

Apellido, Nombre

Secuenciación por NGS de Panel de Epilepsia

Hospital Bitgenia

Datos del informe

Profesional Solicitante: Dr/a. Graciela Pérez
Institución o Procedencia: Hospital Bitgenia, CABA.
Responsable Bitgenia: -

Código de Caso: 0010

Análisis Solicitado: Análisis del panel de epilepsia para el paciente.

Resumen clínico: Paciente hijo de padres sanos no consanguíneos jóvenes sin antecedentes. No hay datos de relevancia en famiolograma de primera y segunda línea ancestral.

Los síntomas principales son mioclonías progresivas multifocales, rigidez y deterioro cognitivo severo y progresivo, arresto de personalidad y desconexión casi completa con el medio.

Se le han realizado estudios de RMN del cerebro y columna, fondo de ojos, estudio metabólico, todos normales. Aún no se realizó otro estudio genético. El diagnóstico clínico tentativo propuesto fue el de Epilepsia Mioclónica Progresiva, y se considera Encefalopatía Epiléptica como alternativo.

Tipo de muestras: ADN

Cód. Muestras: 0010-P

Fecha de Recepción: 27/02/2018

Fecha de Informe: 4/04/2018

Secuenciación de Panel de EPILEPSIA

Se encontraron las siguientes variantes de aparente relevancia clínica:

Posición	Gen	Variación nucleotídica	Cambio de aminoácido	Efecto	Cigotidad	Cob.	Info Externa
6:146007412	EPM2A	c.322C>T	p.Arg108 Cys	Cambio de aminoácido	HET	28/63	Patogénica: MT, CLNSIG 5, PolyPhen rs137852915
6:146056481	EPM2A	c.92_124del33		Delección	HET	10/12	

Variante 1: Se detecta en heterocigosis la variante missense c.322C>T (p.Arg108Cys), descrita previamente en la base de datos Human Gene Mutation Database (HGMD) asociada a epilepsia mioclónica progresiva, y en ClinVar como variante patogénica (**PS1, PP4**). La variante presenta predicción in-silico como patogénica (**PP3**), posee muy baja frecuencia en ExAC (sin la presencia de individuos homocigotas (**PM2**)) y se encuentra acompañada por una segunda variante patogénica/posiblemente patogénica en trans (**PM3**). De acuerdo con el criterio ACMG, la variante se clasifica como **Patogénica**.

Variante 2: Delección c.92_124del33 en carácter heterocigota que acompaña a la variante 1 en trans (**PM3**). Esta variante es de alto impacto y produce la delección de 11 aminoácidos en la proteína codificada por el gen EPM2A (**PVS1**). Dicha delección se encuentra localizada dentro de uno de los dos dominios de la proteína (Laforin protein tyrosine phosphatase y N-terminal CBM20 (Carbohydrate-Binding Module, family 20 domain) y con muy baja frecuencia poblacional en ExAC (sin la presencia de individuos homocigotas (**PM2**)). La bibliografía indica que existe una variante patogénica con una ubicación cercana a la del paciente (c.91-123del33)⁵ que afecta exactamente a los mismos 11 aminoácidos, perdiéndose un sitio de unión a sustrato⁶, al delecionarse el triptofano (W) altamente conservado de la posición 32 de la proteína (**PP3**). De acuerdo con el criterio ACMG, la variante se clasifica como **Patogénica (1xPVS and ≥2xPM/PP)**.

Interpretación biológica

El gen EPM2A (OMIM: 607566) se encuentra localizado en el cromosoma 6, abarca aproximadamente 70 kb y codifica un transcrito de 3 kb, que se divide en 4 exones. Tanto la variante (p.Arg108Cys) como la delección también se encuentran localizadas dentro del dominio CBM20 amino terminal (por sus siglas en inglés, family 20 Carbohydrate-Binding Module) de la proteína laforina, y muy cerca del sitio de unión a la maltohexosa.

En este contexto, si bien la delección de 11 aminoácidos (GRWEPRGAVRL) que abarca desde el residuo Glicina en la posición 30 hasta el aminoácido Leucina en la posición 40 no ha sido previamente reportada -y, por ende, es de significado incierto-, la bibliografía consultada indica que existe una variante patogénica con una ubicación cercana a la del paciente (c.91-123del33) (Gómez-Garre P. et al., 2000) que produce la pérdida de un sitio de unión a sustrato (maltohexosa) (Raththagala et al., 2015), al deleccionarse el triptofano (W) de la posición 32 de la proteína, lo que refuerza la hipótesis de que la variante encontrada es patogénica.

Mutaciones missense, nonsense y, en especial, microdelecciones en el gen EPM2A están relacionados con el desarrollo de la enfermedad de Lafora (OMIM: 254780), una modalidad de EMP caracterizada por la presencia de cuerpos de inclusión intracelulares típicos de ácido periódico de Schiff (cuerpos de Lafora). Los mismos consisten en un polímero anormal de glucosa que se acumula en el sistema nervioso central y periférico, entre otros tejidos. Se manifiesta inicialmente durante la adolescencia, de la misma manera que en el paciente, siendo la edad de inicio más común entre los 10 y los 17 años. Las convulsiones tónico-clónicas generalizadas y la desconexión suelen ser la primera manifestación, seguidas poco después por sacudidas mioclónicas asimétricas y masivas. En resumen, se consideró a la variante p.Arg108Cys, junto con la delección encontrada (c.91-123del33) en el mismo gen, como potenciales responsables del fenotipo observado con un alto grado de confianza.

Conclusiones - Síntesis

1- Se encontró en el paciente una variante missense (c.322C>T, p.Arg108Cys) en heterocigosis descrita como patogénica en las bases de datos y bibliografía consultada, relacionada con Epilepsia Mioclónica Progresiva.

2- Debido a que el diagnóstico de Epilepsia Mioclónica Progresiva presenta un modelo de herencia autosómico recesivo, es necesario tener en cuenta otra/s mutación/es para justificar su clínica. En este contexto, se encuentra y reporta una variante correspondiente a una delección de 11 aminoácidos, con alta probabilidad de ser patogénica.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Richards, S. et al. 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. *Genet. Med.* 17, 405–24 (2015).
2. Sherry, S. T. et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29, 308–11 (2001).
3. Stenson, P. D. et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum. Genet.* 133, 1–9 (2014).
4. Consortium, E. A. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Labs Journals)*, (2015).
5. Minassian BA1, Lee JR, Herbrick JA, Huizenga J, Soder S, Mungall AJ, Dunham I, Gardner R, Fong CY, Carpenter S, Jardim L, Satishchandra P, Andermann E, Snead OC 3rd, Lopes-Cendes I, Tsui LC, Delgado-Escueta AV, Rouleau GA, Scherer SW. 1998. "Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy". *Nat. Genet.* 171-4.
6. Raththagala M., Brewer M.K., Parker M.W., Sherwood A.R., Wong B.K., Hsu S., Bridges T.M., Paasch B.C., Hellman L.M., Husodo S., Meekins D.A., Taylor A.O., Turner B.D., Auger K.D., Dukhande V.V., Chakravarthy S., Sanz P., Woods V.L. Jr. Gentry M.S. 2015. "Structural mechanism of laforin function in glycogen dephosphorylation and lafora disease". *Mol Cell* 261-72.
7. Landrum, M. J. et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 44, D862–8 (2015).
8. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man.
9. Gomez-Garre P. Sanz Y, Rodríguez De Córdoba SR, Serratosa JM. Mutational spectrum of the EPM2A gene in progressive myoclonus epilepsy of Lafora: high degree of allelic heterogeneity and prevalence of deletions. (2000) *Eur J Hum Genet.* DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200571.
10. Raththagala M., Brewer M.K., Parker M.W., Sherwood A.R., Wong B.K., Hsu S., Bridges T.M., Paasch B.C., Hellman L.M., Husodo S., Meekins D.A., Taylor A.O., Turner B.D., Auger K.D., Dukhande V.V., Chakravarthy S., Sanz P., Woods V.L. Jr. Gentry M.S. 2015. "Structural mechanism of laforin function in glycogen dephosphorylation and lafora disease". *Mol Cell* 261-72.

Anexo I- Panel y Estrategia de Priorización de variantes

EPILEPSIA	ADSL, ALDH5A1, ALDH7A1, ALG13, AMT, ARHGEF9, ARX, ATP13A2, ATP1A2, ATP1A3, ATP6AP2, ATRX, BRAF, BRAT1, C12orf57, CACNA1A, CACNAD2, CASK, CDKL5, CES1, CHD2, CHRNA2, CHRNA4, CHRNA7, CHRN2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CNTNAP2, CSTB, CTSD, DEPDC5, DNAJC5, DNM1, DYRK1A, EEF1A2, EFHC1, EHMT1, EPM2A, FOLR1, FOXP1, FRRS1L, GABRA1, GABRB2, GABRB3, GABRG2, GAMT, GBA, GATM, GLRA1, GLDC, GNAO1, GOSR2, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRN, HCN1, HNRNPU, IER3IP1, IQSEC2, ITPA, KANSL1, KCNA2, KCNB1, KCNC1, KCNH2, KCNJ10, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, KCTD7, LGI1, LIAS, MAGI2, MBD5, MECP2, MEF2C, MFSB8, MOCS1, MOCS2, NEXMIF, NGLY1, NHLRC1, NR2F1, NRXN1, PACS1, PCDH19, PIGA, PIGN, PIGO, PIGV, PLCB1, PNKD, PNKP, PNPO, POLG, PPT1, PRICKLE1, PRRT2, PURA, QARS, RBFOX1, ROGDI, SATB2, SCARB2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN3A, SCN8A, SCN9A, SERPINI1, SGCE, SLC13A5, SLC19A3, SLC25A22, SLC2A1, SLC35A2, SLC6A1, SLC6A8, SLC9A6, SMC1A, SMS, SNX27, SPATA5, SPTAN1, STX1B, STXBP1, SUOX, SYN1, SYNGAP1, SYNJ1, SZT2, TBC1D24, TCF4, TPP1(CLN2), TSC1, TSC2, UBE3A, WDR45, WWOX, ZDHHC9, ZEB2.
------------------	---

Teniendo en cuenta el diagnóstico clínico y modelo de enfermedad propuesto (ver documentos de historia clínica y análisis de factibilidad asociados al caso) se priorizaron para el análisis aquellas variantes que cumplieran los siguientes criterios:

- I. Se ajustarán a un modelo de herencia autosómico recesivo o dominante (Ver RF).
- II. Estuvieran dentro de los genes relacionados clínicamente con casos de epilepsia mioclónica progresiva, epilepsia y encefalopatía epiléptica (ver RF).
- III. Estuvieran reportadas en la base de datos ClinVar¹ como patogénicas y/o que tuvieran una predicción bioinformática de alto impacto funcional y bajas frecuencias poblacionales.

Anexo II - Estadística General

Paciente	
Library Prep Kit	Sure Select Human All Exon V5
Reference	GRCh37
#Variants	86489
#Known variants	85660
dbSNP ratio	0.99
Het/Hom ratio	1.49
Ti/Tv ratio	2.39
Missense/Silent	0.96
Avg.coverage	53
#Genes	16690

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>

Anexo III - Metodología y Limitaciones.

Análisis Bioinformático para identificación de las variantes

Para la obtención del siguiente reporte a partir de la muestra de sangre/saliva obtenida se realizó una extracción del material genético -ADN-, luego se procedió a realizar una captura de las regiones que comprenden un EXOMA-HUMANO utilizando el kit “Agilent Sure Select V5”. Las regiones fueron secuenciadas con tecnología Illumina (llevada a cabo por la empresa MacroGen) obteniéndose ca. 73678850 lecturas. El procedimiento de mapeo-alineamiento y llamado de variantes fue realizado mediante el protocolo desarrollado en Bitgenia, basado en las buenas prácticas establecidas por el Broad Institute (Eli and Edythe L. Broad Institute of Harvard and MIT) y utilizando como referencia GRCH37.p13 primary assembly. El análisis del archivo de variantes (VCF) se realizó con el software B-platform. Los filtros de calidad tienen en cuenta la calidad del genotipado, la frecuencia alélica de la variante y la cobertura en la posición. La clasificación de las variantes puede cambiar en un futuro si se va conociendo más información acerca de las mismas. Se siguen las guías prácticas del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), C.G.M.

Limitaciones

Las variantes no han sido confirmadas mediante un método de análisis independiente y podrían representar errores técnicos. Algunos tipos de anomalías genéticas pueden no ser detectables mediante el uso de las distintas tecnologías involucradas en este estudio:

- Grandes reordenamientos y reordenamientos complejos.
- Variaciones del número de copias.
- Variantes en regiones repetitivas o con porcentajes extremos de GC.
- Deleciones/inserciones de mediano y gran tamaño, debido a una bajada de sensibilidad del alineador.
- Variantes en genes con pseudogenes asociados o con secuencias altamente homólogas.
- Variantes en mosaico de bajo grado.
- Variantes enmascaradas por fenómenos de dropout alélico.

Es posible que la región genómica que pudiera contener la/s eventual/es variantes indicadas no hayan sido capturadas o adecuadamente representadas en las secuencias obtenidas y en consecuencia no detectadas en el presente estudio. Por otro lado, es posible que una anomalía genética particular pueda no ser reconocida como la causa del trastorno en estudio debido al conocimiento incompleto de la funcionalidad de todos los genes y regiones genómicas secuenciadas, así como el impacto funcional de cada variante identificada.

Los resultados informados están destinados exclusivamente a profesionales de la salud cualificados para su interpretación en el contexto de una consulta médica y no proporcionan per-se consejo médico, diagnóstico o tratamiento alguno. Es por esto que los resultados aquí presentados deben ser cuidadosamente interpretados por el profesional solicitante.