

# APLICACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS EN PEDIATRÍA

Impacto en el estudio de las Rasopatías y las Enfermedades Neuromusculares

---

*9 de octubre de 2019*

**Luis Pablo Gravina**

*Laboratorio de Biología Molecular-Servicio de Genética  
Coordinación de Laboratorio*

# Plataforma NGS. Aumento de la capacidad diagnóstica

**Patologías con  
fenotipos similares  
y heterogeneidad  
genética**

**Secuenciación  
de genes  
grandes**

	Pre NGS	Post NGS
<b>Rasopatías</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secuenciación parcial de <b>4 genes</b> de la <b>vía RAS-MAPK</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secuenciación completa de la región codificante de los <b>18 genes</b> de la vía</li> </ul>
<b>Enfermedades Neuromusculares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patologías específicas (<b>5 genes</b>):</li> <li>• <i>Distrofia Muscular de Duchenne</i></li> <li>• <i>Atrofia Muscular Espinal</i></li> <li>• <i>Distrofia Miotónica</i></li> <li>• <i>Charcot-Marie-Tooth</i></li> <li>• <i>Ataxia de Fredreich</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>80 genes</b> nuevos para 3 grupos de patologías:</li> <li>• <i>Miopatías congénitas</i></li> <li>• <i>Distrofias musculares</i></li> <li>• <i>Síndromes miasténicos congénitos</i></li> </ul>
<b>Fibrosis Quística</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>50 mutaciones</b> en el <b>gen CFTR</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Secuenciación</b> de la región codificante y ciertas regiones intrónicas del <b>gen CFTR</b></li> </ul>
<b>Distrofia Muscular de Duchenne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Deleciones/duplicaciones</b> en el <b>gen DMD</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Secuenciación</b> completa de la región codificante del <b>gen DMD</b></li> </ul>

# Impacto en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento



- Capacidad Pre-NGS
- Capacidad NGS-Amplicones
- Capacidad NGS-Captura

## Estudios moleculares. Para qué?

- Confirmar el diagnóstico clínico
- Asesoramiento Genético
- Pronóstico
- Selección de tratamiento
- Incorporación a protocolos dirigidos a corregir el defecto genético

# RASopatías

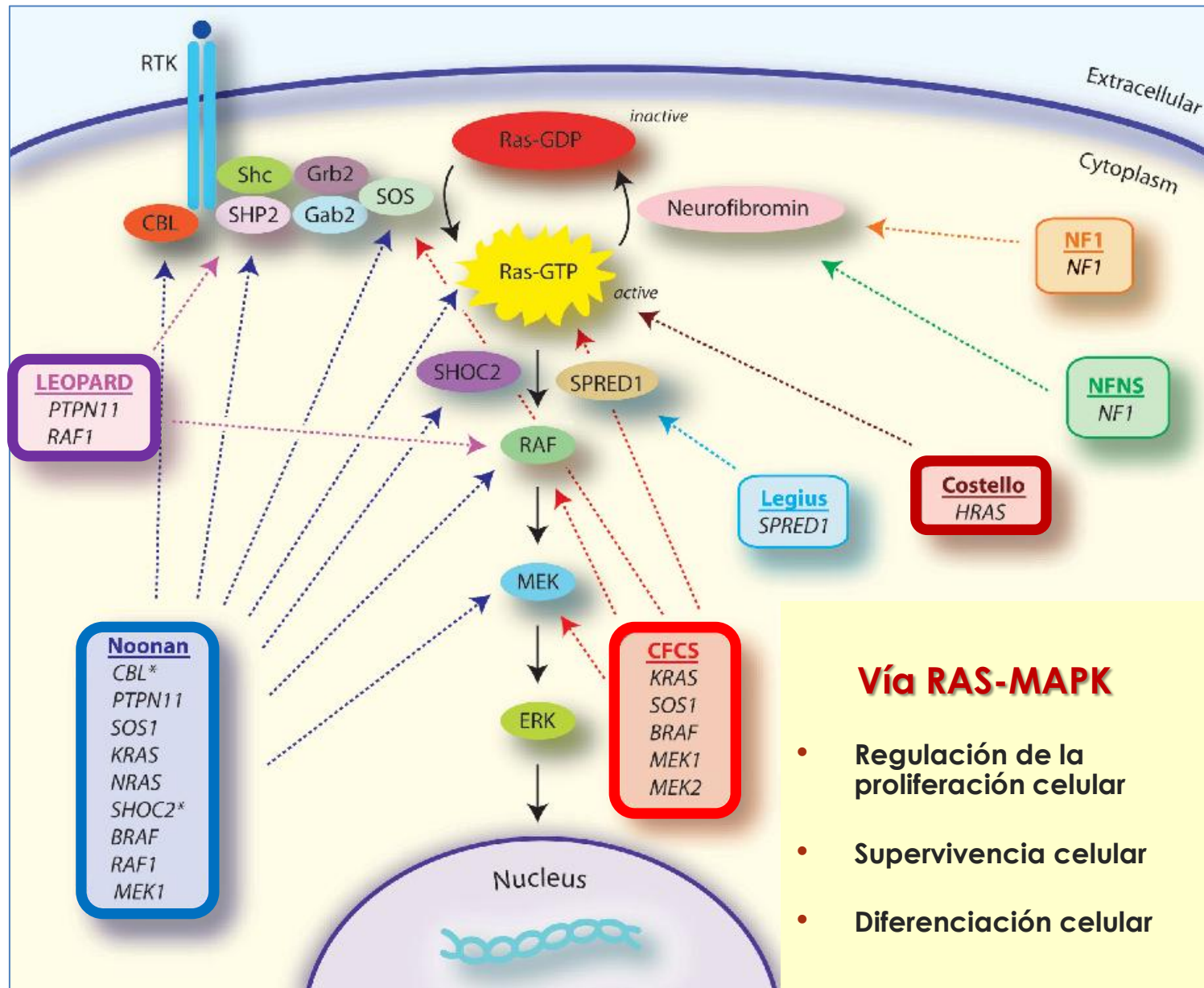
Conjunto de síndromes fenotípicamente superpuestos

- Causados por mutaciones *missense* en genes de la vía de señalización intracelular RAS-MAPK
- Síndrome de Noonan (incidencia 1/2000-1/2500)
- Síndrome de Noonan con múltiples lentigos (LEOPARD)
- Síndrome Cardio-Facio-Cutáneo
- Síndrome de Costello
  - ✓ Baja talla
  - ✓ Dismorfias craneofaciales
  - ✓ Cardiopatía congénita
  - ✓ Manifestaciones ectodérmicas
  - ✓ Mayor riesgo de cáncer
- Herencia autosómica dominante
- Genéticamente Heterogéneos

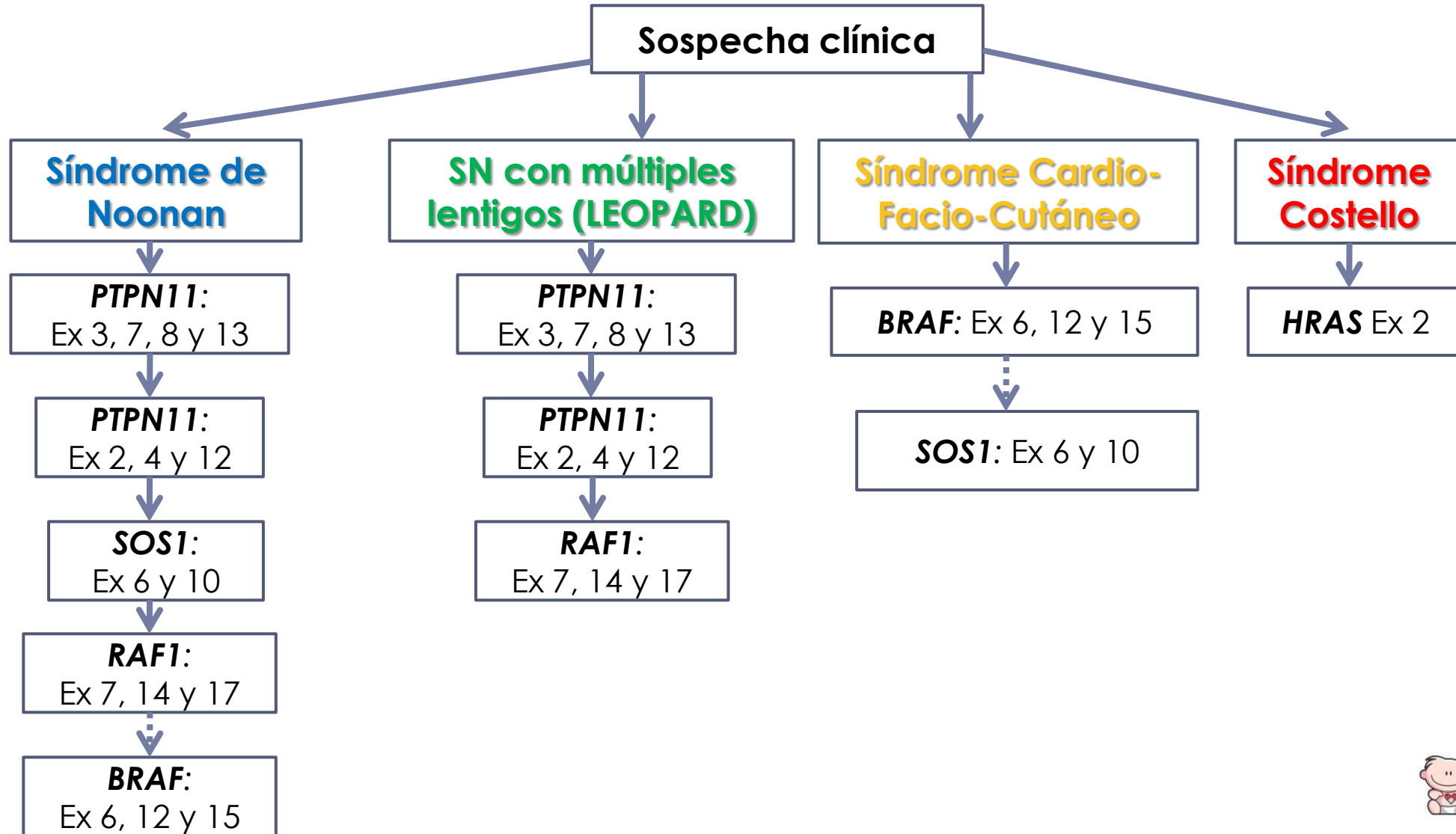
*Superposición de características clínicas + expresión variable*



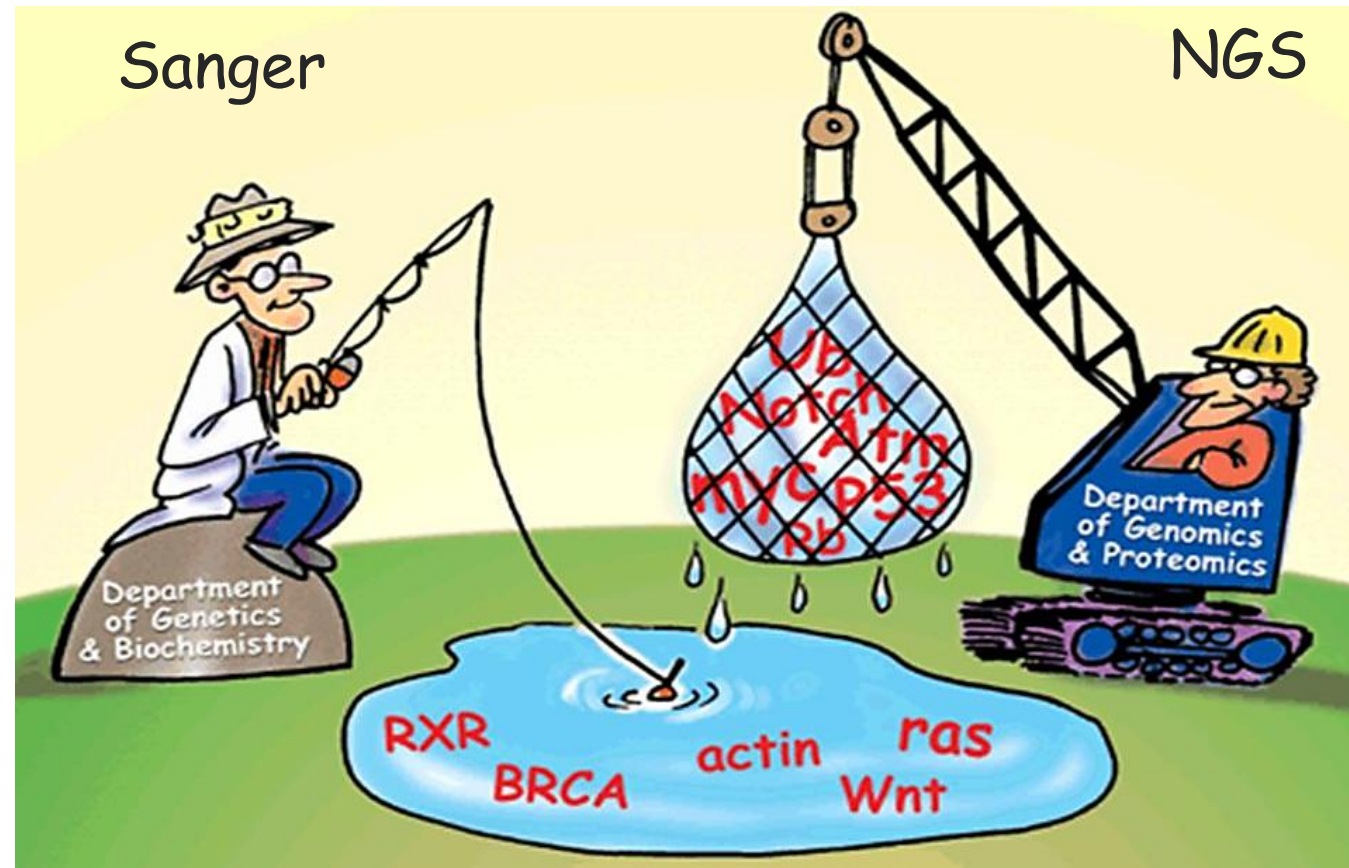
*Estudio molecular  
(diagnóstico preciso)*



# Rasopatías: estrategia diagnóstica por secuenciación Sanger

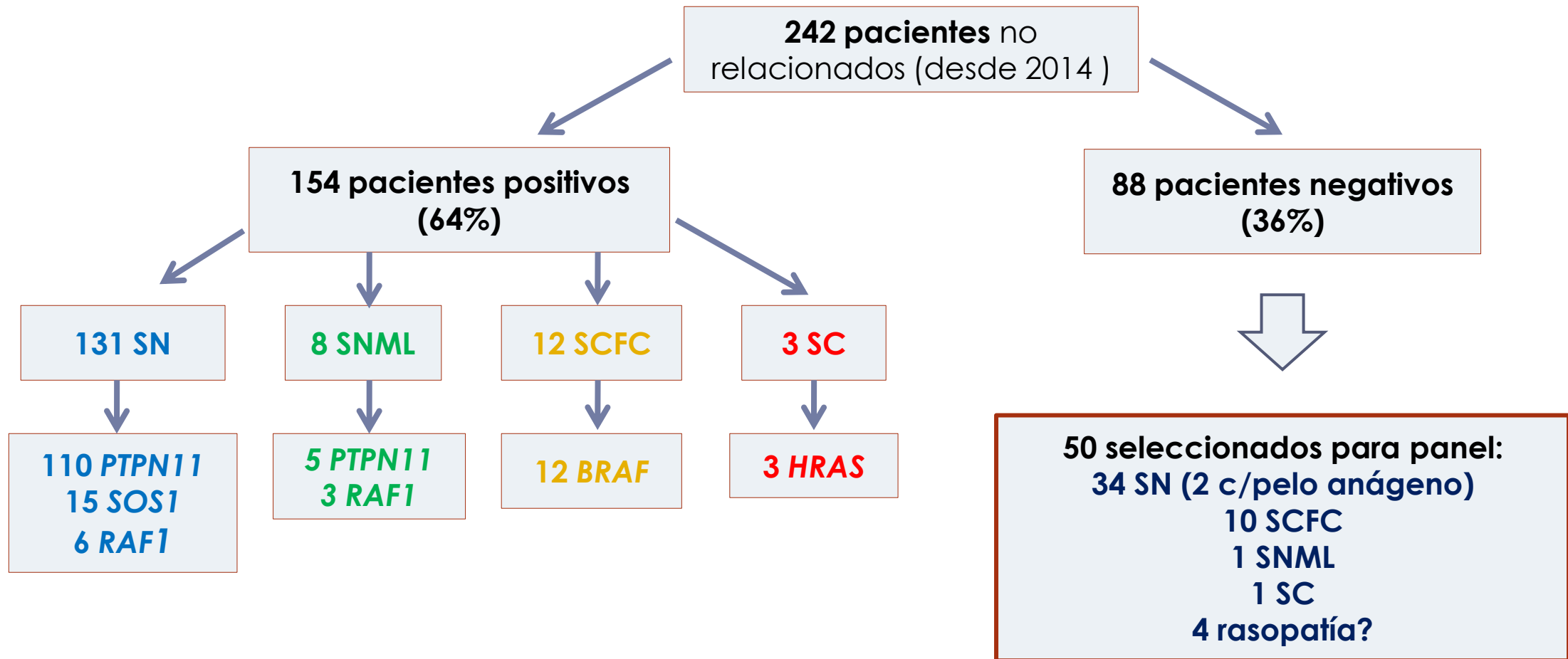


# Secuenciación tradicional de Sanger vs NGS



<https://www.chem.purdue.edu/people/faculty/Images/Tao%20proteomics-cartoon.jpg>

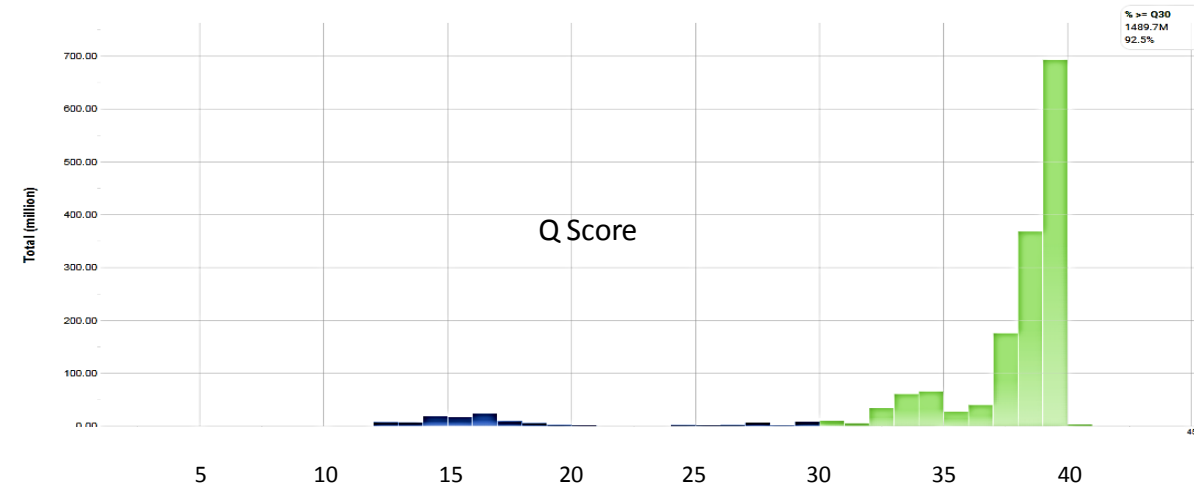
# Rasopatías: Eficiencia diagnóstica por Sanger y pacientes para panel





# Diagnóstico molecular de Rasopatías por NGS

- ▶ **Panel inicial (45 genes):** RASopatías, Neuromuscular, Fibrosis Quística
- ▶ **15 genes para RASopatías:** *PTPN11, SOS1, BRAF, RAF1, KRAS, NRAS, HRAS, SHOC2, MAP2K1, MAP2K2, CBL, RIT1, RRAS, SOS2* y *LZTR1*
- ▶ **Técnica de enriquecimiento:** Amplicones (TSCA-Illumina)
- ▶ **Secuenciación:** Kit v2 micro (300 ciclos)
  
- ▶ **Panel actual (110 genes):** RASopatías, Neuromuscular
- ▶ **18 genes para RASopatías:** *PTPN11, SOS1, BRAF, RAF1, KRAS, NRAS, HRAS, SHOC2, MAP2K1, MAP2K2, CBL, RIT1, RRAS, SOS2, LZTR1, PPP1CB, RASA2* y *A2ML1*
- ▶ **Técnica de enriquecimiento:** Captura (Sure Select- Agilent)
- ▶ **Secuenciación:** Kit v2 standard (300 ciclos)



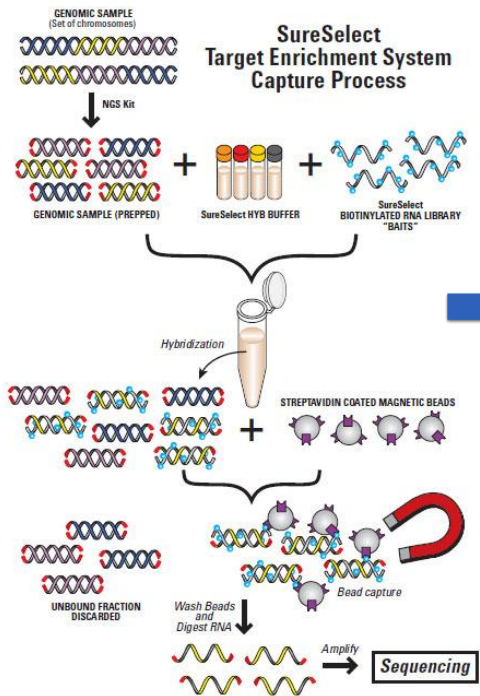
Nº Corrida	> Q30 (%)	Densidad de clusters (K/mm2)	Output (megabits)
1	94.6	722	1239
2	78.8	753	1012
3	92.5	967	1489
4	96.8	706	4282
5	94.7	1389	3420

**Q30:** probabilidad de asignar una base de manera incorrecta, 1 error/1000 bases

**Genética clínica :** Victoria Huckstadt - Gabriela Obregón  
**Biología Molecular - Genética:** Josefina Chinton - Pablo Gravina  
**Genómica/Bioinformática:** Gabriel Veneruzzo - Francisco García

# Etapas del proceso de NGS

## Preparación de las bibliotecas



## Secuenciación masiva en paralelo



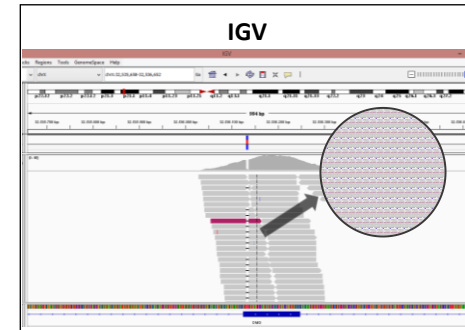
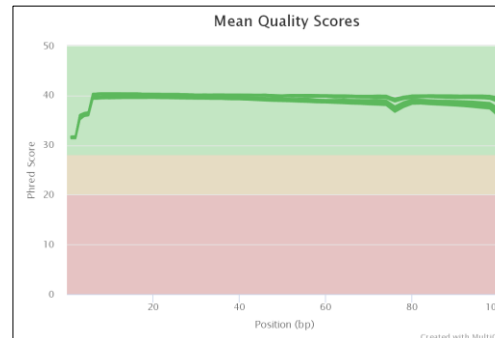
## Análisis Bioinformático

**Análisis primario de la secuenciación**  
Output: .fastq

**Mapeo y alineamiento**  
Output: .bam

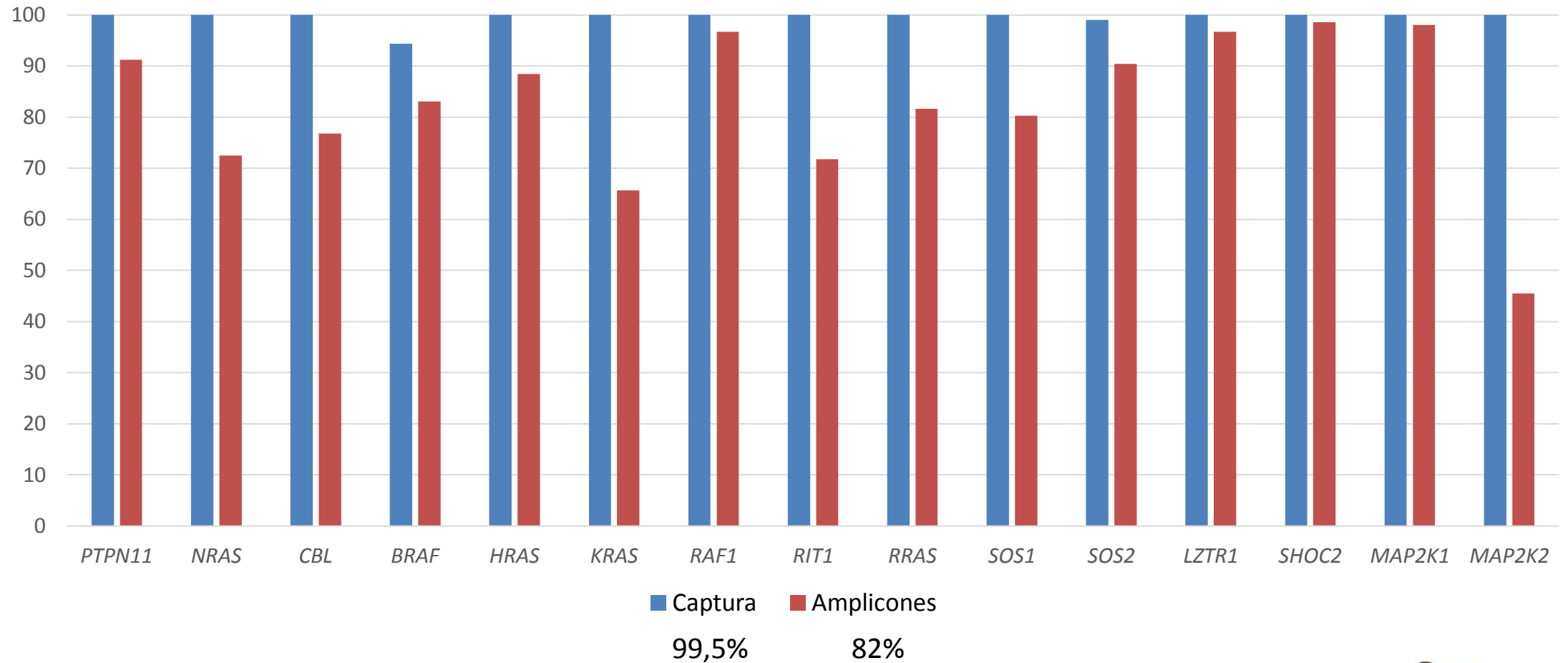
**Llamado de variantes**  
Output: .vcf

**Interpretación funcional de las variantes**

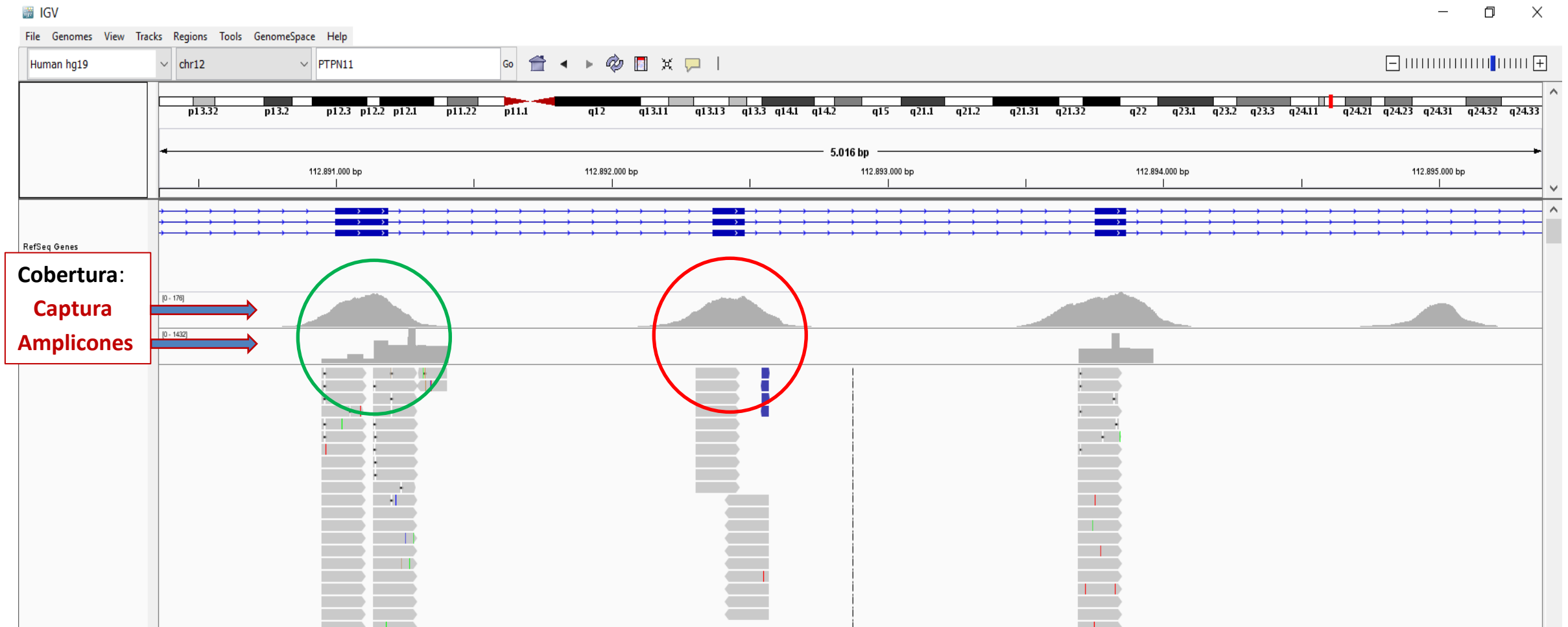


filtrado y priorización

# Cobertura > 20X (amplicones vs captura)



# Cobertura: amplicones vs captura



Captura: mejor cobertura y mayor homogeneidad

## Análisis Bioinformático

- Procesamiento QC
- Alineamiento
- Llamado de Variantes
- Anotación funcional

VCF



Filtrado de variantes

- Variantes repetidas en todas las muestras (Irrelevantes)
- QC: Pass
- Profundidad  $\geq 20$  lecturas
- Calidad Genotipo (GQ)  $\geq 99$
- QUAL  $\geq 300.00$
- Frecuencia población gral  $\leq 0.01$
- Genes: panel de rasopatías
- Consecuencia: impacto potencial: high, moderate

## B PLATFORM

CASOS PANEL DE GENES

Ordenar por Efecto

Chr:posición	Gen	Cambio	Efecto	Impacto	Frecuencia	Evidencia	Información de muestras
chr10:112724120	SHOC2	A -> G p.Ser2Gly	missense variant	Moderado		rs267607048: dbSNP   Ensembl Pop.   Uniprot   ClinVar ⚠ ExAC   M.Taster ⚠	In samples: GMG DP: 245/510   Freq: 1/1 Het: 1   Hom: 0

### Daño potencial

CLNSIG	5 - Pathogenic
SIFT	--
Polyphen	possibly damaging (0.827)
CADD_1000G	--
VEST3	0.817
Mutation Taster	disease_causing (0.999999)

Source: dbNSFP version 2.9

### ClinVar

ClinVar Search ClinVar for gene symbols, HGVS expressions, c  
Advanced

Home About Access Help Submit Statistics FTP

NEW Click here to see the new Variation Report design!

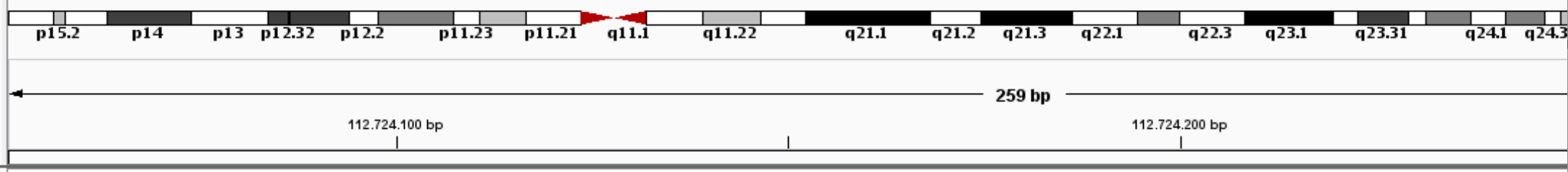
### NM\_007373.3(SHOC2):c.4A>G (p.Ser2Gly)

Variation ID: 6821  
Review status: reviewed by expert panel

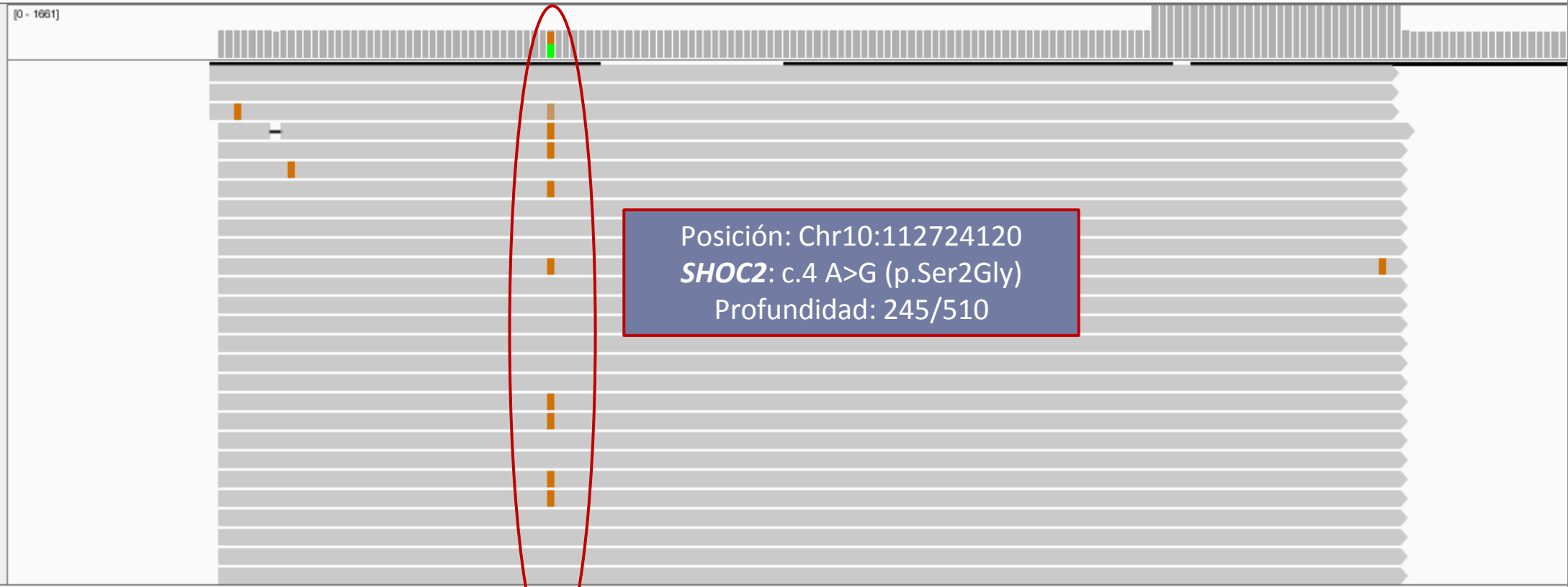
### Interpretation

Clinical significance: Pathogenic  
Last evaluated: Apr 3, 2017  
Number of submission(s): 17  
Condition(s):

- Noonan syndrome 3 [MedGen - OMIM]
- Noonan syndrome-like disorder with loose anagen hair 1 [MedGen - OMIM]
- Noonan syndrome [MeSH - MedGen - Orphanet - OMIM]
- Rasopathy [MedGen - Orphanet]



GMG\_bqsr.bam Coverage  
GMG\_bqsr.bam  
Sequence  
RefSeq Genes



Posición: Chr10:112724120  
*SHOC2*: c.4 A>G (p.Ser2Gly)  
Profundidad: 245/510

SHOC2

# Variantes detectadas por NGS confirmadas por Sanger

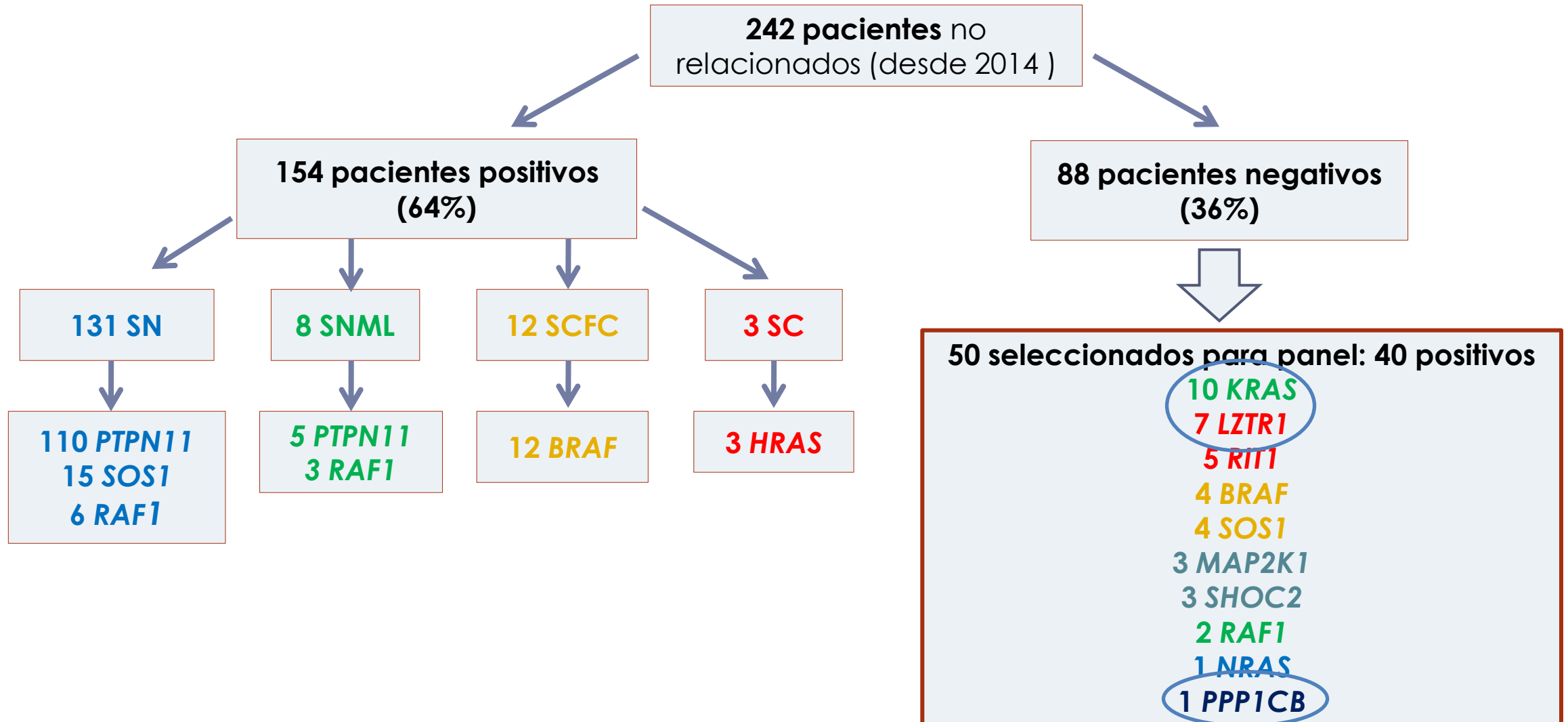
Muestra	Genes estudiados previamente	Diagnóstico	Variante encontrada	Clasificación
SN 242	<i>PTPN11 RAF1 SOS1</i>	Rasopatía	<b>BRAF</b> : c.1391G>C (p.Gly464Ala)	Probablemente patogénica
SN 181	<i>PTPN11, SOS1, RAF1</i>	SN	<b>BRAF</b> : c.1574T>C(p.Leu525Pro)	Patogénica/Prob.patogénica
SN 170	<i>PTPN11, SOS1</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.65A>G (p.Gln22Arg)	Patogénica
SN 103	<i>PTPN11, SOS1, RAF1, BRAF</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.101C>A (p.Pro34Gln)	Patogénica
SN 165	<i>PTPN11, SOS1</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.13A>G (p.Lys5Glu)	Patogénica/Prob.patogénica
SN 245	<i>PTPN11 RAF1 SOS1</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.175G>T (p.Ala59Ser)	Probable. patogénica
SN 189	<i>PTPN11, SOS1</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.40G>A (p.Val14Ile)	Patogénica
SN 199	<i>PTPN11</i>	SN	<b>LZTR1</b> : c.2245T>C (p.Tyr749His)	Novel/Prob. patogen.
SN 263	<i>PTPN11 SOS1 KRAS RIT1 RAF1</i>	SN	<b>LZTR1</b> : c.742G>A (p.Gly248Arg)	Patogénica/Prob.patogénica
SN 271	<i>PTPN11 SOS1</i>	SN	<b>RAF1</b> : c.770C>T (p.Ser257Leu)	Patogénica
SN 276	<i>HRAS MAP2K1 SOS1 PTPN11</i>	CFC?	<b>RAF1</b> : c.770C>T (p.Ser257Leu)	Patogénica
SN 180	<i>PTPN11, SOS1</i>	SN	<b>RIT1</b> : c.170C>G (p.Ala57Gly)	Patogénica
SN 184	<i>PTPN11, SOS1</i>	SN	<b>RIT1</b> : c.170C>G (p.Ala57Gly)	Patogénica
SN 40	<i>PTPN11, SOS1, RAF1, BRAF</i>	SN anagen	<b>SHOC2</b> : c.4 A>G (p.Ser2Gly)	Patogénica
SN 272	<i>SOS1 BRAF KRAS PTPN11</i>	Rasopatía	<b>SHOC2</b> : c.517A>G (p.Met173Val)	Probablemente patogénica
SN 197	<i>PTPN11</i>	SN	<b>SOS1</b> : c.1655G>A (p.Arg552Lys)	Patogénica
SN 168	<i>PTPN11</i>	SCFC	<b>SOS1</b> : c.806 T>C (p.Met269Thr)	Patogénica
SN 190	<i>BRAF</i>	SCFC	<b>MAP2K1</b> : c.389A>G (p.Tyr130Cys)	Patogénica
SN 273	<i>PTPN11 BRAF SOS1</i>	Rasopatía	<b>MAP2K1</b> : c.389A>G (p.Tyr130Cys)	Patogénica
SN 269	<i>SOS1 BRAF SHOC2 MAP2K1 KRAS PTPN11</i>	CFC?	<b>PPP1CB</b> : c.146C>G (p.Pro49Arg)	Patogénica

# Variantes detectadas por NGS en el exterior

Muestra	Genes estudiados previamente	Diagnóstico	Variante encontrada	Clasificación
SN 93	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>BRAF</b> : c.1390G>A (p.Gly464Arg)	Patogénica
SN 147	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF HRAS</i>	CFC	<b>BRAF</b> : c.1391G>A (p.Gly464Glu)	Patogen./Prob. Patogen./VUS
SN 41	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.173C>T (p.Thr58Ile)	Patogénica
SN 62	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	CFC	<b>KRAS</b> : c.173C>T (p.Thr58Ile)	Patogénica
SN 63	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.178G>A (p.Gly60Ser)	Patogénica
SN 37	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF HRAS</i>	CFC	<b>KRAS</b> : c.40G>A (p.Val14Ile)	Patogénica
SN 87	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>KRAS</b> : c.40G>A (p.Val14Ile)	Patogénica
SN 47	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>LZTR1</b> : c.360C>A (p.His120Gln)	Novel/Prob. patogen.
SN 84	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>LZTR1</b> : c.742G>A (p.Gly248Arg)	Patogénica/Prob.patogénica
SN 108	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>LZTR1</b> : c.742G>A (p.Gly248Arg)	Patogénica/Prob.patogénica
SN 132	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>LZTR1</b> : c.742G>A (p.Gly248Arg)	Patogénica/Prob.patogénica
SN 160	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>LZTR1</b> : c.742G>A (p.Gly248Arg)	Patogénica/Prob.patogénica
SN 100	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>RIT1</b> : c.170C>G (p.Ala57Gly)	Patogénica
SN 113	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>RIT1</b> : c.170C>G (p.Ala57Gly)	Patogénica
SN 142	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>RIT1</b> : c.229G>A (p.Ala77Thr)	Patogénica
SN 79	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>SOS1</b> : c.2207T>G (p.Ile736Arg)	Probablemente patogénica
SN78	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>SOS1</b> : c.2536G>A (p.Glu846Lys)	Patogénica
SN 97	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	CFC	<b>MAP2K1</b> : c.389A>G (p.Tyr130Cys)	Patogénica
SN 129	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN Anagen	<b>SHOC2</b> : c.4 A>G (p.Ser2Gly)	Patogénica
SN53	<i>PTPN11 SOS1 RAF1 BRAF</i>	SN	<b>NRAS</b> : c.179G>A (p.Gly60Glu)	Patogénica



# Pacientes positivos con el panel de NGS



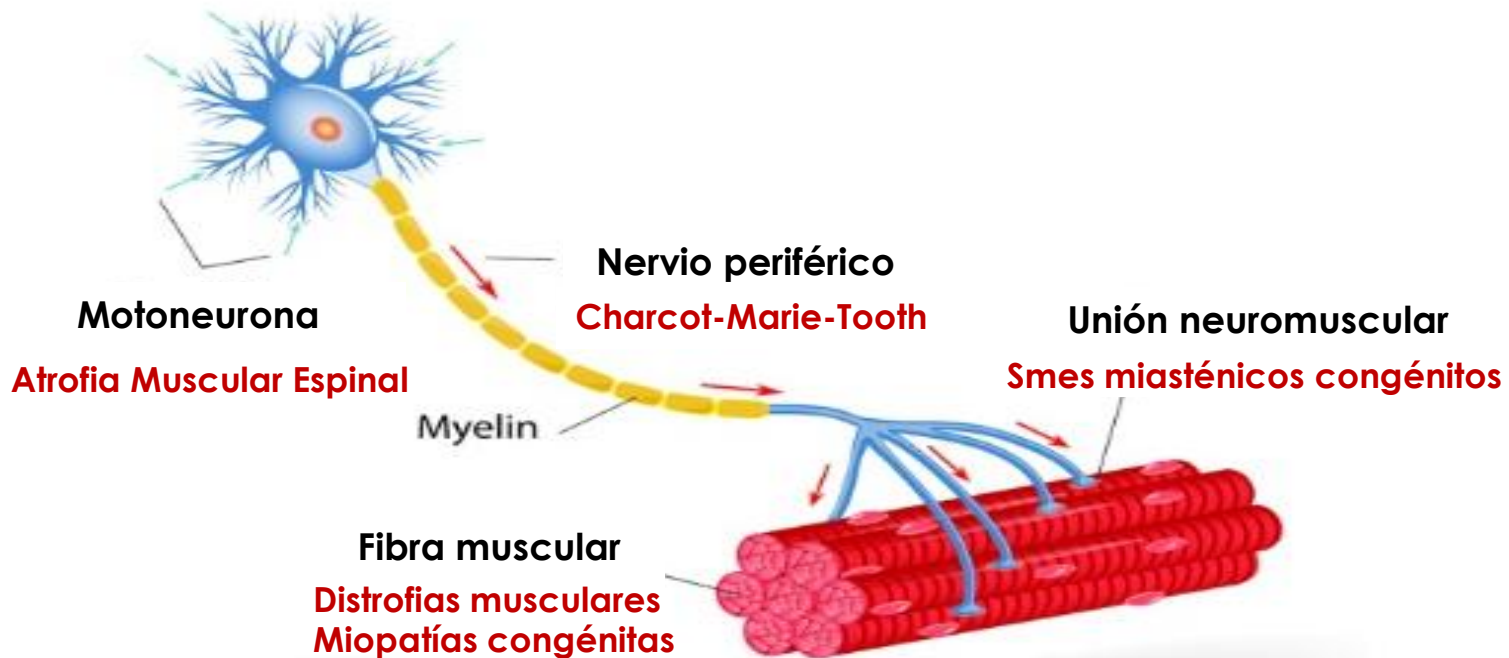
# Conclusiones Panel de Rasopatías

La incorporación del panel en el diagnóstico molecular permitió:

- **Diagnosticar 40/50 pacientes (80%)** que habían resultado negativos por estudios previos
- Detectar mutaciones en **10 genes de la vía RAS-MAPK** que no se secuenciaban previamente (**KRAS** y **LZTR1**, los más frecuentes)
- Determinar la **prevalencia** de mutaciones en los **genes de la vía RAS-MAPK** en nuestra población
- Identificar la causa en **3 síndromes** (Noonan, Cardio-Facio-Cutáneo y Noonan c/pelo anágeno)
- Detectar **dos variantes nuevas en el gen LZTR1** probablemente patogénicas
- **Aumentar la sensibilidad** del diagnóstico molecular en **un 29%** (del **64%** previo por secuenciación **Sanger** a un **93%** sumando **NGS**)

# Enfermedades Neuromusculares

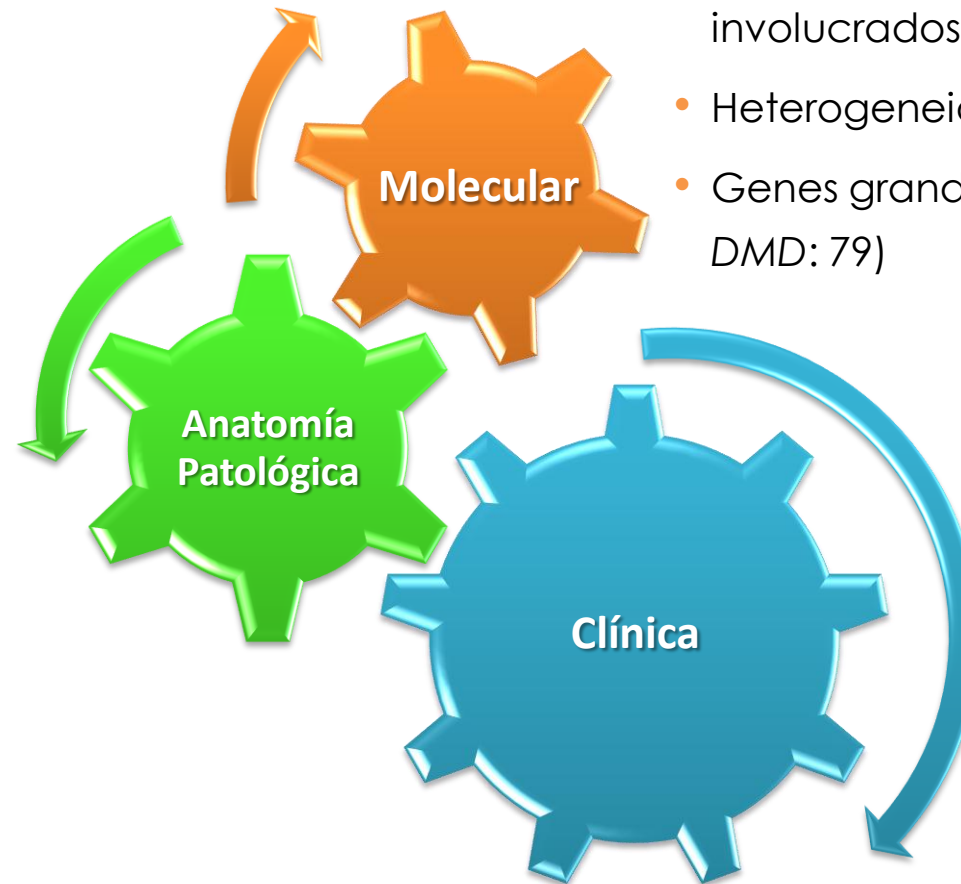
Causadas por anomalía en cualquiera de los componentes de la unidad motora



- Mayoría de origen genético
- Prevalencia <math>< 5/10.000</math> habitantes
- > 900 ENM descritas, > 500 genes
- ✓ Signo clínico principal: **debilidad muscular**
- ✓ **Presentación variable**: neonatales severas a leves del adulto
- ✓ Evolución **crónica y progresiva**
- ✓ Compromiso **respiratorio, cardíaco, osteo-articular y psicosocial**
- ✓ **Sobrevida**: relacionada al **subtipo de ENM** y al **cuidado de sus comorbilidades**

# El diagnóstico de las Enfermedades Neuromusculares

- Superposición de patrones morfológicos
- Hallazgos inespecíficos



- Heterogeneidad genética (más de 500 genes involucrados)
- Heterogeneidad clínica (un gen para varios fenotipos)
- Genes grandes (*TTN*: 363 exones, *NEB*: 183, *RYR1*: 106, *DMD*: 79)

- Muchos tipos diferentes de ENMs
- Características clínicas compartidas :
  - ✓ Retraso del desarrollo motor
  - ✓ Hipotonía
  - ✓ Debilidad

# Panel de Enfermedades Neuromusculares

## Miopatías congénitas

Panel 1	Panel 2: +
<i>ACTA1</i>	<i>BIN1</i>
<i>FHL1</i>	<i>CACNA1S</i>
<i>DES</i>	<i>CCDC78</i>
<i>DNM2</i>	<i>CFL2</i>
<i>MTM1</i>	<i>KBTBD13</i>
<i>NEB</i>	<i>KLHL40</i>
<i>RYR1</i>	<i>KLHL41</i>
<i>SEPN1</i>	<i>LMOD3</i>
<i>TPM2</i>	<i>MEGF10</i>
<i>TPM3</i>	<i>MYH2</i>
	<i>MYH7</i>
	<i>MYO18B</i>
	<i>MYPN</i>
	<i>PYROXD1</i>
	<i>SCN4A</i>
	<i>SPEG</i>
	<i>STAC3</i>
	<i>TNNT1</i>
	<i>TTN</i>

## Distrofias musculares

Panel 1	Panel 2: +
<i>CAPN3</i>	<i>ANO5</i>
<i>COL6A1</i>	<i>B3GALNT2</i>
<i>COL6A2</i>	<i>B4GAT1</i>
<i>COL6A3</i>	<i>CAV3</i>
<i>DMD</i>	<i>DAG1</i>
<i>FKRP</i>	<i>DES</i>
<i>LAMA2</i>	<i>DPM2</i>
<i>LMNA</i>	<i>DYSF</i>
<i>POMGNT1</i>	<i>FKTN</i>
<i>POMT1</i>	<i>GMPPB</i>
<i>POMT2</i>	<i>ISPD</i>
	<i>LARGE</i>
	<i>POMGNT2</i>
	<i>POMK</i>
	<i>SGCA</i>
	<i>SGCB</i>
	<i>SGCD</i>
	<i>SGCG</i>
	<i>TCAP</i>
	<i>TMEM5</i>

## Síndromes miasténicos congénitos

Panel 1	Panel 2: +
<i>CHAT</i>	<i>AGRN</i>
<i>CHRNA1</i>	<i>ALG14</i>
<i>CHRNA1</i>	<i>ALG2</i>
<i>CHRNB1</i>	<i>DOK7</i>
<i>CHRND</i>	<i>DPAGT1</i>
<i>CHRNE</i>	<i>GFPT1</i>
<i>CHRNA1</i>	<i>LAMB2</i>
<i>COLQ</i>	<i>LRP4</i>
<i>MUSK</i>	<i>PLEC</i>
	<i>PREPL</i>
	<i>RAPSN</i>
	<i>SLC5A7</i>
	<i>SYT2</i>

- Filtrar variantes repetidas en todas las muestras (Irrelevantes)
- Filtro por QC:
- Pass
- Profundidad  $\geq 20$
- Calidad Genotipo (GQ)  $\geq 99$
- QUAL  $\geq 300.00$

- Filtrar por frecuencia:
- Frecuencia en GnomAD Exomes  $\leq 0.01$
- Frecuencia en GnomAD Genomes  $\leq 0.01$
- Frecuencia en 1000G  $\leq 0.01$
- Genes: panel de síndromes miasténicos congénitos
- Consecuencia: impacto potencial: high, moderate

**B PLATFORM**

INICIO CASOS PANEL DE GENES

< 190902

CONSULTA AVANZADA 2 variantes 1 gen

Filtros aplicados

Comentarios en: IRRELEVANT Genes en: Neuromuscular 2019-Síndromes miasténicos congénitos QUAL  $\geq 300.00$  Profundidad  $\geq 20$  Frecuencia en ExAC  $\leq 0.01$  Muestras en: A594790 Frecuencia en 1000G  $\leq 0.01$  Frecuencia en GnomAD  $\leq 0.01$  Impacto potencial en: HIGH,MODERATE GQ  $\geq 60.00$

Ordenar por Cr:Pos

	Chr:posición	Gen	Cambio	Impacto/Efecto	ACMG	Frecuencia	Evidencia	Información de muestras
<input type="checkbox"/>	<a href="#">11:47463165</a>	<a href="#">RAPSIN</a>	T -> A c.910A>T p.Lys304*	<b>Alto</b> stop gained	<b>Pathogenic</b> PVS1 PM2 PP3		Source: haplotypeCaller-freebayes-filterInplatypus <a href="#">gnomAD</a>   <a href="#">M.Taster</a>	<b>In samples:</b> A594790 DP: 139/278   Freq: 1/1 Het: 1   Hom: 0 <a href="#">Ver muestras</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">11:47469631</a>	<a href="#">RAPSIN</a>	G -> T c.264C>A p.Asn88Lys	<b>Moderado</b> missense variant	<b>Likely pathogenic</b> PM1 PM2 PP3 PP5	ExAC:0.0016 (ExAC-hom:0) TGP:0.0012	Source: haplotypeCaller-freebayes-platypus rs104894299: <a href="#">dbSNP</a>   <a href="#">Clinvar</a> <a href="#">gnomAD</a>   <a href="#">M.Taster</a>	<b>In samples:</b> A594790 DP: 151/307   Freq: 1/1 Het: 1   Hom: 0 <a href="#">Ver muestras</a>

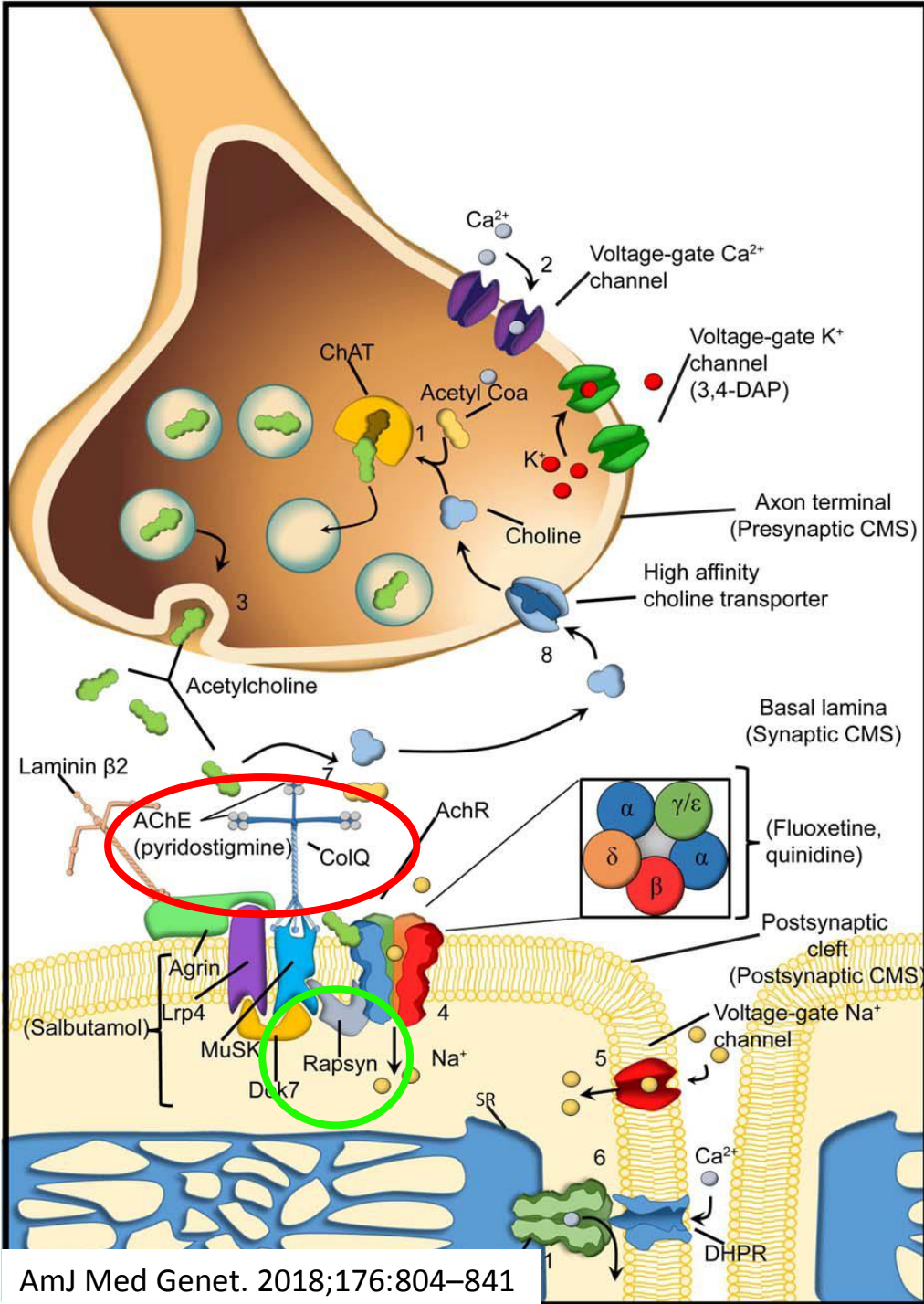
Resultados por página 25

Páginas totales: 1

# Variantes detectadas por NGS confirmadas por Sanger

Muestra	Diagnóstico	Gen	Variante encontrada	Efecto	Clasificación	Profundidad	Calidad
JPS	Síndrome Miasténico Congénito	<b>COLQ</b>	c.157dupC (p.Leu53Profs*81) Homocigota	<i>Frameshift</i>	Patogénica	318/318	13784
LKN	Síndrome Miasténico Congénito	<b>CHRNB1</b>	c.995T>G (p.Leu332Arg)	<i>Missense</i>	VUS	240/494	4932
		<b>CHRNB1</b>	c.727C>T (p.Arg243Cys)	<i>Missense</i>	Patogénica	148/262	4012
GBF	Síndrome Miasténico Congénito	<b>RAPSN</b>	c.737C>T (p.Ala246Val)	<i>Missense</i>	Patogénica	125/256	2.683
		<b>RAPSN</b>	c.264C>A (p.Asn88Lys)	<i>Missense</i>	Patogénica	147/310	3.346
JSE	Síndrome Miasténico Congénito	<b>RAPSN</b>	c.910A>T (p.Lys304*)	<i>Nonsense</i>	Novel	139/278	3.158
		<b>RAPSN</b>	c.264C>A (p.Asn88Lys)	<i>Missense</i>	Patogénica	151/307	3.402
HF	Miopatía Congénita	<b>RYR1</b>	c.14582G>A (p.Arg4861His)	<i>Missense</i>	Patogénica	355/661	6501
SMI	Miopatía Congénita	<b>RYR1</b>	c.5989G>A (p.Glu1997Lys)	<i>Missense</i>	VUS	278/829	7183
SMY	Miopatía Congénita	<b>RYR1</b>	c.325C>T (p.Arg109Trp)	<i>Missense</i>	Patogénica	194/372	4388
FLN	Miopatía Congénita	<b>ACTA1</b>	c.402G>A (p.Met134Ile)	<i>Missense</i>	Prob. Patog.	112/250	2397
AJJ	Miopatía Congénita	<b>MYO18B</b>	c.4345G>A (p.Asp1449Asn)	<i>Missense</i>	VUS	200/429	4.524
		<b>MYO18B</b>	c.5614A>G (p.Met1872Val)	<i>Missense</i>	VUS	181/399	3.704
TRT	Distrofinopatía	<b>DMD</b>	c.3039_3043delAATTA (p.Ile1014Profs*8)	<i>Frameshift</i>	Novel	344/344	15439

# Tratamiento de los Síndromes miasténicos congénitos



AmJ Med Genet. 2018;176:804–841

**Table 1**

**Treatment of some of the more common congenital myasthenic syndromes**

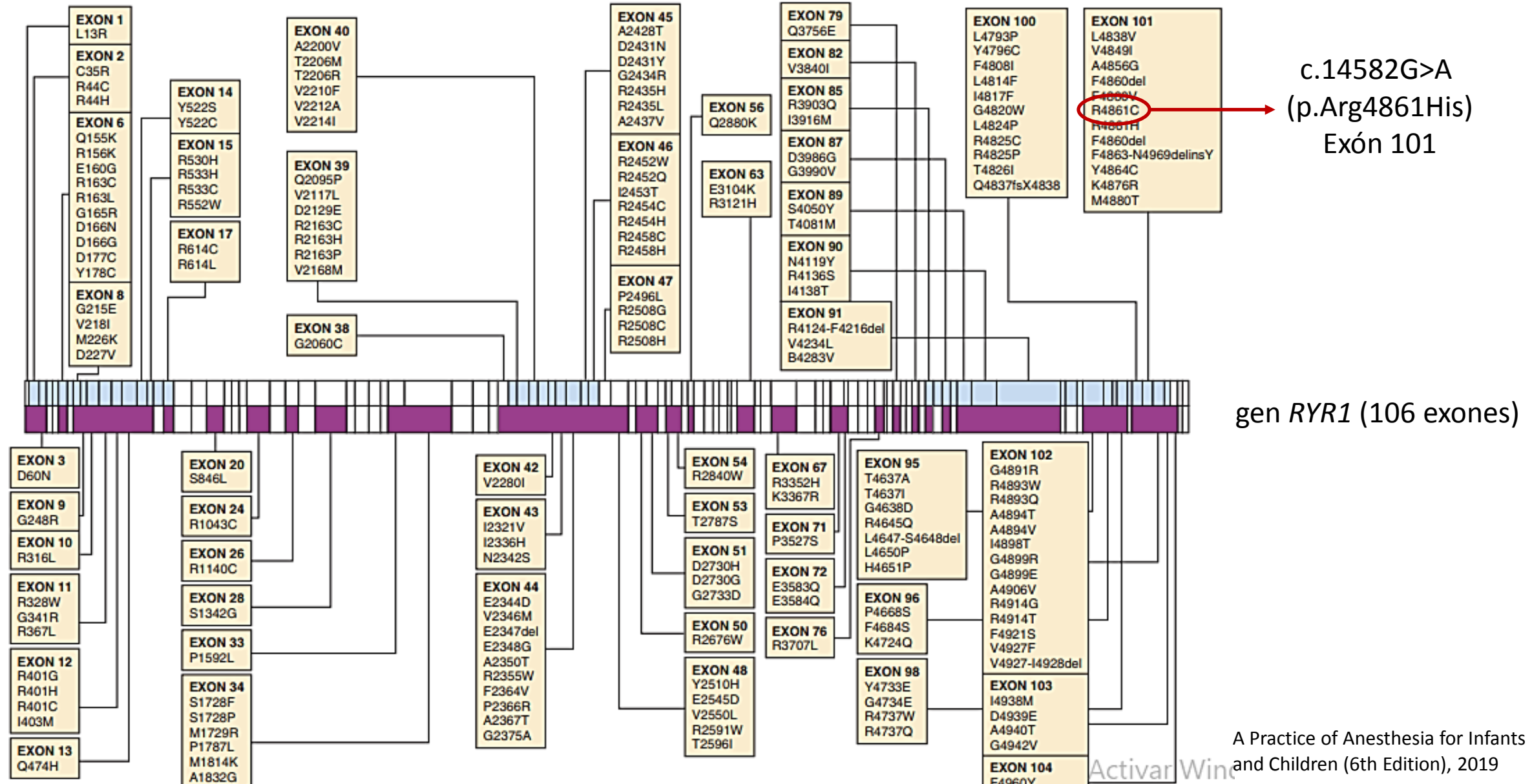
Location	Syndrome	Inheritance	Treatment	Comments
Presynaptic	ChAT	Recessive	AChE inhibitor	Consider ventilator & apnea monitor
Synaptic	ColQ	Recessive	$\beta$ -Agonist	AChE inhibitors contraindicated
Postsynaptic	AChR deficiency	Recessive	AChE inhibitor, 3,4-DAP	Consider $\beta$ -agonist
	Slow channel	Dominant	Fluoxetine, quinidine	AChE inhibitors contraindicated
	Fast channel	Recessive	AChE inhibitor, 3,4-DAP	
	Dok-7	Recessive	$\beta$ -Agonist	AChE inhibitors contraindicated
	Rapsyn	Recessive	AChE inhibitor, 3,4-DAP	Consider $\beta$ -agonist
	GFPT1	Recessive	AChE inhibitor, 3,4-DAP	

AChEI: Piridostigmina

$\beta$ - Agonista: Salbutamol



# Distribución de mutaciones en el gen *RYR1* asociadas con hipertermia maligna y central core disease



# Conclusiones Panel de Enfermedades Neuromusculares

- Se detectaron **14 variantes potencialmente patogénicas** que fueron confirmadas por Sanger
- En **10/25 pacientes** se encontró alguna **alteración molecular** asociada a la patología en estudio
- En un paciente con SMC se detectó una **mutación en el gen COLQ que modificó la conducta terapéutica.**
- En un paciente con MC se detectó una **mutación en el gen RYR1** que permitió confirmar el diagnóstico y advertir sobre el riesgo de **susceptibilidad a Hipertermia Maligna.**
- Se identificaron dos **variantes nuevas:** una en el **gen DMD** y otra en el **gen RAPSN.**
- Este estudio por NGS permitió **detectar mutaciones en 7 genes** que no se secuenciaban en nuestro laboratorio y alcanzar el **diagnóstico en 10 pacientes** con **3 enfermedades neuromusculares diferentes.**

# Posibles causas de resultados negativos

- Cobertura insuficiente de algunos genes
- Genes no incluidos en el panel
- Genes desconocidos
- Mutaciones intrónicas profundas

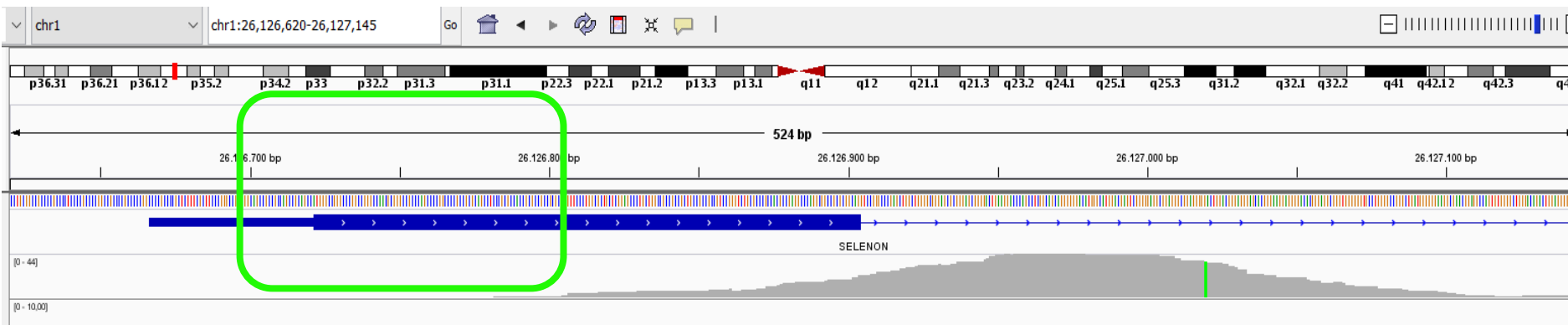


c.832-186T>G (gen *DMD*) Mutación intrónica profunda no detectada por NGS

*Un tercio de los pacientes con miopatías congénitas permanecen negativos (Neurology. 2015 Jan 6;84(1):28-35)*

# Regiones de baja cobertura

**Alto contenido de GC**



# Conclusiones y Desafíos

NGS resultó una herramienta muy útil en el diagnóstico molecular de pacientes con estudios negativos previos

**ALTA EFICIENCIA DIAGNÓSTICA: 92/124 pacientes diagnosticados (74%)**

- Rasopatías: 40/50 (80%)
- Enf. Neuromusculares: 10/25 (40%)
- Fibrosis Quística: 28/34 (82%)
- Distrofia Muscular de Duchenne: 14/15 (93%)

- **COBERTURA DE LOS GENES** (con tecnología de captura mejora significativamente)
- **VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO (VUS)** (revisar periódicamente bases de datos y conseguir más evidencia)
- **COMPARTIR VARIANTES** (en bases de datos nacionales e internacionales)
- **DESARROLLAR ESTUDIOS FUNCIONALES** (propios o en colaboración)
- **MUTACIONES INTRONICAS PROFUNDAS** (estudios de ARN)
- **ALGORITMOS CONFIABLES PARA DETECCIÓN DE CNVS** (desarrollo bioinformático)
- **PACIENTES QUE PERMANECEN NEGATIVOS** (posibilidad de realizar exomas o derivar a otros centros)
- **IMPOSIBILIDAD DE SER EXPERTOS EN TODOS LOS GENES** (colaboraciones para derivar pacientes)

*Muchas gracias....*



## **Laboratorio de Biología Molecular - Servicio de Genética**



### **Bioquímicos:**

Verónica Aráoz  
Eugenia Foncuberta  
Carolina Crespo  
Josefina Chinton  
Mercedes Pérez



### **Técnicos:**

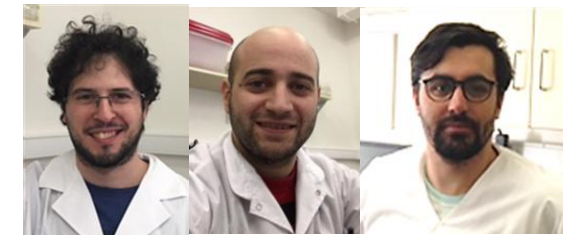
Abel Gómez  
Mara Bonetto



### **Jefe de Clínica:**

Pablo Gravina

## **Laboratorio de Genómica Bioinformática**



Gabriel Veneruzzo  
Matías Juanes  
Francisco García

### **Jefe de Laboratorios Especialidad:**

Lilien Chertkoff / Cristina Alonso



### **Médica Genetista:**

Victoria Huckstadt

### **Jefe de Servicio:**

Gabriela Obregón



### **Neuróloga:**

Soledad Monges

### **Patóloga:**

Fabiana Lubieniecki



# Qué hacemos con las VUS?

<b>Gen <i>CHRNA1</i></b>	<b>c.727C&gt;T p.(Arg243Cys)</b>	<b>c.995T&gt;G p.(Leu332Arg)</b>
Cigosidad	Heterocigota	Heterocigota
Madre	negativo	heterocigota
Padre	negativo	negativo
ExAC	0.00003	0.00003
1000 Genomes	0.00020	-
gnomAD	0.00002	0.00003
BD LOVD	Afecta la función (n=2)	no
ClinVar	Conflicting interpretations of pathogenicity: Pathogenic(1); Uncertain significance(1)	Uncertain significance
UMD-Predictor	Pathogenic	Pathogenic
MUTATION TASTER	disease causing	disease causing
Polyphen	probably damaging (0.99)	probably damaging (0.956)
CADD	26.3	27.5
Búsqueda bibliográfica	publicada	no

# Genetic Variant Interpretation Tool

 Richards, et al. *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants*. 2015.

PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical  $\pm 1$  or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease

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

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

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

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

PP1 (Strong evidence) Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease

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

PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium

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

PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants

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

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

PP1 (Moderate evidence) Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease

PP1 Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease

PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease

PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)

PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology

PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation



## Genetic Variant Interpretation Tool

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

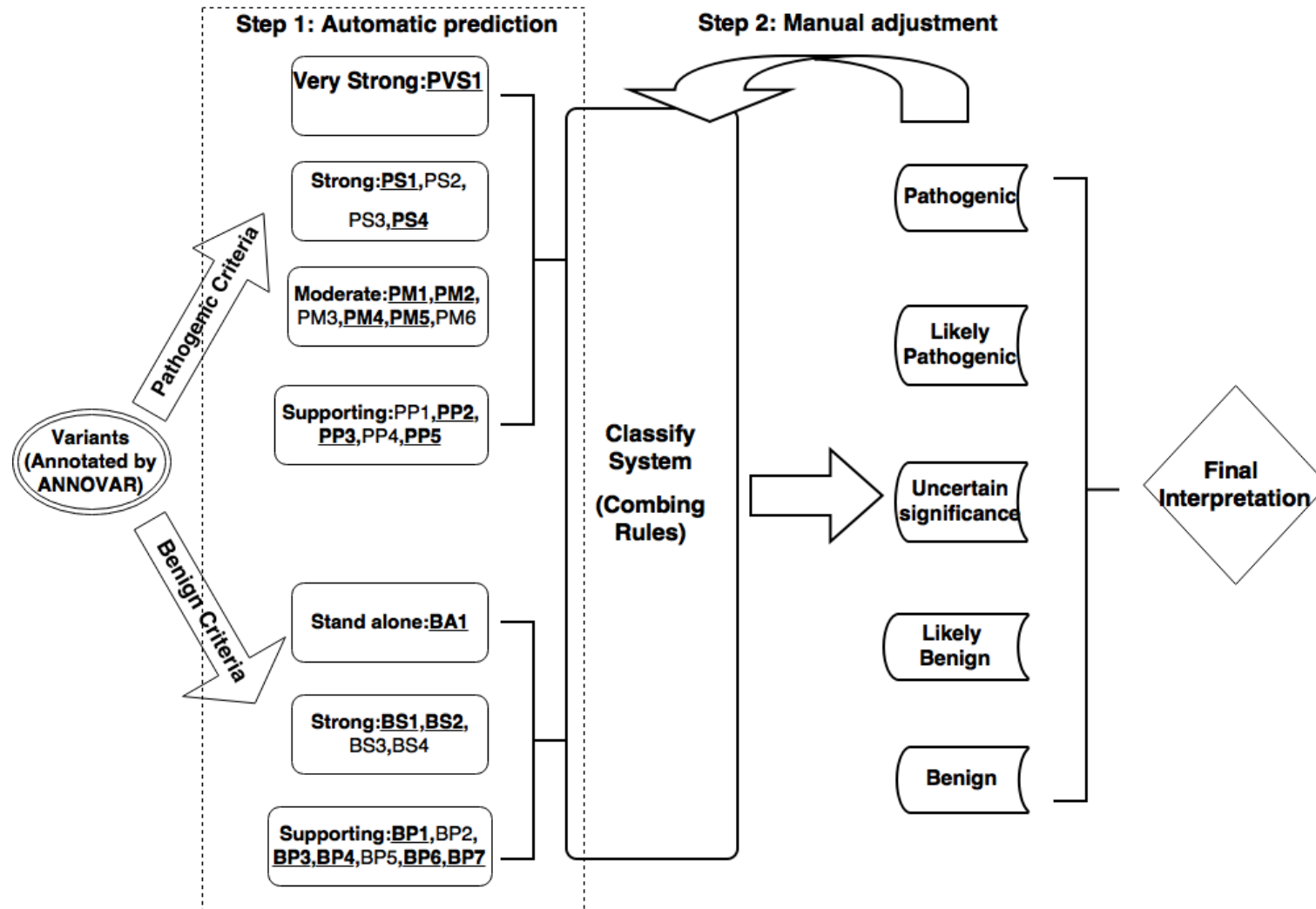
- BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder
- BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age
- BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing
- BS4 Lack of segregation in affected members of a family

- BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium

- Sequencing artifact as determined by depth, quality, or other previously reviewed data

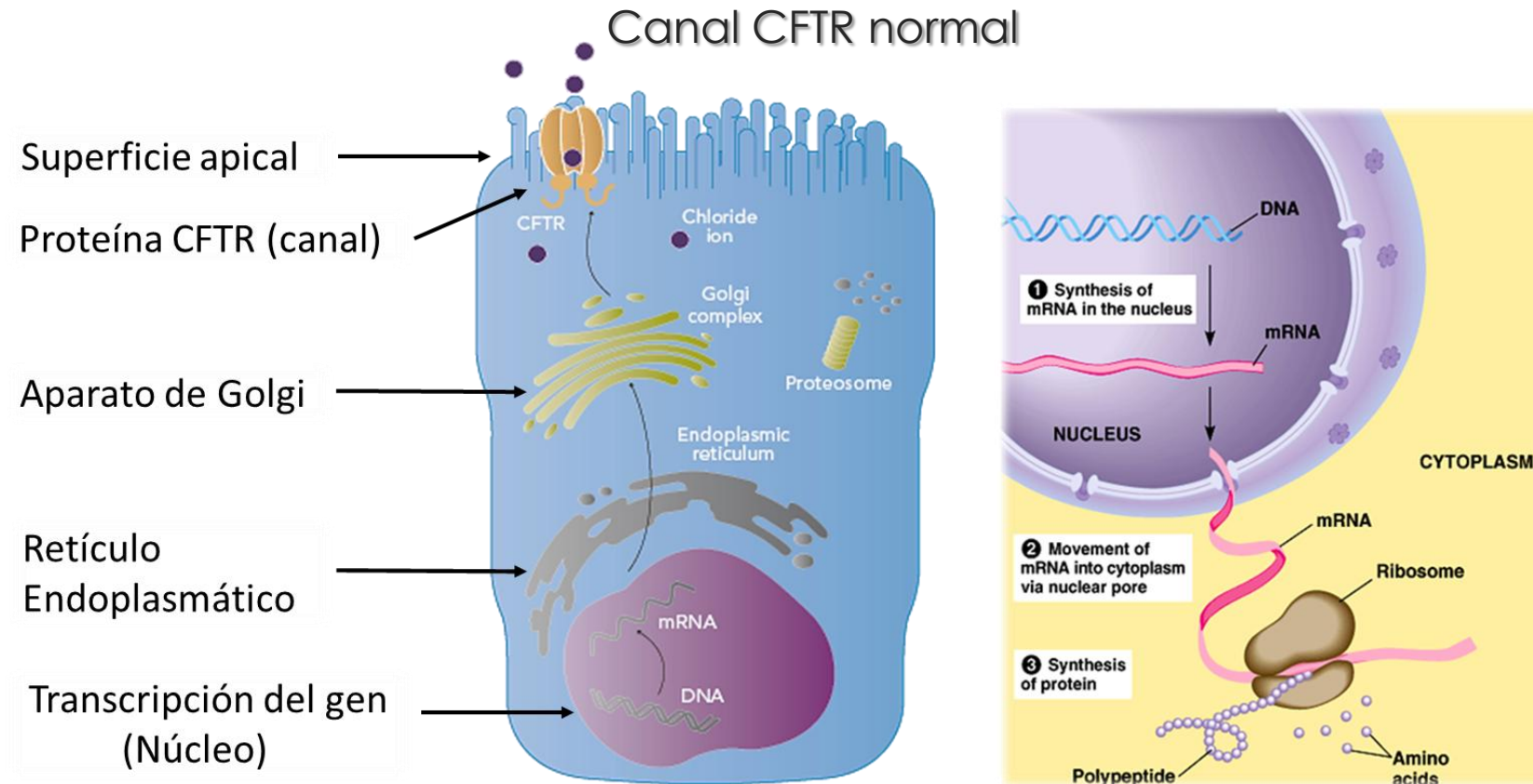
Variant Classification:  
VUS - not enough evidence

# Criterio ACMG: clasificación de variantes



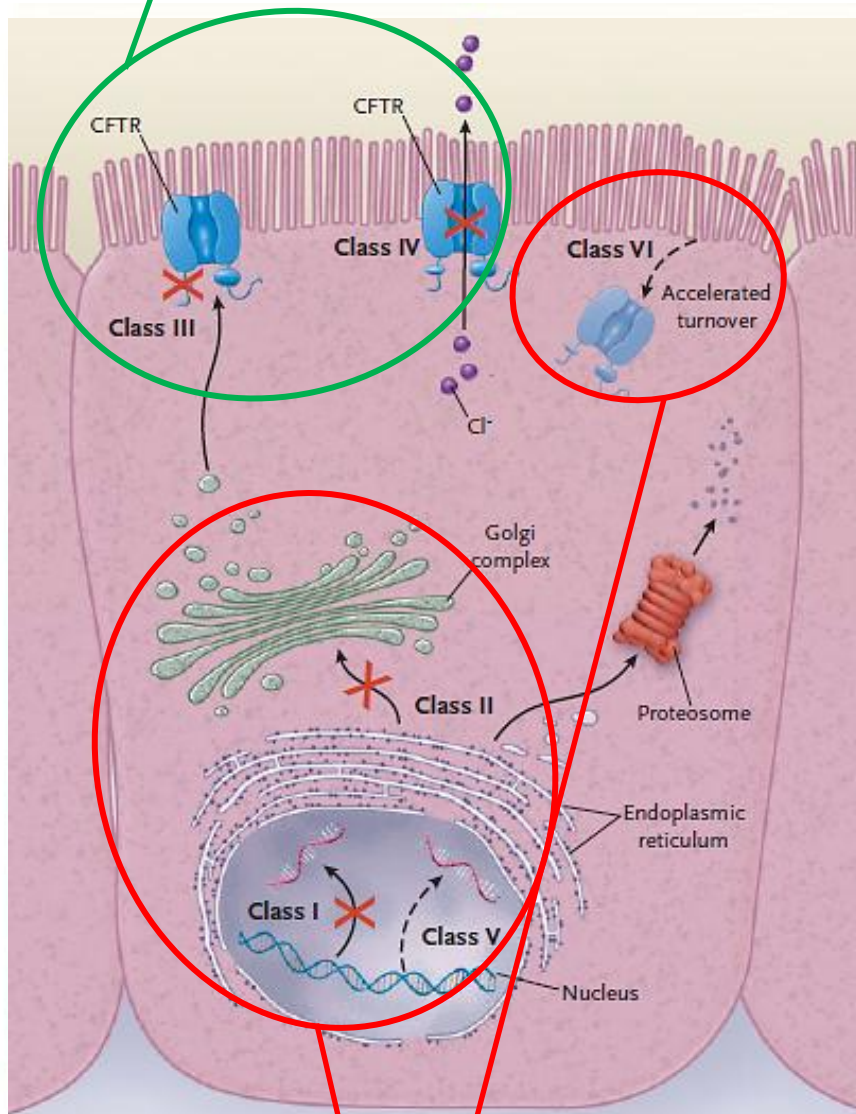
# Fibrosis Quística

La proteína CFTR está presente en la membrana apical de las células del epitelio exocrino donde actúa principalmente en el transporte activo de iones cloruro y regula la función de otros canales iónicos



*Las mutaciones en el gen CFTR pueden afectar cualquiera de las etapas de este proceso*

Mutaciones que reducen la **FUNCIÓN** de la proteína CFTR en la superficie celular



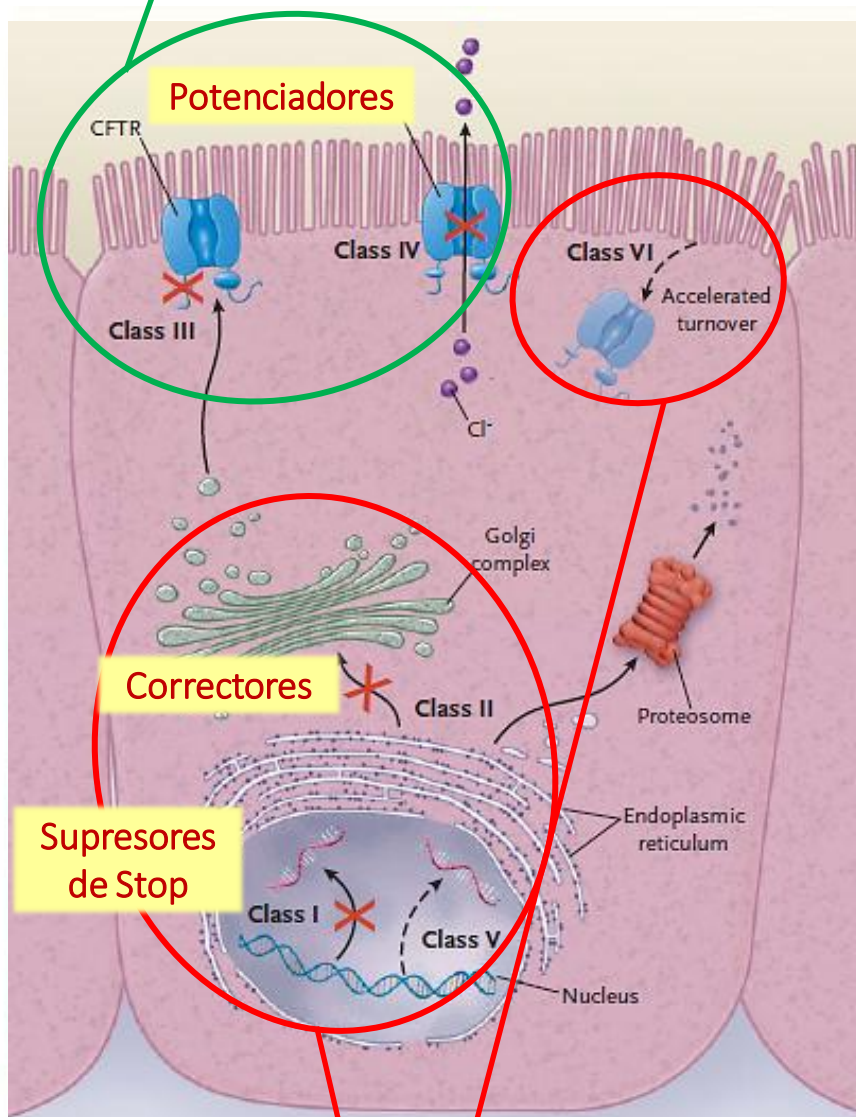
Mutaciones que reducen la **CANTIDAD** de proteína CFTR funcional que alcanza la superficie

## Clases de mutaciones en el CFTR

<b>CLASE I</b>	• Defecto de síntesis	<b>G542X W1282X 1717-1G&gt;A</b>	Insuficiencia Pancreática
<b>CLASE II</b>	• Defecto de procesamiento y tráfico intracelular	<b>ΔF508 N1303K</b>	
<b>CLASE III</b>	• Defecto de activación y regulación	<b>G551D S549N</b>	
<b>CLASE IV</b>	• Defecto de conductancia	<b>D1152H R117H R334W</b>	Suficiencia Pancreática
<b>CLASE V</b>	• Reducción de la cantidad	<b>3849+10KbC&gt;T A455E</b>	
<b>CLASE VI</b>	• Renovación acelerada	<b>Q1412X</b>	

CBAVD, pancreatitis crónica, bronquiectasias

Mutaciones que reducen la **FUNCIÓN** de la proteína CFTR en la superficie celular

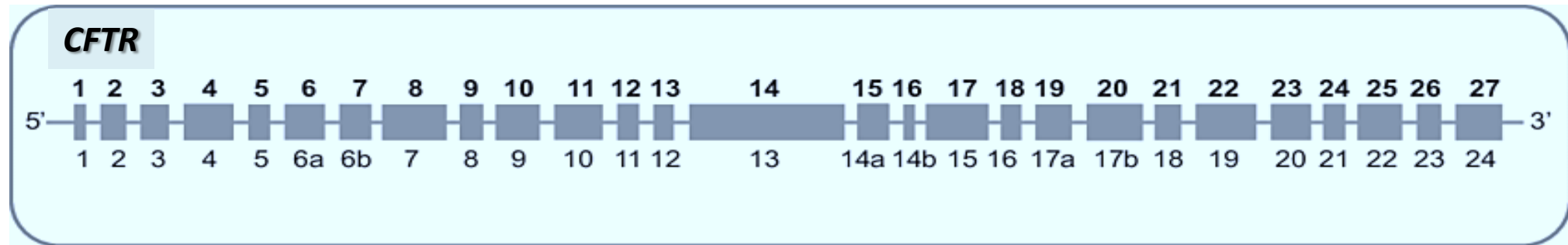


Mutaciones que reducen la **CANTIDAD** de proteína CFTR funcional que alcanza la superficie

## Clases de mutaciones en el CFTR

CLASE I	• Defecto de síntesis	G542X W1282X 1717-1G>A
CLASE II	• Defecto de procesamiento y tráfico intracelular	$\Delta$ F508 N1303K
CLASE III	• Defecto de activación y regulación	G551D S549N
CLASE IV	• Defecto de conductancia	D1152H R117H R334W
CLASE V	• Reducción de la cantidad	3849+10KbC>T A455E
CLASE VI	• Renovación acelerada	Q1412X

# Secuenciación de genes grandes: el gen *CFTR* en Fibrosis Quística



- Región codificante completa (27 exones)
  - Regiones intrónicas flanqueantes
  - Dos regiones intrónicas profundas
  - Región intrón 9: poli T y tracto TG
  - Región del promotor
- Neumonología: Hilda Giugno – Claudio Castaños
  - Biología Molecular Genética: Carolina Crespo – Pablo Gravina
  - Genómica/Bioinformática: G. Veneruzzo/M. Juanes – F. García

# NGS en Fibrosis Quística

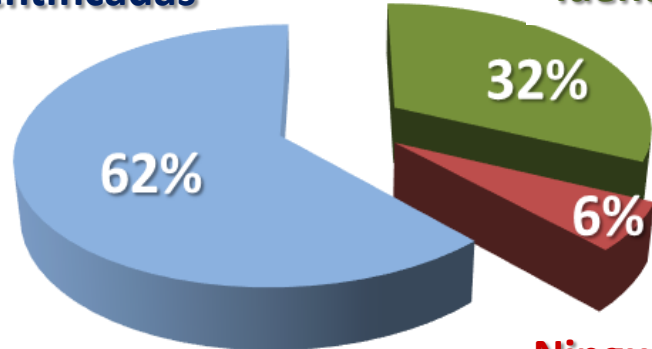
- ✓ **Kits prediseñados** con regiones fijas (MiSeqDx-Illumina, Multiplicom MASTR, VariFind – ParSeq, NEXTflex-PE)
- ✓ **Panel de genes**, que incluye el *CFTR* diseñado por regiones customizadas (TruSeq Custom Amplicon)
  
- **Validación de dos kits comerciales** (VariFind – ParSeq, Devyser): 44 muestras con mutaciones ya identificadas en el laboratorio
  
- Se estudiaron **para diagnóstico 34 pacientes** con genotipo incompleto (con una o ninguna mutación identificada)
  - **Kit VariFind – ParSeq:** 12 pacientes, en 9 se pudo completar el genotipo y se confirmó el diagnóstico
  - **Panel FONARSEC:** 1 paciente, en el que se identificó la segunda mutación causante de FQ
  - **Kit NEXTflex-PE:** 4 pacientes, en los que se identificó la segunda mutación causante de FQ
  - **Kit Devyser:** 17 pacientes, en 14 se identificó la segunda mutación causante de FQ
  
- En **28/34 pacientes (82%)** se completó el genotipo y se **confirmó el diagnóstico**

# Sensibilidad del estudio molecular del gen *CFTR*

## 32 mutaciones

**Dos  
mutaciones  
identificadas**

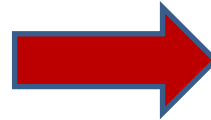
**Una  
mutación  
identificada**



**Ninguna  
mutación  
identificada**

Proporción de pacientes con mutaciones identificadas con el estudio de 32 mutaciones

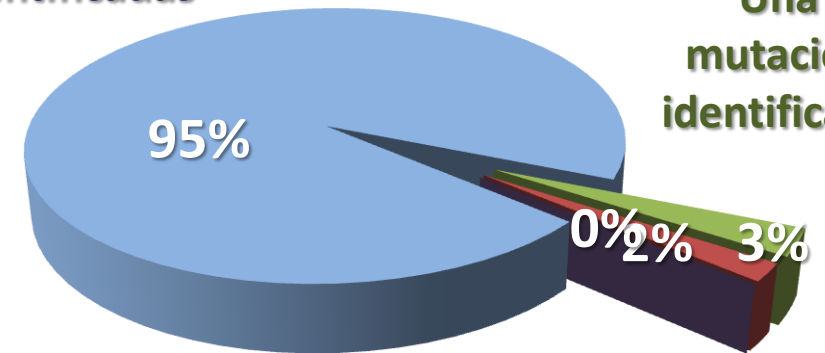
Secuenciación  
(NGS)



## Secuenciación

**Dos  
mutaciones  
identificadas**

**Una  
mutación  
identificada**



**Ninguna  
mutación  
identificada**

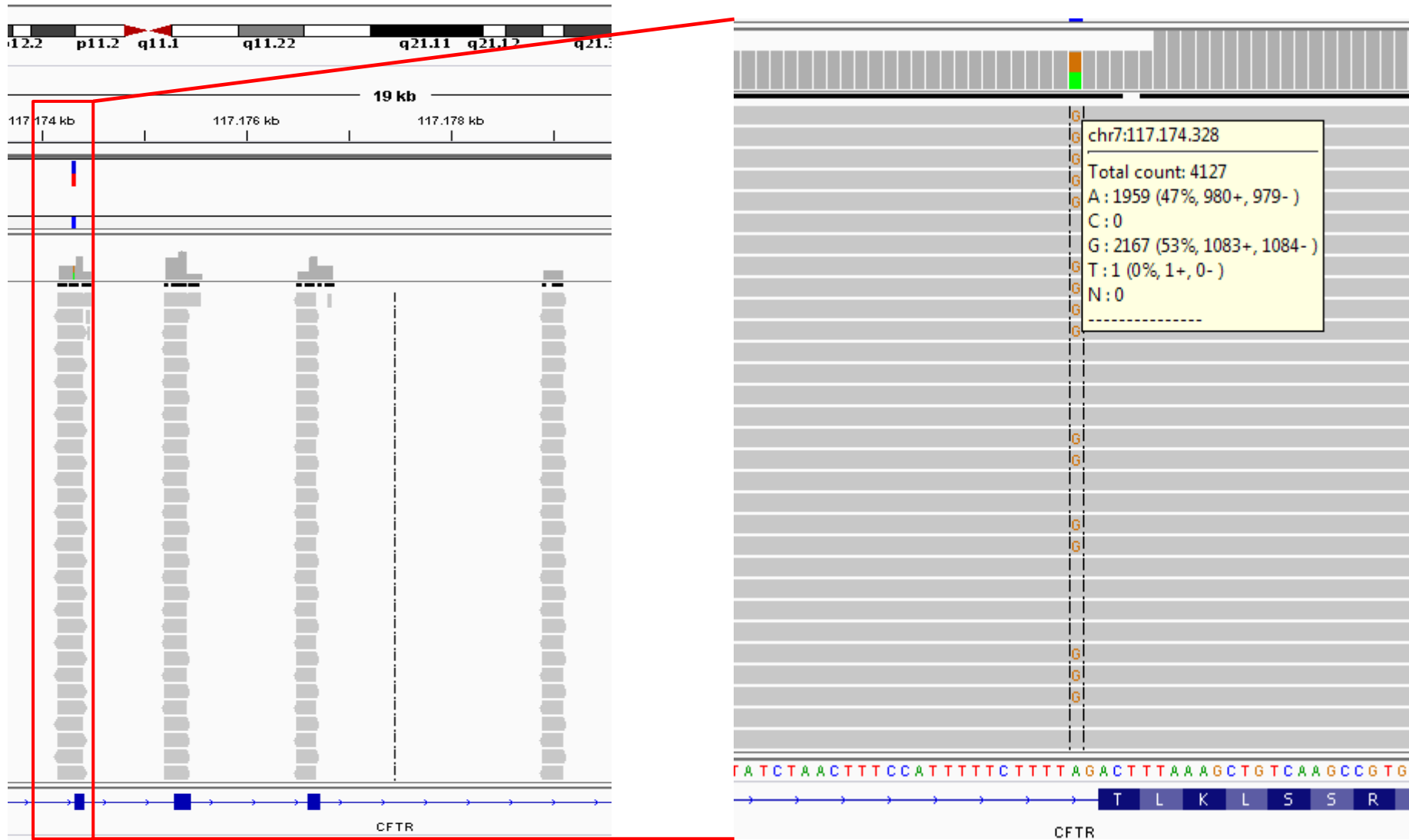
Proporción de pacientes con mutaciones identificadas con el estudio de Secuenciación



# Resultados NGS en Fibrosis Quística

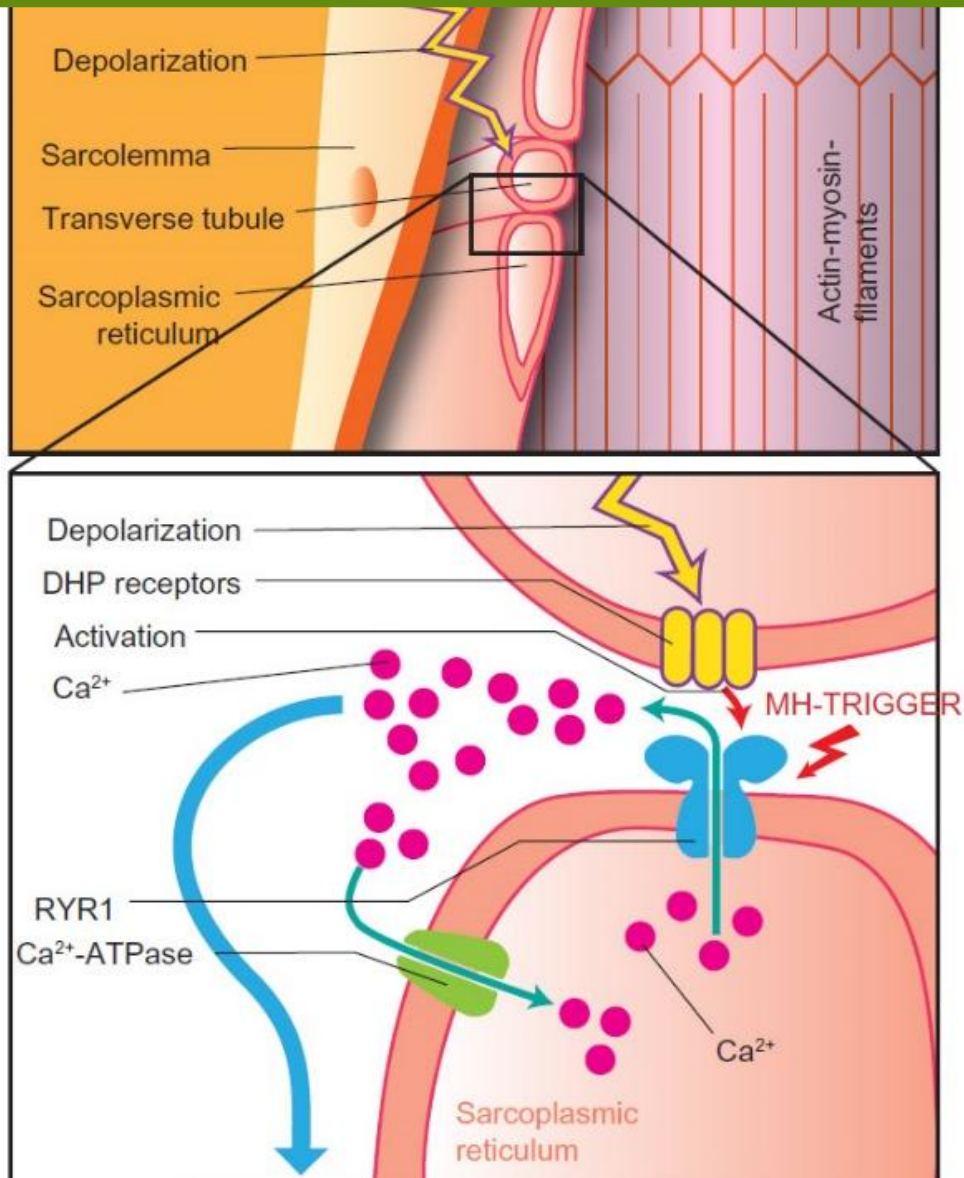
- Se identificaron **24 mutaciones diferentes** en el gen *CFTR*
- Se identificó una **variante nueva en el gen *CFTR*** probablemente patogénica
- En un paciente se detectaron dos **variantes patogénicas tratables con moduladores del *CFTR*** mutación-específicos (Ivacaftor)
- En 28 de 34 pacientes (**82%**) se completó el genotipo **y se confirmó el diagnóstico**
- La secuenciación por **NGS permitió aumentar la sensibilidad** del diagnóstico molecular en **un 33%** (del **62% previo** por estudio de 32 mutaciones a un **95% con ambos estudios**)
- La comparación de los dos kits comerciales y el panel nos permite concluir que es más conveniente utilizar **kits comerciales prediseñados para secuenciación individual del *CFTR*** ya que alcanzan **mejor cobertura** y son más **costo-efectivos** que un panel

# Next Generation Sequencing (NGS)



Es rápida, sencilla y más costo-efectiva, permite analizar las variantes en todos los exones simultáneamente en varios pacientes en un único ensayo

# Hipertermia maligna



Regulación anormal del metabolismo del calcio en la célula muscular esquelética, por defectos en un canal de calcio (receptor de ryanodina - *RYR1*) en el retículo sarcoplásmico (SR).

Liberación de calcio rápida y sin control desde el SR al mioplasma.

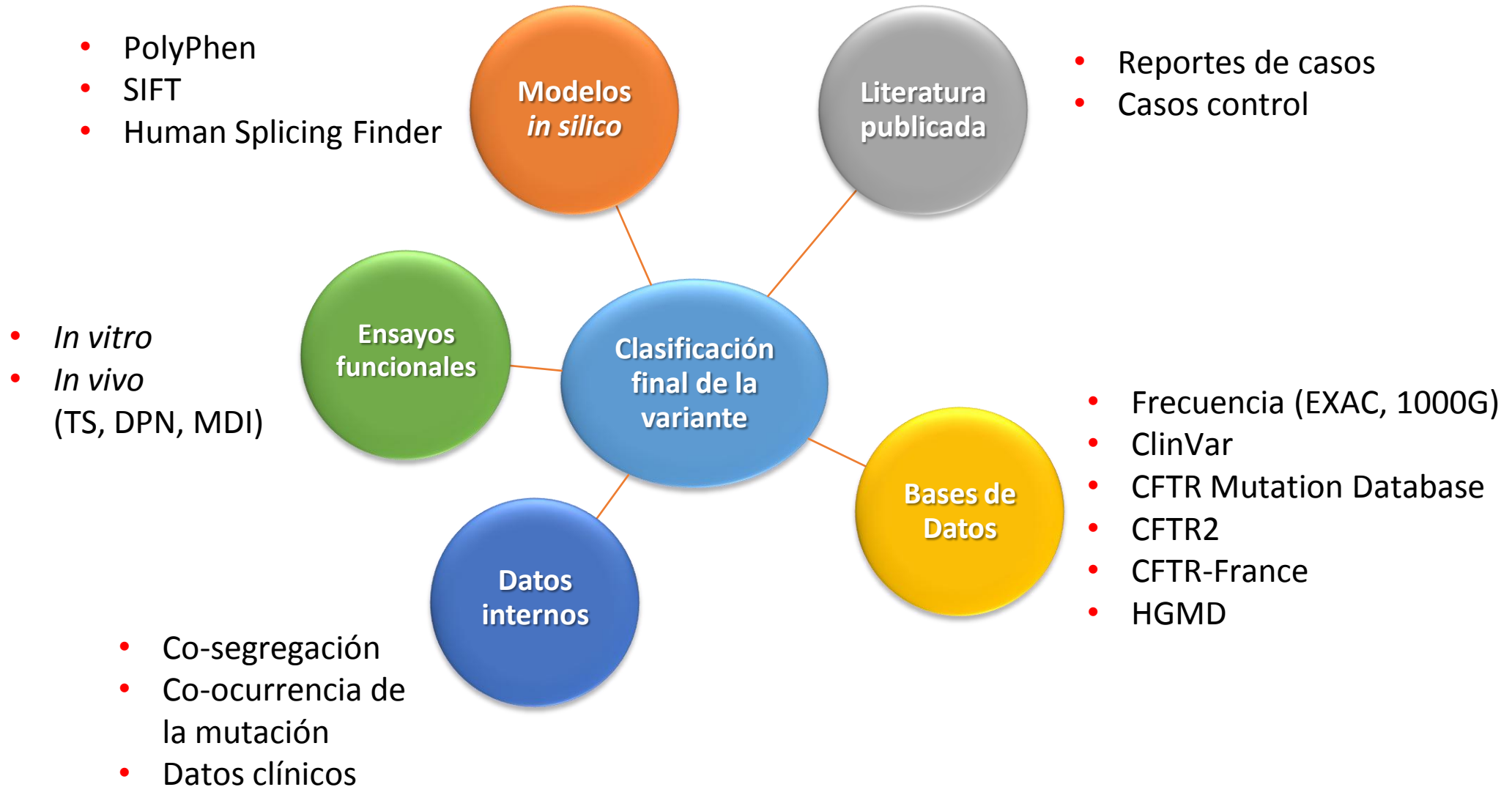
Estado hipermetabólico

Aumento del consumo de Oxígeno, producción excesiva de CO<sub>2</sub> y de calor

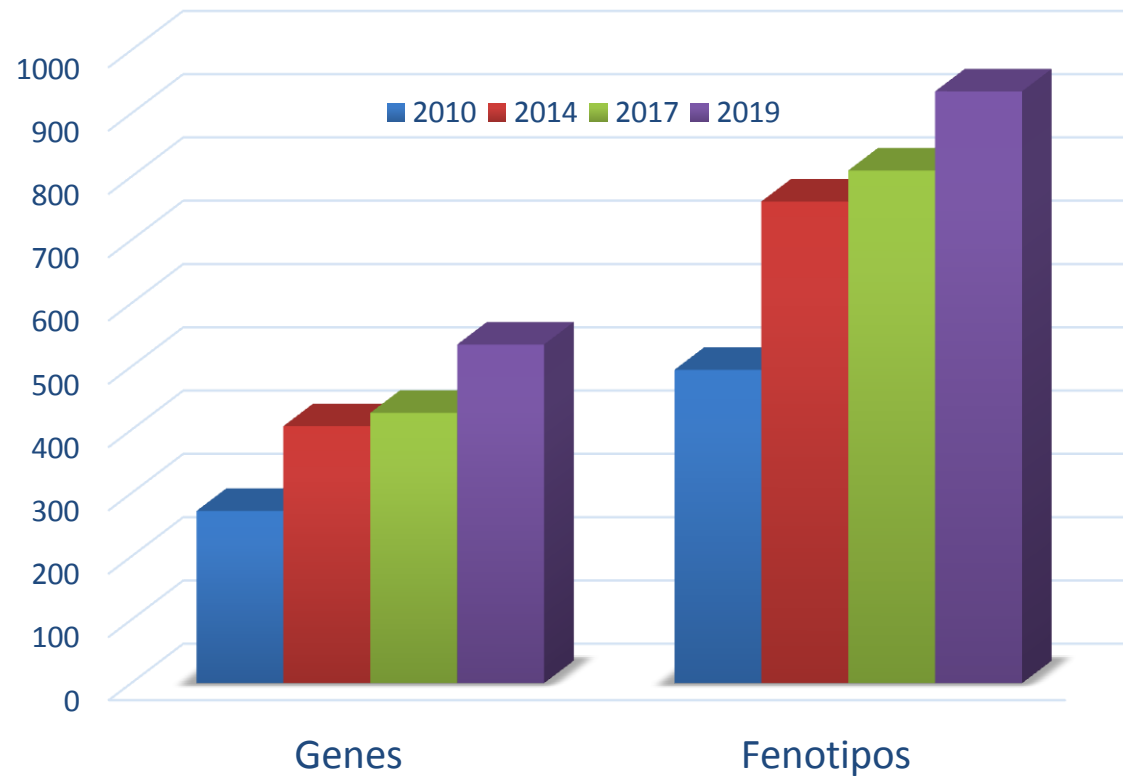
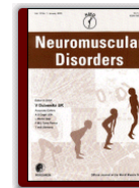
Crisis de hipertermia maligna:

- taquicardia
- rigidez muscular
- hipercapnia
- rabdomiolisis
- hipoxemia
- hipertermia

# Herramientas para la clasificación de variantes



# Evolución del nro. de genes y fenotipos de las ENMs



**2019: > 900 fenotipos descritos**  
**> 500 genes diferentes**