

II Jornadas de Genómica Clínica
La Revolución Genómica en la Medicina Clínica: Estrategias
Preventivas, Diagnósticas y Tratamientos Dirigidos
Viernes 27/10/2023 - 9 a 18hs
Aula 1401, Pabellón Cero+Infinito, Ciudad Universitaria,
CABA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA.

NGS y diagnósticos de certeza: Impacto en Inmunología clínica

Dr. Matías Oleastro

Jefe del Servicio de Inmunología

Hospital Nacional de Pediatría "Prof. Dr. Juan P Garrahan"

Buenos Aires, Argentina

Año 2023



Hospital de Pediatría
Garrahan

Enfermedades genéticas

Abordaje diagnóstico

Fenotipo

- ✓ *Heterogeneidad de Locus*
- ✓ *Heterogeneidad alélica*

Genotipo

Herramientas

Citogenéticas

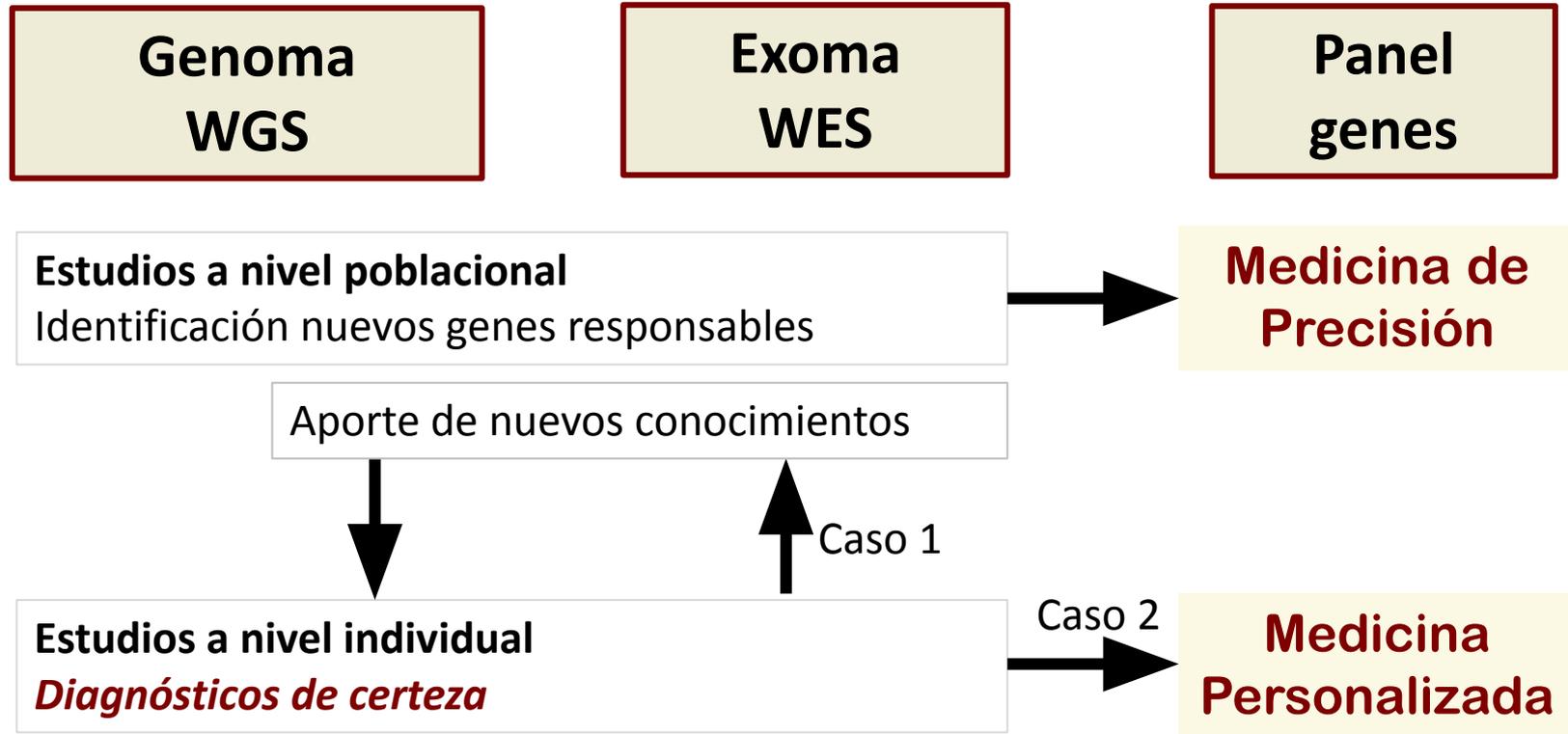
- Cariotipo/Bandeo G
- Técnicas de hibridación: FISH, FISH M, Array CGH
- Valoración longitud telomérica

Moleculares

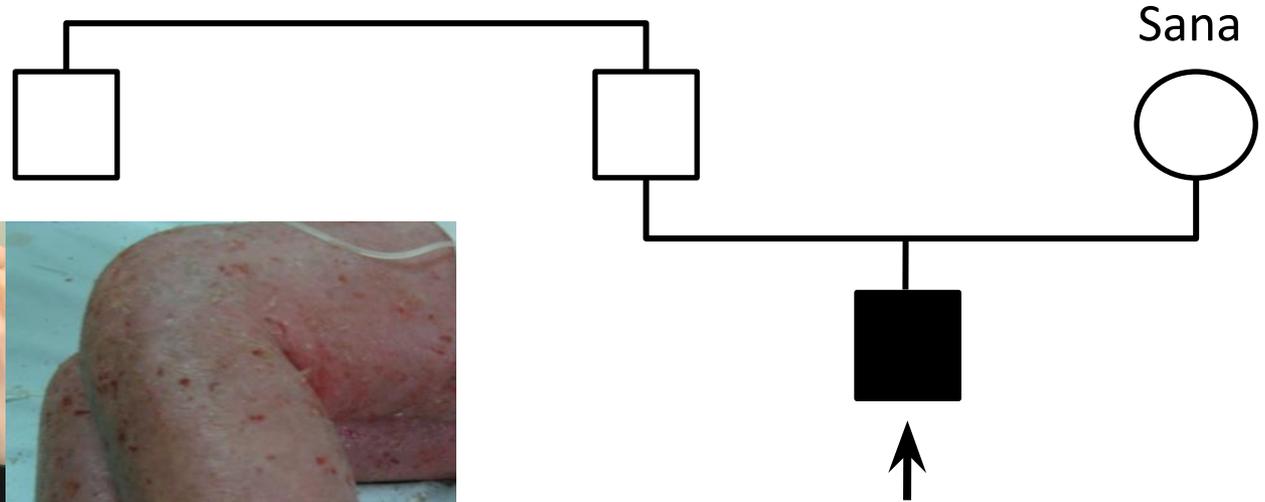
- Metodología Sanger
- MLPA
- NGS

Genotipo

Secuenciación de nueva generación - NGS



Caso clínico 1

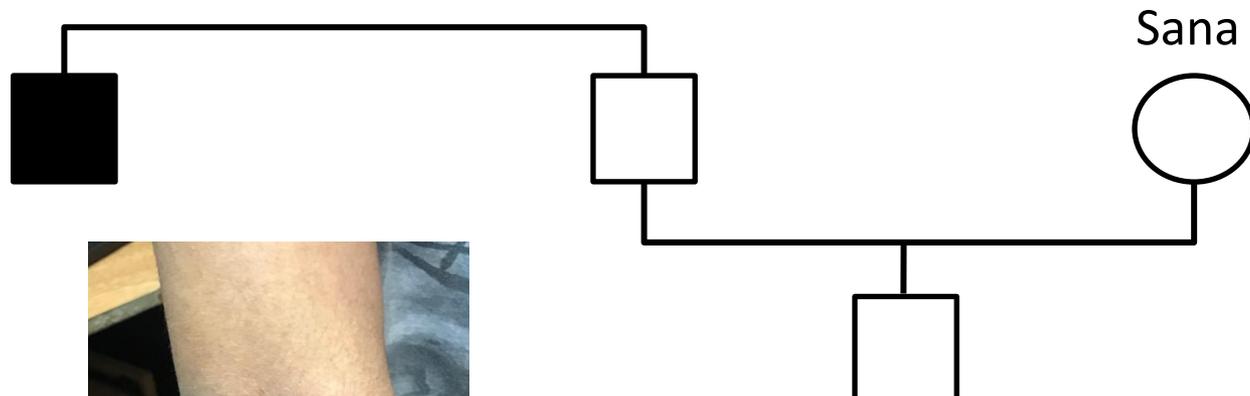


Consulta a Inmunología

3 meses:

- Eritrodermia severa
- **Dermatitis atópica severa**
- Sobre infección bacteriana - Sepsis

Caso clínico 1

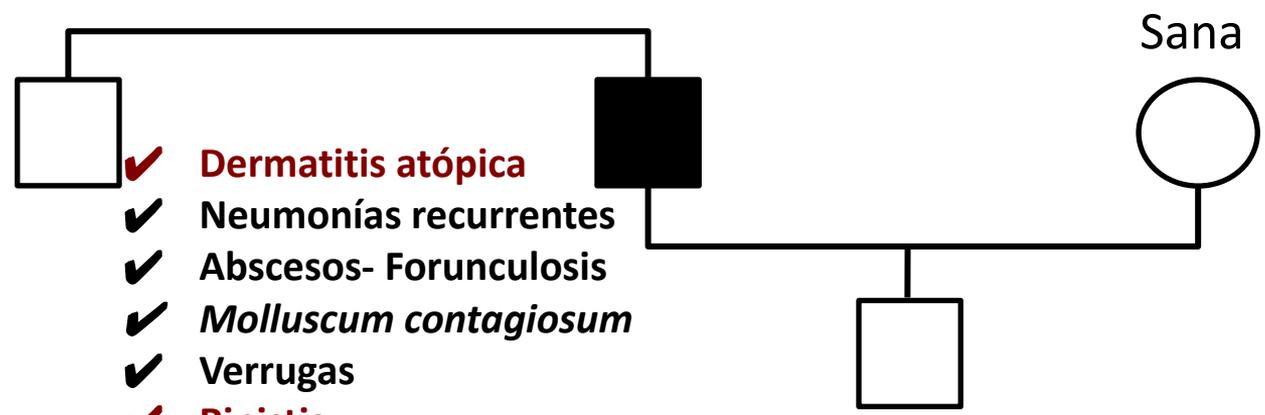


Tío, 17 años

- ✓ **Dermatitis atópica**
- ✓ Neumonías recurrentes
- ✓ Bronquiectasias
- ✓ Abscesos- Forunculosis
- ✓ *Molluscum contagiosum*
- ✓ **Rinitis**
- ✓ Estigmas faciales
- ✓ R^{to} Eosinófilos normal
- ✓ Leve hipergamaglobulinemia
- ✓ **IgE ↑**
- ✓ Formación Acs ↓



Caso clínico 1

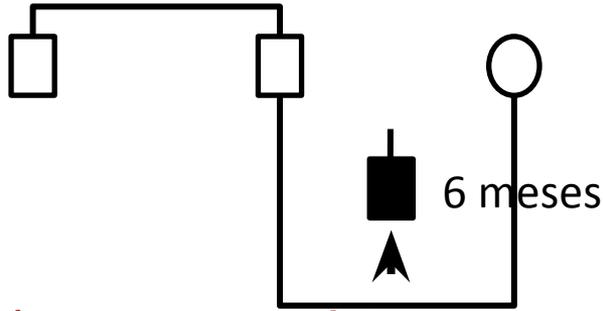


Tío, 17 años

- ✓ Dermatitis atópica
- ✓ Neumonías recurrentes
- ✓ Bronquiectasias
- ✓ Abscesos- Forunculosis
- ✓ *Molluscum contagiosum*
- ✓ Rinitis
- ✓ Dismorfias faciales
- ✓ R^{to} Eosinófilos normal
- ✓ Leve hipergamaglobulinemia
- ✓ IgE ↑
- ✓ Formación Acs ↓

- ✓ **Dermatitis atópica**
- ✓ Neumonías recurrentes
- ✓ Abscesos- Forunculosis
- ✓ *Molluscum contagiosum*
- ✓ Verrugas
- ✓ **Rinistis**
- ✓ Estigmas faciales
- ✓ R^{to} Eosinófilos normal
- ✓ Leve hipergamaglobulinemia
- ✓ **IgE ↑**
- ✓ Formación de Acs ↓

Caso clínico 1



- ✓ **Dermatitis atópica**
- ✓ Sepsis
- ✓ Diarrea – **Coloproctitis crónica**
- ✓ **Eosinofilia**
- ✓ R^{to} y VPM plaquetario normales
- ✓ **IgE ↑↑**
- ✓ **IgG e IgM ↓levemente**
- ✓ Poblaciones linfocitarias normales
- ✓ Subpoblaciones LB normales
- ✓ LT reg FOXP3 normales
- ✓ TH17 normales

Presunción diagnóstica

Entidad autosómica dominante

→ **Hiper IgE LOF (LX) por defecto *STAT3***

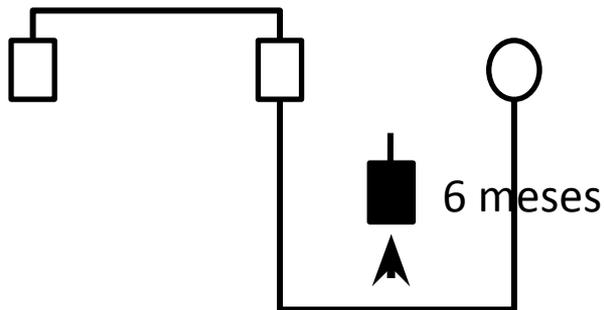
Secuenciación Sanger *STAT3*

Sin variantes patológicas

Laboratorio Biología Molecular Garrahan

- Emma Prieto
- Verónica Goris
- Judith Yancoski
- Silvia Danielian

Caso clínico 1



- ✓ **Dermatitis atópica**
- ✓ Sepsis
- ✓ Diarrea – **Coloproctitis crónica**
- ✓ **Eosinofilia**
- ✓ R^{to} y VPM plaquetario normales
- ✓ **IgE ↑↑**
- ✓ **IgG e IgM ↓ levemente**
- ✓ Poblaciones linfocitarias normales
- ✓ Subpoblaciones LB normales
- ✓ LT reg FOXP3 normales
- ✓ TH17 normales

Presunción diagnóstica

Entidad autosómica dominante



Secuenciación génica *WES*

Gen ***CARD11****

dup183_196

Heterocigota

* *Caspase Activation and Recruitment Domain 11*

Confirmada por Sanger

Laboratorio Biología Molecular Garrahan

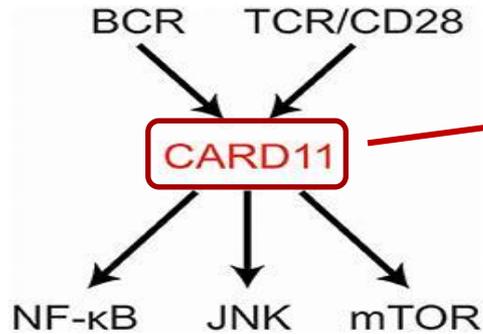
- Emma Prieto
- Verónica Goris
- Judith Yancoski
- Silvia Danielian

CARD11

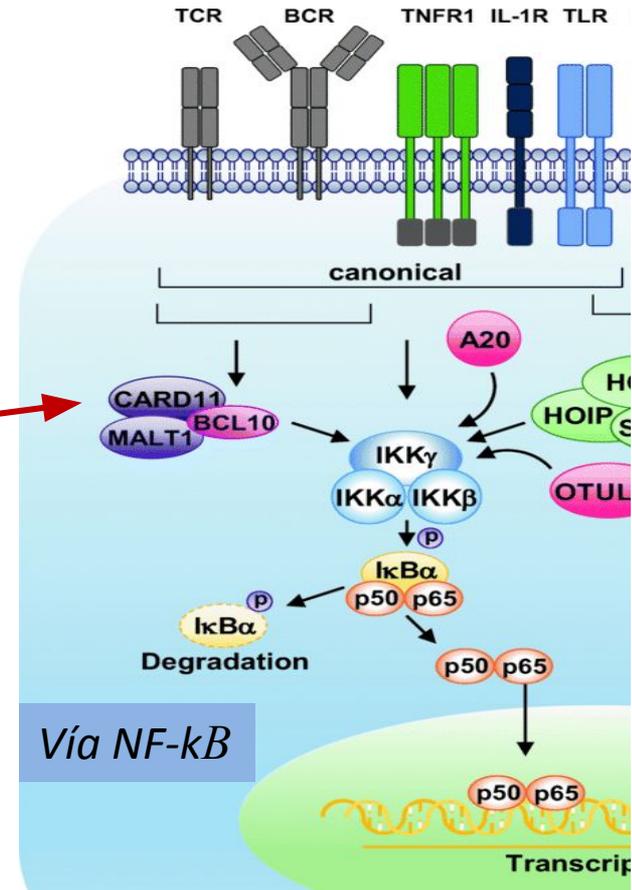


Adaptador en la señalización de activación:

- Linfocitos T
- Linfocitos B inducida por antígeno
- Linfocitos T reguladores



Activación, proliferación, supervivencia linfocitaria



Caso clínico 1

Germline hypomorphic *CARD11* mutations in severe atopic disease

Chi A Ma^{1,13}, Jeffrey R Stinson^{2,13}, Yuan Zhang^{1,13}, Jordan K Abbott³, Michael A Weinreich¹, Pia J Hauk³, Paul R Reynolds³, Jonathan J Lyons¹, Celeste G Nelson¹, Elisa Ruffo^{2,4}, Batsukh Dorjbal², Salomé Glauzy⁵, Natsuko Yamakawa⁵, Swadhinya Arjunaraja², Kelsey Voss², Jennifer Stoddard⁶, Julie Niemela⁶, Yu Zhang⁷, Sergio D Rosenzweig⁶, Joshua J McElwee⁸, Thomas DiMaggio¹, Helen F Matthews⁷, Nina Jones¹, Kelly D Stone¹, Alejandro Palma⁹, Matias Oleastro⁹, Emma Prieto⁹, Andrea R Bernasconi⁹, Geronimo Dubra⁹, Silvia Danielian⁹, Jonathan Zaiat⁹, Marcelo A Marti⁹, Brian Kim¹⁰, Megan A Cooper¹¹, Neil D Romberg¹², Eric Meffre⁵, Erwin W Gelfand^{3,14}, Andrew L Snow^{2,14} & Joshua D Milner^{1,14}

Nature genetics **2017**; 49 (8), 1192-1201

Estudios *NGS* a nivel individual
Diagnósticos de certeza

Aporte de nuevos conocimientos

4 Familias: 8 individuos mutaciones hipomórficas en *CARD11*

- ✓ **Dermatitis atópica severa** ± comorbilidades
- ✓ **Construcciones en línea linfocitos T con transfección variantes *CARD11*:**
 - Pérdida de función (LOF) de la proteína generada
 - Efecto de interferencia de actividad dominante vías *NF-Kβ* y mTORC1

El: Errores innatos de la Inmunidad

Clasificación – CARD11

Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee

Stuart G. Tangye^{1,2} · Waleed Al-Herz³ · Aziz Bousfiha⁴ · Charlotte Cunningham-Rundles⁵ · Jose Luis Franco⁶ · Steven M. Holland⁷ · Christoph Klein⁸ · Tomohiro Morio⁹ · Eric Oksenhendler¹⁰ · Capucine Picard^{11,12} · Anne Puel^{13,14} · Jennifer Puck¹⁵ · Mikko R. J. Seppänen¹⁶ · Raz Somech¹⁷ · Helen C. Su⁷ · Kathleen E. Sullivan¹⁸ · Troy R. Torgerson¹⁹ · Isabelle Meyts²⁰

Journal of clinical immunology, 2022; 1-35

Tabla 1: Deficiencia combinada

***CARD11* bialélicas – LOF – Deficiencia completa: Autosómica recesiva**

Tabla 2: Deficiencia Combinada en cuadro Sindromático

CARD11 monoalélico - Heterocigota - LOF Dominante negativa: Autosómica dominante

CARD11-associated atopy with dominant interference of NF-kB signaling (CADINS)

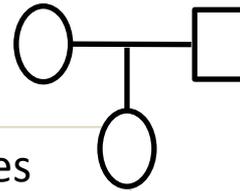
Tabla 3: Deficiencias de Anticuerpos

CARD11 monoalélico – Heterocigota – GOF: Autosómica dominante

B cell expansion with NF-kB and T cell anergy - BENTA



Caso clínico 2



Primera hija de padres sanos, no consanguíneos. No otros antecedentes

Embarazo controlado, sin complicaciones. RNT – PAEG, parto vaginal

Desde 1 mes a 11 meses (1^{ra} consulta):

- **Episodios febriles recurrentes** que no responden a los antitérmicos
- **Diarrea crónica**
- **Nódulos subcutáneos y rash urticariforme**
- **Aftas orales recurrentes**
- **Episodio de pericarditis**
- **Artralgias (?) episódicas**

✓ Intervalos libres de clínica

Antecedentes heredado familiares
Antecedentes personales

Caso clínico 2



Erupción urticariforme – Lesiones eritematosas palpables (nódulos SC)

Caso clínico 2

Exámenes complementarios

- Leucocitosis neutrofílica, monocitosis
- Anemia crónica
- Hiperplaquetosis
- *Reactante de fase aguda*: ↑ VSG (82 mm/H), PCR (187 mg/dl), C3 (190mg/dl)
- Autoinmunidad: FAN, ANCA, Prueba de Coombs: Negativo

■ ***Biopsia cutánea:***

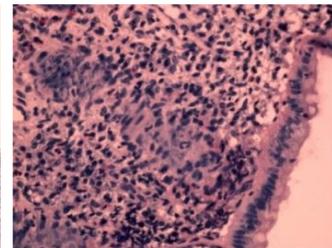
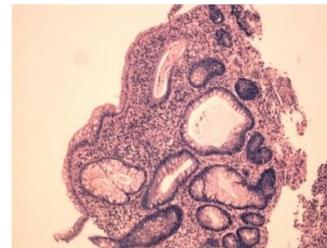
- Infiltrado inflamatorio mixto
- No identificación microbiana
- Vasculitis leucocitoclástica

Caso clínico 2

Exámenes complementarios

▪ **Endoscopia - Biopsia digestiva:**

- ✓ Leve **infiltrado inflamatorio** mixto
- ✓ Criptitis con abscesos crípticos
- ✓ Ulceraciones
- ✓ Ausencia de microorganismos
- ✓ Proctitis



Diagnóstico Enfermedad Inflamatoria Intestinal infantil - Símil Enfermedad de Crohn

Enfermedad Intestinal Inflamatoria Infantil

Tratamiento

- Antinflamatorios: Mesalazina
- **Anti TNF α** : Infliximab
(según recomendaciones / protocolos Gastroenterología)

Evolución

- ✓ Falta de respuesta - persistencia de diarrea e inflamación (endoscopías)
- ✓ Episodios febriles asociados a rash y dolores articulares (MMII)

Caso clínico 2

Fenotipo: Enfermedad inflamatoria intestinal infantil

Genotipos \neq Defectos moleculares?

**Heterogeneidad
de Locus**

Vía inmune IL10 - IL10R

Defectos en IL 10

Defectos en IL 10RA

Defectos en IL 10RB

Reconocimiento - eliminación de bacterias/hongos/Micobacterias

Defectos en *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4*

Defectos en *ITGB2*

Defectos en *SLC35C1*

Defectos en *RAC*

Defectos en *CARD9*

Defectos *IL 12R β*

Inmunidad adaptativa

Síndrome de Omenn

Defectos en *BTK*

ID Común Variable

Deficiencia en IgA

Defectos en *PI3KCD*

Defectos en *WASP*

Defectos linfocito T (varios)

Defectos en *LRBA*

Defectos en *PTEN*

Células T reguladoras

Defectos en *FOXP3*

Defectos en *IL2R*

Defectos en *STAT5b*

Defectos en *ITCH*

Defectos en *STAT1 GOF*

Defectos en *CTLA4*

Defectos en *LRBA*

Autoinflamatorias

Defectos en *MVK*

Defectos en *NLRC4*

Defectos en *MEFV*

Defectos en *APB13*

Defectos en *SH2D1A*

Defectos en *BIRC4* (XIAP)

Defectos en *PLCG2*

Defectos en *TRIM22*

Defectos en *NLRP3*

Defectos en *CARD8*

Defectos en *STAT3 LOF*

Defectos en *IFIH1 LOF*

Defectos en *SOCS1*

Otros defectos moleculares

Defectos en *IL 21*

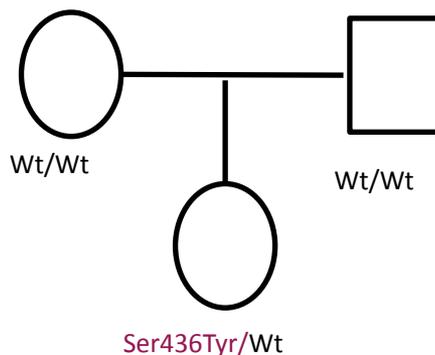
Caso clínico 2

Abordaje diagnóstico – Genotipo

NGS - WES (Obra social)

Variante gen **NLRP3/Criopirina**
(c.1307 C>A.) **Ser436Tyr**

NLRP3: Inflamasoma → IL 1 β



Ambos padres asintomáticos

Segregación familiar (Sanger)
Variante *de novo*

Inmunología Molecular Garrahan

- Silvia Danielian
- Judith Yancoski
- Verónica Goris
- Emma Prieto

Análisis

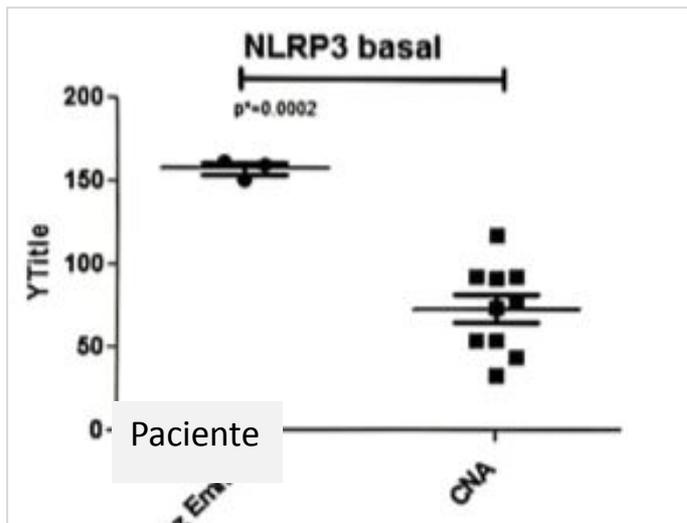
Caracterización y Predictores informáticos

- ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) **Probable patogénica**
- SIFT/Mutation Taster/Polyphen2/PROVEAN **Patogénica**
- CADD 24 (catoff 0.01) **Alto**
- Infevers (Registro génico) **No registrada**
- GnomAD (Genoma aggregation database) **No identificada**
- ClinVar (variaciones génicas – fenotipos, con evidencias) **NO**
- Publicaciones/Reportes **NO**

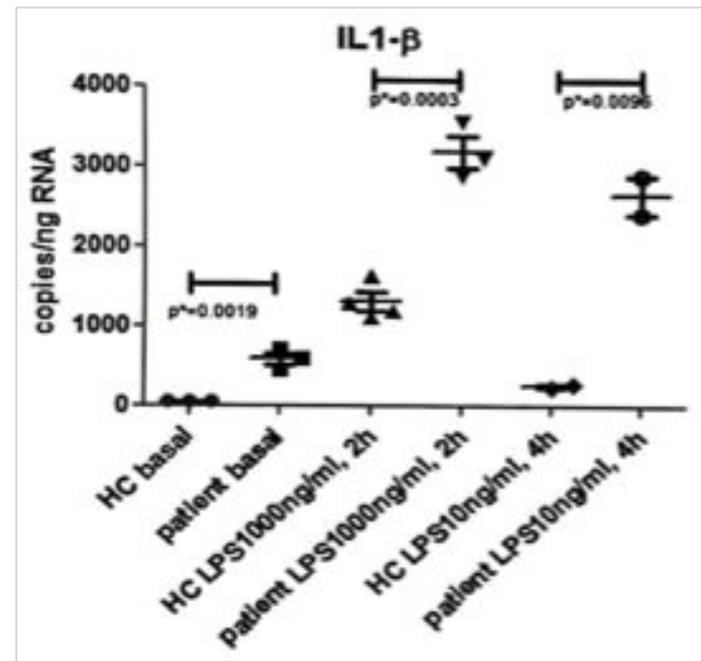
Significado incierto - VUS

- Silvia Danielian
- Judith Yancoski
- Verónica Goris
- Emma Prieto

Abordaje diagnóstico –Molecular Funcional



- ARN sangre periférica → ADNc
- PCR Digital
- Expresión **NLRP3** basal



- ARN sangre periférica → ADNc
- PCR Digital
- Expresión **IL 1β**
- Basal y estimulado con LPS

Diagnóstico de certeza

Enfermedad autoinflamatoria por Defecto en NLRP3

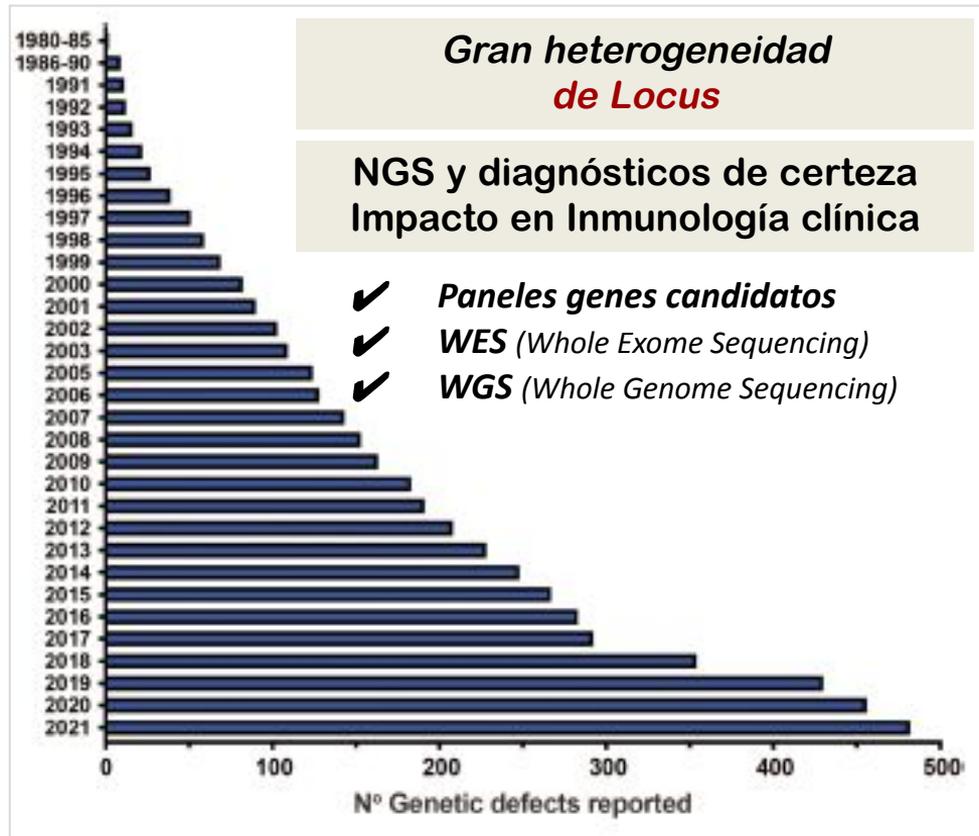
Medicina personalizada

Tratamiento preciso - personalizado

→ Biológico bloqueantes de **IL 1 β**

Franca mejoría

Errores innatos de la Inmunidad - EII



1. Inmunodeficiencias combinadas (IDC)
2. IDC asociadas a síndromes definidos
3. Deficiencias predominantes de anticuerpos
4. Enfermedades por desregulación inmune
5. Deficiencias congénitas del fagocito
6. Defectos de la inmunidad innata
7. Desórdenes autoinflamatorios
8. Deficiencias del sistema complemento
9. Fallas de médula ósea
10. Fenocopias de IDP

NGS y diagnósticos de certeza

Impacto en Inmunología clínica – Medicina Personalizada

Inmunología – Hospital Garrahan

Inmunología Molecular Garrahan

- Silvia Danielian
- Judith Yancoski
- Verónica Goris
- Emma Prieto

❖ Era “Sanger” - Primera Generación: 1995 - 2017

❖ Era “NGS” – Paneles genes de *Errores innatos de la inmunidad*

- 1^{ra} versión 68 genes (Año 2017)
- 2^{da} versión 122 genes
- 3^{ra} versión 142 genes
- 4^{ta} versión 332 genes (Año 2023)

Plataforma
Illumina MiSeq system

Twist NGS Library

292 casos índice estudiados → **80 (28%)** *Diagnóstico de certeza/ Muy probable*

- ✓ Tratamientos adecuados
- ✓ Estudios de segregación familiar
- ✓ Asesoramiento heredo familiar

NGS y diagnósticos de certeza: Impacto en Inmunología clínica

Concluyendo

La adquisición de nuevas metodologías de *secuenciación génica masiva – paralelo (NGS)* ha generado un enorme avance en la **Inmunología Clínica** permitiendo definir génicamente diversos cuadros **fenotípicos** de *Inmunodeficiencias Primarias (Medicina de Precisión)* y ofrecer a numerosos pacientes un **diagnóstico de Certeza, con ello** abordar una terapéutica **personalizada** y un adecuado asesoramiento heredo familiar.

II Jornadas de Genómica Clínica
La Revolución Genómica en la Medicina Clínica: Estrategias
Preventivas, Diagnósticas y Tratamientos Dirigidos
Viernes 27/10/2023 - 9 a 18hs
Aula 1401, Pabellón Cero+Infinito, Ciudad Universitaria,
CABA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA.

GRACIAS

**NGS y diagnósticos de certeza:
Impacto en Inmunología clínica**

GRACIAS