

## Expandiendo las fronteras de la tecnología genómica en Latinoamérica: medicina de precisión Made in Argentina

German Biagioli<sup>1,3</sup>, Sebastián A. Vishnopolka<sup>3,4</sup>, Guadalupe Buda<sup>3,4</sup>, Jonathan Zaiat<sup>2,4</sup>, Nelba Pérez<sup>3,4</sup>, María T. Bernardi<sup>3,4</sup>, Geronimo Dubra<sup>2</sup>, Sergio I. Nemirovsky<sup>4</sup>, Juan P. Bustamante<sup>4,5</sup>, Adrián G. Turjanski<sup>3,4</sup> y Marcelo A. Marti<sup>3,4</sup>

1 Departamento de Química Biológica,

2 Instituto de Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,

3 BITGENIA,

4 Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN) CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

5 Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Argentina.

Recibido:

**Recibido en:** 04/04/2019

| Aceptado:

**Aceptado en:** 17/04/2019

Contacto: Marcelo Martí - marti.marcelo@gmail.com

### Resumen

Con el advenimiento del siglo XXI la medicina está a las puertas de un cambio de paradigma, producto de las tecnologías de secuenciación masiva que permiten obtener, a un costo accesible, la información genómica de un individuo, abriendo el camino a una medicina verdaderamente personalizada y de precisión. Los primeros beneficiados por éste cambio son aquellos pacientes que padecen algunas de las más de 8000 enfermedades genéticas, al poder acceder a un potencial diagnóstico molecular certero. En Argentina, estas enfermedades afectan a más de 1 millón de habitantes, y determinar la mutación responsable es fundamental para arribar a un diagnóstico y permitir el desarrollo de futuros tratamientos. Los esquemas de aplicación de tecnología genómica en la clínica sin embargo, no están exentos de dificultades, particularmente en países en vías de desarrollo debido a la dificultad de acceso a las mismas, y a la escasa formación de los profesionales en los aspectos necesarios para su implementación.

En este contexto en el año 2016, en el marco de una colaboración entre Bitgenia y un grupo de investigación en genómica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires se lanzó la campaña "100 exomas" con el objetivo realizar la secuenciación y análisis sin costo de 100 exomas de pacientes con diagnóstico presuntivo de una enfermedad genética poco frecuente. Los resultados muestran que la tasa de éxito -casos dónde se llegó a diagnóstico – está entre el 30-50% lo que

es consistente con estudios realizados a nivel internacional. Varios de los casos, además han permitido encontrar variantes novedales que representan el punto de partida para el estudio de los fenómenos moleculares subyacentes al desarrollo patológico, algunos de los cuales han dado lugar a publicaciones de primer nivel en el marco de colaboraciones internacionales [1] [2].

En resumen el desarrollo exitoso de la campaña “100 Exomas” es una clara prueba de concepto de que es posible implementar a nivel local servicios de diagnóstico molecular basados en secuenciación de próxima generación.

Palabras clave: Secuenciación de próxima generación, NGS, Exoma, Variante, Enfermedades genéticas

## Summary

21st century biology promises to revolutionize medicine due to the emergence of Next Generation Sequencing technologies that allow obtaining at an affordable cost, each person genetic profile, thereby leading to a personal and precision medicine. Main beneficiaries of this progress are those patients suffering from one of the over 8000 rare genetic diseases, which now access a potential precise molecular diagnostics. In Argentina rare diseases affect about 3 million people, and determining the underlying causal mutation is the first and key step towards development of a proper treatment. However, application of genomic technologies in the clinical practice is far from simple, particularly in developing countries due to difficulties in the access to the technologies and the limited knowledge of the health care professionals.

In year 2016, in the context of collaboration between our research group at the university of Buenos Aires and Bitgenia ([www.bitgenia.com](http://www.bitgenia.com)) we launched the 100 exomes project, whose aim was to sequence the exons of 100 patients harboring a rare disease in order to arrive to a potential molecular diagnostic. Our results show that success rate -those cases where a causal pathogenic mutation was found- was between 30-50% of cases, in agreement with other studies. Moreover, several cases, yield variants that were the starting point of molecular studies that for example lead to international collaborations. Our experience also shows that success rate is maximized when professionals from different reads (Physicians, molecular biologists, geneticists, informatitinas) work together, particularly during variant prioritization and interpretation procedure.

In summary, successful development of the “100 exomes” project is a nice proof of concept showing that it is possible to implement next generation sequencing clinical genomic services locally.

Keywords: Next Generation Sequencing, Mendelian Disease, Mutation.

## Introducción

Con el advenimiento del siglo XXI la medicina está a las puertas de un cambio de paradigma producto del desarrollo de las tecnologías NGS (del inglés *Next Generation Sequencing*) que permiten obtener, a un costo accesible cercano a los mil dólares [3], la información genómica de un individuo, abriendo el camino a una medicina verdaderamente personalizada y de precisión [4]. En este nuevo marco del ejercicio de la medicina se pretende complementar a las manifestaciones clínicas y el fenotipo general del paciente, junto a los tratamientos disponibles, con la información genética de fondo del individuo, permitiendo evaluar la interacción entre estos tres dominios, para realizar decisiones precisas en los tres pilares de la medicina: prevención, diagnóstico y tratamiento [5,6].

Como muestran los trabajos en el área, que datan de hace poco menos de 10 años, los primeros beneficiados por la aplicación de las Tecnologías Genómicas en la clínica, son aquellos pacientes que padecen enfermedades genéticas mendelianas, usualmente poco frecuentes, al poder acceder a un potencial diagnóstico molecular certero [7][8]. Según Orphanet [9], las Enfermedades poco Frecuentes (EpoF) -mal llamadas raras- son aquellas que afectan a uno de cada 2000 individuos. De acuerdo con el catálogo OMIM [10], en la actualidad se conocen alrededor de 8.000 enfermedades genéticas (la mayoría de ellas de tipo monogénicas), que en conjunto afectan al 7% de la población mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [11]. En Argentina, las enfermedades poco frecuentes -de origen genético, crónico y degenerativo- afectan alrededor de 3,2 millones de habitantes. Determinar la variante genética -históricamente llamada mutación- responsable del desarrollo de la enfermedad es fundamental, no solo para arribar a un diagnóstico, sino también para comprender las bases moleculares de la patología y permitir el desarrollo de posibles futuros tratamientos [12].

Los esquemas de aplicación de tecnología genómica en la clínica para el diagnóstico preciso de enfermedades mendelianas y el potencial hallazgo de nuevos genes o variantes asociados a la enfermedad en cuestión no están, sin embargo, exentos de dificultades [13]. En un experimento, de por ejemplo secuenciación exómica (es decir, secuenciación de las regiones codificantes del genoma), se obtienen decenas de miles de variantes, muchas de las cuales son novedades y otras, aunque reportadas previamente, no se cuenta con información de su frecuencias alélicas y son muchas veces de significado incierto [14]. En este contexto, es fundamental contar con un protocolo informático eficiente para priorizar las variantes encontradas y un entrenamiento en genómica por parte del especialista que permita valorar las mismas de manera adecuada en el contexto de la historia clínica del paciente [15]. En países en vías de desarrollo - como la Argentina- estas dificultades se ven exacerbadas debido a la dificultad de acceso a las tecnologías genómicas y la escasa formación de los profesionales en los aspectos técnicos y clínicos necesarios para su implementación.

En este contexto, en el año 2016, con el objetivo de brindar capacitación y acceso a las tecnologías genómicas y, en el marco de una colaboración entre Bitgenia y un grupo de investigación en genómica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, se lanzó la campaña "100 exomas". La misma tuvo como objetivo realizar la secuenciación y análisis sin costo de 100 exomas de pacientes con diagnóstico presuntivo de una enfermedad genética poco frecuente que requiriese de un diagnóstico molecular y que, por la variedad de genes involucrados y/o la complejidad de la sintomatología clínica, requieran en particular de un análisis de exomas. Buscando, mediante el análisis e interpretación de los resultados obtenidos, trabajar junto a los profesionales de la salud participantes, con la intención de desarrollar y difundir la genómica y capacidad bioinformática en el país. La campaña tuvo alcance nacional, los casos fueron seleccionados de más de 10 provincias Argentinas.

Los resultados de la campaña, como se describen a continuación, junto con esfuerzos previos del mismo grupo de trabajo, han tenido un enorme impacto en la comunidad biomédica, generando conocimiento de gran relevancia que ha trascendido las fronteras nacionales [1] [9].

## **Métodos**

### *Protocolo de enrolamiento clínico.*

El reclutamiento de casos se llevó a cabo a través de la difusión de la campaña "100 exomas" en instituciones de la salud, tanto públicas como privadas, dentro del territorio argentino. Se realizaron

entrevistas con el personal médico interesado, durante las cuales se presentaron aquellos casos que se pensara pudieran beneficiarse de una secuenciación exómica. Como criterio de selección se dio prioridad a aquellos casos para los cuales se tuviera un fuerte indicio de enfermedad hereditaria monogénica, con un buen diagnóstico clínico y conocimiento previo de la etiología molecular, es decir, que existieran evidencias previas de mutaciones en genes candidatos que resulten en el fenotipo asociado al diagnóstico. También fue necesario descartar en esta etapa aquellos casos que tuvieran una alta probabilidad de ser causados por modificaciones genéticas no detectables por medio de la secuenciación de exomas, como inserciones y deleciones grandes (mayores a 150 pares de bases), variaciones en el número de copias, re arreglos cromosómicos o mutaciones en regiones no codificantes del genoma.

Una vez preseleccionados los casos, se procedió a realizar para cada uno un reporte de factibilidad. El mismo consistió en analizar: i) la historia clínica y familiar del paciente, ii) las asociaciones genotipo-fenotipo conocidas para la patología, iii) trabajos previos que dieran cuenta del uso de tecnologías NGS para casos similares, y iv) la existencia de paneles de secuenciación comerciales que cubran las enfermedades descritas relacionadas con el diagnóstico presuntivo. A partir de esto se confeccionó una lista de genes candidatos para los cuales se analizó la cobertura horizontal teórica para el kit de captura utilizado y, finalmente, se asignó a cada caso un nivel de factibilidad cualitativo (bajo - medio - alto), junto con una propuesta sobre a quiénes secuenciar del grupo familiar.

De esta manera, cada análisis de factibilidad confeccionado fue entregado a los médicos responsables de los casos clínicos, quienes, en base al nivel de factibilidad asignado y la propuesta de secuenciación, tomaron la decisión final sobre continuar o no con el estudio. En caso afirmativo, en cada caso se procedió a secuenciar el exoma de cada paciente/ grupo familiar.

### *Secuenciación de las muestras*

Una vez firmado el consentimiento por parte de los pacientes (ver sección “Consentimiento informado y hallazgos incidentales”), se procedió a la extracción de sangre periférica y la purificación de ADN de linfocitos circulantes, mediante kits comerciales a una concentración final mínima de 50 ng/ul y una pureza mayor a 1,8 en relación de absorbancia 260nm/280nm. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 2% para evaluar la calidad del ADN. La captura exómica se realizó con el kit de “*Agilent SureSelect Human All Exon V5*” y las muestras fueron secuenciadas mediante la tecnología “*Illumina HiSeq 4000*” con una longitud de lectura de 100 pares de bases y una profundidad promedio de 100X. Todas las muestras fueron anonimizadas en todos los pasos del análisis desde la extracción de sangre hasta la entrega de resultados finales al médico responsable.

### *Protocolo de procesamiento de datos*

Las lecturas pareadas obtenidas fueron alineadas contra el genoma de referencia de “*The Genome Reference Consortium*” en su versión 37 (GRCh37), por medio del software *Barrow Wheelers Aligner* (BWA) [16]. El procesamiento de las lecturas alineadas se llevó a cabo según las recomendaciones del *Genome Analysis Toolkit* (GATK) [17-19]. En primer lugar se procedió a marcar las lecturas que puedan ser producto de duplicaciones de PCR por medio del software PICARD, se detectaron regiones con varias lecturas de baja calidad y se realizó un realineado local con el fin de detectar posibles deleciones o inserciones pequeñas. El siguiente paso consistió en detectar las diferencias entre el consenso de las lecturas obtenidas y el genoma de referencia, en un proceso denominado “llamado de variantes” (del inglés “*variant calling*”) mediante la herramienta “*Haplotype Caller*” de GATK. A partir de la información de calidad

de las variantes se realizó un filtrado, con el protocolo “*Hard Filtering*”, según las recomendaciones detalladas por GATK, con el fin de detectar y filtrar aquellos variantes llamadas de baja calidad. Como último paso se procedió a anotar el VCF (vincular las variantes con datos biológicos) con información externa de bases de datos utilizando el paquete de software SnpEff/SnpSift [20,21]. Para ello se utilizaron las siguientes fuentes: dbSNP, ExAC [22], 1000 Genomas [23] para frecuencia poblacional, ClinVar [24] para la relevancia clínica y Polyphen [25], SIFT [26] y MutationTaster [27] para las predicciones de patogenicidad.

### *Protocolo de priorización de variantes*

A partir de la información anotada en las variantes, se seleccionaron aquellas con mayor probabilidad de ser causantes del cuadro clínico presentado, en un proceso denominado priorización de variantes. Para ello se utilizó la herramienta informática B\_Platform, desarrollada por Bitgenia en conjunto con el grupo de investigación en genómica de FCEN de la UBA. Este software funciona dentro de un servidor accesible por la red que facilita las consultas sobre los datos de variantes de cada caso, así como el acceso a los datos por parte del equipo médico. Todos los casos fueron sometidos al protocolo de priorización de variantes diseñado previamente, con la finalidad de descartar variantes que no cumplieran con los requisitos para ser consideradas como “patogénicas” o “posiblemente patogénicas” según los criterios del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) [28] y de enriquecer los resultados con aquellas variantes candidatas a ser las causales de la sintomatología presentada. Dicho protocolo consta de grupos de filtros (descritos en el figura 1), que se aplican secuencialmente y para los cuales se analizan los resultados de manera detallada.

fig1

**Figura 1:** *Esquema de priorización de variantes.* Según la historia clínica, se seleccionaron genes candidatos a albergar variantes patogénicas que puedan explicar la patología clínica. En primer lugar se buscaron variantes con reportes previos de patogenicidad en bases de datos de asociaciones clínicas. Luego se procedió a buscar variantes con alto impacto y baja frecuencia poblacional, según el modelo de herencia ó variantes nóveles en los genes candidatos. En casos donde no se encontraron variantes relevantes en estos primeros pasos, se continuó con la búsqueda de variantes nóveles de impacto alto o moderado por fuera del panel de genes propuesto, pero aún en genes relacionados a la patología.

Cada variante fue categorizada primero de acuerdo a su impacto a nivel molecular. Se le asignó un impacto alto a aquellas variantes que resultan en ganancia o pérdida de codones de inicio, finalización de la traducción y/o cambios en el marco de lectura. El impacto se consideró moderado cuando las modificaciones a nivel proteico involucran cambios no sinónimos de un único aminoácido y/o pequeñas inserciones o deleciones que mantengan el mismo marco de lectura. El resto se consideró de impacto bajo. Luego, para cada variante se analizó su frecuencia poblacional (si la hubiera), la evidencia previa de asociaciones clínicas (calificación de ClinVar considerando valores de ClinSig 4 o 5, correspondientes a las categorías “*Likely pathogenic*” y “*Pathogenic*”, respectivamente), el efecto fenotípico previsto, el modelo de herencia para mutaciones ya reportadas en ese gen según OMIM y, si fuera posible, el efecto sobre la estructura y función proteica.

### *Consentimiento informado y hallazgos incidentales.*

Todos los casos analizados formaron parte de: i) protocolos investigación aprobados por los comités de ética de las instituciones que atienden los pacientes, con los consentimientos informados correspondientes; o alternatively ii) casos enmarcados en un proceso de innovación clínica [29] donde el médico

responsable del caso otorga y explica el consentimiento informado al paciente. En todos los casos el análisis se limitó a aquellos genes previamente consensuados con el profesional como directamente relacionados con el diagnóstico presuntivo, para disminuir la posibilidad de hallazgos incidentales. En ninguno de los casos se presentó un hallazgo incidental.

### Resultados

La campaña 100 exomas fue desarrollada bajo el concepto de que la cooperación interinstitucional y la complementariedad disciplinar son esenciales para el éxito de un programa de genómica clínica. En el contexto de Argentina, con 40 millones de habitantes distribuidos heterogéneamente a lo largo y ancho del país con acceso dispar a servicios de salud y con una variedad de especialidades médicas que mostraron interés, se priorizó el contacto directo con los médicos responsables de los casos; limitando el número de casos de cada institución participante. Participaron del proyecto 58 médicos agrupados en 32 instituciones de salud tanto públicas como privadas que incluyen principalmente Hospitales y laboratorios de análisis clínicos (Ver Anexo I). El grupo de análisis fue conformado por bioinformáticos y biólogos moleculares con experiencia en análisis de datos genómicos. En total se procesaron y analizaron 129 exomas correspondientes a 100 casos, con diagnósticos presuntivos de enfermedades asociadas a uno o unos pocos genes -como el síndrome de Sotos, epilepsia mioclónica progresiva- a enfermedades con asociación a decenas (como desórdenes de glicosilación), o incluso centenas de genes -como las Inmunodeficiencias primarias- (Ver listado completo de diagnósticos presuntivos en el Anexo II).

Para analizar el grado de éxito alcanzado, cada caso fue clasificado en una de las siguientes categorías de acuerdo al tipo y nivel de evidencia disponible para las variantes encontradas, y al grado de asociación clínica entre el diagnóstico presuntivo (o los síntomas) del probando y el fenotipo patológico reportado para defectos en el gen que las contenga: i) categoría 1, casos donde se encontró una o más variantes conocidas con evidencia previa (ClinSig 4 o 5) de asociación con el diagnóstico presuntivo ii) categoría 2, casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante nueva potencialmente patogénica, acompañada de una variante conocida en un modelo de heterocigosis compuesta (categoría 2A), o sola en un modelo de herencia dominante (categoría 2B). En caso de que se hayan encontrados dos variantes de estas características en el mismo gen en un modelo de heterocigosis compuesta se clasificó al caso como 2C. iii) Categoría 3, aquellos casos donde se encontró una variante nueva potencialmente patogénica en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico y iv) categoría 4, casos donde no se encontró ninguna variante relevante para ser informada.

**Tabla 1:** Clasificación de los casos de acuerdo a las categorías 1 a 4.

| Categoría |    | Descripción                                                                                                                                                                                                  | # de Casos |   | # de Variantes encontradas |
|-----------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---|----------------------------|
| 1         |    | Casos donde se encontró una o más variantes conocidas con evidencia previa de asociación con el diagnóstico presuntivo.                                                                                      | 31         |   | 45                         |
| 2         | 2A | Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante nueva potencialmente patogénica, acompañada de una variante conocida en un modelo de heterocigosis compuesta. | 27         | 6 | 23                         |

|    |                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2B | Casos14<br>donde<br>se<br>encontró,<br>dentro<br>de<br>los<br>genes<br>asociados<br>al<br>diagnóstico<br>presuntivo,<br>una<br>variante<br>nueva<br>potencialmente<br>patogénica<br>en<br>un<br>modelo<br>de<br>herencia<br>dominante. | 18 |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 2C    | Casos7<br>donde<br>se<br>encontró,<br>dentro<br>de<br>los<br>genes<br>asociados<br>al<br>diagnóstico<br>presuntivo,<br>dos<br>variantes<br>nuevas<br>potencialmente<br>patogénicas<br>en<br>el<br>mismo<br>gen<br>en<br>un<br>modelo<br>de<br>heterocigosis<br>compuesta. | 25  |     |
| 3     | Casos donde se encontró una variante nueva potencialmente patogénica en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico.                                                                                                                                            | 17  | 25  |
| 4     | No se encontró ninguna variante relevante para ser informada.                                                                                                                                                                                                             | 25  | 0   |
| Total | Total de casos secuenciados                                                                                                                                                                                                                                               | 100 | 136 |

De los 100 casos analizados durante la campaña (Tabla 2), 31 corresponden a la categoría 1, que consideramos como casos exitosos y que, dado el conocimiento previo de la variante y su asociación con el fenotipo patológico, representan un diagnóstico certero. Un ejemplo del mismo se presenta en la BOX1.

#### **BOX 1. Caso categoría 1.**

*Un ejemplo de diagnóstico exitoso y certero lo comprende el caso de un paciente masculino adulto, aportado por el Dr. César Crespi del Hospital Interzonal Especializado de Agudos y Crónicos San Juan de Dios de La Plata, con un diagnóstico clínico presuntivo para la enfermedad de Wilson, una patología autosómica recesiva que entre los síntomas principales presenta cirrosis hepática, niveles altos de cobre en orina, con anillos de Kayser-Fleischer y cataratas. Se procedió a secuenciar al probando y al padre, y se priorizo un panel de 11 genes. No se encontraron variantes relevantes en homocigosis por lo que se*

*procedió a buscar la coincidencia de dos variantes heterocigotas en el mismo gen (modelo de heterocigosis compuesta).*

*Se encontraron en el probando dos variantes (una compartida con el padre) en el gen ATP7B, que codifica para la proteína transportadora de cobre ATPasa de tipo P, denominada también proteína de la enfermedad de Wilson, una proteína transmembrana altamente conservada evolutivamente que posee roles esenciales en la fisiología humana, relacionados con el metabolismo del Cobre. Individuos que carecen de proteína ATP7B funcional, evidencian grandes dificultades en las vías de excreción de cobre, dando lugar a la enfermedad de Wilson. Ambas variantes encontradas se encuentran reportadas en Clinvar como patogénicas (NM\_000053.3(ATP7B):c.3207C>A; y NM\_000053.3(ATP7B):c.3955C>T) y han sido relacionadas a la enfermedad de Wilson por varios autores [30-34], poseen una frecuencia alélica muy baja en la base de datos de ExAC (no existen individuos en homocigosis para ninguna de ellas) y son predichas como “disease causing” por los softwares de predicción de patogenicidad.*

*La primera variante corresponde a un cambio de histidina por glutamina en la posición 1069 de la proteína, ha sido ampliamente estudiada y es la mutación más frecuentemente asociada a la enfermedad de Wilson. El mecanismo por el cual la mutación afecta la función, se cree está asociado a la desestabilización del sitio de unión a ATP. La otra mutación generaría un codón de terminación prematuro, que se supone da origen a una proteína truncada no funcional. El hecho de que ambas mutaciones hayan sido previamente reportadas como patogénicas y asociadas a la enfermedad de Wilson, y su correcta cigosidad y segregación en el probando y su padre, resultan en un diagnóstico de máxima confianza.*

En la categoría 2 clasificamos 27 casos. Estos son, desde una perspectiva de descubrimiento, los más interesantes, ya que representan aquellos donde se han encontrado variantes nuevas con un potencial significativo para explicar el fenotipo patogénico. En estos casos es fundamental la evaluación del potencial patogénico de la variante, para lo cual se consideran importantes diversos factores. Por un lado, se debe verificar que la variante posee una cigosidad correcta de acuerdo al modelo de herencia y verificación de la correcta segregación en el grupo familiar. Por ejemplo, en casos de herencia autosómica dominante (AD) la misma debe estar presente en heterocigosis en el probando y ausente en ambos padres (y si hubiera hermanos) sanos. En casos de enfermedades recesivas (AR), usualmente, si no hay consanguinidad, se presenta un modelo de heterocigosis compuesta, donde cada una de las variantes encontradas, está presente en heterocigosis en el probando y en uno (y sólo uno) de los padres.

Por otro lado, es fundamental determinar el potencial patogénico de la variante desde una perspectiva molecular analizando su impacto a nivel del gen o la proteína. En el caso de variantes que introducen un stop prematuro o producen un cambio en el marco de lectura, es razonable suponer que las mismas den lugar a una proteína no funcional. En el caso de que la variante resulte en un cambio de aminoácido, se debe profundizar el análisis considerando el tipo de cambio de residuo, la conservación del mismo en términos evolutivos, la frecuencia poblacional de la variante (si la hubiere), la predicción de patogenicidad por parte de algoritmos bioinformáticos, y si hubiere un análisis del efecto de la misma sobre la estructura proteica. Idealmente, las variantes candidatas deben ser predichas como patogénicas por todas estas propiedades. Ejemplos de estos casos se presentan en el BOX 2, BOX 3 y BOX 4.

## BOX 2. Caso Categoría 2A.

*Paciente masculino con diagnóstico clínico tentativo de epilepsia mioclónica progresiva, aportado por el Dr. Santiago Chacón, del Hospital Centenario de Gualeguaychú, Entre Ríos. En base a toda su historia clínica, se confeccionó una lista de 65 genes a priorizar basándose en paneles existentes, genes extraídos de publicaciones científicas, y aquellos identificados mediante cruce de datos de distintas procedencias, tales como sintomatología del paciente y genes involucrados en patologías similares.*

*Al analizar el exoma del paciente se halló una variante en heterocigosis en el gen EPM2A, siendo éste uno de los dos genes responsables de la patología. La variante resultó causar el cambio de aminoácido arginina 108 por cisteína (c.322C>T) en la proteína laforina, la cual según Genetic Home Reference [35], parece jugar un rol fundamental en la supervivencia de las neuronas. El impacto de dicha variante sobre la estructura de la laforina puede observarse en la Figura 2, realizada mediante un análisis estructural de la proteína a nivel molecular. Dicha variante se encuentra descrita por Clinvar como variante patogénica para epilepsia mioclónica progresiva con código de acceso rs137852915. Por otra parte, en el mismo gen se halló una delección en carácter también heterocigota, no descrita previamente, la cual produce la pérdida de 11 aminoácidos, con el consiguiente corrimiento en el marco de lectura. Dicha delección se encuentra localizada dentro del dominio CBM20 amino terminal (family 20 carbohydrate-binding module) de la proteína laforina, y muy cerca del sitio de unión a maltohexosa.*

*En este contexto, si bien la delección de 11 aminoácidos no ha sido previamente informada (y por ende es de significado incierto), se encuentra en la región de unión a la maltohexosa, por lo que su efecto a nivel molecular y aparición en compañía de la otra variante patogénica ya reportada, ambas en heterocigosis, fortalecen la hipótesis de un caso de heterocigosis compuesta, siendo fuertes candidatas causales de la sintomatología presentada.*

fig2

**Figura 2:** Representación de la estructura cristalográfica de la proteína laforina. Pueden observarse sus dos dominios: tirosina fosfatasa y CBM20. Este último posee un sitio de unión a maltohexosa un azúcar (resaltada en verde), y los aminoácidos involucrados en la unión de dicha molécula se encuentran resaltados en naranja. En la vista ampliada, puede verse cómo la Arg108 contribuye, mediante interacciones de puente de hidrógeno con otros residuos, a la estabilización de la estructura terciaria de CMB20. En la región resaltada en rojo puede observarse que la mutación Arg108 -> Cys imposibilita la formación de los puentes de hidrógeno mencionados, lo cual desestabiliza la estructura del sitio de unión a maltohexosa, resultando en una proteína no funcional.

## BOX 3. Caso Categoría 2B

*Paciente masculino con diagnóstico clínico tentativo de Disregulación Inmune no caracterizada, aportado por la división de Inmunología del "Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan", sin un modelo de herencia definido. En base a análisis genéticos previos, los profesionales ya habían descartado la presencia de mutaciones en 4 genes (ALP, CASP8, CASP10, FAS) relacionados con los síntomas del paciente. Confeccionamos una lista de genes candidatos, tomando como punto de partida los genes causantes de más de 150 formas distintas de inmunodeficiencias primarias, a los que agregamos panel de genes para Linfocitosis congénita de células B y genes contenidos en paneles comerciales para*

desregulaciones inmunes. En total el panel de genes a priorizar contenía 207 genes. Realizando filtros en las variantes obtenidas de este conjunto de genes, (frecuencia poblacional menor al 1%, heterocigosis e impacto alto/moderado) se encontró una variante de tipo missense dentro de la región codificante del gen CARD11 (Caspase Recruitment Domain family member 11).

La variante encontrada produce el cambio de la treonina 117 por una prolina (p.Thr117Pro, NM\_032415(CARD11):c.349A>C) y es considerada como patogénica por los predictores bioinformáticos SIFT, Polyphen y Mutation Taster; habiéndose reportado previamente en bibliografía un cambio aminoacídico en la misma posición (p.Thr117Ala) también en heterocigosis, en un paciente con un trastorno genético poco frecuente asociado con linfocitosis congénita de células B [36]. La prolina es un aminoácido no cargado que tiende a rigidizar la estructura y afectar, de esta forma, la función de la proteína resultante. Mutaciones similares en CARD11 han sido asociadas a la ganancia de función de un dominio funcional de la proteína, que normalmente desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la misma en un estado inactivo, activando en las mutantes espontáneamente a NF- $\kappa$ B y promoviendo la supervivencia de células B humanas de linfoma in vitro [37]. El gen CARD11 se encuentra asociado con el desarrollo de “Expansión de células B con NF $\kappa$ B y anergia de células T” (OMIM: 616452); trastorno con el que el paciente presenta muchos síntomas solapados, y en un modelo Dominante, consistente con la cigosidad de la variante encontrada. De esta forma, se la considera como potencialmente responsable del fenotipo observado con un alto grado de confianza, si bien es una variante novel y por lo tanto de significado incierto.

#### **BOX 4: Caso Categoría 2C**

Un ejemplo de esta categoría lo comprende el caso de un paciente femenino adulto con un diagnóstico clínico presuntivo de síndrome atáxico-oculomotor de tipo 2 (OMIM: 606002), una patología autosómica recesiva que presenta varios síntomas neuromotores. Para analizar el mismo se secuenció al probando y se analizó un panel de 222 genes. No se encontraron variantes relevantes en homocigosis, por lo que se procedió a buscar la coincidencia de dos variantes heterocigotas en un mismo gen (modelo de heterocigosis compuesta). Con este modelo de herencia, se encontraron dos variantes noveles en el gen SETX (OMIM: 608465), un gen que codifica para la proteína senataxina y se expresa en un amplio rango de tejidos, incluyendo el cerebro, la médula espinal y los músculos. La primera variante (p.Ser507fs: c.1518dupA) es de alto impacto funcional, ya que produce el corrimiento del marco de lectura por la adición de un nucleótido; mientras que la segunda (p.Val2385Gly: c.7154T>G) es una variante de cambio de aminoácido, de una valina a una glicina, un aminoácido más pequeño y no quiral. Ambas variantes son predichas como “disease causing” por “Mutation Tester”. Mutaciones reportadas en este gen están asociadas al desarrollo de un trastorno neurodegenerativo caracterizado por el inicio en la edad adulta de ataxia cerebelosa progresiva, neuropatía periférica senso-motora axonal y aumento de la alfa-fetoproteína sérica [38,39], síntomas que se solapan con la Historia Clínica del probando.

En resumen, la predicción del efecto patogénico de ambas variantes y su presencia en el principal gen candidato, sugieren fuertemente que ambas variantes combinadas podrían ser las responsables del fenotipo observado.

La categoría 3, con 17 casos, comprende aquellos que representan hipótesis de trabajo, tanto clínicas como moleculares. En estos casos, si bien se han encontrado variantes de significado incierto, éstas son desde el punto de vista molecular potencialmente patogénicas cumpliendo la mayoría de los criterios de análisis a nivel gen y/o proteína. En este contexto, los pasos a seguir son por un lado verificar la correcta segregación y cigosidad de la variante en el grupo familiar y en concordancia con el modelo de herencia de la enfermedad, si el mismo estuviera establecido. Por otro lado, se podría -al igual que con los casos de la categoría 2- avanzar con ensayos in-vitro para analizar el efecto de la mutación sobre la función proteica. En relación con la clínica, el objetivo debe tender a una revisión del solapamiento entre los síntomas presentados por el paciente, y aquellos reportados para otros pacientes con defectos en el gen que contiene la(s) variante(s). Un ejemplo de un caso con este tipo de resultados se presenta en el BOX 5.

### **BOX 5. Caso Categoría 3**

*Paciente pediátrico masculino sin antecedentes familiares relevantes, cariotipo normal y diagnóstico tentativo de Síndrome de Sotos, un desorden autosómico dominante caracterizado, entre otros síntomas, por macrocefalia y crecimiento corporal excesivo en la infancia acompañado de retraso mental, problemas de conducta e hipotonía. La mayoría de los casos de síndrome de Sotos (95%) se producen por mutaciones de novo en el gen NSD1, o deleciones en la región 5q35.3, en la persona afectada. También se reportan algunos casos para mutaciones heterocigotas en el gen NFIX, o mutaciones en el gen APC2, en este último caso siguiendo un modelo autosómico recesivo.*

*A partir de la secuenciación exómica del probando se buscaron, en un primer momento, variantes presentes en los tres genes reportados para el síndrome Sotos, sin encontrarse ninguna con relevancia clínica. Extendiendo la búsqueda a genes asociados a los síntomas reportados en la historia clínica del probando se encontró una variante novel en heterocigosis (NM\_000264(PTCH1):c.1906A>G), en el gen PTCH1, que se traducen en l cambio aminoacídico de asparagina por ácido aspártico en la posición 636 de la proteína Patched-1. Mutation Taster la reporta como patogénica. El gen PTCH1 es considerado un gen supresor de tumores por su rol en la prevención de la proliferación celular incontrolada. Dentro de las patologías asociadas a este gen se encuentra el síndrome de Gorlin o Nevroid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) (OMIM #109400) y es considerada por la bibliografía como una condición que puede confundirse con Síndrome de Sotos [40]. Existe un solapamiento fenotípico moderado con los signos y síntomas del probando, aunque es posible que algunos de ellos que permitan la realización de un diagnóstico diferencial aún no se hayan desarrollado, dada la edad pediátrica del paciente. El síndrome NBCCS presenta herencia autosómica dominante que es compatible con la variante del probando. De esta forma, la variante encontrada se considera como potencialmente responsable del fenotipo observado, si bien es una variante novel y por lo tanto de significado incierto. Una vez informada al médico la analizará junto a la evidencia clínica para validar o rechazar el nuevo diagnóstico hipotético; de ser confirmado, permitirá acompañar la evolución del paciente de manera eficiente.*

Finalmente, la categoría 4 comprende aquellos 25 casos donde no se ha encontrado ninguna variante que pueda explicar el fenotipo observado. Estos casos, si bien se los puede considerar abiertos, la falta de una hipótesis de trabajo luego de un análisis exhaustivo, que puede involucrar dos o hasta tres ciclos de evaluación de genes candidatos, sugiere que poseen una causa molecular subyacente que no ha podido ser determinada por la técnica utilizada.

## Discusión

Los resultados de la iniciativa “100 Exomas”, si bien no representan una cantidad de casos suficientes como para realizar afirmaciones estadísticamente significativas sobre la capacidad de la secuenciación exómica para diagnosticar de manera precisa las causas moleculares de las EPoFs o para avanzar en el descubrimiento de nuevos genes y variantes patogénicas, permiten evaluar en las capacidades locales, con sus virtudes y dificultades, para la implementación de estas tecnologías en contextos de investigación científica e innovación clínica, y compararlos con experiencias realizadas en los países del denominado “primer mundo”. Para llevar adelante la campaña, armamos un protocolo de trabajo con una fuerte base interdisciplinaria, desde los médicos responsables de los casos clínicos a biólogos, bioinformáticos y expertos en computación, que permitió un entendimiento completo y exhaustivo de las características fenotípicas del paciente a las causas moleculares intrínsecas.

Si consideramos aquellos casos donde se encontraron variantes de asociación clínica conocida (categoría 1) o con altas chances de ser patogénicas (categoría 2) como exitosos, vemos que la tasa de éxito es superior al 50%, lo que es levemente superior a lo reportado en la literatura [6]. La aparente performance superior podría deberse a dos motivos: ya sea una selección más sesgada de los casos con alta chance de obtener un diagnóstico y/o la definición de caso exitoso. Si, por ejemplo, consideramos como casos exitosos sólo aquellos incluidos en la categoría 1, entonces el porcentaje de casos que han llegado a un diagnóstico se acerca más al 30%, que es el valor usualmente tomado como de referencia para análisis exómico.

Desde una perspectiva de ciencia básica, los casos más interesantes son los de categoría 2, donde se encuentran una (o dos) variantes nóveles, con una alta chance de ser responsable del fenotipo observado. Estas variantes muchas veces representan el punto de partida para el estudio de los fenómenos moleculares subyacentes al desarrollo patológico, al señalar cómo su efecto sobre la función proteica repercute en la fisiología molecular y celular. Un ejemplo exitoso de este tipo de caso, derivado de la presente campaña, es el de una inmunodeficiencia combinada que se origina en una mutación en heterocigosis en el gen CARD11, la cual comprende una inserción de 14 aminoácidos. La misma fue estudiada en colaboración con un grupo del Instituto Nacional de Salud de EEUU (NIH), junto con otras tres mutaciones, todas en heterocigosis en diferentes dominios de CARD11, mostrando que el efecto patogénico se debía a una pérdida de función con interferencia sobre la proteína salvaje. Esto dió lugar a un cuadro autosómico dominante, que puso en evidencia detalles del funcionamiento de diferentes vías de señalización de los linfocitos T, algo que culminó en un trabajo en la prestigiosa revista Nature Genetics [9].

Otros de los casos de esta categoría que han dado lugar a resultados del mismo tipo se encuentran actualmente siendo analizadas en el grupo y en el marco de colaboraciones nacionales e internacionales.

Es interesante también analizar cuáles son los motivos subyacentes que resultan en casos donde no se ha llegado al diagnóstico molecular, es decir, aquellos casos de categoría 3 o 4 donde falle la hipótesis, no se confirme la asociación propuesta entre genotipo (variante) y fenotipo del paciente y/o la variante propuesta no segregue adecuadamente en el grupo familiar. En este sentido, hay diversos motivos asociados a un resultado de este tipo, dependiendo principalmente de la naturaleza del caso. En algunos casos puede suceder que las mutaciones responsables no fueron reveladas por el tipo de experimento de secuenciación, ya sea por que están en exones pobremente capturados y/o regiones no codificantes o porque corresponden a inserciones o deleciones de tamaño superior al que puede ser determinado por la secuenciación exómica (comúnmente conocidas como variaciones en el número de copias). En estos casos

la única posibilidad para avanzar hacia el diagnóstico es realizar una secuenciación genómica completa. En otros casos, un resultado de este tipo puede estar asociado a la falta de mejores -en términos de la precisión sintomatológica- relaciones genotipo-fenotipo. Este área es una de las de mayor expansión, y existen varias iniciativas internacionales para promover su desarrollo. Una de ellas, PhenomeCentral es un portal centralizado que permite cargar casos de EPoF no resueltos. Dicho portal utiliza un sistema automático para evaluar similitud de fenotipos y alertar a los investigadores sobre las coincidencias halladas para, mediante la evaluación de múltiples casos y cooperación internacional, poder reforzar hipótesis de asociación variante-fenotipo y/o avanzar hacia ensayos de validación funcional.

Finalmente, resulta relevante evaluar los resultados de la campaña desde una perspectiva asociada al trabajo conjunto de los distintos tipos de profesionales, con sus experiencias y conocimientos especializados requeridos para la implementación de un servicio de diagnóstico genómico. La experiencia de esta campaña permite darle peso y reforzar la siguiente filosofía de trabajo interdisciplinario: si bien la división de tareas es un proceso lógico, práctico y adecuado para muchos trabajos, tales como el relevamiento de la historia clínica por parte del médico, la toma y procesamiento de la muestra por el bioquímico de laboratorio, el procesamiento de datos por parte del bioinformático, la priorización de variantes por parte de bioquímicos/biólogos moleculares y finalmente la interpretación de las mismas y devolución al paciente por parte del médico; la eficiencia y las chances de éxito se maximizan cuando todos los profesionales trabajan en conjunto. Particularmente, esto sucede con mayor hincapié en la etapa de priorización e interpretación de las variantes, la cual requiere integrar conocimientos asociados al experimento de NGS (cobertura, profundidad, calidad de la variante, entre otras), al impacto a nivel molecular de la misma y, por supuesto, a su potencial relación con la clínica. En este contexto, a través de esta experiencia, se destaca que la mayor probabilidad de éxito se asocia a un diagnóstico presuntivo preciso, y a un profundo conocimiento por parte del equipo médico de los genes y variantes patogénicas conocidas en casos similares. Todo esto contribuye a evidenciar y reforzar la importancia de brindar, a nuestros futuros médicos, conocimientos y capacitación en el área de la genómica clínica.

## **Perspectivas Futuras**

El desarrollo exitoso de la campaña “100 Exomas” sirve, en una primera instancia, como prueba de concepto de que es posible implementar a nivel local servicios de diagnóstico molecular basados en secuenciación de próxima generación. Dicha implementación se sustenta en el conocimiento y capacidad de los profesionales locales, y es un ejemplo que puede servir como semilla para extenderlo a escala regional. Esta prueba de concepto es fundamental para la nacionalización de este tipo de servicios que hoy en día se encuentran disponibles internacionalmente. Para avanzar en este sentido, es inminente ampliar la red de profesionales capacitados con acceso a estas tecnologías, para lo cual es necesario un continuo flujo de fondos que permitan cubrir los gastos asociados a la secuenciación. En este contexto, es importante destacar la reciente adquisición por parte de diversas instituciones públicas y privadas nacionales de equipos de NGS con capacidad para realizar secuenciación exómica. También es relevante mencionar iniciativas como las “Escuelas de genómica clínica” (<http://www.celfi.gob.ar/programas/detalle?p=48>) financiadas por el MINCyT en el marco del programa CELFI, coordinadas por los autores del presente trabajo, las cuales buscan reunir y sobre todo capacitar a investigadores y profesionales interesados en el área.

## **Agradecimientos**

Agradecemos a todos los médicos, instituciones y pacientes que participaron del proyecto (Anexo I), a Bitgenia, al CONICET y la Universidad de Buenos Aires.

## Referencias:

1. **Nemirovsky SI, Córdoba M, Zaiat JJ, Completa SP, Vega PA** (2015) Whole genome sequencing reveals a de novo SHANK3 mutation in familial autism spectrum disorder. *PlosOne* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116358>
2. **Ma CA, Stinson JR, Zhang Y, Abbott JK, Weinreich MA, Hauk PJ et al** (2017) Germline hypomorphic CARD11 mutations in severe atopic disease. *Nature Genetics* 49 1192–1201
3. **Natrajan R, Reis-Filho JS** (2011) Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostic* 11: 425-444. Ng SB, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J(2010). Massively parallel sequencing and rare disease. *Human Molecular Genetics* 19: R119-124.
4. **Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER** (2013) The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 155(1):27-38. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.006.
5. **Ku, CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R** (2012) Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Annals of Neurology* 71: 5-14.
6. **Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K, Vellore K, McDonald MD, et al** (2014) The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genetics in Medicine* 16: 176–182. doi:10.1038/gim.2013.99
7. **Rabbani, N. Mahdieh, K. Hosomichi, H. Nakaoka, I. Inoue I** (2012) Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *Journal of Human Genetics* 57 (10) :621-32. 8. Yang Y, Muzny DM, Reid JG et al ( 2013) Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *New England Journal of Medicine* 369: 1502-1510.
9. Orphanet: an online rare disease and orphan drug database. Copyright, INSERM 1997. Disponible en <http://www.orpha.net>. Accessed : August 21, 2017.
10. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), August 17, 2017. World Wide Web URL: <https://omim.org>
11. Organización Mundial De La Salud. Consejo Ejecutivo EB116/3. 116a reunión 21 de abril de 2005. Control de las enfermedades genéticas.
12. **Baudhuin LM, Donato LJ, Uphoff TS** (2012) How novel molecular diagnostic technologies and biomarkers are revolutionizing genetic testing and patient care. *Expert Review of Molecular Diagnosis* 12: 25-37.
13. **Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J** (2011) Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics* 12, 745-755.
14. **Xue Y, Ankala A, Wilcox W, Hegde M** (2015) Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/ genome sequencing. *Genetics in Medicine* 17(6):444-51. doi: 10.1038/gim.2014.122.
15. **Hong H, Zhang W, Shen J, Su Z, Ning B et al** (2013) Critical role of bioinformatics in translating huge amounts of next-generation sequencing data into personalized medicine. *Science China Life Sciences* 56 (2): 110-118.
16. **Li H, Durbin R** (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14): 1754-1760.
17. **McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis, K et al** (2010) The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research* 20(9): 1297-1303.
18. **De Pristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, et al** (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics* 43(5): 491-498.
19. **Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, et al** (2013). From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Current protocols in bioinformatics*, 11-10.
20. **Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen, T Wang L et al.** (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEffSNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* 6(2): 80-92
21. **Cingolani P, Patel V M, Coon M, Nguyen T, Land S J, Ruden D M, Lu X** (2012) Using *Drosophila melanogaster* as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, SnpSift. *Frontiers in genetics* <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00035>
22. **Lek M, Karczewski K J, Minikel E V, Samocha K E, Banks E, Fennell, T et al** (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536(7616): 285-291.
23. 1000 Genomes Project Consortium.(2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526(7571): 68-74.
24. **Landrum MJ, Lee J M, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S. et al** (2015) ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Research* 44(D1), D862-D868.

25. **Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR** (2013) Predicting effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics* 7-20.
26. **Kumar P, Henikoff S, Ng PC**(2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 4(7): 1073-1081.
27. **Schwarz JM, et al.** (2010) Mutation Taster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods* 7: 575-576.
28. **Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al** (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.
29. **Holzer F, Mastroleo I** (2017) Ethical aspect in precision medicine: an introduction to the ethics and concept of clinical innovation. In *Precision Medicine : Tools and Quantitative Approaches USA: Academic Press Inc.*
30. **Rodriguez-Granillo A, Sedlak E, Wittung-Stafshede P** (2008) Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation. *Journal of Molecular Biology* 28: 383(5):1097-111. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.065.
31. **Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, Polli C, Glant TT, Ferenci P** (2002) Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *American Journal of Medical Genetics* 15:108(1):23-8.
32. **Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW** (1995) The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genetics*. 9(2):210-7. Erratum in: *Nature Genetics* 9(4):451.
33. **Czlonkowska A, Rodo M, Gajda J, Ploos van Amstel HK, Juyn J, Houwen RH** (1997) Very high frequency of the His1069Gln mutation in Polish Wilson disease patients. *Journal of Neurology* 244(9):591-2.
34. **Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, Bochow B, Büttner J, Schmidt H** (2008) Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *Journal of Human Genetics* 53(8):681-7. doi: 10.1007/s10038-008-0298-7.
35. Genetic Home Reference, National Library of Medicine (NLM). World Wide Web URL: <https://ghr.nlm.nih.gov/>
36. **Chan W, Schaffer TB, Pomerantz JL** (2013) A quantitative signaling screen identifies CARD11 mutations in the CARD and LATCH domains that induce Bcl10 ubiquitination and human lymphoma cell survival *Molecular and Cell Biology* 429-43. doi: 10.1128/MCB.00850-12.
37. **Brohl AS, Stinson J, Su HC, Badgett T, Jennings CD, Sukumar G et al** (2015) CARD11 mutation in a patient with severe congenital B cell lymphocytosis *Journal of Immunology* 35: 32-46
38. **Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Le Ber I, Moniz JC, and 28 others** (2004) Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nature Genetics* 36: 225-227,.
39. **Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H et al** (2013) Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *Journal of Neurology. Neurological Science* 331: 158-160.
40. **Tatton-Brown K, Trevor RP, Rahman,N.**(2004) Sotos Syndrome. World Wide Web URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1479/>

**Anexo I:**Listado de Profesionales e instituciones que han contribuido al presente trabajo y participado de la campaña 100 exomas.

Bioq. Mónica Natale, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez

Dr. Cesar Crespi, Hospital San Juan de Dios

Dr. Christian Martín Moya, Hospital Público de Autogestión Dr. Arturo Oñativia

Dr. Claudio Cantisano, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

Dr. Cristian Ricardo Calandra, Hospital de Clínicas

Dr. Ernesto Veber, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

Dr. Jorge Otal, Rosario. Santa Fe

Dr. Juan Nicola, CIBICI, CONICET, Univ. Nacional de Córdoba

Dr. Marcelo Rugiero, Hospital Italiano de Buenos Aires

Dr. Matías Juanes, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Dr. Matías Oleastro, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Dr. Rodrigo Mendez, CENAGEM

Dr. Santiago Chacon, Hospital Centenario de Gualeguaychú, Entre Ríos

Dr. Sebastián Gacio, Instituto de Neurociencias, Universidad Favaloro. Hospital Fernández

Lic. Rodrigo Fernando Ernesto Bogado, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones  
Dra. Alejandra Chaves, Hospital de Niños de Córdoba  
Dra. Andrea Solari, CENAGEM  
Dra. Andrea Vanesa Soto, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones  
Dra. Carla Asteggiano, Hospital de Niños de Córdoba  
Dra. Cecilia Montes, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba  
Dra. Claudia Arberas, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez  
Dra. Emilia Gatto  
Dra. María Dolores Mansilla, Hospital Roffo  
Dra. Inés Noher de Halac, CEMECO, Córdoba.  
Dra. Lia Mayorga, IHEM (CONICET-UNCuyo) Mendoza  
Dra. Lilien Chertkoff, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"  
Dra. Mariana Guzmán, CEMIC  
Dra. María Eugenia Heis Mendoza, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones  
Dra. Rossana Espindola, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones  
Dra. Silvia Danielian, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"  
Dra. Vanesa Zaslavsky, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde  
Dra. Virginia Bañares, CENAGEM

**Anexo II:** Listado de diagnósticos presuntivos asociados a los casos campaña.

Albinismo Ocular Ligado al X.  
Anemia hemolítica  
Artrogriposis vs Cutis laxa Ataxia  
Atrofia Espinal Congénita  
Baraitser-Winter syndrome 1 or 2  
CAMRQ  
Cardiopatía Congénita  
CDLS - Cornelia de Lange  
Charcot Marie Tooth  
Cowden  
Desorden Congénito de Glicosilación (CDG-X)  
Displasia Ectodérmica  
Distonía, sensible a la L-Dopa (DRD)  
Encefalopatía epiléptica  
Enfermedad de Parkinson Juvenil  
Enfermedad mitocondrial por depleción de ADN mitocondrial (genes de mantenimiento del ADNmt)  
Epidermolisis bullosa de la unión - tipo Herlitz  
Epilepsia mioclónica  
Hallermand-Streiff Syndrome  
Hipercolesterolemia familiar homocigota  
Hipomagnesemia severa  
Hipotiroidismo congénito dishormonogénico causado por la inhabilidad de la glándula tiroides de acumular yoduro.  
Hipotonía, Macrocefalia  
Inmunodeficiencia Combinada

Inmunodeficiencia Primaria con Susceptibilidad Hereditaria al infección por Epstein Barr Virus (EBV)  
Insuficiencia hipofisaria combinada con respuesta deficiente al tratamiento con hormona del crecimiento  
Li Fraumeni  
Linfedema Primario Congénito (LPC)  
Lipofuscinosis Ceroidea  
Lupus Pernio Familiar  
Nefrocalcinosis  
Osteogénesis Imperfecta Tipo 3  
Paciente sindrómico, con manchas café con leche, Restricción del Crecimiento IntraUterino (RCIU) y  
dismorfias.  
Paraparesia espástica hereditaria  
Parkinsonismo/Hipotonía  
Retraso de crecimiento, retraso madurativo, malformaciones esqueléticas  
Síndrome de Angelman atípico  
Síndrome de Asperger  
Síndrome de Disregulación inmune no caracterizado  
Síndrome de Gitelman  
Síndrome de Hiper IgM  
Síndrome de Intolerancia al Ejercicio (o esfuerzo) y rabdomiolisis recidivante.  
Síndrome de Malabsorción  
Síndrome de Noonan  
Síndrome de RETT  
Síndrome de Sotos  
Síndrome de Temple Baraitser  
Síndrome de Wilson  
Síndrome Myhre - Poliposis Familiar juvenil  
Síndrome progeria Hutchinson-Gilford



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista QuímicaViva

Volumen 18, Número 1, Abril de 2019

ID artículo:E0153

DOI: no disponible

[Versión online](#)