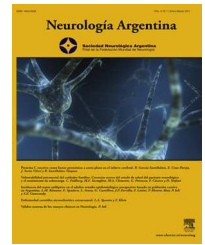


Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



Artículo original

Neurología genómica personalizada: el futuro es ahora



Marta Córdoba^{a,b,*}, Dolores González Morón^{a,d}, Sergio Alejandro Rodríguez-Quiroga^{a,c} y Marcelo Andrés Kauffman^{a,b}

^a Consultorio de Neurogenética, Centro Universitario de Neurología «José María Ramos Mejía», División Neurología, Hospital J.M. Ramos Mejía, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^b Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Eduardo de Robertis», Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Buenos Aires, Argentina

^c Consultorio de Movimientos Anormales, Centro Universitario de Neurología «José María Ramos Mejía», División Neurología, Hospital J.M. Ramos Mejía, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina

^d Sección de Neurooftalmología, FLENI, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de enero de 2014

Aceptado el 11 de marzo de 2014

On-line el 1 de mayo de 2014

Palabras clave:

Medicina personalizada

Exoma

Leucodistrofia

Paraparesia espástica

Retraso mental no sindrómico

RESUMEN

Introducción y objetivos: Las nuevas técnicas de secuenciación genómica masiva han revolucionado el diagnóstico de las enfermedades neurológicas. Nuestro objetivo general es ilustrar, mediante la presentación de 3 casos clínicos, el abordaje diagnóstico de la patología neurológica desde la genómica. Para ello nos proponemos: explorar herramientas bioinformáticas de anotación e interpretación funcional de variantes, describir un algoritmo de análisis para los datos obtenidos del exoma y con estos resultados correlacionar en nuestros pacientes fenotipo-genotipo-vía funcional.

Material y métodos: Fueron incluidos 3 pacientes que concurrieron a la consulta con síntomas neurológicos crónicos y progresivos. Secuenciamos el exoma en los 3. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, utilizando un algoritmo de selección, se filtraron las variantes por frecuencia poblacional, patogenicidad y modelo de herencia. Se estableció la correlación funcional con el fenotipo en cada caso y finalmente se validaron las variantes candidatas por Sanger en los afectados y se buscó su segregación en familiares.

Resultados: Se elaboraron algoritmos de aproximación diagnóstica genómica para cada caso. En el caso 1 se llegó al diagnóstico de leucodistrofia asociada a POLR3A con las siguientes mutaciones c.G3781A:p.E1261K y c.G3014A:p.R1005H. En el caso 2 el diagnóstico probable fue de retraso mental sindrómico secundario a la mutación p.Arg198* en homocigosis para GRIK2. Y, finalmente, en el caso 3 la causa de paraparesia espástica hereditaria fue el haplotipo patogénico en heterocigosis compuesta c.6763insA y c.6726A>T, p.Gln2242His en SPG11.

Conclusiones: La aproximación diagnóstica genómica en conjunto con una completa evaluación clínica resulta útil para el abordaje de la patología neurológica, permitiendo una

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: martacordoba.genomics@gmail.com (M. Córdoba).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2014.03.002>

1853-0028/© 2014 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

correlación fenotipo genotipo y vía funcional afectada, arribando a un diagnóstico molecular sólido.

© 2014 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Personalized genomic neurology: Future is now

A B S T R A C T

Keywords:

Personalized medicine
Exome
Leukodystrophy
Spastic paraparesis
Non syndromic mental
retardation

Introduction and objectives: The new techniques of mass genome sequencing have revolutionized the diagnosis of neurological diseases. Our overall objective is to illustrate the genomic diagnostic approach of neurological pathology by presenting three cases. To do this we will: explore bioinformatic annotation tools and functional interpretation of variants, describe an algorithm for exome data analysis and to correlate these results with our phenotype-genotype -functional pathway.

Material and methods: We included 3 patients who attended the talks with chronic and progressive neurological symptoms. We sequenced the exome in all three. We performed the analysis through annotation and functional bioinformatic tools

Results: Algorithms genomic diagnostic approach were developed for each case. In case 1 the diagnosis was reached Leukodystrophy associated with the following mutations POLR3A c.G3781A: p.E1261K and c.G3014A: p.R1005H. In case 2 the diagnosis was probable syndromic mental retardation secondary to homozygous mutation p.Arg198* for GRIK2. And finally in case 3 the cause of hereditary spastic paraparesis was compound heterozygous pathogenic haplotype c.6763insA and c.6726A > T, p.Gln2242His in SPG11.

Conclusions: The genomic diagnostic approach along with a complete clinical evaluation is useful for addressing neurological pathology allowing genotype and phenotype correlation with functional pathways arriving to a solid molecular diagnosis.

© 2014 Sociedad Neurológica Argentina. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El problema de la comprensión precisa y completa de las bases moleculares de la patología neurológica ha sido la meta de muchos estudios genéticos. En este sentido, hasta hace poco existían 3 formas principales de abordaje a este problema: a) estudios de análisis de ligamiento genético; b) estudios basados en genes candidatos, y c) estudios epidemiológicos basados en casos y controles. El uso de estos 3 enfoques dio lugar a considerables éxitos, culminando en la identificación de muchos genes responsables de enfermedades con herencia mendeliana y otros tantos factores de riesgo para numerosas afecciones neurológicas con herencia compleja¹. En los últimos 5 años, las nuevas técnicas de secuenciación masiva del ADN han revolucionado el campo de la genética y de las enfermedades humanas y, por ende, el de la neurología también². Actualmente, es posible determinar la secuencia codificante para proteínas de todos los genes en el genoma de un individuo (el *exoma humano*) en cuestión de días y la obtención del genoma humano completo (secuencia codificante y no codificante) ya es una *realidad asible*³. El impacto de estos avances tecnológicos está produciendo un cambio paradigmático en la aproximación al proceso salud-enfermedad, expresado bajo el concepto de *medicina personalizada*, donde se busca asesorar acerca de riesgo, realizar diagnósticos e implementar tratamientos de acuerdo con el *fenotipo molecular* de cada paciente⁴.

Sin embargo, todavía existen limitaciones asociadas a estas nuevas tecnologías. Se debe considerar la posibilidad de errores técnicos en el análisis de secuencias, como también el hecho de que la validación de los hallazgos es dificultosa y laboriosa. En consecuencia, su introducción directa en el diagnóstico debe ser cautelosa, a la espera de resultados que tienen que ser consistentes antes de su establecimiento sistemático⁵. Por otro lado, el manejo y la categorización de la gran cantidad de información incidental o no buscada inherente implican un verdadero desafío^{6,7}. Debe tenerse en cuenta que el análisis de la secuenciación de un exoma permite reconocer, en promedio, más de 70.000 variantes (posiciones en el genoma que se diferencian de la secuencia de referencia humana) y que de ellas solo una o 2 serán la/s responsable/s de la sintomatología en un individuo con una enfermedad de herencia autosómica dominante o recesiva, respectivamente. Entonces, la aproximación diagnóstica mediante estas nuevas y poderosas herramientas conlleva tanto optimismo como un pensamiento cuidadoso.

En este trabajo, nuestro *objetivo general* es ilustrar mediante la presentación de 3 casos clínicos el abordaje diagnóstico de la patología neurológica desde la genómica. Para ello, como *objetivos específicos* nos proponemos:

- Explorar herramientas bioinformáticas de anotación e interpretación funcional de variantes genéticas.

- A partir de dicha exploración, describir un algoritmo de análisis aplicable a los datos obtenidos de la secuenciación del exoma.
- Establecer una hipótesis diagnóstica en cada uno de nuestros pacientes correlacionando fenotipo-genotipo-vía funcional.

Pacientes y métodos

Pacientes y procedimientos diagnósticos efectuados

Fueron incluidos 3 pacientes con patología neurológica de probable origen genético. Cada uno de los sujetos fue interrogado y evaluado clínicamente. Por otro lado, se recabó información demográfica, origen étnico familiar y presencia de comorbilidades. A cada uno de los sujetos afectados se les realizó, como estudios complementarios comunes, resonancia magnética (RM) de encéfalo de 1,5 T y electromiografía de 4 miembros. Todos los sujetos brindaron el consentimiento informado mediante formulario aprobado por el Comité de Ética Institucional previamente a su participación en el estudio.

Estudios moleculares. Secuenciación completa del exoma humano

Se purificó ADN genómico de una muestra de sangre periférica perteneciente a cada uno de los sujetos incluidos utilizando un sistema comercial y siguiendo instrucciones del fabricante. A partir de 1 µg de ADN se construyeron 3 bibliotecas de secuenciación según procedimientos estandarizados de Illumina, que incluyen fragmentación de la muestra por nebulización en tamaños de 350-400 pb. Posteriormente, se enriqueció cada una de estas bibliotecas con aquellos fragmentos representativos del exoma humano completo mediante la utilización de un sistema de hibridación en solución (Nimblegen V3 o TruSeq), siguiendo instrucciones del fabricante. Luego, se amplificaron por PCR todos los fragmentos seleccionados siguiendo procedimientos estandarizados. Finalmente, se secuenció el exoma utilizando un equipo Illumina HiSeq 2000 siguiendo procedimientos estandarizados del fabricante.

Análisis bioinformático. Identificación de variantes candidatas e interpretación funcional

Se alineó el producto de la secuenciación con la secuencia de referencia del genoma humano del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos versión 37/hg19 utilizando la herramienta BWA (v0.5.9; parámetros disponibles ante su requerimiento)⁸. Posteriormente, se identificaron variantes de nucleótido único y pequeñas inserciones/deleciones (INDEL) mediante la utilización de las herramientas picard (v1.59) y samtools (v0.1.18; parámetros utilizados disponibles ante su requerimiento)⁹. Cada una de las variantes identificadas fue caracterizada utilizando la herramienta ANNOVAR¹⁰ y OMICIA¹¹, utilizando las bases de datos dbSNP 130 y 135¹², 1.000 genomas (versión febrero de 2012)¹³, knowngene de UCSC¹⁴, 5.400 exomas de NHLBI¹⁵, junto a las herramientas de predicción de patogenicidad SIFT¹⁶, Condel¹⁷, PhyloP y GERP++¹⁸.

Finalmente, se filtraron e identificaron aquellas variantes que cumplieran con los requisitos de: 1) frecuencia poblacional menor al 5% (*prevalencia del desorden estimada en 0,00005 y frecuencia de portadores de mutación según modelo de herencia inferido estimada en 0,007*); 2) consistentes con un modelo de herencia autosómico recesivo, y 3) probable patogenicidad¹⁹.

Finalizada esta primera etapa, se continuó con la interpretación funcional de las variantes candidatas mediante las herramientas de interpretación biológica: BIOGRAPH²⁰.

Validación por secuenciación de Sanger. Identificación de variantes candidatas por segregación familiar

Las variantes seleccionadas por el algoritmo descrito arriba fueron secuenciadas en los 3 casos por método de Sanger, utilizando un sistema de electroforesis capilar, y método ABI BigDye terminator, siguiendo instrucciones del fabricante. En los casos 1 y 3 se realizó en otros miembros de la familia. En el caso 2 solo en el afectado porque todavía no se obtuvo el consentimiento para estudio mediante exoma de otro miembro afectado en la familia. Esto tiene el objetivo de validar los hallazgos de la secuenciación masiva e identificar aquella/s variante/s probablemente responsables del fenotipo observado investigando su segregación entre sujetos afectados y consistencia mendeliana en la familia en padres, en caso de que fuera posible.

Informe de hallazgos incidentales

Se realizó informando las variantes con significado clínico partiendo de los siguientes preceptos⁶:

- El cambio genético debe ser conocido o previsto de tener importancia clínica urgente.
- El conocimiento del hallazgo debe tener un claro beneficio directo que se perdería si el diagnóstico se hiciera más tarde, es decir, el conocimiento de este factor de riesgo alterarían sustancialmente la toma de decisiones médicas o reproductivas.
- El beneficio potencial de conocer que un trastorno genético existe es claramente mayor que los riesgos potenciales asociados con la ansiedad y las pruebas médicas posteriores que podrían resultar de este conocimiento.
- A menos que añadan un riesgo sustancial, los factores de riesgo de los trastornos multifactoriales no se reportan.
- Las mutaciones recesivas se informan solamente sí:
 1. La frecuencia de portación para mutaciones en ese gen específico es >1% (de manera que la incidencia de la enfermedad es mayor a 1/40.000).
 2. El síndrome da lugar a una significativa morbilidad.
 3. El diagnóstico precoz y la intervención tendrían un beneficio significativo.

La selección final se hizo de acuerdo con las recientes recomendaciones de la Asociación Americana de Genética Humana⁷, donde se determina un panel de 57 genes accionables para los que sus variantes, previamente conocidas como patogénicas o patogénicas por predicción bioinformática, deben ser informadas independientemente del consentimiento del paciente (tabla 1).

Tabla 1 – Recomendaciones de reporte de hallazgos incidentales

Gen	Fenotipo
BRCA, BRCA2	Cáncer de mama y ovario familiar
TP53	Síndrome de Li-Fraumeni
STK11	Síndrome de Peutz-Jeghers
MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Síndrome de Lynch
APC	Poliposis adenomatosa familiar
MUTYH	Poliposis asociada a MUTYH, adenomas múltiples colorrectales, FAP tipo 2, poliposis adenomatosa colorrectal AR
VHL	Síndrome de von Hippel-Lindau
MEN1	Neoplasia endocrina múltiple tipo 1
RET	Neoplasia endocrina múltiple tipo 2
RET, NTRK1	Carcinoma de tiroides familiar
PTEN	Síndrome de tumor y hamartoma PTEN
RB1	Retinoblastoma
SDHD, SDHDF2, SDHC, SDHB	Síndrome del feocromocitoma paraganglionar hereditario
TSC1, TSC2	Esclerosis tuberosa compleja
WT1	Tumor de Wilms asociado a WT1
NF2	Neurofibromatosis tipo 2
COL3A1	EDS tipo vascular FBN1
FBN1, TGBR1, TGBR2, SMAD3, ACTA2, MYH11	Síndrome de Marfan y de Loeys-Dietz, y aneurismas y disecciones de aorta torácica familiar
MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNT3, TPM1, MYL3, ACTC1, PRKAG2, GLA, MYL2, LMNA	Cardiomiopatía hipertrófica y dilatada
RYR2	Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
PKP2, DSP, DSC2, TMEM43, DSG2	Síndrome de Romano Ward 1, 2 y 3 con QT prolongado y síndrome de Brugada
LDLR, APOB, PCSK9	Hipercolesterolemia familiar
RYR1, CACNA1S	Susceptibilidad a la hipertermia

Tomado de Green et al.⁷.

Se brindó asesoramiento genético en cada caso particular de acuerdo con estos criterios, según los hallazgos particulares.

Análisis estadístico

Las distintas herramientas bioinformáticas utilizadas involucran el uso de algoritmos particulares que incluyen pruebas estadísticas que habitualmente son no paramétricas y basadas en permutaciones. Una descripción detallada de cada algoritmo puede encontrarse en cada una de las referencias de las herramientas mencionadas arriba. Cuando correspondiera, para el cálculo de la significación estadística del análisis de la mutación individualizada se siguió la metodología descrita por Zhi y Chen⁵.

Resultados

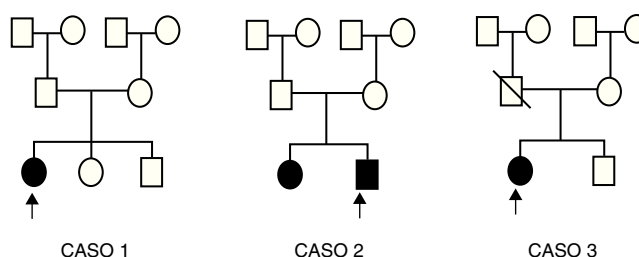
Presentación de casos

Caso 1: leucodistrofia

Una mujer de 23 años de edad fue derivada a nuestro consultorio por un cuadro clínico de 18 años de evolución. Sin antecedentes familiares relevantes (fig. 1), tuvo un desarrollo normal hasta que a los 5 años presentó sus primeros síntomas, con torpeza en los movimientos. A los 14 años fue evaluada por endocrinología por amenorrea y pubertad tardía. De acuerdo con los archivos médicos, en su primera evaluación endocrinológica se evidenciaba retraso en el desarrollo puberal,

ausencia de caracteres sexuales secundarios, hipogonadismo confirmado por ultrasonido e hipogonadotrofismo con niveles de hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante por debajo de la normalidad. En los años siguientes, evolucionó con mayor incoordinación en los movimientos y problemas de aprendizaje. El curso fue lentamente progresivo, excepto por una importante exacerbación aguda a los 20 años consistente en ataxia y alteración de los movimientos oculares.

Fue estudiada con una RM de cerebro, que mostró afectación difusa de la sustancia blanca con patrón de hipomielinización y adelgazamiento del cuerpo calloso (fig. 2). Otros estudios diagnósticos fueron solicitados ante la sospecha de leucodistrofia. Los resultados mostraron bajos niveles de la enzima arilsulfatasa A en leucocitos (0,14 nm/min/mg Prot, VN: 0,40-2), con excreción urinaria normal de sulfátidos. Ambos padres también tenían bajos niveles de actividad de arilsulfatasa A (0,33 nm/min/mg Prot y 0,27 nm/min/mg Prot) y excreción de sulfátidos normal en la orina.

**Figura 1 – Familiograma.**

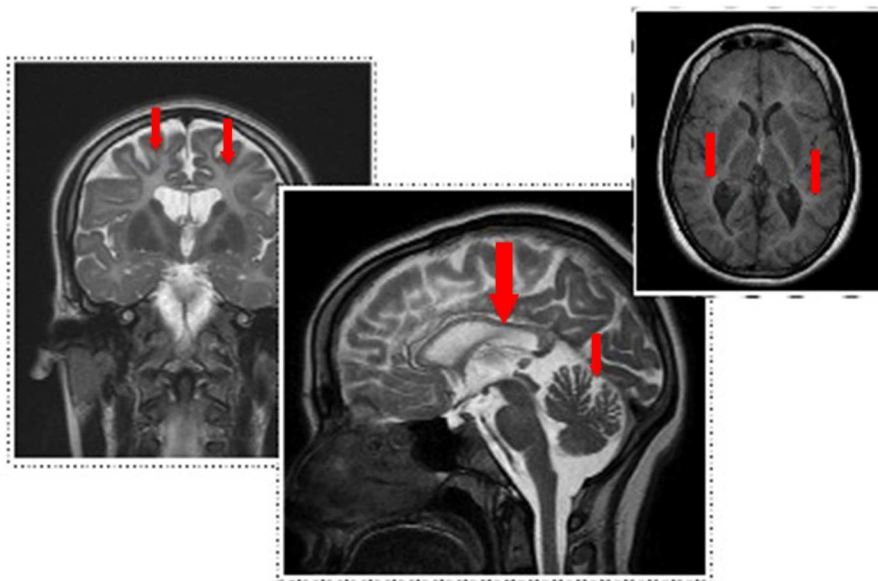


Figura 2 – Afectación difusa de la sustancia blanca con patrón de hipomielinización y adelgazamiento del cuerpo calloso (flechas).

Llegó a nuestra evaluación con un diagnóstico etiológico no concluyente de leucodistrofia metacromática o portación sintomática de *seudodeficiencia* de arilsulfatasa.

Caso 2: retraso mental y epilepsia

Un paciente varón de 31 años fue traído por sus padres a la consulta por presentar trastornos de aprendizaje y crisis epilépticas de tipo atónicas desde los 13 años, habiendo agregado en los últimos 2 años distonía cervical y alteraciones conductuales. Mostraba el antecedente en una familia consanguínea de una única hermana con trastornos conductuales e historia de un evento comicial aislado (fig. 1).

En la evaluación neurológica, se constató: retraso mental, hiperreflexia generalizada, distonía cervical en rotación lateral a derecha con componente en anteroflexión, asociada a distonía de tronco en lateralización a izquierda, temblor postural y cinético mínimo bilateral y simétrico, además de la presencia de movimientos mioclónicos a nivel de miembros superiores los cuales exacerbaban ante el estímulo táctil.

La RM de encéfalo no mostró alteraciones. En la RM de columna se observó marcada escoliosis, sin alteraciones a nivel medular. El electromiograma resultó normal.

Una biopsia muscular y estudios de laboratorio dirigidos a la búsqueda de enfermedad mitocondrial resultaron negativos.

Llegó a nuestra evaluación sin diagnóstico etiológico.

Caso 3: paraparesia espástica

Paciente mujer, de 23 años, que concurrió a la consulta presentando trastornos de aprendizaje y alteraciones de la marcha de curso progresivo. Sin antecedentes patológicos ni familiares de relevancia, hasta que a los 10 años inició con problemas en su desempeño escolar. Seis años más tarde, agregó pérdida de equilibrio y dificultad para mantenerse de pie, síntomas que progresaron a lo largo del tiempo requiriendo apoyo para

caminar alrededor de los 19 años. En los últimos 2 años, agregó temblor cinético, intermitente, del miembro superior derecho, así como disartria y trastornos deglutorios.

En el examen físico, se constataron como hallazgos positivos: disartria moderada, hipertonia espástica severa de miembros inferiores asociada a leve disminución de la fuerza muscular en los miembros inferiores, hiperreflexia generalizada con signos de piramidalismo y temblor cinético en ambos miembros superiores.

En los estudios complementarios, la paciente presentó RM de encéfalo con lesiones de sustancia blanca en ambos hemisferios y en corona radiata, asociado a adelgazamiento de la rodilla y tercio anterior del cuerpo calloso (fig. 3). El electromiograma mostró hallazgos compatibles con una polineuropatía motora de tipo axonal a predominio distal de miembros superiores e inferiores.

Llegó a nuestra consulta sin diagnóstico etiológico concluyente.

Análisis global de variantes y algoritmos propuestos

Luego de la exploración de las diferentes herramientas bioinformáticas, se establecieron algoritmos de análisis. En la figura 4 se ilustra un algoritmo general de análisis de variantes. Esto involucra:

1. Una primera etapa de filtrado por frecuencia poblacional.
2. Una segunda etapa de filtrado por modelo de herencia. Considerando que el modelo de herencia que mejor se ajusta a lo observado en estos pacientes es el autosómico recesivo, concentramos nuestro análisis en aquellos genes que tuvieran 2 variantes (heterocigota compuesta) o una variante rara en homocigosis (fig. 1). En el caso 2, priorizamos nuestro análisis en aquellas variantes en homocigosis debido a la presencia de consanguinidad entre los padres.

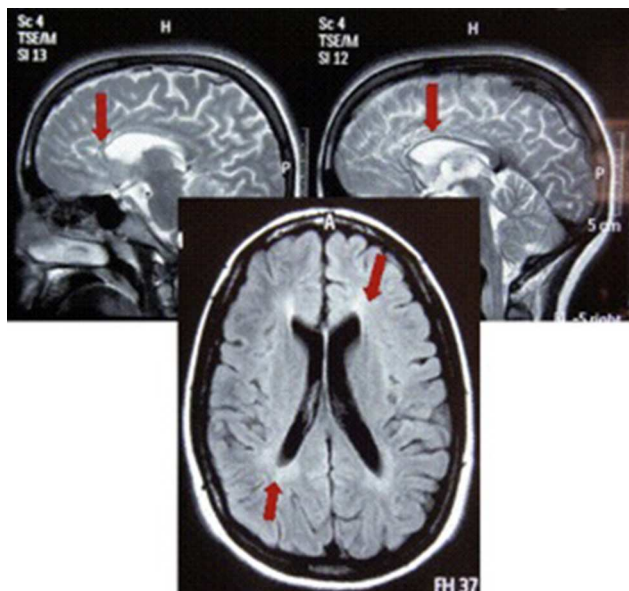


Figura 3 – Lesiones en sustancia blanca en ambos hemisferios y en corona radiata asociadas a adelgazamiento de la rodilla y el tercio anterior del cuerpo calloso.

3. Una tercera etapa de análisis, que combina una hipótesis etiológica «a priori» (determinada por la presentación clínica) y el análisis funcional de los productos proteicos de cada uno de los genes candidatos resultantes de las 2 primeras etapas de filtrado junto con el análisis de patogenicidad de cada una de sus variantes. En el primer caso (leucodistrofia) la hipótesis etiológica «a priori» incluyó un panel de 64 genes conocidos como etiopatogénicos en las leucodistrofias; en el caso 2 (retraso mental y epilepsia) se trató de una aproximación libre (sin genes candidatos «a priori») y en el caso 3 la búsqueda se orientó también a un panel amplio de 15 genes responsables de paraparesia espástica hereditaria recesiva. En las [figuras 5–7](#) se muestran los algoritmos de aproximación diagnóstica según cada caso clínico.

Análisis de los 3 exomas

Un detalle del volumen de información nucleotídica obtenido en los 3 exomas es presentado en las [tablas 2–4](#). El análisis de

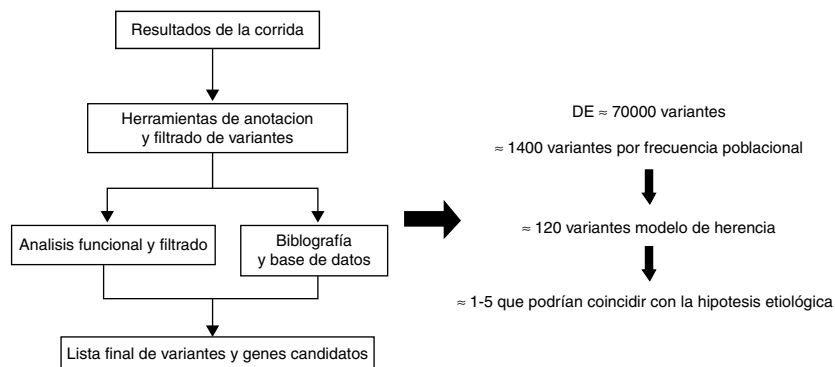


Figura 4 – Algoritmo general de análisis de variantes.

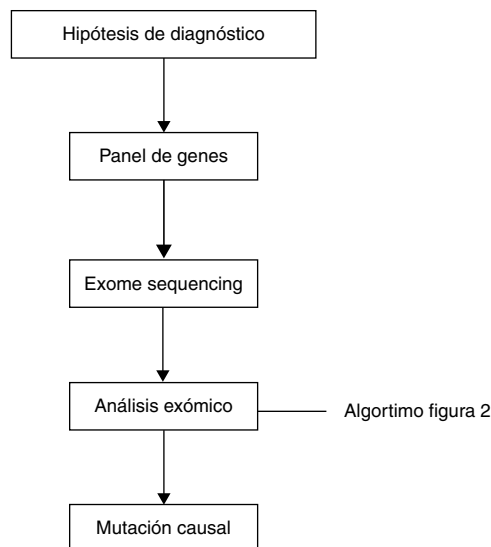


Figura 5 – Algoritmo de análisis del caso 1.

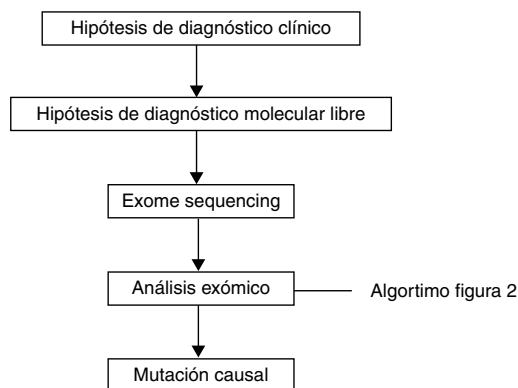


Figura 6 – Algoritmo de análisis del caso 2.

esta información muestra que en cada uno de los 3 exomas se hallaron alrededor de 75.000 variantes de nucleótido único y 8.000 pequeñas inserciones/delecciones.

Más de un 90% de estas variantes fueron previamente descritas en la literatura o en bases de datos poblacionales con una frecuencia poblacional mayor al 5% o por localizar en regiones no codificantes, por lo que se presumen sin valor patogénico.

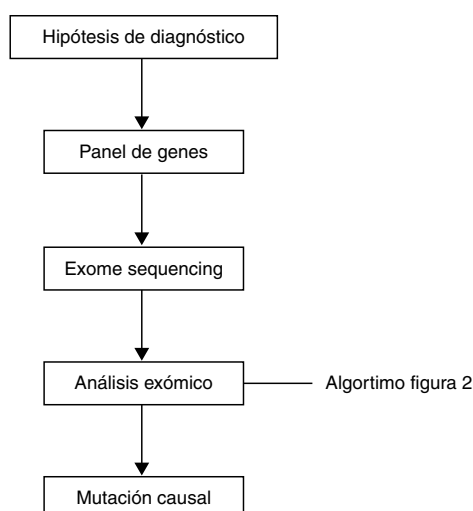


Figura 7 – Algoritmo de análisis del caso 3.

En el *exoma 1* se destacan las siguientes mutaciones en los genes ARSA Y POLR3A: ARSA: c.G190T:p.V64L, no reportada previamente y con predicción bioinformática de patogenicidad y c.A1055G:p.N352S, previamente reportada y

Tabla 2 – Resumen de la información nucleotídica: exoma 1

Número de muestra	800
Reads totales	93.802.994
Yield totales (bp)	94.474.102,394
Longitud de reads (bp)	1.010
Regiones target (bp)	62.085.286
Promedio de regiones target	152,6
Reads iniciales mapeables (referencia al genoma humano)	93.655.994
% inicial de reads mapeables (sobre el total de reads)	99,8%
Reads no redundantes (duplicados por Picards tools)	49.742.419
% de reads no redundantes (sobre los reads mapeables asignables)	53,1%
Reads únicos no redundantes (únicamente mapeados al genoma humano)	44.987.489
% de reads únicos no redundantes (sobre reads no redundantes)	90,4%
Reads en el blanco (mapeados en regiones target)	30.727.578
% reads blanco (sobre reads non redundantes únicos)	68,3%
% de cobertura en regiones target (mayor a 1 X)	94,1%
Número de genotipos no target (mayor a 1 X)	54.440.617
% de cobertura de regiones target (mayor a 10 X)	85,0%
Número de genotipos no target (mayor a 10 X)	52.744.592
Promedio de lectura de regiones target	40,3
Número de SNP	72.141
Número de coding SNP	19.747
Número de synonymous SNP	10.271
Número de non synonymous SNP	8.996
Número de of Indels	7.658
Número de coding Indels	356

Tabla 3 – Resumen de la Información nucleotídica: exoma 2

Número de muestra	801
Reads totales	93.706.974
Yield totales (bp)	94.384.104,354
Longitud de reads (bp)	1,010
Regiones target (bp)	62.165.486
Promedio de regiones target	132,6
Reads iniciales mapeables (referencia al genoma humano)	93.645.894
% inicial de reads mapeables (sobre el total de reads)	99,8%
Reads no redundantes (duplicados por Picards tools)	49.842.419
% de reads no redundantes (sobre los reads mapeables asignables)	53,1%
Reads únicos no redundantes (únicamente mapeados al genoma humano)	44.787.469
% de reads únicos no redundantes (sobre reads no redundantes)	90,3%
Reads en el blanco (mapeados en regiones target)	30.427.278
% reads blanco (sobre reads no redundantes únicos)	67,2%
% de cobertura en regiones target (mayor a 1 X)	94,4%
Número de genotipos no target (mayor a 1 X)	54.340.516
% de cobertura de regiones target (mayor a 10 X)	84,0%
Número de genotipos no target (mayor a 10 X)	52.754.692
Promedio de lectura de regiones target	40,1
Número de SNP	72.314
Número de coding SNP	19.647
Número de synonymous SNP	10.172
Número de non synonymous SNP	8.776
Número de Indels	7.648
Número de coding Indels	366

causa conocida de seudodeficiencia de arilsulfatasa; POLR3A: c.G3781A:p.E1261K y c.G3014A:p.R1005H, ambas ausentes en las bases de datos poblacionales y con predicción bioinformática de patogenicidad.

En el *exoma 2*, dada la presencia de consanguinidad entre los padres, el análisis se centró en variantes homocigotas. Destaca la variante en homocigosis en el gen GRIK2: p.Arg198*, con predicción de patogenicidad por herramientas bioinformáticas.

En el *exoma 3* destacan 4 variantes en el gen SPG11 con respecto a la secuencia de referencia. Una de ellas, en homocigosis, rs3759871, se encuentra presente en bases de datos poblacionales con una frecuencia para el alelo G de 49%. Se encontraron otras 3 en heterocigosis, no previamente reportadas: c.6763insA; c.6726A>T, p.Q2242H y c.617insT. Las 2 primeras tienen predicción de patogenicidad según las herramientas bioinformáticas utilizadas.

Validación por Sanger

Las variantes en los genes POLR3A, SPG11 y GRIK2 fueron validadas por Sanger en cada uno de los pacientes correspondientes. En el caso 1 para POLR3A, la búsqueda de las mismas en los respectivos padres mostró una segregación perfecta.

Tabla 4 – Resumen de la información nucleotídica: exoma 3

Número de muestra	802
Reads totales	93.714.994
Yield totales (bp)	94.374.103,324
Longitud de reads (bp)	1.010
Regiones target (bp)	62.165.486
Promedio de regiones target	132,6
Reads iniciales mapeables (referencia al genoma humano)	93.635.864
% inicial de reads mapeables (sobre el total de reads)	99,7%
Reads no redundantes (duplicados por Picards tools)	49.822.469
% de reads no redundantes (sobre los reads mapeables asignables)	53,3%
Reads únicos no redundantes (únicamente mapeados al genoma humano)	44.776.457
% de reads únicos no redundantes (sobre reads no redundantes)	90,2%
Reads en el blanco (mapeados en regiones target)	30.417.268
% reads blanco (sobre reads no redundantes únicos)	67,1%
% de cobertura en regiones target (mayor a 1 X)	94,6%
Número de genotipos no target (mayor a 1 X)	54.320.916
% de cobertura de regiones target (mayor a 10 X)	84,0%
Número de genotipos no target (mayor a 10 X)	52.774.782
Promedio de lectura de regiones target	40,4
Número de SNP	72.114
Número de coding SNP	19.547
Número de synonymous SNP	10.276
Número de non synonymous SNP	8.674
Número de of Indels	7.658
Número de coding Indels	357

Respecto a SPG 11, se buscó segregación en una muestra de madre y de hermano asintomático. No pudo investigarse en el padre por haber fallecido previamente. La madre solo es heterocigota para la variante c.6763insA, mientras que el hermano no es portador de ninguna de ellas. Se infiere que el padre portaría el haplotipo c.6726A>T, p.Q2242H y c.617insT. En este caso, los resultados obtenidos en las 3 muestras analizadas, junto a los hallazgos del análisis de segregación y a las predicciones bioinformáticas de patogenicidad, indican que el probable haplotipo patogénico, en heterocigosis compuesta, es c.6763insA y c.6726A>T, p.Q2242H.

En el caso 2, GRIK2, la validación se realizó en el paciente y en su hermana, confirmandose dicha mutación. Posteriormente, también se confirmó la presencia de la variante en sus padres.

Hallazgos incidentales

El reporte de los hallazgos incidentales para cada paciente se muestran en las tablas 5-7.

Discusión

Para el abordaje genómico de la patología neurológica resulta necesaria la exploración de diferentes herramientas bioinformáticas con el objetivo de establecer algoritmos de utilidad en el manejo e interpretación de información. Diversos estudios acuerdan en que, dada la gran cantidad de recursos disponibles, no existe una manera unívoca de alcanzar un mismo resultado, pero que, sin embargo, resulta útil la propuesta de una sistematización en el análisis de los datos³.

En el caso 1, se utilizó la secuenciación del exoma para resolver el caso de un paciente con sospecha clínica de leucodistrofia y diagnóstico no definido por los métodos complementarios utilizados anteriormente. Partiendo de una hipótesis clínica y de la construcción de un panel de 64 genes candidatos, esta técnica ha demostrado ser eficaz para el enfoque diagnóstico de esta condición, genética y fenotípicamente muy heterogénea, y con superposición en sus formas de presentación, donde se estima que entre el 30 y el 40% de los individuos permanecen sin un diagnóstico definitivo después de una extensa evaluación²¹. Las mutaciones encontradas son consistentes con las hipótesis clínicas planteadas anteriormente. Para el gen ARSA, la mutación c.A1055G:p.N352S es una causa conocida de pseudodeficiencia de arilsulfatasa. Dicho hallazgo también se correlaciona con los estudios neurometabólicos previos de la paciente²². POLR3A es un gen que codifica para la subunidad mayor de la ARN polimerasa III humana²³. Ocho mutaciones en este gen se han reportado como patogénicas y asociado al síndrome 4H: leucodistrofia, ataxia, hipomielinización, hipodondia, hipogonadismo hipogonadotrófico²⁴⁻²⁶. Las principales manifestaciones clínicas de este paciente coinciden con esta entidad. Una de las mutaciones encontradas en POLR3A había sido recientemente identificada como patogénica, mientras que c.G3014A:p.R1005H no estaba reportada previamente, pero con una alta patogenicidad predicha por las herramientas bioinformáticas.

En el segundo caso, ante un diagnóstico clínico de retraso madurativo, epilepsia y distonía pero sin hipótesis etiológica, se parte de una hipótesis de diagnóstico molecular libre. GRIK2 codifica para el receptor ionotrópico de glutamato tipo 6. Mutaciones en GRIK2 han sido reportadas en 2 familias con retraso mental no sindrómico^{27,28}. Está descrito el papel de la neurotransmisión glutamatérgica en las funciones

Tabla 5 – Hallazgos incidentales: exoma 1

Gen	Fenotipo	Variante encontrada	Patogenicidad	Significado clínico
CACNAS1S	Susceptibilidad familiar a la hipertermia	c.4346T>C p.Val1499Gly het non-sym	Por predicción bioinformática	Susceptibilidad a presentar hipertermia maligna con la exposición a determinados fármacos y relajantes musculares

Tabla 6 – Hallazgos incidentales: exoma 2

Gen	Fenotipo	Variante encontrada	Patogenicidad	Significado clínico
CACNAS1S	Susceptibilidad familiar a la hipertermia	c.4346T>C p.Val1499Gly het non-sym	Por predicción bioinformática	Susceptibilidad a presentar hipertermia maligna con la exposición a determinados fármacos y relajantes musculares

Tabla 7 – Hallazgos incidentales: exoma 3

Gen	Fenotipo	Variante encontrada	Patogenicidad	Significado clínico
CACNAS1S	Susceptibilidad familiar a la hipertermia	c.4346T>C p.Val1499Gly het non-sym	Por predicción bioinformática	Susceptibilidad a presentar hipertermia maligna con la exposición a determinados fármacos y relajantes musculares
MYBPC3	Miocardiopatía dilatada	c.2992C>G p.Gln98Glu het non-sym	Conocida	Portador de esa variante. Se piensa que el mecanismo de herencia es recesivo. Implicaría un mayor riesgo de transmisión a la descendencia

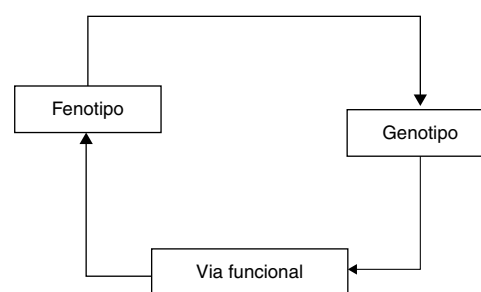
mentales superiores y las consecuencias de su alteración en el retraso mental²⁹. Por otro lado, puede destacarse que este es el primer caso reportado de mutaciones en GRIK2 en el contexto de retraso mental sindrómico (plus epilepsia y distonía), quizás como consecuencia de la probable ausencia de expresión de GRIK2 merced a la presencia en homocigosis de una mutación sin sentido (o de stop prematuro en la traducción proteica).

En el caso 3, nuestra hipótesis inicial diagnóstico fue la de una paraparesia espástica de herencia autosómica recesiva. Si bien el hallazgo en la RM de adelgazamiento del cuerpo caloso y la presencia de retraso mental reducen el espectro de diagnósticos diferenciales, existen mutaciones descritas en al menos 10 genes, que podrían coincidir con el cuadro clínico de la paciente, siendo SPG11 y 15 indiferenciables desde este punto de vista clínico^{30,31}. Los hallazgos en el examen físico y los hallazgos imagenológicos coinciden con los casos previamente reportados de pacientes con mutaciones en SPG11³², quedando demostrada la utilidad y el coste-efectividad del estudio mediante exoma de este grupo de patologías neurológicas cada vez más caracterizadas e individualizadas molecularmente que hasta hace no mucho años eran consideradas dentro de un gran síndrome conocido como *Strumpell Lorrain*.

Es así que en cada paciente, mediante la aproximación diagnóstica genómica, partiendo de una evaluación clínica profunda, se pudo establecer un correlato sólido basado en evidencia científica entre fenotipo, genotipo y vía funcional afectada, otorgando a estos hallazgos validez y revalorizando la importancia de la evaluación semiológica y la interpretación al momento de usar herramientas bioinformáticas de análisis; generándose de esta manera un círculo virtuoso en el abordaje de la enfermedad (fig. 8).

En relación con los hallazgos incidentales, si bien se realizó bajo las recientemente existentes recomendaciones de la Asociación Americana de Genética Humana⁷, este aspecto continúa siendo motivo de grandes debates y controversias^{33,34}.

Con la caída progresiva en los costes de secuenciación, la llegada masiva de estas tecnologías al sistema de salud no tardará muchos años. El campo de las enfermedades neurológicas es uno de los más susceptibles a ser modificado por

**Figura 8 – Círculo virtuoso de la aproximación diagnóstica genómica.**

su implicación en investigación traslacional³⁵. Los últimos 20 años han sido un momento emocionante en la genética humana. Los recientes avances en la secuenciación van a transformar nuestro conocimiento de cómo la variación genética contribuye a la enfermedad humana. Seguirán representando un desafío el análisis de datos, el manejo de los hallazgos incidentales, el valor de las variantes de significado incierto y los aspectos éticos en relación con la información que se brinda a los pacientes.

Optimismo y prudencia. Paso a paso, el futuro es ahora.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bras J, Guerreiro R, Hardy J. Use of next-generation sequencing and other whole-genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neuroscience*. 2012;13:453-64.
2. Wright C, Burton H, Hall A, Moorthe S, Pokorska-Bocci A, Sagoo G, et al. Next steps in the sequence. PGH Foundation; 2011. ISBN 978-1-907198-08-3.
3. Goldstein DB, Allen A, Keebler J, Margulies EH, Petrou S, Petrovski S, et al. Sequencing studies in human genetics: Design and interpretation. *Nat Rev Genet*. 2013;14:460-70, doi:10.1038/nrg3455.

4. Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J, Jiang L, Lam HY, Chen R, et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*. 2012;148:1293-307.
5. Zhi D, Chen R. Statistical guidance for experimental design and data analysis of mutation detection in rare monogenic Mendelian diseases by exome sequencing. *PLoS One*. 2012;7.
6. Solomon BD, Hadley DW, Pineda-Alvarez DE, NISC Comparative Sequencing Program, Kamat A, Teer JK, et al. Incidental medical information in whole-exome sequencing. *Pediatrics*. 2012;129:e1605-11, doi:10.1542/peds.2011-0080.
7. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15:565-74, doi:10.1038/gim.2013.73.
8. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25:1754-60.
9. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAM tools. *Bioinformatics*. 2009;25:2078-9.
10. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:e164.
11. Yandell M, Huff C, Hu H, Singleton M, Moore B, Xing J, et al. A probabilistic disease-gene finder for personal genomes. *Genome Res*. 2011;21:1529-42, doi:10.1101/gr.123158.111.
12. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:308-11.
13. Clarke L, Zheng-Bradley X, Smith R, Kulesha E, Xiao C, Toneva I, et al. The 1000 Genomes Project: Data management and community access. *Nat Methods*. 2012;9:459-62, doi:10.1038/nmeth.1974.
14. Meyer LR, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Kuhn RM, Wong M, et al. The UCSC Genome Browser database: Extensions and updates 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:D64-9. Database issue. doi:10.1093/nar/gks1048.
15. 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;337:64-9, doi:10.1126/science.1219240.
16. Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:W452-7. Web Server issue. doi:10.1093/nar/gks539.
17. González-Pérez A, López-Bigas N. Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score Condel. *Am J Hum Genet*. 2011;88:440-9.
18. 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 Comput Biol*. 2010;6:e1001025.
19. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*. 2010;42:30-5.
20. Liekens AM, De Knijf J, Daelemans W, Goethals B, De Rijk P, Del-Favero J. BioGraph: Unsupervised biomedical knowledge discovery via automated hypothesis generation. *Genome Biol*. 2011;12:R57, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r57.
21. Schiffmann R, van der Knaap MS. Invited article: An MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology*. 2009;72:750-9.
22. Coulter-Mackie M, Gagnier L. Two new polymorphisms in the arylsulfatase A gene and their haplotype associations with normal, metachromatic leukodystrophy and pseudodeficiency alleles. *Am J Med Genet*. 1997;73:32-5.
23. Dieci G, Fiorino G, Castelnuovo M, Teichmann M, Pagano A. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet*. 2007;23:614-22.
24. Potic A, Brais B, Choquet K, Schiffmann R, Bernard G. 4 H syndrome with late-onset growth hormone deficiency caused by POLR3A mutations. *Arch Neurol*. 2012;69:920-3, doi:10.1001/archneurol.2011.1963.
25. Terao Y, Saitsu H, Segawa M, Kondo Y, Sakamoto K, Matsumoto N, et al. Diffuse central hypomyelination presenting as 4 H syndrome caused by compound heterozygous mutations in POLR3A encoding the catalytic subunit of polymerase III. *J Neurol Sci*. 2012;320(1-2):102-5.
26. Bernard G, Chouery E, Putorti ML, Tetreault M, Takanohashi A, Carosso G, et al. Mutations of POLR3A encoding a catalytic subunit of RNA polymerase pol III cause a recessive hypomyelinating leukodystrophy. *Am J Hum Genet*. 2011;89:415-23, doi:10.1016/j.ajhg.2011.07.014.
27. Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann R, et al. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2007;81:792-8, doi:10.1086/521275.
28. Mhamdi O, Kharrat M, Mrad R, Maazoul F, Chaabouni Bouhamed H. Non-syndromic autosomal recessive mental retardation in Tunisian families: Exclusion of GRIK2 and TUSC3 genes. *Tunis Med*. 2011;89:479-84, doi:/article-medicale-tunisie.php?article=1720 [pii].
29. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14:383-400, doi:10.1038/nrn3504.
30. Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G. Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci*. 2012;318(1-2):1-18.
31. Schüle R, Schlipf N, Synofzik M, Klebe S, Klimpe S, Hehr U, et al. Frequency and phenotype of SPG11 and SPG15 in complicated hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80:1402-4, doi:10.1136/jnnp.2008.167528.
32. Tang B, Chen X, Zhao GH, Shen L, Yan XX, Jiang H, et al. Clinical features of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum: Report of 5 Chinese cases. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117:1002-5.
33. Parens E, Appelbaum P, Chung W. Incidental findings in the era of whole genome sequencing? *Hastings Cent Rep*. 2013;43:16-9, 10.1002/hast.189.
34. Rosenblatt DS. Who's on first in exome and whole genome sequencing? Is it the patient or the incidental findings? *Mol Genet Metab*. 2013;S1096-7192(13)00188-1. doi:10.1016/j.ymgme.2013.06.001
35. Coppola G, Geschwind DH. Genomic medicine enters the neurology clinic. *Neurology*. 2012;79:112-4, doi:10.1212/WNL.0b013e31825f06d9.