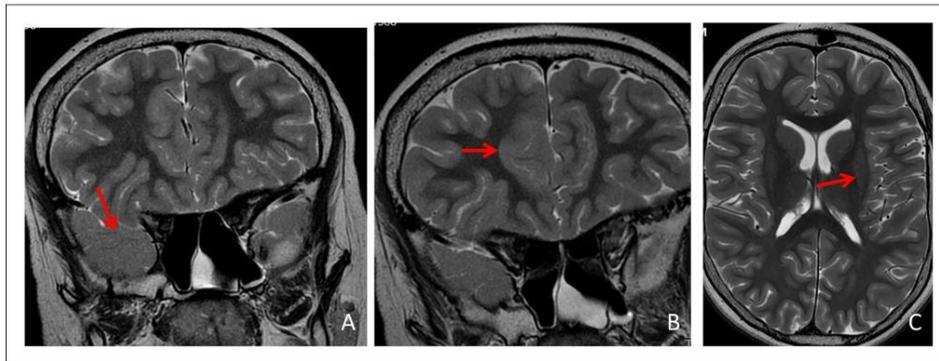
generalized seizures. After examination at 6 months, psychomotor development was normal, but some episodes of hyperkinesis were observed with rapid stereotyped movements of lateralization of the head to both sides and extension and flexion of the neck that associated stereotyped jerks of the 4 extremities. The episodes usually last up to several minutes, presented in clusters, with normality between them. Episodes of hyperkinesis preceded epileptic decompensations. During the hyperkinetic movements and hand stereotypies, video EEG recording revealed no changes in brain electrical activity (see Video).

The last patient to disclose (patient 10) is a child born to healthy nonconsanguineous parents after a normal pregnancy and an uneventful full-term cesarean delivery weighing 3200 g. The seizures began at 7 months of age in the context of an uncomplicated febrile infection. Psychomotor development at that time was normal. He is currently 14 years old and presents with a phenotype compatible with severe Dravet Syndrome, that is, refractory epileptic encephalopathy with seizures of various types including generalized seizures, focal seizures, and poorly controlled tonic seizures. An interesting finding in this patient is that he presents with a cerebral malformation consisting of an alteration of the morphology of the caps, asymmetric ventricles, hamartomatous gliotic focus, band heterotopia, and possible polymicrogyria (Figure 3). He also has other malformations such as cryptorchidism, scoliosis,

and vesicoureteral reflux. The genetic study showed the pathogenic variant c.2792G>A (p.Arg931His), reported multiple times in association with *SCN1A*-related disorders.<sup>23–25</sup>

## Discussion

Most patients presented here fit well with the classically defined phenotypes ascribed to *SCN1A* variants, most frequently giving rise to Dravet syndrome. However, it is worth noting that in such a small series, in-depth clinical assessment of patients with pathogenic variants in the *SCN1A* gene revealed atypical findings in 3 (20%) patients, which reinforces the broad phenotypic spectrum related to this gene. Patient 5 associated a phenotype of severe epileptic encephalopathy with arthrogryposis, similar to that previously described by Spagnoli et al<sup>15</sup> and Jaber et al.<sup>16</sup> Consequently, our patient represents a novel case where rare de novo variants in *SCN1A* cause arthrogryposis multiplex congenita and reinforces its relationship with prenatal motor development. As can be seen in Table 2, a total of 5 cases could be gathered with similar characteristics, where the common points in all these patients are arthrogryposis and early epileptic encephalopathy. Two of the patients showed nonepileptic abnormal movements from the first days of life. In another 2 cases, voluntary termination of pregnancy was decided. The patient bearing the missense variant (p.Leu893Phe) died prematurely during the first month of life.



**Figure 3.** Magnetic resonance in T2. (A) Coronal section, anterior temporal pole with loss of normal structure is observed. (B) Coronal section, dysmorphic anterior cingulate. (C) Coronal T2, slightly dysmorphic coarse operculums with greater extension in depth, practically in contact with lateral ventricles without clear polymicrogyria (patient 10).

The patient with a de novo *SCN1A* missense variant (p.Ser228Pro) reported by Spagnoli et al presented with both a severe motor defect with multiple contractures and hip dysplasia, as well as severe epilepsy from 8 months of life, with characteristics similar to Dravet syndrome. In addition, he had severe intellectual disability with absence of language and a movement disorder defined as spasms in response to tactile contact from the first hours of life and phenotypically defined as hyperreflexia. None of the genetic variants in the 5 patients has been previously reported, so it is conceivable that their functional effect may be different to a mere loss of function.

In this sense, it is worth noting that Sadleir et al<sup>13</sup> published a severe clinical presentation associated with *SCN1A* with some features similar to these patients that they defined as “early infantile *SCN1A* encephalopathy.” They described 8 unrelated patients with the same de novo missense variant c.677C>T (p.Thr226Met), and a ninth patient with the missense variant c.4033C>T (p.Pro1345Ser). Early infantile *SCN1A* encephalopathy is characterized by the presence of epilepsy, of earlier onset than Dravet syndrome, around 9 weeks of life, associated with movement disorder. In evolution, they present more profound developmental impairments than Dravet syndrome; all patients included in the study were nonambulatory, and the majority required feeding tubes. The abnormal movements were described as hyperkinetic movement disorders—including choreoathetosis, dystonia, myoclonus, and perioral hyperkinesia—and epileptic spasms, neither of which are typically seen in patients with Dravet syndrome. Although hyperkinetic movements are not characteristic of *SCN1A*-linked Dravet syndrome, similar movement disorders are associated with *SCN2A*- and *SCN8A*-linked early infantile epileptic encephalopathies.<sup>26</sup> This overlap in symptomatology led Sadleir et al to speculate that the early infantile *SCN1A* encephalopathy, like *SCN2A*- and *SCN8A*-linked early infantile epileptic encephalopathies, may be associated with a gain-of-function variant. Subsequently,

Berecki et al demonstrated that the early infantile *SCN1A* encephalopathy variant shows a gain in functional properties.<sup>27</sup> In contrast, *SCN1A* variants causing Dravet syndrome have been primarily associated with loss of function variants.

As we have seen, involuntary movements are a rare manifestation of the pathogenic *SCN1A* variant. In this sense, patient 1 presented with epilepsy of a phenotype similar to Dravet syndrome as well as episodes of hyperchoreiform movements with very marked irritability preceding crises. As we have commented, abnormal movements preceding epileptic decompensations were previously described in other patients.<sup>28,29</sup> The phenotype would not match either the early epileptic encephalopathy associated with arthrogyriposis or the early infantile *SCN1A* encephalopathy. There is another recent publication that reported an association between *SCN1A* and hyperkinetic movements.<sup>13</sup> Nor can we totally exclude that these episodes are focal seizures, although with a normal EEG, it is unlikely.

It is known that some antiepileptic drugs, such as phenytoin, carbamazepine, and zonisamide,<sup>30</sup> can induce abnormal movements through their action on the ion channel, such as the *SCN1A* ion channel. It can be argued that there is a common pathophysiological mechanism. In the review by Badheka et al<sup>30</sup> on pediatric movement disorders, they refer to a long list of drugs that can cause abnormal movements, some of them antiepileptic. In the case of our patient, he did not take any of these drugs. Therefore, we speculate that these involuntary movements were not related to the effects of antiepileptic drugs, but to the frameshift deletion c.2853\_2857 in *SCN1A* gene, which could be considered as a possible cause of epileptic encephalopathy and involuntary movements, although it would be necessary to carry out more studies on this to confirm it.<sup>26,31</sup>

Finally, patient 10 presented with Dravet syndrome and a neuronal migration disorder on MRI consisting in band heterotopia and possible polymicrogyria (Figure 3). The analysis of the genes more specifically related with these 3 atypical signs

**Table 2.** Clinical Information on 5 Patients With De Novo SCN1A Alterations and Arthrogryposis.

Patient	Prenatal history	Perinatal history	Family background	Age at seizure onset	Seizure type	Signs of arthrogryposis	ID	Age at Abnormal movements and type	Pathogenic variant	Reference
1, female	Breech position	Severe acute fetal distress	Consanguineous healthy parents	20 d	Sucking crisis and hypoventilation with apnea	Dislocation of both hips that are not reducible and dislocation of both knees and right elbow	Profound	First days of life, hyperreflexia, and facial flushing triggered by tactile stimuli	c.2312C>T (p. Thr782Ile)	This work
2, male	None	35 wk premature	None	8 mo	Prolonged hemiconic seizure	Stiffness, multiple contractures, hip dysplasia and talipes	Severe and absent speech	Spasms in response to tactile stimuli since the first hours of life: hyperekplexia	c.628T>C (p. Ser228Pro)	15
3, male	23 w.g. Bilateral flexion of both hands, a hyperextension of knees and reduced swallowing	25 w.g. lack of fetal movements associated with arthrogryposis of the upper limbs and micrometrotrognathism	None	2 d	EEG: suppression burst	Distal joint contractures of both lower and upper limbs			c.2679A>C (p. Leu893Phe)	17
4, male	25 w.g. lack of fetal movements associated with arthrogryposis of the upper limbs and micrometrotrognathism	25 w.g. lack of fetal movements associated with micrometrotrognathism without cleft palate, generalized edema, very short neck, hyperextension of both legs in front of the trunk, dorsal flexion of feet, bilateral camptodactyly with flexion of elbows, right diaphragmatic hernia and marked dorsolumbar scoliosis	None	24 w.g. VIP postmortem examination:	Intractable epilepsy and died 21 d				c.2965G>A (p. Ala989Thr)	(17)
5, male	21 w.g. bilateral camptodactyly, hyperextension of knees and hallux valgus of feet	24 w.g. VIP postmortem examination: camptodactyly, hyperextension of knees and hallux valgus of feet							c.707T>C (p. Ile236Thr)	(17)

Abbreviations: ID, intellectual disability; VIP, voluntary interruption of pregnancy.

failed to reveal any putative disease-causing variant. There are numerous publications on the concurrence of cortical developmental malformations and pathogenic variants in *SCN1A* gene.<sup>32–36</sup> Skjei et al reported on 6 patients with *SCN1A* variants with refractory mixed seizure types who underwent epilepsy surgery and the surgical histopathology showed evidence of subtle cortical dysplasia in 4 of 6 patients, with more neurons in the molecular layer of the cortex and white matter cortical disorganization.<sup>32</sup> Moreover, Barba et al<sup>33</sup> reported another 6 patients with *SCN1A* variants with co-occurring cortical malformations. It is controversial whether the association of 2 epileptogenic events had occurred purely by chance or if a predisposing role for *SCN1A* variants could be considered. Some authors consider that given the high number of patients with *SCN1A* variants published so far, and the rarity of co-occurring MCDs, epidemiology does not support a causative role for *SCN1A* variants in MCDs.<sup>32</sup> In studies carried out on the prevalence of incidental findings in brain MRI in children, it was seen that 0.48% (95% CI 0.30–0.76) had subependymal heterotopias, 0.03% (95% CI 0.01–0.16) had transmantle dysplasias, and 0.03% (95% CI 0.01–0.16) had focal cortical dysplasias.<sup>37</sup> Studies on large samples of patients with pathogenic variants in *SCN1A* would be necessary to systematically evaluate the presence of malformations of cortical development and thus determine if in some way the presence of these variants may condition the increase in the frequency of these malformations of cortical development.

It is remarkable that 3 of our 15 patients with pathogenic variants in *SCN1A* gene were conceived by in vitro fertilization techniques, 2 of them by egg donation. According to the National Registry of the Spanish Fertility Society, during 2010–2017, the rate of newborns conceived through in vitro fertilization was around 2.9%,<sup>38</sup> in high contrast with the 20% (3/15; 95% CI 0.071–0.452) found in our series. Although the sample size is too small, these data were similar to a recently published study, based on population registers in Western Australia, where a small increased risk of intellectual disability was found among children conceived by assisted reproduction techniques, even after stratification for twin pregnancies or very preterm births.<sup>39</sup> These authors found that patients conceived by in vitro fertilization after intracytoplasmic sperm injection were more likely to have a known genetic cause than naturally conceived patients (20% vs 12%). Although further studies are necessary, it would be important to determine if in vitro fertilization techniques may be a risk factor for the presence of de novo variants, and even if these variants occur preferentially at sites of greater vulnerability.

#### Acknowledgments

We thank Dr Eleanor Holmes for her linguistic assistance. We warmly thank all the patients and their families for their involvement in this study.

#### Author Contribution

AVMH was responsible for drafting of the article, clinical examination of the patients, and bibliographic search. ACL, SM, and FM analyzed and interpreted genetic data. PRS evaluated and analyzed the electroencephalographic records. JCM evaluated the magnetic resonances of the patients and analysis. ACL, MTV, and FM revised the article for important intellectual content. MTV contributed to clinical data analysis. FM was responsible for final approval of the article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Fundación Mutua Madrileña (grant number CM19/00181). This work has received financial support from the CM19/00181 grant from the Carlos III Institute (grant holder AVMM) and the Mutua Madrileña Foundation (SM).

#### Ethical Approval

The study was performed with approval from the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). All patients or their legal representatives signed the informed consent.

#### Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### ORCID iD

Ana Victoria Marco-Hernández  <https://orcid.org/0000-0002-6027-376X>

#### Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

#### References

- de Lange IM, Koudijs MJ, van't Slot R, et al. Mosaicism of de novo pathogenic *SCN1A* variants in epilepsy is a frequent phenomenon that correlates with variable phenotypes. *Epilepsia*. 2018;59:690–703.
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci*. 2006;9:1142–1149.
- Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J Neurosci*. 2007;27:5903–5914.
- Catterall WA, Kalume F, Oakley JC. Nav1.1 channels and epilepsy. *J Physiol*. 2010;588:1984–1959.
- Kalume F, Yu FH, Westenbroek RE, Sheuer T, Catterall WA. Reduced sodium current in Purkinje neurons from Nav1.1 mutant mice: implications for ataxia in severe myoclonic epilepsy in infancy. *J Neurosci*. 2007;27:11064–11074.
- Han S, Tai C, Westenbroek RE, et al. Autistic behavior in *Scn1a* +/- mice and rescue by enhanced GABAergic transmission. *Nature*. 2012;489:385–390.
- Brunklaus A, Schorge S, Smith AD, et al. *SCN1A* variants from bench to bedside-improved clinical prediction from functional characterization. *Human Mutat*. 2019;41(2):363–374.

8. Scheffer I, Nabbout R. *SCN1A*-related phenotypes: epilepsy and beyond. *Epilepsia*. 2019;60(S3):S17-S24.
9. Mei D, Cetica V, Marini C, Guerrini R. Dravet syndrome as part of the clinical and genetic spectrum of sodium channel epilepsies and encephalopathies. *Epilepsia*. 2019;60(S3):S2–S5.
10. Carranza Rojo D, Hamiwka L, McMahon JM, et al. De novo *SCN1A* mutations in migrating partial seizures of infancy. *Neurology*. 2011;77(4):380-383.
11. Hirose S, Scheffer IE, Marini C, et al. *SCN1A* testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia*. 2013;54(5):946-952.
12. Meng H, Xu HQ, Yu L, et al. The *SCN1A* mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. *Hum Mutat*. 2015;36:573-580.
13. Sadleir LG, Mountier EI, Gill D, et al. Not all *SCN1A* epileptic encephalopathies are Dravet syndrome: early profound Thr226Met phenotype. *Neurology*. 2017;89:1035-1142.
14. Spagnoli C, Frattini D, Rizzi S, Salerno GG, Fusco C. Early infantile *SCN1A* epileptic encephalopathy: expanding the genotype-phenotype correlations. *Seizure*. 2019;65:62-64.
15. Beck VC, Hull JM, Isom LL. Beyond Dravet syndrome: characterization of a novel, more severe *SCN1A*-linked epileptic encephalopathy. *Epilepsy Curr*. 2019;19(4): 266-268.
16. Jaber D, Gitioux C, Blesson S, et al. De novo mutations of *SCN1A* are responsible for arthrogryposis broadening the *SCN1A*-related phenotypes. *J Med Genet*. 2020;20:1-6.
17. Jiang T, Shen Y, Chen H, et al. Clinical and molecular analysis of epilepsy-related genes in patients with Dravet syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(50):e13565.
18. Symonds JD, Zuberi SM, Stewart K, et al. Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain*. 2019;142:2303-2318.
19. Miller IO, Sotero de Menezes MA. *SCN1A*-related seizure disorders. In: Adam MP, Ardinger HA, Pagon RA, et al, eds. *GeneReviews*®. 1993–2021. University of Washington; 2018.
20. Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, et al. Spectrum of *SCN1A* gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet*. 2009;46(3):183-191.
21. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
22. Martinez F, Caro-Llopis A, Rosello M, et al. High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *J Med Genet*. 2017;54(2):87-92.
23. Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, et al. Genotype-phenotype associations in *SCN1A*-related epilepsies. *Neurology*. 2011;76(7):594-600.
24. Catarino CB, Liu JYW, Liagkouras I, et al. Dravet syndrome as epileptic encephalopathy: evidence from long-term course and neuropathology. *Brain*. 2011;134(Pt10):2982-3010.
25. Rilstone JJ, Coelho FM, Minassian BA, Andrade DM. Dravet syndrome: seizure control and gait in adults with different *SCN1A* mutations. *Epilepsia*. 2012;53(8):1421-1428.
26. Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, et al. High prevalence of genetic alterations in early-onset epileptic encephalopathies associated with infantile movements disorders. *Brain Dev*. 2016;38(3):285-292.
27. Berecki G, Bryson A, Terhag J, et al. *SCN1A* gain of function in early infantile encephalopathy. *Ann Neurol*. 2019;85:514-525.
28. Ohashi T, Akasaka N, Kobayashi Y, et al. Infantile epileptic encephalopathy with a hyperkinetic movement disorder and hand stereotypies associated with a novel *SCN1A* mutation. *Epileptic Disord*. 2014;16:208-212.
29. Ohtsuka Y, Ohmori I, Ogino T, et al. Paroxysmal movement disorders in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Brain Dev*. 2003;25(6):401-405.
30. Badheka R, Barad KN, Sankhla CS. Pediatric movement disorders. *Neurol India*. 2018;66(Suppl):s59-s67.
31. Pearson TS, Pons R. Movement disorders in children. *Continuum (Minneapolis)*. 2019;25(4):1099-1120.
32. Skjei KL, Church EW, Harding BN. Clinical and histopathological outcomes in patients with *SCN1A* mutations undergoing surgery for epilepsy. *J Neurosurg Pediatr*. 2015;16: 668-674.
33. Barba C, Parrini E, Coras R, et al. Co-occurring malformations of cortical development and *SCN1A* gene mutations. *Epilepsia*. 2014;55(7):1009-1019.
34. Informes Registro Nacional de Actividad-Registro SEF. Accessed January 25, 2021. <https://www.registrosef.com/index.aspx?ReturnUrl=%2f#Anteriores>
35. Striano P, Mancardi MM, Biancheri R, et al. Brain MRI findings in severe myoclonic epilepsy in infancy and genotype-phenotype correlations. *Epilepsia*. 2007;48(6):1092-1096.
36. Le Gal F, Korff CM, Monso-Hinard C, et al. A case of SUDEP in a patient with Dravet syndrome with *SCN1A* mutation. *Epilepsia*. 2010; 51(9):1915-1918.
37. Renier WO, Rnekawek K. Clinical and neuropathologic findings in a case of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia*. 1990;31:287-291.
38. Jansen PR, Drennen M, van den Berg A, et al. Incidental findings on brain imaging in the general pediatric population. *N Engl J Med*. 2017;377: 1593-1593.
39. Hansen M, Greenop KR, Bourke J, et al. Intellectual disability in children conceived using assisted reproductive technology. *Pediatrics*. 2018;142(6): e20181269.



Figure 1 Sup. Left wrist with significant non-reducible contracture at the age of 6 years (patient 5).



Figure 2 Sup. Record made at 5 years of age while awake with continuous slow-spike-wave (Patient 5).

#### **CAPITULO IV. NUEVOS GENES CANDIDATOS**

Finalmente, en el último capítulo se analizaron los pacientes que presentaban TND secundarios a variantes genéticas en nuevos genes candidatos.

El artículo publicado es "*Mitochondrial Developmental encephalopathy with bilateral optic neuropathy related to homozygous likely pathogenic variants in the IMMT gene in an extended family with high consanguinity*" y actualmente tenemos dos más en revisión que adjuntamos también a continuación.

**Marco-Hernández AV, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Barranco-González, H, Vilchez Padilla JJ, Azorín I, Smeyers Dura P, Monfort S, Pitarch-Catellano I, Martínez, F. Mitochondrial Developmental encephalopathy with bilateral optic neuropathy related to homozygous likely pathogenic variants in the *IMMT* gene in an extended family with high consanguinity. *Clinical Genetics*. 2021.**

El gen *IMMT* codifica la mitofilina, una proteína de la membrana interna mitocondrial que regula la morfología de las crestas mitocondriales. El fenotipo asociado a mutaciones en este gen aún no ha sido establecido, pero los estudios funcionales realizados muestran que su pérdida provoca una alteración mitocondrial, tanto en la morfología de las crestas mitocondriales, como en su función. Presentamos a dos primos de una familia muy consanguínea con encefalopatía del desarrollo, hipotonía, y nistagmo secundario a la neuropatía óptica. La variante probablemente patogénica en homocigosis c.895A>G (p.Lys299Glu) en el gen *IMMT* co-segrega con la enfermedad de forma significativa y se asocia con la alteración de las crestas mitocondriales observadas por microscopía electrónica.

Pitarch-Castellano Inmaculada (Orcid ID: 0000-0002-3864-7374)  
Marco Hernández Ana Victoria Victoria (Orcid ID: 0000-0002-6027-376X)

**Mitochondrial Developmental encephalopathy with bilateral optic neuropathy  
related to homozygous variants in IMMT gene**

Running title: Mitochondrial Disease related with *IMMT* gene.

Financing: Grant Río Hortega CM19/00181.

Authors: Ana Victoria Marco-Hernández<sup>a\*</sup>, Miguel Tomás-Vila<sup>b</sup>, Alejandro Montoya-Filardi<sup>c</sup>, Honorio Barranco-González<sup>d</sup>, Juan Jesus Vilchez Padilla<sup>f</sup>, Inmaculada Azorín<sup>f</sup>, Patricia Smeyers Dura<sup>b</sup>, Sandra Monfort-Membrado<sup>e</sup>, Inmaculada Pitarch-Castellano<sup>b</sup> Francisco Martínez- Castellano<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Genomics Unit La Fe Health Research Institute, Valencia, Spain.

<sup>b</sup> Neuropediatrics Section Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

<sup>c</sup> Radiology Service Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

<sup>d</sup> Ophthalmology Service Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

<sup>e</sup> Genetics Unit, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain .

<sup>f</sup> Neuromuscular pathology laboratory Health Research Institute La Fe. Valencia, Spain.  
CIBERER. European Reference for rare Neuromuscular Diseases.

\*Corresponding autor at: Ana Victoria Marco Hernández

Teléfono: 961244108

E-mail: [marco\\_anaher@gva.es](mailto:marco_anaher@gva.es)

Present address: Av Fernando Abril Martorell, 106, Valencia 46026 Spain.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as doi: [10.1111/cge.14093](https://doi.org/10.1111/cge.14093)

This article is protected by copyright. All rights reserved.

**Abstract**

*IMMT* gene codes for mitofilin, a mitochondrial inner membrane protein that regulates the morphology of mitochondrial cristae. The phenotype associated with mutations in this gene has not been yet established, but functional studies carried out show that its loss causes a mitochondrial alteration, both in the morphology of the mitochondrial crests and in their function. We present two cousins from an extended highly consanguineous family with developmental encephalopathy, hypotonia, nystagmus due to optic neuropathy. The likely pathogenic homozygous c.895A>G (p.Lys299Glu) variant in the *IMMT* gene co-segregates with the disease and associates altered mitochondrial cristae observed by electron microscopy.

**Keyword:** developmental encephalopathy, mitochondrial disorder, nystagmus, optic neuropathy, mitofilin complexes, *IMMT* gene.

**1. Introduction**

Mitochondria are complex organelles of the eukaryotic cells implied in energy production through oxidative phosphorylation in the respiratory chain (1). Proper mitochondrial function is necessary in tissues and organs that are of high energy demand, including the heart, brain and muscles. So mitochondrial dysfunction (MD) tend to present as a multisystemic and progressive presentation, decorated with a wide clinical spectrum in terms of symptoms, age of presentation and severity as described in diverse reports. The classic presentation in the perinatal period is hypotonia and lactic acidosis and sometimes is also associated with encephalopathy, seizures and the presence of both hypertrophic and dilated cardiomyopathy (2-6).

In childhood and adulthood, the presence of progressive external ophthalmoplegia, optic atrophy, pigmentary retinopathy, sensorineural deafness, axonal peripheral neuropathy, renal tubulopathy, exercise intolerance, cardiomyopathy, migraine, seizures, encephalopathy / dementia, ataxia and diabetes mellitus should make us think of MD (1, 7,8). Furthermore, there is growing evidence that MD appears to be closely related to at least a subset of patients with Autism spectrum disorders (ASD) (9).

Mitochondrial function is determined by the general architecture that it is made up of an outer membrane and an inner membrane. The outer membrane mediates the communication of the mitochondria with the rest of the cell. The inner membrane is a heterogeneous structure composed of the inner boundary membrane and cristae (10). The inner membrane contains a number of highly specialized proteins, including the respiratory chain complexes and members of the mitochondrial membrane protease family. The mitochondrial matrix compartment contains mtDNA molecules packaged within mitochondrial DNA nucleoid structures, and it is also the site of multiple metabolic pathways essential for normal cellular function (11, 12).

An important step towards understanding the molecular basis of the inner membrane architecture was the identification of mitofilin (*IMMT*, *MINOS2*), a protein that plays a key role in mitochondrial membrane organization (10, 13-15). Mitofilin proteins are part of heterooligomeric protein complexes that have been called the mitochondrial inner membrane organizing system (MINOS) and interact with various outer membrane protein complexes, thus generating contact sites between the two mitochondrial membrane systems. They are ubiquitous mitochondrial proteins that share their domain organization from yeast to humans, whereas the mitofilin signature domain is the only part of the protein that exhibits strong conservation at the primary structure level across species (10, 13, 14). Depletion of mitofilin in human cells and worms or deletion of

mitofilin in yeast leads to an extension of the inner membrane surface, a massive loss of crista junctions and to abnormal crista structures that appear as stacked lamellae disconnected from the inner boundary membrane (10, 14-19). Alterations of mitofilin have been described in the context of several different pathologies, as epilepsy, Down syndrome, Parkinson's disease, neurodegeneration, amyloidosis, cancer and diabetic cardiomyopathy (10). However, the phenotype associated with mutations in this gene has not yet been established, in spite of the functional relevance expected for a deficit or malfunctioning of mitofilin protein on the morphology and function of the mitochondrial crests (20-23).

We present two cousins from an extensive, closely consanguineous family with developmental encephalopathy, hypotonia, nystagmus due to optic neuropathy. Both cousins present the probable pathogenic homozygous c.895A>G (p.Lys299Glu) variant in the IMMT gene. In the cosegregation study, it was found that only individuals with the homozygous variant present symptoms. At the histopathological level, it associates altered mitochondrial ridges observed by electron microscopy.

## **2. Materials and Methods**

### **1.1. Participants**

Two consanguineous cousins were recruited for inclusion in a research study carried out in patients with neurodevelopmental problems and pathogenic or probably pathogenic genetic variants, according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria (24). Detailed clinical data were retrospectively collected from medical records and a semi-structured interview at the time of inclusion. An extensive physical examination with systematized data collection, somatometry (weight, height and head

circumference) and collection of a photograph of the face was performed in all patients when the families gave their consent. All patients had at least a brain MRI, and this was systematically reviewed by an experienced pediatric neuroradiologist (see table 1).

This study was approved by the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). Informed consent was obtained from the parents of all participants.

### 1.2. Genetic studies

Peripheral blood samples from individuals and their parents were collected by standard methods for the genetic studies. Genomic DNA was isolated using the Qiacube extractor (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA purity and concentration were measured using the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen), respectively.

Massive parallel sequencing for exome was performed by using the commercial clinical exome SureSelect Focused Exome (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 following the manufacturer's protocol to get a minimum reading depth of 100X. Sequence read alignments; variant calling and annotations were performed in *Alissa* platform (Agilent Technologies). All disease-causing genes related with mitochondrial and/or neurodevelopmental disorders described in different databases were analyzed. To evaluate the clinical impact and to assess the pathogenicity of variants in exome sequencing we applied the ACMG described criteria (25). All potentially relevant genetic variants detected were confirmed by Sanger sequencing from purified PCR products. All primers for amplification and sequencing were designed with exon-primer (primers and PCR conditions are available on request).

### 1.3. Muscle biopsy studies

Open muscle biopsies were obtained from quadriceps femoris for diagnostic purpose after correspondent informed consent. Samples were snap frozen or fixed and embedded in appropriate material for electron microscopy. Transverse cryo-sections were processed by routine histological and histochemical techniques for morphologic evaluation in light microscopy, while ultrathin cuts from plastic blocks were analyzed in the electronmicroscope following conventional procedures (26). Biochemical determinations in muscle homogenates were performed in the Mitochondrial Research Laboratory at Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain). The mitochondrial respiratory chain (MRC) complexes and citrate synthase enzyme activities were determined spectrophotometrically in the skeletal muscle of patient 1 using reported methods (27) with minor modifications consistent in slight changes in the assay concentrations in some buffers and reactants (28).

## 2. Results

### 2.1. Patient 1

Patient 1 is a 10-years-old boy born to healthy consanguineous parents, both are first-cousins (see figure 1). Risky pregnancy for diabetic mother controlled with insulin without other complications. Patient was born by normal, vaginal delivery without incidents. He is the third of a phratry of 4 siblings, the rest of the siblings are totally healthy with normal psychomotor development.

From birth he presented nystagmus that was increasing, initially the psychomotor development seemed normal, presenting normal head support, sitting at 6 months and gait at 15 months. At 3 years of age, he was assessed for the first time by pediatric

neurology due to increased nystagmus, absence of language, and developmental delay, consisting of lack of toilet training, stereotypies without clear autistic features, and nonspecific fine motor clumsiness without regression. . The neurological examination did not detect dysmorphic features, he presented an action tremor, continuous nystagmus, and rocking stereotypies were observed. At 4 years old, he speaks with single words without forming complete sentences, with repetitive language. At the behavioral level, he presents hand-washing-type stereotypes and little contact with a child of his age.

Initially, an ophthalmology assessment was carried out that confirmed the presence of bilateral torsional nystagmus and moderate bilateral optic atrophy in both eyes and he was diagnosed with bilateral optic neuropathy. Study was completed with visual evoked potentials that were affected (PEV FLASH Left eye P1 71.7ms; Right eye P1 78.3ms). At 4 years of age, he started tonic-dystonic episodes of the left hemibody with a claw position of the left hand lasting between 10 and 60 minutes that occurred two or three times a day. An electroencephalographic recording was carried out in which generalized high voltage wave outbreaks at 3-4c / second of short duration were detected during the episode. Treatment with levetiracetam was started and the episodes subsided. In addition, a brain nuclear magnetic resonance (NMR) was performed, it showed bilateral high signal on T2 weighted image (WI) and reduced volume of both globus pallidus nuclei, high signal on T2 WI was also seen in anterior aspect of left corona radiata (see figure 2).

At that time, a mitochondrial disease was suspected. A complete metabolic study was carried out, amino acids in urine and plasma were normal, mucopolysaccharides in urine normal, there was an elevation of lactic acid 3.8 (0.3-2.5), with normal pyruvate of

46 $\mu$ mol / L (29.6-90), L / P ratio 82.6 and acetoacetate 0.40 nmol / L (0.01-0.2). In addition, an elevation of some organic acids such as 3OH-propionic, 3me-glutaric, 3meglutaconic and hippuric acid was detected, this profile has been seen in mitochondrial disease (29, 30). Neurotransmitters in cerebrospinal fluid were performed and were normal.

## 2.2. Patient 2

Patient 2 is a 12-years-old boy born to healthy consanguineous healthy parents, who are first cousins and also related as sibling or cousins with the parents of patient 1 (see figure 1). Controlled pregnancy was without incident. Cesarean delivery at week 40, weight 3500g and APGAR 9/10. He has a healthy 5-year-old sister with normal psychomotor development.

Developmental delay and nystagmus were observed from the first months of life accompanied by inappropriate inappropriate laugh. He started walking at 2 and a half years, he presented dystonia when walking. Clinically, he has nystagmus, moderate intellectual disability, moderate language disorder, autism spectrum features, and heteroaggressive behavior problems. He has never had epilepsy. The neurological examination did not show dysmorphic features, but he had tremor and dysmetria, microcephaly 51 cm ( $p < 1; -2.59$  SD) with weight and height at the 10-15th percentile. In the ophthalmological study, nystagmus secondary to bilateral optic atrophy was confirmed. FLASH-like visual evoked potentials were normal in both eyes (PEV FLASH Left eye P1 55ms; Right eye P1 64s). A metabolic study was carried out (lactate, pyruvate, L / P ratio, acetoacetate, betahydroxybutyrate, B / A ratio, organic acids in urine, guanidoacetic and creatine) with normal results. In the cerebral magnetic resonance, lesions in globus pallidus cavitation and hypoplasia of the optic nerve were

detected (see figure 3). The electromyographic study in proximal and distal muscles of the upper and lower limbs was normal.

### 2.3 Genetic studies

After initial studies for fragile X and CGH Array, which were normal, the exome sequencing of patient 1 yielded the homozygous variant c.895A>G in the *IMMT* gene as the only clinically relevant result. This variant causes the substitution of the highly conserved amino acid lysine by glutamic acid in position 299 of the protein (p.Lys299Glu) (see figure 4), predicted to be pathogenic by most of the in-silico predictors (CADD, Polyphen, DANN, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, MutationTaster and SIFT). On the other hand, as the variant modifies the -2 position of the donor splicing sequence of exon 8 (NM\_006839), it might also affect the efficiency of splicing this exon (dbSNV ADA score = 0.9998; RF score = 0.998). According to the ACMG criteria, this variant was classified as likely pathogenic (PP1, PP3, PM2). This variant is absent in our in-house database and present in one single individual in gnomAD (0.0000046). Familial segregational study by Sanger sequencing confirmed that patient 2 shares the variant c.895A>G in the *IMMT* gene in homozygous state, while the healthy siblings of the two patients were heterozygous carriers or non-carriers. The *a priori* probability that the two patients share by chance a homozygous genetic variant was estimated 0.001, including the probability that the three healthy siblings are non-carriers, it renders  $p=0.0003$ .

#### 2.4 Muscle biopsy findings

The biopsies from both patients revealed similar findings. The only morphologic alteration consisted of fiber size variability with scattered atrophic fibers.

The changes gave support to suspect a mitochondrial disorder, but respiratory chain determination was normal complexes activities were not diminished and no increase in citrate synthase activity, a mitochondrial matrix enzyme used as a marker of mitochondrial content, was observed in muscle of patient 1 (Suppl. Table 1).

Histochemistry disclosed predominance of type I and atrophy of type II fibers, whereas oxidative techniques (NADH-TR and SDH) depicted significant subsarcolemal and cytosolic reinforcements indicative of mitochondrial proliferation; frequent COX negative fibers were also visible (see images A and C in figure 5).

The changes gave support to suspect a mitochondrial disorder, but respiratory chain determination was normal.

In the electron microscopy study highlighted the presence of mitochondrial abnormalities in which are depicted in figure 5 (D, E and F). The most remarkable was disorganization of normal inner membrane and cristae replaced by tubular and membrane folds irregularly arranged, as well as concentric onion-bulb lamella layers and other degenerative features like vacuolization or deposits of electron-dense granular material (C). Plate (D) recreates a mitochondrion containing the normal disposition of cristae arranged in parallel fashion.

#### 4. Discussion

Patients with neurodevelopmental disorders often go through a diagnostic odyssey with multiple and expensive tests. There is more and more evidence that the genetic study with next-generation sequencing study can be of benefit in terms of time and overall costs (31-33).

Mitochondrial diseases present multisystemic involvement and the characteristic symptoms that should guide the diagnostic suspicion of them have been described (1, 7,8). We present two cousins, both with a very strong clinical suspicion of MD because they presented a very similar clinical picture in which developmental encephalopathy, hypotonia, nystagmus with optic atrophy predominated (see table 1).

There is extensive evidence that MD associates a broad spectrum of optic neuropathies (12, 34-36). The term mitochondrial optic neuropathy (MON) has increasingly been used within the literature to describe a group of optic neuropathies that exhibit mitochondrial dysfunction in retinal ganglion cell (RGCs). The classic involvement of MON includes Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and autosomal-dominant optic atrophy (DOA). The mechanism by which MON is produced is the impairment in ATP production via alternations in oxidative phosphorylation and the accumulation of reactive oxygen species (ROS) within the mitochondrion trigger a decrease in the electrical potential across the mitochondrial membrane. This causes cytochrome C to leak out of the mitochondria into the cytoplasm and bind to the apoptosis activating factor-1 (APAF-1) resulting in apoptosis of the RGC (34-36). Another example is the membrane fusion GTPases OPA1 and mitofusin2 (MFN2) are frequently found mutated in cases of DOA. Both are genes implicated in mitochondrial fusion and fission machineries (10). Also, mutations affecting the mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 (DRP1) are connected to cardiomyopathy and to neonatal lethal case of multisymptomatic disease with microencephaly and optic atrophy (37).

However, optic neuropathy can also accompany classic mitochondrial syndromes in which other neurological manifestations predominate, such as MELAS, myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF), KSS, CPEO, maternally inherited Leigh

syndrome (MILS), and mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) (38).

On the other hand, there are several other mitochondrial syndromes with prominent optic neuropathy, including Charcot-Marie Tooth disease type 2A, *SPG7* related hereditary spastic paraplegia, Friedrich's ataxia, and Costeff syndrome. Although each syndrome has its own characteristics, they usually associate the common signs of these mitochondrial syndromes (39).

The findings in the MRI images of our patients are highly suggestive of MD. Basal ganglia lesions are very common in MD, specifically, bilateral and symmetric focal T2 hyperintensities in the basal ganglia (striatum), thalamus, substantia nigra, and brainstem nuclei at various levels on T2-weighted MR images, can be highly indicative of MD, especially when there is no history of hypoxia, ischemia or infection. Other common findings of MD are cerebral and cerebellar atrophy, changes in the brainstem tegmentum, cerebral white matter, and cerebellar cortex and delayed myelination among others (40).

One of our patients also presents a diagnosis of ASD and behavior problems. ASD is a spectrum of conditions regarding social communication and restrictive/repetitive patterns of behaviors and interests (41). It has been proposed that mitochondrial dysfunction appears to be closely associated with at least a subset of patients with ASD (9). They represent 5% of all patients with ASD (95% confidence interval 3.2 - 6.9%), much higher than the prevalence of MD in the general population (0.01%) (42). In addition, a genetic relationship has also been found between ASD and mtDNA genetic mutations or deletions of nuclear genes regulating mitochondrial function. Dysfunction of the complexes of the mitochondrial respiratory chain or electron transport chain,

indicating abnormal oxidative phosphorylation, has been reported in patients with ASD and in the autopsy samples of brains (42-44).

It is known that 80% of MD are due to mutations in the nuclear genes (8, 12, 45, 46), as expected by the fact that the vast majority of mitochondrial proteins are synthesized within the cytosol from nuclear gene transcripts. In addition, many of the MDs have an autosomal recessive inheritance, such as mitochondrial depletion syndromes (7). For all this, a clinical exome study was carried out using massive sequencing technique in which the same homozygous variant c.895A>G (p.Lys299Glu) of the *IMMT* gene was detected in both patients. The muscle biopsy of both patients confirmed the presence of signs suggestive of mitochondrial disorder and the electron microscopy study of patient 2 alteration of the mitochondrial crest disposition rarely reported in common mitochondrial disorders but being found to be similar to those observed in experimental animals harboring down regulation or knock down of mitofilin, a critical component of the mitochondrial contact site cristae organising system (MICOS) (23, 47). Animal model with interested mitochondrial mutations can provide useful information of genotype-phenotype association and therapeutic development (48, 49). However, in more situation is that many animal models cannot recapitulate phenotypes as shown in human being (50). Recent, by a combination of iPSC-derived tissue specific cells and CRISPR/cas9 genome editing technic, it has been demonstrated a useful tool to mechanistically understand MD relevant disorder (51) One of options is to test mitochondrial function in iPSC-derived neural cells with homozygous c.895A>G in *IMMT*. That probably will allow us to determine if this c.895A>G in *IMMT* is the pathogenic cause in these patients.

## 1. Conclusions

No patient with pathogenic variants in *IMMT* gene has been so far reported. Clinical, genetic and histopathological findings of the patients in this family allow us to propose for the first time that their neurological and ophthalmological phenotype is caused by a functional deficit of the mitofilin, a mitochondrial inner membrane protein coded by *IMMT* gene that regulates the morphology of mitochondrial cristae.

## Acknowledgements

This study was supported by grant CM19/00181 (Instituto de Salud Carlos III-Río Hortega). We thank to Dr. Miguel Ángel Martín for his collaboration in technical analysis of respiratory chain. We warmly thank all the patients and their families for their involvement in this study.

## Conflict of Interest

We have no conflicts of interest related to this work.

## Funding

This work has received financial support from the CM19 / 00181 Grant from the Carlos III Institute.

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

**References**

1. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 2019; 8: 680.
2. Berardo A, Musumeci O, Toscano A. Cardiological manifestations of mitochondrial respiratory chain disorders. *Acta. Myol*. 2011;30(1): 9-15.
3. Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: A brief Review. *Ann. Med*. 2018;50(2): 121-127.
4. Finsterer J, Rudolfstiftung K, Mahjoub SZ. Cardiac Manifestations of Mitochondrial Disorders. *Tex. Heart. Inst. J*. 2013;40(5): 634-635.
5. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial Cardiomyopathy. *Tex. Heart. Inst. J*. 2013;40(4): 385-394.
6. Yang Y, Gao H, Zhou H, Liu Q, Zhongwen Q, Zhang Y, Zhang J. The role of mitochondria-derived peptides in cardiovascular disease: Recent Updates. *Biomed. Pharmacother*. 2019;117: 109075.
7. Basel D. Mitochondrial DNA Depletion Syndromes. *Clin. Perinatol*. 2020;47(1): 123-141.
8. Kanungo S, Morton J, Neelakantan M, Ching K, Saeedian J, Goldstein A. Mitochondrial disorders. *Ann. Transl. Med*. 2018;6 (24): 475.
9. Citrigno L, Muglia M, Quattieri A, et al. The Mitochondrial Dysfunction Hypothesis in Autism Spectrum Disorders: Current Status and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21(16): 5785.
10. Zerbes RM, van der Klei IJ, Veenhuis M, Pfanner N, van der Laan M, Bohnert M. Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol. Chem*. 2012;393(11): 1247-1261.

11. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends. Biochem. Sci.* 2000;25(10): 502-508.
12. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery P. Mitochondrial optic neuropathies- Disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye Res.* 2011; 30(2): 81-114.
13. Komer C, Barrera M, Dukanovic J, et al. The C-terminal domain of Fcj1 is required for formation of crista junctions and interacts with the TOB/SAM complex in mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 2012;23:2143-2155.
14. Rabl R, Soubannier V, Scholz R, et al. Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Sue/g. *J. Cell. Biol.* 2009;185: 1047-1063.
15. Von der Malsburg K, Muller JM, Bohnert M, et al. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev. Cell.* 2011;21: 694-707.
16. Alkhaja AK, Jans DC, Nikolov M, et al. MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol. Biol. Cell.* 2012;23(2): 247-257.
17. Harner ME, Unger AK, Izawa T, et al. Aim24 and MICOS modulate respiratory function, tafazzin-related cardiolipin modification and mitochondrial architecture. *Elife.* 2014;3:e01684.
18. Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, et al. A mitochondrial-focussed genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol.* 2011;195 (2): 323-340.

19. Mun JY, Lee TH, Kim JH, et al. *Caenorhabditis elegans* mitofilin homologs control the morphology of mitochondrial cristae and influence reproduction and physiology. *J. Cell. Physiol.* 2010;224(3): 748-756.
20. John GB, Shang Y, Li L, et al. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol. Biol. Cell.* 2005;16(3):1543-1554.
21. Koob S, Reichert A S. Novel intracellular functions of apolipoproteins: the ApoO protein family as constituents of the Mitofilin/MINOS complex determines cristae morphology in mitochondria. *Biol. Chem.* 2014;395(3): 285-296.
22. Kondadi AK, Anand R, Reichert AS. Cristae Membrane Dynamics- A paradigm change. *Trends. Cell. Biol.* 2020;30(12):923-936.
23. Tsai PI, Papakyrikos AM, Hsieh CH, Wang X. *Drosophila* MIC60/mitofilin conducts dual roles in mitochondrial motility and crista structure. *Molec. Biol. Cell.* 2017;28(24): 3471-3479.
24. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet. Med.* 2015;17: 405-424.
25. Martinez F, Caro-Llopis A, Rosello M, et al. High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *J. Med. Genet.* 2017;54(2): 87-92.
26. Dubowitz V, Sewry CA, Russell JM. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. Ed Saunders Elsevier. Amsterdam. Holland. 2013.

27. Medja F, Allouche S, Frachon P, et al. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*. 2009; 9: 331-339.
28. González-Quintana A, Trujillo-Tiebas MJ, Fernández-Perrone AL, et al. Uniparental isodisomy as a cause of mitochondrial complex I respiratory chain disorder due to a novel splicing *NDUFS4* mutation. *Mol Genet Metab*. 2020;131:341–348.
29. Boenzi S, Diodato D. Biomarkers for mitochondrial energy metabolism diseases. *Essays Biochem*. 2018;62(3): 443-454.
30. Wortmann SB, Duran M, Anikster Y, Barth PG, Sperl W, Zschocke J. Inborn errors of metabolism with 3-methylglutaconic aciduria as discriminative feature: proper classification and nomenclature. *J. Inheret Metab. Dis*. 2013;36(6): 923-928.
31. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509): 344.
32. Retterer K, Juusola J, Cho MT, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet. Med*. 2016;18(7): 696-704.
33. Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, et al. Whole-genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in paediatric medicine. *NPJ. Genom. Med*. 2016;1:15012.
34. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev*. 2007;87: 99-163.
35. Sadum AA, La Morgia C, Carelli V. Mitochondrial optic neuropathies: our travels from bench to bedside and back again. *Clin. Exp. Ophthalmol*. 2013;41: 702-712.

36. Sadum AA. Mitochondrial optic neuropathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2002;72: 4235.
37. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010;11(12): 872-884.
38. Grönlund MA, Seyedi Honarvar AK, Andersson S, et al. Ophthalmological findings in children and young adults with genetically verified mitochondrial disease. *Br. J. Ophthalmol.* 2010;94(1): 121-127.
39. Pilz YL, Bass SJ, Sherman J. A review of Mitochondrial Optic Neuropathies: From Inherited to Acquired Forms. *J. Optom.* 2016;10: 205-214.
40. Gonçalves FG, Ferreira Alves CAP, Heuer B, et al. Primary Mitochondrial Disorders of the Pediatric Central Nervous System: Neuroimaging Findings. *Radiographics.* 2020;40(7):2042-2067.
41. Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet.* 2014;383:896-910.
42. Rossignol DA, Frye RE. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry.* 2012;17:290-314.
43. An JY, Cristino AS, Zhao Q, et al. Towards a molecular characterization of autism spectrum disorders: an exome sequencing and systems approach. *Transl. Psychiatry.* 2014;4: e394.
44. Legido A, Jethva R, Goldenthal MJ. Mitochondrial Dysfunction in Autism. *Semin. Pediatr. Neurol.* 2013;20:163-175.
45. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J. Pathol.* 2017;241:236-250.
46. Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. *J. Neurol.* 2016;263:179-191.

47. John GB, Shang Y, Li L, et al. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell*. 2005;16(3):1543-54. .
48. Siegmund S, Yang H, Sharma R et al. Low-dose rapamycin extends lifespan in a mouse model of mtDNA depletion syndrome *Hum Mol Genet*. 2017;26(23):4588-4605.
49. Jiang D, Xiong G, Feng H, et al. Donation of mitochondria by iPSC-derived mesenchymal stem cells protects retinal ganglion cells against mitochondrial complex I defect-induced degeneration. *Theranostics*. 2019;9(8):2395-2410.
50. Ma CY, Li C, Zhou X, et al. Management of adrenoleukodystrophy: From pre-clinical studies to the development of new therapies. *Biomed Pharmacother*. 2021;143:112214.
51. Zhang Z, Yan B, Gao F et al. PSCs Reveal PUFA-Provoked Mitochondrial Stress as a Central Node Potentiating RPE Degeneration in Bietti's Crystalline Dystrophy. *Mol Ther*. 2020;28(12):2642-2661.

**Legends of figures**

**Figure 1.** Pedigree of the family in which the p.Lys299Glu variant in the *IMMT* gene segregates with mitochondrial disease. Black symbols denote patients and dotted symbols denote obligate or confirmed heterozygous unaffected carriers. A dash above the symbol indicates the family members genetically studied.

**Figure 2:** A-C. MRI images from Patient 1. A study is carried out with sagittal, transversal and coronal planes in sequences T1, T2, Flair, diffusion T2 gradient, spectroscopic study. WI= weighted image

A) Axial T2-WI, showing bilateral high signal and reduced volumen (arrows in image A) due to pallidal atrophy.

B) Axial T2-weighted image. White matter area of T2 hyperintensity (arrow) located in left corona radiada.

C) Axial T1-weighted image. Bilateral optic nerve reduced diameter due to atrophy (arrowheads).

D) Single voxel short echo time spectroscopy located in basal ganglia. Revealed abnormal decreased choline peak (white arrow). Choline peak is even more reduced than creatine peak (yellow arrow), which is an abnormal relationship.

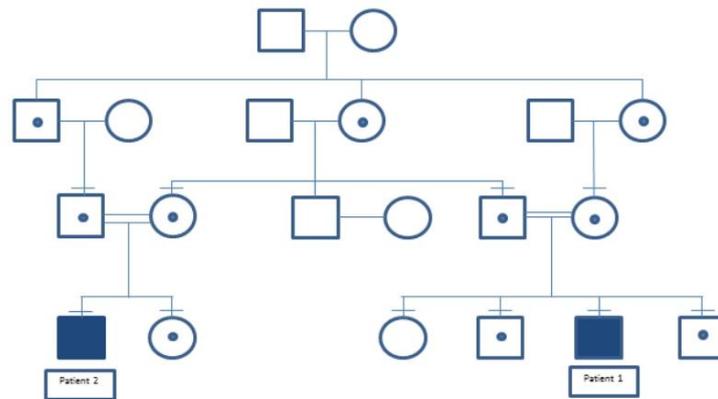
**Figure 3.** MRI images from Patient 2 demonstrating: A) Axial T2-weighted image, showing bilateral high signal and reduced volume (arrows) due to pallidal atrophy. B) Axial T2-weighted image. Bilateral optic nerve dural ectasia appearance due to optic nerve atrophy (arrowheads). C) Single voxel short echo time spectroscopy located in basal ganglia revealed abnormal decreased choline peak (white arrow), even more reduced than creatine peak (yellow arrow).

**Figure 4.** The amino acid substitution p.Lys299Glu of mitofilin in highly conserved.

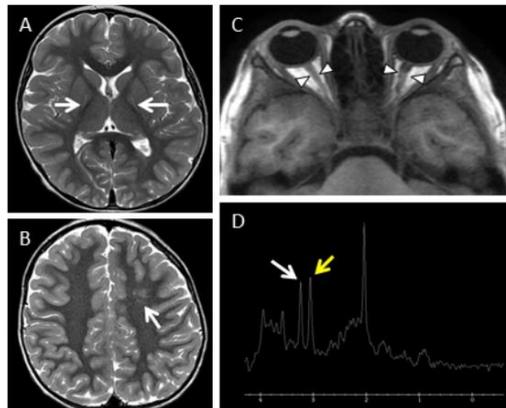
**Figure 5.** Light microscopy pictures of muscle sample from patient 2: (A) NADH-tetrazolium reductase, reaction showing hyperreactive subsarcolemmal reinforcements in some fibres. (B) NADH-tetrazolium reductase, reaction showing normal subsarcolemmal reinforcements in a healthy patient.

(C) Combined cytochrome c oxidase (COX)–succinate dehydrogenase (SDH) preparation depicting COX negative fibers losing the brown staining and turning blueish (original magnification, X40) .

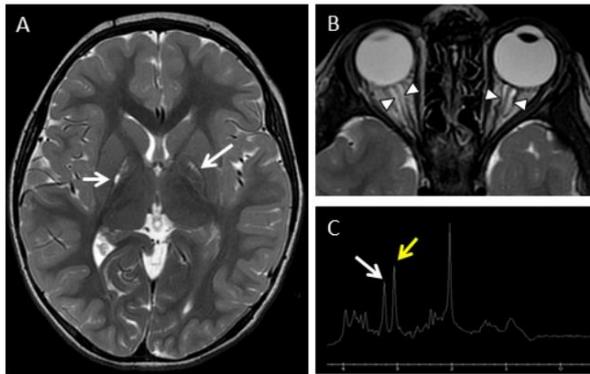
Ultramicroscopy images: (D) shows a collection of mitochondria presenting disorganization of the inner membrane and cristae as well as degenerative features like vacuolization or compartmentation, concentric onion-bulb lamella layer myelin-like figures (arrow) or deposits of electron-dense granular material (E). Plate (F) recreates a mitochondrion containing tubular and membrane folds irregularly arranged in contrast to the normal disposition of cristae arranged in parallel fashion.



CGE\_14093\_Figure 1.tif

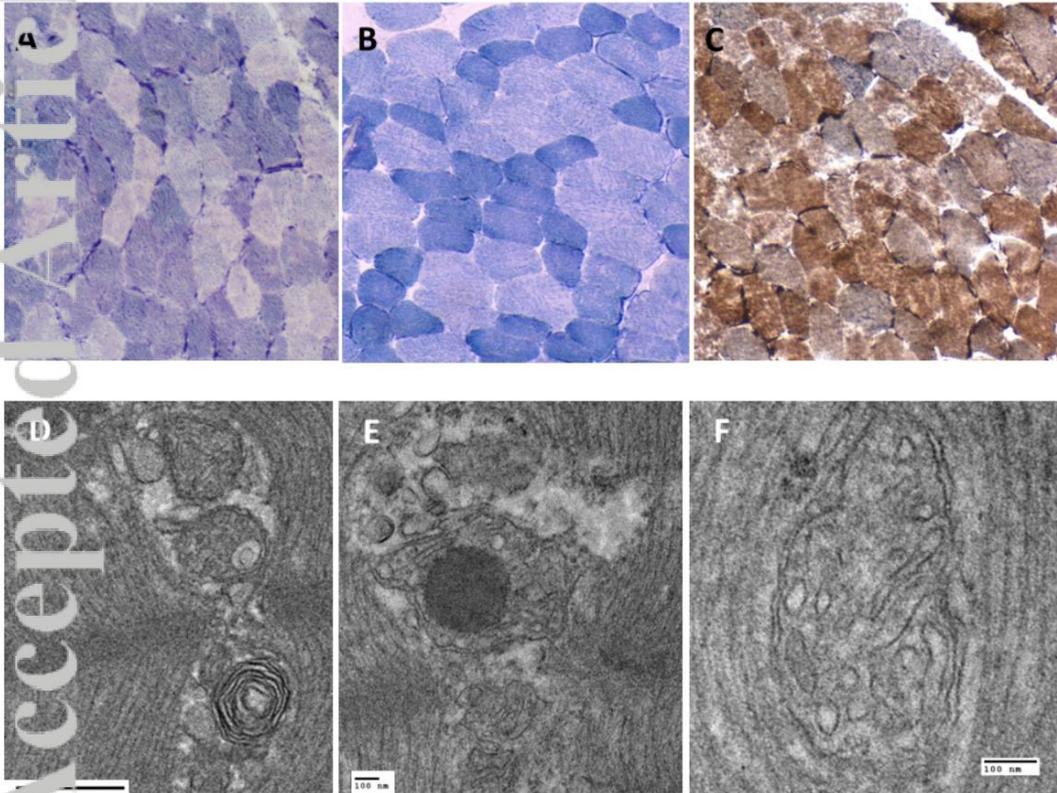


CGE\_14093\_Figure2.TIF



CGE\_14093\_Figure3.TIF





CGE\_14093\_FIGURA 5\_REV.tif

## TABLES

Table 1: A brief clinical description of the patients.

	<b>Patient 1 ADAM</b>	<b>Patient 2</b>
<b>Age</b>	10 years	12 years
<b>Starting age</b>	Infant	Infant
<b>Growth</b>	Normal	Normal
<b>Head circumference</b>	53 cm p25	51 cm (p<1 -2.59 SD)
<b>Dysmorphic features</b>	No	No
<b>Hearing</b>	Normal	Normal
<b>Ocular</b>	Bilateral congenital nystagmus Bilateral optic neuropathy	Bilateral congenital nystagmus Bilateral optic neuropathy
<b>PEV FLASH</b>	Very abnormal	Normal
<b>Cardiology</b>	Not done	Not done
<b>Gastrointestinal</b>	Normal	Normal
<b>Skin</b>	Normal	Normal
<b>Neurological</b>	Language and DD, moderate ID, ASD	DD, moderate ID, moderate LD, ASD,
<b>Epilepsy</b>	Yes, partial seizures	No
<b>EEG</b>	High voltage slow waves at 3-4c/sec	
<b>Abnormal movements</b>	Episodes of paroxysmal dystonia, tremor, rocking stereotypies	Dystonia, tremor and dysmetria
<b>NMR brain</b>	Hyperintensity and cystification of both pale nuclei. Bilateral atrophy of optic nerve	Lesions in pale with cystification and hypoplasia of the optic path
<b>PNS</b>	Not done	Not done
<b>Muscular biopsy</b>	Mitochondrial proliferation, atrophy-hypotrophy of type 2 fibers	Mitochondrial proliferation
<b>Respiratory chain</b>	Normal	Normal
<b>Metabolic analyses</b>	Lactic acid 3.8, elevation of some organic acids such as 3OH-propionic, 3me-glutaric, 3meglutaconic and hippuric acid	Normal
<b>Behavioral/psychiatric manifestations</b>	Behaviour problems	Heteroaggressive behaviour problems Inappropriate laugh

Abbreviations: percentile p; standard deviation SD; centimeters cm; intellectual disability ID; developmental delay DD; language disorder LD; autism spectrum disorder ASD; electroencephalogram EEG; nuclear magnetic resonance NMR; peripheral nervous system PNS

El siguiente trabajo actualmente se encuentra en revisión. También describe una paciente con una encefalopatía del desarrollo grave con regresión que proponemos que es secundaria a la alteración de la función del gen *SUCLG2*, por dos variantes en heterocigosis compuesta.

**Marco-Hernández AV, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Blázquez A, Cano-Sánchez A, Martín MA, Monfort S, Martínez, F. *Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic variants in the SUCLG2 gene.* 2022. En revisión.**

La succinil-CoA sintasa cataliza la síntesis reversible de succinil-CoA a partir de succinato y coenzima A. La enzima funcional es un heterodímero compuesto por una subunidad  $\alpha$  codificada por *SUCLG1*, y una subunidad  $\beta$ , codificada por dos genes alternativos, *SUCLG2* para la isoforma GTP y *SUCLA2* para la isoforma ATP.

Las mutaciones en los genes *SUCLG1* y *SUCLA2* se han asociado con síndrome de déficit de ADN mitocondrial, caracterizado por trastornos digestivos, compromiso neurológico, hepático, muscular y cardíaco. Por el contrario, los pacientes con los síntomas secundarios a la alteración en el gen *SUCLG2* aún no han sido descritos.

Se detectaron dos variantes de cambio de aminoácido heterocigotas probablemente patógenas en el gen *SUCLG2* en una paciente de 6 años con acidosis láctica, cardiomiopatía hipertrófica transitoria, déficit visual y regresión autista atípica con discapacidad intelectual grave, síntomas compatibles con enfermedad mitocondrial. La biopsia muscular confirmó una deficiencia del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Aquí proponemos *SUCLG2* como un nuevo gen candidato que causa disfunción mitocondrial.

## BMC Medical Genomics

### Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic variants in the SUGL2 gene.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>									
<b>Full Title:</b>	Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic variants in the SUGL2 gene.								
<b>Article Type:</b>	Case report								
<b>Section/Category:</b>	I don't know (Editor will decide Section)								
<b>Funding Information:</b>	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Instituto de Salud Carlos III (CM19/00181)</td> <td>Dr Ana Victoria Marco Hernández</td> </tr> <tr> <td>Instituto de Salud Carlos III (PI18_01374)</td> <td>Dr Alberto Blázquez</td> </tr> </table>	Instituto de Salud Carlos III (CM19/00181)	Dr Ana Victoria Marco Hernández	Instituto de Salud Carlos III (PI18_01374)	Dr Alberto Blázquez				
Instituto de Salud Carlos III (CM19/00181)	Dr Ana Victoria Marco Hernández								
Instituto de Salud Carlos III (PI18_01374)	Dr Alberto Blázquez								
<b>Abstract:</b>	<p>Succinyl-CoA synthase catalyzes the reversible synthesis of succinyl-CoA from succinate and coenzyme A. The functional enzyme is a heterodimer composed of one <math>\alpha</math> subunit encoded by SUGL1, and one <math>\beta</math> subunit, codified by two alternative genes, SUGL2 for the GTP isoform and SUGLA2 for the ATP isoform. Mutations in both the SUGL1 and SUGLA2 genes have been associated with mitochondrial DNA depletion syndrome, characterized by variable digestive, neurological, hepatic, muscular and cardiac involvement. Conversely, patients with symptoms secondary to alteration in the SUGL2 gene have not yet been described. Two heterozygous probably pathogenic missense variants were detected in the SUGL2 gene in a 6-year-old female patient with lactic acidosis, transitory hypertrophic cardiomyopathy, visual deficit and atypical autistic regression with severe intellectual disability, symptoms compatible with mitochondrial disease. Muscular biopsy confirmed a deficiency of mitochondrial respiratory chain complex I. Here we propose SUGL2 as a novel candidate gene causing mitochondrial dysfunction.</p>								
<b>Corresponding Author:</b>	Ana Victoria Marco Hernández Instituto de Investigación Sanitaria La Fe Valencia, Valencia SPAIN								
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	annvm24@gmail.com								
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>									
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Instituto de Investigación Sanitaria La Fe								
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>									
<b>First Author:</b>	Ana Victoria Marco Hernández								
<b>First Author Secondary Information:</b>									
<b>Order of Authors:</b>	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr><td>Ana Victoria Marco Hernández</td></tr> <tr><td>Miguel Tomás Vila</td></tr> <tr><td>Alejandro Montoya Filardi</td></tr> <tr><td>Alberto Blázquez</td></tr> <tr><td>Ana Cano Sánchez</td></tr> <tr><td>Miguel A. Martín</td></tr> <tr><td>Sandra Monfort</td></tr> <tr><td>Francisco Martínez</td></tr> </table>	Ana Victoria Marco Hernández	Miguel Tomás Vila	Alejandro Montoya Filardi	Alberto Blázquez	Ana Cano Sánchez	Miguel A. Martín	Sandra Monfort	Francisco Martínez
Ana Victoria Marco Hernández									
Miguel Tomás Vila									
Alejandro Montoya Filardi									
Alberto Blázquez									
Ana Cano Sánchez									
Miguel A. Martín									
Sandra Monfort									
Francisco Martínez									
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>									
<b>Opposed Reviewers:</b>									

*Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation*

Additional Information:	
Question	Response
Has this manuscript been submitted before to this journal or another journal in the <a href="https://www.biomedcentral.com/p/there-bmc-series-journals#journalist" target="_blank">BMC series</a> ?	Yes
Please provide the manuscript identification number from your previous submission. If you no longer have the identification number, please specify this in the text box below. as follow-up to "Has this manuscript been submitted before to this journal or another journal in the <a href="https://www.biomedcentral.com/p/there-bmc-series-journals#journalist" target="_blank">BMC series</a> ?"	9fd45cb0-5373-4982-b63f-9e8611e95d25

[Click here to view linked References](#)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic variants in the *SUCLG2* gene.**

Running title: Mitochondrial disease due to *SUCLG2* gene.

Authors: Ana V. Marco Hernández<sup>1\*</sup>, Miguel Tomás Vila<sup>2</sup>, Alejandro Montoya Filardi<sup>3</sup>, Alberto Blázquez<sup>4</sup>, Ana Cano Sánchez<sup>5</sup>, Miguel A. Martín<sup>4</sup>, Sandra Monfort<sup>1,5</sup>, Francisco Martínez<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Genomics Unit, Instituto Investigación Sanitaria La Fe.

<sup>2</sup>Departments of Neuropediatric, <sup>3</sup>Radiology, <sup>4</sup>Children's cardiology units, <sup>5</sup>Genetics Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia.

<sup>4</sup>Mitochondrial Diseases Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12). Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

\*Correspondence: Ana Victoria Marco Hernández

Present address: Neuropediatrics Section, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Av. Fernando Abril Martorell, 106, Valencia-46026, Spain.

Tel.: +34 961244108. E-mail: [marco\\_anaher@gva.es](mailto:marco_anaher@gva.es)

## Abstract

1 Succinyl-CoA synthase catalyzes the reversible synthesis of succinyl-CoA from  
2  
3 succinate and coenzyme A. The functional enzyme is a heterodimer composed of one  $\alpha$   
4  
5 subunit encoded by *SUCLG1*, and one  $\beta$  subunit, codified by two alternative genes,  
6  
7  
8 *SUCLG2* for the GTP isoform and *SUCLA2* for the ATP isoform.

9  
10  
11  
12 Mutations in both the *SUCLG1* and *SUCLA2* genes have been associated with  
13  
14 mitochondrial DNA depletion syndrome, characterized by variable digestive,  
15  
16 neurological, hepatic, muscular and cardiac involvement. Conversely, patients with  
17  
18 symptoms secondary to alteration in the *SUCLG2* gene have not yet been described.

19  
20  
21  
22 Two heterozygous probably pathogenic missense variants were detected in the *SUCLG2*  
23  
24 gene in a 6-year-old female patient with lactic acidosis, transitory hypertrophic  
25  
26 cardiomyopathy, visual deficit and atypical autistic regression with severe intellectual  
27  
28 disability, symptoms compatible with mitochondrial disease. Muscular biopsy  
29  
30 confirmed a deficiency of mitochondrial respiratory chain complex I. Here we propose  
31  
32  
33 *SUCLG2* as a novel candidate gene causing mitochondrial dysfunction.

34  
35  
36  
37 **Keywords:** cardiomyopathy, mitochondrial complex I, NDPK, autistic regression,  
38  
39 Succinyl-CoA synthase (SCS), *SUCLG2* gene  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 1. Introduction

The *SUCLG2* gene encodes the  $\beta$  subunit that is part of Succinyl-CoA synthase (SCS). This enzyme is a heterodimer composed of one  $\alpha$  subunit encoded by *SUCLG1*, and one  $\beta$  subunit, which determines the enzyme's nucleotide specificity. The GTP-specific  $\beta$  subunit encoded by *SUCLG2* is a component of the second SCS isoform (EC 6.2.1.4), which catalyzes GDP-dependent reactions [1]. On the other hand, the ATP-specific  $\beta$  subunit, encoded by the *SUCLA2* gene, catalyzes ATP-dependent reactions [2]. SCS is a mitochondrial matrix enzyme that catalyzes the reversible synthesis of succinyl-CoA from succinate and CoA. The reverse reaction occurs in the Krebs cycle, while the forward reaction may produce succinyl-CoA for activation of ketone bodies and heme synthesis. The expression of *SUCLA2* is stronger than *SUCLG2* in nearly all tissues, especially in those highly dependent on oxidative metabolism for ATP production (heart, brain, and skeletal muscle), whereas *SUCLG2* is predominantly expressed in tissues that are involved in biosynthetic pathways such as gluconeogenesis (liver and kidney). This is consistent with the role of *SUCLG2* in the generation of GTP for specialized functions [1, 3]. Mutations in both the *SUCLG1* and *SUCLA2* genes have been associated with the mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndromes (MTDS), MTDPS5 and MTDPS9, respectively (table 1). MTDS is a genetically heterogeneous group of autosomal recessive mitochondrial disorders (MD) (15 genes reported so far) characterized by a significant decrease of mtDNA content with accompanying reduction of the activities of the mitochondrial respiratory chain (MRC) complexes having subunits encoded by the mtDNA (complexes I, III, and IV), and the ATP synthase (complex V). MTDS are usually manifested in infancy or childhood in a tissue-specific manner mainly affecting brain and muscle [4-6].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

The main function of the mitochondria is the production of cellular energy synthesizing ATP through the coordinated action of the respiratory chain and oxidative phosphorylation [7]. Mitochondrial disorders display a wide clinical spectrum in terms of symptoms, age of presentation and severity. Characteristically, they tend to have a multisystemic and progressive presentation.

In the perinatal period, the classic presentation is hypotonia and lactic acidosis. In some cases, it is also associated with encephalopathy and crisis. At the cardiac level, the presence of both hypertrophic and dilated cardiomyopathy is characteristic. Proper mitochondrial function is critical for tissues and organs with high energy demands, including the heart. Functional abnormalities of cardiac mitochondria in cardiovascular disease (CVD) lead to enhanced oxidative stress, diminished ATP production and energy supply, increased cell apoptosis, and impaired autophagic mechanisms [8-12].

It is also possible that symptoms appear later in childhood and adulthood, with cardiac, muscular, endocrine and/or neurological signs being characteristic. The presence of progressive external ophthalmoplegia, optic atrophy, pigmentary retinopathy, sensorineural deafness, axonal peripheral neuropathy, renal tubulopathy, exercise intolerance, cardiomyopathy, migraine, seizures, encephalopathy/dementia, ataxia and diabetes mellitus should make us think of MD [4]. Furthermore, there is growing evidence that mitochondrial dysfunction appears to be closely associated with at least a subset of patients with Autism spectrum disorders (ASD) [13].

Surprisingly, no patient has been so far reported with mitochondrial depletion syndrome or any other clinical phenotype secondary to mutations in the *SUCLG2* gene. Here we report on a 6-year-old female patient associated with two heterozygous probably pathogenic variants in the *SUCLG2* gene.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 2. Materials and Methods

### 1. Research context

The patient was included in a research study carried out in pediatric patients with neurodevelopmental problems and identification by next-generation sequencing (NGS) of pathogenic or probably pathogenic genetic variants, following recommendations of the American College of Medical Genetics and Genomics [14]. Detailed clinical data were retrospectively collected from the medical records of all participants, and a semi-structured interview was conducted at the time of inclusion. An extensive physical examination with systematized data collection, somatometry and collection of a photograph of the face was performed in all patients who attended the consultation when the families gave their consent. This study was approved by the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). Informed consent was obtained from the parents of all participants.

### 2. Genetic studies

Peripheral blood samples from individuals and their parents for the genetic studies were collected by standard methods. Genomic DNA was isolated using the Qiacube extractor (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA purity and concentration were measured using the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen), respectively.

Massive parallel sequencing for exome sequencing was performed by using the commercial clinical exome SureSelect CCP17 Exome (Agilent Technologies). The libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 following the manufacturer's protocol to get a minimum reading depth of 100X. Sequence read alignments; variant detection and annotation were performed in *Alissa Interpret* platform (Agilent

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Technologies). All disease-causing genes related to neurodevelopmental disorders described and other candidate genes in different databases were analyzed. To evaluate the clinical impact and to assess the pathogenicity of variants in exome sequencing we applied the previously described criteria [15]. Clinically relevant genetic variants detected were confirmed by Sanger sequencing from purified PCR products. All primers for amplification and sequencing were designed with exon-primer (primers and PCR conditions are available on request).

### 3. Results

The patient is a 6-years-old girl born to non-consanguineous parents, after a bi-chorionic bi-amniotic twin pregnancy of an elderly mother (45 years old). The conception was natural. In the first trimester of pregnancy, she presented a threat of abortion. Amniocentesis was performed, which was normal. The birth was by cesarean at 35 weeks gestational age. She had low birth weight, with a weight of 1730g (p3-5), height, 41cm (p<3) and head circumference, 32cm (p50-90) [16]. Perinatal was without incidents. She had a healthy male twin brother, also underweight (1700g p <3). She has no other siblings.

Initially, she was admitted to a regional hospital due to prematurity and low weight, and at 6 days of life, it was decided to transfer to a referral hospital for suspected metabolic disease [17]. At 7 days of life, the presence of complex heart disease consisting in a wide aortopulmonary window (8-10mm) type A and aortic arc interruption was confirmed (Fig 1). She required supportive treatment with bicarbonate infusion due to metabolic acidosis [arterial blood gas: pH 7.22 (7.35-7.45), pCO<sub>2</sub> 26.2 mmHg (35-45), bicarbonate 10.5 nmol/L (22-26), EB -15.7 nmol/L (-5 -5), lactic acid 10.7 nmol/L (0.3-1.6)]. Until the intervention, she required support with dobutamine and prostaglandins.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Broad-spectrum antibiotic therapy with cefotaxime and vancomycin and intensive respiratory support were prescribed.

At 13 days of life, corrective extracorporeal surgery was performed. Double ligation of the ductus and section of the ductus was performed. Direct anastomosis of the descending aorta is performed with the aortic arch (aortic advance). Seven days after the intervention, an attempt was made to extubate, although extreme bradycardia required advanced cardiopulmonary resuscitation (CPR) maneuvers. She maintains cardiomegaly and biventricular hypertrophy, predominantly right, unknown, despite anti-congestive treatment and Digoxin so a cardiac MRI was performed (Fig 1). For this reason, fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders were studied and were normal. A 22q11 deletion was also ruled out.

Remodeling treatment with spironolactone was prescribed for a month, with complete regression of ventricular hypertrophy. However, intra-atrial communication (IAC) fossa oval persists with current exclusive I-D short circuit.

In the evaluation carried out after the intervention, a sign of periventricular leukomalacia was detected on magnetic resonance imaging (Fig 3). In addition, neonatologists reported included fists and increased tone in the lower extremities.

Later, the patient presented feeding difficulties with very good evolution. Patient was followed up with rehabilitation and early stimulation.

Psychomotor development was normal (sitting at 8 months, crawling at 10 months, walking with assistance at 12 months), with a slight delay in autonomous walking (18-20 months). Regarding language, the family reported that the first words were said at 12 months. At the age of 2 years, the vocabulary was wide although she did not put two words together, but she counted from one to ten and sang songs. Socialization was adequate, she had good eye contact and began symbolic play . At the age of 3 years,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

she presented a regression in developmental milestones, losing language completely.

She presented persistent stereotyped movements (bruxism, episodes of hyperventilation, restraining her hands, tilting her head). She also lost a purposeful use of hands and presented gross motor clumsiness compatible with ataxia.

In addition, she was being followed up by ophthalmology for suspected visual deficit. At that time, a MD was suspected. A complete metabolic study was carried out (study of very long-chain fatty acids, organic acids, purines and pyrimidines, and lactic acid) including neurotransmitters in cerebrospinal fluid, all of them were normal.

The enzymatic study of ceroid lipofuscinosis CLN1 and CLN2 was also carried out, which was normal. The quadriceps muscle biopsy was normal.

In the brain MRI control performed at that time, an increase in brain atrophy and the already known signs of periventricular leukomalacia were observed (Fig 4).

Mitochondrial respiratory chain spectrophotometric analysis in muscle homogenate showed a decrease in complex I activity (NADH-Decylubiquinone oxidoreductase) ( $13.5 \text{ nmol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  expressed as a percentage of the citrate synthase (CS) activity; percentile 2.5 of controls, significant if  $<15$ ) was detected. The rest being normal complexes, mitochondrial DNA depletion was not detected either.

A genetic study was carried out, with array CGH which was normal. In the exome sequencing study, alterations in the *MECP2* gene or other genes related with a Rett-like phenotype were ruled out. After exhaustive analyses of known and candidate genes presumably related with neurodevelopmental disorders, only two heterozygous probably pathogenic variants were prioritized in *SUCLG2* gene (GenBank accession # NM\_003848.4). The heterozygous variant c.235G>A (p.Glu79Lys) and the heterozygous variant c.517G>C (p.Gly173Trp) modify two highly conserved amino-acids, for which the *in-silico* analyses (Polyphen, SIFT, DANN, CADD) suggest a

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

probably pathogenic consequence, while HSF predicts an alteration of an exonic splicing enhancer (ESE) for the former, which could conceivably affect the efficiency of the acceptor site of exon 3. Both are reported at very low allele frequencies in the gnomAD database (0.00009 and 0.00004, respectively), with no homozygotes reported. Unfortunately, familial study could not be performed because the parents refused the genetic study for religious reasons. However, it is worth noting that both variants are present in very different allele frequencies in distinct populations (according to gnomAD database), what suggests that they segregate independently, so they are most likely in compound heterozygosity in our patient. Finally, a therapeutic trial with cofactors was carried out without significant improvement in symptoms [4, 5].

#### 4. Discussion

Patients with neurodevelopmental disorders may benefit from early genetic diagnosis that can save time and overall cost by reducing the amount resources and time expended to reach a diagnosis [18-20]. With the increased availability of genetic studies, especially the application of the mass sequencing study, many patients with neurodevelopmental disorders of varying degrees of severity will be diagnosed etiologically.

In this patient there is a very strong clinical suspicion that it is a MD. In the first place, in the first days of life, she presented severe lactic acidosis not justified by her heart disease, since her ductus arteriosus was open and she was treated with prostaglandins. Patient also had a low birth weight. In addition, in the first months of life she presented significant respiratory problems due to weakness and failure to thrive. In her neurological evolution, she presented a moderate periventricular leukomalacia (Fig 2),

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

which was initially asymptomatic since the patient presented good psychomotor development up to 3 years of age. At that time, she presented a severe autistic regression, with total loss of language, and severe intellectual disability. In addition, she showed motor clumsiness and visual deficit. The family reports fatigue with mild exercise.

The main function of the mitochondria is the production of ATP. MDs characterized by defects in the respiratory mitochondrial chain, thus affecting tissues with high energy demands, such as the heart, brain, muscles and endocrine system.

Therefore, patients with MD tend to have a multisystemic presentation. One of the organs with the most energy demand is the heart. Mitochondrial cardiomyopathy has been defined as a myocardial condition characterized by abnormal heart-muscle structure, function, or both, secondary to genetic defects involving the mitochondrial respiratory chain, in the absence of concomitant coronary artery disease, hypertension, valvular disease, or congenital heart disease. The typical cardiac manifestations of MD are hypertrophic and dilated cardiomyopathy, arrhythmias, left ventricular myocardial noncompaction, and heart failure. Mitochondrial crisis is often precipitated by physiologic stressors such as a febrile illness or surgery and can be accompanied by acute heart failure [11].

In our patient there was a previous congenital malformation with interruption of the aortic arch and wide aortopulmonary window. Rivera et al published a case of a patient with MDS secondary to *SUCLG1* with interrupted aortic arch [21]. On the other hand, the cardiac hypertrophy detected after extracorporeal surgery was not justified by the clinical condition of the patient. Regression of cardiac hypertrophy has not been described in patients with MD.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Our patient also present an atypical autistic regression with subsequent clinical stabilization, persisting the almost absence of language, visual contact deficit and continuous stereotypies. ASD are a heterogeneous group of neurodevelopmental conditions, characterized by early-onset impairments in social communications and restricted repetitive interest and behaviors [22, 23]. There are more than 1000 genes associated with increased risk of ASD [24, 25]. It's known that MD appears to be closely associated with at least a subset of patients with ASD [13].

This subgroup of patients present some characteristic clinical aspects such as unusual neurodevelopmental regression (52%), many times triggered by an inflammatory event, seizures (41%), motor delays (51%), fatigue, lethargy, gastrointestinal symptoms (74%), female gender (39%), elevated lactate (78%) and pyruvate (45%) [26]. They represent 5.0% of all patients with ASD (95% confidence interval 3.2 - 6.9%), much higher compared to the prevalence of MD in the general population (0.01%) [27]. In addition, a genetic relationship has also been found between ASD and mtDNA genetic mutations or deletions of nuclear genes regulating mitochondrial function. The presence of dysfunction of the complexes of the mitochondrial respiratory chain or electron transport chain, indicating abnormal oxidative phosphorylation, has been reported in patients with ASD and in the autopsy samples of brains [27-29].

SUCL deficiency represents a rare MTD syndrome. Patients harboring mutations in *SUCLA2* or *SUCLG1* have been rarely reported in the literature [30].

Table 2 contains a summary of the symptoms presented by patients with pathogenic variants in the *SUCLG1* and *SUCLA2* genes [4] (Table 2). So far, no patient with pathogenic variants in *SUCLG2* gene has been published and consequently, it was proposed that the deficiency of this gene could be incompatible with life [31]. If this is the case, we hypothesize that at least one of the two variants in our patient is probably

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

mild (hypomorphic), that is causing a partial loss of gene function, this would explain why a depletion of mitochondrial DNA has not been evidenced. Similarly, patients with a *SUCLG1* mutation who also have a reduced degree of mtDNA depletion have been described despite presenting a severe clinical course and not appreciable changes in ETC activities [31]. Relevant to this, reports of patients exhibiting mutations in either *SUCLG1* [32, 33], or, *SUCLA2* [34, 35] with no significant changes in ETC activities and/or mtDNA depletion appear in the literature. The existence of patients showing mild decrease or normal levels of mtDNA while exhibiting a severe symptomatology highlights that there are mechanisms other than mtDNA depletions, which are responsible for the manifestations of the disease. Thus, the concept that the severity of the clinical phenotype in SUCL deficiency patients correlates with the degree of mtDNA depletion [21] is probably true only if a threshold in the extent of depletion is reached.

## 5. Conclusions

Our patient presents many findings compatible with MD as well as alteration of complex I of the respiratory chain, although we have not been able to confirm mitochondrial DNA depletion, as expected for a deficit in the GTP-specific succinyl-CoA synthetase. However, here we propose that hypomorphic mutations in *SUCLG2* gene cause a clinical picture similar to mitochondrial depletion syndromes.

## Abbreviations

SCS: Succinyl-CoA synthase; mtDNA: mitochondrial DNA; mtDNA: mitochondrial DNA; MTDS: depletion syndromes; MD:mitochondrial disorders; MRC:mitochondrial respiratory chain; CVD: cardiovascular disease; ASD: Autism spectrum disorders;

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

NGS: next-generation sequencing; CPR: cardiopulmonary resuscitation; IAC: intra-atrial communication; CS: citrate synthase; ESE: exonic splicing enhancer.

**Ethics approval and consent to participate**

This study was approved by the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). Informed consent was obtained from the parents of all participants

**Consent for publication**

All patients gave informed consent to the publication of this study.

**Availability of data and materials**

All data generated or analysed during the study of this patient are included in this published article.

**Funding**

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III-Río Hortega [grant CM19/00181] and by ISCIII and ERDF funds (FEDER) to MAM [grant PI18\_01374]. No funding body was directly involved in design, analysis, and publication of this study.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

AVMH was responsible for data acquisition, analysis of case, conceptualization of study and manuscript preparation. FM contributed to data acquisition, analysis of case, conceptualization of study and reviewed the final version. MTV, AMF, ACS, SMM, AB, MAM contributed in analysis of case. All of the authors have read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We warmly thank all the patients and their families for their involvement in this study. No other professionals participated in the preparation of the article.

## 6. References

1. Johnson J D, Melhus J G, Tews K, et al. Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes. *J Biol Chem.* 1998;273:27580-27586.
2. Miller C, Wang L, Ostergaard E, Dan P, Saada A. The interplay between *SUCLA2*, *SUCLG2*, and mitochondrial DNA depletion. *Biochim biophys Acta.* 2011;1812:625-629.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

3. Johnson J D, Muhonen WW, Lambeth DO. Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeon. *J Biol Chem.* 1998;273:27573–27579.
4. Basel D. Mitochondrial DNA Depletion Syndromes. *Clin Perinatol.*2020;47(1): 123-141.
5. Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes- Many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord.*2010;20(7):429-437.
6. Poulton J, Hirano M, Spinazzola A, et al. Collated mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (excluding the mitochondrial gamma polymerase, POLG1). *Biochim Biophys Acta.*2009;1972(12):1109–112.
7. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells.*2019;8:680.
8. Finsterer J, Rudolfstiftung K, Mahjoub SZ. Cardiac Manifestations of Mitochondrial Disorders. *Tex Heart Inst J.*2013;40,5:634-635.
9. Yang Y, Gao H, Zhou H, et al. The role of mitochondria-derived peptides in cardiovascular disease: Recent Updates. *Biomed Pharmacother.* 2019;117:109075.
10. Berardo A, Musumeci O, Toscano A. Cardiological manifestations of mitochondrial respiratory chain disorders. *Acta Myol.* 2011;30(1):9-15.
11. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial Cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J.*2013;40(4):385-94.
12. Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, et al. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: A brief Review. *Ann Med.* 2017;50(2): 121-127.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

13. Citrigno L, Muglia M, Quattieri A, et al. The Mitochondrial Dysfunction Hypothesis in Autism Spectrum Disorders: Current Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.*2020;21(16):5785.

14. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-424.

15. Martinez F, Caro-Llopis A, Rosello M, et al. High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *J. Med. Genet.* 2017;54(2):87-92.

16. Grantz KL, Hediger ML, Liu D, Buck Louis GM. Fetal growth standards: the NICHD fetal growth study approach in context with INTERGROWTH-21st and the World Health Organization Multicentre Growth Reference Study. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2S):S641-S655.e28.

17. Ferreira CR, van Karnebeek CDM. Inborn errors of metabolism. *Handb Clin Neurol.* 2019;162: 449-481.

18. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature.*2014;511(7509):344-7.

19. Retterer K, Jussola J, Cho MT, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med.* 2016;18(7):696-704.

20. Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, et al. Whole-genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in paediatric medicine. *NPJ Genom Med.* 2016;1:15012.

21. Rivera, H., Merinero B., Martinez-Pardo M., et al. Marked mitochondrial DNA depletion associated with a novel *SUCLG1* gene mutations resulting in lethal

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

neonatal acidosis, multi-organ failure, and interrupted aortic arch.

Mitochondrion. 2010;10(4):362-8.

22. Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. Lancet. 2014; 383(9920): 896-910.
23. APA. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5<sup>th</sup> ed.). Washington, DC: *American Psychiatric Association*. (2013).
24. Krumm N, O’Roak BJ, Shendure J, Eichler EE. A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. Trends Neurosci. 2014;37 (2):95-105.
25. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. Nature. 2010;466(7304):368-72.
26. Rose S, Niyazov DM, Rossignol DA, et al. Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. Mol Diagn Ther. 2018;22:571-593.
27. Rossignol DA, Frye RE. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. Mol Psychiatry. 2012;17(3): 290-314.
28. Legido A, Jethva R, Goldenthal MJ. Mitochondrial Dysfunction in Autism. Seminars in Pediatric Neurology. 2013;20(3):163-175.
29. An JY, Cristino AS, Zhao Q, et al. Towards a molecular characterization of autism spectrum disorders: an exome sequencing and systems approach. Transl Psychiatry. 2014; 4(6):e394.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

30. Carrozzo R, Verrigni D, Rasmussen M, et al. Succinate-CoA ligase deficiency due to mutations in SUCLA2 and SUCLG1: phenotype and genotype correlations in 71 patients. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39(2):243-52.

31. Chinopoulos C, Batziou S, van den Heuvel LP, et al. Mutated SUCLG1 causes mislocalization of *SUCLG2* protein, morphological alterations of mitochondria and an early-onset severe neurometabolic disorder. *Mol Genet Metab.* 2019;126(1):43-52.

32. Valayannopoulos V, Haudry C, Serre V, et al. New SUCLG1 patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria. *Mitochondrion.* 2010;10(4): 335-41.

33. Sakamoto O, Ohura T, Murayama K, et al. Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the SUCLG1 gene. *Pediatr Int.* 2011;53(6):921-5.

34. Huang X, Bedoyan JK, Demirbas D, et al. Succinyl-CoA Synthetase (SUCLA2) deficiency in two siblings with impaired activity of other mitochondrial oxidative enzymes in skeletal muscle without mitochondrial DNA depletion. *Mol Genet Metab.* 2017;120(3):213-222.

35. Alkhater RM, Ahonen S, Minassian BA. SUCLA2 Arg407Trp mutation can cause a nonprogressive movement disorder-deafness syndrome. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021;8(1):252-258.

**Legends of figures**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 1. Echocardiography showing wide arotopulmonary window (8-10mm) type A and aortic arc interruption (**Image A**) and interruption of the aortic arch (**Image B**) (**Image C**) Echocardiography 3 days before the intervention in which normal-sized cardiac ventricles are observed.

Figure 2. (**Image A**): Echocardiography showing severe perioperative biventricular hypertrophy 32 days after extracorporeal repair surgery. (**Image B**) Cardiac magnetic resonance coronal section 2C cine and (**Image C**) cardiac magnetic resonance axial section 4C cine and (**Image D**) sagittal section T2, 60 days after the intervention in which persistence of cardiac ventricular hypertrophy is observed.

Figure 3. Axial FLAIR T1WI, 16 months old and coronal FLAIR (**image A**). One year later (axial FLAIR T2 WI, **image B**) notice enlarged ventricles and subarachnoid space due to supratentorial atrophy.

Coronal FLAIRT2 WI showed straight atrial margins and high periventricular signal (arrowheads in **image C**). These findings suggest periventricular leukomalacia (PVL) due to previous hypoxic event. Sagittal T1 WI (**image D**), corpus callosum is completely formed but is diffusely thin in caliber (arrowheads), consistent with PVL.

Figure 4. Axial and coronal FLAIR image (**A and B**) showing enlarged ventricles, enlarged subarachnoid space, straight atrial margins and high periventricular signal (arrowheads). These findings suggest periventricular leukomalacia (PVL) due to previous hypoxic event.

Sagittal T1 WI (**image C**), corpus callosum is completely formed but is diffusely thin in caliber (arrowheads), consistent with PVL.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Table 1. Clinical Subtypes of the Mitochondrial DNA depletion syndromes [4].

MDS	Gene	Phenotype
MTDPS1 MTDPS4B	<i>TYMP</i> <i>POLG</i>	Neurogastrointestinal subtypes
MTDPS3 MTDPS4A MTDPS15	<i>DGUOK</i> <i>POLG</i> <i>TFAMA</i>	Hepatocerebral subtypes
MTDPS2 MTDPS11	<i>TK2</i> <i>MGME1</i>	Myopathic subtypes
MTDPS10 MTDPS12A MTDPS12B	<i>AGK</i> <i>SLC25A4</i> <i>SLC25A4</i>	Cardiomyopathic subtypes
MTDPS5 MTDPS8A MTDPS9 MTDPS13 MTDPS14	<i>SUCLA2</i> <i>RRM2B</i> <i>SUCLG1</i> <i>FBXL4</i> <i>OPA1</i>	Encephalomyopathic subtypes

Table 2. Clinical phenotypes associated with the three genes that make up SCS [4].

Gen	<i>SUCLA2</i>	<i>SUCLG1</i>	<i>SUCLG2</i>
<b>Type of inheritance</b>	AR	AR	AR
<b>Starting age</b>	Childhood	Childhood	Perinatal
<b>Growth</b>	Failure to thrive	Failure to thrive	SGA, Failure to thrive
<b>Facial</b>	Facial diplegia		
<b>Hearing</b>	Sensorineural Deafness	Hearing loss	
<b>Ocular</b>	Ophthalmoplegia ptosis		Optic neuropathy
<b>Cardiology</b>			Transitory hypertrophic cardiomyopathy
<b>Respiratory</b>	Respiratory failure due to weakness	Respiratory failure due to weakness	Respiratory failure (intubation)
<b>Gastrointestinal</b>	Feeding problems	Feeding problems	Feeding problems
<b>Skin</b>		Hyperhidrosis	
<b>Músculoskeletal</b>	Weakness	Severe mitochondrial myopathy	
<b>Neurological</b>	Psychomotor retardation Loss of the gait Hypotonia, seizures, athetoid abnormal movements, dystonia, spasticity, hyporeflexia	Severe axial hypotonia Severe psychomotor retardation	Ataxia, Hypotonia Autistic regression Stereotypes, progressive Psychomotor retardation
<b>NMR brain</b>	Brain atrophy, altered basal ganglia	Brain atrophy, ventricles enlargement. Basal ganglia injuries	Periventricular leukomalacia, brain atrophy
<b>PNS</b>	Axonal Demyelinating neuropathy		Normal
<b>Behavioral/psychiatric manifestations</b>	Irritability/inconsolable crying		ASD, Autistic regression
<b>Endocrine features</b>		Hypoglycemias	

AR: Autosomal recessive; ASD: autism spectrum disorders; NMR: magnetic resonance imaging; PNS: peripheral nervous system; SGA: Small for Gestational Age.

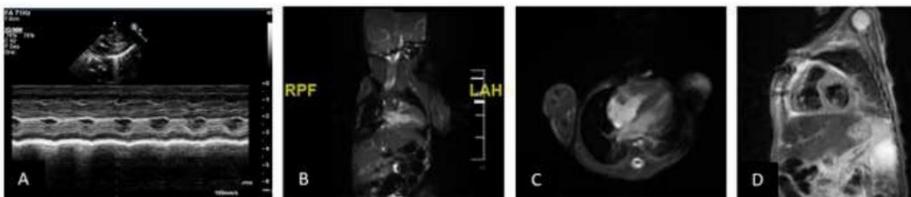
Figure

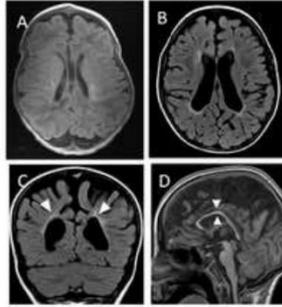
[Click here to access/download;Figure;FIGURE 1.tif](#)



Figure

[Click here to access/download;Figure;FIGURE 3.tif](#)





Finalmente, el último trabajo que presentamos se trata de un artículo que actualmente se encuentra en revisión, en el que presentamos un caso clínico con clínica neuropsiquiátrica grave. El paciente es un niño con un TEA con regresión autista atípica y un trastorno de conducta refractario al tratamiento. El paciente presenta una variante patogénica de pérdida de función en el gen *ZNF292*, que es un gen causante de discapacidad intelectual de reciente descripción, además de otra variante de pérdida de función en el gen *SRGAP3*, ambas *de novo*. Proponemos que la segunda variante en *SRGAP3* actúa como modificadora del fenotipo.

**Marco-Hernández AV, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Matamoros JM, Monfort S, Martínez, F. Short report: *SRGAP3* as a possible genetic modifier of the phenotype associated to *de novo* mutation in *ZNF292*: autistic regression and severe conduct disorder. *Frontiers in Genetics*. En revisión.**

Las variantes de *ZNF292* se han asociado recientemente con discapacidad intelectual (DI) leve a grave, en muchos casos asociada a trastorno del espectro autista (TEA) y/o TDAH. *ZNF292* codifica una proteína zinc-*finger* altamente conservada, un factor de transcripción que se expresa en el cerebro humano en desarrollo y es fundamental para el neurodesarrollo. Actualmente, solo 28 individuos con variante patogénicas *de novo* se han descrito en *ZNF292*. Aportamos a un varón de 6 años con un trastorno de conducta grave, discapacidad intelectual y macrocefalia en quien se detectó una mutación de cambio de pauta de lectura *de novo* en el gen *ZNF292*, además de la variante de *splicing* c.2227+1G>T en el gen candidato *SRGAP3*.

Aquí proponemos que la variante en el gen *SRGAP3* podría haber actuado como modificador del fenotipo asociado a la variante en el gen *ZNF292*, causando autismo severo con regresión autista y trastorno de conducta grave.

## SRGAP3 as a possible genetic modifier of the phenotype associated to de novo mutation in ZNF292: autistic regression and severe conduct disorder

Ana V. Marco Hernandez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Spain

**Submitted to Journal:**  
Frontiers in Genetics

**Specialty Section:**  
Behavioral and Psychiatric Genetics

**Article type:**  
Brief Research Report Article

**Manuscript ID:**  
804759

**Received on:**  
29 Oct 2021

**Revised on:**  
07 Dec 2021

**Journal website link:**  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

### **Author contribution statement**

Ana Victoria Marco-Hernández: drafting of the article, clinical examination of the patients, bibliographic search.  
Miguel Tomás Vila: revising the article for important intellectual content, contribution to clinical data analysis.  
Alejandro Montoya Filardi: substantial contributions to analysis and interpretation of MNR data.  
Juan Manuel Matamoros: substantial contributions to analysis and interpretation of clinical data.  
Beatriz Beseler Soto: revising the article for important intellectual content, contribution to clinical data analysis.  
Alba Gabaldón Albero: revising the article for important intellectual content, contribution to clinical data analysis.  
Francisco Martínez Castellano: analysis and interpretation of genetic data and revising of the article and final approval

### **Keywords**

Autism Spectrum Disorders, Autistic regression, Conduct Disorder, SRGAP3 gene, ZNF292gene

### **Abstract**

Word count: 134

ZNF292 variants have been recently associated with a range of neurodevelopmental features including autism spectrum disorder (ASD) and intellectual disability (ID). ZNF292 encodes a highly conserved zinc finger protein, a transcription factor that is expressed in the developing human brain and it is critical for neurodevelopment. Currently, only 28 individuals with de novo pathogenic variants in ZNF292 have been described. We provide a 6-years-old male with a severe conduct disorder, intellectual disability and macrocephaly in who a de novo frameshift mutation in the ZNF292 gene was detected, in addition to the splice site variant c.2227+1G>T in the candidate gene SRGAP3.

Here we propose that the variant in SRGAP3 gene could have acted as a modifier of the phenotype associated to variant in ZNF292 gene, causing severe autism with autistic regression and severe conduct disorder.

### **Contribution to the field**

In-depth clinical evaluation of patients with severe ASD with or without autistic regression, we must think that in many cases they are due to genetic causes. The clinical phenotype associated with pathogenic variations in the ZNF292 gene is yet to be determined, and can be modulated by variations in other candidate genes.

### **Ethics statements**

#### **Studies involving animal subjects**

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

#### **Studies involving human subjects**

Generated Statement: The studies involving human participants were reviewed and approved by Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

#### **Inclusion of identifiable human data**

Generated Statement: Written informed consent was obtained from the minor(s)' legal guardian/next of kin for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

#### **Data availability statement**

Generated Statement: The authors acknowledge that the data presented in this study must be deposited and made publicly available in an acceptable repository, prior to publication. Frontiers cannot accept a manuscript that does not adhere to our open data policies.

***SRGAP3* as a possible genetic modifier of the phenotype associated to de novo mutation in *ZNF292*: autistic regression and severe conduct disorder.**

Running title: **Autistic regression and severe conduct disorder due to *SRGAP3* and *ZNF292* genes.**

Financing: Grant Río Hortega CM19/00181.

Authors: Ana Victoria Marco Hernández<sup>1,2</sup>, Miguel Tomás Vila<sup>2</sup>, Alejandro Montoya Filardi<sup>3</sup>, Juan Manuel Matamoros<sup>4</sup>, Beatriz Beseler Soto<sup>2</sup>, Alba Gabaldón Albero<sup>2</sup>, Francisco Martínez Castellano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Genetics Unit, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Neuropediatrics Section, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

<sup>3</sup>Radiology Service, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

<sup>4</sup>Child Psychiatry Service, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

Correspondence: Ana Victoria Marco Hernández

Teléfono: 961244108

E-mail: [marco\\_anaher@gva.es](mailto:marco_anaher@gva.es)

#### **Abstract 200**

*ZNF292* variants have been recently associated with a range of neurodevelopmental features including autism spectrum disorder (ASD) and intellectual disability (ID).

*ZNF292* encodes a highly conserved zinc finger protein, a transcription factor that is expressed in the developing human brain and it is critical for neurodevelopment.

Currently, only 28 individuals with *de novo* pathogenic variants in *ZNF292* have been described. We provide a 6-years-old male with a severe conduct disorder, intellectual disability and macrocephaly in who a *de novo* frameshift mutation in the *ZNF292* gene was detected, in addition to the splice site variant c.2227+1G>T in the candidate gene *SRGAP3*.

Here we propose that the variant in *SRGAP3* gene could have acted as a modifier of the phenotype associated to variant in *ZNF292* gene, causing severe autism with autistic regression and severe conduct disorder.

**Keyword:** autism spectrum disorders, autistic regression, conduct disorder, *SRGAP3* gene, *ZNF292*gene.

## 1. Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder of heterogeneous etiology characterized by alteration in social communication and the presence of restricted interests and behaviors [1]. It affects approximately 1% of the population worldwide. It is known that between 15-47% of patients with ASD present autistic regression. Regression is characterized by the loss of previously-acquired skills, especially involving a loss of speech or / and social responsivity, having presented a period of normal or near normal early development. This group of patients tends to develop severe ASD [2].

ASD is supposed to have a multifactorial origin, including environmental, perinatal, immunological, and genetic factors. In recent decades, remarkable progress has been made in the genetic study of ASD and there are currently more than 1000 genes presumably associated with increased risk for ASD and/or ID [3]. New candidate genes for ASD are continually being published, but the diagnostic yield remains controversial, depending among other factors on the series studied and the techniques used [4, 5].

In 2012 de Ligt *et al* described the *ZNF292* gene for the first time as a possible candidate gene for neurodevelopmental disorder [6]. In the next 8 years, 8 more probands were published. Recently Mirzaa *et al* have published the phenotypic description of 28 individuals with *de novo* or inherited variants in *ZNF292*. All of them had intellectual disability (ID) with or without ASD or ADHD, except for one of them who presented ASD without ID with speech delays at age 6 years. Other findings found in this series have been the presence of language regression, short stature, tone abnormalities (hypo and hypertonia), dysmorphic facial features, ocular abnormalities, alteration of head occipitofrontal circumference (microcephaly) and brain abnormalities (ventriculomegaly, callosal abnormalities and periventricular nodular heterotopia) [7].

On the other hand, it was previously known that deletions of the 6q locus containing the *ZNF292* gene have been identified in individuals with a range of developmental issues including ID and ASD, further supporting the role of this gene in neurobehavioral phenotypes. Other symptoms associated with these patients are trachea / laryngo / bronchomalacia, gastroesophageal reflux, congenital heart defects, brain defects, seizures, as well as respiratory and vision problems. However, these deletions include genes such as *COL12A1* (causes hypermobility), *MAP3K7* and *TBX18* (associated with congenital heart defects), as well as other genes implied in neurodevelopment in addition to *ZNF292*, such as *SYNCRIP*, *BAI3*, *HTR1B*, *KCNQ5*, *PHIP*, *HTR1E*, *RIMS1*, *AKIRIN2* and *EPHA7* [8].

The *ZNF292* gene encodes a highly conserved zinc finger protein that acts as a transcription factor related to growth hormone (GH) expression and as a tumor suppressor. Furthermore, *ZNF292* is highly expressed in the developing human brain, but its precise role in neurodevelopment is still unknown.

The phenotypic expression associated with a certain gene can be modified due to modifying variants present in other genes [9].

Variations in *SRGAP3* gene, located at chromosome 3p25, have been previously associated with ID [10, 11]. *SRGAP3* gene encodes the Slit-Robo GTPase-activating proteins (srGAPs), an adapter protein involved in regulate cytoskeletal reorganization through inhibition of the Rho GTPase Rac1 [12]. Studies in *Srgap3* *-/-* mice demonstrated association with neurodevelopmental disorder and schizophrenia-related intermediate phenotypes [13].

Here we present the clinical signs associated to *de novo* frameshift mutation in *ZNF292* gene in a 6-year-old male patient, and a possible modifier splice site variant in *SRGAP3* gene.

## 2. Methods

A detailed clinical study was carried out in our patient. Clinical data were retrospectively collected from the medical records, and a semi-structured interview was conducted at the time of inclusion. An extensive physical examination with systematized data collection, somatometry and collection of a photograph of the face was performed (see Supplemental Data for further details).

Whole-exome sequencing was performed by using the SureSelect Clinical Research Exome (Agilent Technologies). The libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 following the manufacturer's protocol to get a mean reading depth of 100X. Sequence read alignments, variant calling and annotation were performed in Alissa Interpret platform (Agilent Technologies). All disease-causing genes related with neurodevelopmental disorders described in different databases were analyzed. To evaluate the clinical impact and to assess the pathogenicity of variants in exome sequencing we applied the previously described criteria [14]. Validation and segregation studies of clinically relevant genetic variants were performed by Sanger sequencing from purified PCR products. Primers for amplification and Sanger sequencing were designed with ExonPrimer (URL <https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>). Primers and PCR conditions are available on request.

This study was approved by the local ethics committee of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain). Informed consent was obtained from the parents of our patient. The parents of the patient were involved in encouraging the present study in order to explain the conductal phenotype of the patient.

Brain MRI was systematically reviewed by an experienced pediatric neuroradiologist.

### 3. Results

The patient is a 6-years-old boy born to non-consanguineous healthy parents. Pregnancy and delivery without incident. There is no referred neurological history in his family.

At two months of age, he was admitted to hospital for the first time due to choking episodes due to physiological gastroesophageal reflux. At 5 months of life, he was referred to pediatric neurology for presenting acquired macrocephaly with 46cm CP (p>99, + 2.88 SD). The mother's circumference was 54.5cm (p39) and the father's head circumference 61cm (p99 + 2.31 SD), for which it was diagnosed of familial macrocephaly.

Neurologically, from the age of 5 months there was a tendency to hyperextension of the neck and hypertonia of the trunk, unrelated to feeding, and also presented significant irritability. At 8 months, unstable sitting and persistence of great irritability were observed. He acquired the milestones of psychomotor development normally (gait at 14 months), although with a slight language delay, and adequate socialization. At the cognitive level, no delay was detected, but there was great irritability with frequent tantrums and great motor restlessness.

Admission at 17 months of age, for complex febrile crisis, due to the recurrence of a second episode in the first 24 hours of the febrile process.

At 31 months he was diagnosed by a child psychiatrist of Specific Language Disorder (SLI) with suspected ASD traits, significant maturational delay with a developmental age of 22 months. He was followed up with rehabilitation and early stimulation.

Beginning of toilet training at 33 months. At 34 months, he began a sleep disorder compatible with night terrors.

At 39 months the parents consulted because the patient presented loss of acquired language (at that time he only babbled, echolalia occasionally), loss of sphincter control,

loss of the ability to perform symbolic play accompanied by a motor agitation with chaotic play, disorganized and hyperactive behavior, constant tantrums and hetero-aggressiveness. They do not report triggers, except for separation anxiety at the beginning of schooling at 34 months of age. For this reason, he was admitted, and continuous hyperkinesia, lack of sense of danger, lack of visual contact, lost gaze, lack of sustained attention, aggressiveness (he hit other children, the mother and threw objects) and self-aggression (he hit hand with door). Regarding language, there was patent echolalia, unintelligible speech and based on monosyllables. At the motor level, he maintained good fine and gross coordination, without neurological focus. Several therapeutic trials were conducted with risperidone, chlorpromazine (with paradoxical effect), dipotassium chlorazepate, aripiprazole, methylphenidate (rebound effect), quetiapine (excessive sedation), clonidine and melatonin without clinical improvement. At that time a complete metabolic study was carried out, with organic acids, amino acids in blood and urine, ammonium, homocysteine, copper and ceruloplasmin and oligosaccharides all of them normal. Study of antiNMDA antibodies in cerebrospinal fluid was normal. In the brain MRI performed at that time, a slight decrease in the anteroposterior diameter of the corpus callosum due to reduction of the splenium was observed with the presence of coarse operculums, mainly the left one, but without signs of polymicrogyria, which is probably secondary to mild dysmorphia due to the small caliber of the splenium. Also diffuse ectasia of perivascular spaces of Virchow Robin and wide cistern with right lateralization as a variant were described (see Figure 1). In the subsequent clinical course up to the age of 6 years, the patient has presented an extremely serious behavioral problems refractory to pharmacological treatment, presented self-injury, fractured elbow after fall, and pulled out several teeth. On the other hand, he presents episodes compatible with pluricotidian gellastic laughter,

disconnection episodes (about 2 or three a day) and episodes of nocturnal agitation. For this reason, given the suspicion that it was epilepsy, even when EEG and polysomnography were normal, treatment with valproate was prescribed.

On the other hand, he associates multiple continuous stereotypes, consisting of turning the head, shaking the hands and hitting the face. He presents periods of insomnia that are very difficult to control and that have been treated with melatonin, hydroxyzine, clonidine and risperidone.

Regarding language and socialization, there is a significant alteration of understanding, non-functional stereotyped language, no eye contact and an inability to learn. Autonomy is affected, although he is able to eat alone, he does not dress alone, no toilet training.

The head circumference is 57cm (p> 99, +3.34 SD).

Genetic study by array CGH was normal. In the exome sequencing study (see Supplemental Data), a heterozygous insertion of a base was found in the coding sequence of exon 8 of the *ZNF292* gene that causes a displacement of the reading frame from position 3950 (NM\_015021.1:c.3950delA) and the appearance of an early stop signal (p.Asn1317MetfsTer8), resulting in an incomplete protein that has lost several functional domains, so it was classified as pathogenic (PVS1, PM2, PS2). This change has not been described in the literature or databases (1000g, gnomAD, ClinVar). The study of his parents by Sanger sequencing confirmed a *de novo* occurrence.

On the other hand, the heterozygous splice site variant NM:014850.3:c.2227+1G>T was found in the *SRGAP3* gene. This variant has not been previously reported and is predicted to lead to aberrant splicing of exon 18 (of 22), being classified as likely pathogenic according to the ACMG recommendations (PS2, PM4, PM2, PP3). In the segregation study carried out on the family, it was confirmed that it was *de novo*.

#### 4. Discussion

Autism spectrum disorder (ASD) describes a wide range of human interpersonal behaviors [1], encompassing both the diversity between individuals in terms of the severity of symptoms, from mild to severe, and the underlying etiological diversity. Furthermore, ASD may be associated with neurological comorbidities, such as ID, epilepsy, psychiatric comorbidities, such as conduct disorders and schizophrenia [15], or physical comorbidities.

Therefore, it is important that patients with neurodevelopmental disorders are genetically evaluated, taking into account that NGS have a high diagnostic yield and provide information on new candidate genes for ASD.

Pathogenic or probably pathogenic variants in the *ZNF292* gene have recently been associated with a phenotypic spectrum characterized by neurodevelopmental disorder (ID with or without ASD), facial dysmorphic features, and brain MRI abnormalities. Currently there are only 28 individuals described, so it is likely that the phenotype associated with variations in *ZNF292* is not yet well established. We present a patient with a *de novo* frameshift mutation in *ZNF292*, only 6 years old with symptoms compatible with ASD with regression at 3 years, in which intractable behavior problem and moderate intellectual disability predominate. This patient also had macrocephaly (see table 1). Familial macrocephaly was initially diagnosed, however there is evidence that both ASD with or without regression present increased head circumference [16]. In the case of our patient, we cannot affirm that the variant in *ZNF292* is the cause of the increased head circumference. In the phenotype of our patient, the very severe conduct disorder has not been so far associated to *ZNF292* loss-of-function mutations [7].

Therefore, we postulate that the presence of c.2227+1G>T variant in the *SRGAP3* gene may have acted as a modifying factor, contributing to the severe conductal phenotype.

In studies carried out in *SRGAP3* KO mice, it was observed that they presented, in addition to neurodevelopmental disorder, schizophrenia-related intermediate phenotypic symptoms and tics [13]. Also, neuroanatomical defects were reported in the animal model, including enlarged lateral ventricles and thicker white matter tracts [12, 13]. *SRGAP3* gene was proposed to cause intellectual disability by haploinsufficiency, based on the finding of a balanced translocation disrupting *SRGAP3* reported in a female patient with severe psychomotor impairment and absence of speech [10]. However, a heterozygous *SRGAP3*- truncating mutation was posteriorly reported in a female patient with mild ID and in three healthy relatives with normal intelligence from the same family, what suggest that haploinsufficiency of this gene per se does not cause intellectual disability [17]. On the other hand, the finding of a disrupting variant in *SRGAP3* is extremely rare, given that this gene shows constraint metrics in gnomAD highly significant of intolerance to loss-of-function variation (pLI=1, observed / expected ratio = 0.13) [18]. The fact that a stop mutation can be found in healthy people [16], in spite of the scarcity of LoF variants in gnomAD, together with the role of this gene in the neurodevelopment, let us propose that LoF variants in *ZNF292* and *SRGAP3* may present an interaction through autosomal dominant epistasis, producing the modification of the phenotype associated with *ZNF292*. As the reviewer will know, epistasis is a classical genetic interaction, where the expression of one gene is affected by the expression of one or more independently inherited genes.

## **5. Implications and conclusion**

Here we propose that pathogenic variations in the *ZNF292* gene can cause a clinical phenotype characterized by ASD with autistic regression and severe conduct disorders.

We also raise the possibility of the presence of loss-of-function variants in *SRGAP3* gene act as modifier factor leading to early and serious behavioral disorder.

In review

## 7. References

1. Lai, M.C., Lombardo, M.V., & Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *Lancet*, 383, 896-910. [https:// doi: 10.1016/S0140-6736\(13\)61539-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1).
2. Stefanatos, G.A. (2008). Regression in Autistic Spectrum Disorders. *Neuropsychology review*, 18(4), 305-319. doi: 10.1007/s11065-008-9073-y.
3. Krumm, N., O’Roak, B.J., Shendure, J., & Eichler, E.E. (2014). A *de novo* convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends in neurosciences*, 37 (2), 95-105. [https:// doi: 10.1016/j.tins.2013.11.005](https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.11.005).
4. Yuen, R. K. C., Merico, D., Bookman, M., Howe, J., L., Thiruvahindrapuram, B., Patel, R., V.,... Scherer, S. W. (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience*, 20(4), 602-611. [https://doi: 10.1038/nn.4524](https://doi.org/10.1038/nn.4524).
5. Myers, S.M., Challman, T. D., Bernier, R., Bourgeron, T., Chung, W.K., Constantino, J.N., ...Ledbetter, D.H. (2020). Insufficient Evidence for “Autism-Specific” Genes. *The American Journal of Human Genetics*, 106, 587-595. [https://doi: 10.1016/j.ajhg.2020.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.04.004)
6. de Ligt, J., Willemsen, M.H., van Bon, B.W.H., Kleefstra, T., Yntema, H.G., Kroes, T., ...Vissers, L.E.L.M. (2012). Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New England journal of Medicine*, 367(20), 1921-1929. [https://doi:10.1056/NEJMoa1206524](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206524).
7. Mirzaa, G., Chong, J.X., Piton, A., Popp, B., Foss, K., Guo, H.,... Bamshad, M.J. (2020). *De novo* and inherited variants in *ZNF292* underlie a neurodevelopmental disorder with features of autism spectrum disorder. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(3), 538-546. [https:// doi: 10.1038/s41436-019-0693-9](https://doi.org/10.1038/s41436-019-0693-9).

8. Engwerda, A., Frentx, B., den Ouden, A.L., Flapper, B.C.T., Swertz, M.A., Gerkes, E.H., ...van Ravenswaaij-Arts C.M.A. (2018). The phenotypic spectrum of proximal 6q deletions based on a large cohort derived from social media and literature reports. *European journal of human genetics: EJHG*, 26, 1478-1489. [https:// doi: 10.1038/s41431-018-0172-9](https://doi.org/10.1038/s41431-018-0172-9).
9. Rylaarsdam, L., & Guemez-Gamboa, A. (2019). Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 385. [https:// doi: 10.3389/fncel.2019.00385](https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00385).
10. Endris, V., Wogatzky, B., Leimer, U., Bartsch, D., Zatyka, M., Latif, F.,... Rappold, G.A. (2002). The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/srGAP3 has a putative role in severe mental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 11754-11759. [https:// doi: 10.1073/pnas.162241099](https://doi.org/10.1073/pnas.162241099).
11. Shuib, S., McMullan, D., Rattenberry, E., Barber, R.M., Rahman, F., Zatyka, M.,... Maher, E.R. (2009). Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p- syndrome) *American journal of medical genetics. Part A*, A 149A, 2099-2105. [https:// doi: 10.1002/ajmg.a.32824](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32824).
12. Bacon, C., Endris, V., & Rappold, G.A. (2013). The cellular function of srGAP3 and its role in neuronal morphogenesis. *Mechanism of development*, 130(6-8), 391-395. [https:// doi: 10.1016/j.mod.2012.10.005](https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.10.005).
13. Waltereit, R., Leimer, U., von Bohlen Und Halbach, O., Panke, J., Holter, S.M., Garret, L., Wittig, K., ...Bartsch, D. (2012). *Srgap3*<sup>-/-</sup> mice present a neurodevelopmental disorder with schizophrenia-related intermediate phenotypes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American*

- Societies for Experimental Biology*, 26(11), 4418-4428. [https://doi: 10.1096/fj.11-202317](https://doi.org/10.1096/fj.11-202317).
14. Martinez, F., Caro-Llopis, A., Rosello, M., Oltra, S., Mayo, S., Monfort, S., Orellana, C. (2017). High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *Journal of Medical Genetics*. 54(2),87-92. [https://doi:10.1136/jmedgenet-2016-103964](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103964).
15. Chisholm, K., Lin, A., Abu-Akel, A., & Wood, S.J. (2015). The association between autism and schizophrenia spectrum disorders: A review of eight alternate models of co-occurrence. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 55, 173-183. [https://doi:10.1016/j.neubiorev.2015.04.012](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.012).
16. Webb, S.J., Nalty, T., Munson, J., Brock, C., Abbott, R., & Dawson, G. (2007). Rate of head circumference growth as a function of autism diagnosis and history of autistic regression. *Journal of Child Neurology*, 22(10), 1182-1190. [https://doi: 10.1177/0883073807306263](https://doi.org/10.1177/0883073807306263).
17. Hamdan, F.F., Gauthier, J., Pellerin, S., Dobrzyniecka, S., Marineau, C., Fombonne, E., ...Michaud, J.L. (2002). No association between SRGAP3/MEGAP haploinsufficiency and mental retardation. *Archives of neurology*. 66(5):675-6. [https:// doi: 10.1001/archneuro.2009.65](https://doi.org/10.1001/archneuro.2009.65).
18. Lek, M., Karczewski, K., Minikel, E., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., ...Exome Aggregation Consortium. (2006). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291. [https://doi: 10.1038/nature19057](https://doi.org/10.1038/nature19057).
19. Garel, C., Cont, I., Alberti, C., Josserand E., Moutard, M.L., & le Pointe, H.D. (2011). Biometry of the corpus callosum in children: MR imaging reference

data. *AJNR.American journal of neuroradiology*, 32(8), 1436-1444. [https:// doi: 10.3174/ajnr.A2542](https://doi.org/10.3174/ajnr.A2542).

### **Legends of figures**

Figure 1.

- A) Midsagittal T1 WI showing reduced splenium thickness, wich is below de 10th percentile.
- B) Transversal T2 WI with midly asymmetric cisterna magna.

### **8. Acknowledgements**

This study was supported by grant CM19/00181 (Instituto de Salud Carlos III-Río Hortega). We warmly thank the patients and his family for their involvement in this study.

### **9. Declaration of conflicting of Interests**

We have no conflicts of interest related to this work.

### **10. Funding**

This work has received financial support from the CM19 / 00181 Grant from the Carlos III Institute.

### **11. ORCID iDs**

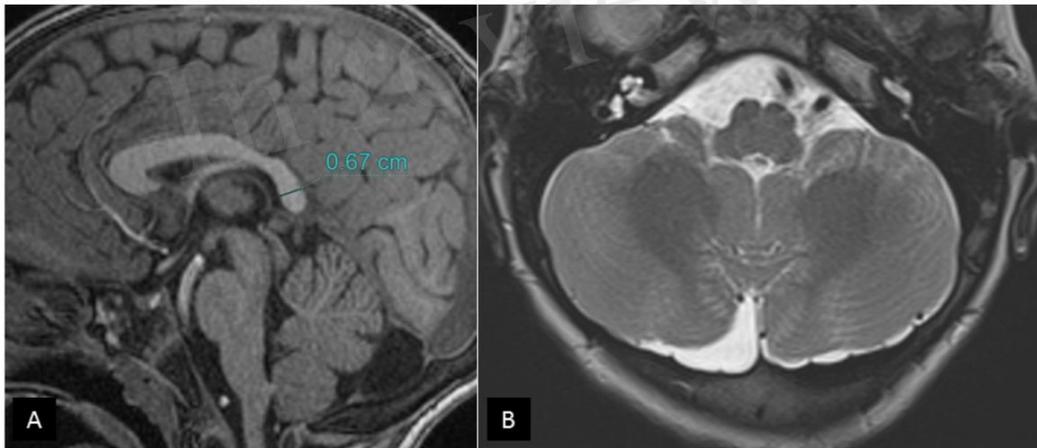
Ana Victoria Marco Hernández: 0000-0002-6027-376X

Francisco Martínez Castellano: 0000-0002-0589-2584

Miguel Tomás Vila: 0000-0002-8632-3593

In review

Figure 1.TIF



VER ANEXOS 6,7 y 8.

## **VII. DISCUSIÓN**

## VII.DISCUSIÓN

En la práctica clínica habitual todos los neuropediatras nos enfrentamos frecuentemente a pacientes en los que tras realizar un fenotipado clínico amplio no obtenemos un diagnóstico etiológico de sus síntomas. El fenotipo sindrómico en neuropediatría incluye un abanico de entidades muy heterogéneo como son el retraso psicomotor, la epilepsia, la DI, el TDAH, los trastornos del movimiento, el TEA, u otros TND y frecuentemente la combinación de varios de ellos.

Las exploraciones complementarias en muchos casos aportan una información valiosa y hoy en día el fenotipo ampliado debe de incluir el fenotipado radiológico e incluso electroencefalográfico. Sin embargo, muy frecuentemente los diagnósticos sindrómicos clásicos no tienen un correlato etiológico homogéneo y son secundarios a diversas causas de diferente índole. Un ejemplo sería el síndrome de West que puede ser debido a mutaciones en genes de herencia mendeliana como *SPTAN1*, *SCN1A*, entre otros, y también secundario a cromosomopatías, la más frecuente la trisomía 21. También puede tener causas no genéticas, como la encefalopatía hipóxico-isquémica al nacimiento o por accidentes cerebrovasculares en el periodo perinatal.

También ocurre el proceso inverso, conocido como pleiotropismo fenotípico, en el que un gen puede presentar diferentes fenotipos (ver figura 14).

Distribution of Phenotypes across Genes (Updated December 27th, 2021) :

Number of genes with 1 phenotype	3,182
Number of genes with 2 phenotypes	832
Number of genes with 3 phenotypes	304
Number of genes with 4+ phenotypes	243

**Figura 14. Tabla extraída de la página OMIM. Distribución de los fenotipos entre los genes<sup>9</sup>.**

Una vez el neuropediatra ha realizado un fenotipado ampliado, una gran proporción de pacientes quedan sin diagnóstico etiológico, llegando este porcentaje a más del 50% de ellos. Actualmente estamos viviendo una eclosión de conocimiento en el área de la genética humana, que se incrementa exponencialmente año tras año. Si bien no

hay que olvidar que se trata de una herramienta más, cada vez sabemos que en una gran proporción de pacientes es clave para saber la causa de los síntomas.

El rendimiento de las pruebas genéticas es variable, pero en muchos casos permite finalizar la odisea diagnóstica de los pacientes y de sus familias. Una vez obtenido el resultado genético hemos de realizar una búsqueda sistemática para poder interpretar los datos. Las herramientas que hemos comentado en la introducción, como son los HPO, las plataformas OMIM y Orphanet<sup>9,90</sup>, así como las guías de la ACMG<sup>17</sup>, entre otras muchas, nos aportan la capacidad para entender los resultados tanto clínicos como genéticos.

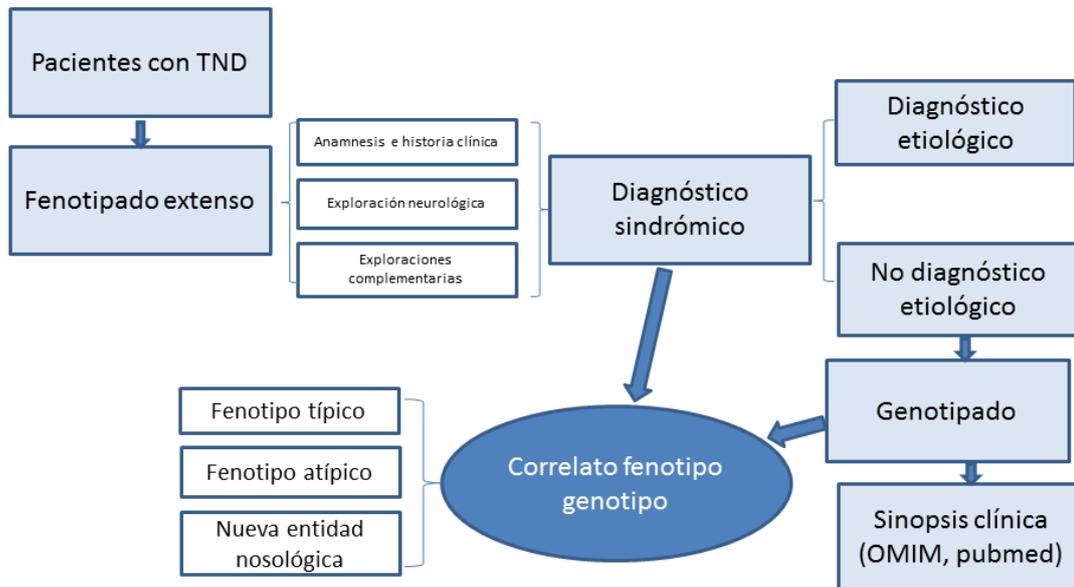
Con toda la información que disponemos, una vez conocemos el fenotipo descrito asociado a un determinado gen, el siguiente paso es la revaloración del paciente, proceso denominado fenotipado inverso (en inglés *reverse phenotyping*)<sup>116</sup>. Las bases de datos como *DECIPHER*<sup>106</sup>, pueden ayudar a encontrar más pacientes con variantes similares con los que comparar el fenotipo encontrado.

En este sentido la descripción de fenotipo debe de ser riguroso y hay que evitar definiciones subjetivas, por esto se está haciendo un gran esfuerzo en construir la base de datos *Human Phenotype Ontology* (HPO, <http://www.human-phenotype-ontology.org/>) en la que cada elemento es numerado y describe una anomalía fenotípica. Sin embargo, surgen muchas otras dificultades a la hora de fenotipar a los pacientes, por ejemplo en el periodo neonatal y la primera infancia el enfoque clínico adolece de información sobre el crecimiento y el neurodesarrollo futuro. En el caso de los adultos también existe el problema de que hay una falta de descripción de fenotipos en los adultos, de hecho, gran número de pacientes adultos con discapacidad intelectual, TEA o EED no tienen diagnóstico etiológico<sup>117</sup>.

A veces, a pesar de realizar una búsqueda extensa sistemática y recurrir al fenotipado inverso y a las bases de datos de pacientes disponibles, nos encontramos con pacientes con resultados inesperados. En la literatura científica se pueden encontrar centenares de entradas que hacen referencia a fenotipos atípicos, sin embargo, no existe hasta la fecha una definición consensuada al respecto sobre lo que es.

Nosotros hemos propuesto una definición flexible de lo que es un fenotipo atípico. Pensamos que serían atípicos aquellos pacientes que presentan síntomas secundarios a la disfunción producida por la variante encontrada pero que no han sido descritos o lo han sido muy escasamente en la literatura. OMIM y Orphanet son nuestra fuente de referencia, sin olvidar que en Pubmed los datos se actualizan continuamente, ya que se nutre de las publicaciones de la mayoría de revistas científicas. Sin embargo, no siempre es sencillo encontrar pacientes similares a pesar de realizar la búsqueda en Pubmed.

En esta Tesis Doctoral titulada **“ANÁLISIS FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE LOS PACIENTES CON TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO EN LOS QUE SE HA DETECTADO ALTERACIONES PATOGENICAS EN EL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA”**, se ha estudiado en profundidad una serie de pacientes con trastornos del neurodesarrollo secundarios a alteraciones patogénicas detectadas en los estudios de NGS. El objetivo ha sido en primer lugar, confirmar la presencia de correlación fenotipo-genotipo, es decir, determinar la relación existente entre las variantes encontradas en un determinado gen y los síntomas que se producen secundariamente, centrándonos fundamentalmente en los fenotipos típicos (Capítulo 1); determinar la presencia de fenotipos atípicos, ampliando el espectro fenotípico asociado a un determinado gen y tratar de comprender los mecanismos por los que se dan esas características fenotípicas diversas (Capítulo 2) y por último, proponer nuevos genes candidatos como causas de TND, describiendo el fenotipo clínico, radiológico, anatomopatológico y electroencefalográfico al que da lugar, y sobre todo, demostrando mediante estudios de investigación dicha causalidad (Capítulo 3).



**Figura 15: Diagrama de flujo propuesto para el neuropediatra: ante un paciente con TND se procede a realizar un fenotipado extenso (con una anamnesis e historia clínica rigurosa, una exploración neurológica y la evaluación de las exploraciones complementarias). Con estos datos, en la mayoría de casos podemos realizar un diagnóstico sindrómico y en muchos casos un diagnóstico etiológico. En los casos en los que no se obtiene diagnóstico etiológico se realizará estudio genético (CGH array o NGS según sospecha clínica). Aquellos en los que obtenemos variantes patogénicas debemos reevaluar el fenotipo (fenotipado inverso) y determinar si se trata de un fenotipo típico (ya descrito previamente en OMIM y/o Orphanet), un fenotipo atípico (no descrito o descrito en casos aislados) o bien, si la variante encontrada se encuentra en un nuevo gen candidato deberemos estudiar en profundidad si los síntomas del paciente son debidos a esa variante (nueva entidad nosológica).**

## Fenotipos típicos. Correlación fenotipo-genotipo

Basándonos en este concepto ampliamente utilizado, pero no definido hasta ahora, hemos planteado el estudio sistemático tanto a nivel fenotípico como genotípico de una serie de pacientes con patología neuropediátrica, sobre todo, trastornos del neurodesarrollo y encefalopatías epilépticas, secundarias a alteraciones genéticas detectadas en el estudio de NGS.

De la amplia serie revisada hemos publicado un artículo sobre dos pacientes con fenotipo típico asociado a *SCN1A*. Esta familia despertó nuestro interés desde el primer momento ya que se trata de dos hermanos, hijos de padres consanguíneos con dos fenotipos distintos, pero con características comunes entre ambos. Los dos presentaban crisis febriles, con estatus febriles desde los primeros meses de vida (primer episodio convulsivo a los 4 meses en la hermana mayor y a los 7 meses en el menor), aunque el hermano menor asociaba también sordera neurosensorial congénita y leve retraso psicomotor los primeros meses de vida. Además, los progenitores referían la presencia de múltiples miembros de la familia extensa que presentaron crisis febriles y/o epilepsia (ver árbol genealógico del artículo). Todo esto, nos llevó a pensar que efectivamente se trataba de un fenotipo compatible con Epilepsia genética con crisis febriles plus o *GEFS+*. El resultado genético mediante NGS detectó en ambos hermanos una variante probablemente patogénica en homocigosis (NM\_001165963.1):c.4513A>C(p.Lys1505Gln) en el gen *SCN1A*. Aplicando los criterios propuestos por ACMG dicha variante presentaba los siguientes criterios: PM1, PM2, PP2 y PP3. Además, cosegregaba con la enfermedad y el fenotipo es compatible con la disfunción en ese gen. El CADD era de 28.6.

Estos casos presentan por un lado, un fenotipo típico de *GEFS+* secundario a variantes en *SCN1A*, pero por otro, el hermano menor presentaba sordera neurosensorial de etiología no filiada, y tampoco se ha descrito nunca relacionada con variantes en *SCN1A*. En este paciente además, se obtuvo la variante c.269T>C (p.Leu90Pro) en heterocigosis en el gen *GJB2*. Este gen es causante de sordera neurosensorial, pero presenta herencia autosómico recesiva como casi todas las sorderas hereditarias. En cualquier caso, no es infrecuente la presencia de dos enfermedades autosómico

recesivas en familias consanguíneas, como se explica en el artículo. Por esto, descartamos que la sordera que presenta el paciente sea secundaria a la variante en *SCN1A* y actualmente aún no tenemos certeza de la causa etiológica. Por otro lado, no es típico que la *GEFS+* asociada a *SCN1A* presente una herencia autosómica recesiva como habíamos objetivado en estos hermanos.

Todos los neuropediatras conocemos muy bien los fenotipos típicos asociados a *SCN1A*, ya que es el gen asociado a epilepsia por antonomasia. Este gen codifica para una proteína que forma parte del canal de sodio (ver figura 17). Fundamentalmente, se relaciona con el Síndrome de Dravet que es una encefalopatía epiléptica y del desarrollo (DEE6A) caracterizada por un cuadro clínico típico en el que lactantes previamente sanos inician crisis febriles de repetición desde los primeros 6 meses de vida. Con la evolución, es frecuente que presenten estatus epilépticos, diversos tipos de crisis epilépticas refractarias al tratamiento y deterioro cognitivo que suele empezar a ser manifiesto entre los 2 y los 4 años de vida. Actualmente, hay gran cantidad de investigación en marcha en los pacientes con *SCN1A*, incluso se están realizando ensayos clínicos con terapia génica<sup>118</sup>. Por otro lado, *SCN1A* también se asocia al fenotipo *GEFS+*, que es un síndrome epiléptico familiar en el que los individuos afectados en una misma familia tienen típicamente una amplia variedad de fenotipos epilépticos, desde crisis febriles simples, crisis febriles plus con buen desarrollo psicomotor a encefalopatías epilépticas graves<sup>119</sup>. También se ha asociado a TEA, migraña familiar hemipléjica, SUDEP, Epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias e incluso espasmos infantiles<sup>57,77,120-122</sup>. Siendo estos fenotipos mucho menos frecuentes pero descritos en la literatura. Siguiendo nuestra propuesta de definición de lo que es un fenotipo atípico realizamos la búsqueda en OMIM (fecha 17/2/22) ver figura 16<sup>9</sup>:

HGNC Approved Gene Symbol: **SCN1A**

Cytogenetic location: 2q24.3 Genomic coordinates (GRCh38): 2:165,984,640-166,149,160 (from NCBI)

### Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype <small>Clinical Synopsis</small>	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
2q24.3	Developmental and epileptic encephalopathy 6B, non-Dravet	619317	AD	3
	Dravet syndrome	607208	AD	3
	Febrile seizures, familial, 3A	604403	AD	3
	Generalized epilepsy with febrile seizures plus, type 2	604403	AD	3
	Migraine, familial hemiplegic, 3	609634	AD	3

Figura 16. Captura de la búsqueda en plataforma OMIM de los fenotipos asociados a *SCN1A*<sup>9</sup>.

Como hemos comentado, las variantes patogénicas en el gen *SCN1A* se asocian a un amplio rango de fenotipos epilépticos y TND, casi siempre con variantes en heterocigosis, y la mayoría *de novo*. Al encontrarnos con esta familia decidimos realizar una búsqueda bibliográfica en Pubmed con los términos “*SCN1A*”, “*homozygous*” y “*recessive inheritance*”. Encontramos 10 pacientes publicados previamente con variantes con herencia autosómica recesiva en un total de 5 artículos<sup>123-127</sup>.

En este trabajo además de presentar nuestros dos pacientes, realizamos un análisis pormenorizado del fenotipo y el genotipo asociado a estos pacientes. Como conclusión, podemos afirmar que *SCN1A* casi siempre presenta herencia autosómico dominante, pero hay suficientes casos publicados para pensar que también puede heredarse de forma autosómica recesiva.

En cuanto a la correlación genotipo-fenotipo, hay numerosos estudios que han intentado analizar la relación entre las diferentes variantes en el gen *SCN1A* con el fenotipo encontrado en los pacientes. Se sabe que la localización de las variantes en el gen, así como el tipo de variante, determina la gravedad clínica en muchos casos. De esta forma, las variantes de cambio de aminoácido en el gen *SCN1A* presentarán efectos variables dependiendo de la región funcional en la que se localicen y la naturaleza de la sustitución del aminoácido<sup>128,129</sup>. Pero de forma global se puede decir que las variantes de cambio de aminoácido que se localizan en el poro de la proteína y las variantes patogénicas que dan lugar a una pérdida completa de función dan lugar a

los fenotipos más graves<sup>129</sup>. En cualquier caso, ante una nueva variante es muy complicado predecir la gravedad del efecto funcional en el canal de sodio.

De los 12 pacientes analizados en total en este trabajo, se puede extraer como conclusión que el fenotipo es sorprendentemente similar al descrito en los pacientes con variantes en heterocigosis, de herencia autosómico dominante. Los datos sugieren que las variantes localizadas en el área intracitoplásmica o a nivel extracelular (pacientes 1, 2, 5, 6, 9, 10 y 12) presentan fenotipos menos graves. Por otro lado, aquellos en los que las variantes se encontraron en el poro (pacientes 3, 4, 7, 8 y 11) más frecuentemente presentaron un fenotipo SD (ver tabla 7).

En esta serie los padres portadores eran asintomáticos, lo que nos lleva a pensar que estas variantes son hipomórficas, lo que quiere decir que es necesario que se encuentren en ambos alelos para causar alteración en la función del gen, esto puede ser debido a su localización en el gen o bien por sus características intrínsecas.

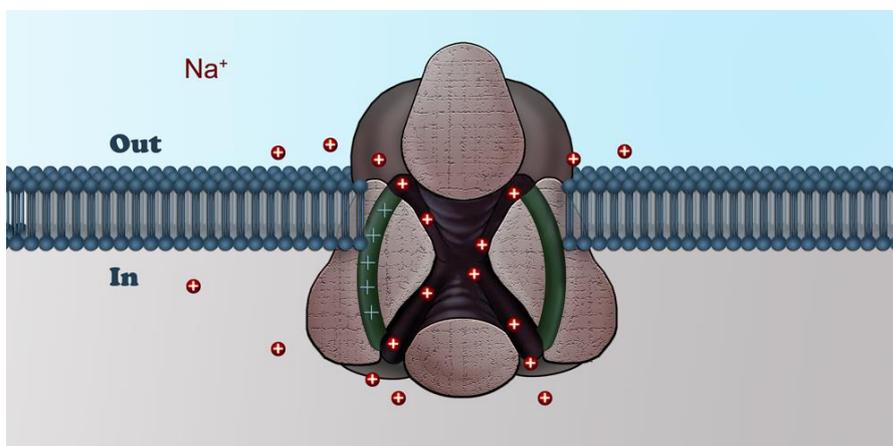


Figura 17. De Guangzhou. Esquema del canal de sodio que codifica el gen *SCN1A*<sup>128</sup>.

**Tabla 7. Relación de pacientes con variantes recesivas en el gen *SCN1A*<sup>109</sup>. Transcrito de referencia NM\_001165963.**

Nº de paciente y variante	Localización del aminoácido alterado por la variante	Fenotipo clínico
1 (p.Lys1505Gln)	Intracitoplasmática	GEFS+
2 (p.Lys1505Gln)	Intracitoplasmática	GEFS+
3 (p.Arg101Gln) + (p.Ile1576Thr)	Intracitoplasmática/poro	DS
4 (p.Arg101Gln) + (p.Ile1576Thr)	Intracitoplasmática/poro	DS
5.(Ile923Ser)	Extracelular	GEFS+
6 (Asn275Ser)	Extracelular	GEFS+
7(p.Met400Val)	poro	DS
8(p.Met400Val)	poro	FS+ PS
9 (p.Arg618Cys)	Intracitoplasmático	FS+ PS
10 (p.Arg618Cys)	Intracitoplasmático	DS + AE
11 (p.Ala1440Val)	Poro	DS
12 (p.Tyr1599Phefs*19)	Intracitoplasmático	DS

## Fenotipos atípicos

En este trabajo proponemos definir como fenotipo atípico a aquellos pacientes que presenten un fenotipo clínico no descrito previamente en OMIM ni en Orphanet, pero en el que existen suficientes pruebas genéticas y fisiopatológicas para atribuirlo a la alteración genética encontrada. Somos conscientes de la limitación de esta definición, ya que por un lado, el hecho de que esta definición venga determinada por lo descrito en una fuente de datos de referencia que continuamente está actualizándose hace que un fenotipo determinado pueda ser considerado inicialmente atípico y posteriormente típico. Pensamos que la propia definición tendrá que ser revisada a medida que avance la genética clínica. En el futuro el concepto de lo que es un fenotipo atípico probablemente se basará en términos estadísticos, es decir, serán considerados aquellos fenotipos con baja prevalencia. También es posible que el propio concepto tienda a desaparecer y podamos hablar de fenotipos raros o fenotipos mixtos, teniendo en cuenta la interacción de varios factores causales.

Sin embargo, pensamos que actualmente es útil para describir algunos casos y ayudarnos a comprender la presentación clínica de pacientes, así como la etiopatogenia de los síntomas que presentan. Por todo esto, es necesario definir el concepto de fenotipo atípico porque se utiliza *de facto*, pero no está conceptualizado en ninguna fuente.

En cuanto a los trabajos que hemos presentado en este capítulo, se trata de dos publicaciones en las que hemos revisado el espectro fenotípico asociado a los genes *SPTAN1* y *SCN1A*. Estos genes están relacionados con encefalopatías epilépticas, sin embargo, mientras que hay cientos, si no miles, de pacientes publicados con síntomas relacionados con variaciones en *SCN1A*, solamente hay unas pocas decenas de pacientes descritos con TND y/o epilepsia relacionados con *SPTAN1*.

El gen *SPTAN1* codifica para la proteína  $\alpha$ II-espectrina que forma parte de la estructura de los heterotetrámeros, junto con la  $\beta$ -espectrina, que están involucrados en la unión y formación del citoesqueleto celular<sup>130,131</sup>. *SPTAN1* es un gen que se expresa predominantemente en el córtex temporal y en el cerebelo, lo que explicaría la presencia de atrofia cerebral y cerebelosa de los pacientes con fenotipo más grave, así

como la presencia de ataxia, alteración de la coordinación motora y epilepsia<sup>132,133</sup>. Solo hace poco más de una década que Saitsu *et al.* publicaron los dos primeros pacientes con EED-5 asociada a variantes en *SPTAN1*. Esos mismos pacientes habían sido descritos previamente por sus colegas Tohyama *et al.* en 2008 en un artículo en el que había reportado varios individuos con encefalopatía epiléptica similar al síndrome de West, con hipomielinización cerebral y reducción de la sustancia blanca<sup>134,135</sup>. Actualmente es un gen incluido en todos los listados de encefalopatía epiléptica y en los exomas clínicos. Sin embargo, sorprende que a día de hoy, menos de 50 pacientes han sido publicados con variantes en este gen. En OMIM, el fenotipo asociado a *SPTAN1* es el de EED-5 (ver figura 8). Sin embargo, en *Pubmed* encontramos unas 17 publicaciones anteriores a nuestro trabajo, en las que se describen diferentes fenotipos en pacientes con variantes en *SPTAN1*. El espectro clínico reportado hasta ahora ha sido clásicamente dividido entre aquellos pacientes con afectación del sistema nervioso periférico<sup>136,137,138</sup>, de los que se han descrito unos 15 pacientes, y por otro lado, aquellos con afectación del SNC de los que a su vez se ha hablado de que hay un fenotipo grave y un fenotipo más benigno<sup>38,132, 139-144</sup>. De este segundo grupo, incluyendo a nuestros tres pacientes hay publicados hasta hoy unos 35 pacientes.

Syrbe *et al.* publicó en 2017 la serie más grande hasta ese momento, que constaba de 20 pacientes de los que 95% presentaban epilepsia y se podría intuir que existía un grupo de pacientes con fenotipo muy grave (EED-5) y otro con fenotipo más leve. Es importante destacar que el 20% de los pacientes de esta serie presentaron muerte súbita inesperada en epilepsia, más conocida como SUDEP (*sudden unexpected death in epilepsy*)<sup>141</sup>.

En nuestro trabajo hemos analizado a fondo el fenotipo clínico-radiológico así como el genotipo de nuestros tres pacientes y del resto de pacientes publicados con afectación del SNC. Del total de 33 pacientes analizados, hemos subdividido los fenotipos en 5 subtipos según los síntomas que presentaban, por orden de frecuencia:

- 1.- Encefalopatía epiléptica y del desarrollo tipo 5 (EED-5): 39 % (fenotipo típico).
- 2.- Epilepsia con discapacidad intelectual: 21%.

3.- Epilepsia sin discapacidad intelectual: 12%.

4.- Discapacidad intelectual sin epilepsia: 12%

5.- Autismo (simple o con discapacidad intelectual) sin epilepsia: 8%

6.-Discapacidad intelectual con síndrome cerebeloso (ID-CS): 8%

En esta serie actualizada podemos ver que globalmente un 24% de los pacientes con variantes en *SPTAN1* y afectación SNC no presentaban epilepsia, aunque se ha postulado fundamentalmente como un gen causante de epilepsia.

Es difícil dividir a los pacientes entre leves y graves como se ha ido haciendo en las publicaciones previas, y realmente podemos considerar un espectro de gravedad en el que los diversos síntomas de afectación del sistema nervioso, y los diferentes trastornos del neurodesarrollo están imbricados entre sí. Pensamos, además, que el fenotipo más grave, EED-5, el que está definido en OMIM asociado a *SPTAN1*, probablemente sea el primero en ser descrito y el más frecuentemente reportado debido al sesgo que hemos referido en la introducción por el cual los pacientes más graves son más estudiados y publicados. De modo que a medida que vamos estudiando mediante NGS a los pacientes con fenotipos menos graves, el fenotipo ha ido ampliándose, y actualmente hay incluso pacientes que presentan epilepsia de inicio en la infancia tardía y sin discapacidad intelectual<sup>110</sup>.

En cuanto a nuestros tres pacientes, el primero y el tercero fueron clasificados como fenotipo ID-CS, es decir, presentaban discapacidad intelectual con síndrome cerebeloso, con rasgos dismórficos inespecíficos y el primero presentaba atrofia cerebelosa e hiperintensidad frontal en el córtex. El segundo paciente es el que presentaba un fenotipo más leve, con desarrollo psicomotor normal, así como un coeficiente intelectual dentro de la normalidad con migrañas refractarias y epilepsia con crisis generalizadas nocturnas con buena respuesta en monoterapia con zonisamida. Como hallazgo atípico presentaba heterotopias subependimarias detectadas en la resonancia magnética.

En la serie completa, dos pacientes más presentaban alteraciones de la migración neuronal. El paciente 22 publicado por Syrbe *et al.* también presentaba heterotopias subependimarias con atrofia cerebelopontina y fenotipo de EED-5<sup>146</sup>. Rapaccini *et al.* describió el paciente 32, que presentaba una simplificación de la arquitectura cerebral asociada a atrofia cerebelosa y EED-5<sup>142</sup>. Por tanto, del total de los 35 pacientes, tres de ellos (8.6%) presentaron malformaciones del desarrollo cortical (MDC). No existen datos concluyentes sobre la prevalencia de MDC en la población general, aunque se sabe que gran parte de ellas ocurren sin causa genética subyacente. En un estudio realizado por Jansen *et al.* sobre la prevalencia de hallazgos incidentales en resonancia magnética cerebral en niños, se vio que un 0.48% (IC 95% = 0.30 a 0.76) presentaban heterotopias subependimales, un 0.03% (IC 95% = 0.01 a 0.16) presentaban displasias transmanto y un 0.03% (IC 95% = 0.01 a 0.16) presentaban displasias focales corticales<sup>150</sup>. Claramente existe un exceso de pacientes con MDC en la pequeña serie de *SPTAN1* conocida hasta el momento actual, con 3/35 pacientes (IC 95% = 3 a 22%). Por tanto, planteamos que *SPTAN1* debería ser considerado un gen candidato a estudiar ante pacientes con trastornos de la migración neuronal y una causa posible de heterotopias subependimarias.

El correlato fenotipo-genotipo también ha sido evaluado en esta serie (tabla 3 del trabajo) y se ha comprobado que los pacientes en los que las variables se encontraban en los dominios espectrina 1 al 18 solían presentar fenotipos menos graves y por el contrario aquellos en los que las variantes afectaban a los dominios 19-20 presentaban fenotipos más graves (11/12 EED-5).

Por último, la revisión de la serie completa de pacientes con variantes patogénicas en *SPTAN1* nos ha permitido objetivar que existe un exceso de pacientes femeninas entre los fenotipos más graves. Esto puede ser debido a que las mujeres estén protegidas de algún modo, lo que sería un factor de confusión a la hora de establecer la patogenicidad de aquellas variantes heredadas de la madre sana, interpretándose erróneamente como variante benigna. También puede haber motivos sociales, en los que por algún motivo se esté estudiando más frecuentemente a los varones y solamente se estudie genéticamente a las mujeres con fenotipos más graves. En cualquier caso, es un dato que habrá que tener en cuenta y analizarlo en el futuro.

El análisis exhaustivo de pacientes con variantes patogénicas en *SPTAN1* ha aumentado el conocimiento del espectro clínico relacionado con este gen. Además, se ha descrito un variado espectro clínico de fenotipos más leves, cabe señalar que no siempre están relacionados con DI o con epilepsia. Aunque no se ha descrito afectación periférica en la mayoría de estos pacientes, no podemos descartar que la degeneración axonal se produzca más tarde o incluso que la afectación periférica pasara desapercibida en algunos de los pacientes con fenotipos muy graves. Actualmente hay evidencia para pensar que *SPTAN1* puede causar alteración a nivel del sistema nervioso periférico y debe ser considerado en nuevos pacientes.

En la discusión del capítulo 1 de la tesis hemos hablado del gen *SCN1A*, siendo este gen uno de los que más interés despierta tanto en investigación como en la práctica clínica en neuropediatría. Se trata, no en vano, del gen que más frecuentemente encontramos en pacientes con epilepsia en la infancia y además, presenta una correlación muy alta con el fenotipo clínico clásico de Síndrome de Dravet.

Sin embargo, al igual que ocurre con *SPTAN1*, el fenotipo ampliado asociado a *SCN1A* es muy extenso. De hecho, continuamente se describen nuevos fenotipos asociados<sup>123, 78, 151-153</sup>. En OMIM se describen 5 fenotipos asociados (ver figura 16).

Etiopatogénicamente, las variantes patogénicas en *SCN1A* dan lugar a la disfunción de los canales de sodio Nav1.1 que se localizan en las interneuronas inhibitoras GABA-érgicas, produciendo hiperexcitabilidad y por tanto disminuyendo el umbral epiléptico. Esta reducción de las corrientes de sodio, colateralmente deteriora las células de Purkinje, lo que da lugar a alteraciones motoras, contribuyendo a discapacidad cognitiva y a los problemas de comportamiento<sup>154,155</sup>. Teniendo en cuenta la gran cantidad de pacientes que hay publicados en grandes series<sup>156</sup>, llama la atención que en una pequeña serie de 15 pacientes encontremos un 20% de fenotipos atípicos. De este modo, el paciente 5 de la serie presentaba un fenotipo de encefalopatía epiléptica y del desarrollo de inicio precoz con artrogriposis congénita y trastorno del movimiento asociado. Previamente algunos casos aislados habían sido descritos por Jaber *et al.* y Spagnoli *et al.* de pacientes con EED grave y artrogriposis<sup>151,153</sup>. Dos de

estos pacientes presentaron movimientos anormales desde los primeros días de vida y otro paciente falleció durante el primer mes de vida. El paciente descrito por Spagnoli *et al.* presentaba movimientos anormales que definieron como hiperecplexia. En todos estos casos las variantes encontradas eran variantes no descritas previamente<sup>151,153</sup>. La hipótesis que se plantea en estos casos es que probablemente dichas variantes presentan una afectación funcional del gen diferente a las variantes asociadas a SD. De hecho, se sabe que las variantes asociadas a SD producen una pérdida de función del canal de sodio, por lo que los fármacos anticrisis bloqueantes de canal de sodio como la carbamazepina, oxcarbamazepina, lacosamida y fenitoína fundamentalmente, están contraindicados en este síndrome. Sin embargo, el fenotipo de migraña hemipléjica asociado a *SCN1A* se produce por variantes con ganancia de función en el canal de sodio. También ha despertado mucho interés la descripción reciente por parte de Sadleir *et al.* de una encefalopatía epiléptica precoz infantil asociada a *SCN1A* debida a la variante de cambio de aminoácido c.677C>T (p.Thr226Met)<sup>78</sup>. Berecki *et al.* demostraron que la variante publicada previamente por Sadleir *et al.*, c.677C>T (p.Thr226Met) efectivamente, presentaba propiedades de ganancia de función<sup>157</sup>: Tanto nuestra paciente como los casos descritos por Sadleir *et al.*, Jaber *et al.* y Spagnoli *et al.*, presentan en la evolución una discapacidad intelectual profunda, con afectación motora grave y epilepsia incontrolable. Algunos de estos pacientes incluso tenían que ser alimentados por gastrostomía o sonda nasogástrica. Además, característicamente estos pacientes presentaban movimientos anormales no epilépticos, como coreoatetosis, distonía, mioclonía e hipercinesia perioral. Este tipo de movimientos no son habituales en pacientes con variantes en *SCN1A*, sin embargo sí se han descrito en las encefalopatías epilépticas de inicio precoz producidas por *SCN2A* y *SCN8A*<sup>158</sup>. Esta similitud en el fenotipo ha llevado a especular que estos pacientes presenten también variantes con ganancia de función.

Este asunto está ganando interés y actualmente el grupo liderado por el Dr Brunklaus está realizando un trabajo en pacientes con fenotipo de encefalopatía epiléptica y del desarrollo grave con artrogriposis asociada a *SCN1A* en el que se está evaluando la función de las variantes encontradas<sup>159</sup>.

El siguiente paciente con fenotipo atípico, el paciente 1 de la serie, presentaba una variante patogénica en *SCN1A* (c.2853\_2857 del) no descrita previamente que además asocia un fenotipo epiléptico de SD con episodios de movimientos hipercinéticos paroxísticos de varios minutos de duración no epilépticos que preceden a las crisis epilépticas. Como hemos comentado, no es característico del SD el asociar movimientos paroxísticos, sin embargo, sí hay algunos casos reportados<sup>160,161</sup>. Además, este paciente actualmente, presenta un deterioro cognitivo notable, compatible con un retraso psicomotor y trastorno del espectro autista grave, que podemos afirmar que es significativamente más grave que el que habitualmente presentan los pacientes con SD a la misma edad.

Por último, el paciente 10 de la serie presenta un fenotipo SD que asocia un trastorno de la migración neuronal detectado mediante resonancia magnética. Las malformaciones del desarrollo cortical son trastornos del neurodesarrollo debidos a un desarrollo anormal del córtex cerebral intraútero que dan lugar a importante morbilidad como epilepsia fármacorresistente, parálisis cerebral infantil, trastorno del espectro autista, discapacidad intelectual y otros trastornos neurológicos y comportamentales<sup>162</sup>. Las MDC fundamentalmente se relacionan con epilepsias refractarias al tratamiento farmacológico y muchas de ellas son subsidiarias de tratamiento quirúrgico resectivo. Se ha descrito en al menos 8 pacientes con mutaciones en *SCN1A*, en los que había evidencia neuropatológica o en imagen de resonancia magnética, de la presencia de MDC<sup>163,164,165</sup>. La concurrencia de dos fenómenos epileptogénicos, como son las MDC y las variantes patogénicas en el gen *SCN1A* nos lleva a plantearnos si existe relación causal entre ambas. En la mayoría de pacientes con mutaciones en *SCN1A* o con SD, la resonancia magnética cerebral es normal o presentan hallazgos inespecíficos, como atrofia cerebral o cerebelosa o hiperintensidades en sustancia blanca<sup>164</sup>. La esclerosis del hipocampo es un hallazgo relativamente frecuente. Catarino *et al.* realizaron un estudio neuropatológico sistemático en tejido cerebral de 9 pacientes con SD en el que no objetivaron anomalías compatibles con displasia cortical focal. Sí había cambios comunes en casos de epilepsia crónica<sup>166</sup>. Skjei *et al.* informaron sobre seis pacientes con variantes de *SCN1A*, 5 con SD y 1 con GEFS+, con tipos de convulsiones mixtas refractarias que se

sometieron a cirugía de epilepsia y la histopatología quirúrgica mostró evidencia de displasia cortical sutil en 4 de 6 pacientes con evidencia microscópica de más neuronas en la capa molecular de la corteza y desorganización cortical de la sustancia blanca. Sin embargo, ninguno de ellos presentaba malformaciones corticales macroscópicas evidentes en la resonancia magnética<sup>167</sup>. Además, Barba *et al.* reportaron otros seis pacientes con variantes patogénicas en el gen *SCN1A* que presentaban MDC concurrentes. La prevalencia en este estudio era de un 3.3% (6 presentaron MDC del total de 120 pacientes con variantes en *SCN1A*).

Le Gal *et al.* reportó hallazgos postmortem de un paciente pediátrico con SD, secundario a una duplicación *frameshit* en *SCN1A*, en el que encontró displasia multifocal micronodular en el córtex temporal izquierdo y gliosis terminal bilateral. Renier y Rnekawek publicaron la autopsia de un niño de 19 meses con SD fallecido por SUDEP en el que objetivaron anomalías del desarrollo cerebral grave. Con todo esto, es controvertido si la asociación de dos eventos epileptogénicos se produce por pura casualidad o si se podría considerar un papel predisponente para las variantes de *SCN1A*. El caso de nuestro paciente, presenta la variante p.Arg93His, que se ha descrito en 12 individuos con SD en los que no se refiere que presenten MDC.

Algunos autores consideran que dado el elevado número de pacientes con variantes de *SCN1A* publicados hasta el momento y la rareza de las MDC concurrentes, la epidemiología no respalda un papel causal de las variantes de *SCN1A* en las MDC<sup>163</sup>. En principio parece que serán necesarias más evaluaciones de grandes series de pacientes con SD para confirmar esta asociación. En cuanto a la implicación terapéutica, se ha visto que los pacientes en los que se realizó cirugía resectiva por MDC con epilepsia refractaria que presentaban variantes patogénicas en *SCN1A* no presentaron buena evolución tras la cirugía<sup>163</sup>. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que las anomalías estructurales cerebrales pueden modificar la expresión epiléptica en cuanto a su expresión topográfica así como en su gravedad<sup>168</sup>. Los fármacos más utilizados en las MDC son la carbamazepina, oxcarbazepina, lacosamida, es decir, inhibidores de canal de sodio. Sin embargo, como hemos comentado previamente, en la epilepsia relacionada con el gen *SCN1A*, este grupo de fármacos produce un empeoramiento de las crisis. Por tanto, la presencia de MDC en un paciente con

fenotipo compatible con SD o GEFS+, aunque hasta ahora no hay suficiente evidencia para afirmar que ambos trastornos tengan un nexo etiológico común, debemos de valorar cuidadosamente los fármacos anticrisis más adecuados y solicitar estudio del gen *SCN1A* para descartar la presencia de variantes patogénicas.

## **Nuevos genes candidatos y nuevas entidades nosológicas**

A pesar de que actualmente hay entre 6.000 y 8.000 enfermedades raras descritas en las bases de datos, hay suficiente evidencia para pensar que aún hay muchas otras no descritas. De este modo, aproximadamente 300 nuevos fenotipos mendelianos se añaden en OMIM cada año, la mayoría de ellos representan asociaciones gen-enfermedad nuevas<sup>89,92</sup>. El descubrimiento de la base genética de un fenotipo mendeliano determinado establece un vínculo causal entre el genotipo y el fenotipo. Esto hace posible incluir ese gen en el estudio etiológico de otros pacientes con fenotipo similar. Además, estos descubrimientos también contribuyen a nuestro conocimiento de la función de los genes, la regulación de los genes, el desarrollo y los mecanismos biológicos que pueden usarse para desarrollar nuevas terapias.

Se calcula que aproximadamente el 50% de los pacientes en neuropediatría carecen de un diagnóstico etiológico<sup>169</sup> y más de la mitad de los pacientes analizados por secuenciación del exoma no reciben un diagnóstico molecular<sup>170</sup>. Esto supone un gran nicho para la investigación biomédica. De este modo, en diciembre de 2011 el NIH estableció los Centros de Genómica Mendeliana (CMG) para realizar un estudio colaborativo en el que se realizó una secuenciación del exoma completo a gran escala con el objetivo de estudiar las variantes genéticas responsables de los fenotipos mendelianos. En este trabajo 529 investigadores de 261 instituciones de 36 países analizaron 18.863 muestras de 8.838 familias con 579 fenotipos mendelianos conocidos y 470 fenotipos nuevos. En este trabajo se identificaron 956 genes, 375 fueron nuevos genes candidatos de los que no se había asociado previamente un fenotipo clínico<sup>89</sup>.

En el área de la neuropediatría, sabemos que el conocimiento de las enfermedades raras aún le queda un largo camino por recorrer. Por esto, en este trabajo decidimos incluir a los pacientes en los que se había encontrado variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el estudio de secuenciación masiva en genes candidatos, es decir, en genes que por su función y patrón de expresión se sabe que están implicados en el neurodesarrollo, pero no existe un fenotipo clínico asociado a ellos.

Sin embargo, para poder definir una nueva entidad nosológica es muy importante demostrar la causalidad entre la variante encontrada en un determinado gen y el fenotipo del paciente. Las dos grandes plataformas de enfermedades raras, Orphanet y OMIM, tienen criterios diferentes para definir lo que es una nueva enfermedad, aun así, el número total de enfermedades raras en cada una de las plataformas es similar<sup>9,90</sup>.

Los estudios de asociación de genes candidatos mediante comparación de variantes presentes en gran cantidad de genes de enfermos con respecto a las presentes en población sana es útil para detectar genes de predisposición de enfermedad<sup>93</sup>. En el caso de las enfermedades de herencia mendeliana, es decir, de enfermedades de herencia monogénica, debemos utilizar además otro tipo de evidencias suplementaria.

Es fundamental que como miembros de la comunidad científica seamos capaces de separar las variantes genuinamente causantes de enfermedad de aquellas que no tienen suficiente evidencia para ser consideradas como tal, incluso aunque sean variantes raras y con potencial afectación funcional pero no definitivamente patogénicas en relación a la enfermedad que está siendo investigada<sup>95</sup>. En un análisis de 406 publicaciones que hacían referencia a enfermedades de causa genética con herencia mendeliana, se analizó y se detectó que 122 de los casos, es decir el 27%, eran polimorfismos comunes o había una evidencia insuficiente para considerarlas patogénicas<sup>171</sup>. Por todo esto, es importantísimo que cualquier variante candidata sea evaluada de forma rigurosa para prevenir anotaciones erróneas sobre patogenicidad en las bases de datos públicas. En este sentido, el grupo de expertos procedente de la *US National Human Genome Research Institute* realizaron una guía con las recomendaciones para para investigación de variantes en el genoma humano<sup>95</sup>.

Algunas de las recomendaciones que dan son por ejemplo, realizar estudios de cosegregación ya que para presuntas enfermedades monogénicas, la disponibilidad de múltiples familias con fenotipos clínicos muy similares aumenta sustancialmente el poder para poder atribuir la patogenia a un nuevo gen candidato. De este modo, es importante realizar estudios de los familiares, que si bien no confirman patogenicidad si pueden descartarla, siempre y cuando consideremos que hay penetrancia completa.

Para los casos en que hay un solo caso probando afectado y no hay antecedentes familiares, los investigadores deben considerar secuenciación de los padres no afectados de los probandos, lo que permite el descubrimiento eficiente de mutaciones *de novo* o genotipos heterocigotos compuestos.

En el caso de nuevos genes candidatos, los investigadores deben demostrar simultáneamente evidencia de que el gen está implicado en las vías fisiopatológicas alteradas en la enfermedad y por otro, que la variante encontrada es patogénica y altera el producto funcional del gen.

Por otro lado, la estadística va a ser un soporte clave a la hora de implicar variantes y genes, junto con la bioinformática y los estudios experimentales *in vivo* o *in vitro*. La evidencia aceptada en medicina de forma general, para realizar el cálculo formal de significación estadística en un conjunto de datos, es que la tasa general de error tipo I, esté por debajo del 5%. Este criterio minimiza el riesgo de que asumamos que una variante es causante del fenotipo del paciente siendo esto incierto. Teniendo en cuenta que cada individuo es portador de miles de variantes, y que aproximadamente la mitad de los individuos tienen variantes patogénicas *de novo* en secuencias codificantes, es necesario demostrar la causalidad<sup>96-98</sup>.

Además de las características intrínsecamente genéticas también hay que apoyarse en estudios funcionales e informáticos. Es importante demostrar que la secuencia de ADN afectada por esa variante tiene un papel en el proceso de la enfermedad. La anotación *in silico* y la genómica comparativa predicen si una variante es dañina en términos de función biológica.

Los datos obtenidos en investigación en cada laboratorio es importante que sean compartidos con el resto de la comunidad científica y médica y esta importancia se hace mucho más patente en el caso de las enfermedades raras. La base de datos DECIPHER<sup>106</sup> y los *International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium* (<https://www.iscaconsortium.org/>), con la ayuda de un número cada vez mayor de consorcios de recursos de enfermedades raras son plataformas para compartir datos disponibles al público investigador.

Huelga decir que los datos obtenidos en investigación proporcionan la base para la interpretación clínica posterior. En el caso de las enfermedades del SNC, puede determinar decisiones a nivel de diagnóstico prenatal de gran relevancia, así como modificar decisiones terapéuticas y el consejo genético. Por esto, la responsabilidad a la hora de decidir si una variante es patogénica y causante de la enfermedad es trascendental.

Siguiendo todas estas directrices hemos publicado un trabajo describiendo el fenotipo asociado al gen *IMMT*. Además, actualmente tenemos dos trabajos más que están siendo revisados. En el primero describimos el fenotipo asociado al gen *SUGLG2*, y por otro lado, tenemos otro trabajo en revisión en el que describimos un nuevo fenotipo grave asociado a variante patogénica en el gen *ZNF292* que pensamos que está siendo modificado por la presencia de una segunda variante patogénica en el gen *SRGAP3*.

El gen *IMMT* codifica para la proteína mitofilina, que forma parte de la membrana interna mitocondrial y regula la morfología de las crestas mitocondriales. El fenotipo asociado a este gen no había sido descrito hasta ahora. Por otra parte, hay estudios funcionales que demuestran que variantes en este gen producen alteración mitocondrial, tanto morfológica como funcional<sup>172</sup>.

Las mitocondrias son orgánulos presentes en todas las células eucariotas que están implicados en la producción energética celular mediante la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria. La disfunción mitocondrial da lugar a un grupo heterogéneo de trastornos conocidos como enfermedades mitocondriales. El espectro de gravedad y sintomatología asociada a estas enfermedades es muy amplio. Los órganos afectados son aquellos que tienen mayor demanda energética como el sistema nervioso central, corazón y músculos, aparato visual, sistema endocrino y renal principalmente.

La preservación de la morfología de la mitocondria es importante para mantener la función mitocondrial. La mitofilina es clave en la organización mitocondrial y es una proteína altamente conservada a nivel evolutivo. La pérdida de mitofilina da lugar a una expansión anormal de la membrana interna y una pérdida masiva de las uniones de las crestas mitocondriales.

Aunque no se habían descrito pacientes con alteraciones en este gen, nosotros hemos publicado dos pacientes con la variante c.895A>G (p.Lys299Glu) en homocigosis en el gen *IMMT*. Ambos son primos pertenecientes a una familia muy consanguínea. El fenotipo clínico que presentan es grave, complejo y muy similar entre ambos, con síntomas comunes, como la presencia de hipotonía, encefalopatía del desarrollo, y nistagmos desde el nacimiento secundario a neuropatía óptica.

En el estudio de cosegregación familiar se comprobó que solo estos dos individuos presentan la variante en homocigosis. Además, a ambos primos se les realizó un estudio extenso que incluía biopsia muscular, en el que se objetivaron cambios compatibles con enfermedad mitocondrial. En uno de ellos además se realizó estudio de microscopía electrónica que demostró la presencia de crestas mitocondriales alteradas, como cabía esperar por el defecto de la mitofilina.

Aplicando las recomendaciones de ACMG<sup>18</sup> y teniendo en cuenta es estudio de segregación familiar, la variante homocigota c.895A>G en el gen *IMMT* presente en estos pacientes se clasifica como probablemente patogénica (PM1, PM2, PP3, PP4). Esta variante provoca la sustitución del aminoácido altamente conservado lisina por ácido glutámico en la posición 299 de la proteína (p.Lys299Glu), predicha como patógena por la mayoría de los predictores *in-silico* (CADD, Polyphen, DANN, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, MutationTaster y SIFT). Por otro lado, como la variante modifica la posición -2 de la secuencia dadora de empalme del exón 8 (NM\_006839), también podría afectar a la eficiencia del procesamiento de este exón en el ARN mensajero (dbscSNV ADA score = 0.9998; RF score = 0.998). Esta variante está ausente en nuestra base de datos interna y está presente en un solo individuo en gnomAD (p=0.0000046).

Con todo esto podemos afirmar que variantes patogénicas o probablemente patogénicas en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *IMMT* producen un fenotipo clínico compatible con enfermedad mitocondrial grave desde el nacimiento que asocia discapacidad intelectual y atrofia óptica fundamentalmente.

En cuanto al artículo que hemos preparado con el título "*Mitochondrial encephalopathy with atypical autistic regression associated with probably pathogenic*

*variants in the SUCLG2 gene*”, también presentamos un caso clínico de una paciente con un fenotipo compatible con enfermedad mitocondrial.

La paciente es una niña de 6 años de edad, nacida de padres no consanguíneos, fruto de un embarazo gemelar bicorial-biamniótico de una madre sana de 45 años. La concepción fue natural. En el primer trimestre del embarazo presentó amenaza de aborto. Se realizó amniocentesis, que fue normal. El parto fue por cesárea a las 35 semanas de edad gestacional. Nació con bajo peso al nacer (1730g percentil 3-5, talla 41cm (p<3) y perímetro cefálico 32cm (p50-90)). Permaneció ingresada en el hospital comarcal debido a la prematuridad y a los 6 días de vida fue trasladada a un hospital de referencia por sospecha de enfermedad metabólica. Allí se confirmó la presencia de una cardiopatía compleja consistente en una ventana aorto-pulmonar amplia (8-10 mm) tipo A e interrupción del arco aórtico acompañada de acidosis metabólica que requirió cuidados intensivos. A los 13 días de vida se realizó cirugía extracorpórea correctora. A nivel cardiológico persistió cardiomegalia e hipertrofia biventricular de predominio derecho. Por este motivo se realizó estudio metabólico de los trastornos de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos que fueron normales, y resonancia magnética cardíaca. Tras el tratamiento con espironolactona durante un mes presentó regresión completa de la hipertrofia ventricular.

Posteriormente la paciente presentó buena evolución clínica, aunque permaneció en seguimiento por rehabilitación y fisioterapia por el riesgo neurológico y porque presentaba hallazgos compatibles con leucomalacia periventricular en la resonancia magnética cerebral. Hasta los 2 años de vida el desarrollo psicomotor estaba dentro de los parámetros esperados para la edad. A la edad de 3 años presentó una regresión en los hitos del desarrollo, perdiendo completamente el lenguaje, con estereotipias persistentes (bruxismo, episodios de hiperventilación, contención de las manos, ladeo de la cabeza). También perdió el uso intencional de las manos y presentaba torpeza motora gruesa compatible con ataxia. Además, estaba siendo seguida por oftalmología por déficit visual.

En ese momento, se sospechó que se tratara de una alteración metabólica de tipo mitocondrial por lo que se realizó estudio metabólico completo (estudio de ácidos

grasos de cadena muy larga, ácidos orgánicos, purinas y pirimidinas, y ácido láctico) incluyendo neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo, todos ellos normales. También se realizó un estudio enzimático de lipofuscinosis cerioidea CLN1 y CLN2, que resultó normal. La biopsia del músculo cuádriceps fue normal.

En la RM cerebral de control realizada en ese momento, se observó un aumento de la atrofia cerebral y los ya conocidos signos de leucomalacia periventricular. El análisis espectrofotométrico de la cadena respiratoria mitocondrial de músculo mostró una disminución en la actividad del complejo I (NADH-ubiquinona oxidorreductasa), el resto de los complejos fueron normales. No se detectó depleción de ADN mitocondrial.

Genéticamente se realizó un CGH array y la secuenciación del gen *MECP2*, todo normal. Posteriormente se realizó un exoma clínico ampliado que incluía genes candidatos presumiblemente relacionados con trastornos del neurodesarrollo. En este último estudio se detectaron dos variantes heterocigotas probablemente patogénicas en el gen *SUCLG2* (número de acceso de GenBank NM\_003848.4). La variante heterocigota c.235G>A (p.Glu79Lys) y la variante heterocigota c.517G>C (p.Gly173Trp) que modifican dos aminoácidos altamente conservados, para los cuales los análisis *in-silico* (Polyphen, SIFT, DANN, CADD) sugieren una consecuencia probablemente patogénica. Ambas se informan con frecuencias alélicas muy bajas en la base de datos gnomAD (0.00009 y 0.00004, respectivamente), sin que se reporten homocigotos. Desafortunadamente, no se pudo realizar el estudio familiar porque los padres rechazaron el estudio genético por motivos religiosos. Sin embargo, vale la pena señalar que ambas variantes están presentes en frecuencias alélicas muy diferentes en distintas poblaciones (según la base de datos gnomAD), lo que sugiere que se segregan de forma independiente, por lo que es muy probable que se encuentren en heterocigosis compuesta en nuestra paciente. Finalmente, se realizó un ensayo terapéutico con cofactores sin mejoría significativa de los síntomas. Tanto los signos clínicos como la historia natural de nuestra paciente apuntan a una alta sospecha clínica de enfermedad mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales en el período perinatal se presentan clásicamente con hipotonía y acidosis láctica. En algunos casos, también se asocia con encefalopatía

y crisis. A nivel cardíaco es característica la presencia de miocardiopatía tanto hipertrófica como dilatada. La disfunción mitocondrial en la enfermedad cardiovascular es causada por un aumento del estrés oxidativo y la apoptosis celular, así como por mecanismos autofágicos deteriorados, secundarios a la disminución de la producción de ATP y energía<sup>173-176</sup>. Otros sistemas habitualmente afectados en las enfermedades mitocondriales son el visual (atrofia óptica, oftalmoplejía externa progresiva o retinopatía pigmentaria), auditivo (sordera neurosensorial), renal (tubulopatía renal), endocrino (diabetes mellitus) y especialmente a nivel nervioso (neuropatía axonal periférica, convulsiones, encefalopatía/demencia, ataxia) o también la intolerancia al ejercicio<sup>177</sup>. También existe una creciente evidencia de que la disfunción mitocondrial parece estar estrechamente asociada con un subconjunto de pacientes con trastornos del espectro autista (TEA)<sup>178</sup>. Este subgrupo de pacientes presenta algunos aspectos clínicos característicos como la regresión atípica muchas veces desencadenada por un evento inflamatorio (52%), convulsiones (41%), retraso motor (51%), fatiga, letargo, síntomas gastrointestinales (74%), sexo femenino (39%), aumento del lactato (78%) y piruvato (45%)<sup>179</sup>.

El TEA afecta aproximadamente al 1-2% de la población mundial y entre el 15-47% presentan regresión autista. La regresión se caracteriza por la pérdida de habilidades previamente adquiridas, que implican especialmente una pérdida del habla y/o de la capacidad de respuesta social, habiendo presentado un período de desarrollo temprano normal o casi normal. Este grupo de pacientes tiende a desarrollar TEA grave<sup>180</sup>.

Rivera *et al.* publicaron un caso de un paciente con síndrome de depleción del ADN mitocondrial secundario a mutación en *SUCLG1* con arco aórtico interrumpido<sup>181</sup>. Por otro lado, la hipertrofia cardíaca detectada tras la cirugía extracorpórea no estaba justificada por el estado clínico de la paciente, aunque hasta ahora no se ha descrito la regresión de la hipertrofia cardíaca en pacientes con enfermedad mitocondrial.

Nuestra paciente también presenta una regresión autista atípica con posterior estabilización clínica, persistiendo la casi ausencia de lenguaje, déficit del contacto visual y estereotipias continuas. La prevalencia de enfermedad mitocondrial en la

población general es de aproximadamente 0,01%, cifra muy inferior al 5% estimado en pacientes con TEA (intervalo de confianza al 95%: 3,2 - 6,9%)<sup>182</sup>. Muchos pacientes con deleciones o variantes patogénicas en el ADN mitocondrial presentan TEA. También existen estudios sobre muestras de autopsia de cerebros de pacientes con TEA en los que se ha observado disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial o de la cadena de transporte de electrones<sup>182-184</sup>.

Hasta el momento no se ha publicado ningún paciente con variantes patogénicas en el gen *SUCLG2* y en consecuencia se planteó que la deficiencia de este gen podría ser incompatible con la vida<sup>185</sup>. Si este es el caso, planteamos la hipótesis de que al menos una de las dos variantes en nuestra paciente es probablemente leve (hipomórfica), es decir, causa una pérdida parcial de la función del gen. Esto explicaría además por qué no se ha detectado una depleción del ADN mitocondrial. De manera similar, se han descrito pacientes con mutación en *SUCLG1* que también tienen un grado reducido de depleción de ADN mitocondrial a pesar de presentar un fenotipo grave y cambios no apreciables en las actividades de cadena respiratoria mitocondrial<sup>185</sup>. Relacionado con esto, existen otros casos en la literatura de pacientes con mutaciones en *SUCLG1*<sup>186,187</sup> o *SUCLA2*<sup>188,189</sup> sin cambios significativos en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y/o depleción del ADN mitocondrial. Esto llevó a plantear la hipótesis de que en los pacientes con variantes patológicas en estos genes existen mecanismos distintos al déficit del ADN mitocondrial que pueden producir síntomas graves incluso en presencia de niveles normales o levemente reducidos de ADN mitocondrial<sup>181</sup>.

La succinil-CoA sintasa cataliza la síntesis reversible de succinil-CoA a partir de succinato y coenzima A. La enzima funcional es un heterodímero compuesto por una subunidad  $\alpha$  codificada por *SUCLG1* y una subunidad  $\beta$ , codificada por dos genes alternativos, *SUCLG2* para la isoforma GTP y *SUCLA2* para la isoforma ATP.

Las mutaciones en los genes *SUCLG1* y *SUCLA2* se han asociado con el síndrome de depleción del ADN mitocondrial (MTDPS por sus siglas en inglés), MTDP5 y MTDP9, respectivamente. MTDPS es un grupo genéticamente heterogéneo de trastornos mitocondriales autosómicos recesivos (15 genes conocidos hasta ahora) de muy baja prevalencia, que tienen en común un contenido reducido de ADN mitocondrial que

conduce a la pérdida de la función mitocondrial. De manera característica, se ven afectados los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial codificados por ADN mitocondrial, es decir, los complejos I, III y IV, así como la ATP sintetasa (complejo IV). Se trata de trastornos mitocondriales graves que afectan predominantemente al cerebro y los músculos desde los primeros años de vida<sup>177,190,191</sup>. Clínicamente se caracterizan por presentar afectación digestiva, neurológica, hepática, muscular y cardíaca variable.

Sorprendentemente, hasta el momento no se ha informado de ningún paciente con síndrome de depleción mitocondrial o cualquier otro fenotipo clínico secundario a mutaciones en el gen *SUCLG2*. Como conclusión podemos afirmar que se detectaron dos variantes de cambio de aminoácido heterocigotas probablemente patológicas en el gen *SUCLG2* en una paciente de 6 años con antecedente de acidosis láctica, miocardiopatía hipertrófica transitoria, déficit visual y regresión autista atípica con discapacidad intelectual grave, fenotipo compatible con enfermedad mitocondrial. La biopsia muscular confirmó una deficiencia del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Por esto proponemos *SUCLG2* como un nuevo gen candidato que causa disfunción mitocondrial.

Por último, comentaremos el artículo que está en revisión titulado "*SRGAP3 as a possible genetic modifier of the phenotype associated to de novo mutation in ZNF292: autistic regression and severe conduct disorder*".

Variantes patológicas en el gen *ZNF292* se han asociado recientemente a un espectro de trastornos del neurodesarrollo que incluyen el TEA y la discapacidad intelectual (DI). *ZNF292* codifica una proteína de dedos de zinc (*zinc-finger*) altamente conservada, que actúa como factor de transcripción que se expresa en el cerebro humano en desarrollo y es fundamental para el desarrollo neurológico. Actualmente, solo se han descrito 37 individuos con variantes patogénicas *de novo* en *ZNF292*. En este trabajo presentamos un varón de 6 años con trastorno de conducta grave, DI y macrocefalia, en el que se detectó una mutación de alteración de la pauta de lectura *de novo* en el gen *ZNF292*,

además de una variante de procesamiento del ARN (*splicing*), c.2227+1G>T en el gen candidato *SRGAP3*, también *de novo*.

En 2012, de Ligt *et al.* describieron por primera vez el gen *ZNF292* como posible gen candidato causante de trastorno del neurodesarrollo<sup>39</sup>. En los siguientes 8 años, se publicaron 8 individuos más. Recientemente, Mirzaa *et al.* han publicado la descripción fenotípica de 28 individuos con variantes *de novo* o heredadas en *ZNF292*. Todos presentaban DI con o sin TEA o TDAH, excepto uno de ellos que presentó TEA sin DI con retraso en el habla a los 6 años. Otros hallazgos encontrados en esta serie han sido la presencia de regresión del lenguaje, talla baja, anomalías del tono (hipo e hipertonia), rasgos faciales dismórficos, anomalías oculares, alteración del perímetro occipitofrontal de la cabeza (microcefalia) y anomalías cerebrales (ventriculomegalia, anomalías del cuerpo caloso, heterotopias periventriculares y heterotopia nodular)<sup>192</sup>.

Las variantes en el gen *SRGAP3*, ubicado en el cromosoma 3p25, se han asociado previamente con DI<sup>193,194</sup>. El gen *SRGAP3* codifica la proteína activadora de GTPasa Slit-Robo (srGAP), una proteína adaptadora involucrada en la regulación de la reorganización del citoesqueleto a través de la inhibición de la Rho GTPasa Rac1<sup>195</sup>. Los estudios en ratones *Srgap3* *-/-* demostraron una asociación con trastornos del neurodesarrollo y fenotipos intermedios relacionados con la esquizofrenia<sup>196</sup>.

El paciente es un niño de 6 años nacido de padres sanos no consanguíneos. Embarazo por concepción natural sin incidencias. Parto por cesárea en la semana 41 de gestación normal. No hay antecedentes neurológicos referidos en su familia. A los dos meses de edad ingresó por primera vez en el hospital por episodios de atragantamiento con sospecha de apnea asociada e intensa palidez cutánea. Se realizó ecografía cerebral transfontanelar y electroencefalograma, que fueron normales. Finalmente, los episodios se atribuyeron a reflujo gastroesofágico fisiológico y se tomaron medidas posturales con mejoría parcial. A los 5 meses de vida fue remitido a neurología pediátrica por presentar macrocefalia adquirida con perímetro cefálico de 46cm (p > 99, + 2,88 DE). El perímetro materno era de 54,5 cm (p39) y el perímetro cefálico del padre de 61 cm (p99 + 2,31 DE), por lo que se diagnosticó macrocefalia familiar.

Neurológicamente, desde los 5 meses de edad presentó tendencia a la hiperextensión del cuello e hipertonia del tronco, no relacionada con la alimentación, y también presentó irritabilidad importante. A los 8 meses se observó sedestación inestable y persistencia de gran irritabilidad. Adquirió los hitos de la psicomotricidad con normalidad (marcha a los 14 meses), aunque con ligero retraso en el lenguaje, y adecuada socialización. A nivel cognitivo no se detectó retraso, pero sí gran irritabilidad con rabietas frecuentes y gran inquietud motora.

Ingresó a los 17 meses de edad, por crisis febril compleja, por recurrencia de un segundo episodio en las primeras 24 horas del proceso febril.

A los 31 meses fue diagnosticado de Trastorno Específico del Lenguaje con sospecha de rasgos de TEA, retraso significativo en la maduración con una edad de desarrollo de 22 meses. Se realizó seguimiento en rehabilitación y estimulación temprana. A los 33 meses inició el control de esfínteres diurno. A los 34 meses inició un trastorno del sueño compatible con terrores nocturnos.

A los 39 meses los padres consultaron porque el paciente presentaba pérdida del lenguaje adquirido (en ese momento solo balbuceaba, ecolalia ocasionalmente), pérdida del control de esfínteres, pérdida de la capacidad para realizar el juego simbólico acompañado de una agitación motriz con juego caótico, desorganizado y comportamiento hiperactivo, berrinches constantes y heteroagresividad. No referían desencadenantes, salvo ansiedad por separación al inicio de la escolarización a los 34 meses de edad. Por este motivo se ingresó al paciente objetivándose hipercinesia continua, falta de sentido del peligro, escaso contacto visual, falta de atención sostenida, hetero y auto-agresividad. En cuanto al lenguaje, había ecolalia patente, habla ininteligible y basada en monosílabos. A nivel motor mantuvo una buena coordinación fina y gruesa, sin focalidad neurológica. Se realizaron varios ensayos terapéuticos con risperidona, clorpromazina (con efecto paradójico), clorazepato dipotásico, aripiprazol, metilfenidato (efecto rebote), quetiapina (sedación excesiva), clonidina y melatonina sin mejoría clínica.

En ese momento se le realizó un estudio metabólico completo, con ácidos orgánicos, aminoácidos en sangre y orina, amonio, homocisteína, cobre y ceruloplasmina y

oligosacáridos todos ellos normales. El estudio de anticuerpos antiNMDA en líquido cefalorraquídeo fue normal. En la RM cerebral realizada se observó una ligera disminución del diámetro anteroposterior del cuerpo calloso por reducción del esplenio con presencia de opérculos toscos, principalmente el izquierdo, pero sin signos de polimicrogiria, probablemente secundaria a dismorfia leve debido al pequeño calibre del esplenio. Además, presentaba ectasia difusa de espacios perivasculares de Virchow-Robin y cisterna magna con lateralización derecha.

En el curso clínico posterior hasta la edad de 6 años, el paciente ha presentado un gravísimo problema de conducta refractario al tratamiento farmacológico, presenta autolesiones, con fractura de codo tras caída y extracción de varios dientes. Por otro lado, presenta episodios compatibles con risa gelástica pluricotidiana, episodios de desconexión (unos 2 o 3 al día) y episodios de agitación nocturna. Por ello, ante la sospecha de que se tratara de epilepsia, aun cuando el EEG y la polisomnografía fueran normales, se pautó tratamiento con valproato. También presenta múltiples estereotipias continuas, consistentes en girar la cabeza, estrechar las manos y golpearse la cara. Presenta trastorno del sueño con insomnio rebelde al tratamiento (se ha realizado ensayos terapéuticos con melatonina, hidroxizina, clonidina y risperidona). En cuanto al lenguaje y la socialización, existe una alteración importante de la comprensión, lenguaje estereotipado no funcional, falta de contacto visual e incapacidad para aprender. La autonomía está gravemente afectada. El perímetro cefálico es de 57cm ( $p > 99$ , +3,34 DE).

El estudio genético con CGH array fue normal. En el estudio de secuenciación del exoma se encontró una inserción heterocigota de una base en la secuencia codificante del exón 8 del gen *ZNF292* que provoca un desplazamiento del marco de lectura desde la posición 3950 (c.3950delA) y la aparición de una señal de parada temprana, dando como resultado una proteína incompleta que ha perdido varios dominios funcionales, por lo que se clasificó como patógena. Este cambio no ha sido descrito en la literatura o bases de datos. El estudio de sus padres por secuenciación de Sanger confirmó que era *de novo*. Por otro lado, la variante de *splicing* heterocigota c.2227+1G>T se encontró en el gen *SRGAP3*. Esta variante no ha sido reportada previamente y se prevé que provoque una alteración del procesamiento del exón 18 (de 22), clasificándose

como probablemente patógena de acuerdo con las recomendaciones de la ACMG. En el estudio de segregación realizado a la familia se comprobó que era *de novo*. A destacar que el hallazgo de una variante disruptiva en *SRGAP3* es extremadamente raro, dado que este gen muestra métricas de restricción en gnomAD altamente significativas de intolerancia a la variación de pérdida de función (pLI = 1, relación observada / esperada = 0.13)<sup>140</sup>.

Actualmente solo hay 37 individuos descritos, por lo que es probable que el fenotipo asociado con variaciones en *ZNF292* aún no esté bien establecido. Este paciente también tenía macrocefalia, inicialmente considerada macrocefalia familiar, sin embargo, existe evidencia de que muchos pacientes con TEA, con o sin regresión, presentan un perímetro cefálico aumentado<sup>192</sup>. En el caso de nuestro paciente, no podemos afirmar que la variante en *ZNF292* sea la causante del aumento del perímetro cefálico.

El trastorno del espectro autista (TEA) describe una amplia gama de comportamientos interpersonales humanos que abarca tanto la diversidad entre individuos en cuanto a la gravedad de los síntomas, de leves a graves, y la diversidad etiológica subyacente. Además, el TEA puede estar asociado con comorbilidades neurológicas, como DI, epilepsia, comorbilidades psiquiátricas, como trastornos de conducta y esquizofrenia o comorbilidades físicas. Estos pacientes son un ejemplo claro de la importancia de la valoración minuciosa del fenotipo junto con el del genotipo de pacientes con trastornos del neurodesarrollo. Las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación tienen un alto rendimiento diagnóstico y aporta información sobre nuevos genes candidatos a TEA.

El fenotipo que presenta nuestro paciente es complejo y fundamentalmente predomina un trastorno de conducta muy grave. Actualmente ninguno de los pacientes descritos en la literatura con TND asociado a *ZNF292* presenta sintomatología similar. Por otra parte, en estudios realizados en ratones *Knockout* para *SRGAP3* se observó que estos presentaban, además del trastorno del neurodesarrollo, síntomas fenotípicos intermedios relacionados con la esquizofrenia y tics<sup>196</sup>. Además, se informaron defectos neuroanatómicos en el modelo animal, incluidos ventrículos

laterales agrandados y engrosamiento de la sustancia blanca<sup>195,196</sup>. Por lo tanto, postulamos que la presencia de la variante c.2227+1G>T en el gen *SRGAP3* puede haber actuado como un factor modificador, contribuyendo al fenotipo conductual.

## **VIII. CONCLUSIONES**

## VIII. CONCLUSIONES

### Conclusiones concretas:

1. Incluso en un gen tan estudiado como es *SCN1A*, con miles de pacientes descritos, actualmente nos podemos encontrar con nuevos fenotipos atípicos como la Encefalopatía Epiléptica y del Desarrollo con artrogriposis descrita en este trabajo.
2. Hay evidencia de que variantes hipomórficas en *SCN1A* se comportan de forma recesiva, causando los mismos trastornos que las variantes dominantes, pero en homocigosis o heterocigosis compuesta.
3. Las variantes con herencia recesiva en el gen *SCN1A* presentan una correlación genotipo-fenotipo similar a la descrita para las variantes dominantes.
4. Las variantes patológicas en el gen *SPTAN1* pueden causar un amplio espectro de sintomatología neurológica, desde afectación sólo periférica a trastornos del neurodesarrollo con o sin epilepsia.
5. *SPTAN1* debería ser considerado un gen candidato a estudiar ante pacientes con epilepsia y trastornos de la migración neuronal y una causa posible de heterotopias subependimarias.
6. Existe una infrarrepresentación de mujeres en los fenotipos leves asociados a variantes en el gen *SPTAN1*, en los casos publicados.
7. Variantes patogénicas o probablemente patogénicas en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *IMMT* producen un fenotipo clínico compatible con enfermedad mitocondrial grave desde el nacimiento que asocia discapacidad intelectual y atrofia óptica fundamentalmente.
8. Hasta el momento no se ha informado de ningún paciente con síndrome de depleción mitocondrial o cualquier otro fenotipo clínico secundario a mutaciones en el gen *SUCLG2*. Nosotros proponemos que variantes patogénicas con herencia autosómica recesiva pueden producir un fenotipo compatible con enfermedad mitocondrial consistente en acidosis láctica, miocardiopatía hipertrófica transitoria, déficit visual y regresión autista atípica con discapacidad intelectual severa.

9. Las variantes patogénicas en el gen *ZNF292* causan un espectro variable de trastornos del neurodesarrollo. Aquí presentamos un paciente con un fenotipo clínico caracterizado por TEA con regresión autista y trastornos de conducta graves secundarios a una variante patogénica en *ZNF292*, y posiblemente agravado por otra mutación de novo de pérdida de función en el gen *SRGAP3*.

### **Conclusiones generales**

10. El fenotipado extenso de los pacientes con trastornos del neurodesarrollo correlacionado con el genotipo amplía nuestro conocimiento sobre las bases fisiopatológicas que subyacen a los trastornos del neurodesarrollo.
11. Los síntomas en pacientes con trastornos graves del neurodesarrollo pueden ser debidos a la alteración en un único gen, pero también a la interacción de varios factores genéticos (doble impacto).
12. El diagnóstico etiológico de los trastornos neuropediátricos es difícil por su elevada heterogeneidad y su baja o muy baja prevalencia. Los estudios genéticos de secuenciación masiva de nueva generación han supuesto una revolución en esta área, donde fenotipos similares pueden deberse a mutaciones en diferentes genes, mientras que aumenta el número de genes con pleiotropismo fenotípico.
13. No existe actualmente una definición sobre lo que es un fenotipo atípico. Nosotros proponemos que serían los fenotipos fundamentalmente secundarios a la alteración de un gen no descritos previamente en OMIM ni Orphanet.
14. El conocimiento sobre las posibles consecuencias clínicas de las diferentes mutaciones genéticas es una ciencia emergente en el área de la Neuropediatria, lo que exige un continuo reanálisis considerando la evidencia científica actualizada.

## **IX. PERSPECTIVAS FUTURAS**

## IX. PERSPECTIVAS FUTURAS

Seguir trabajando en el fenotipado extenso y realizando el correlato fenotipo-genotipo puede ampliar el conocimiento que tenemos sobre la interpretación del genoma humano y ayudar al diagnóstico etiológico de nuestros pacientes.

Cada paciente con patología neuropediátrica sin diagnóstico etiológico es un reto que debemos afrontar. Hemos visto que la evaluación de nuevos genes candidatos nos abre el camino para ampliar el número de pacientes diagnosticados.

Es necesario plantear estudios a gran escala, con colaboraciones multidisciplinares y con diferentes grupos de investigación con el objetivo de analizar la asociación entre variantes y enfermedades. Para esto es necesario evaluar el mayor número de pacientes posible y tener registros exhaustivos del fenotipo con nomenclatura estandarizada HPO. Estos estudios nos permitirán conocer la correlación fenotipo-genotipo, así como la penetrancia y expresividad de cada gen. En este sentido, será necesario desarrollar modelos estadísticos formales para cuantificar la fuerza de la evidencia que determina la correlación. El trabajo riguroso y compartido permitirá diferenciar las variantes genéticas causantes de enfermedad de aquellas variantes raras no patógenas que pueden estar presentes en los genomas de los seres humanos.

Por tanto, el estudio de secuenciación de nueva generación se considera actualmente la prueba genética más completa. Sin embargo, el diagnóstico genético implica el análisis especializado y riguroso de los datos. Para los neuropediatras, es cada vez más importante el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad. En la práctica clínica actual el proceso de diagnóstico médico se basa en conectar los signos objetivos que aparecen en el paciente y saber qué entidad los causan. El conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad neurológica permitirá alcanzar con mayor precisión el diagnóstico correcto, prever la evolución y, en algunos casos, elegir el tratamiento más adecuado. También es fundamental a nivel práctico, el conocimiento de las posibilidades de diagnóstico prenatal y consejo genético para las familias.

Hay descritos en la literatura científica varios pacientes en los que concurren mutaciones patogénicas en *SCN1A* y malformaciones del desarrollo cortical, sin

embargo, hasta ahora no hay suficiente evidencia para afirmar que tengan un nexo etiológico común. Sin embargo, la presencia de malformaciones del desarrollo cortical en un paciente con fenotipo compatible con síndrome de Dravet o GEFS+ deberá ser estudiada más profundamente en el futuro. En los casos en los que concurren ambas entidades debemos de valorar cuidadosamente los fármacos anticrisis más adecuados y solicitar estudio del gen *SCN1A* para descartar la presencia de variantes patogénicas.

La infrarrepresentación de mujeres en los fenotipos leves asociados a *SPTAN1* deberá ser estudiada en el futuro.

Este trabajo ha supuesto una ampliación del conocimiento que teníamos sobre los pacientes con variantes en *SCN1A*, *SPTAN1* y también la descripción de nuevos genes candidatos como *IMMT*, *SUCLG2* y *SRGAP3*. Seguir en esta línea de investigación promete nuevos resultados ampliando los pacientes valorados.

## **X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*. 2012;135(Pt 5):1348-1369.
2. Weaver W. Stakes in nuclear power. *Public Health Rep*. 1957;72(11):1005-1006.
3. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
4. Franklin R, Gosling RG. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature*. 1953;171(4356):740-1.
5. Sanger F, Brownlee GG. Methods for determining sequences in RNA. *Biochem Soc Symp*. 1970;30:183-97.
6. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2003;226:3-6.
7. Moraes F, Góes A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochem Mol Biol Educ*. 2016;44(3):215-23.
8. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. 2003;300(5617):286-90.
9. <https://omim.org>
10. Amberger JS, Hamosh A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A Knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2017;58:1.2.1-1.2.12.
11. Bodenreider O. The Unified Medical Language System (UMLS): integrating biomedical terminology. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:D267-70.
12. Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen JOB, Danis D, Gouridine JP, *et al*. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D1018-D1027.
13. Cornet R, de Keizer N. Forty years of SNOMED: a literature review. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2008;8 (Suppl 1):S2.
14. Cornet R. Definitions and qualifiers in SNOMED CT. *Methods Inf Med*. 2009;48(2):178-83.

15. Allanson JE, Biesecker LG, Carey JC, Hennekam RCM. Elements of morphology: introduction. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(1):2-5.
16. Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. *Annu Rev Med*. 2012;63:35-61.
17. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, *et al*. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med*. 2008;10(4):294-300.
18. 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: 405-424.
19. Hu WF, Chahrour MH, Walsh CA. The diverse genetic landscape of neurodevelopmental disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:195-213.
20. Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000;108 Suppl 3:511-533.
21. European Union. Draft Baseline Report on neurodevelopmental disorders in the framework of the European Environment and Health Strategy. Technical working group on priority diseases, subgroup neurodevelopmental disorders;2003, 7.
22. Dietrich KN, Eskenazi B, Schantz S, Yolton K, Rauh VA, Johnson CB, *et al*. Principles and practices of neurodevelopmental assessment in children: lessons learned from the Centers for Children’s Environmental Health and Disease Prevention Research. *Environ Health Perspect*. 2005;113(10):1437-1446.8.
23. Thapar A, Cooper M, Rutter M. Neurodevelopmental disorders. *Lancet Psychiatry*. 2017;4(4):339-346.
24. Capute AJ, Palmer FB. A pediatric overview of the spectrum of developmental disabilities. *J Dev Behav Pediatr*. 1980;1(2):66-9.
25. Capute AJ, Accardo PJ, Bender M, Ross A. Dyslexia: initial assessment and outcome. *J Dev Behav Pediatr*. 1980;1(1):24-8.
26. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition: DSM-5. Washington DC: APA; 2013.

27. Ismaila FY, Shapiro BK. What are neurodevelopmental disorders?. *Curr Opin Neurol.* 2019;32(4):611-616.
28. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, *et al.* Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68(11):1095-102.
29. Astrom RL, Wadsworth SJ, DeFries JC. Etiology of the stability of reading difficulties: the longitudinal twin study of reading disabilities. *Twin Res Hum Genet.* 2007;10(3):434-9.
30. Larsson H, Chang Z, D'Onofrio BM, Lichtenstein P. The heritability of clinically diagnosed attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. *Psychol Med.* 2014;44(10):2223-9.
31. Nieto-Barceló JJ, González Montes, Gonzalo Alonso I, Martinez F, Aparisi MJ, Martínez-Matilla M, *et al.* Variant in CACNA1G as a Possible Genetic Modifier of Neonatal Epilepsy in an Infant with a De Novo SCN2A Mutation. *J Pedia Genet.* DOI <https://doi.org/10.1055/s-0041-1723958>.
32. Saudubray JM, Garcia-Cazorla A. An overview of inborn errors of metabolism affecting the brain: from neurodevelopment to neurodegenerative disorders. *Dialogues Clin Neurosci.* 2018;20(4):301-325.
33. Chiriboga CA. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Rev Neurother.* 2017;17(10):955-962.
34. Stevens D, Claborn MK, Gildon BL, Kessler TL, Walker C. Onasemnogene Apeparvovec-xioi: Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *Ann Pharmacother.* 2020;54(10):1001-1009.
35. Messina S, Sframeli M. New Treatments in Spinal Muscular Atrophy: Positive Results and New Challenges. *J Clin Med.* 2020;9(7):2222.
36. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, Goodspeed K, Gray SJ, Kay CN, *et al.* Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs *Mol Ther.* 2021; 29(2):464-488.
37. Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet.* 2016 Jan;17(1):9-18.

38. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH, *et al.* Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509):344-347.
39. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWH, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, *et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New Engl J Med*. 2012;367(20):1921-1929.
40. Ebrahimi-Fakhari D, Sahin M. Autism and the synapse: emerging mechanisms and mechanism-based therapies. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(2):91-102.
41. Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, *et al.* Rare disease terminology and definitions-a systematic global review: Report of the ISPOR rare disease special interest group. *Value Health*. 2015;18(6):906–914.
42. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *Am J Med Genet A*. 2019;179(6):885-892.
43. Chiu ATG, Chung CCY, Wong WHS, Lee SL, Chung BHY. Healthcare burden of rare diseases in Hong Kong—Adopting ORPHAcodes in ICD-10 based healthcare administrative datasets. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):147.
44. Walker CE, Mahede T, Davis G, Miller LJ, Girschik J, Brameld K, *et al.* The collective impact of rare diseases in Western Australia: An estimate using a population-based cohort. *Genet Med*. 2016;19:546.
45. <https://www.enfermedades-raras.org/>
46. Guillem P, Cans C, Robert-Gnansia E, Aymé S, Jouk PS. Rare diseases in disabled children: An epidemiological survey. *Archives of Disease in Childhood*. 2008;93(2):115–118.
47. Rosello M, Caro-Llopis A, Orellana C, Oltra S, Alemany-Albert M, Marco-Hernandez AV, *et al.* Hidden etiology of cerebral palsy: genetic and clinical heterogeneity and efficient diagnosis by next-generation sequencing. *Pediatr Res*. 2021;90(2):284-288.
48. Kjeldsen MJ, Corey LA, Solaas MH, Friis ML, Harris JR, Kyvik KO, *et al.* Genetic factors in seizures: a population-based study of 47,626 US, Norwegian and Danish twin pairs. *Twin Res Hum Genet*. 2005;8(2):138-47.

49. Vadlamudi L, Andermann E, Lombroso CT, Schachter SC, Milne RL, Hopper JL, *et al.* Epilepsy in twins: insights from unique historical data of William Lennox. *Neurology*. 2004;62(7):1127-33.
50. Webb DW, Osborne JP. Tuberous sclerosis. *Arch Dis Child*. 1995;72(6):471-4.
51. Dolce A, Ben-Zeev B, Naidu S, Kossoff EH. Rett syndrome and epilepsy: an update for child neurologists. *Pediatr Neurol*. 2013;48(5):337-45.
52. Berry-Kravis E. Epilepsy in fragile X syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 2002;44(11):724-8.
53. Mudigoudar B, Nune S, Fulton S, Dayyat E, Wheless JW. Epilepsy in 22q11.2 Deletion Syndrome: A Case Series and Literature Review. *MPediatr Neurol*. 2017;76:86-90.
54. Pelc K, Boyd SG, Cheron G, Dan B. Epilepsy in Angelman syndrome. *Seizure*. 2008;17(3):211-7
55. Steinlein OK, Noebels JL. Ion channels and epilepsy in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(3):286-91.
56. Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, Fish DR, Marsden CD, Andermann E, *et al.* Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A distinctive clinical disorder. *Brain*. 1995;118( Pt 1):61-73.
57. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, van Broeckhoven C, de Jonghe P. De novo mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet*. 2001; 68:1327-1332.
58. Dravet C. How Dravet syndrome became a model for studying childhood genetic epilepsies. *Brain*. 2012; 135:2309-2311
59. Symonds JD, McTague A. Epilepsy and developmental disorders: Next generation sequencing in the clinic. *Eur J Paediatr Neurol*. 2020;24:15-23.
60. Tumienė B, Maver A, Writzl K, Hodžić A, Čturiilo G, Kuzmanić-Šamija R, *et al.* Diagnostic exome sequencing of syndromic epilepsy patients in clinical practice. *Clin Genet*. 2018;93(5):1057-1062.
61. Palmer EE, Sachdev R, Macintosh R, Melo US, Mundlos S, Righetti S, *et al.* Diagnostic Yield of Whole Genome Sequencing After Nondiagnostic Exome Sequencing or Gene Panel in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Neurology*. 2021;96(13):e1770-e1782.

62. Møller RS, Dahl HA, Helbig I. The contribution of next generation sequencing to epilepsy genetics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(12):1531-8.
63. Symonds JD, Zuberi SM, Stewart K, McLellan A, O'Regan M, MacLeod S, *et al.* Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain.* 2019;142(8):2303-2318.
64. Guo H, Duyzend MH, Coe BP, Baker C, Hoekzema K, Gerds J, *et al.* Genome sequencing identifies multiple deleterious variants in autism patients with more severe phenotypes. *Genet Med.* 2019;21(7):1611-1620.
65. Velmeshev D, Schirmer L, Jung D, Haeussler M, Perez Y, Mayer S, *et al.* Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science.* 2019;364(6441):685-689.
66. McRae JF, Clayton S, Fitzgerald TW, Kaplanis J, Prigmore E, *et al.* Prevalence and architecture of De novo mutations in developmental disorders. *Nature.* 2017; 542(7642):433-438.
67. Pevsner J, Hsu SC, Scheller RH. n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1994;91: 1445-1449.
68. Gengyo-Ando K, Kitayama H, Mukaida M, Ikawa Y. A murine neural-specific homolog corrects cholinergic defects in *Caenorhabditis elegans* unc-18 mutants. *J. Neurosci.* 1996;16: 6695-6702.
69. Saitou H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, *et al.* De novo mutations in the gene encoding *STXBP1* (*MUNC18-1*) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 2008; 40: 782-788.
70. Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, Hartmann C, Moller RS, Hjalgrim H, *et al.* *GABRA1* and *STXBP1*: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology.* 2014; 82:1245-1253.
71. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, *et al.* De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature.* 2013;501: 217-221.
72. Vlaskamp DRM, Rump P, Callenbach PMC, Vos YJ, Sikkema-Raddatz B, van Ravenswaaij-Arts CMA, *et al.* Haploinsufficiency of the *STX1B* gene is associated with myoclonic astatic epilepsy. *Eur J Paed Neurol.* 2016;20: 489-492.

73. Suri M, Evers JMG, Laskowski RA, O'Brien S, Baker K, Clayton-Smith J, *et al.* Protein structure and phenotypic analysis of pathogenic and population missense variants in *STXBP1*. *Mol Genet Genomic Med.* 2017;5(5):495-507.
74. Abramov D, Lewis Guiberson NG, Burré J. *STXBP1* encephalopathies: Clinical spectrum, disease mechanisms, and therapeutic strategies. *J Neurochem.* 2021;157(2):165-178.
75. Brunklaus A, Ellis R, Reavey E, Forbes GH, Zuberi SM. Prognostic, clinical and demographic features in *SCN1A* mutation-positive Dravet syndrome. *Brain.* 2012;135: 2329-2336.
76. Dravet C. How Dravet syndrome became a model for studying childhood genetic epilepsies. *Brain.* 2012; 135:2309-2311
77. Scheffer IE, Nabbout R. *SCN1A*-related phenotypes: Epilepsy and beyond. *Epilepsia.* 2019;60 Suppl 3:S17-S24.
78. Sadleir LG, Mountier EI, Gill D, Davis S, Joshi C, DeVile C, *et al.* Not all *SCN1A* epileptic encephalopathies are Dravet syndrome: Early profound Thr226Met phenotype. *Neurology.* 2017;89(10):1035-1042.
79. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, *et al.* Mutations of neuronal voltage-gated Na<sup>+</sup> channel alpha 1 subunit gene *SCN1A* in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia.* 2004; 45: 140-148.
80. Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, *et al.* Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel *SCN1A* in familial hemiplegic migraine. *Lancet.* 2005;366(9483):371-7.
81. Dhifallah S, Lancaster E, Merrill S, Leroudier N, Mantegazza M, Cestele S, *et al.* Gain of function for the *SCN1A*/hNav1.1-L1670W mutation responsible for familial hemiplegic migraine. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:232.
82. Hassan Rahit KMT, Maja Tarailo-Graovac M. Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes. Basel.* 2020;11(3):239.
83. Daci A, Bozalija A, Jashari F, Krasniqi S. Individualizing Treatment Approaches for Epileptic Patients with Glucose Transporter Type1 (GLUT-1) Deficiency. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):122.

84. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, *et al.* Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet.* 2014;23(22):5866–5878.
85. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR., Barrell D, Bhai J, *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D754–D761.
86. Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, *et al.* Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science.* 2002;297(5585):1301–1310.
87. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Computational Biol.* 2010;6(12):e1001025.
88. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002;420(6915):520–562.
89. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, *et al.* The genetic basis of Mendelian phenotypes: Discoveries, challenges, and opportunities. *Am J Hum Genet.* 2015;97(2):199–215.
90. <https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/?lng=ES>
91. Ayadi A, Birling MC, Bottomley J, Bussell J, Fuchs H, Fray M, *et al.* Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. *Mamm Genome.* 2012;23(9-10):600-10.
92. Hartley T, Balci TB, Rojas SK, Eaton A, Canada CR, Dymant DA, *et al.* The unsolved rare genetic disease atlas? An analysis of the unexplained phenotypic descriptions in OMIM®. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics. Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2018;178(4):458–463.
93. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009; 461:747–753.

94. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, Haas M, Roselli C, Hoan Choi S, et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet.* 2018;50(9):1219-1224.
95. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature.* 2014;508(7497):469-76.
96. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science.* 2012; 337:64–69.
97. Veltman JA, Brunner H. G. De novo mutations in human genetic disease. *Nature Rev. Genet.* 2012; 13:565–575.
98. Bustamante CD, Fledel-Alon A, Williamson S, Nielsen R, Hubisz MT, Glanowski S, et al. Natural selection on protein-coding genes in the human genome. *Nature.* 2005; 437:1153–1157.
99. Cooper GM, Shendure J. Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nature Rev. Genet.* 2011; 12:628–640.
100. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells *Nat Protoc.* 2014;9(10):2329-40.
101. Lancaster M, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-9.
102. Lage K, Hansen NT, Karlberg EO, Eklund AC, Roque FS, Donahoe PK, et al. A large-scale analysis of tissue-specific pathology and gene expression of human disease genes and complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(52):20870-5.
103. Franke L, van Bakel H, Fokkens L, de Jong ED, Egmont-Petersen M, Wijmenga C. Reconstruction of a functional human gene network, with an application for prioritizing positional candidate genes. *Am J Hum Genet.* 2006;78(6):1011-25.
104. Boulding H, Webber C. Large-scale objective association of mouse phenotypes with human symptoms through structural variation identified in patients with developmental disorders. *Hum Mutat.* 2012;33(5):874-83.

105. Webber C, Hehir-Kwa JY, Nguyen DQ, de Vries BBA, Veltman JA, Ponting CP. Forging links between human mental retardation-associated CNVs and mouse gene knockout models. *PLoS Genet* . 2009;5(6):e1000531.
106. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, *et al*. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am. J. Hum. Genet.* 2009; 84:524–533.
107. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, *et al*. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-521.
108. Martínez 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.
109. Marco-Hernández AV, Tomás Vila M, Caro A, Monfort S, Martínez, F. Novel homozygous likely pathogenic SCN1A variant with autosomal recessive inheritance and review of the literature. *Front Neurol*. 2021;12:784892.
110. Marco-Hernández AV, Caro A, Montoya-Filardi A, Tomas-Vila M, Monfort S, Nieto-Barceló J, *et al*. Extending the clinical phenotype of *SPTAN1*: from DEE5 to migraine, epilepsy and subependymal heterotopias without intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2022;188(1):147-159.
111. Marco-Hernández AV, Caro A, Rubio-Sánchez P, Martínez-Martínez JC, Tomás Vila M, Monfort S, *et al*. Extending the phenotype related to SCN1A gene: Arthrogryposis, movements disorder and malformations of cortical development. *J Child Neurol*. 2022;8830738211072694.
112. Marco-Hernández AV, Tomás Vila M, Montoya-Filardi A, Barranco-González, H, Vilchez Padilla JJ, Azorín I, *et al*. Mitochondrial Developmental encephalopathy with bilateral optic neuropathy related to homozygous likely pathogenic variants in the *IMMT* gene in an extended family with high consanguinity. *Clinical Genetics*. 2022;101(2):233-241.
113. Kegele J, Krüger J, Koko M, Lange L, Marco-Hernández AV, Martínez F, *et al*. Genetics of Paroxysmal Dyskinesia: Novel Variants Corroborate the Role of *KCNA1* in Paroxysmal Dyskinesia and Highlight the Diverse Phenotypic

- Spectrum of *KCNA1*- and *SLC2A1*-Related Disorders. *Front neurol.*2021;12:701351.
114. Martínez-Matilla M, Ferré-Fernández JJ, Aparisi MJ, Marco-Hernández AV, Cerón JA, *et al.* Apparent Radiological Improvement in an Infant With Labrune Syndrome Treated With Bevacizumab. *Pediatr Neurol.* 2020; 112:53-55.
  115. Nieto-Barceló JJ, González Montes, Gonzalo Alonso I, Martinez F, Aparisi MJ, Martínez-Matilla M, *et al.* Variant in *CACNA1G* as a Possible Genetic Modifier of Neonatal Epilepsy in an Infant with a De Novo *SCN2A* Mutation. *Journal of Pediatric Genetics.* <https://doi.org/10.1055/s-0041-1723958>.
  116. Uliana V, Percesepe A. Reverse phenotyping comes of age. *Mol Genet Metab.* 2016;118(4):230-1.
  117. Baker K, Raymond FL, Bass N. Genetic investigation for adults with intellectual disability: opportunities and challenges. *Curr Opin Neurol.* 2012;25(2):150–158.
  118. Higurashi N, Broccoli V, Hirose S. Genetics and gene therapy in Dravet syndrome. *Epilepsy Behav.* 2021;108043.
  119. Myers KA, Scheffer IE, Berkovic SF, ILAE Genetics Commission. Genetic literacy series: genetic epilepsy with febrile seizures plus. *Epileptic Disord.* 2018;20(4):232-8.
  120. Mei D, Cetica V, Marini C, Gerrini R. Dravet syndrome as part of the clinical and genetic spectrum of sodium channel epilepsies and encephalopathies. *Epilepsia.* 2019;60(S3):S2-S7.
  121. Carranza Rojo D, Hamiwka L, McMahon JM, Dibbens LM, Arsov T, Suls A, *et al.* De novo *SCN1A* mutations in migrating partial seizures of infancy. *Neurology.* 2011;77(4):380-3.
  122. Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, *et al.* *SCN1A* testing for epilepsy: Application in clinical practice. *Epilepsia.* 2013;54(5):946–52.
  123. Brunklaus A, Ellis R, Stewart H, Aylett S, Reavey E, Jefferson R, *et al.* Homozygous mutations in the *SCN1A* gene associated with genetic epilepsy

- with febrile seizures plus and Dravet syndrome in 2 families. *Eur J Paediatr Neurol*. 2015;19(4):484-8.
124. Tuncer FN, Gormez Z, Calik M, Uzun GA, Sagioglu MS, Yuceturk B, *et al*. A clinical variant in *SCN1A* inherited from a mosaic father cosegregates with a novel variant to cause Dravet syndrome in a consanguineous family. *Epilepsy Res*. 2015;113:5-10.
125. Aslan M, Ozgor B, Kirik S, Gungor S. A novel *SCN1A* Mutation: A Case Report. *J Pediatr Neurosci*. 2020;15(2):120-3.
126. Khanh Van LT, Hien HTD, Kieu HTT, Hieu NLT, Vinh LS, Hoa G, *et al*. De novo homozygous variant of the *SCN1A* gene in patient with severe Dravet syndrome complicated by acute encephalopathy. *Neurogenet*. 2021;22(2):133-6.
127. Moretti R, Arnaud L, Bouteiller D, Trouillard O, Moreau P, Buratti J, *et al*. *SCN1A*-related epilepsy with recessive inheritance: Two further families. *Eur J Paediatric Neurol*. 2021;33:121-4.
128. Guangzhou Medical University. Institute of Neurosciences *SCN1A* mutation database [Internet,. C2021] – [cited 2021 Jul 8]. Available from: <http://scn1a.caae.org.cn>.
129. Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, *et al*. The *SCN1A* mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. *Hum Mutat*. 2015;36:573-80.
130. Syrbe S, Harms FL, Parrini E, Montomoli M, Mutze U, Helbig KL, *et al*. Delineating *SPTAN1* associated phenotypes: From isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy. *Brain*. 2017;140:2322-2336.
131. Weigand JE, Boeckel JN, Gellert P, Dimmeler S. Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7 (8): e42697.
132. Gartner V, Markello TC, Macnamara E, De Biase A, Thurm A, Joseph L, *et al*. Novel variants in *SPTAN1* without epilepsy: an expansion of the phenotype. *Am J Med Genet A*. 2018;176A:2768-2776.
133. He J, Zhou R, Wu Z, Carrasco MA, Kurshan PT, Farley JE, *et al*. Prevalent presence of periodic actin-spectrin-based membrane skeleton in a broad range

- of neuronal cell types and animal species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(21):6029-6034.
134. Tohyama J, Akasaka N, Osaka H, Maegaki Y, Kato M, Saito N, *et al*. Early onset West syndrome with cerebral hypomyelination and reduced cerebral white matter. *Brain Develop*. 2008;30:349-355.
135. Saito H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, *et al*. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause west syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet*. 2010; 86:881–891.
136. Beijer D, Deconinck T, De Bleecker JL, Dotti MT, Malandrini A, Urizberea JA, *et al*. Nonsense mutations in alpha-II spectrin in three families with juvenile onset hereditary motor neuropathy. *Brain*. 2019;142(9):2605-.2616.
137. Leveille E, Estiar MA, Krohn L, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, Dupré N, *et al*. *SPTAN1* variants as a potential cause for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet*. 2019;64(11):1145-1151.
138. Ylikallio E, Ritari N, Sainio M, Toppila J, Kivirikko S, Tynismaa H, *et al*. De novo *SPTAN1* mutation in axonal sensorimotor neuropathy and developmental disorder. *Brain*. 2020;143(12):e104.
139. An JY, Cristino AS, Zhao Q, Edson J, Williams SM, Ravine D, *et al*. Towards a molecular characterization of autism spectrum disorders:an exome sequencing and systems approach. *Translat Psychiat*. 2014; 4(6):e394.
140. Hamdan FF, Gauthier J, Pellerin S, Dobrzyńska S, Marineau C, Fombonne E, *et al*. No association between *SRGAP3/MEGAP* haploinsufficiency and mental retardation. *Arch neurol*. 2002;66(5):675-6.
141. Nonada Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, *et al*. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to *SPTAN1* gene mutation. *Brain Develop*. 2013;35:280–283.
142. Rapaccini V, Esposito S, Strinati F, Allegretti M, Manfroi E, Miconi F, *et al*. A Child with a c.6923\_6928dup (p.Arg2308\_Met2309dup) *SPTAN1* Mutation Associated with a Severe Early Infantile Epileptic Encephalopathy. *Int J Mol Sci*.2018;19(7):1976.

143. Ream MA, Mikati MA. Clinical utility of genetic testing in pediatric drug-resistant epilepsy: A pilot study. *Epilepsy Behav.* 2014;37:241-248.
144. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, *et al.* Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet. Med.* 2016;18(7):696-704.
145. 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 paediatric medicine. *NPJ Genomic Medicine.* 2016;13, 1: 15012.
146. Syrbe S, Harms FL, Parrini E, Montomoli M, Mütze U, Helbig KL, *et al.* Delineating *SPTAN1* associated phenotypes: from isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy. *Brain.* 2017;140(9):2322-2336.
147. Terrone G, Pinelli M, Bernardo P, Parrini E, Imperati F, Brunetti-Pierri N, *et al.* Intrafamilial variability in *SPTAN1*-related disorder: From benign convulsions with mild gastroenteritis to developmental encephalopathy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2020;28:237-239.
148. Writzl K, Primec ZR, Strazisar BG, Osredkar D, Pecaric-Meglic N, Kranjc BS, *et al.* Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with *SPTAN1* mutation. *Epilepsia.* 2012; 53(6), e106–110.
149. Yavarna T, Al-Dewik N, Al-Mureikhi M, Ali R, Al-Mesaifri F, Mahmoud L, *et al.* High diagnostic yield of clinical exome sequencing in Middle Eastern patients with Mendelian disorders. *Hum Genet.* 2015;134(9):967-980.
150. Jansen PR, Dremmen M, van den Berg A, Dekkers IA, Blanken LME, Muetzel RL, *et al.* Incidental findings on brain imaging in the general pediatric population. *N. Engl. J. Med.* 2017;377:1593-1593.
151. Spagnoli C, Frattini D, Rizzi S, Salerno GG, Fusco C. Early infantile *SCN1A* epileptic encephalopathy: Expanding the genotype-phenotype correlations. *Seizure.* 2019;65:62-64.
152. Beck VC, Hull JM, Isom LL. Beyond Dravet Syndrome: characterization of a Novel, More Severe *SCN1A*-Linked Epileptic Encephalopathy. *Epilepsy Curr.* 2019;19(4): 266-268.

153. Jaber D, Gitiaux C, Blesson S, Marguet F, Buard D, Varela Salgado M, *et al.* De novo mutations of *SCN1A* are responsible for arthrogryposis broadening the *SCN1A*-related phenotypes. *J Med Genet.* 2020;20:1-6.
154. Han S, Tai C, Westenbroek RE, Yu FH, Cheah CS, Potter GB, *et al.* Autistic-like behaviour in *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature.* 2012;489(7416):385-90.
155. de Lange IM, Koudijs MJ, van't Slot R, Gunning B, Sonsma ACM, van Gemert LJM, *et al.* Mosaicism of de novo pathogenic *SCN1A* variants in epilepsy is a frequent phenomenon that correlates with variable phenotypes. *Epilepsia.* 2018;59:690-703.
156. Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, Gourfinkel AI, Bouteiller D, Carpentier W, *et al.* Spectrum of *SCN1A* gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet.* 2009;46(3):183-191.
157. Berecki G, Bryson A, Terhag J, Maljevic S, Gazina EV, Hill SL, *et al.* *SCN1A* gain of function in early infantile encephalopathy. *Ann Neurol.* 2019;85:514-525.
158. Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Akasaka N, Magara S, Kawashima H, *et al.* High prevalence of genetic alterations in early-onset epileptic encephalopathies associated with infantile movements disorders. *Brain Dev.* 2016;38 (3):285-292.
159. Brunklaus A, Feng T, Brünger T, Perez-Palma E, Heyne H, Matthews E, *et al.* Gene variant effects across sodium channelopathies predict function and guide precision therapy. *Brain.* 2022;awac006.
160. Ohashi T, Akasaka N, Kobayashi Y, Magara S, Kawashima H, Matsumoto N, *et al.* Infantile epileptic encephalopathy with a hyperkinetic movement disorder and hand stereotypies associated with a novel *SCN1A* mutation. *Epileptic Disor.* 2014;16:208-212.
161. Ohtsuka Y, Ohmori I, Ogino T, Ouchida M, Shimizu K, Oka E. Paroxysmal movement disorders in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Brain Dev.* 2003;25(6):401-405.

162. Oegema R, Barakat TS, Wilke M, Stouffs K, Amrom D, Aronica E, *et al.* International consensus recommendations on the diagnostic work-up for malformations of cortical development. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(11):618-635.
163. Barba C, Parrini E, Coras R, Galuppi A, Craiu D, Kluger G, *et al.* Co-occurring malformations of cortical development and *SCN1A* gene mutations. *Epilepsia.* 2014;55(7):1009-1019.
164. Striano P, Mancardi M, Biancheri R, Madia F, Gennaro E, Paravidino R, *et al.* Brain MRI findings in severe myoclonic epilepsy in infancy and genotype-phenotype correlations *Epilepsia.* 2007;48(6):1092-6
165. Le Gal F, Korff CM, Monso-Hinard C, Mund MT, Morris M, Malafosse A, *et al.* A case of SUDEP in a patient with Dravet syndrome with *SCN1A* mutation. *Epilepsia.* 2010; 51(9):1915-1918.
166. Catarino CB, Liu JYW, Liagkouras I, Gibbons VS, Labrum RW, Ellis R, *et al.* Dravet syndrome as epileptic encephalopathy: evidence from long-term course and neuropathology. *Brain.* 2011;134(Pt10): 2982-3010.
167. Skjei KL, Church EW, Harding BN, Santi M, Holland-Bouley KD, Clancy RR, *et al.* Clinical and histopathological outcomes in patients with *SCN1A* mutations undergoing surgery for epilepsy. *J Neurosurg Pediatr.* 2015;16, 668–674.
168. Guerrini R, Striano P, Catarino C, Sisodiya SM. Neuroimaging and neuropathology of Dravet syndrome. *Epilepsia.* 2011;52 Suppl 2:30-4.
169. 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):176–182.
170. Boycott KM, Ardigó D. Addressing challenges in the diagnosis and treatment of rare genetic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;17(3), 151–152.
171. Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, *et al.* Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3:65ra.
172. Zerbes RM, van der Klei IJ, Veenhuis M, Pfanner N, van der Laan M, Bohnert M. Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol. Chem.* 2012;393(11): 1247-1261.

173. Finsterer J, Rudolfstiftung K, Mahjoub SZ. Cardiac Manifestations of Mitochondrial Disorders. *Tex Heart Inst J.* 2013;40,5:634-635.
174. Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN, *et al.* The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: A brief Review. *Ann Med.* 2017;50(2):121-127.
175. Yang Y, Gao H, Zhou H, Liu Q, Qi Z, Zhang Y, *et al.* The role of mitochondria-derived peptides in cardiovascular disease: Recent Updates. *Biomed Pharmacother.* 2019;117:109075.
176. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial Cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J.* 2013;40(4):385-94.
177. Basel D. Mitochondrial DNA Depletion Syndromes. *Clin Perinatol.* 2020;47(1): 123-141.
178. Citrigno L, Muglia M, Qualtieri A, Spadafora P, Cavalcanti F, Pioggia G, *et al.* The Mitochondrial Dysfunction Hypothesis in Autism Spectrum Disorders: Current Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5785.
179. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, *et al.* Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature.* 2010;466(7304):368-72.
180. Stefanatos, G.A. Regression in Autistic Spectrum Disorders. *Neuropsychol rev.* 2008;18(4):305-319.
181. Rivera H, Merinero B, Martínez-Pardo M, Arroyo I, Ruiz-Sala P, Bornstein B, *et al.* Marked mitochondrial DNA depletion associated with a novel *SUCLG1* gene mutations resulting in lethal neonatal acidosis, multi-organ failure, and interrupted aortic arch. *Mitochondrion.* 2010;10(4):362-8.
182. Rose S, Niyazov DM, Rossignol DA, Goldenthal M, Kahler SG, Frye RE, *et al.* Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. *Mol Diagn Ther.* 2018;22:571-593.
183. Rossignol DA, Frye RE. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2012;17(3): 290-314.
184. Legido A, Jethva R, Goldenthal MJ. Mitochondrial Dysfunction in Autism. *Semin Pediatr Neurol.* 2013;20(3):163-175.

185. Carrozzo R, Verrigni D, Rasmussen M, de Coo R, Amartino H, Bianchi M, *et al.* Succinate-CoA ligase deficiency due to mutations in *SUCLA2* and *SUCLG1*: phenotype and genotype correlations in 71 patients. *J Inher Metab Dis.* 2016;39(2):243-52.
186. Chinopoulos C, Batzios S, van den Heuvel LP, Rodenburg R, Smeets R, Waterham HR, *et al.* Mutated *SUCLG1* causes mislocalization of *SUCLG2* protein, morphological alterations of mitochondria and an early-onset severe neurometabolic disorder. *Mol Genet Metab.* 2019;126(1):43-52.
187. Valayannopoulos V, Haudry C, Serre V, Barth M, Boddaert N, Arnoux JB, *et al.* New *SUCLG1* patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria. *Mitochondrion.* 2010;10(4): 335-41.
188. Sakamoto O, Ohura T, Murayama K, Ohtake A, Harashima H, Abukawa D, *et al.* Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the *SUCLG1* gene. *Pediatr Int.* 2011;53(6):921-5.
189. Huang X, Bedoyan JK, Demirbas D, Harris DJ, Miron A, Edelheit S, *et al.* Succinyl-CoA Synthetase (*SUCLA2*) deficiency in two siblings with impaired activity of other mitochondrial oxidative enzymes in skeletal muscle without mitochondrial DNA depletion. *Mol Genet Metab.* 2017;120(3):213-222.
190. Poulton J, Hirano M, Spinazzola A, Arenas Hernández M, Jardel C, Lombès A, *et al.* Collated mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (excluding the mitochondrial gamma polymerase, *POLG1*). *Biochim Biophys Acta.* 2009;1972(12):1109–112.
191. Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes- Many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(7):429-437.
192. Mirzaa G, Chong JX, Piton A, Popp B, Foss K, Guo H, *et al.* De novo and inherited variants in *ZNF292* underlie a neurodevelopmental disorder with features of autism spectrum disorder. *Genet med.* 2020;22(3):538-546.
193. Endris V, Wogatzky B, Leimer U, Bartsch D, Zatyka M, Latif F, *et al.* The novel Rho-GTPase activating gene *MEGAP/srGAP3* has a putative role in severe mental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99:11754-11759.

194. Shuib S, McMullan D, Rattenberry E, Barber RM, Rahman F, Zatyka M, *et al.* Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p- syndrome) . *Am J Med Genet A.* 2009;149A:2099-2105.
195. Bacon C, Endris V, Rappold GA. The cellular function of srGAP3 and its role in neuronal morphogenesis. *Mech dev.* 2013;130(6-8):391-395.
196. Waltereit R, Leimer U, von Bohlen Und Halbach O, Panke J, Holter SM, Garret L, *et al.* *Srgap3*<sup>-/-</sup> mice present a neurodevelopmental disorder with schizophrenia-related intermediate phenotypes. *FASEB J.* 2012;26(11):4418-4428.
197. Chisholm K, Lin A, Abu-Akel A, Wood SJ. The association between autism and schizophrenia spectrum disorders: A review of eight alternate models of co-occurrence. *Neurosci biobehav rev.* 2015;55:173-183.

## **XII. ANEXO. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

## **XI. ANEXO. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

ANEXO 1: CARTA DE APROBACIÓN DEL CEIM.

ANEXO 2: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.

ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO.

ANEXO 4: HOJA DE INFORMACIÓN A LOS PACIENTES.

ANEXO 5: TABLA DE PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

ANEXOS 6 7 Y 8: ARTÍCULOS RELACIONADOS CON LA TESIS.

ANEXO 1: CARTA DE APROBACIÓN DEL CEIM.



FPNT-CEIB-07 (A)

**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON  
MEDICAMENTOS**

Dña. María Tordera Baviera, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del **Hospital Universitario y Politécnico La Fe,**

**CERTIFICA**

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **18 de septiembre de 2019,** el Proyecto de Tesis:

**Título: "ANÁLISIS FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE LOS PACIENTES CON TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO EN LOS QUE SE HA DETECTADO ALTERACIONES PATOGÉNICAS EN EL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA."**

Nº de registro: **2019/0249**

Versión/fecha de la memoria del proyecto: **TESIS**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado para Menores Maduros (12-17 años): **2.0/ 04 de septiembre de 2019**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado para Padres/ Representante Legal: **2.0/ 04 de septiembre de 2019**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Tesis que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, siendo el director de la Tesis el **Dr. Isidro Vitoria Miñana** del servicio de **PEDIATRÍA,** el Tutor del Hospital el Dr. Miguel Tomás Vila del servicio de **NEUROPEDIATRÍA,** y el **DOCTORANDO D./ Dña. Ana Victoria Marco Hernández.**

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a **18 de septiembre de 2019**



Fdo.: **Dra. María Tordera Baviera**  
Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos

**ANEXO I**  
**COMPOSICIÓN CEIm**

**Presidente:**

Dra. Adela Cañete Nieto (Oncología Pediátrica)

**Vicepresidente:**

Dr. Salvador Alifio Pellicer (Catedrático Farmacólogo Clínico)

**Secretaria Técnica:**

Dra. María Tordera Baviera (Farmacéutica del Hospital)

**Miembros:**

Dr. Bonaventura Casanova Estruch (Neurología)

Dra. M<sup>a</sup> Isabel Izquierdo Macián (Neonatología)

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz (Cardiología)

Dra. Paula Ramírez Gallego (Medicina Intensiva - Miembro de la Comisión de Investigación)

Dra. Sara Brugger Frigols (Radiodiagnóstico)

D. Serafín Rodríguez Capellán (Licenciado en derecho - Ajeno a las profesiones sanitarias)

Dña. María Victoria Paricio Gómez (Enfermería)

Dr. José María Canelles Gamir (Farmacéutico de Atención Primaria)

Dr. Matteo Frasson (Cirugía General y Aparato Digestivo)

Dr. José Vicente Solanas Prats (Atención Primaria)

Dr. Javier Lluna González (Cirugía Pediátrica - Miembro del Comité de Ética Asistencial - Formación acreditada en Bioética)

D. Miguel Ángel Cano Torres (Secretario de ASLEUVAL - Miembro Lego - Ajeno a las profesiones sanitarias)

D. Vicente Inglada Alcaide (Secretario Unión de Consumidores de Valencia - Miembro ajeno a las profesiones sanitarias)

D. Antonio Juan Orduña Galán (Experto en Protección de Datos)

ANEXO 2: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.

**PLANTILLA RECOGIDA DE DATOS**

Nº de paciente asignado: \_\_\_\_\_ Nombre del paciente: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ NHC: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Diagnóstico clínico principal: \_\_\_\_\_

Diagnósticos secundarios: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Motivo de consulta inicial: \_\_\_\_\_

Edad de inicio de los síntomas: \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES FISIOLÓGICOS:**

Niño adoptado: \_\_\_\_\_

Embarazo: Espontáneo  Técnicas de reproducción: Fecundación in vitro  FIV  ICSI

Donación de ovocitos: Madre  Padre  Ambos

Ácido Fólico preconcepcional: Sí  No

Patología durante la gestación: No  Sí:

Especificar: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Ecografías: normales:  Alteraciones detectadas: especificar: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Tóxicos: Alcohol  Tabaco:  Drogas  Fármacos:

Especificar: \_\_\_\_\_

Parto: Edad gestacional: \_\_\_\_\_

Vaginal: eutócico  Instrumentado: Ventosa  Fórceps  Palas  Kristeller

Cesárea: Programada  Urgente:

Especificar: \_\_\_\_\_

Perinatal: APGAR \_\_\_\_\_ Reanimación: No  Sí: superficial

Profunda:  Especificar: \_\_\_\_\_

Ingreso en neonatología: No  Sí:  Especificar motivo: \_\_\_\_\_

Días de ingreso: \_\_\_\_\_ Ingreso en UCIN: No  Sí:

Diagnósticos al alta: \_\_\_\_\_ Tratamientos recibidos: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Alimentación: Lactancia Materna:  Lactancia artificial:  Indicencias: \_\_\_\_\_

Beikost incidencias: No  Sí:  Especificar: \_\_\_\_\_

Vacunación: \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES PATOLÓGICOS NO NEUROLÓGICOS:**

Alergias medicamentosas: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

Intervenciones previas: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

Ingresos previos: : No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

Enfermedades crónicas: : No  Sí   
Especificar: \_\_\_\_\_

Tratamientos crónicos: : No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES FAMILIARES:**

Consanguinidad: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

Madre: edad: Especificar patología: \_\_\_\_\_

Padre: edad: Especificar patología: \_\_\_\_\_

Hermanos: edad: Especificar patología: \_\_\_\_\_

edad: Especificar patología: \_\_\_\_\_

edad: Especificar patología: \_\_\_\_\_

Otros antecedentes neurológicos en la familia: No  Sí   
Especificar: \_\_\_\_\_

**ESTADO ACTUAL:**

Medicación: : No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

Diagnósticos:

Epilepsia: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

Tratamientos previos: \_\_\_\_\_

Tipo de crisis: Parciales:  Generalizadas:  Tipo concreto: \_\_\_\_\_

Frecuencia de crisis: \_\_\_\_\_

Tratamiento actual: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Discapacidad intelectual: : No  Sí  Especificar GRADO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Trastorno del lenguaje: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Problemas de aprendizaje: : No  Sí  Especificar tipo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

TEA: : No  Sí  Especificar GRADO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Parálisis cerebral infantil: No  Sí  Especificar GMF: \_\_\_\_\_

Tipo: Diplejía:  Tetraparesia  Monoparesia  Hemiparesia

\_\_\_\_\_

Tratamientos que recibe por la PCI: \_\_\_\_\_

Trastornos del movimiento: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

Tipo: ataxia:  Temblor:  Tics:  Estereotipias:  Distonias:

Características: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tratamientos que recibe por el trastorno del movimiento: \_\_\_\_\_

Trastorno de conducta: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tratamientos que recibe por el trastorno de conducta: \_\_\_\_\_

Trastorno del sueño: : No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

Hipersomnia:  Insomnio conciliación:  Insomnio por despertares:

Parasomnias:  Roncopatía:

Especificar: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tratamientos que recibe por el problema de sueño: \_\_\_\_\_

Trastorno alimentación: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

OTROS PROBLEMAS NEUROLÓGICOS: \_\_\_\_\_

EXPLORACIÓN FÍSICA:

Perímetro cefálico: Talla: Peso:

Discromías: No  Sí  Especificar: \_\_\_\_\_

RASGOS DISMÓRFICOS:

No dismorfias:

Rasgos dismórficos: Faciales: \_\_\_\_\_

Ojos: \_\_\_\_\_ Orejas: \_\_\_\_\_ Nariz: \_\_\_\_\_

Boca: \_\_\_\_\_

FACE-TO-GENE: aplicación: resultados: \_\_\_\_\_

Dismorfias corporales: \_\_\_\_\_

Manos: \_\_\_\_\_ Pies: \_\_\_\_\_

Genitales: \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_

EXPLORACIÓN NEUROLÓGICA:

Pares craneales

Fuerza

Coordinación

Sensibilidad

Marcha

Reflejos

DPM actual

Escala Haizea Llevant si menor de 5 años

EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS:

-RMN CEREBRAL: No realizada:  Sí realizada:  Año: \_\_\_\_\_

Normal:  Alteraciones:  Especificar: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

-EEG: No realizada:  Sí realizada:  Tipo: \_\_\_\_\_

Normal:  Alteraciones:  Especificar: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

Analíticas: No realizada:  Sí realizada:

Normal:  Alteraciones:  Especificar: \_\_\_\_\_

---

---

Estudios genéticos previos: No realizada:  Sí realizada:

Normal:  Alteraciones:  Especificar cual: \_\_\_\_\_

---

---

Electromiografía: No realizada:  Sí realizada:

Normal:  Alteraciones:  Especificar: \_\_\_\_\_

---

---

Otras pruebas diagnósticas:

---

---

---

SECUENCIACIÓN MASIVA: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO.**



**CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE LEGAL**

Título del estudio: "Análisis fenotípico y genotípico de los pacientes con trastornos del neurodesarrollo en los que se ha detectado alteraciones patogénicas en el estudio de secuenciación masiva."

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: Ana Victoria Marco Hernández (nombre del Investigador)

Comprendo que la participación de \_\_\_\_\_ (nombre del participante) es voluntaria.

Comprendo que \_\_\_\_\_ (nombre del participante) puede retirarse del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a \_\_\_\_\_ (nombre del participante), toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Y presto mi conformidad con que \_\_\_\_\_ (nombre del participante) participe en el estudio.

**Firma del Representante**

**Firma del Investigador**

**Nombre:** \_\_\_\_\_  
**Fecha:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Nombre:** Ana Victoria Marco Hernández  
**Fecha:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Deseo que me comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para mi salud:  **Sí**  **No**

Firma del representante \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: Ana Victoria Marco Hernández Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Deseo que me comuniquen la información derivada de las pruebas genéticas realizadas (únicamente para aquellos estudios que incluyan este tipo de pruebas, siempre que estén validadas y que puedan tener relevancia para la salud del paciente):  **Sí**  **No**

Firma del representante \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: Ana Victoria Marco Hernández Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: "Análisis fenotípico y genotípico de los pacientes con trastornos del neurodesarrollo en los que se ha detectado alteraciones patogénicas en el estudio de secuenciación masiva."

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos).

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con: Ana Victoria Marco Hernández (nombre del Investigador)
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

**Firma del Participante**

**Nombre:** \_\_\_\_\_  
**Fecha:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Firma del Investigador**

**Nombre: Ana Victoria Marco Hernández**  
**Fecha:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Deseo que me comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para mí salud:  **Sí**  **No**

Firma del representante \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: Ana Victoria Marco Hernández Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Deseo que me comuniquen la información derivada de las pruebas genéticas realizadas (únicamente para aquellos estudios que incluyan este tipo de pruebas, siempre que estén validadas y que puedan tener relevancia para la salud del paciente):  **Sí**  **No**

Firma del representante \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: Ana Victoria Marco Hernández Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO 4: HOJA DE INFORMACIÓN A LOS PACIENTES.



### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA PADRES/ REPRESENTANTE LEGAL

Versión de la HIP: 1.0	Fecha de la versión: 4/6/2019
Investigador Principal: Ana Victoria Marco Hernández, Neuropediatría Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Teléfono 961244108	
CENTRO: Hospital Universitari i Politècnic La Fe	
Título del proyecto de investigación: "Análisis fenotípico y genotípico de los pacientes con trastornos del neurodesarrollo en los que se ha detectado alteraciones patogénicas en el estudio de secuenciación masiva."	

#### 1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico la Fe (CEIm La Fe).

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas.

#### 2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

#### 3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Actualmente gracias a las nuevas técnicas de estudio genéticos hemos conseguido realizar el diagnóstico etiológico de gran cantidad de pacientes con trastornos del neurodesarrollo que previamente se desconocía la causa de sus síntomas. En el presente proyecto pretendemos ampliar el conocimiento de las causas genéticas y la expresión clínica de los pacientes con alteraciones patogénicas detectadas mediante estudio de secuenciación masiva.

Los objetivos que nos planteamos mediante el empleo de esta nueva tecnología son: 1) Revisar los síntomas y características que presentan los pacientes diagnosticados de alteraciones patogénicas en la secuenciación masiva. 2) Ampliar el conocimiento acerca de los diferentes cuadros sindrómicos encontrados. 3) Incorporar esta información al diagnóstico genético asistencial de los trastornos del neurodesarrollo.

#### 4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

El presente estudio pretende ampliar el conocimiento de la relación entre las alteraciones genéticas encontradas en el estudio de secuenciación masiva y los síntomas que presentan los pacientes. Ampliar el conocimiento sindrómico del

paciente puede en algunos casos suponer una mejora en el manejo de su enfermedad y la posibilidad de aplicar tratamientos específicos para su enfermedad.

Por la propia naturaleza del estudio, no hay riesgos implícitos.

Debe saber que su participación en este estudio puede no aportarle beneficios directos.

**5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS** *No procede por no ser un ensayo clínico.*

**6. Nº DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO:**

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio Dr. Miguel Tomás Vila o Dra Ana Victoria Marco Hernández en el número de teléfono 961244108.

**7. CONFIDENCIALIDAD:**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de protección de datos y garantía de los derechos digitales y en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD) . De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición, cancelación de datos, limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos y solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del estudio o al/a la Delegado/a de Protección de Datos de la Institución Hospital Universitari i Politècnic La Fe, con quién podrá comunicarse a través del teléfono y/o dirección de correo electrónico: [dpd@gva.es](mailto:dpd@gva.es).

Le recordamos que los datos no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el estudio, para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Tanto el Centro como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si el participante quiere saber más al respecto, puede contactar con el Delegado de Protección de Datos del promotor [[dpd@gva.es](mailto:dpd@gva.es)].

#### **8. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:**

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no le supondrá ningún gasto.

#### **9. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:**

Cualquier nueva información que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad o porque consideren que usted no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido su retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad.

#### **10. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICOS EN MENORES DE EDAD:**

Le informamos de que si su hijo que tiene más de 12 años de edad, se le va a entregar a él mismo una hoja de información y consentimiento informado, adaptados a su capacidad de entendimiento, que deberá firmar si quiere participar en el estudio.

## HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA MENORES MADUROS (12-17 AÑOS)

Versión de la HIP: 1.0	Fecha de la versión: 4/6/2019
Investigador Principal: Ana Victoria Marco Hernández, Neuropediatría Hospital Universitario i Politècnic La Fe, Teléfono 961244108	
CENTRO: Hospital Universitario i Politècnic La Fe	
Título del proyecto de investigación: "Análisis fenotípico y genotípico de los pacientes con trastornos del neurodesarrollo en los que se ha detectado alteraciones patogénicas en el estudio de secuenciación masiva."	

### 1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a ti para informarte sobre un estudio en el que se te propone participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico la Fe (CEIm La Fe).

Nuestra intención es tan sólo que recibas la información correcta y suficiente para que puedas evaluar y juzgar si quieres o no participar en este estudio. Para ello lee esta hoja informativa con atención y nosotros te aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puedes consultar con las personas que considere oportunas.

### 2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debes saber que tu participación en este estudio es voluntaria y que puedes decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con tu médico ni se produzca perjuicio alguno en tu tratamiento.

### 3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Actualmente gracias a las nuevas técnicas de estudio genéticos hemos conseguido realizar el diagnóstico etiológico de gran cantidad de pacientes con trastornos del neurodesarrollo que previamente se desconocía la causa de sus síntomas. En el presente proyecto pretendemos ampliar el conocimiento de las causas genéticas y la expresión clínica de los pacientes con alteraciones patogénicas detectadas mediante estudio de secuenciación masiva.

Los objetivos que nos planteamos mediante el empleo de esta nueva tecnología son: 1) Revisar los síntomas y características que presentan los pacientes diagnosticados de alteraciones patogénicas en la secuenciación masiva. 2) Ampliar el conocimiento acerca de los diferentes cuadros sindrómicos encontrados. 3) Incorporar esta información al diagnóstico genético asistencial de los trastornos del neurodesarrollo.

### 4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

El presente estudio pretende ampliar el conocimiento de la relación entre las alteraciones genéticas encontradas en el estudio de secuenciación masiva y los síntomas que presentan los pacientes. Ampliar el conocimiento sindrómico del

paciente puede en algunos casos suponer una mejora en el manejo de su enfermedad y la posibilidad de aplicar tratamientos específicos para su enfermedad.

Por la propia naturaleza del estudio, no hay riesgos implícitos.

Debes saber que tu participación en este estudio puede no aportarte beneficios directos.

**5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS** *No procede por no ser un ensayo clínico.*

**6. Nº DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO:**

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio Dr. Miguel Tomás Vila o la Dra. Ana Victoria Marco Hernández en el número de teléfono 961244108.

**7. CONFIDENCIALIDAD:**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de protección de datos y garantía de los derechos digitales y en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD). De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, puedes ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición, cancelación de datos, limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos y solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) para lo cual deberás dirigirte al investigador principal del estudio o al/a la Delegado/a de Protección de Datos de la Institución Hospital Universitari i Politècnic La Fe, con quién podrá comunicarte a través del teléfono y/o dirección de correo electrónico: [dpd@gva.es](mailto:dpd@gva.es).

Te recordamos que los datos no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el estudio, para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedaras satisfecho.

Tanto el Centro como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de tus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo tu médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos contigo y con tu historia clínica. Por lo tanto, tu identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, tu información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de tu salud y por el promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado tu consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si el participante quiere saber más al respecto, puede contactar con el Delegado de Protección de Datos del promotor [[dpd@gva.es](mailto:dpd@gva.es)].

#### **8. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:**

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no te supondrá ningún gasto.

#### **9. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:**

Cualquier nueva información que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, te será comunicada por tu médico lo antes posible.

Si decides retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puedes exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debes saber que puedes ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad o porque consideren que no estás cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, recibirás una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido tu retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se te han expuesto. Cuando acabe tu participación recibirás el mejor tratamiento disponible y que tu médico considere el más adecuado para tu enfermedad.

ANEXO 5: TABLA PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Nº paciente	GEN	VARIANTE GEN	Tránsito	VARIANTE PROTEÍNA	FENOTIPO
1	<i>SYNGAP1</i>	C.3524DELG	NM_006772.2	p.Glu1176LysfsTer20	EED
2	<i>CADNA1D</i>	C.1207G>C	NM_001128840.3	p.G403R	PCI grave
3	<i>CADNA1D</i>	C.812T>A	NM_000720.4	p.Leu271His	DI+ aldosteronismo
4	<i>CACNA1A</i>	C.4186G>A	NM_001127221.1	p.Val1396Met	EEIE 42
5	<i>CACNA1A</i>	C.4186G>A	NM_001127221.1	p.Val1396Met	EEIE 42
6	<i>CACNA1A</i>	C.2767C>T	NM_001127221.1	p.Arg923Ter	Ataxia episódica 2
7	<i>CACNA1A</i>	c.4075C>T	NM_001127221.1	p.Arg1359Trp	EEIE 42
8	<i>CACNA1A</i>	c.4261C>T	NM_001127221.1	p.Arg1420Ter	Ataxia episódica 2
9	<i>CACNA1A</i>	c.1174T>C	NM_001127221.1	p.Tyr392His	EEIE
10	<i>CACNA1C</i>	c.799C>T	NM_000719.6	p.Pro267Ser	SW
11	<i>CACNA2D1</i>	c.1662+1G>A	NM_001128840.3	p.N531_E554del	EEIE
12	<i>EEF1A2</i>	c.137C>T	NM_001958.5	p.Ala46Val	EEIE 33
13	<i>GABRA1</i>	c.809T>G	NM_000806	p.Val270Gly	EEIE19
14	<i>GABRA2</i>	c.716C>A	NM_000807	p.Thr239Lys	DI + TDAH
15	<i>GABRB3</i>	c.539A>G	NM_000814.5	p.Glu180Gly	EEIE 43
16	<i>GABRG2</i>	c.1084G>A	NM_198903.2	p.A362T	Síndrome de Dravet
17	<i>GRIN1</i>	c.1448A>G	NM_007327.4	p.Lys483Arg	DI AD tipo 8
18	<i>GRIN1</i>	c.2414C>T	NM_007327.4	p.Pro805Leu	DI AD tipo 8
19	<i>GRIN1</i>	c.2479G>A	NM_007327.4	p.Gly827Arg	DI AD tipo 8
20	<i>GRIN1</i>	c.2088G>C	NM_007327.3	p.Q696H	DI AD tipo 8
21	<i>GRIN2A</i>	c.2184C>G	NM_001134407.1	p.Phe728Leu	DI RL
22	<i>GRIN2A</i>	c.49dupG	NM_001134407.2	p.Val17GlyfsTer121	Epilepsia + DI
23	<i>GRIN2A</i>	c.1553G>T	NM_000833.4	p.Arg518Leu	Epilepsia focal
24	<i>GRIN2A</i>	c.2146G>A	NM_001134407	p.A716T	Epilepsia focal
25	<i>GRIN2B</i>	c.2248_2254delACCATTG	NM_000834.4	p.Thr750AlafsTer58	DI AD tipo 6
26	<i>GRIN2B</i>	c.2459G>T	NM_000834.3	p.Gly820Val	DI AD tipo 6
27	<i>IMMT</i>	c.895A>G	NM_006839	p.Lys299Glu	DI Atrofia óptica
28	<i>IMMT</i>	c.895A>G	NM_006839	p.Lys299Glu	DI Atrofia óptica
29	<i>JARID2</i>	c.2255C>T	NM_004973.3	p.Pro752Leu	DI macrosomía
30	<i>KCNB1</i>	c.1229C>T	NM_004975.4	p.P410L	EEIE 26
31	<i>KCNB1</i>	c.1190G>T	NM_004975.4	p.C397F	EEIE 26
32	<i>KCNB1</i>	c.1190G>T	NM_004975.4	p.C397F	EEIE 26
33	<i>KCNB1</i>	c.878G>A	NM_004975.4	p.R293H	DI Polimicrogiria
34	<i>KCNH1</i>	c.1486G>A	NM_172362.3	p.Gly496Arg	Sd Zimmermann-Laband
35	<i>KCNQ2</i>	c.997C>T	NM_004518.5	p.Arg333Trp	EEIE 7
36	<i>KCNQ2</i>	c.1636A>G	NM_172107.3	p.Met546Val	EEIE 7
37	<i>KCNQ2</i>	c.1055C>G	NM_172107.3	p.Ser352Trp	EEIE 7
38	<i>KCNQ2</i>	c.1678C>T	NM_172107.4	p.Arg560Trp	EEIE displasia
39	<i>KCNT1</i>	c.2800G>A	NM_020822.2	p.Ala934Thr	EEIE 14
40	<i>KMT2A</i>	c.6533_6534insA	NM_001197104.1	p.Val2179fs	Wiedemann-Steiner
41	<i>KMT2A</i>	c.9682_9682delC	NM_001197104.1	p.Arg3228fs	Wiedemann-Steiner
42	<i>KMT2A</i>	c.2438dupA	NM_001197104.1	p.Asn813LysfsTer9	Wiedemann-Steiner
43	<i>KMT2A</i>	c.3110T>A	NM_001197104.1	p.Ile1037Thr	Wiedemann-Steiner
44	<i>KMT2A</i>	c.8722G>T	NM_001197104.1	p.Glu2908Ter	Wiedemann-Steiner
45	<i>MECP2</i>	c.437C>G	NM_001110792.1	p.Ser146Cys	Sd Rett
46	<i>MECP2</i>	c.799C>T	NM_001110792.1	p.Arg267Ter	Sd Rett
47	<i>MECP2</i>	c.789dupC	NM_001110792	p.Gly264ArgfsTer7	Encefalopatía precoz
48	<i>MECP2</i>	c.1200_1243del	NM_001110792.1	p.Pro401Ter	Sd Rett
49	<i>NAA10</i>	c.215T>C	NM_003491.4	p.Ile72Thr	Sd Ogden
50	<i>NAA10</i>	[c.22C>T;c.30C>G]	NM_003491.4	p.Pro8Ser;p.Asp10Glu	EEIE
51	<i>PCDH19</i>	c.1106C>T	NM_020766.2	p.Ala369Val	EIEE9
52	<i>PCDH19</i>	c.2570_2574delGGCCC	NM_020766.2	p.G857Afs*4	EIEE9
53	<i>PCDH19</i>	c.1091dupC	NM_020766.2	p.Tyr366LeufsTer10	EIEE9
54	<i>SCN1A</i>	c.2853_2857delGTGGA	NM_001165963.1	p.Glu951Aspfs*44	Sd Dravet
55	<i>SCN1A</i>	c.5341T>A	NM_001165963.1	p.Tyr1781Asn	Sd Dravet
56	<i>SCN1A</i>	c.4305_4308delGGAT	NM_001165963.1	p.Met1435Ifs*2	Sd Dravet
57	<i>SCN1A</i>	c.5383G>A	NM_001165963.1	p.Glu1795Lys	GEFS+

58	<i>SCN1A</i>	c.2345C>T	NM_001165963.1	P.Thr782Ile	DEE Arthrogyrosis
59	<i>SCN1A</i>	c.2728C>A	NM_001165963.1		Sd Dravet
60	<i>SCN1A</i>	c.2589+3A>T	NM_001165963.1	p.Gln910Lys	Sd Dravet
61	<i>SCN1A</i>	c.1461dupT	NM_001165963.1	p.Lys488Ter	Sd Dravet
62	<i>SCN1A</i>	c.1624C>T	NM_001165963.1	p.Arg542Ter	Sd Dravet
63	<i>SCN1A</i>	c.2792G>A	NM_001165963.1	p.Arg931His	Sd Dravet
64	<i>SCN1A</i>	c.5021G>A	NM_001165963.1	p.Gly1674Asp	Sd Dravet
65	<i>SCN1A</i>	c.4316A>G	NM_001165963.1	p.Tyr1439Cys	Sd Dravet
66	<i>SCN1A</i>	c.580G>A	NM_001165963.1	p.Asp194Asn	FS+
67	<i>SCN1A</i>	c.2851G>A	NM_001165963.1	p.Glu951Lys	Sd Dravet
68	<i>SCN1A</i>	c.533T>C	NM_001165963.1	p.Phe178Ser	Sd Dravet
69	<i>SCN1A</i>	c.4513A>C	NM_001165963.1	p.K1505Q	GEFS+
70	<i>SCN1A</i>	c.4513A>C	NM_001165963.1	p.K1505Q	GEFS+
71	<i>SCN2A</i>	c.605C>T	NM_001040142.2	p.Ala202Val	EEIE11
72	<i>SCN2A</i>	c.4888C>A	NM_001040142.2	p.Leu1630Ile	EEIE11
73	<i>SCN2A</i>	c.4501A>G	NM_001040142.2	p.M1501V	EEIE11
74	<i>SCN8A</i>	c.4044G>T	NM_001330260.1	p.L1348F	EEIE 13
75	<i>SCN8A</i>	c.1998+1G>A	NM_001330260.1	p.Val465Met	EEIE 13
76	<i>SPTAN1</i>	c.6908_6916del	NM_001130438	p.(Asp2303_Leu2305del)	DI ataxia
77	<i>SPTAN1</i>	c.6546_6556dup	NM_001130438	p.(Asn2186ArgfsTer82)	Epilepsia sin DI
78	<i>SPTAN1</i>	c.3292C>A	NM_001130438	p.(Arg1098Ser)	DI ataxia
79	<i>SLC12A5</i>	c.1825C>G c.3213delG	NM_001134771.1	p.Leu632Val p.Arg1072AlafsTer8	EEIE 34
80	<i>STXBP1</i>	c.183_187del4	NM_003165.3	p.Asn62AlafsTer27	EEIE4
81	<i>STXBP1</i>	c.875G>A	NM_003165.3	p.Arg292His	EEIE4
82	<i>STXBP1</i>	c.1015A>T	NM_003165.3	p.Lys339Ter	EEIE4
83	<i>STXBP1</i>	c.1354_del3251	NM_003165.3	p.Ser454_Glu487del	EEIE4
84	<i>STXBP1</i>	c.1651C>T	NM_003165.3	p.Arg551Cys	EEIE4
85	<i>STXBP1</i>	c.538dupT	NM_003165.3	p.Cys180LeufsTer34	EEIE4
86	<i>STXBP1</i>	c.1628G>A	NM_003165.3	p.Gly543Glu	EEIE4
87	<i>STXBP1</i>	c.1216C>T	NM_003165.3	p.Arg406Cys	EEIE4
88	<i>STXBP1</i>	c.416C>T	NM_003165.3	p.Pro139Leu	EEIE4
89	<i>STXBP1</i>	c.475C>T	NM_003165.3	p.Pro159Ser	EEIE ataxia
90	<i>SUCLG2</i>	c.517G>C	NM_003848.4	p.G173R	Enf mitochondrial
91	<i>TCF20</i>	c.2883C>A	NM_005650.3	p.Y961*	EEIE
92	<i>TCF20</i>	c.4894delT	NM_005650.3	p.Y1632Tfs*6	EEIE
93	<i>TCF20</i>	c.2327_2328delAG	NM_005650.3	p.Q776Rfs*5	EEIE
94	<i>TUBA1A</i>	c.970G>C	NM_006009.4	p.Val324Leu	Lisencefalia
95	<i>TUBA1A</i>	c.790C>T	NM_006009.4	p.Arg264Cys	Lisencefalia
96	<i>TUBA1A</i>	c.352G>A	NM_006009.4	p.V118M	Lisencefalia
97	<i>UBE3A</i>	c.2609G>A	NM_130839.2	p.Gly870Asp	Sd Angelman
98	<i>UBE3A</i>	c.1472_1476delATTAT	NM_130839.2	p.Tyr491Ter	Sd Angelman
99	<i>ZNF292</i> <i>SRGAP3</i>	c.3950delA c.2227+1G>T	NM_015021.1 NM_014850.3	p.N1317Mfs*8	TEA      trastorno conducta
100	<i>KCNA1</i>	c.1186G>C		p.Gly396Arg	Epilepsia



## Clinical Letter

## Apparent Radiological Improvement in an Infant With Labrune Syndrome Treated With Bevacizumab



Marina Martínez-Matilla, MSc<sup>a,\*,\*</sup>, Jesús José Ferre-Fernández, PhD<sup>a,\*,\*</sup>,  
 María José Aparisi, PhD<sup>a</sup>, Ana Victoria Marco-Hernández, MD<sup>b</sup>, Juan Antonio Cerón, MD<sup>c</sup>,  
 Yanick J. Crow, PhD<sup>d</sup>, Francisco Martínez-Castellano, PhD<sup>c</sup>, Miguel Tomás-Vila, PhD<sup>b</sup>,  
 Laia Pedrola, PhD<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Genomic Unit, Health Research Institute La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain

<sup>b</sup> Pediatric Neurology Department, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Genetics Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>d</sup> MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 March 2020

Accepted 22 July 2020

Available online 25 July 2020

## Keywords:

Leukoencephalopathy with intracranial calcification and cysts

SNORD118

Bevacizumab

Infant

## Introduction

Leukoencephalopathy with intracranial calcification and cysts (LCC) is a rare genetic disorder characterized by progressive cerebral degeneration, seizures, and a mixture of extrapyramidal, pyramidal, and cerebellar signs.<sup>1,2</sup> LCC is associated with mutations in the small nucleolar RNA, C/D box 118 gene (*SNORD118*), inherited as an autosomal recessive trait.<sup>3</sup> To date, 59 patients have been described with biallelic mutations in this gene. LCC has no known effective treatment, but the use of the vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocker bevacizumab was utilized in one patient,

apparently with an improvement in the clinical and radiological features.<sup>4</sup>

## Patient Description

This 19-month-old male infant was referred because of psychomotor regression, leukoencephalopathy, and cerebral calcification. The most striking clinical features were four-limb distal dystonia with pyramidal signs and the loss of previously acquired milestones.

Developmental milestones were within normal limits until age seven months. At age 12 months he demonstrated decreased mobility of the left body and a tendency to internally rotate the left leg. Creatine kinase and metabolic tests were within the normal range. At age 19 months, brain magnetic resonance imaging (MRI) and cranial computed tomography showed extensive leukodystrophy with calcifications (Fig A, D, and G). Clinical features suggested a genetic leukodystrophy due to a microangiopathy, with calcifications and cysts.<sup>2,5,6</sup>

The study of cerebrospinal fluid pterins revealed normal levels. Genetic testing revealed a homozygous mutation n.8G>C in

Funding: This work was supported by Fondo Social Europeo (FSE) and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), grant number CM19/00181.

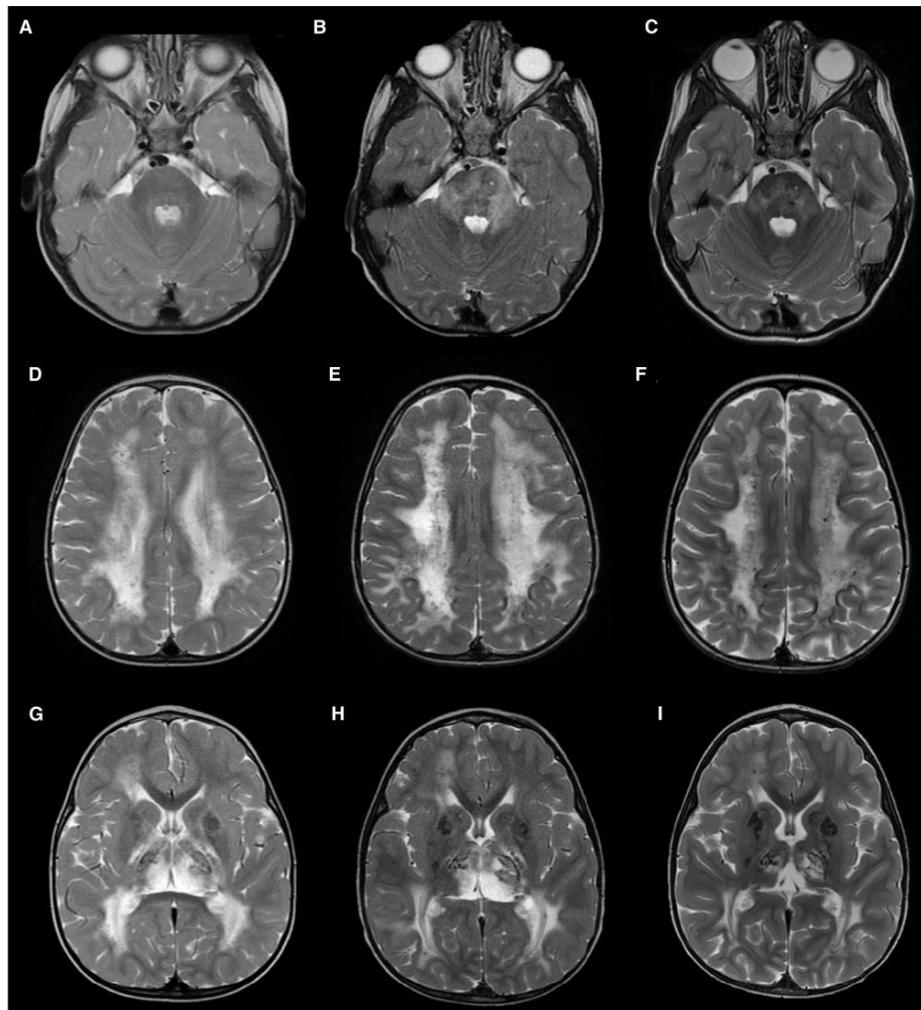
Declaration of conflicts of interest: None.

\* Communications should be addressed to: Dr. Martínez-Matilla; Unidad Genómica; Instituto de Investigación Sanitaria La Fe; Avenida Fernando Abril Martorell nº106; Valencia 46026, Spain.

E-mail address: [marinamtn@phoemail.com](mailto:marinamtn@phoemail.com) (M. Martínez-Matilla).

\* Were equally responsible for the work described in this paper.

<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.07.011>  
 0887-8994/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



**FIGURE.** Comparative cranial magnetic resonance imaging (MRI) before and after the treatment. Cranial MRI at 19 months (A, D, and G), before starting bevacizumab at age three years and four months (B, E, and H), and after six months of treatment (C, F, and I). MRI before bevacizumab (B, E and H) shows increased white matter involvement in the pons, mesencephalus, both cerebellar peduncles, and thalami when compared with the initial imaging (A, D, and G). Note the apparent decrease in abnormal white matter volume after bevacizumab in (C, F, and I). Cerebral atrophy with increased subarachnoid space is shown in (F).

*SNORD118*, consistent with a diagnosis of LCC. The parents were confirmed as heterozygous carriers of the mutation.

Despite symptomatic treatment with baclofen, gabapentin, and trihexyphenidyl hydrochloride, the child continued to exhibit clinical deterioration. At age three years and four months, MRI showed increased white matter involvement, extending to previously unaffected areas (Fig B, E, and H). Compassionate use of

bevacizumab (5 mg/kg biweekly) was initiated. Bevacizumab is a monoclonal antibody that inhibits VEGF signaling (anti-VEGF) and is of proven efficacy in the vascular eye phenotype Coats disease. As Coats plus and LCC share clinical neuroradiological features—presumed to be related to a common microvascular pathology—this treatment was previously used in a patient with LCC, with apparent clinical and radiological benefit over a one-year period.<sup>4,6</sup>

After six months of bevacizumab treatment, our patient's MRI showed a notable improvement in the extent and severity of leukoencephalopathy, especially in the pons and thalami (Fig C, F, and I). Cerebral atrophy was indicated by increased prominence of the subarachnoid space, and there were emerging cysts in the centrum semiovale. Calcifications remained unchanged. Despite these radiological changes, however, there was no discernable improvement in clinical status.

At present, the patient is four years old. He is unable to walk, demonstrating a significant spastic dystonia. He is completely dependent on his parents for all activities of daily living. Cognitively, he understands orders but is unable to talk. The most obvious period of regression occurred around age two years, and currently his clinical condition appears stable.

#### Discussion

We describe the earliest intervention yet documented with bevacizumab in an individual with LCC. The patient presented a very severe clinical phenotype. Treatment was associated with an apparent improvement in neuroimaging, although clinical status has remained static. Further follow-up, and earlier intervention, will be necessary to assess the utility of this treatment modality in LCC.

To date, only two patients with LCC homozygous for variants in *SNORD118* have been reported. We noticed that all three LCC homozygotes experienced onset before age one year and progressive neurological decline in infancy.

Early interventions are becoming of great importance for optimum clinical management of pediatric genetic diseases.

#### References

1. Labrune P, Lacroix C, Goutieres F, et al. Extensive brain calcifications, leukodystrophy, and formation of parenchymal cysts: a new progressive disorder due to diffuse cerebral microangiopathy. *Neurology*. 1996;46:1297–1301.
2. Livingston JH, Mayer J, Jenkinson E, et al. Leukoencephalopathy with calcifications and cysts: a purely neurological disorder distinct from coats plus. *Neuropediatrics*. 2014;45:175–182.
3. Jenkinson EM, Rodero MP, Kasher PR, et al. Mutations in *SNORD118* cause the cerebral microangiopathy leukoencephalopathy with calcifications and cysts. *Nat Genet*. 2016;48:1185–1192.
4. Fay AJ, King AA, Shimony JS, Crow YJ, Brunstrom-Hernandez JE. Treatment of leukoencephalopathy with calcifications and cysts with bevacizumab. *Pediatr Neurol*. 2017;71:56–59.
5. Livingston JH, Stivaros S, van der Knaap MS, Crow YJ. Recognizable phenotypes associated with intracranial calcification. *Dev Med Child Neurol*. 2013;55:46–57.
6. Linnankivi T, Valanne L, Paetau A, Alafuzoff I. Cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts. *Neurology*. 2006;67:1437–1443.



# Genetics of Paroxysmal Dyskinesia: Novel Variants Corroborate the Role of *KCNA1* in Paroxysmal Dyskinesia and Highlight the Diverse Phenotypic Spectrum of *KCNA1*- and *SLC2A1*-Related Disorders

Josua Kegele<sup>1\*</sup>, Johanna Krüger<sup>1</sup>, Mahmoud Koko<sup>1</sup>, Lara Lange<sup>2</sup>, Ana Victoria Marco Hernandez<sup>3</sup>, Francisco Martinez<sup>3,4</sup>, Alexander Münchau<sup>5</sup>, Holger Lerche<sup>1</sup> and Stephan Lauxmann<sup>1</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Anna De Rosa,  
Università di Napoli Federico II, Italy

### Reviewed by:

Florence Riant,  
Assistance Publique Hôpitaux de  
Paris, France  
Niccolò Menicacci,  
Northwestern University, United States

### \*Correspondence:

Josua Kegele  
josua.kegele@med.uni-tuebingen.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Movement Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Neurology

**Received:** 27 April 2021

**Accepted:** 28 May 2021

**Published:** 08 July 2021

### Citation:

Kegele J, Krüger J, Koko M, Lange L,  
Marco Hernandez AV, Martinez F,  
Münchau A, Lerche H and  
Lauxmann S (2021) Genetics of  
Paroxysmal Dyskinesia: Novel Variants  
Corroborate the Role of *KCNA1* in  
Paroxysmal Dyskinesia and Highlight  
the Diverse Phenotypic Spectrum of  
*KCNA1*- and *SLC2A1*-Related  
Disorders. *Front. Neurol.* 12:701351.  
doi: 10.3389/fneur.2021.701351

<sup>1</sup> Department of Neurology and Epileptology, Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Tübingen, Germany, <sup>2</sup> Institute of Neurogenetics, University of Lübeck, Lübeck, Germany, <sup>3</sup> Neuropediatrics Section, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain, <sup>4</sup> Genetics Unit, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain, <sup>5</sup> Institute of Systems Motor Science, University of Lübeck, Lübeck, Germany

Paroxysmal dyskinesias (PxD) are rare movement disorders with characteristic episodes of involuntary mixed hyperkinetic movements. Scientific efforts and technical advances in molecular genetics have led to the discovery of a variety of genes associated with PxD; however, clinical and genetic information of rarely affected genes or infrequent variants is often limited. In our case series, we present two individuals with PxD including one with classical paroxysmal kinesigenic dyskinesia, who carry new likely pathogenic *de novo* variants in *KCNA1* (p.Gly396Val and p.Gly396Arg). The gene has only recently been discovered to be causative for familial paroxysmal kinesigenic dyskinesia. We also provide genetic evidence for pathogenicity of two newly identified disease-causing variants in *SLC2A1* (p.Met96Thr and p.Leu231Pro) leading to paroxysmal exercise-induced dyskinesia. Since clinical information of carriers of variants in known disease-causing genes is often scarce, we encourage to share clinical data of individuals with rare or novel (likely) pathogenic variants to improve disease understanding.

**Keywords:** paroxysmal dyskinesia, paroxysmal kinesigenic dyskinesia, paroxysmal exercise induced dyskinesia, *KCNA1*, *SLC2A1*

## INTRODUCTION

Paroxysmal dyskinesias (PxD) are rare movement disorders, characterized by provoked or spontaneous episodes of hyperkinetic involuntary mixed movements such as choreoathetosis, dystonia, or ballism (1, 2). There are three main PxD subtypes: paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD), paroxysmal exercise-induced dyskinesia (PED), and paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia (PNKD). Clinically, they differ from each other mainly in their duration, provocation factors, and frequency of dyskinetic attacks (Table 1) but also regarding their genetic

**TABLE 1 |** Phenotypic characteristics of paroxysmal dyskinesias\*.

Feature	PKD	PNKD	PED
Trigger	(Sudden) movements	Caffeine, alcohol	Prolonged exercise, hyperventilation
Duration	Seconds to few minutes	Minutes to hours	Minutes to hours
Lateralization	Unilateral to bilateral	Unilateral to bilateral	Unilateral to bilateral
Male:female ratio	2:1	1.5:1	1:1
Age at onset	1–40 years	1–30 years	2–30 years
Frequency	Up to hundreds per day	Up to a few per day	One per day
Aura/prodromal symptoms	Sometimes	Sometimes	None
Improvement with age	Sometimes	Sometimes	Unknown
Major causative gene	<i>PRRT-2</i>	<i>PNKD</i>	<i>SLC2A1</i>
Predominant inheritance mode	Positive FH in 2/3 (3), AD/sporadic	AD (4)	AD (4)

PKD, paroxysmal kinesigenic dyskinesia; PNKD, paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia; PED, paroxysmal exercise-induced dyskinesia; FH, family history; AD, autosomal dominant. \*This table is based on Mink (5).

pathology and underlying mechanism: PKD mainly results from mutations in *PRRT2* (Proline-rich transmembrane protein 2), mutations in *PNKD* (metallo-beta-lactamase domain-containing protein, formerly known as *MR-1*) may induce PNKD, and *SLC2A1* (Solute carrier family 2, member 1; known as glucose transporter 1 gene or GLUT1) is known to cause PED, among other diseases. Further genes have been linked to PxD, albeit less frequently than the already mentioned ones. Described PKD-associated genes are *SCN8A*, *PNKD*, *SLC2A1*, *KCNMA1*, *DEPDC5*, *KCNA1*, and *CHRNA4* (6–11). Genes associated with PNKD are *KCNMA1* (12) and *SLC2A1* (10), and the following genes have been linked to PED: *GCHI* (13, 14), *ECHS* (15, 16), and *PRRT2* (10). The aforementioned list of genes refers to isolated/predominant PxD. However, PxD can also be part of the clinical presentation in a variety of complex neurogenetic disorders (17).

On the one hand, there is an astonishing cumulation of a few recurrent variants in PxD. For example, up to 78.5% of *PRRT2*-positive individuals with PKD carry the frameshift mutation c.649dupC (18). On the other hand, there are reports of disease-causing variants that have occurred only in one family or only in a single individual and whose genetic evidence underpinning the pathogenicity is often limited.

In contrast, there are also secondary causes that lead to PxD such as stroke, trauma, central nervous infection, and multiple sclerosis (19), but these will not be the focus of this report.

Recently, *KCNA1* has been linked to familial PKD and PxD (7, 8, 11). In this case series, we strengthen the evidence for *KCNA1* as a causative gene in sporadic PKD and other PxD with a detailed description of the clinical phenotype of patients with two newly identified *de novo* missense mutations in *KCNA1*. We further describe a novel missense mutation in *SLC2A1* resulting in autosomal dominant PED as well as another *SLC2A1* missense mutation resulting in PED which has not been associated with this phenotype until now but has been previously published once in a different context as a *de novo* mutation in a patient with glucose transporter 1 deficiency syndrome (GLUT1-DS).

## METHODS

### Study Participants

The study was performed according to local regulations and was approved by the ethics committees involved. Informed consent for publication of the clinical and genetic information was provided by all index individuals and living tested relatives. Consent for the publication of genetic information of deceased individuals was obtained from the next of kin. All study-related procedures are in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki and its later amendments.

Clinical data were acquired by the investigators directly from the patient, from medical charts, or from the responsible physician. EDTA samples were taken from each available family member and DNA was extracted using standard procedures.

### Genetic Testing

We performed whole-exome sequencing (WES) in all index individuals. The exomes have been sequenced within previous research projects (individual 1: IonNeuroNet/EuroEPINOMICS, individual 3: EuroEPINOMICS) or done on clinical diagnostic basis (individuals 2 and 4). All discovered variants were validated by Sanger sequencing. The genetic variants were interpreted according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. The fulfilled criteria are listed in brackets with the abbreviations used in the reference literature (20).

## RESULTS

### Individual #1: *KCNA1* p.Gly396Val (c.1187G>T)

#### Clinical Description

This 49-year-old man has been followed up from 2003 to 2020. He started having attacks of PKD at the age of 10 years. The paroxysmal events were usually provoked by sudden movements, for example, at the start of a 100-m run, or when he was suddenly called while waiting in the waiting room. He reported having

twisting and cramping movements of the right arm and leg which rarely spread to the left side of the body. Sometimes, the symptoms were so severe that he could no longer hold himself upright. The attacks lasted between 20 and 60 s and there were no prodromes, for example, sensory phenomena and no alteration of consciousness. He also did not notice any vertigo or the feeling of being drunk during the episodes. Other triggers such as consumption of alcohol, caffeinated drinks, or certain food or the feeling of being cold or fatigue were denied. In case of high fever, the attacks were more frequent, and on rare occasions, they could also occur at rest. The family history was negative for neurological disorders.

Carbamazepine had reduced attacks but was not tolerated because of side effects. Gabapentin was not helpful. The patient did not want to try other medications. The neurological examination revealed an asymmetrical right accentuated arm tremor but was otherwise normal (in particular no ataxia or myokymia, electromyography was not performed). EEG and MRI findings were normal. Genetic findings will be presented with the ones of individual #2.

### Individual #2: *KCNA1* p.Gly396Arg (c.1186G>C)

#### Clinical Description

This 17-year-old woman suffers from idiopathic generalized epilepsy and PxD. She had her first epileptic seizure at the age of 18 months when she suffered from atonic seizures with a sudden loss of tone for a few seconds with falling. She started to have generalized tonic-clonic seizures (GTCS) at the age of 6 years. At the same age, she had a febrile convulsive status epilepticus requiring intubation. Her first episodes with abnormal involuntary choreiform movements started at the age of 12 years. Both legs and arms and facial muscles were affected. The paroxysmal events lasted 3 to 5 s, occurred two to three times per day, and were triggered by emotional stress, not by sudden movements or exercise.

Development was described as normal, yet when she was 6 years old, she was diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder and with a mild difficulty in expressive language. There have been no neurologic disorders in the family.

She was first treated with valproate which was withdrawn due to lack of seizure control. Her second antiseizure drug was topiramate which was stopped due to anhidrosis. Levetiracetam led to an increase in seizure activity so the medication was exchanged with oxcarbazepine which was very effective. When she suffered from a febrile convulsive status epilepticus at the age of 6 years, valproate was added again and taken together with oxcarbazepine until the age of 15. Since paroxysmal dyskinesia did continue, she additionally received brivaracetam from the age of 14 years on. Only when lacosamide, a third anticonvulsive drug, was added 1 year later (in exchange for valproate), she became free of paroxysmal dyskinetic events. Her current treatment (last update: February 2021) is oxcarbazepine 2 × 600 mg (19.05 mg/kg body weight per day), brivaracetam 2 × 50 mg (1.59 mg/kg body weight per day), and lacosamide 2 × 150 mg (4.76 mg/kg body weight per day).

Physical examination did not reveal any signs of ataxia, impaired coordination, or tremor. Myokymia was observed clinically. Further significant findings were generalized hyperhidrosis and acne vulgaris.

A 6-h EEG recording after sleep deprivation (10–20 standard EEG recording, age: 15 years and 9 months) revealed intermittent generalized theta activity (4–6/s) and high amplitude delta activity (3–4/s) predominantly in stage I sleep as well as generalized 3/s spike-wave activity of up to 1 s duration during wakefulness without any clinical correlate. A small subcortical area of gliosis/demyelination right frontobasally was found in the MRI of the brain and interpreted as an unspecific finding.

### Genetic Testing and Variant Interpretation (*KCNA1*) of Individual #1 and #2

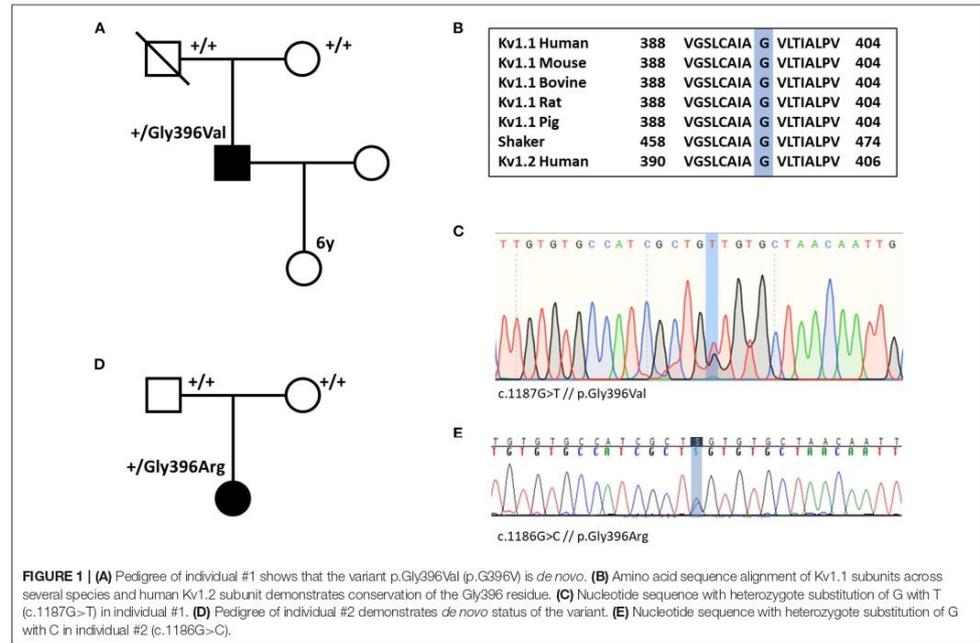
Whole-exome sequencing for individual #1 was performed in 2012. At that time, no disease-causing variant could be identified (including analysis of *PRRT2* and *SLC2A1*). Exome data reanalysis of six exome-negative patients with paroxysmal movement disorders from our local patient database in 2020 revealed the variant p.Gly396Val in *KCNA1* (Figure 1). In the remaining five exomes (three samples of individuals with PKD and two samples of individuals with PED), we did not find any significant variants. Individual #2 received whole-exome sequencing on a diagnostic basis in 2020 where the variant p.Gly396Arg was detected.

Both variants are confirmed to be *de novo* and they were not listed in gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) (21). The amino acid change is located in the pore-forming transmembrane segment S6. Alignment of Kv1 channels across species, shaker, and Kv1.2 (Figure 1) indicates that the Gly396 residue is highly conserved among all species and tested channels. Only two familial variants in *KCNA1* causing PKD have been described so far. While p.Asn255Lys sits in the S3-helix, p.Leu319Arg is located in an intracellular linker that connects the voltage-sensing domain to the pore (between S4 and S5) (22, 23). Both variants are in a completely different region compared with our variants. According to the ACMG criteria, the variants of individual #1 and #2 are predicted to be likely pathogenic [PM1, PM2, PM6, PP2, PP3; the abbreviations refer to the ACMG reference publication (20)]. All 21 *in silico* prediction tools listed on VarSome (free version) predict a deleterious effect. Furthermore, electrophysiological studies in *Xenopus* oocytes at homolog positions in the *KCNA2* gene (Gly398Cys) and in the well-studied *shaker* channel (Gly466Ala and Gly466Trp) revealed loss-of-function defects for all three variants (24–26).

### Individual #3: *SLC2A1* p.Met96Thr (c.287T>C)

#### Clinical Description

This 26-year-old woman has suffered from PED since childhood. Symptoms emerged when she began to be able to do prolonged exercise like hiking with the family or playing table tennis. Predominant symptoms of PED were dystonia of the legs that occurred after or during prolonged exercise and up to three to four times per week. After the interruption of physical activity and intake of glucose (dextrose), she was able to move on after



10–15 min. Regular intake of carbamazepine retard 15 mg/kg per day led to a reduction of the attack frequency to three to four episodes per 6 months.

At the age of 10 years, she presented with an episode which was classified as an attack of hemiplegic migraine: in school, she suffered from a sudden headache with subsequent paresis of the left leg, followed by twitches of the left leg and stiffness of the left arm, which was rotated inwards. Consciousness and awareness have been normal for the whole episode; there was no tongue bite, no defecation, and no enuresis. The speech was blurred. Her symptoms were regressing during the transport to the hospital. EEG revealed delta slowing of the right hemisphere. The paresis faded after 1 to 2 h. A hemiplegic migraine attack had been suggested. Such an episode did not recur. Since she did not feel the episodes of PED to be disturbing, she stopped taking carbamazepine between 11 and 13 years of age.

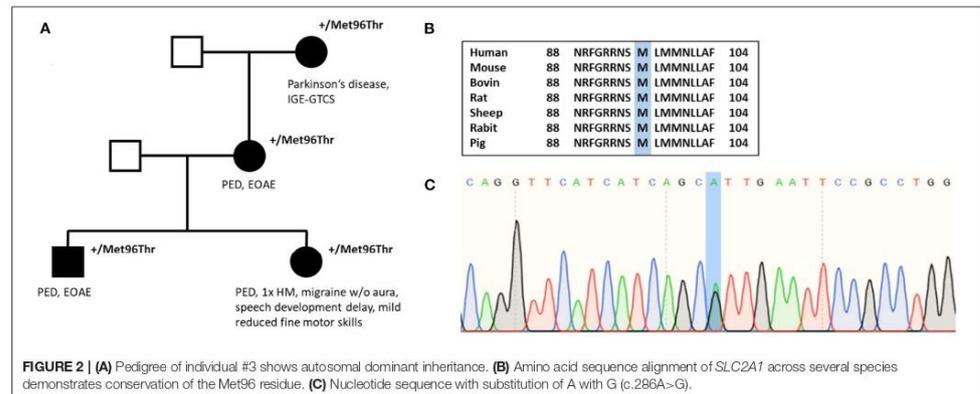
Mild coordination impairment was observed during development and she needed logopedic support to improve her speech skills. She had a learning disability and physical examination revealed mildly reduced fine motor skills. EEG repeatedly showed increased non-lateralized theta rhythms.

Family history was positive for PED (for pedigree, see **Figure 2**). Her mother and grandmother also suffered from the disease with PED of the legs after prolonged walks or hiking. All

affected family members started to suffer from PED with onset in childhood. The brother of the index patient has early-onset absence epilepsy (with onset in the third year of life) in addition to PED, and the grandmother suffered from Parkinson's disease and idiopathic/genetic generalized epilepsy with GTCS.

#### Genetic Testing and Variant Interpretation

In 2008, the first genetic test performing Sanger sequencing of *PNKD* and *SLC2A1* was negative. In December 2011, whole-exome sequencing revealed the missense variant c.287T>C in *SLC2A1* leading to an amino acid change from methionine to threonine (p.Met96Thr), which was reconfirmed by Sanger sequencing. The variant has been classified as pathogenic by MutationTaster and as probably damaging by PolyPhen-2. The amino acid position is located in the S3 helix and is conserved among several species (**Figure 2**). Evidence details have recently been uploaded to ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/847673/>). The variant p.Met96Val (c.286A>G), which has been described as a *de novo* variant in a patient with GLUT1-DS (27), has been investigated recently showing a significant reduction of glucose uptake compared with average protein function (28). However, our variant p.Met96Thr has not been published or functionally analyzed before. According to ACMG criteria, the variant has been



classified as a variant of uncertain significance until recently. We suggest that, with our additional evidence [cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitely known to cause the disease (PPI and PM5)], the variant can be reclassified as likely pathogenic (PM2, PM5, PP1, PP2, PP3).

#### Individual #4: *SLC2A1* p.Leu231Pro (c.692T>C)

##### Clinical Description

A 21-year-old man presented at our outpatient clinic for clarification of intermittent pain associated with cramps in the legs due to exertion, which he experienced the first time 1 year ago. In the beginning, symmetrical cramping pains in the legs had occurred in the afternoon, at the end of or after working as a warehouse keeper. When the symptoms were getting worse, the legs would turn inwards or forwards. Sometimes he noticed an indefinite feeling as a prodromal. When he sat down at the end of work, the symptoms eased after a certain time. Initially, L-dopa-sensitive dystonia was suspected by a practicing neurologist, but the symptoms did not improve by taking L-dopa. About 1 week after starting L-dopa treatment, he had his first and only GTCS. Immediately after the seizure, a cerebral CT scan and an EEG were performed, which were unremarkable. The individual had a history of early-onset absence epilepsy, which is why an antiepileptic treatment was started with valproic acid. There were no further seizures during the year until presentation, and also, the painful involuntary movements of the legs occurred less frequently.

Motor development was normal except for a circumscribed mild impairment of gross motor skills. He had mild psychomotor slowing and experienced difficulties in school with lack of concentration, but with support, he could complete secondary school. His maternal great-grandmother had a child with epilepsy (no further details available). The family history was otherwise negative for neurological diseases. On physical examination,

mild gait insecurity was observed. The remaining neurological examination was normal.

At the age of 12 years, he underwent a 24-h EEG where generalized irregular 3/s spike-wave discharges with a maximal duration of 4 s had been recorded during sleep. There were no clinical absences during wakefulness. An MRI has never been performed.

##### Genetic Testing and Variant Interpretation

Whole-exome sequencing revealed the variant c.692T>C which results in a substitution of leucine with proline (p.Leu231Pro). There has been no contact with the father, which is why a segregation analysis was not possible. Amino acid alignment shows conservation of the amino acid among several species (human, mouse, rat, bovine, sheep, pig, rabbit, chicken). There is one publication of an individual with suspected GLUT1-DS which carried the same variant. Segregation analysis in this individual confirmed *de novo* status. She had predominant eyelid myoclonus with onset at the age of 3 months and mild intellectual disability, so that the phenotype of this individual differs significantly from ours, also indicating phenotypic heterogeneity (29). According to ACMG criteria, the variant is likely pathogenic (PM2, PM6, PP2, PP3, PP5), whereas criterion PM6 is based on the already published individual.

## DISCUSSION

We here describe four individuals with PxD, three of whom bear newly identified likely pathogenic variants in known PxD genes (individual #1: *KCNA1*, p.Gly396Val; individual #2: *KCNA1*, p.Gly396Arg; and individual #3: *SLC2A1*, p.Met96Thr). The clinical presentation of the fourth individual expands the phenotypic spectrum of an *SLC2A1* variant previously associated only with GLUT1-DS (individual #4: *SLC2A1*, p.Leu231Pro).

The missense mutations of individual #1 and #2 (*KCNA1*; p.Gly396Val and p.Gly396Arg) further corroborate the recent

findings of *KCNA1* as a causative gene for PxD since only two PKD families with an underlying *KCNA1* variant have been described so far (7, 8, 11). Moreover, these patients carry the first described *KCNA1* variants with PxD phenotype occurring *de novo*.

This evidence is urgently needed since only the index patient of the family carrying the variant p.Leu319Arg in *KCNA1* already published by Yin and colleagues (8) fulfilled the diagnostic criteria for PKD (3). Four other affected individuals with *KCNA1*-related PxD suffered from episodic dystonic attacks not fulfilling the criteria of PKD (3) because they were too long and not triggered by movement. The episodes were therefore termed “paroxysmal dyskinesia”—without further classification. Similar to our individual #2, the episodes were triggered by stress and anger (in our individual triggered by emotional stress). Given the long duration and/or the aforementioned triggering factors, one may suggest that there is a phenotypic overlap between PNKD in *KCNA1*-associated PxD. However, data on *KCNA1*-related PxD are only available from four different variants occurring in single families, so that closer assertions cannot be made yet.

*KCNA1* is commonly associated with episodic ataxia 1 (EA1) but shows a broad phenotypic spectrum including myokymia and hypomagnesemia without EA1, developmental and epileptic encephalopathy, and neuromyotonia (23). Up to 10% of patients with EA1 suffer from epilepsy (30), and myokymia and hyperthermia have been reported to co-occur in *KCNA1* mutation carriers as well. Therefore, it is not surprising that epilepsy has also been described to be a phenotypic feature of the known PxD-related *KCNA1* variants p.Leu319Arg and p.Asn255Lys (7, 8). Accordingly, individual #2 suffered also from epilepsy and myokymia, representing the diverse phenotypic spectrum of *KCNA1*-related disorders.

Currently, there is no targeted treatment available for *KCNA1*-associated disorders, which are mainly caused by a biophysical loss-of-function effect (23). The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide, which is often used in EA1 patients, seems to be effective in some patients, but there are still many patients suffering from uncontrolled disease course (31). Our individuals and the individuals of the affected family carrying the p.Leu319Arg variant responded well to the sodium channel blocker (SCB) oxcarbazepine, although seizure freedom was not reached. Unfortunately, treatment data of individuals with the p.Asn255Lys variant were not available, but individual #2 became free of attacks when another SCB—lacosamide—was added to oxcarbazepine. Consequently, we consider that the usage of SCBs in combination or as monotherapy (and in analogy with EA1) might be a good choice for acetazolamide-resistant patients or even as a first-line therapy in *KCNA1*-associated PxD. There have been first *in silico* approaches for a specific, causative treatment for *KCNA1*-related disorders with new substances (32) and different SCBs using a targeted “drug repurposing” approach (33). The biophysical ratio of a broadened shape of the action potential (AP) due to a reduced function of voltage-gated potassium tetramers, such as  $K_v1.1$  subunits, and a consequently affected repolarization phase (34) seems plausible, given the

fact that SCBs could “correct” this broadened AP by very well-described effects, such as enhancing the inactivated state (35, 36), blocking the persistent sodium current [e.g., riluzole (37)], and reducing repetitive firing (38). Nevertheless, further studies in heterologous expression systems and neurons are necessary to enable individualized treatment.

The two families in our series with a variant in *SLC2A1* have PED and early-onset absence epilepsy or a positive family history of both. *SLC2A1* is known to be the major causative gene of the two diseases (39–41). We therefore think that the combination of the manifestations is highly suggestive for *SLC2A1* to be a candidate gene. The variant p.Met96Thr of individual #3 has not been described to date, but the evident cosegregation (Figure 2) increases the likelihood of pathogenicity of this variant. There have been functional measurements on a different variant at the same amino acid position (p.Met96Val), which has once been observed in a patient with GLUT1-DS (27, 28). A *Xenopus laevis* oocyte glucose uptake assay showed a significantly marked reduction of glucose uptake compared with the average protein function indicating pathogenicity. The variant with a valine substitution though has been found among 3 of 12,332 individuals of Finnish ancestry so that the likelihood of pathogenicity of this variant (p.Met96Val) becomes more disputable (21, 28).

Our case series has major limitations as we do only have single individuals or families carrying the presented variants and we do not have functional data to support our hypotheses. We know that the variants can only be classified as likely pathogenic and therefore leave room for some uncertainty. Also, we could not reliably retrace why the *SLC2A1* variant of individual #3 was missed in the first sequencing approach *via* single-gene sequencing. However, we believe that in conjunction with the literature on related variants and their phenotypes, we increase the evidence of pathogenicity of the detected variants and give an overview of the current knowledge about them. Furthermore, functional characterizations of three other variants in homologous channels at the same position but different amino acids revealed a clear loss of function (see results). We want to highlight that two of our four described variants (*KCNA1* p.Gly396Val; *SLC2A1* p.Met96Thr) have been identified by reanalysis of existing genetic information. Therefore, reanalysis of existing genomic data may be considered, especially if the phenotype is highly suggestive for a specific gene or genetic phenotype. We encourage clinicians and researchers to share clinical information of individuals carrying rare or novel likely pathogenic or pathogenic variants, which might lead to a better understanding of the disease mechanism.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are publicly available. This data can be found at ClinVar with the following accession numbers: NM\_000217.3(*KCNA1*):c.1187G>T SCV001623013; NM\_000217.3(*KCNA1*):c.1186G>C SCV001623014;

NM\_006516.4(SLC2A1):c.287T>C SCV001623015 and NM\_006516.4(SLC2A1):c.692T>C SCV001623016.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee at the Medical Faculty of the University of Tuebingen and the Comité de Ética de Investigación con medicamentos La Fe. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin. Written informed consent was obtained from the individual(s), and minor(s)' legal guardian/next of kin, for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JKe, LL, AM, AVM, and FM recruited and phenotyped the patients. JKr, MK, JKe, AVM, FM, and SL analyzed

and interpreted the genetic data. JKe, JKr, and SL wrote the manuscript. All authors read, revised, and approved the manuscript.

## FUNDING

The research was supported by the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF, IonNeuroNet: 01GM1105A, TreatION 01GM1907A), the EuroEPINOMICS Programme, and the European Reference Network—Rare Neurological Diseases (ERN—RND; Project ID No. 739510). AVM holds a grant CM19/00181 (Instituto de Salud Carlos III—Río Hortega).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and family members that have contributed samples for the purpose of this study. C. Hengsbach and A. Maisch are thanked for data organization and sample logistics.

## REFERENCES

- Berkovic SF. Paroxysmal movement disorders and epilepsy Links across the channel. *Neurology*. (2000) 55:169–70. doi: 10.1212/WNL.55.2.169
- Bhatia KP. Familial (idiopathic) paroxysmal dyskinesias: an update. *Semin Neurol*. (2001) 21:69–74. doi: 10.1055/s-2001-13121
- Bruno MK, Hallett M, Gwinn-Hardy K, Sorensen B, Considine E, Tucker S, et al. Clinical evaluation of idiopathic paroxysmal kinesigenic dyskinesia: new diagnostic criteria. *Neurology*. (2004) 63:2280–7. doi: 10.1212/01.WNL.0000147298.05983.50
- Erro R, Sheerin U-M, Bhatia KP. Paroxysmal dyskinesias revisited: a review of 500 genetically proven cases and a new classification. *Mov Disord*. (2014) 29:1108–16. doi: 10.1002/mds.25933
- Mink JW. Treatment of paroxysmal dyskinesias in children. *Curr Treat Options Neurol*. (2015) 17:23. doi: 10.1007/s11940-015-0350-9
- Gardella E, Becker E, Möller RS, Schubert J, Lemke JR, Larsen LHG, et al. Benign infantile seizures and paroxysmal dyskinesia caused by an SCN8A mutation. *Ann Neurol*. (2016) 79:428–36. doi: 10.1002/ana.24580
- Tian W-T, Huang X-J, Mao X, Liu Q, Liu X-L, Zeng S, et al. Proline-rich transmembrane protein 2-negative paroxysmal kinesigenic dyskinesia: Clinical and genetic analyses of 163 patients. *Mov Disord*. (2018) 33:459–67. doi: 10.1002/mds.27274
- Yin X-M, Lin J-H, Cao L, Zhang T-M, Zeng S, Zhang K-L, et al. Familial paroxysmal kinesigenic dyskinesia is associated with mutations in the KCNA1 gene. *Hum Mol Genet*. (2018) 27:625–37. doi: 10.1093/hmg/ddx430
- Jiang Y, Yuan F, Yang Y, Sun X, Song L, Jiang W. CHRNA4 variant causes paroxysmal kinesigenic dyskinesia and genetic epilepsy with febrile seizures plus? *Seizure*. (2018) 56:88–91. doi: 10.1016/j.seizure.2018.02.005
- Gardiner AR, Jaffer F, Dale RC, Labrum R, Erro R, Meyer E, et al. The clinical and genetic heterogeneity of paroxysmal dyskinesias. *Brain*. (2015) 138:3567–80. doi: 10.1093/brain/awv310
- Huang X-J, Wang S-G, Guo X-N, Tian W-T, Zhan F-X, Zhu Z-Y, et al. The Phenotypic and genetic spectrum of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in China. *Mov Disord*. (2020) 35:1428–37. doi: 10.1002/mds.28061
- Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You S-A, Wang L, et al. Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet*. (2005) 37:733–8. doi: 10.1038/ng1585
- Dale RC, Melchers A, Fung VSC, Grattan-Smith P, Houlden H, Earl J. Familial paroxysmal exercise-induced dystonia: atypical presentation of autosomal dominant GTP-cyclohydrolase 1 deficiency. *Dev Med Child Neurol*. (2010) 52:583–6. doi: 10.1111/j.1469-8749.2010.03619.x
- Erro R, Stamelou M, Ganos C, Skorvanek M, Han V, Batla A, et al. The clinical syndrome of paroxysmal exercise-induced dystonia: diagnostic outcomes and an algorithm. *Mov Disord Clin Pract*. (2014) 1:57–61. doi: 10.1002/mdc3.12007
- Olgiati S, Skorvanek M, Quadri M, Minnebo M, Graafland J, Breedveld GJ, et al. Paroxysmal exercise-induced dystonia within the phenotypic spectrum of ECHS1 deficiency. *Mov Disord*. (2016) 31:1041–8. doi: 10.1002/mds.26610
- Mahajan A, Constantinou J, Sidiropoulos C. ECHS1 deficiency-associated paroxysmal exercise-induced dyskinesias: case presentation and initial benefit of intervention. *J Neurol*. (2017) 264:185–7. doi: 10.1007/s00415-016-8381-z
- Garone G, Capuano A, Travaglini L, Graziola F, Stregapede F, Zanni G, et al. Clinical and genetic overview of paroxysmal movement disorders and episodic ataxias. *Int J Mol Sci*. (2020) 21:3603. doi: 10.3390/ijms21103603
- Ebrahimi-Fakhari D, Saffari A, Westenberger A, Klein C. The evolving spectrum of PRRT2-associated paroxysmal dyskinesias. *Brain*. (2015) 138:3476–95. doi: 10.1093/brain/awv317
- Blakeley J, Jankovic J. Secondary paroxysmal dyskinesias. *Mov Disord*. (2002) 17:726–34. doi: 10.1002/mds.10178
- On behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, 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) 17:405–23. doi: 10.1038/gim.2015.30
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. (2020) 581:434–43. doi: 10.1530/ey.17.14.3
- Kuang Q, Purhonen P, Hebert H. Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci*. (2015) 72:3677–93. doi: 10.1007/s00018-015-1948-5
- Paulhus K, Ammerman L, Glasscock E. Clinical spectrum of KCNA1 mutations: new insights into episodic ataxia and epilepsy comorbidity. *Int J Mol Sci*. (2020) 21:2802. doi: 10.3390/ijms21082802
- Masnada S, Hedrich UBS, Gardella E, Schubert J, Kaiwar C, Klee EW, et al. Clinical spectrum and genotype-phenotype associations of KCNA2-related encephalopathies. *Brain*. (2017) 140:2337–54. doi: 10.1093/brain/awx184
- Yifrach O, MacKinnon R. Energetics of pore opening in a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Cell*. (2002) 111:231–9. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01013-9
- Soler-Llavina GJ, Chang T-H, Swartz KJ. Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the shaker Kv channel. *Neuron*. (2006) 52:623–34. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.005
- Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Lefterink M, Hofste T, van Engelen BG, et al. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical

- and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain*. (2010) 133:655–70. doi: 10.1093/brain/awp336
28. Zaman SM, Mullen SA, Petrovski S, Maljevic S, Gazina EV, Phillips AM, et al. Development of a rapid functional assay that predicts GLUT1 disease severity. *Neurol Genet*. (2018) 4:e297. doi: 10.1212/NXG.0000000000000297. Available online at: <https://ng.neurology.org/content/4/6/e297>
  29. Castellotti B, Ragona F, Freri E, Solazzi R, Ciardullo S, Tricomi G, et al. Screening of SLC2A1 in a large cohort of patients suspected for Glut1 deficiency syndrome: identification of novel variants and associated phenotypes. *J Neurol*. (2019) 266:1439–48. doi: 10.1007/s00415-019-09280-6
  30. Rajakulendran S, Schorge S, Kullmann DM, Hanna MG. Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy. *Neurotherapeutics*. (2007) 4:258–66. doi: 10.1016/j.nurt.2007.01.010
  31. D'Adamo MC, Hasan S, Guglielmi L, Servettini I, Cenciarini M, Catacuzzeno L, et al. New insights into the pathogenesis and therapeutics of episodic ataxia type 1. *Front Cell Neurosci*. (2015) 9:317. doi: 10.3389/fncel.2015.00317
  32. Manville RW, Abbott GW. Isoform-selective KCNA1 potassium channel openers built from glycine. *J Pharmacol Exp Ther*. (2020) 373:391–401. doi: 10.1124/jpet.119.264507
  33. Lauxmann S, Sonnenberg L, Koch NA, Boßelmann CM, Winter N, Schwarz N, et al. Therapeutic potential of sodium channel blockers as targeted therapy approach in KCNA1-associated episodic ataxia (EA1) and a comprehensive review of the literature. *Front Neurol*. (2021) (in review).
  34. Hedrich UBS, Lauxmann S, Wolff M, Synofzik M, Bast T, Binelli A, et al. Effective precision therapy in KCNA2-related developmental and epileptic encephalopathy with 4-aminopyridine. *Sci Trans Med*. (in press).
  35. Hebeisen S, Pires N, Loureiro AI, Bonifácio MJ, Palma N, Whyment A, et al. Eslicarbazepine and the enhancement of slow inactivation of voltage-gated sodium channels: A comparison with carbamazepine, oxcarbazepine and lacosamide. *Neuropharmacology*. (2015) 89:122–35. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.09.008
  36. Bayraktar E, Liu Y, Hedrich UBS, Sara Y, Lerche H, Wuttke TV, et al. *In vitro* effects of S-Licarbazepine as a potential precision therapy on SCN8A variants causing neuropsychiatric disorders. *bioRxiv [preprint]*. (2021). doi: 10.1101/2021.04.24.441205
  37. Zona C, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G. Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience*. (1998) 85:931–8. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00604-0
  38. Wamil AW, Schmutz M, Portet C, Feldmann KF, McLean MJ. Effects of oxcarbazepine and 10-hydroxycarbamazepine on action potential firing and generalized seizures. *Eur J Pharmacol*. (1994) 271:301–8. doi: 10.1016/0014-2999(94)90787-0
  39. Suls A, Dedeken P, Goffin K, Van Esch H, Dupont P, Cassiman D, et al. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain*. (2008) 131:1831–44. doi: 10.1093/brain/awn113
  40. Weber YG, Storch A, Wuttke TV, Brockmann K, Kempfle J, Maljevic S, et al. GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J Clin Invest*. (2008) 118:2157–68. doi: 10.1172/JCI34438
  41. Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, Guerrini R, et al. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol*. (2009) 66:415–9. doi: 10.1002/ana.21724
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2021 Kegele, Krüger, Koko, Lange, Marco Hernandez, Martinez, Münchau, Lerche and Lauxmann. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Variant in *CACNA1G* as a Possible Genetic Modifier of Neonatal Epilepsy in an Infant with a De Novo *SCN2A* Mutation

Juan Jose Nieto-Barcelo<sup>1</sup> Noelia Gonzalez Montes<sup>2</sup> Isabel Gonzalo Alonso<sup>2</sup> Francisco Martinez<sup>3</sup>  
 Maria Jose Aparisi<sup>4</sup> Marina Martinez-Matilla<sup>4</sup> Ana Victoria Marco Hernandez<sup>4</sup> Miguel Tomás Vila<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitari i Politecnic La Fe, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Pediatrics Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Genetics Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Genomics Unit, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain

<sup>5</sup>Neuropediatrics Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

Address for correspondence Juan Jose Nieto-Barcelo, Hospital Universitari i Politecnic La Fe, Valencia 46026, Spain (e-mail: juanjonb92@gmail.com).

J Pediatr Genet

### Abstract

Mutations in *SCN2A* genes have been described in patients with epilepsy, finding a large phenotypic variability, from benign familial epilepsy to epileptic encephalopathy. To explain this variability, it was proposed the existence of dominant modifier alleles at one or more loci that contribute to determine the severity of the epilepsy phenotype. One example of modifier factor may be the *CACNA1G* gene, as proved in animal models. We present a 6-day-old male newborn with recurrent seizures in which a mutation in the *SCN2A* gene is observed, in addition to a variant in *CACNA1G* gene. Our patient suffered in the first days of life myoclonic seizures, with pathologic intercritical electroencephalogram pattern, requiring multiple drugs to achieve adequate control of them. During the next weeks, the patient progressively improved until complete remission at the second month of life, being possible to withdraw the antiepileptic treatment. We propose that the variant in *CACNA1G* gene could have acted as a modifier of the epilepsy syndrome produced by the mutation in *SCN2A* gene in our patient.

### Keywords

- ▶ neonatal epilepsy
- ▶ *SCN2A*
- ▶ *CACNA1G*
- ▶ genetic modifier

### Introduction

Seizures are more frequent in the first month after birth than at any other time. The incidence of seizures in neonates is 1.5 to 5.5 in 1,000 and is higher in preterm infants.<sup>1</sup>

Although most neonatal seizures are the manifestations of acute conditions (sepsis, meningitis, stroke, etc.), approximately 15% of seizures are caused by neonatal epileptic syndromes.<sup>2</sup> Many of these syndromes have an identifiable genetic etiology.

Identifying the etiology of these disorders allows for long-term prognostication and optimized treatment.

The sodium voltage-gated channel  $\alpha$  subunit 2 (*SCN2A*) gene, located at the long arm of chromosome 2 (2q24.3), encodes one of the  $\alpha$  subunits of a transmembrane glycoprotein (Nav1.2). Nav1.2 acts as a voltage-gated sodium channel (VGSC), which is involved in the generation and propagation of action potentials in neurons and muscles.<sup>3</sup> Several other VGSCs also have been described.

received  
 June 15, 2020  
 accepted after revision  
 January 4, 2021

© 2021. Thieme. All rights reserved.  
 Georg Thieme Verlag KG,  
 Rüdigerstraße 14,  
 70469 Stuttgart, Germany

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0041-1723958>.  
 ISSN 2146-4596.

In the brain, VGSCs are composed of a central  $\alpha$ -subunit of 260 kDa and two  $\beta$ -subunits of approximately 35 kDa ( $\beta 1$ – $\beta 4$ ). The  $\beta$ -subunits modulate the properties of the  $\alpha$ -subunit. Nine  $\alpha$ -subunit subtypes have been described, Nav1.1–Nav1.9, and their corresponding genes are *SCN1A* to *SCN5A* and *SCN8A* to *SCN11A*.<sup>4</sup>

Mutations in the *SCN2A* gene cause epileptic encephalopathies, including early infantile epileptic encephalopathy type 11 (EIEE11)<sup>5</sup> and occasionally other identifiable epileptic syndromes, such as epilepsy with migrating focal seizures.<sup>6</sup> *SCN2A*-related epilepsies often are associated with aggressive courses, seizures that are difficult to control, delayed psychomotor development, and pathologic electroencephalograms (EEG).

EIEE11 is an autosomal dominantly inherited disorder that is one of the refractory epilepsies. High variability in the types of crises and ages of onset have been reported. All cases have had an early age onset. EEGs usually show diffused slowing with paroxysmal discharges of different morphologies (spikes and polyspikes) and locations. Nuclear magnetic resonance imaging (NMR) frequently indicates cerebral atrophy, hypomyelination, and basal ganglia hyperintensity.<sup>5</sup>

Benign familial neonatal epilepsy (BFNE) can also be associated with *SCN2A* mutations,<sup>3</sup> but the condition usually is associated with mutations in genes that encode for voltage-dependent potassium channels (*KCNQ2* and *KCNQ3*).<sup>7</sup> BFNE is a less aggressive autosomal dominant disorder that normally presents as an afebrile seizure within the first year of life. This latter condition is self-limiting because the *SCN2A* gene is expressed early in life in axons of the hippocampal and cortical neurons with expression gradually decreasing and being replaced by *SCN8A* function.<sup>8</sup> BFNE also does not have concurrent psychomotor development delays<sup>9</sup> and interictal EEGs are usually normal.

Another gene, *CACNA1G*, encodes for the pore-forming  $\alpha 1G$ /Cav3.1 subunit, a low-voltage activated calcium channel that is involved in a variety of calcium dependent processes (muscle contraction, hormone and neurotransmitter release, gene expression and mobility, and cell division and cell death).<sup>10</sup> Mutations in this gene may cause spinocerebellar ataxia type 42 (*SCA42*).<sup>11</sup>

In 2005, Bergren et al proposed the existence of dominant modifier alleles at one or more loci. These modifier alleles would explain the large phenotypic variability in patients with alterations in the *SCN2A* gene.<sup>12</sup> One such modifier could be the *CACNA1G* gene. Animal models have shown that decreased expression of this gene decreases the frequency of certain types of spike-wave discharges, and overexpression of gene is associated with the appearance of absence seizures.<sup>13,14</sup> Here, we present evidence that alteration in the *CACNA1G* gene may modify the clinical severity of associated *SCN2A* epilepsies.

### Case Report

A 6-day-old male newborn was hospitalized in the neonatal unit in June 2016 due to recurrent seizures. The pregnancy was adequately followed and without complications. Maternal

serologies (syphilis, toxoplasma, rubella, HIV, and hepatitis B and C) were normal and vaginal culture for Chlamydia was negative. The delivery was full term, spontaneous and without incident. The family history was negative for epilepsy or other neurological or developmental pathologies.

Following birth, the neonate experienced approximately ten seizures per day, each lasting about 1 minute and subsiding spontaneously. The majority of the seizures consisted of hypertonia with postural clonus of the upper limbs, lateralization of the head, deviation of the eyes, moaning, and subsequently a postictal period. At other times, he had episodes of myoclonic seizures, clonus, and extension spasms.

Interictal EEGs showed diffused slowing with discharges at the left hemisphere and right diffusion. Brain NMR and ultrasonogram were normal. The most common viral and bacterial infections as well as inborn errors of metabolism were ruled out.

Once hospitalized, the infant was treated with phenobarbital, levetiracetam, valproate, coenzymes (biotin and pyridoxine), and lacosamide and started on a ketogenic diet. This treatment regimen produced slight clinical improvement. At age 6 weeks, the treatment was changed to perampnel and clonazepam with subsequent improvement in the frequency of the seizures, followed by complete remission and finally hospital discharge of the patient. The patient then remained seizure free for the next 10 months at which time all drugs were stopped without subsequent recurrence of the seizures.

During our patient's hospitalization, EEGs showed structured basal organized, with an adequate basal activity tracing with isolated spikes predominantly in the right temporal and left hemispheric areas. After the drug treatment was ended, his EEGs have remained normal.

During his first few months, the patient has mild psychomotor delay with hypotonia. Subsequently, he has had normal motor development with only slight delay in expressive language for which he received speech therapy. Now, his general communication abilities are normal. Behavioral and social developments and school performance all have been normal.

### Genetic Study

Massive parallel sequencing including analyses of the coding and flanking intronic regions of 751 genes targeted to neurologic diseases were done. Specifically, the Ion AmpliSeq Neurological Research Panel was used for library construction prior to sequencing on the Ion Proton System (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer recommendations.

Following the guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomes,<sup>15</sup> two heterozygous variants were found in the patient. These findings included a c.605C > T in the *SCN2A* gene (NM\_021007) and c.1258G > A in the *CACNA1G* gene (NM\_018896). The genetic variant c.605C > T in the *SCN2A* causes an amino acid substitution, p.Ala202Val, within the transmembrane segment S3 in the first homologous domain. This variant has not been previously reported in aggregated databases of 140,000 individuals (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). The functional predictor databases employed to assess the altered amino acid (SIFT, polyphen-2, CADD), and the high degree of evolutionary

conservation led us to classify this variant as likely pathogenic. Significantly, the variant has been reported in the ClinVar database in four patients with conflicting interpretations of pathogenicity, such as uncertain significance (x2), likely pathogenic, and pathogenic (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/449147/>). Sanger sequencing of samples from the subject and his parents confirmed that this mutation arose de novo in our patient.

The presence of the c.1258G > A change in the *CACNA1G* gene causes a p.Ala420Thr substitution. This variant has been observed in the database, gnomAD, only in one individual (among 123,839 patients and controls) and is predicted to be pathogenic by most in silico analyses tools (Polyphen-2, CADD, DANN, FATHMM-MKL, M-CAP, MutationAssessor, MutationTaster, and PrimateAI). The wild-type residue is highly conserved; neither the mutant residue nor another residue type with similar properties has been observed at this position in other homologous sequences. The *CACNA1G* gene variant was inherited from his mother who is a normal individual.

### Discussion

We present a male patient with recurrent seizures in whom a de novo mutation in the *SCN2A* gene (p.Ala202Val) and a variant of unknown significance in the *CACNA1G* gene (p.Ala420Thr) were found. The subject experienced generalized and myoclonic seizures beginning in the first days of life and required multiple drugs treatment to achieve adequate seizure control. The patient progressively improved until complete remission occurred. At age 10 months, his antiepileptic treatment was stopped without recurrent seizures. At the present time, the patient's psychomotor development is near normal.

In 2016 from studying mutations in the *SCN2A* gene in mice, Calhoun et al<sup>16</sup> identified the *CACNA1G* gene as a seizure modifier gene. These investigators demonstrated that mice with identical mutations in the *SCN2A* gene, which had overexpression of the *CACNA1G* gene, had significantly higher frequencies of seizures. However, mice with decreased levels of the Cav3.1 protein (heterozygous deletion of the *CACNA1G* gene) had significantly fewer seizures. To the best of our knowledge, the findings of Calhoun et al<sup>16</sup> have not been observed in humans. Known human variants in the *CACNA1G* gene can cause autosomal dominant *SCA42*. Further, based on electrophysiological studies, the pathogenic variants of *CACNA1G* can also result in a gain of function.<sup>17</sup> Conversely, the variant p.Ala420Thr, located in the cytoplasmic I-II linker domain, can lead to a loss of function or a loss in the protein stability.

In our patient, the mutation in the *SCN2A* gene raises the question is the alteration causing an attenuated form of EIEE because of the variant in the *CACNA1G* gene or it is producing BFNE.

In our patient, the substituted amino acid in the protein produced by *CACNA1G* is similar to that of another described in EIEE (p. Ala263Val).<sup>18</sup> Initially, the aggressive nature of our patient's disorder with numerous daily seizures and refractoriness to treatment indicated EIEE. Our patient initially

also presented with pathologic interictal EEGs, consistent with an encephalopathic pattern (diffused slowing with epileptic paroxysmal activity). However, the self-limiting symptoms, absence of a significant impact on psychomotor development, and the normality of neuroimaging are more typical of BFNE.

A very similar substitution (p.Ala263Val) in *SCN2A*, which also affects a conserved residue of the S5 segment of the first transmembrane domain, has been reported as a pathogenic de novo mutation in six patients.<sup>18</sup> This mutation has been variably associated with benign neonatal or infantile seizures, epileptic encephalopathy or Ohtahara syndrome.<sup>18</sup> This clinical variability of the same mutation in different patients has been reported for other mutations and suggests that other genetic factors also act as seizure modulators, at least for certain mutations.<sup>12</sup>

### Conclusions

The disorder suffered by our patient was initially more phenotypically similar to EIEE than to BFNE, but his clinical course was more consistent with the latter. Therefore, we propose that the variant in the *CACNA1G* gene has acted as a modulator of the epilepsy in our patient, as has previously been demonstrated in mice.

The mutation in *SCN2A* gene identified in the patient presented here has not previously been described as clearly pathogenic. Further, even though the significance of the variant in *CACNA1G* in our patient is not fully understood, this variant does appear to be acting as a modulator of the clinical course in our patient. For the first time, our case illustrates and supports that the modulating effect seen in mice also occurs in humans. In the future, we believe that our case may lead to more effective treatments of a devastating disease.

**Funding**  
None.

**Conflict of Interest**  
None declared.

### References

- 1 Vasudevan C, Levene M. Epidemiology and aetiology of neonatal seizures. *Semin Fetal Neonatal Med* 2013;18(04):185–191
- 2 Shellhaas RA, Wusthoff CJ, Tsuchida TN, et al; Neonatal Seizure Registry. Profile of neonatal epilepsies: characteristics of a prospective US cohort. *Neurology* 2017;89(09):893–899
- 3 Sanders SJ, Campbell AJ, Cottrell JR, et al. Progress in understanding and treating *SCN2A*-mediated disorders. *Trends Neurosci* 2018;41(07):442–456
- 4 Mantegazza M, Curia G, Biagini G, Ragsdale DS, Avoli M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 2010;9(04):413–424
- 5 Ogiwara I, Ito K, Sawaiishi Y, et al. De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene *SCN2A* in intractable epilepsies. *Neurology* 2009;73(13):1046–1053
- 6 Howell KB, McMahon JM, Carvill GL, et al. *SCN2A* encephalopathy: a major cause of epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Neurology* 2015;85(11):958–966

- 7 Leppert M, Novel K. Novel K<sup>+</sup> channel genes in benign familial neonatal convulsions. *Epilepsia* 2000;41(08):1066–1067
- 8 Oliva M, Berkovic SF, Petrou S. Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. *Epilepsia* 2012;53(11):1849–1859
- 9 Holmes GL. Classification of seizures and the epilepsies. In: Schachter SC, Schomer DL, eds. *The Comprehensive Evaluation and Treatment of Epilepsy*. San Diego, CA: Academic Press; 1997:1–36
- 10 Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 1998;391(6670):896–900
- 11 Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, et al. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol Brain* 2015;8(01):89
- 12 Bergren SK, Chen S, Galecki A, Kearney JA. Genetic modifiers affecting severity of epilepsy caused by mutation of sodium channel Scn2a. *Mamm Genome* 2005;16(09):683–690
- 13 Kim D, Song I, Keum S, et al. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking  $\alpha(1G)$  T-type Ca(2<sup>+</sup>) channels. *Neuron* 2001;31(01):35–45
- 14 Ernst WL, Zhang Y, Yoo JW, Ernst SJ, Noebels JL. Genetic enhancement of thalamocortical network activity by elevating  $\alpha$ 1g-mediated low-voltage-activated calcium current induces pure absence epilepsy. *J Neurosci* 2009;29(06):1615–1625
- 15 Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(05):405–424
- 16 Calhoun JD, Hawkins NA, Zachwieja NJ, Kearney JA. Cacna1g is a genetic modifier of epilepsy caused by mutation of voltage-gated sodium channel Scn2a. *Epilepsia* 2016;57(06):e103–e107
- 17 Chemin J, Siquier-Pernet K, Nicouveau M, et al. De novo mutation screening in childhood-onset cerebellar atrophy identifies gain-of-function mutations in the CACNA1G calcium channel gene. *Brain* 2018;141(07):1998–2013
- 18 Wolff M, Johannesen KM, Hedrich UBS, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. *Brain* 2017;140(05):1316–1336