

DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN PACIENTES CON LEUCODISTROFIA A TRAVÉS DE SECUENCIACIÓN GENÓMICA MASIVA

Las leucodistrofias representan un grupo de trastornos hereditarios que afectan la sustancia blanca del sistema nervioso central con o sin compromiso del sistema nervioso periférico. Se encuentran dentro de las enfermedades raras, porque en promedio aparecen con baja frecuencia en la población (menos de 5 casos por cada 10.000 habitantes), presentan muchas dificultades diagnósticas y de seguimiento, existen pocos datos epidemiológicos, conllevan múltiples problemas sanitarios, sociales, psicológicos, educativos y laborales. Plantean dificultades en la investigación debido a los pocos casos identificados. El hecho de que los tractos de sustancia blanca estén afectados lleva casi universalmente al compromiso del sistema motor que se manifiesta como hipotonía en la primera infancia y progresa a la espasticidad en el tiempo. Esto puede llevar a un deterioro motor variable, desde diplejía espástica leve a cuadriplejía espástica grave que limita el movimiento intencional. Además, la disfunción motora puede perjudicar significativamente las funciones vitales, incluyendo la deglución, masticación, y (en algunos casos) la respiración. Otros síntomas que varían según el trastorno incluyen trastornos extrapiramidales (por ejemplo, distonía y / o discinesias), ataxia, convulsiones y retraso en el desarrollo cognitivo o cambio en la función cognitiva a través del tiempo.[1]

El tratamiento se realiza de acorde a las manifestaciones clínicas presentadas en forma multidisciplinaria. La rehabilitación tiene un impacto positivo en la evolución de la enfermedad. En pocos casos de leucodistrofias las manifestaciones de la enfermedad primaria se pueden prevenir mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) o trasplante de médula ósea (BMT) temprano en el curso de la enfermedad. El diagnóstico precoz además de ser imprescindible para iniciar un tratamiento que pueda detener el avance de la enfermedad (sólo en algunos tipos de leucodistrofias) y/o para iniciar terapias de rehabilitación que tengan mayor eficacia si se inician en

**Hospital JM Ramos Mejía. Centro Universitario de Neurología JM Ramos Mejía.
Consultorio de Neurogenética**

estadíos tempranos, también sirve para poder realizar una planificación familiar a la hora de decidir si tener más hijos o no (dado que las probabilidades de tener otro hijo enfermo subsisten).

Obtener un diagnóstico preciso de leucodistrofia en un individuo dado por lo general implica:

- La obtención de una historia clínica y la historia familiar detallada
- Realizar un examen físico general y un examen neurológico
- Revisión de los resultados de la Resonancia Magnética cerebral:
- Realización de pruebas especializadas de laboratorio: estudios neurometabólicos y estudios genéticos.

Son pocas las situaciones como en el caso de la leucodistrofia metacromática donde a partir la deficiencia enzimática de arilsulfatasa se puede ir a buscar directamente la alteración del gen ARSA causante de esta enfermedad. En general en este grupo de patología existe una gran superposición fenotípica clínica e imagenológica, y resulta en muchas ocasiones difícil elegir un gen candidato para llegar a un diagnóstico molecular de certeza. Por tal motivo las técnicas de secuenciación genómica masiva podrían resultar una aproximación útil y costo efectiva en este grupo de pacientes.

OBJETIVO

Estudiar 20 pacientes de la República Argentina con sospecha de leucodistrofia mediante secuenciación genómica masiva con la finalidad de obtener un diagnóstico molecular de certeza de su enfermedad

MATERIALES Y MÉTODOS

Los participantes del estudio

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Ramos Mejía, en Buenos Aires, Argentina. Se obtendrá el consentimiento informado

**Hospital JM Ramos Mejía. Centro Universitario de Neurología JM Ramos Mejía.
Consultorio de Neurogenética**

por escrito de los padres de los probandos, si los mismos no fueran mayores de edad. La investigación clínica se realizará de acuerdo a los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Los datos de secuenciación de ADN permanecerán almacenados en forma confidencial y segura en la base de datos interna y estarán disponibles sólo a petición de los investigadores externos que deseen utilizarlos para fines de investigación. Las evaluaciones clínicas se realizarán en el Consultorio y Laboratorio de Neurogenética del Hospital Ramos Mejía.

La generación de datos genómicos

Se aislará ADN genómico a partir de sangre periférica y se secuenciará utilizando las plataformas Illumina HiSeq 1500[2] e Ion Torrent[3].

Alineamiento de secuencias y anotación

Las lecturas paired-end obtenidas a partir de los probandos se alinearán con el genoma humano de referencia GRCh37 utilizando la herramienta de alineación de Burrows-Wheeler (BWA)[4]. Los archivos SAM resultantes se realinearán y recalibraron por medio de la aplicación GATK5. El llamado de variantes mediante la herramienta Platypus[6]. La anotación de las variantes y la predicción de efecto se realizará con annovar[7].

Priorización bioinformática de variantes candidatas

Sólo las variantes de alta calidad se consideraran para el análisis. Aquellas con frecuencia poblacional estimada superior a 1% (datos del Proyecto 1000 Genomas y el Proyecto de Secuenciación del exoma) serán también descartadas por no ser de relevancia. De este conjunto restante, las variantes con alta probabilidad de afectar la función del gen (frame-shift, nonsense, missense, affecting splice sites and small insertions and deletions) se agruparán según modelos diferentes de herencia que podrían explicar el fenotipo de los probandos.

Revisión Manual de variantes candidatas

Tras la priorización, las variantes consideradas que posiblemente explicarían el fenotipo se investigarán a fondo individualmente a través del uso

**Hospital JM Ramos Mejía. Centro Universitario de Neurología JM Ramos Mejía.
Consultorio de Neurogenética**

de varias bases de datos y herramientas de evaluación funcional que incluyen aquellas proporcionadas por NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), ENSEMBL8 (www.ensembl.org/index.html), Mutación Taster9 (www.mutationtaster.org), Combined Annotation Dependent Depletion framework10 (cadd.gs.washington.edu) y Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins 11 ([string, String-db.org](http://string-db.org)), entre otras.

FACTIBILIDAD

El Consultorio y Laboratorio de Neurogenética del Hospital Ramos Mejía cuenta con profesionales entrenados para la correcta evaluación clínica e imagenológica de este grupo de pacientes. Cuenta además con profesionales experimentados y entrenados para realizar el análisis y la interpretación de los datos genómicos obtenidos y su correlación fenotípica. Lo avalan las publicaciones nacionales e internacionales realizadas por el grupo en cuestión. [12-16]

PRESUPUESTO

Secuenciación genómica en 20
pacientes
\$ 20.000 (Dólares americanos)

PARTICIPANTES DEL PROYECTO

- Fundación Lautaro Te Necesita www.fundacionlautarotenecesita.org
 - Consultorio y Laboratorio de Neurogenética Hospital Ramos Mejía
- Dr. Marcelo Kauffman : Neurólogo, Doctor en Medicina y Magister en Biología Molecular
- Dra. Dolores González Morón: Neuróloga especialista en neurooftalmología, Becaria Doctoral Conicet.
- Dra. Marta Córdoba: Neuróloga, Magister en Ciencias Biomédicas, Becaria Doctoral Conicet

**Hospital JM Ramos Mejía. Centro Universitario de Neurología JM Ramos Mejía.
Consultorio de Neurogenética**

Dr. Sergio Rodríguez Quiroga: Neurólogo, especialista en Movimientos Anormales

Lic. Nancy Medina, Licenciada en Genética

Dra. Patricia Vega: Neuropediatra

Dra. Cecilia Vazquez Dusefante : Neuropediatra

BIBLIOGRAFIA

- 1- Gene Reviews. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK184570/>
- 2- Illumina Inc. www.illumina.com
- 3- Life technologies. <http://ioncommunity.lifetechnologies.com/welcome>
- 4- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010 Mar 1;26(5):589–595.
- 5- McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA Sequencing data. *Genome Res*. 2010 Sep 1;20(9):1297–1303.
- 6- Rimmer A, Phan A, Mathieson I, Iqbal Z, et. al. Integrating mapping assembly- and haplotype-based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. *Nature Genetics* (2014) doi:10.1038/ng.3036
- 7- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data *Nucleic Acids Research*, 38:e164, 2010
- 8- Flicek P, Ahmed I, Amode MR, et al. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 1;41(D1):D48–D55.
- 9- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014Apr;11(4):361–362.
- 10- Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014 Mar;46(3):310–315.

**Hospital JM Ramos Mejía. Centro Universitario de Neurología JM Ramos Mejía.
Consultorio de Neurogenética**

- 11- Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: proteinprotein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 1;41(D1):D808–D815.
- 12- Córdoba M, Rodríguez-Quiroga S., González Morón D, Medina N, Kauffman MA, Expanding the spectrum of GRIK2 mutations: intelectual disability, behavioural disorder, epilepsy and dystonia. Manuscript CGE-00232-2014.R1, *Clinical Genetics* 2014
- 13- Cordoba M, Rodríguez-Quiroga S, Gatto EM, Alurralde A, Kauffman MA. Ataxia plus myoclonus in a 23-year-old patient due to STUB1 mutations. *Neurology.* 2014; 13.pii:10.1212/WNL.0000000000000600.
- 14- Córdoba M, González Morón D, Rodríguez-Quiroga S y Kauffman MA. Neurología genómica personalizada: el futuro es ahora. *Neurología Argentina. Neurol Arg.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2014.03.002>
- 15- Nemirovsky SI, Córdoba M, Zaiat JJ, et. al. Whole genome Sequencing reveals a de novo SHANK3 mutation in familial autism Spectrum disorder. *PLoS One.* 2015 Feb 3;10(2):e0116358. doi:10.1371/journal.pone.0116358. eCollection 2015.
- 16- Rodríguez-Quiroga SA, Cordoba M, González-Morón D, et. al Neurogenetics in Argentina: diagnostic yield in a personalized research based clinic. *Genet Res (Camb).* 2015;97:e10.