

Hospital de Pediatría
Garrahan

JORNADAS DE GENÓMICA CLÍNICA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA

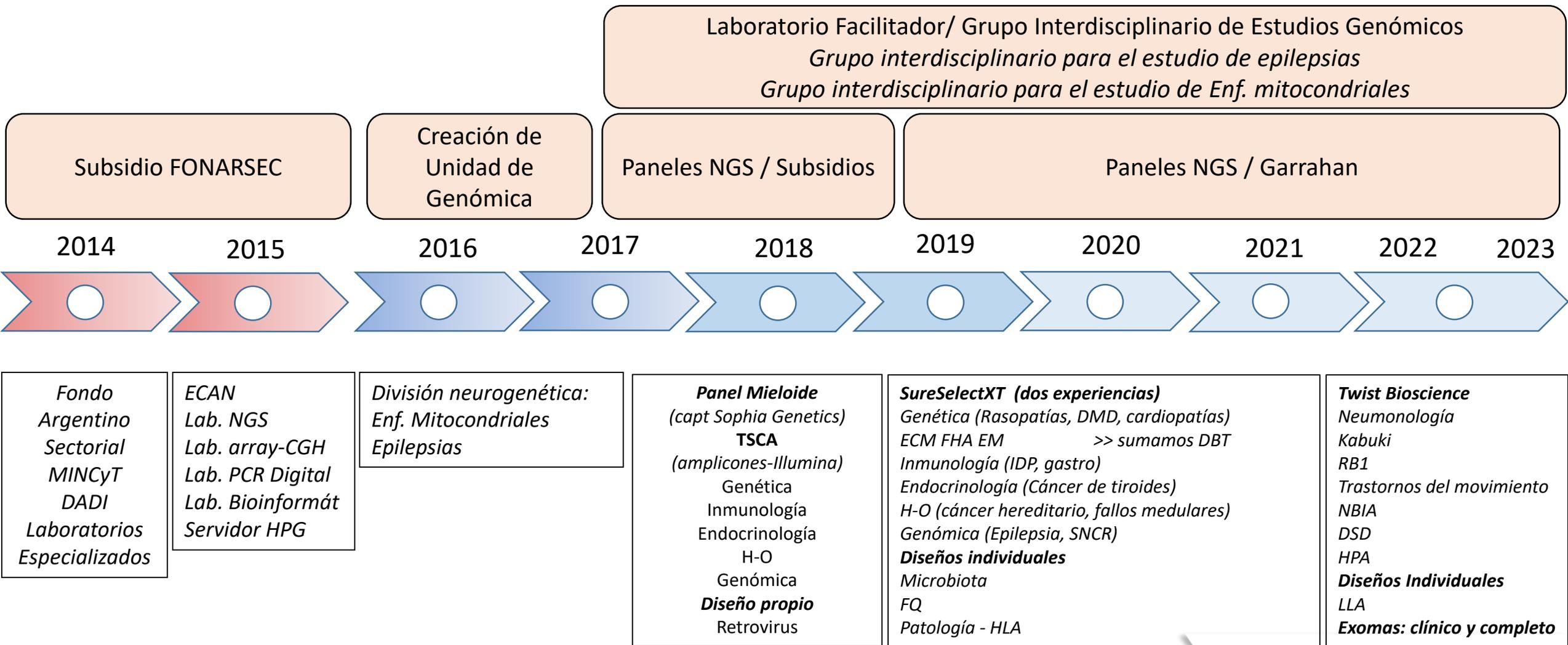
**Implementación de los estudios genómicos en el Hospital Garrahan:
Experiencia de la Unidad de Genómica**

Dr. Juanes Matías
Unidad de Genómica / Laboratorio Facilitador

Contacto: 4122-6000 interno 7161
Mail: matiasjuanes@hotmail.com

Desarrollo de la Unidad de Genómica en el Hospital Garrahan

Proceso de Implementación de los Estudios Genómicos



Experiencia previa imprescindible para el desarrollo de la Unidad de Genómica

Creación del Área BM

Lab. de Genética

BM y retrovirus

Lab. de
Endocrinología

Lab. Inmunología

Lab H-O

Creación del Área de BM

Estudios de patologías de origen genético según prioridades de cada especialidad.

- Lab Genética
- Lab BC y Retrovirus
- Lab Endocrinología
- Lab Inmunología
- Lab Hemato Oncología
- Lab Hematología
- Lab Patología
- Lab HLA
- Lab Microbiología

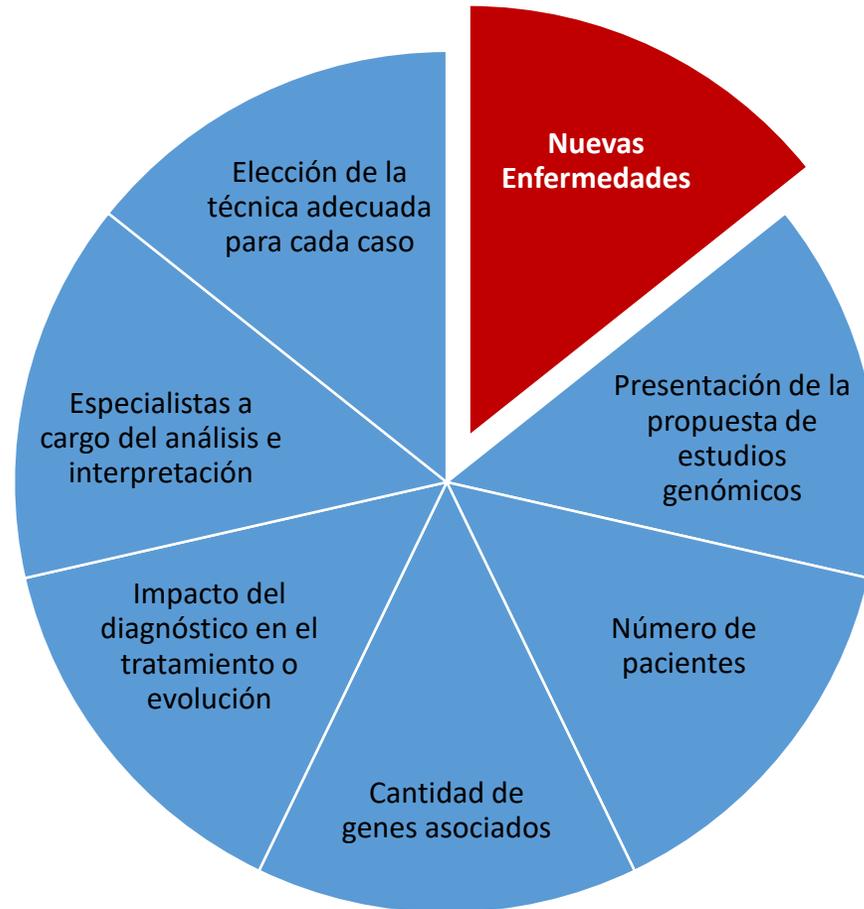
1993

2014

Crecimiento en el diagnóstico molecular del HG

Laboratorio Facilitador / Grupo Interdisciplinario de Estudios Genómicos

Genética
Inmunología
Endocrinología
HO
Virología
HLA
Patología



Consentimiento Informado
Cantidad de paneles disponibles
Informes de resultados unificados
Asesoramiento genético

Diseño de Paneles

Capacidad del equipo de secuenciación.

- Miseq Illumina (Max 15 GB output)

Profundidad deseada del ensayo.

- Entre 200 y 250X de promedio

Pacientes a procesar de manera simultánea.

- De 24 a 32 pacientes



Paneles 500-600 Kb

130-150 genes por panel

16, 24 o 96 muestras

Costo efectividad para el diseño de paneles

Patologías (EPOF)

- Frecuencia.
- Pacientes por año.
- Cantidad de genes.
- Genes solapados con otros fenotipos.

Muchos pacientes con pocos genes asociados (<20)

Moderado número de pacientes y genes asociados

Pocos pacientes gran cantidad de genes asociados

Paneles
130-150 genes

Análisis e interpretación
de exomas

Paneles combinados / Costo-efectividad

Paneles 2022	Laboratorio Responsable	Patologías
ECM/FHA/EM/DBT 207 genes	Genética Unidad Genómica	Errores congénitos del metabolismo Falla hepática aguda Enfermedad mitocondrial Diabetes
CH/DSD/PKU 176 genes	Hemato oncología Endocrinología	Cáncer hereditario Desarrollo sexual diferente Fenilcetonuria
EED/EMP/TMOV/NBIA 151 genes	Unidad de Genómica	Encefalopatía epiléptica y del desarrollo Epilepsias mioclónicas progresivas Trastornos de movimiento Enf. neurodegenerativa por acumulación cerebral de hierro
FMH/Neumo 158 genes	Hematología Benigna Genética	Fallos medulares hereditarios Discinesias ciliares Enfermedad pulmonar intersticial
Raso/Cardio/NM 126 genes	Genética	Rasopatías Cardiopatías hipertróficas Distrofias musculares, miopatías y síndromes miasténicos.

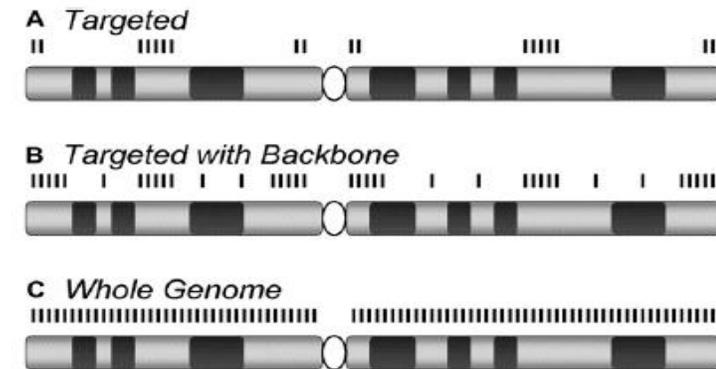
Paneles Especiales

Soluciones alternativas

- Panel IDP. Laboratorio de Inmunología. 333 genes. Mas de 90 pacientes por año.
- Panel RB1, DMD, Kabuki. Genes grandes (ej: gen *DMD* 79 exones). Kabuki, casos retrospectivos.
- Kit comercial específico: Fibrosis Quística. Kit para estudiar el gen *CFTR* en su totalidad.
- Solución para Genoma mitocondrial. Set de sondas para capturar el ADN mitocondrial.

Array CGH

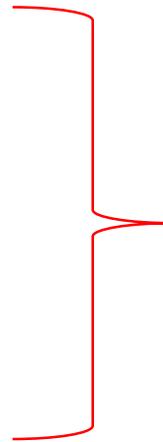
- ✓ La capacidad o poder de resolución de un array es directamente proporcional al número de sondas que se incluyen en el microarray para la región del genoma que se considere.
- ✓ Los microarrays pueden diseñarse para cubrir cualquier región de interés y alcanzar distintas resoluciones.
- ✓ El a-CGH de uso clínico debe ser diseñado para detectar desbalances de aproximadamente 20-50Kb en las regiones de interés (síndromes descriptos o genes implicados en patologías) y para detectar desbalances de 100-250Kb en otras regiones del genoma (*backbone*).
- ✓ Para uso diagnóstico actualmente utilizamos un array estandarizado de 60K, es decir de 60.000 oligos o sondas.



Array-CGH: Aplicación clínica

✓ Técnica de estudio inicial en pacientes con:

- Discapacidad intelectual (DI)
- Retraso global del desarrollo (RGD)
- Anomalías congénitas múltiples (ACM)
- Trastornos de espectro autista (TEA)



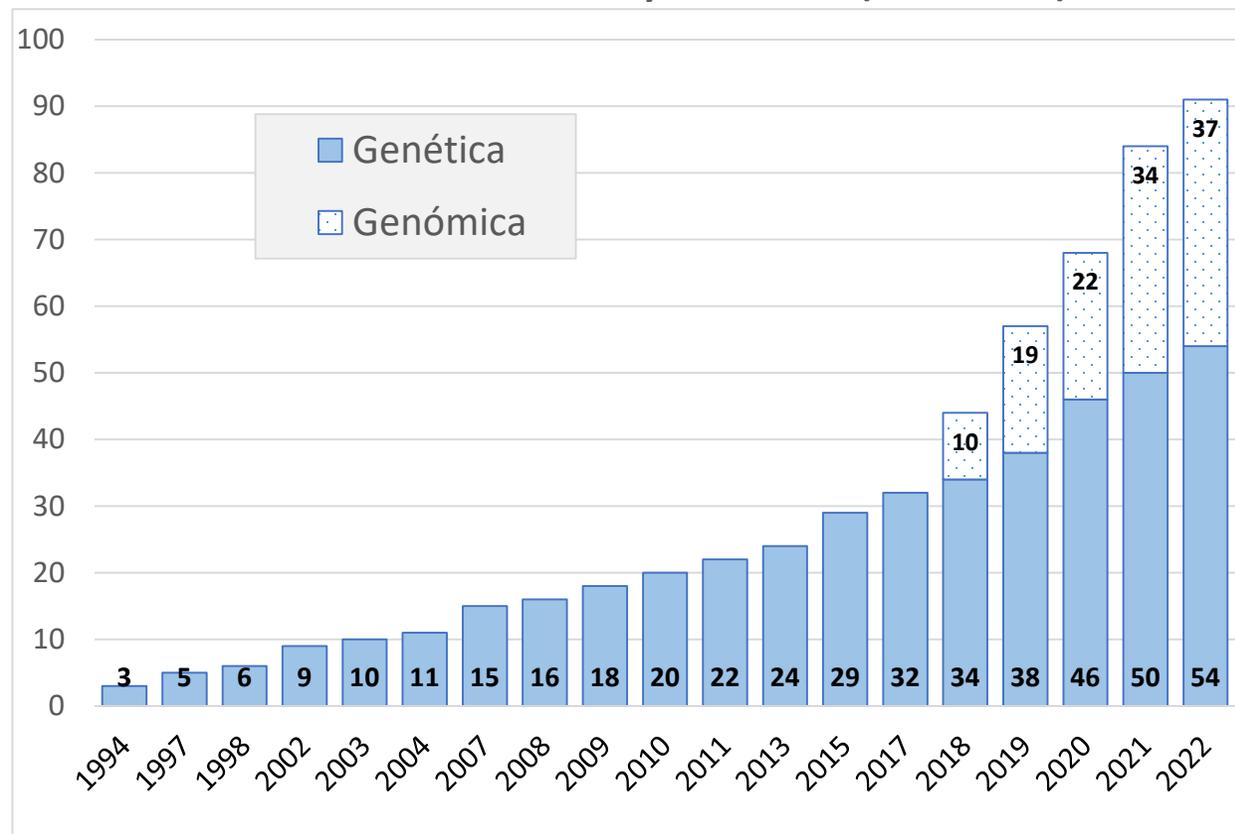
20% rédito diagnóstico

✓ Confirmación de CNV.

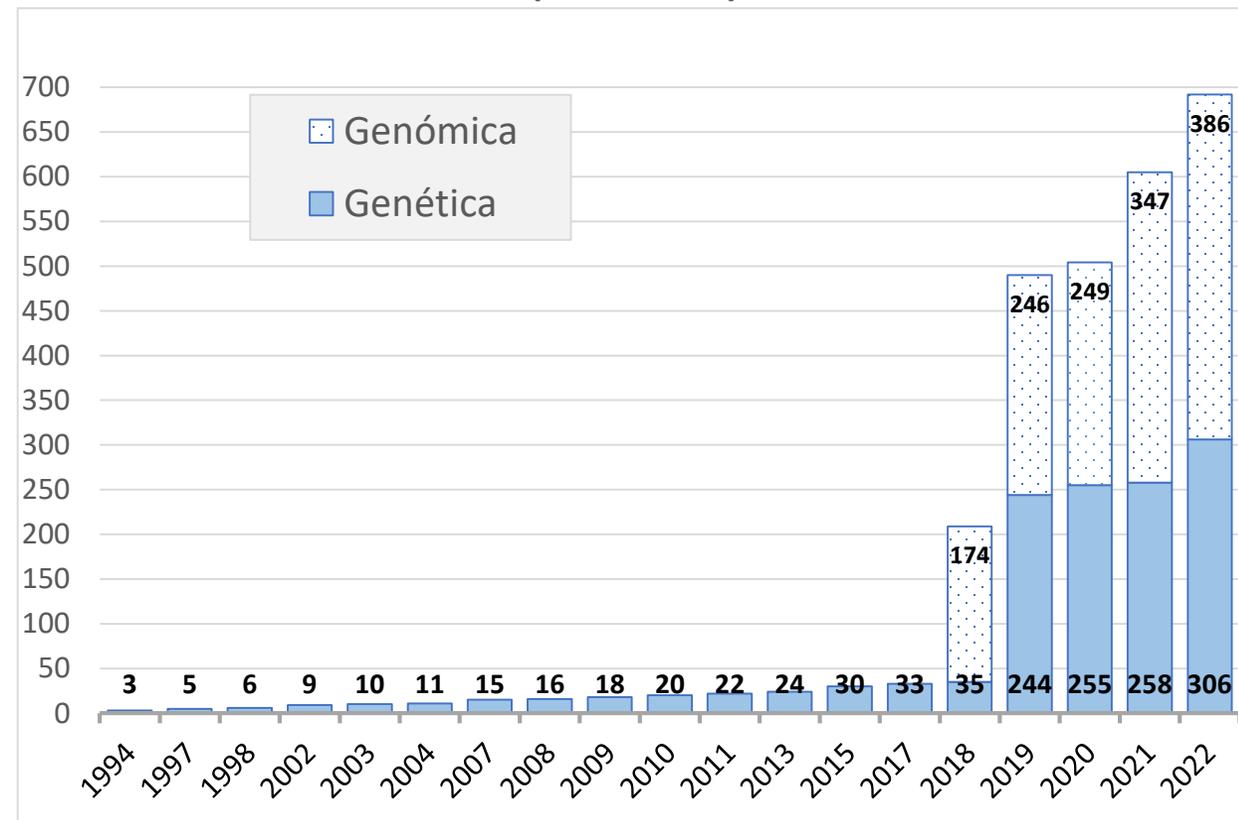
✓ Proyectos de diseño de vidrios enriquecidos para patologías específicas.

Impacto de la Implementación de Estudios Genómicos Laboratorios de BM Genética y Genómica

Nº Acumulado de Nuevas Determinaciones Incorporadas por Año
Laboratorios de Genética y Genómica (1994-2022)



Nº Acumulado de Nuevos Genes Estudiados por Año
(1994-2022)



Encefalopatías epilépticas

Grupo de síndromes neurológicos heterogéneos que constituyen las **formas más severas de epilepsia en pediatría**

- **Incidencia:** 1/2000 nacidos vivos/año
- Epilepsias **fármaco-resistentes**



Encefalopatía Epiléptica (EE)

La **actividad epiléptica en sí misma** genera alteraciones cognitivas y de comportamiento graves, que llevan al retraso y frecuentemente, regresión del desarrollo del paciente.

ILAE, 2010

Encefalopatía Epiléptica y del Desarrollo (DEE)

El deterioro del desarrollo puede deberse tanto a la **etiología subyacente** (encefalopatía del desarrollo) como a los efectos adversos de la **actividad epiléptica** descontrolada (encefalopatía epiléptica), o a ambos.

ILAE, 2017

Principales etiologías EE



estructurales del Sistema Nervioso Central



genéticas



metabólicas

Alteraciones



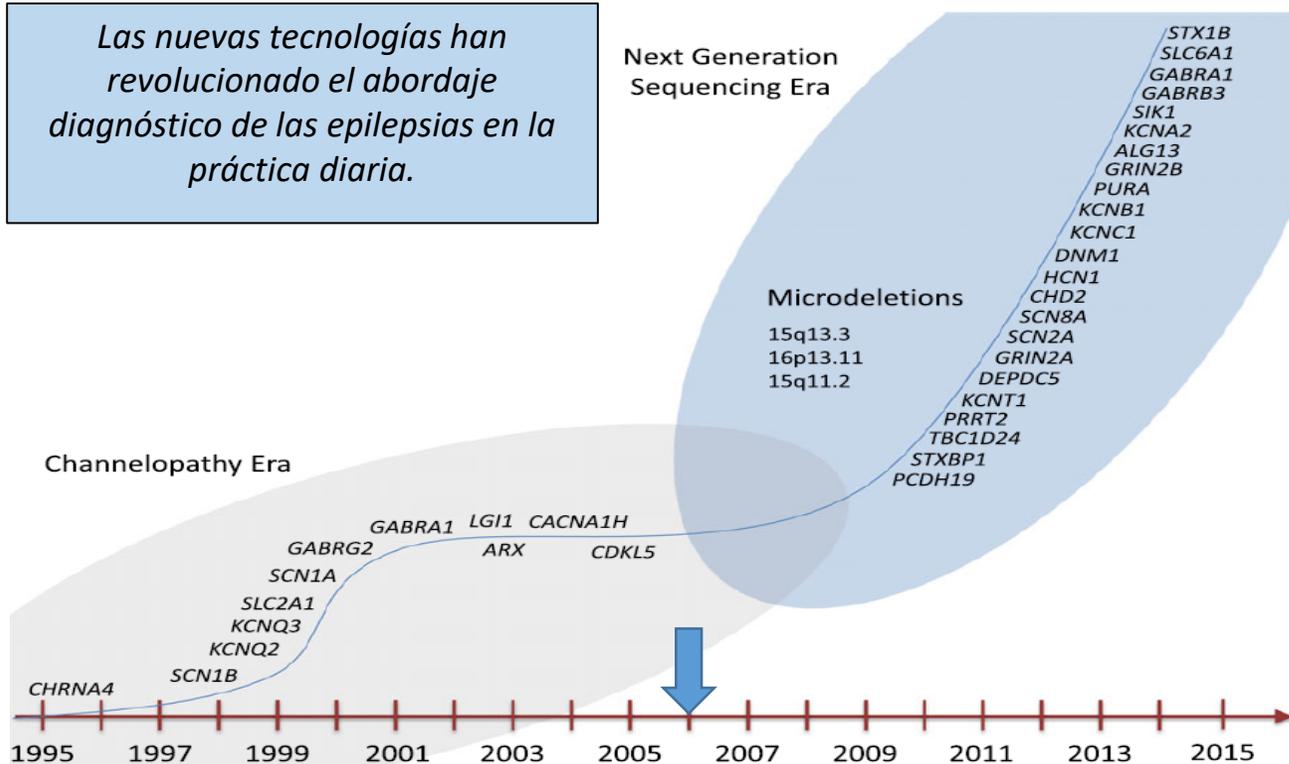
Reconocimiento temprano de su etiología



↓ morbi-mortalidad

NGS: Cambio de paradigma en el diagnóstico

Las nuevas tecnologías han revolucionado el abordaje diagnóstico de las epilepsias en la práctica diaria.



Epilepsia, 57(6):861–868, 2016
doi: 10.1111/epi.13381

Etiology-specific syndromes

- **KCNQ2-DEE**
- **Pyridoxine-dependent (*ALDH7A1*)-DEE (PD-DEE)**
- **Pyridox(am)ine 5'-Phosphate Deficiency (*PNPO*)-DEE (PSPD-DEE)**
- ***CDKL5*-DEE**
- ***PCDH19* clustering epilepsy**
- **Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome (*GLUT1DS*)**
- **Sturge Weber syndrome (SWS)**
- **Gelastic seizures with hypothalamic hamartoma (GS-HH)**

Síndromes epilépticos de inicio en neonatos y lactantes, no autolimitados, etiología-específicos. *ILAE 2022*.

ILAE: Liga Internacional contra la Epilepsia:
<https://www.ilae.org/guidelines/definition-and-classification/classification-and-definition-of-epilepsy-syndromes>

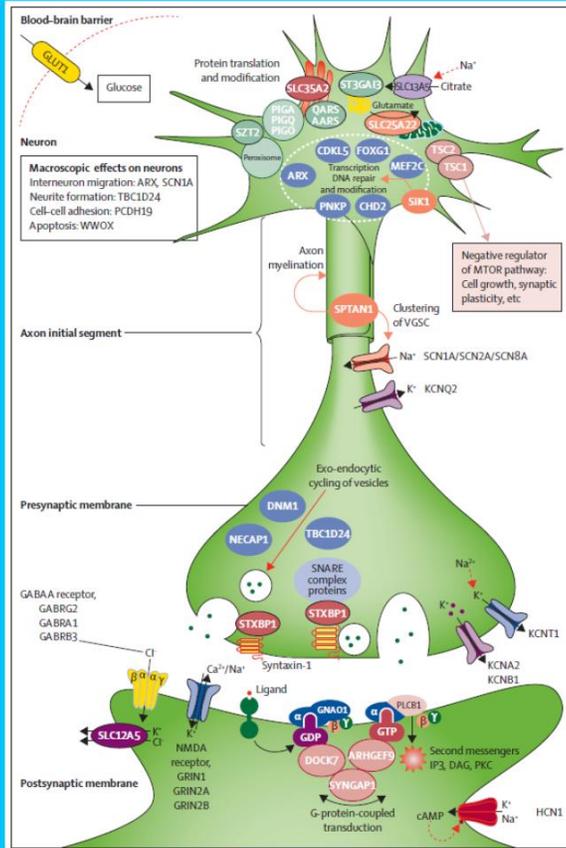
Mecanismos implicados

Defectos de transportador

Defectos metabólicos

Defectos en interacción entre células

Disfunción sináptica

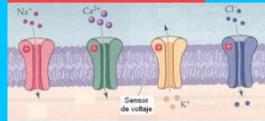


McTague y col, 2015

Alteración de la reparación del ADN y remodelación de la cromatina

Desregulación transcripcional

Canalopatías (transportadores de iones transmembrana)



Modulación de protein quinasa

Genes asociados y síndromes según edad de inicio

Early myoclonic encephalopathy
PIGA, SETBP1, SIK1, SLC25A22

Dravet syndrome
SCN1A
GABRA1, GABRG2, HCN1, KCNA2, SCN1B, STXBP1

Epilepsy with myoclonic-atonic seizures
SLC2A1
SLCGA1
GABRA1, GABRG2, SCN1A, SCN1B

Early-onset epileptic encephalopathy
KCNQ2
AARS, CACNA2D2, NECAP1, PIGA, QARS, SCN8A

CDKL5
SCN2A
STXBP1
GNAO1
ARX, DOCK7, SLC25A22, SLC35A2, WWOX

Infantile spasms
ALG13, DNMI1, FOXG1 duplications, GABRA1, GABRB3, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, IQSEC2, KCNT1, MAGI2, MEF2C, NEDDL4, NDP, NRXN1, PIGA, PLCB1, PTEN, SCA2, SCN1A, SCN2A, SCN8A, SETBP1, SIK1, SLC25A22, SLC35A2, SPTAN1, ST3GAL3, STXBP1, TBC1D24, TCF4

Lennox-Gastaut syndrome
ALG13, DNMI1, FLNA, GABRB3, GUJ3, HNRNPU, SCN1A, SCN2A, SCN8A, STXBP1

KCNQ2
KCNT1, PIGQ
Early infantile epileptic encephalopathy (Ohtahara syndrome)

Epilepsy of infancy with migrating focal seizures
KCNT1
SCN2A, SCN1A
PLCB1, QARS, SCN8A, SLC25A22, TBC1D24, SLC12A5

Epilepsy-aphasia spectrum
GRIN2A

Other predominantly myoclonic epilepsies
Onset 0-1 years: EEF1A2, MEF2C, SCN1A, SLC2A1, SPTAN1, SYNGAP1, TBC1D24
Onset >1 year: CHD2, MEF2C, SYNGAP1, UBE3A

Other predominantly focal or multifocal epilepsies
Onset 0-6 months: ARHGEF9, DEPDC5, SCN1A, TBC1D24, PNKP, SLC2A1
Onset 6-12 months: ARHGEF9, DEPDC5, FOXG1 mutations, MBDS, PIGO, SLC13A5
Onset >1 year: ARHGEF9, DEPDC5, MBDS, PCDH19, POLG, TNK2, ZEB2

Figure 1: Genetic causes of epilepsy syndromes

Genetic causes, and proportion of cases caused by each gene, including only non-chromosomal, non-malformative, and non-metabolic disorders. Only genes with more than one case reported are included. Black font denotes genes that account for at least 50% of cases, purple font 10-50% of cases, and red font 5-10% of cases. Blue font denotes genes that account for less than 5% of cases, and green font denotes genes that account for an unknown percentage of cases.

McTague y col, 2015

Optimización de Paneles

Generalidades de los paneles aplicados al diagnóstico de Encefalopatías Epilépticas de la Unidad de Genómica

Año del panel / Características	2017-2018	2019-2020	2021-2022	2022-2023
Kit	TSCA	SureSelectXT HS		Twist Target Enrichment
Marca	Illumina	Agilent Technologies (HG)		Twist Bioscience (HG)
Tecnología	Amplicones	 Captura		Pre-pooling
Patologías	EE y EMP	EE	EE, EMP, HAI y Nefropatías	EE, EMP, HAI, TMOV y NBIA
Nº genes EE	46 /56			96 /151
Nº muestras EE	16 /24			>96

EE: Encefalopatía epiléptica; EMP: Epilepsia Mioclónica Progresiva; HAI: Hemiplejía alternante de la infancia; NBIA: Enfermedades neurodegenerativas con acumulación cerebral de hierro; TMOV: Trastornos movimientos; TSCA®: TruSeq Custom Amplicon.

Optimización de paneles

Año del panel / Características	2017-2018	2019-2020	2021-2022	2022-2023
Kit utilizado	TSCA	SureSelectXT HS		Twist
Tecnología	Amplicones	Captura Sondas ADN	Captura Sondas ADN	Captura Sondas ARN
Cobertura $\geq 20X$	$\approx 80\%$	$\geq 98\%$	$\geq 99\%$	Cobertura ($\geq 20X$) $\geq 95\%$ (Cobertura teórica $> 99\%$) Mayor de 1000 sondas gen ARX
Profundidad Promedio N: 24/cartucho	<ul style="list-style-type: none"> • Mejores métricas y controles de calidad • Utilización más eficiente de los recursos • Reducción de los tiempos de procesamiento y análisis • Mayor control: Desarrollos Bioinformáticos Propios 			
Fragmentación	No aplica	Sonificación (COVARIS)	Sonificación (COVARIS)	Sonificación
Procesamiento muestras previo a Biblioteca final	Individual	Individual	Individual	Preparación de Bibliotecas con pre-pooling x 8
PLUS Desarrollos Bioinformáticos Propios	NO: Soluciones Externas	Desarrollo de algoritmo bioinformático Propio para detección de CNVs	Controles de Calidad Trazabilidad Sexo X-Y SRY (crom Y) + lecturas crom X	Controles de Calidad Trazabilidad Sexo X-Y SRY (crom Y) + lecturas crom X

RESULTADOS

Año del Panel	2017-2018	2019-2020	2021-2022
Marca	TSCA	SureSelectXT HS	
Pacientes con diagnóstico/analizados	8/16 (50%)	10/23 (44%)	32/62 (52%)

Incorporación de Detección de CNVs

- N° de pacientes con detección de CNVs por medio de algoritmos de predicción de NGS: **7/121**
- **Array-CGH o MLPA** posterior: **100%** confirmados; puntos de ruptura y genes involucrados

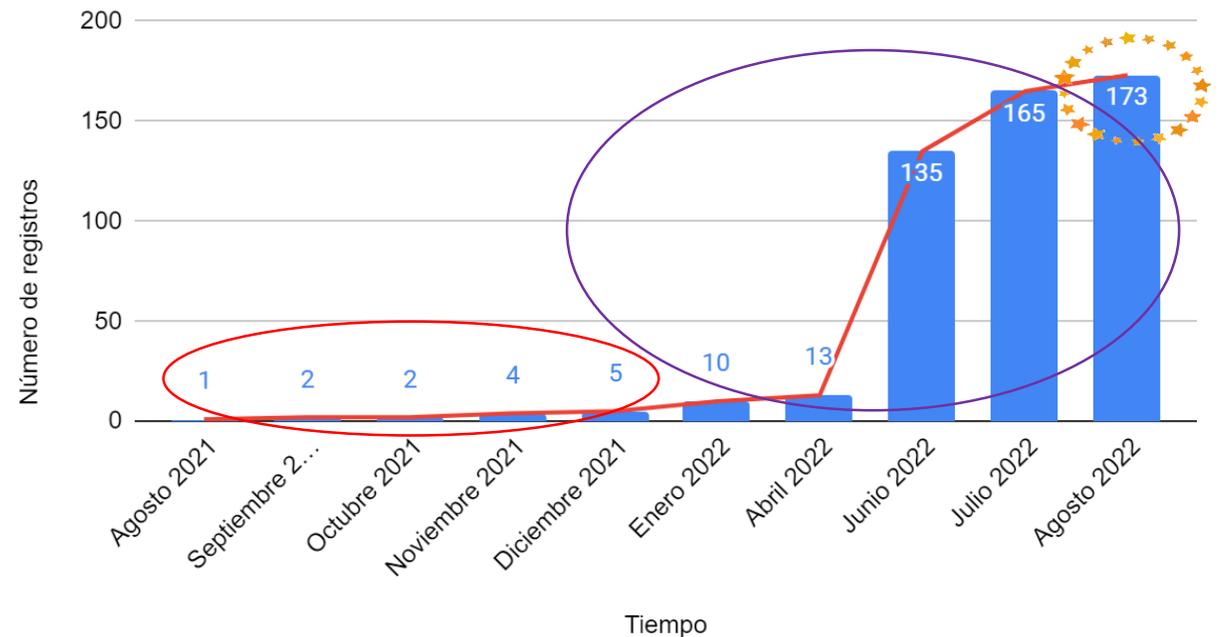
Incorporación del análisis de exomas

- N° pacientes estudiados por **exoma clínico**: 11 (panel neg)
- Con diagnóstico: +1
- Continúa la selección de nuevos casos (**subsidiados + convenios**)

Generación de una base de datos clínico-molecular de población pediátrica argentina con EE



Número de registros en función del tiempo

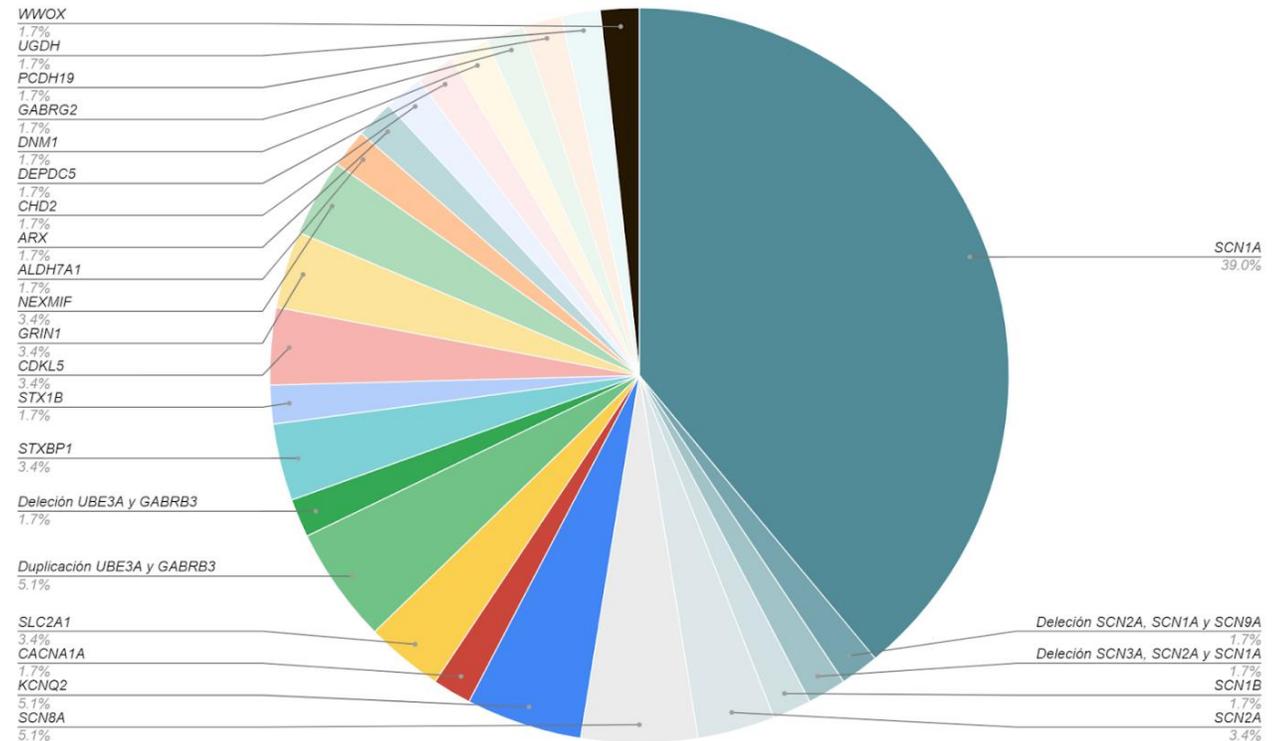


Generación de una base de datos clínico-molecular de población pediátrica argentina con EE

Ventajas del Registro Sistemático de Datos

- **Nº pacientes** con estudio molecular: 117
 - Resultados **positivos**: 50%
 - Resultados **negativos**: 46%
 - **En estudio**: 4%
- Variantes **noveles** detectadas: 48%
- **Genes** detectados asociados a EE

Genes detectados con variantes clínicamente relevantes



Generación de una base de datos clínico-molecular de población pediátrica argentina con EE

TRANSFORMACIÓN DE DATOS → INFORMACIÓN CIENTÍFICA

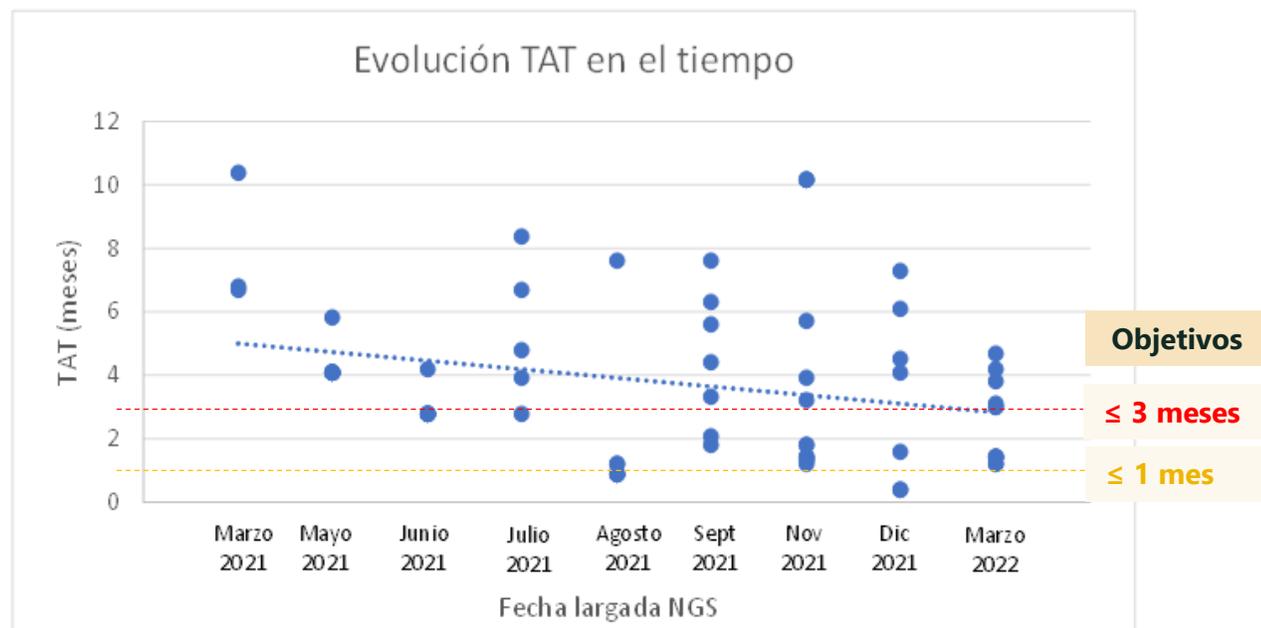
❖ Análisis posterior de los datos

- **Frecuencia** de los distintos **síndromes epilépticos**.
- **Genes más frecuentemente** afectados, o
- **Fenotipos** de los pacientes con variantes en determinado gen.
- **Genes** en los que **no hubo hallazgos**.

❖ Reporte de variantes

- **Interrelación** con base de datos bioinformática.
- **Contribución a ClinVar**: 34 variantes reportadas.
- **Contribución a literatura**: 3 publicaciones y múltiples presentaciones a congresos.

❖ Tiempo promedio de estudio

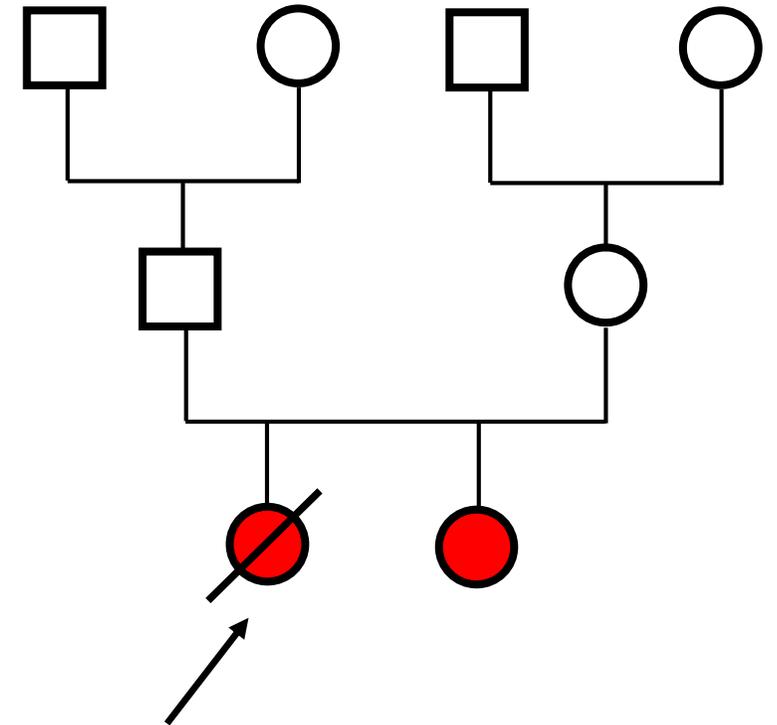


Caso Clínico 1

- Paciente de sexo femenino, 3 años de edad a la consulta
- Retraso en la adquisición de la marcha, con caídas frecuentes.
- Mioclonías predominio miembros superiores.
- Entre los 3 y 9 años DI, con compromiso severo en la atención.
- Se realizaron múltiples estudios para descartar diferentes causas de ataxia (todo Normal)
- A los 11 años crisis epilépticas fármaco resistentes, status mioclónico.

Encefalopatía crónica evolutiva con epilepsia mioclónica, ataxia cerebelosa, deterioro cognitivo

- Estudios neurometabólicos: sangre, orina y LCR normales.
- Estudios inmunológicos: FAN normal, ATG, ATPO Normal, perfil tiroideo normal, complemento normal.
- Potenciales evocados visuales: normal.
- Biopsia de músculo: normal.



Encefalopatía crónica evolutiva con epilepsia mioclónica, ataxia cerebelosa, deterioro cognitivo

Exoma completo por trío
Laboratorio externo



Resultado negativo.
No especifica genes estudiados, ni coberturas.

Reanálisis de datos crudos con pipeline propio
Hospital Garrahan

Chr:posición	Gen	Cambio	Efecto	Impacto	Frecuencia	Evidencia	Información de muestras
<input type="checkbox"/> X:99657721	PCDH19	G -> A p.Ser806Phe	missense variant	Moderado	ExAC:0.00001 (ExAC-hom:0)	rs756871980: dbSNP Ensembl Pop. Uniprot ClinVar ExAC M.Taster	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div> </div><div>Hom</div></div> <p>DP:39/39 GQ:99 FS:-- QUAL:1337.77</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div> </div><div>Het</div></div> <p>DP:42/95 GQ:99 FS:-- QUAL:1019.77</p> <p style="text-align: center;">Ver Muestras</p>

Importancia de los especialistas en el análisis e interpretación

Review > Hum Mutat. 2012 Apr;33(4):627-34. doi: 10.1002/humu.22029. Epub 2012 Feb 14.

PCDH19-related infantile epileptic encephalopathy: an unusual X-linked inheritance disorder

Review > Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2017 Jun 28;42(6):730-736.

doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2017.06.021.

[PCDH19 gene mutations lead to epilepsy with mental retardation limited to females in 2 cases and literature review]

Herencia Ligada al X
Restringida a las Mujeres

> Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2019 Nov 2;57(11):857-862. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2019.11.008.

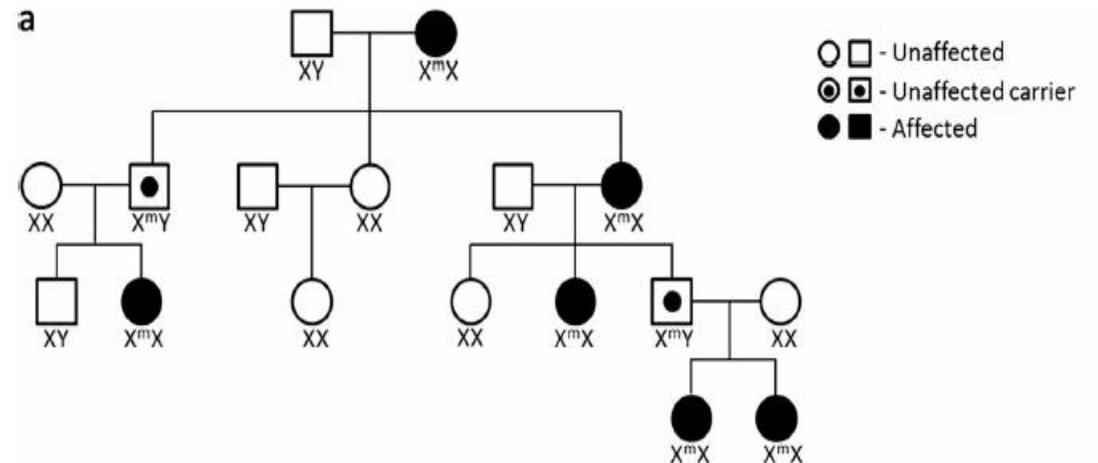
[Clinical characteristics of PCDH19-female limited epilepsy]

[Article in Chinese]

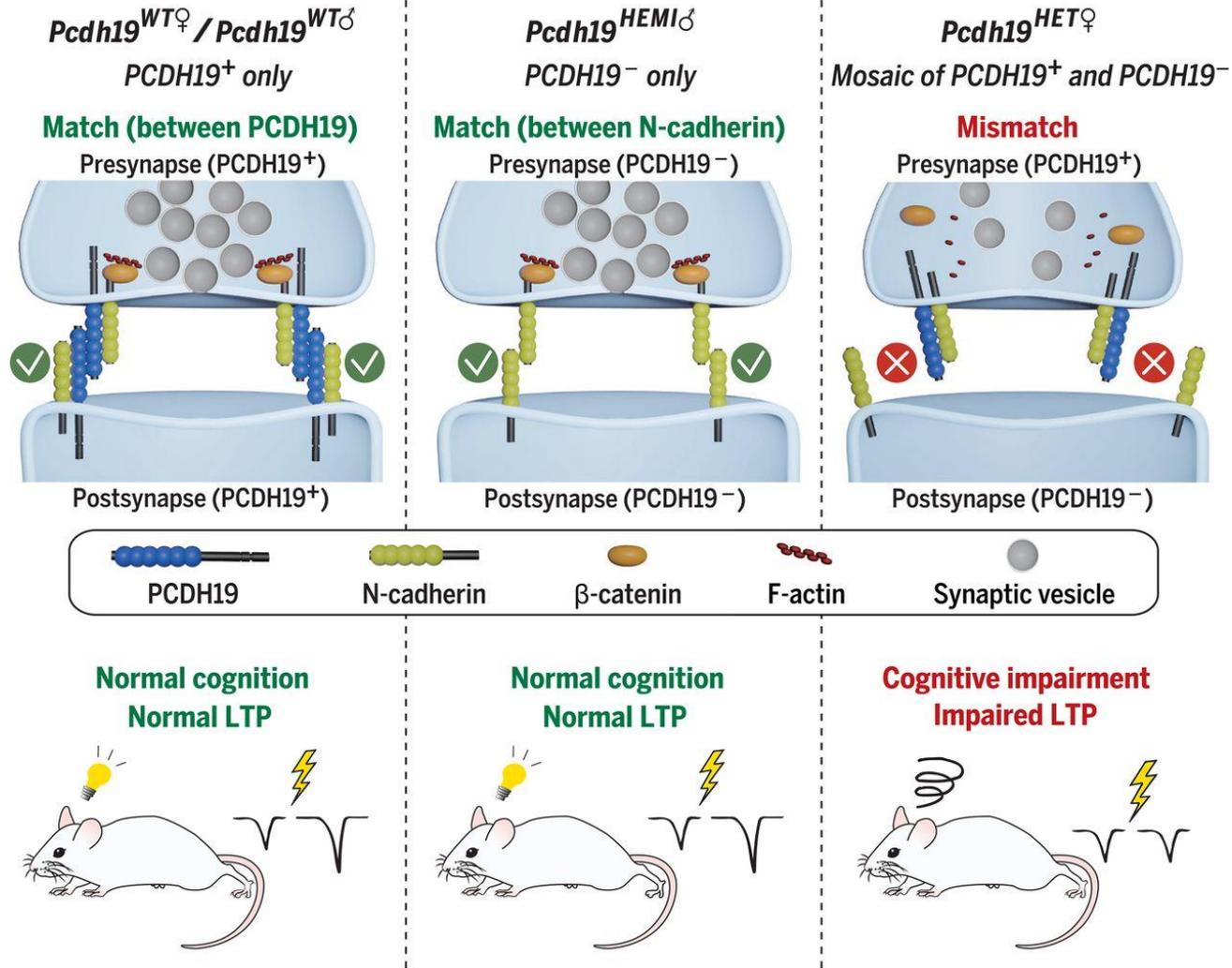
Y Chen ¹, X L Yang ¹, A J Liu ¹, D Sun ², Y Yang ¹, J Zhang ¹, J Y Chen ¹, Z X Yang ¹, Y W Jiang ¹, X R Wu ¹, Y H Zhang ¹

> Eur J Paediatr Neurol. 2020 Jan;24:142-147. doi: 10.1016/j.ejpn.2019.12.020. Epub 2020 Jan 3.

Levetiracetam efficacy in PCDH19 Girls Clustering Epilepsy



Importancia de los especialistas en el análisis e interpretación



PCDH19-Ncad mismatch underlies female specific *PCDH19* disorder.

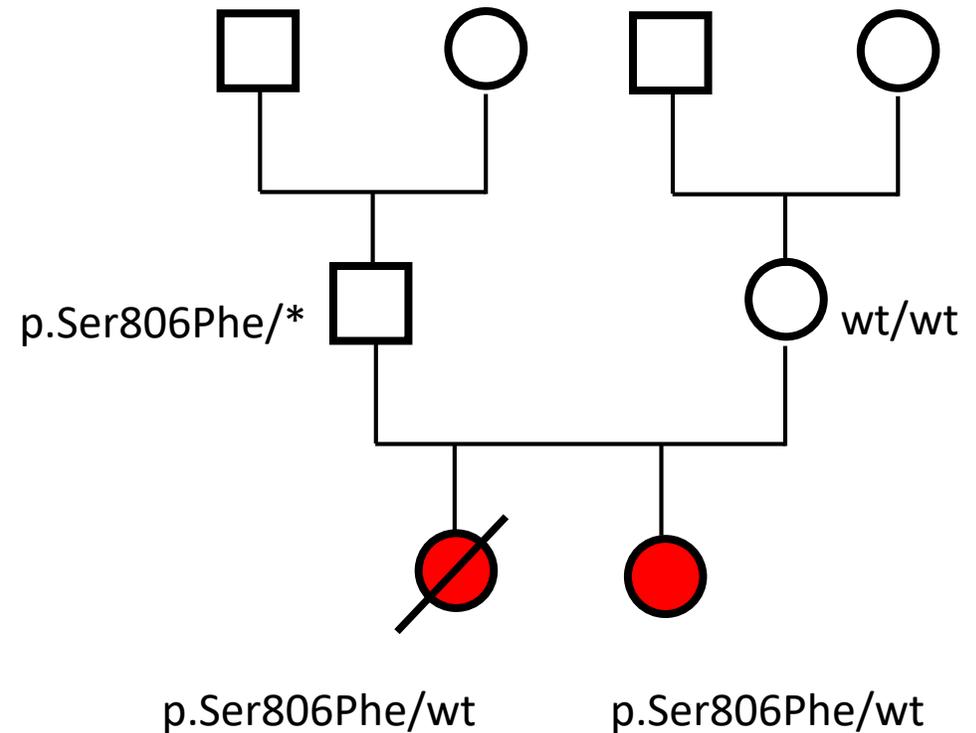
Pcdh19^{HET}♀ synapses between PCDH19-positive and PCDH19-negative neurons, PCDH19-Ncad cis-complex cannot trans-synaptically bind Ncad because of mismatching, leading to impaired presynaptic development, long-term potentiation (LTP), and cognition.

Hoshina et al., *Science* 372, 255 (2021)

Importancia de los especialistas en el análisis e interpretación

Gen *PCDH19*, p.(Ser806Phe)
Probablemente patogénica

- ✓ Disminución del tiempo diagnóstico.
- ✓ Reducción estudios complementarios.
- ✓ Adecuación del tratamiento.
- ✓ Disminución de internaciones.

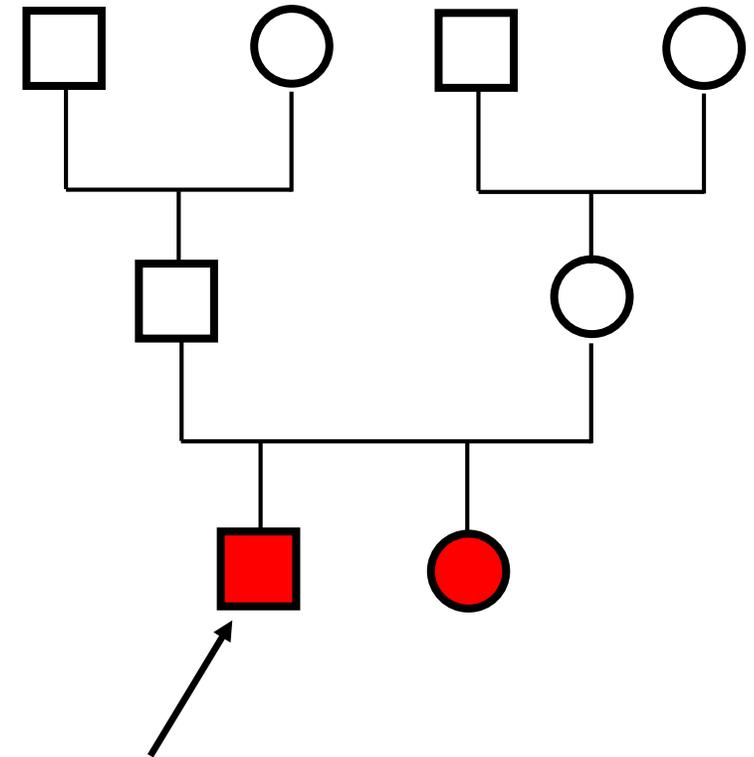


Caso clínico 2

- Paciente de sexo masculino, 1 año y 3 meses de edad.
- Encefalopatía epiléptica/Síndrome de West.
- Hermana mayor de 5 años, Síndrome de West/Lennox Gastaut, con RGD.

**Encefalopatía epiléptica y del desarrollo.
Síndrome de West.
Posible caso familiar.**

- Se solicita panel de Encefalopatías epilépticas en Hospital Garrahan.



ESTUDIO MOLECULAR

AARS	ATP1A3	CLCN4	GABRB3	KARS	NDP	POLG	SCN9A	SLC6A8	TSC2	ATP13A2	KCTD7
ADSL	BRAT1	DEPDC5	GABRG2	KCNA2	NECAP1	PRRT2	SETBP1	SLC9A6	UBE3A	CLN3	MFSD8
AIMP1	CACNA1A	DNM1	GAMT	KCNQ2	NEXMIF	PTEN	SIK1	SMC1A	WWOX	CLN5	NEU1
ALDH5A1	CACNA2D2	DOCK7	GATM	KCNQ3	PCDH19	PURA	SLC12A5	SPTAN1	ZEB2	CLN6	NHLRC1
ALDH7A1	CASK	ERBB4	GNAO1	KCNT1	PIGA	QARS	SLC13A5	STX1B	SRY	CLN8	PPT1
ALG13	CDKL5	FOLR1	GRIN1	MAGI2	PIGQ	SCN1A	SLC19A3	STXBP1	Control	CTSD	PRDM8
AP2M1	CHD2	FOXP1	GRIN2A	MBD5	PLCB1	SCN1B	SLC25A22	SUOX		EPM2A	TPP1
ARX	CHRNA2	GABRA1	GRIN2B	MECP2	PLPBP	SCN2A	SLC2A1	SYNGAP1		GBA	
ASNS	CHRNA4	GABRB1	HCN1	MEF2C	PNKP	SCN3A	SLC35A2	TBC1D24		GOSR2	PLA2G6
ATP1A2	CHRN2	GABRB2	ITPA	MOCS1	PNPO	SCN8A	SLC6A1	TSC1		KCNC1	

Panel Garrahan Epilepsias: Versión 2021/2022 - 112 genes totales + 1 control (SRY)



RESULTADO

Gen *WWOX*.

Variante a nivel del intrón 1, 16:78,099,886 - NM_016373.4:c.107+1G>A (Homocigosis)

Reportada como patogénica en la base de datos ClinVar, asociada a pacientes con encefalopatía epiléptica (ClinVar Id: 689796).

Algoritmo CNVs – Desarrollo Bioinformático Propio Hospital Garrahan

B PLATFORM

CASOS PANEL DE GENES

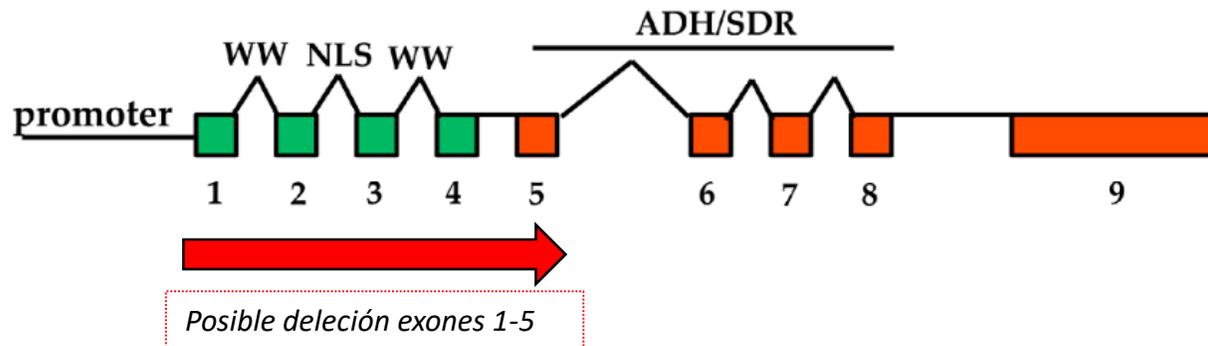
< 210730

Análisis de CNVs

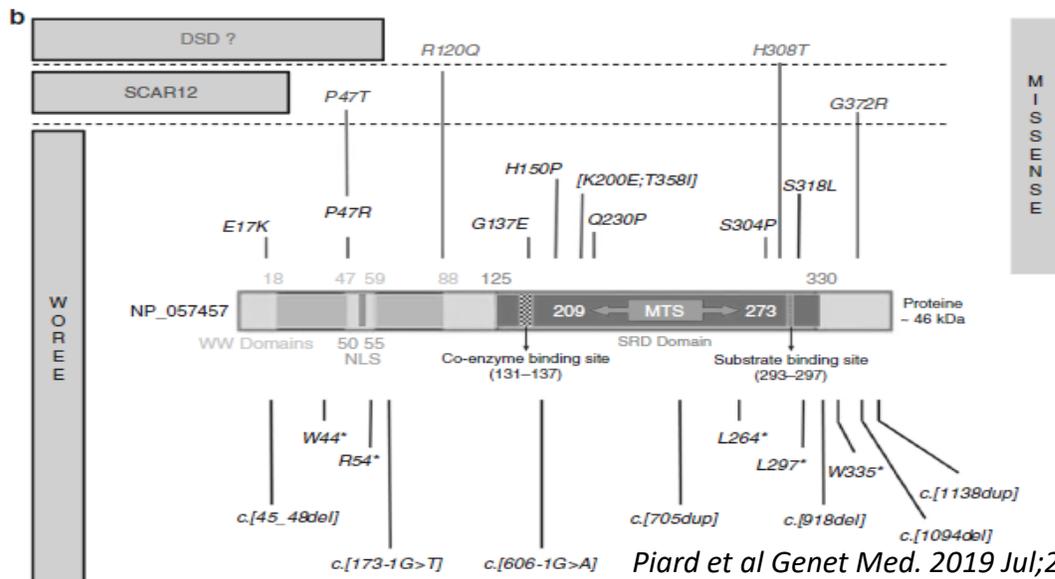
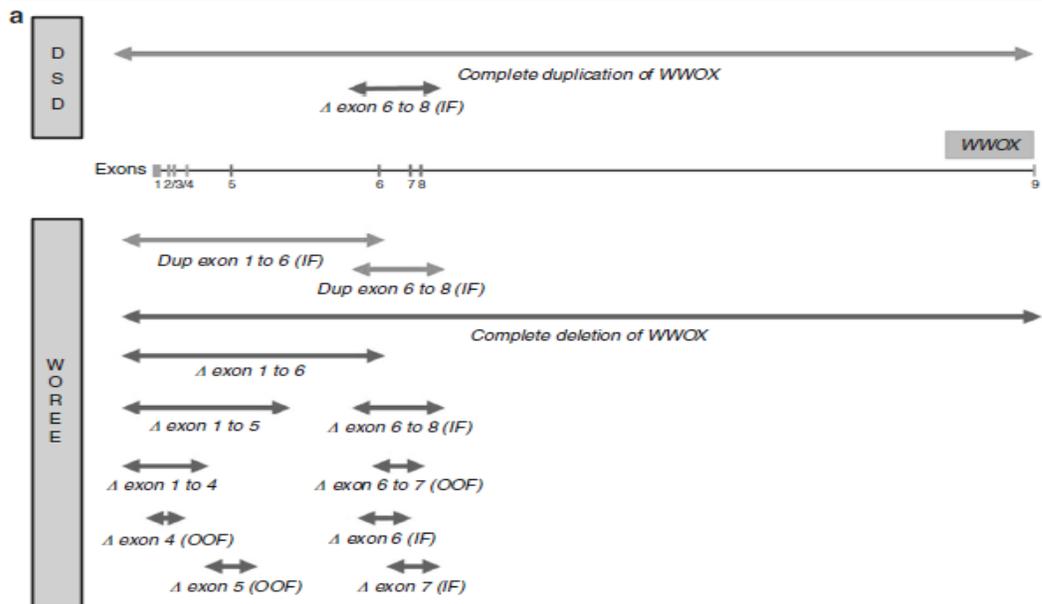
Total de resultados 1

Muestra	Gen	Herramienta	Chr.pos	Tipo	Valoración	Lecturas Esperadas	Lecturas Observadas
EE639	WVOX	DECoN	chr16: 78099761 - 78164300	deletion	BF 30	896	545

Gen **WVOX**

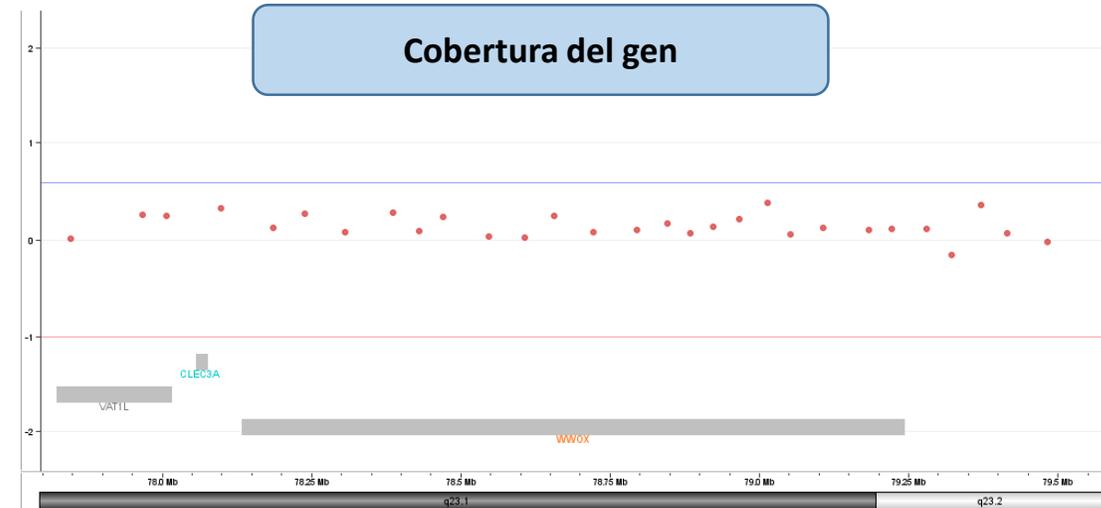


Espectro fenotípico asociado a alteraciones en gen *WWOX*



Piard et al Genet Med. 2019 Jul;21:1667-1671

Array-CGH gen *WWOX*

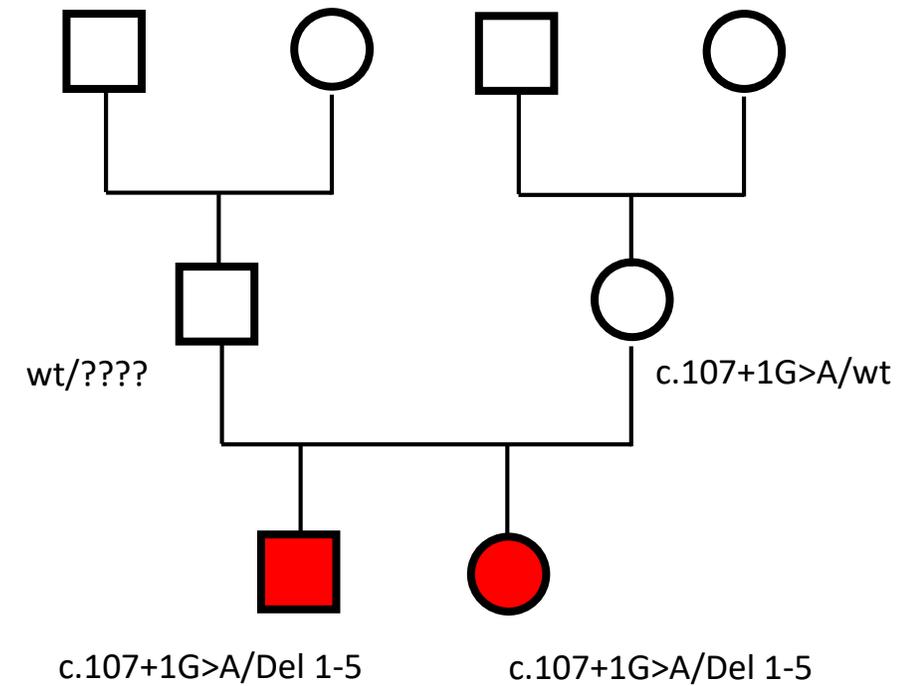


RESOLUCIÓN DEL CASO 2

Gen *WWOX*.

VARIANTE 1: SNV intrón 1, 16:78099886 -NM_016373.4:c.107+1G>A (Hemicigosis).

VARIANTE 2: Deleción en la región 16q23.1, en heterocigosis, que incluye los primeros 5 exones del gen (No podemos determinar los puntos de ruptura específicos).



Comentarios finales

- **Conformación de la Unidad de Genómica** en un Hospital de alta complejidad.
- **Fortalecimiento en equipamiento y capacidades bioinformáticas del área de BM.** La implementación de las nuevas tecnologías generó un crecimiento exponencial en el número de determinaciones y genes estudiados con un claro impacto en el diagnóstico de los pacientes.
- **Conformación de la división de Neurogenética** fomentando el trabajo interdisciplinario, remarcando la importancia de la formación molecular de los médicos especialistas.
- **Creación de nuevos procesos asistenciales.** Se ampliaron los estudios genómicos a áreas del Hospital que no tenían laboratorios específicos, permitiendo resolver las necesidades de diagnóstico molecular (Neurología, ECM, Trasplante Hepático, Trasplante de médula ósea, Neumología, Nefrología, Nutrición, Gastroenterología, Dermatología)
- **Incorporación de los estudios moleculares a los algoritmos diagnósticos.** En la actualidad los estudios genómicos forman parte del algoritmo diagnóstico de epilepsias, TMOV, NBIA, enfermedad mitocondrial dentro de la división de Neurogenética.
- Expandir e incorporar áreas del Hospital al diagnóstico de otras enfermedades de alta complejidad.

MUCHAS GRACIAS !!!!!!!!!!!!!!!

**UNIDAD DE GENÓMICA
HOSPITAL GARRAHAN**

