



Diagnóstico Genético en Nefrología Pediátrica

Paola Krall, BQ, PhD

Profesora Auxiliar- Facultad de Medicina

Universidad Austral de Chile (UACH)

IPNA Teaching Course, Valdivia-Chile, Septiembre 2019

Terminología genética

Genoma

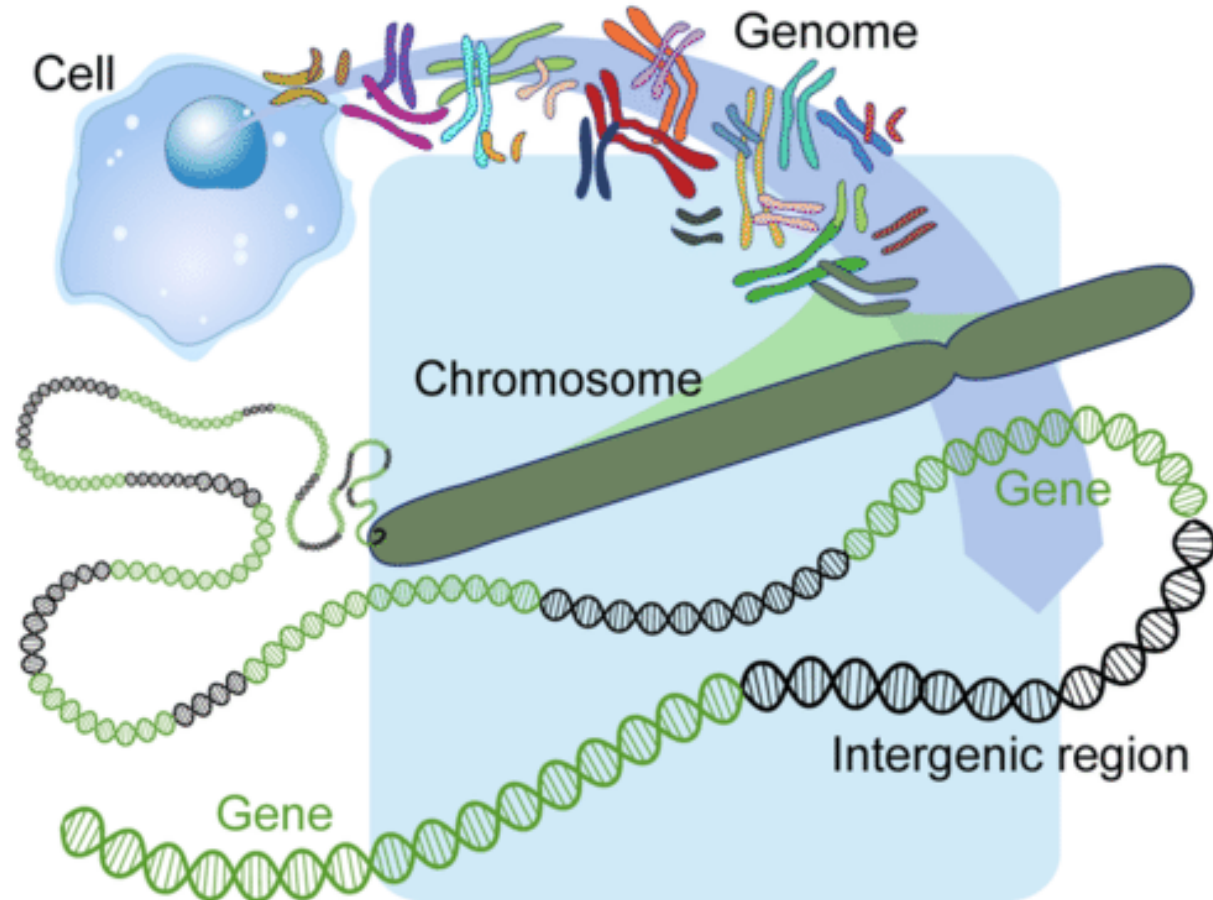
3.000.000.000 pb

Exoma

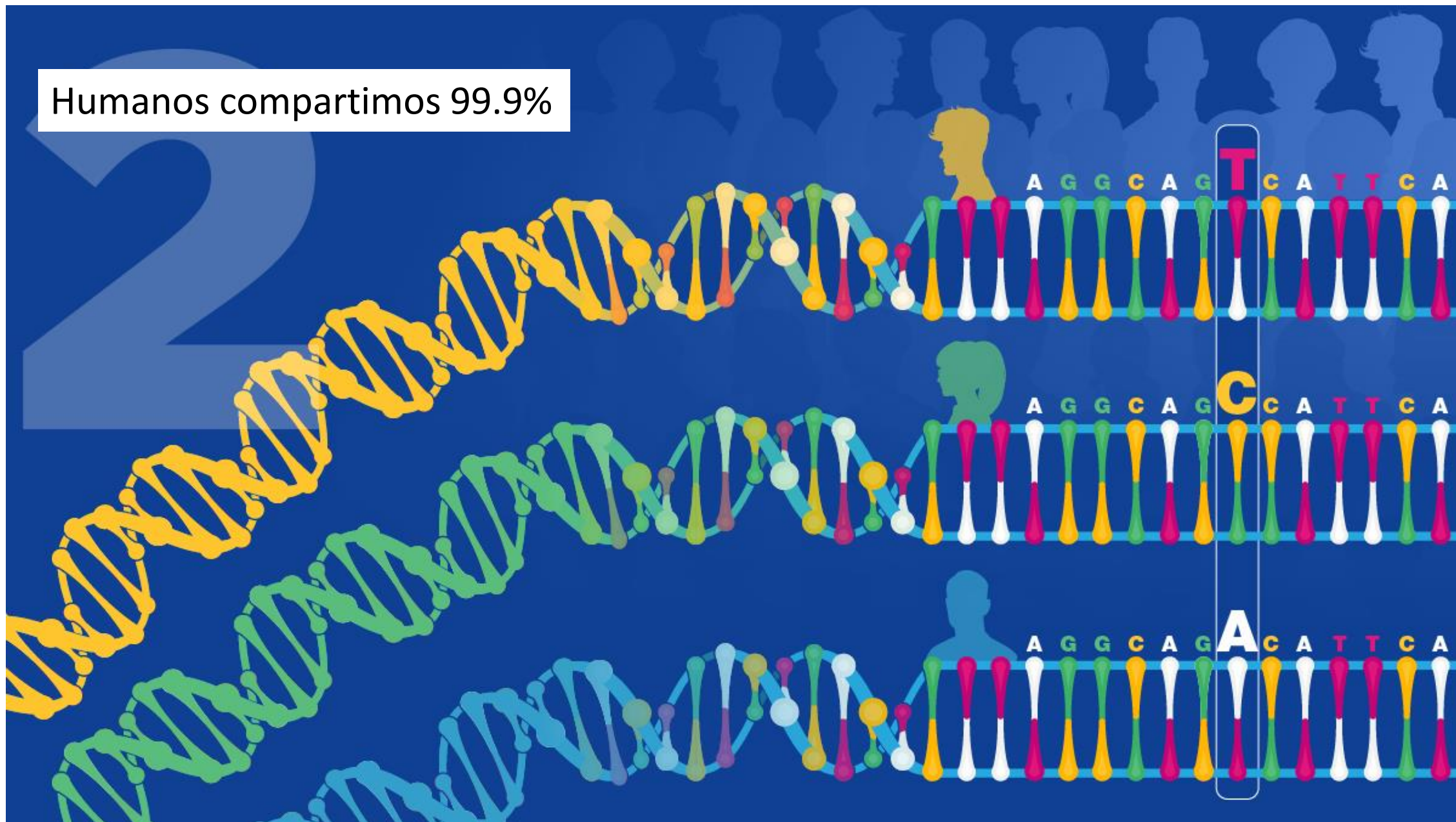
30.000.000 pb (1%)

Genes

20.000-25.000



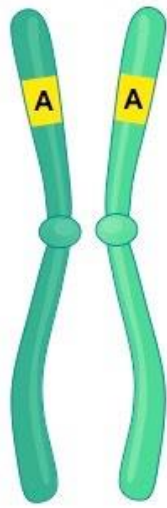
Humanos compartimos 99.9%



Chile y su herencia negra: ¿cuánto de genes africanos tienen los chilenos?

Variantes genéticas- alelos

- Los genes pueden tener más de una versión (alelo)
- Somos bialélicos (excepto XY)
- Los alelos pueden (o no) tener impacto clínico



Homozygous
Alleles are same



Heterozygous
Alleles are different



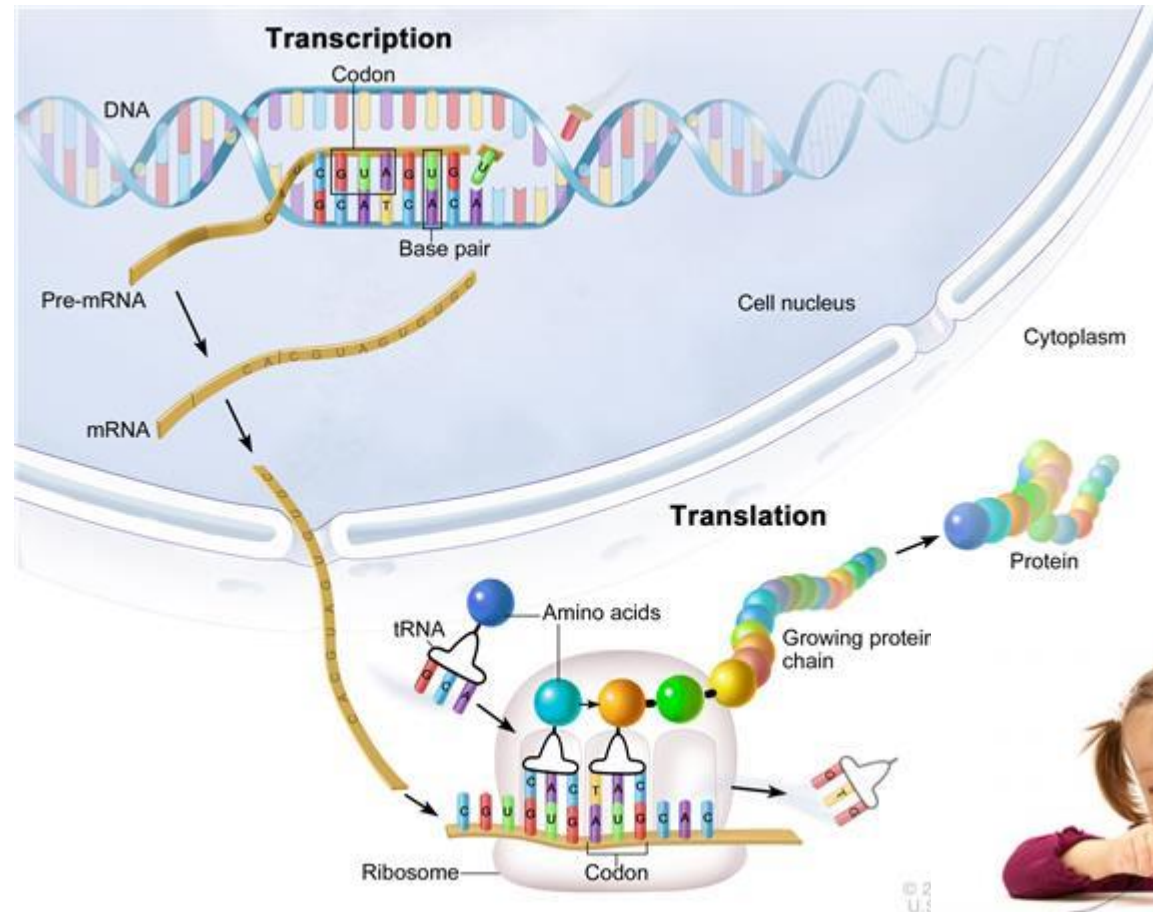
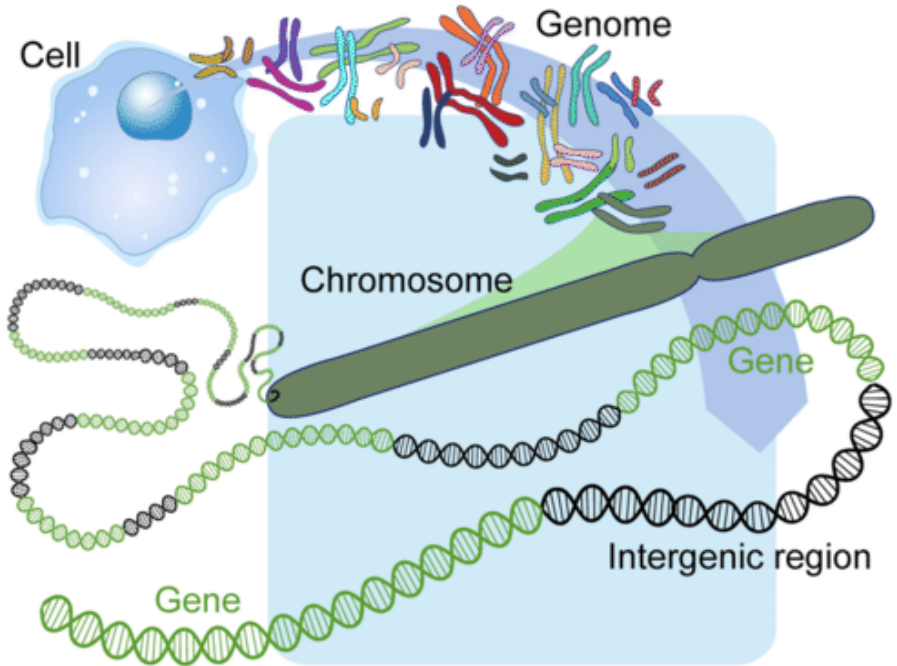
Hemizygous
*Only one allele
(e.g. XY)*

Chile y su herencia negra: ¿cuánto de ~~genes~~ africanos tienen los chilenos?

alelos

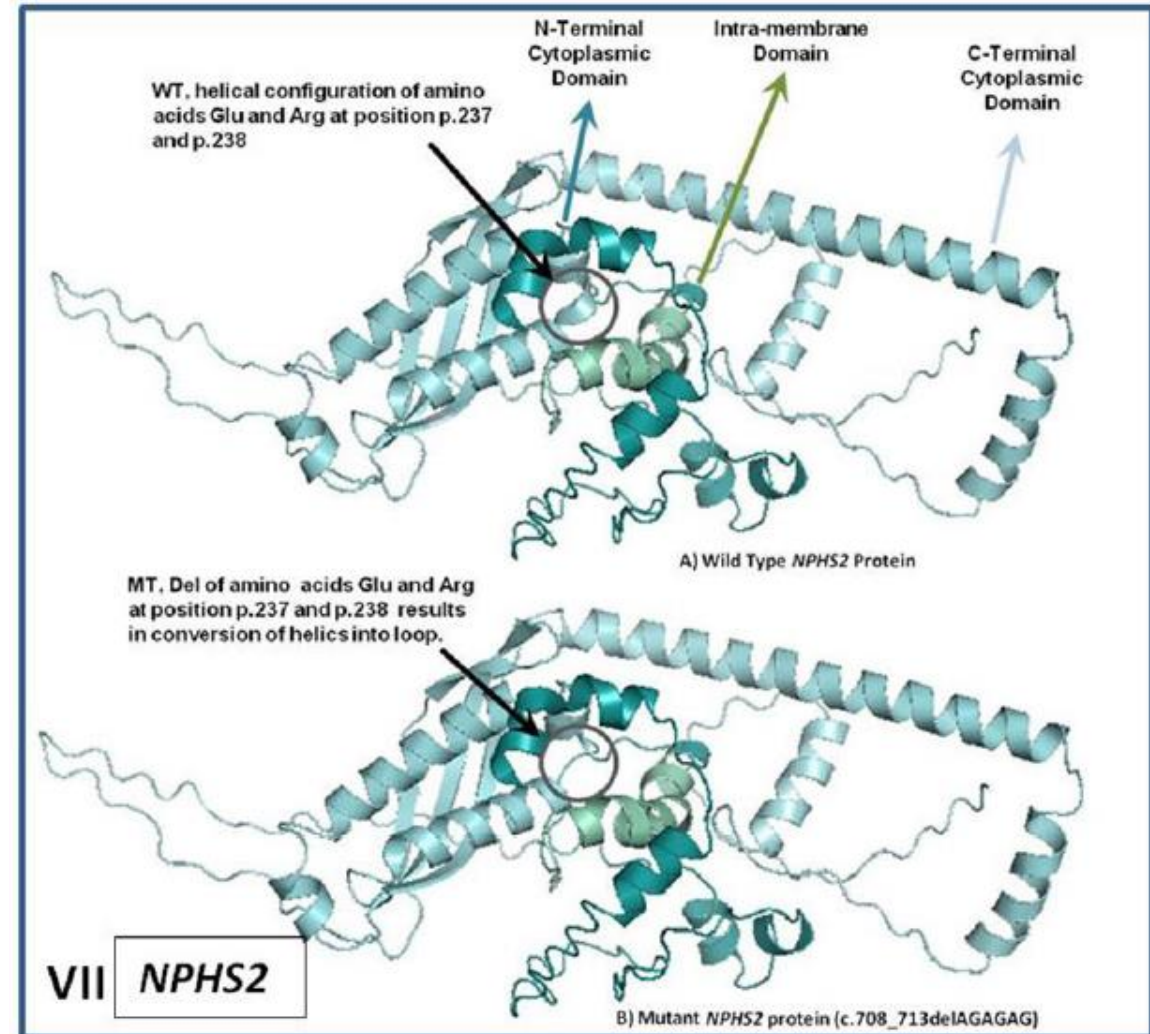
- En promedio 4%.

Dogma Central de la Biología Molecular



VARIANTES GENÉTICAS

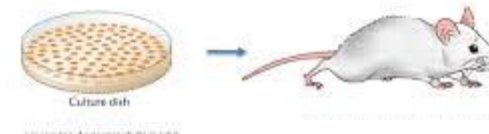
		second base in codon							
		T	C	A	G				
T	TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys	T
	TTC	Phe	TCC	Ser	TAC	Tyr	TGC	Cys	C
	TTA	Leu	TCA	Ser	TAA	stop	TGA	stop	A
	TTG	Leu	TCG	Ser	TAG	stop	TGG	Trp	G
C	CTT	Leu	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg	T
	CTC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CTA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CTG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	ATT	Ile	ACT	Thr	AAT	Asn	AGT	Ser	T
	ATC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	ATA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	ATG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly	T
	GTC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GTA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GTG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G



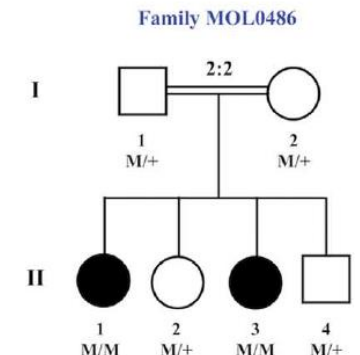
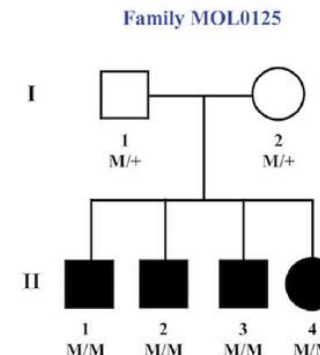
PATOGENICIDAD



- Variantes conocidas están en la literatura-bases de datos (ExAC, dbSNP, HGMD, PKD Database, LOVD Database, etc.)
- Algunas tienen estudios funcionales en células, modelos animales, etc.
- Variantes nuevas se someten a análisis *in silico*:
 - Align GVGD: predice “distancia” entre dos aa
 - Polyphen: predice impacto en estructura y función
 - SIFT: analiza homología de secuencias
 - Mutation Taster, etc.
- Análisis de segregación de variantes



A



PATOGENICIDAD (Guía ACMG)

Benign (B)

Likely Benign (LB)

**Variant of Uncertain
Significance (VUS)**

Likely Pathogenic (LP)

Pathogenic (P)

Se considera resultado **negativo**.

Son las más abundantes.

No se hace estudio en la familia.

No se informan.

Se considera resultado **negativo**.

La evidencia indica que no causa enfermedad

No se hace estudio en la familia.

No se informan.

Se considera resultado **positivo**.

Hay evidencia contundente que causan enfermedad

Se informan y se hace estudio familiar.

Familiares portadores no afectados necesitan seguimiento

Se considera resultado **positivo**.

La evidencia indica que causa enfermedad.

Se informan y se hace estudio familiar,

Familiares portadores no afectados necesitan seguimiento.

La evidencia disponible es limitada.

No se sabe si causa o no enfermedad

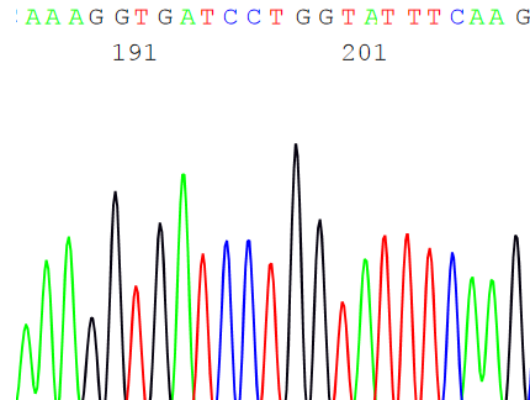
Se informan y el estudio familiar pudiera orientar.

En el futuro pudiera dejar de clasificarse como VUS.

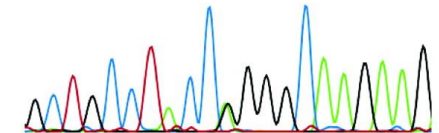
ENFERMEDADES RENALES HEREDITARIAS (ERH)

- ❖ OMIM describe 300 ERH
 - ❖ 45 ERH progresan en 10 años a ERT
 - ❖ Terapia de remplazo renal (Diálisis o Tx)
 - ❖ Tx renal (DV o DC) aumenta expectativa de vida
 - ❖ DV puede ser descartado si hay antecedentes familiares (+)

Tecnologías de secuenciación directa vs. masiva (NGS)



- 1-96 fragmentos (2-3 horas)
- Mayor calidad (Gold standard)
- Análisis simple
- \$ por corrida

[illegible]

- Millones de fragmentos (24-48 horas)
- Menor calidad
- Análisis complejo
- \$\$\$ por corrida

Paneles de genes por NGS

NDI

AVPR2, AQP2

Bartter/Gitelman

Liddle/PHA

WNK4, WNK1, CUL3, KLHL3,
SLC12A3, SLC12A1, KCNJ1,
CLCNKB, BSND, CLCNKA, CASR,
SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G,
NR3C2 +10 related genes

Renal tubular acidosis / Fanconi syndrome

SLC4A1, ATP6V1B1, ATP6V0A1,
ATP6V0A4, SLC4A4, SLC34A1,
CA2, EHHADH, HNF4A, SLC2A2

Uric acid abnormalities

SLC22A12, SLC2A9, ABCG2,
SARS2, UMOD, HPRT1, G6PC,
MUC1

FSGS / SRNS

NPHS2, NPHS1, WT1, PLCE1, LAMB2,
SMARCAL1, INF2, TRPC6, COQ6, ITGA3,
MYO1E, CUBN, COQ2, LMX1B, COQ8B,
PDSS2, ARHGAP24, ARHGDI1, ITGB4,
ACTN4, CD2AP, APOL1, PAX2, ANLN,
CRB2, MEFV, PTPRO, GATA3



Polycystic kidney diseases

PKD1, PKD2, PKHD1, other 66 genes

Alport syndrome /

Thin basement membrane

COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6,
MYH9

Ca/P/Mg metabolism disorders

HSD11B2, CYP11B1, CYP11B2,
KCNJ5, CACNA1D, CACNA1H,
FGF23, DMP1, ENPP1, PHEX,
SLC34A3, CLCN5, OCRL, CYP27B1,
VDR, TRPM6, FXYD2, CLDN16, EGF,
CLDN19, CNNM2, KCNJ10, KCNA1,
GNA11, STX16, GNAS-AS1, GNAS,
PTH, GCM2, CDC73

aHUS

CFH, CD46, CFI, CFHR1, CFHR3,
CFHR5, CFB, C3, THBD, DGKE, PLG

Fabry disease

GLA

Others

42 genes

237 genes are covered

Síndrome de Alport

SÍNDROME DE ALPORT

- ERH muy rara
- Pacientes alcanzan ERT a los 16-35 años
- Asociada a 3 genes: COL4A5 (85%) y COL4A3/COL4A4 (15%)=150 exones
- Recomendación: análisis por panel dirigido



Resumen

Reclutamiento 2015-2018 (FONDECYT)

- 24 casos (18H/6M); 19 pediátricos
- 14 con resultado **positivo: COL4A5 n=10; COL4A3 n=4**
- Aplicaciones: identificar donante seguro para trasplante renal, facilitar entrega de consejo genético, confirmar una sospecha clínica, descartar riesgo genético en familiares

Cistinosis nefropática

CISTINOSIS NEFROPÁTICA

- EH muy rara (1/100.000)
- Tubulopatía con sínd. Fanconi, progresa a ERC en edad pediátrica
- Asociada a 1 gen: CTNS (10 exones codificantes)
- Recomendación: análisis por secuenciación directa o PCR del 57kb

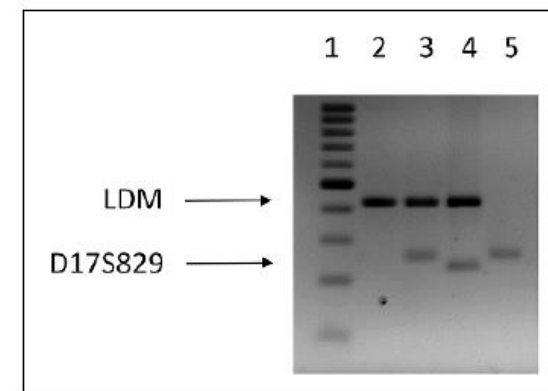
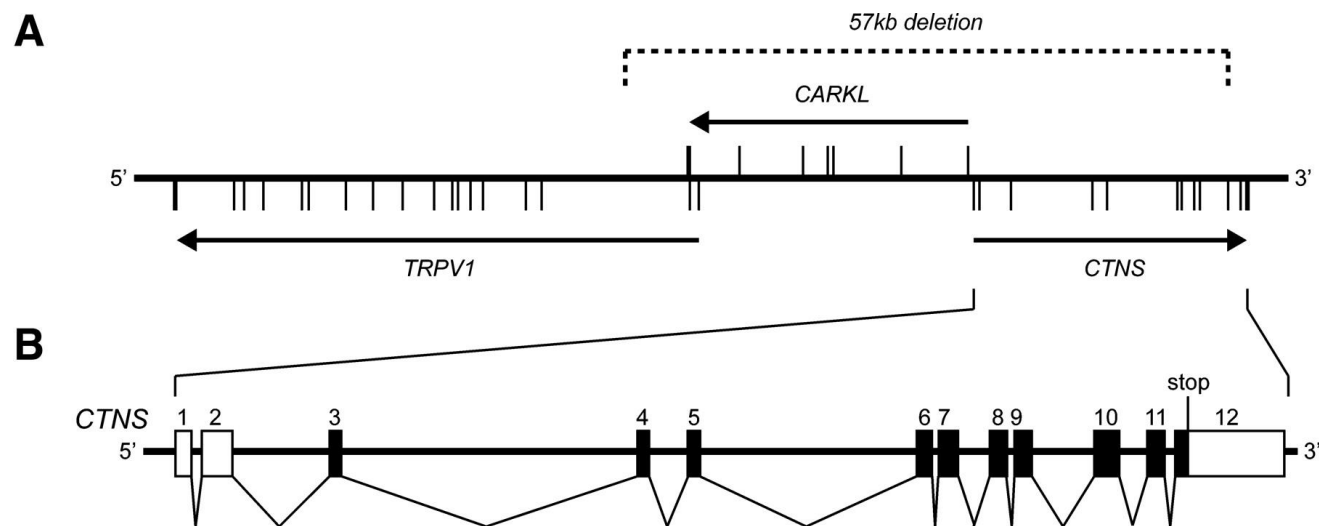


Figura 2. PCR específica de la delección 57kb. Electroforesis en gel de agarosa de productos PCR para LDM y el microsatélite D17S829. En el carril 1: estándar de 100 pb (banda gruesa 500 pb); carril 2: caso índice; carril 3: padre; carril 4: madre; carril 5: individuo control (no pertenece al grupo familiar).

Resumen

Reclutamiento 2016-2019 (FONDECYT)

- 5 casos (2H/3M); todos pediátricos
- 5 con resultado **positivo: del57kb n=4; Exón 12 c.992_993insG n=1**
- Todos con acceso a cisteamina

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Worldwide view of nephropathic cystinosis: results from a survey from 30 countries



13 países en desarrollo (PD)
17 países vías de desarrollo (PVD)

Aurélia Bertholet-Thomas¹, Julien Berthiller^{2,3,4}, Velibor Tasic⁵, Behrouz Kassai^{2,3,4}, Hasan Otukesh⁶, Marcella Greco⁷, Jochen Ehrich⁸, Rejane de Paula Bernardes⁹, Georges Deschênes¹⁰, Sally-Ann Hulton¹¹, Michel Fischbach¹², Kenza Soulami¹³, Bassam Saeed¹⁴, Ehsan Valavi¹⁵, Carlos Jose Cobenas¹⁶, Bülent Hacıhamdioglu¹⁷, Gabrielle Weiler¹⁸, Pierre Cochat¹ and Justine Bacchetta^{1,19*}

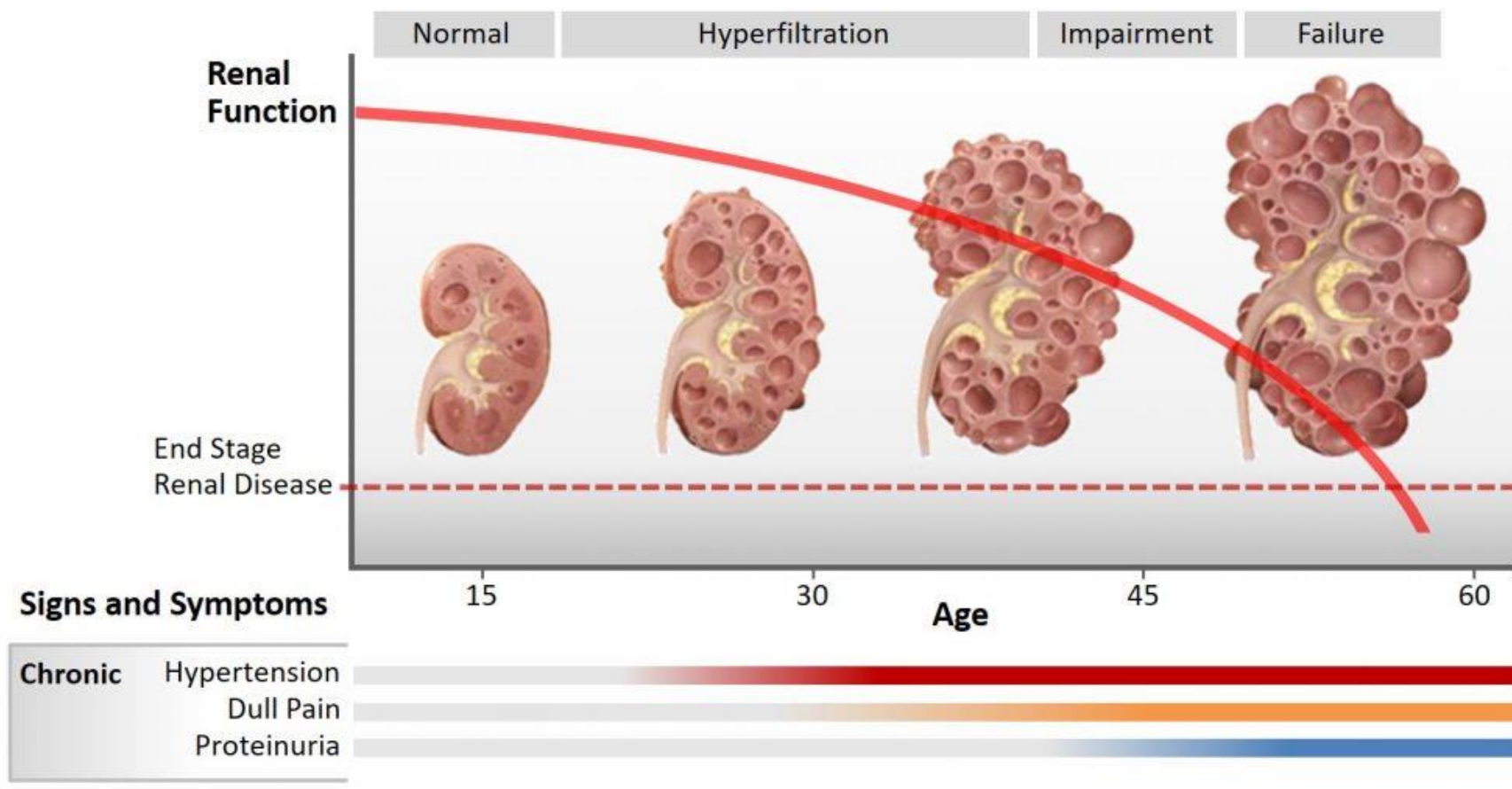
DISCREPANCIAS IMPORTANTES

- Solo 54% de PVD acceden al fármaco vs. 100% de PD
- Solo 22% de PVD realizaron análisis mutacional
- Si cisteamina se inicia después de los 2.5 años no hay diferencias entre PVD y PD

Poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD)

ADPKD: Poliquistosis Renal Autosómica Dominante

Typical Disease Progression in ADPKD



ERH más frecuente (1/1000), poliquistosis “de adulto”, ERT a los 50-60 años

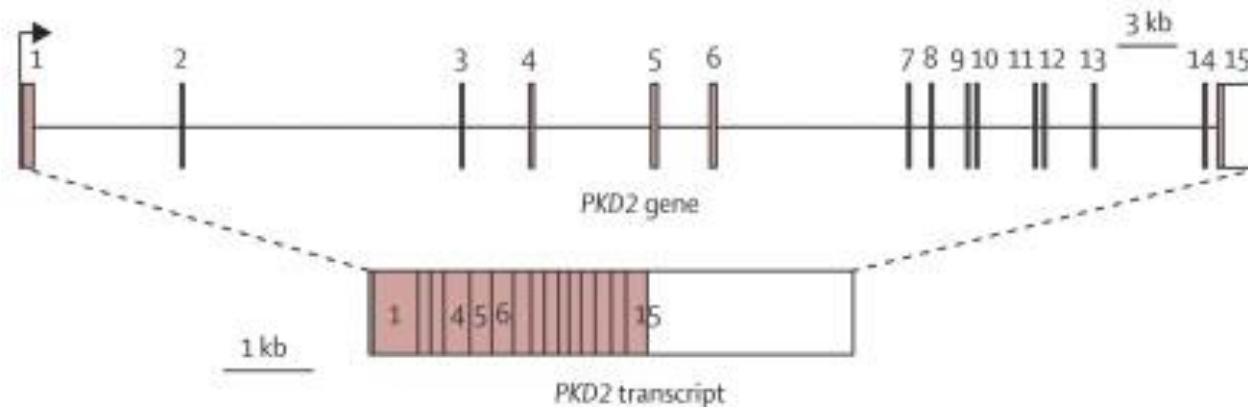
2 GENES RESPONSABLES DE ADPKD

Cromosoma 16



PKD1
ψgenes
>90% homología

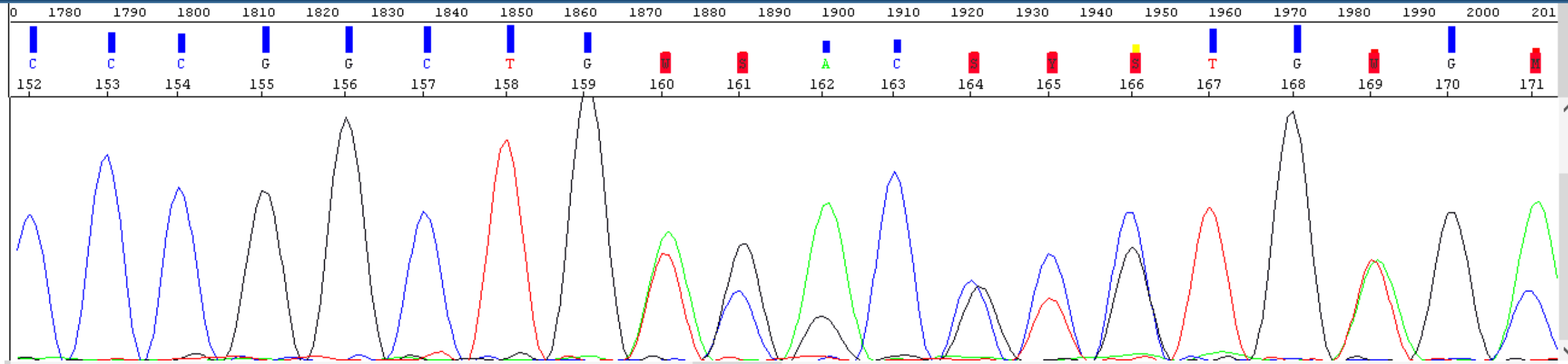
Cromosoma 4



PKD2

¿Secuenciación Directa o Secuenciación Masiva?

FAMILIA PQD-2



C T G **T G** A C G C C T G T G A
C T G A C G C C T G T G A G C

PKD1 Exon 37 c.10907_10908del TG [HET]; p.Val3636AspfsX85

SCORE PROPKD: modelo de pronóstico clínico-genético

Score PROPKD (Escala 0-9 puntos):

- sexo masculino = 1 punto
- HTA < 35 años = 2 puntos
- Eventos urológicos < 35 años = 2 puntos
- Mutación PKD1 truncante = 4 puntos
- Mutación PKD1 no truncante = 2 puntos

0-3 puntos

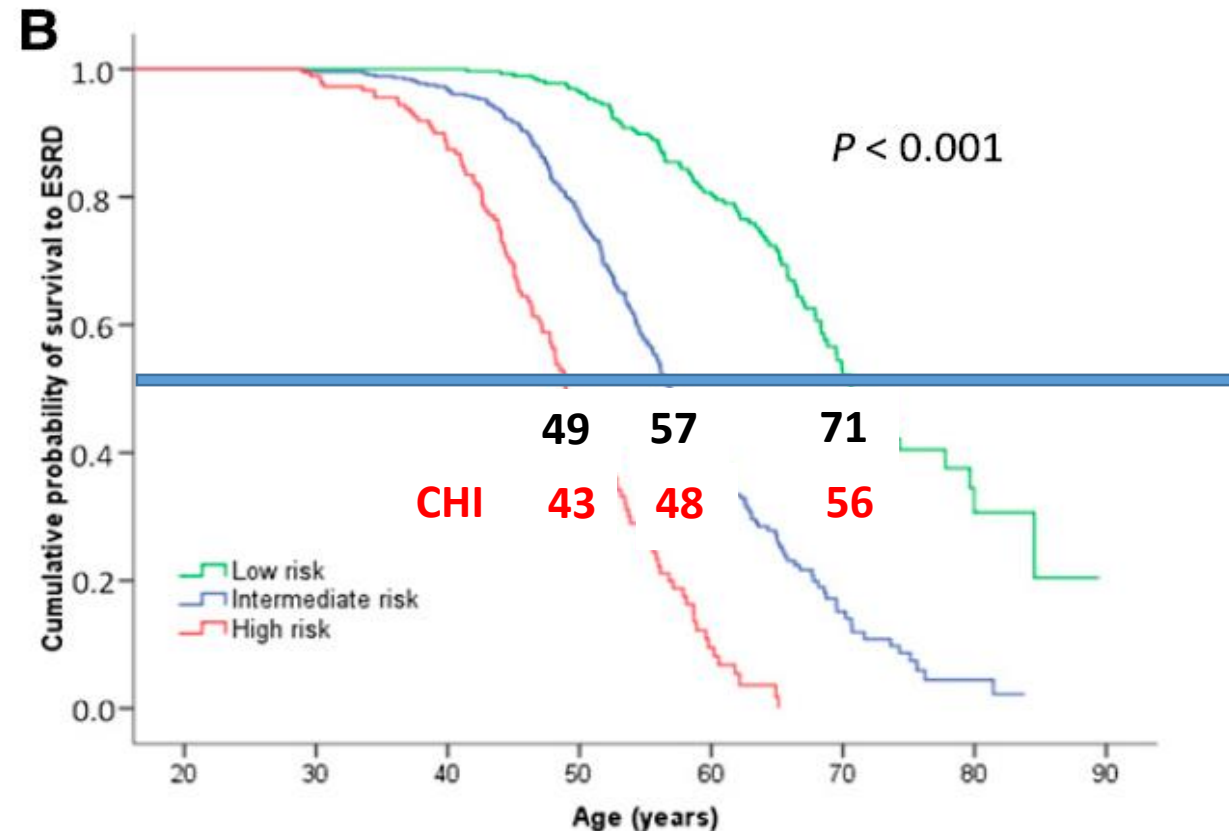
Riesgo bajo

4-6 puntos

Riesgo intermedio

7-9 puntos

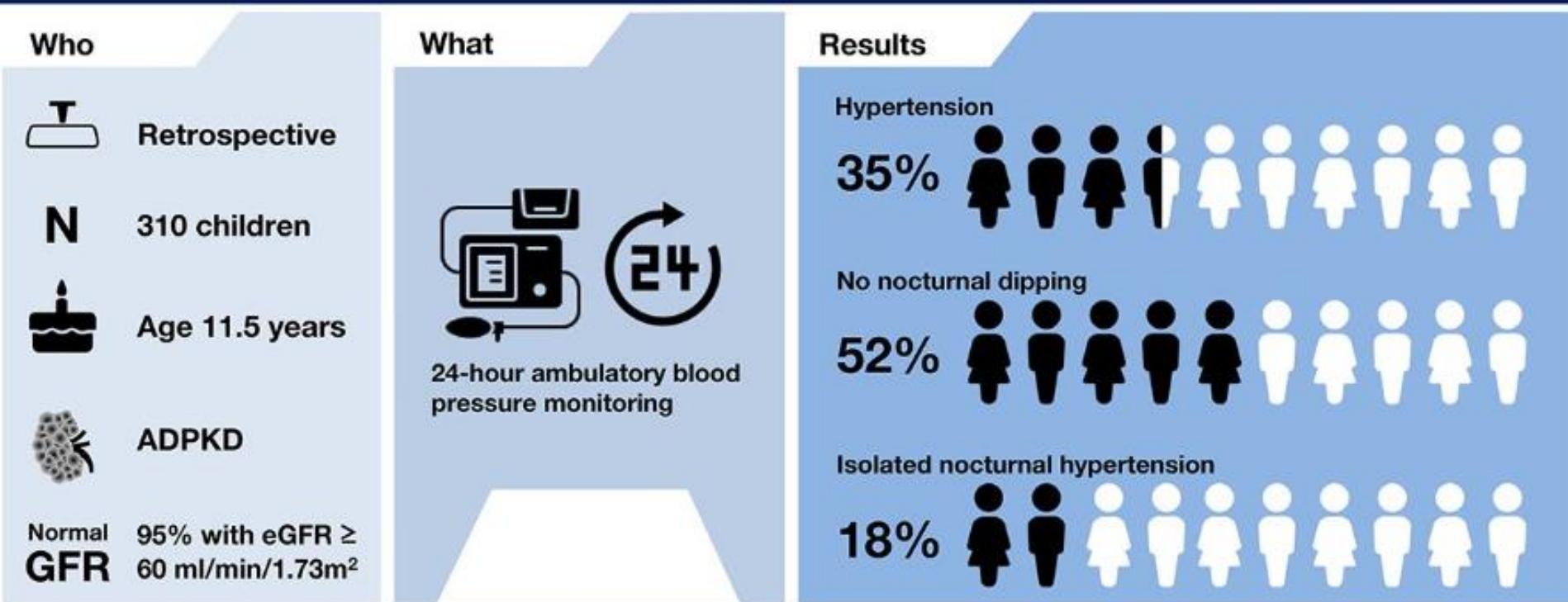
Riesgo alto



Children at risk ADPKD

Do children with ADPKD have high blood pressure or abnormal nocturnal blood pressure?

CJASN[®]
Clinical Journal of American Society of Nephrology



Conclusions Children with ADPKD have a high prevalence of hypertension and abnormal cardiovascular rhythmicity, long before they develop any symptoms of polycystic kidney disease.

Laura Massella, Djalila Mekahli, Dušan Paripović, et al. Prevalence of Hypertension in Children with Early Stage ADPKD. CJASN doi: 10.2215/CJN.11401017.

Proyecto GEMINi: Genética Molecular Informática en Nefropatías

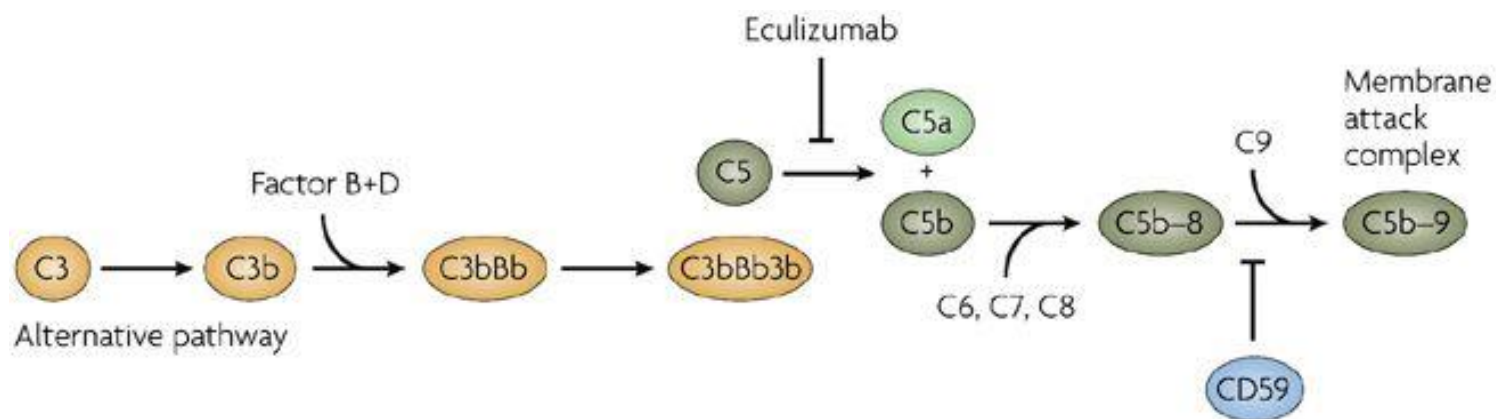
- Un estudio genético con resultado (+) permitiría realizar monitoreo temprano de pacientes con dg clínico o niños en riesgo de ADPKD, promover adherencia a tratamiento antihipertensivo y enlentecer la progresión a ERT.



Síndrome Hemolítico Urémico atípico (SHUa)

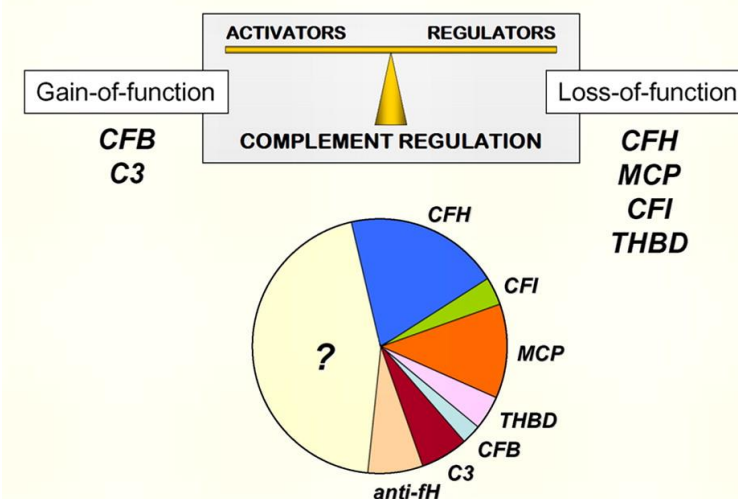
SHU atípico

- Trombocitopenia, anemia hemolítica y falla renal de mal pronóstico
- Condición rara (0.5-2 casos pmp)
- Activación de cascada del complemento



Nature Reviews | Drug Discovery

Rare mutations



Autoantibodies

anti factor H

Common polymorphisms

(Increase **risk** or confer **protection**)

CFH, MCP, CFB, C3, CFHR1

Triggering factors

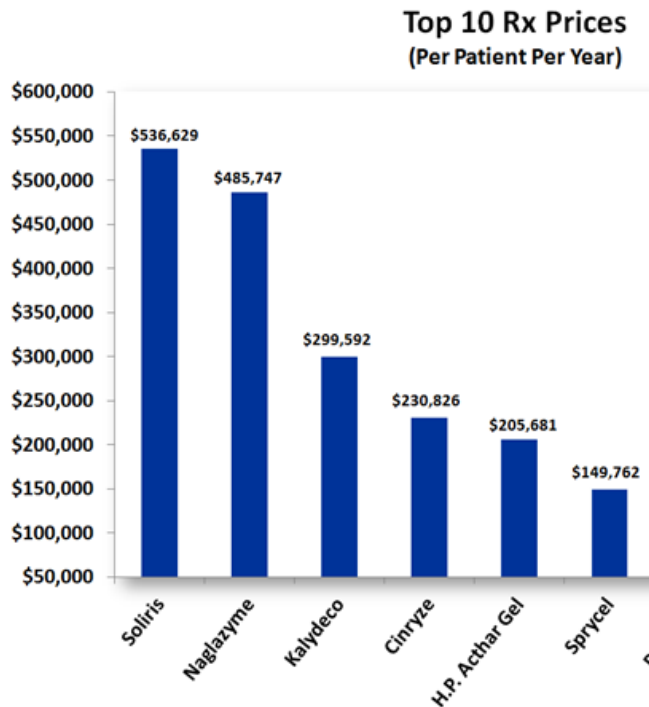
Infection, immunosuppressive drugs, cancer therapies, oral contraceptives, pregnancy, childbirth, etc.

SHU atípico

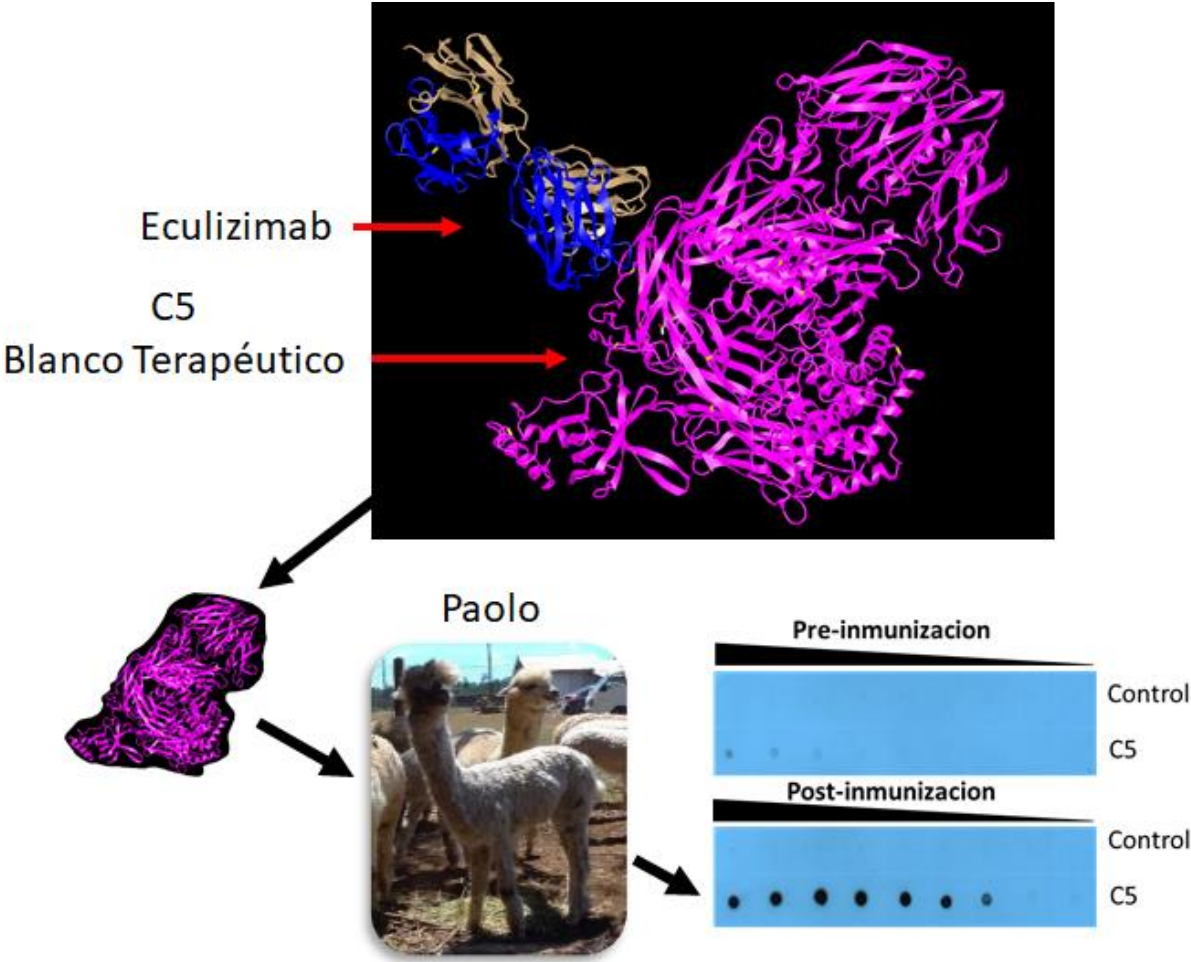
- Chile: >20 casos identificados
- Pocos con estudio genético o acceso a eculizumab



Región de Los Ríos
GOBIERNO REGIONAL



Proyecto: Desarrollo de nanobodies de alto valor social y económico



GEN	SECUENCIA cDNA	LOCALIZACIÓN	OMIM GEN	OMIM FENOTIPO	HERENCIA
CFH	NM_000186.3	1q31.3	134370	235400	Autosómica Dominante Autosómica Recesiva
CFI	NM_000204.3	4q25	217030	612923	Autosómica Dominante
CD46	NM_002389.4	1q32.2	120920	612922	Autosómica Dominante Autosómica Recesiva
C3	NM_000064.3	19p13.3	120700	612925	Autosómica Dominante
THBD	NM_000361.2	20p11.21	188040	612926	Autosómica Dominante
CFHR1	NM_002113.2	1q31.3	134371	235400	Autosómica Recesiva, Autosómica Dominante
CFHR3	NM_021023.5	1q31.3	605336	235400	Autosómica Recesiva, Autosómica Dominante
CFHR4	NM_001201550.2	1q31.3	605337	---	---
CFHR5	NM_030787.3	1q31.3	608593	614809	Autosómica Dominante
CFB	NM_001710.5	6p21.33	138470	612924	Autosómica Dominante

CONCLUSIONES GENERALES

- Estudios genéticos son de **alto valor clínico** en pacientes chilenos con ERH
- Secuenciación directa: resultados de **alta calidad** y cumple con los objetivos
- Secuenciación masiva: **herramienta costosa, aunque recomendable** en casos aislados, clínicas no concluyentes o en enfermedades de origen genético heterogéneo

