

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Mutaciones en mosaico e intrónicas en TSC1/TSC2

Explique la mayoría de los pacientes con TSC sin Mutación identificada mediante pruebas convencionales

Magdalena E. Tyburczy¹, Kira A. Dies², Jennifer Glass³, Susana Camposano⁴, Yvonne Chekaluk¹, Aaron R. Thorner⁵, Ling Lin⁵, Darcy Krueger⁶, David N. Franz⁶, Elizabeth A. Thiele⁴, Mustafa Şahin², David J. Kwiatkowski¹ *

¹ Departamento de Medicina, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, Estados Unidos de América, ² Departamento de Neurología, Hospital Infantil de Boston, Boston, Massachusetts, Estados Unidos de América, ³ Departamento de Genética Humana, Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati, Cincinnati, Ohio, Estados Unidos de América, ⁴ Departamento de Neurología, Hospital General de Massachusetts, Boston, Massachusetts, Estados Unidos de América, ⁵ Centro para el Descubrimiento del Genoma del Cáncer, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, Estados Unidos de América, ⁶ Departamento de Pediatría, Cincinnati Centro Médico del Hospital Infantil, Cincinnati, Ohio, Estados Unidos

* dk@rics.bwh.harvard.edu



Cita: Tyburczy ME, Dies KA, Glass J, Camposano S, Chekaluk Y, Thorner AR, et al. (2015)

Mutaciones en mosaico e intrónicas en TSC1/TSC2 explican la mayoría de los casos de CET sin mutación identificada mediante pruebas convencionales. *PLoS Genet* 11 (11): e1005637. doi:10.1371/journal.pgen.1005637

Editor: Bruce R. Korf, Universidad de Alabama en Birmingham, ESTADOS UNIDOS

Recibido: 1 de junio de 2015

Aceptado: 8 de octubre de 2015

Publicado: 5 de noviembre de 2015

Copyright: © 2015 Tyburczy et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la

[Licencia Creative Commons Atribución](#), que permite el uso, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se den crédito al autor original y la fuente.

Declaración de disponibilidad de datos: Para mantener la confidencialidad del paciente, se retendrán los amplios datos genéticos que permiten la identificación de los participantes. Datos de mutaciones y nuevos SNP para TSC1 y Los TSC2 están disponibles a partir de la mutación LOVD TSC base de datos <http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php>. Todos los demás datos están disponibles en el manuscrito y sus archivos de información complementaria.

Financiación: Este trabajo fue apoyado por la Fundación Nacional Instituto de Salud Instituto Nacional del Cáncer

1P01CA120964 (DJK); la Comisión Europea 602391-2 (DJK) y esclerosis tuberosa del año fiscal 2011

Abstracto

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es un síndrome de genes supresores de tumores autosómicos dominantes debido a mutaciones de la línea germinal en TSC1 o TSC2. Entre el 10 y el 15 % de los individuos con TSC no tienen ninguna mutación identificada (NMI) después de una evaluación diagnóstica molecular convencional exhaustiva. Se estudiaron 53 sujetos con TSC que fueron NMI mediante secuenciación de nueva generación para buscar mutaciones en estos genes. Se dispuso de ADN de sangre/saliva, incluyendo muestras parentales, de todos los sujetos, y de ADN de biopsia de tumor cutáneo de seis sujetos. Se identificaron mutaciones en 45 de 53 sujetos (85%). Se observó mosaicismo en la mayoría (26 de 45, 58%), y las mutaciones intrónicas también fueron inusualmente frecuentes, presentes en 18 de 45 sujetos (40%). Diecisiete (38%) mutaciones se observaron con una frecuencia alélica < 5%, cinco con una frecuencia alélica < 1%, y dos se identificaron únicamente en biopsias de tumor cutáneo, sin observarse con una frecuencia apreciable en el ADN de sangre o saliva. Estos hallazgos iluminan el alcance del mosaico en la TSC, indican la importancia de la cobertura genética completa y la secuenciación de próxima generación para la detección de mutaciones, muestran que el análisis de tumores relacionados con la TSC puede aumentar la tasa de detección de mutaciones, indican que no es probable que exista un tercer gen de la TSC y permiten brindar asesoramiento genético a la importante población de individuos con TSC que actualmente son NMI.

Resumen del autor: El

complejo de esclerosis tuberosa (CET) es un trastorno genético humano causado por mutaciones en los genes TSC1 o TSC2. Durante muchos años, ha sido un misterio que, con las pruebas genéticas estándar, entre el 10 % y el 15 % de los pacientes con CET no presenten mutación identificada (NMI) ni en TSC1 ni en TSC2. Examinamos la causa genética del CET en pacientes que presentaron "NMI" después de...

Premio Postdoctoral Alliance (MET), <http://www.tsalliance.org/>; Consorcio de Sinaptopatías del Desarrollo (U54NS092090), que forma parte de la Red de Investigación Clínica de Enfermedades Raras (RDCRN) del Centro Nacional para el Avance de las Ciencias Traslacionales (NCATS). La RDCRN es una iniciativa de la Oficina de Investigación de Enfermedades Raras (ORDR) y el NCATS, financiada mediante la colaboración entre el NCATS, el NINDS, el NIMH y el NICHD (KAD, MS). Los financiadores no participaron en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicación ni la preparación del manuscrito.

Intereses en conflicto: Los autores han declarado que no existen intereses en conflicto.

Pruebas previas. Encontramos una mutación en TSC1 o TSC2 en la gran mayoría de los sujetos estudiados: 45 de 53 (85%). La mayoría de las mutaciones identificadas fueron en intrones o mosaico, o ambos. Por lo general, esperamos encontrar mutaciones que causan enfermedades humanas en exones, partes codificantes de genes. Sin embargo, también se pueden encontrar mutaciones en intrones, las partes no codificantes de genes, y encontramos mutaciones intrónicas en 18 de 45 sujetos (40%). Se observaron mutaciones en mosaico en 26 de 45 sujetos (58%). El mosaicismo es la situación en la que diferentes células en el cuerpo tienen una composición genética diferente, y en este caso las mutaciones en TSC1/TSC2 estaban presentes solo en una fracción de las células del paciente. Por lo tanto, estos dos tipos de mutaciones difíciles de encontrar (en intrones y/o mosaico) explican la mayoría de los pacientes con TSC que eran NMI.

Introducción

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC (MIM: 191100, 613254) [1]) es un trastorno autosómico dominante que afecta a uno de cada 6000 nacidos vivos y se caracteriza por el crecimiento de tumores benignos en múltiples sistemas orgánicos y un fenotipo altamente variable [2,3]. Los órganos afectados incluyen la piel, el cerebro, los ojos, el corazón, los riñones y los pulmones. En pacientes que cumplen los criterios clínicos estándar para TSC [4], se encuentran mutaciones patogénicas en TSC1 o TSC2 en el 75-90 % de los casos [5-17]. TSC1 se encuentra en el cromosoma 9q34 y consta de 53 273 nt; TSC2 se encuentra en el cromosoma 16p13 y consta de 41 255 nt. Los 23 exones de TSC1 se transcriben en una transcripción de 8,6 kb (NM_000368.4), y TSC2 consta de 42 exones que codifican una transcripción de 5,5 kb (NM_000548).

Aproximadamente entre el 60 % y el 70 % de los casos de CET son esporádicos, lo que refleja una alta tasa de mutación espontánea en estos genes [18-20]. Sin embargo, entre el 10 % y el 15 % de los pacientes con CET no tienen ninguna mutación identificada (NMI), a pesar de las exhaustivas pruebas de diagnóstico molecular, que incluyen la secuenciación de Sanger basada en exones y el análisis de grandes deleciones genómicas en TSC1 y TSC2. Los sujetos con CET NMI generalmente tienen características clínicas de CET más leves que los pacientes con mutaciones identificadas en TSC2 [10,15,21,22]. Una comprensión molecular de la patogénesis de la enfermedad en pacientes con CET NMI tiene una clara importancia tanto para nuestra comprensión de los mecanismos genéticos que causan la CET como para la provisión de asesoramiento genético a los pacientes con CET NMI.

Planteamos la hipótesis de que había varias razones posibles para el estado NMI en pacientes con CET: 1) falla en la detección de mutaciones debido a problemas técnicos; 2) mosaicismo para mutaciones en TSC1 o TSC2; 3) mutaciones en intrones que afectan el empalme y no están cerca de exones, o mutaciones en regiones promotoras y potenciadoras de TSC1 y TSC2, regiones que normalmente no se examinan durante la evaluación de diagnóstico molecular; 4) aparición de un tercer gen TSC.

En este trabajo, presentamos los resultados del análisis de secuenciación de nueva generación de la extensión genómica completa de TSC1 y TSC2 en 53 sujetos con TSC NMI, utilizando muestras de ADN de sangre y saliva, así como biopsias de tumores cutáneos de TSC. Se identificaron mutaciones patogénicas en 45 (85%) pacientes. Se observó mosaicismo en la mayoría de estas mutaciones (26 de 45, 58%), con una frecuencia de alelos mutantes que osciló entre el 0,21% y el 34%. Se identificaron variantes en el sitio de empalme en 18 sujetos (40%). Las biopsias de tumores cutáneos de TSC mostraron una mayor tasa de detección de mutaciones que las muestras de sangre o saliva.

Resultados

Estrategia para la detección y confirmación de mutaciones. Empleamos una serie

de técnicas mediante secuenciación de próxima generación (NGS) para identificar mutaciones en TSC1 y TSC2. Muestras de ADN de 53 sujetos con TSC y sin mutación identificada.

(NMI) se estudiaron mediante estudios previos, incluido el ADN derivado de sangre y/o saliva de 52 pacientes, una muestra de un feto que murió por complicaciones de la CET y 10 biopsias de piel de la CET lesiones. 46 sujetos no tenían antecedentes familiares de TSC (casos esporádicos) y siete tenían otros antecedentes familiares. miembros afectados por TSC. Se realizó NGS en 40 muestras de ADN utilizando bibliotecas derivadas de la amplificación por PCR de largo alcance de la mayoría de TSC1 y TSC2 [23]. También se realizó NGS en 26 muestras de ADN (13 de ellas también habían sido analizadas mediante el primer método) utilizando bibliotecas derivado de la captura híbrida de todos los TSC1 y TSC2 con 10 kb de corriente arriba y corriente abajo secuencias, así como regiones codificantes de DEPTOR, PRAS40, TBC1D7, DEPDC5, NPRL2 y NPRL3. Se identificaron mutaciones probables (ver [Métodos](#) para [más detalles](#)) y se validaron como Ser real (no artefactos de secuenciación) mediante análisis secundarios en todos los casos. Variantes intrónicas. Se validaron sus efectos sobre el empalme en los estudios descritos a continuación. Mutaciones heterocigotas En sujetos esporádicos se validó que se producían de novo en comparación con el ADN parental. muestras. Después de estos estudios que confirman tanto la aparición de una variante de secuencia como su probable o bien efectos funcionales confirmados, las mutaciones se consideraron definitivas.

Resumen de los hallazgos

Se identificaron mutaciones en 45 de 53 sujetos NMI (85%) ([Tabla 1](#) y [Fig. 1](#)). [Mutaciones en](#) [Se encontraron TSC2 en 37 \(82%\) pacientes y TSC1 en 8 \(18%\) pacientes, una distribución que es](#)

Tabla 1. Mutaciones identificadas en los sujetos TSC NMI.

Mutación del gen sujeto		Mutación tipo	Alelo mutante frecuencia	tipos de tejidos con mutación identificada	Edad Sexo	Órganos afectados y # de mayores características	
							SBHK/L
Variantes conocidas como deletéreas con 50% AF							
P3f	TSC2 c.848+1G>A ^A	empalme	50%	Sangre, saliva	31 años F	4 2	1
P10	C TSC2 c.226-12T>A	empalme	50%	Sangre, saliva	5 años F	2 1	
P11	TSC2 c.4660C>T; pág. Q1554*	tonterías 50%		Sangre	8 años F	4 3 1	1
P18	B TSC2 c.976-15G>A	empalme	50%	Sangre, saliva	2 años F	1 1	
P21	TSC2 c.5238_5255delCATCAAGCGGCTCCGCCA	indel	50%	Sangre, saliva	24 años M 4 4 1		1
P25f	TSC1 c.1498C>T; p.R500*	tonterías 50%		Saliva	19 años F	2 2	
P29	TSC1 c.-234-?_*1+?del del ex.1_ex.23#	large del	50%	Sangre	26 años F	3 3 1	
P33	TSC2 c.-106-722_-85del; 744nt del incluyendo parte del exón 1	large del	50%	Saliva	8 años M 2 2 1		1
P37	TSC2 c.976-15G>A ^B	empalme	50%	Sangre	7 años F	1 2 1	1
P38f	B TSC1 c.664-15A>G	empalme	50%	Saliva	1 de M 1 2		
P43	TSC2 c.1432_1436delCAGTT	indel	50%	Saliva	27 años F	3 2	1
P46	B TSC2 c.481+5G>A	empalme	50%	Sangre, saliva	13 años F	3 2 1	1
P52	TSC2 c.5018_5020delCA	indel	50%	Sangre, saliva	1 de M 1 2 1		
Variantes nuevas o previamente reconocidas con efecto patogénico incierto, con un 50% de AF							
P1	TSC2 c.849-15G>A ^Y	empalme	50%	Sangre	5 años M 2 3 1		1
P24f	E TSC1 c.913+3A>T	empalme	50%	Sangre, saliva	10 años M 2 1		
P34	TSC2 c.3611-9_3611-34delinsCC ^D	empalme	50%	Sangre, saliva	22 años F	3 3	1
P35	D TSC2 c.1717-23T>G	empalme	50%	Sangre	14 años M 2 1		1
P36f	TSC2 c.1362-10C>A ^Y	empalme	50%	Saliva	30 años M 2 2		
P41	D TSC2 c.2221-126C>T	empalme	50%	Sangre, saliva	15 años F	2 4	
Variantes en mosaico con AF <50%							
P8	B TSC2 c.976-15G>A	empalme	34%	Saliva	7 años F	3 2	1
P53	TSC1 c.1776delG	indel	30%	Sangre, saliva	22 años M 3 2		1
P12	Un TSC2 c.3610+1G>T	empalme	22%	Sangre	4 años M 1 2		
P39	TSC2 c.3884-? PKD1c.11270-?delb	large del	17%	Sangre, saliva	18 años F	4 2	

(Continuado)

Tabla 1. (Continuación)

Mutación del gen sujeto		Mutación tipo	Alelo mutante frecuencia	tipos de tejidos con mutación identificada	Edad Sexo Órganos afectados y # de mayores características			
					SBHK/L			
P2	TSC1 c.2689C>T; pág.Q897* TSC2	tonterías	15%	Sangre	20 años	M	3	1
P4	c.4943T>C; pág.I1648T	sin sentido	8,1%	Sangre	9 años	M	2	1
P49	TSC2 c.848+281C>T ^B	empalme	6,9%	Angiofibroma, sangre, saliva, piel normal	33 años	M	1	1
P22	TSC2 c.226-12T>A ^{do}	empalme	5,9%	tejido fetal	feto		1	1
P30	TSC2 c.1413_1414delTG	indel	5,3%	Sangre, piel normal	33 años	M	2	1
P6	TSC1 c.2111_2112delAT	indel	4,7%	Sangre, piel normal	4 años	M	1	2
P45	TSC2 c.4051G>T; p.E1351* TSC2	tonterías	4,4%	Saliva	19 años	F	2	1
P26	c.1717-247_CASKIN1c.1417-380del; 114.113 pb del intr.15_CASKIN1intr.14	large del	4,0%	Saliva	6 años	F	2	3
P5f	TSC1 c.2374C>T; p.Q792* TSC2	tonterías	3,3%	Sangre	57 años	F	2	1
P15	c.4238insGGTTAAG	indel	3,2%	Sangre	40 años	F	2	1
P9	TSC2 c.1717-4103_c.3356del; 13.282 nt del intr.15_ex.28	large del	3,0%	Saliva	1 año	F	1	2
P27	TSC2 c.2356_2362delCGCGAGA	indel	3,0%	Sangre, fibroma ungueal, angiofibroma, piel normal	34 años	M	2	3
P28	TSC2 c.2098-86_4493+31del; 12,591nt del intr.18_intr.33	large del	3,0%	Saliva	8 años	F	3	3
P16	TSC2 c.1108C>T; pág. Q370*	tonterías	2,7%	Sangre, saliva	2 años	M	1	2
P13	TSC2 c.3685C>T; pág. Q1229*	disparates	1,7%	Sangre	14 años	M	1	3
P20	TSC2 c.5228G>A; p.R1743Q TSC2	sin sentido	1,4%	Sangre	30 años	M	2	1
P31	c.1831C>T; p.R611W	sin sentido	1,2%	Saliva	18 años	F	2	1
P32	TSC2 c.4850-1G>A ^A	empalme	0,71%	Sangre	17 años	F	3	2
P17	TSC2 c.2647C>T; pág. Q883*	tonterías	0,69%	Sangre, angiofibroma	2 años	F	1	1
P51f	TSC2 c.4180_81delCT	indel	0,21%	Sangre, saliva, angiofibroma (2), sangre de la hija	34 años	F	1	1
P14	TSC2 c.976-15G>A [^]	Empalme	-	Angiofibroma, piel normal	23 años	M	1	1
P42	TSC2 c.4530_4537delTGGCGACG [^]	Indel	-	Angiofibroma (3), normal piel	25 años	F	1	1
Sujetos en los que no se encontró ninguna mutación								
P7	no se encontró ninguna mutación				11 años	M	1	1
P19	no se encontró ninguna mutación				33 años	F	2	1
P23	no se encontró ninguna mutación				9 años	M	1	1
P40	no se encontró ninguna mutación				33 años	M	4	2
P44	no se encontró ninguna mutación				20 años	F	2	1
P47	no se encontró ninguna mutación				1 de	M	1	3
P48	no se encontró ninguna mutación				4 años	M	1	2
P50	no se encontró ninguna mutación				23 años	F	1	1

La columna 1 corresponde al número de sujeto. f significa que se trataba de un caso familiar de CET. Los demás no tenían antecedentes familiares de CET.

Columna 3, letras junto a las variantes del sitio de empalme

^A variantes que afectan a los sitios de empalme canónicos

^B Se informa que afecta el empalme y/o es patógeno.

^{do} Transcripciones aberrantes de TSC2 mostradas en este estudio

^D producto de alto peso molecular mediante RT-PCR de ARN, o distorsión alélica de SNP exónicos mediante análisis de RT-PCR

^Y variantes intrónicas no vistas previamente, que eran de novo (n = 1) o segregadas con TSC (n = 2), sin otra evidencia confirmatoria de efecto sobre el empalme.

[^] En P14 y P43 se detectaron mutaciones en lesiones cutáneas, pero no en muestras de sangre o saliva (véase la [tabla S2](#)).

[#] Identificado por MLPA.

La columna 7 indica la edad del sujeto en el momento de la recopilación de datos clínicos.

Las columnas 9 a 12 indican la presencia o ausencia de afectación de piel (S), cerebro (B), corazón (H), riñones (K) y pulmones (L). Una entrada en blanco en estas columnas.

significa que no hay afectación del órgano respectivo; una entrada numérica indica el número de manifestaciones importantes de TSC presentes en el sujeto para ese órgano.

doi:10.1371/journal.pgen.1005637.t001

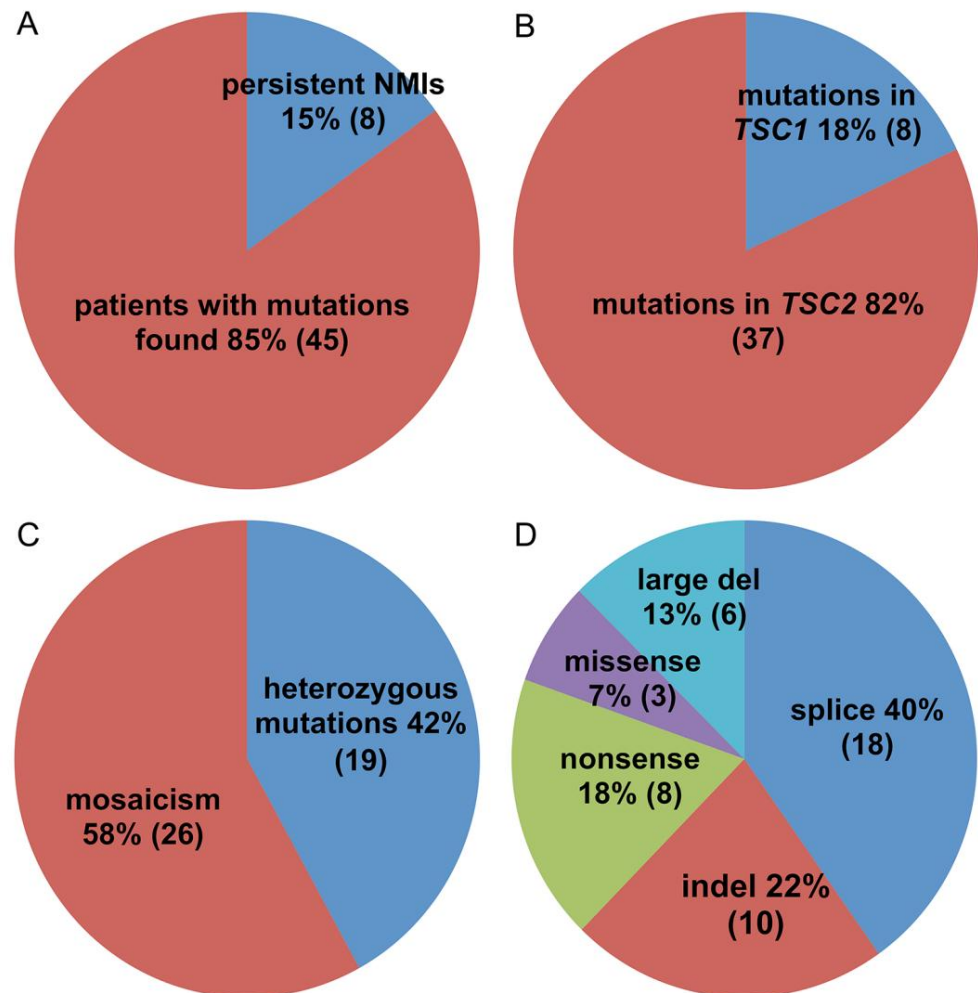


Fig. 1. Gráficos circulares que muestran los tipos y frecuencias de mutaciones en 53 sujetos con TSC NMI. (A) Proporción de sujetos con mutaciones identificadas vs. sujetos que permanecen como NMI persistente. (B) Proporción de mutaciones en TSC1 vs. TSC2. (C) Proporción de mutaciones heterocigotas vs. en mosaico. (D) Diferentes tipos de mutaciones identificadas.

doi:10.1371/journal.pgen.1005637.g001

Similar a la observada en general en TSC [24]. Se identificaron mutaciones heterocigóticas no en mosaico, observadas con una frecuencia alélica del 40-60% por NGS, en exones codificantes y sitios de empalme de consenso en seis de 53 (11%) pacientes con NMI (*Tabla 1*: P3, P11, P21, P25, P43 y P52), aparentemente pasadas por alto en análisis previos. No identificamos ninguna variante patogénica en DEPTOR, PRAS40, TBC1D7, DEPDC5, NPRL2 y NPRL3 en las muestras analizadas. Estos genes se analizaron como candidatos potenciales para TSC3, debido a sus funciones en la vía de señalización de mTOR.

Mosaicismo y análisis de biopsias de piel Las mutaciones

fueron mosaico en 26 de 45 (58%) sujetos en quienes se identificaron mutaciones, con un rango de frecuencia de alelos mutantes (FA) de 0.21% a 34% (*Tabla 1* y *Fig. 1* y *Tabla S2*). Diecisiete sujetos presentaron mosaicismo con FA mutante muy baja, < 5%. Estas mutaciones consistieron en cinco indel, cinco mutaciones sin sentido, dos de sitio de empalme, dos mutaciones sin sentido y tres mutaciones de delección genómica. Todas fueron confirmadas por análisis secundarios (*Tabla S2*) utilizando secuenciación de un solo nucleótido SNaPshot, NGS de amplicones o PCR con secuenciación a través de la unión de fusión de delección.

Aquí revisamos brevemente cada caso en el que se identificó una mutación con una AF < 1%. El sujeto P17 presentó una mutación sin sentido TSC2 p.Q883 en el análisis inicial de ADN sanguíneo mediante NGS con PCR de largo alcance en 10 de 1806 lecturas (0,55 %, [Tabla S2](#)). La NGS posterior de amplicones de ADN sanguíneo y de angiofibroma mostró una AF del 0,69 % y el 0,77 %, respectivamente, mientras que esta variante de secuencia se observó con una tasa promedio del 0,11 % (rango: 0,07-0,16 %) en 25 muestras de control.

Se identificó una variante del sitio de empalme TSC2 c.4850-1G>A en una muestra de sangre del sujeto P32 mediante análisis NGS inicial en 41 de 5745 lecturas (0,71 %, [Tabla S2](#)). La mutación se confirmó en esta muestra mediante NGS del amplicón diana en 2663 de 955 336 lecturas (0,28 %, [Tabla S2](#)), con una AF mutante promedio del 0,09 % (rango: 0,02-0,20 %) observada en 25 muestras de control.

El sujeto P51 era una madre cuya hija también había sido diagnosticada con CET, con una mutación heterocigótica c.4180_81delCT de TSC2 identificada en su muestra de sangre mediante pruebas convencionales y no presente en la madre. La NGS de amplicones de varias muestras de la madre demostró que la mutación c.4180_81delCT se observó con una frecuencia del 0,98 % y el 1,4 % en dos angiofibromas diferentes, con una frecuencia del 0,07 % y el 0,21 % en sangre y saliva, respectivamente, y con una frecuencia promedio del 0,005 % (rango 0-0,03 %) en 25 controles ([Tabla S2](#)). Estos datos indican que la madre presenta un mosaicismo de nivel extremadamente bajo, tanto somático como germinal, para esta mutación indel de TSC2, que transmitió a su hija.

En dos sujetos, los análisis de biopsia cutánea demostraron mutaciones en TSC2, que no se observaron en el análisis de ADN de sangre o saliva ([Tabla S2](#)). Para P42, se encontró que un angiofibroma tenía una mutación indel (c.4530_4537delTGGCGACG) y una mutación de sentido erróneo (p.L590R) en TSC2 con un 4,6% y un 2,7% de AF, respectivamente. La NGS del amplicón del angiofibroma original y dos angiofibroma adicionales mostró que los tres tenían el alelo indel con un 0,86% a un 2,3% de AF, mientras que el alelo de sentido erróneo se observó en niveles significativos solo en el angiofibroma original. Ambas variantes se observaron con una frecuencia extremadamente baja (<0,02%) en el ADN de sangre y saliva de este sujeto, lo que sugiere que este individuo tenía un mosaicismo germinal extremo para la mutación indel. Para P14, el análisis de un angiofibroma condujo a la identificación de tres mutaciones en TSC2 en AF de 1.3% a 8.9% ([Tabla S2](#)). La NGS de amplicón confirmó estos hallazgos, pero también demostró que la frecuencia alélica de las tres mutaciones en saliva y sangre fue similar a los controles normales. Dos de las tres mutaciones se observaron en mayor AF en piel normal (0.61% y 0.63%), lo que sugiere que una u otra era un alelo de línea germinal mosaico extremo presente en este individuo. Sospechamos que la variante del sitio de empalme (c.976-15G>A) vista en 8.9% de frecuencia en el angiofibroma original es el alelo de línea germinal mosaico, y las otras dos variantes (p.P1497L y p.R458) son mutaciones de segundo golpe que llevaron al desarrollo de dos clones de angiofibroma separados que colisionaron en la cara de este paciente.

Otros dos sujetos (P27 y P49) también proporcionaron ADN de piel y saliva/sangre para análisis. En ambos casos, el AF mutante fue mayor en las biopsias cutáneas que en el ADN de la saliva o la sangre, similar a lo observado en los dos sujetos mencionados, lo que sugiere un enriquecimiento en la biopsia cutánea de células portadoras de la mutación germinal en mosaico. Esto no se observó en el sujeto P17 (descrito anteriormente), lo que sugiere la posibilidad de que la biopsia no fuera un tumor TSC verdadero o que fuera demasiado superficial y no incluyera la dermis, donde se sabe que residen fibroblastos aberrantes con mutación TSC2 [23].

Mutaciones en el sitio de empalme.

Las mutaciones que afectan el empalme fueron inusualmente frecuentes en este grupo de sujetos con NMI, en comparación con informes previos de análisis de mutaciones en TSC (9,5 % y 16,2 % de todas las mutaciones en TSC1 y TSC2, respectivamente) [3,25], y se observaron en 18 de 45 (40 %) sujetos con mutaciones identificadas. Se identificaron mutaciones intrónicas en sitios canónicos cerca de exones (tres), cerca de puntos de ramificación (siete),

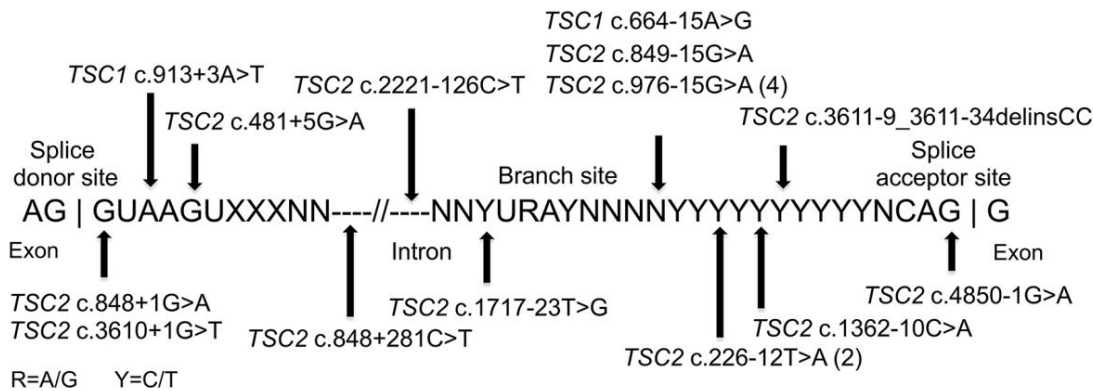


Figura 2. Mutaciones intrónicas en 18 sujetos con TSC NMI. Se muestran las ubicaciones de las 18 mutaciones en el sitio de empalme identificadas en relación con las secuencias consenso canónicas presentes en la región exónica 3', el sitio de ramificación y la región exónica 5'.

doi:10.1371/journal.pgen.1005637.g002

en otras ubicaciones cerca de exones (seis) y en ubicaciones intrónicas profundas (dos) (Fig. 2). Como se mencionó anteriormente, los estudios familiares demostraron que todas estas mutaciones estaban estrictamente asociadas con el estado de la enfermedad, y 15 ocurrieron en casos esporádicos de TSC, no vistos en muestras parentales. La maternidad y la paternidad se confirmaron para los padres de los sujetos P1, P35 y P41, en quienes se identificaron nuevas variantes del sitio de empalme. Además de los tres sujetos con mutaciones en los sitios de empalme canónicos (P3, P12, P32), siete sujetos tenían cada uno una de las cuatro mutaciones de empalme que previamente se había informado que eran patógenas: dos mutaciones observadas en cinco sujetos se habían informado previamente que afectaban al empalme [26] (TSC2 c.976-15G>A (P8, P14, P18 y P37), y TSC2 c.848+281C>T (P49)); y dos sujetos con mutaciones de empalme distintas reportadas como patógenas [27] (TSC1 c.664-15A>G en P38, y TSC2 c.481+5G>A en P46). Se prepararon líneas celulares linfoblastoides (LCL) para las ocho variantes intrónicas putativas restantes (siete únicas) para permitir la confirmación funcional. El análisis RT-PCR de una muestra, P10, mostró bandas aberrantes en gel de agarosa, confirmadas por secuenciación como correspondientes a la omisión de los exones 3-5 (Fig. S1A). La misma mutación (TSC2 c.226-12T>A) también estaba presente en P22. Se observó una mancha de alto peso molecular en el análisis RT-PCR de P34 (TSC2 c.3611-9_3611-34delinsCC, Fig. S1B), lo que sugiere un empalme aberrante. Otras muestras con variantes intrónicas no mostraron bandas aberrantes en el análisis por RT-PCR. Sin embargo, el análisis por RT-PCR de LCL no tratados con puomicina de dos casos (P35 TSC2 c.1717-23T>G y P41 TSC2 c.2221-126C>T) con SNP exónicos mostró distorsión alélica (cociente alélico de SNP: 0,18 y 0,43 para los alelos de menor frecuencia), consistente con efectos en el empalme que conducen a la degradación del ARNm mediada por mutaciones sin sentido (Fig. S2). La distorsión alélica con pérdida relativa del alelo mutante (cociente alélico: 0,26-0,79 [rango], mediana: 0,54) debido a la degradación del ARNm mediada por mutaciones sin sentido se ha descrito previamente para mutaciones de indel, sin sentido y de empalme en TSC1 utilizando preparaciones de ARN de la línea celular linfoblastoide TSC [28]. Además, el análisis del conjunto de datos GTEx de RNA-Seq para 2387 muestras de 155 individuos heterocigotos para el SNP sinónimo rs1748 de la región codificante de TSC2 y 52 sitios tisulares diferentes demuestra que la proporción de alelos se centra en 0,89, con el 99 % de los valores > 0,43 (K. Ardlie y T. Sullivan, proyecto GTEx, dbGAP phs000424.v6.p1). Tres sujetos (P1, P24 y P36) no presentaron SNP exónicos en genes con variantes intrónicas identificadas, por lo que no se pudo realizar este análisis.

Grandes deleciones genómicas. Se

identificaron grandes deleciones genómicas en TSC2 en tres sujetos mediante el análisis del tamaño del inserto en los datos de captura híbrida NGS (Fig. S3). Estas se observaron en los sujetos: P9–13, 282 nt deleción al 3%.

AF; delección de P26–114,113 nt al 4% de AF; y delección de P28–12,591 nt al 3% de AF. Todos estos resultados se verificaron mediante PCR a través de la unión de delección y secuenciación.

Correlaciones genotipo-fenotipo

La información clínica sobre los síntomas de TSC se utilizó para comparar el fenotipo clínico entre sujetos con diferente estado de detección de mutaciones: heterocigoto, mosaico y NMI persistente. (Tenga en cuenta que utilizamos el término NMI persistente para referirnos a los sujetos de este estudio que continuaron sin tener una mutación identificada después de que se completaron todos nuestros análisis). Consideramos tanto el número de sistemas de órganos afectados (entre piel, cerebro, cardíaco y renal/pulmonar) como el número de manifestaciones de TSC que son criterios principales para el diagnóstico [4]. Seis de siete sujetos con cuatro sistemas de órganos afectados tenían mutaciones heterocigotas, mientras que uno tenía mosaicismo (1,2 % AF) y ninguno era NMI persistente ($p = 0,003$, Fig. 3A). Además, siete de ocho (87,5 %) sujetos con NMI persistente tenían solo dos sistemas de órganos afectados, en contraste con las categorías de mutación heterocigota y mosaico, para las cuales se observó afectación de dos sistemas de órganos en la minoría: 37 % y 35 %, respectivamente (Fig. 3A). De manera similar, el número de manifestaciones mayores de TSC fue una mediana de seis para los sujetos con mutación heterocigótica, cuatro para los sujetos con mutación en mosaico y tres para aquellos con NMI persistente, con diferencias estadísticamente significativas en estos números entre NMI persistente y los sujetos con mutación heterocigótica ($p = 0,01$), y entre NMI persistente y los sujetos con mosaicismo ($p = 0,046$; Fig. 3B). Dado que las manifestaciones de TSC a menudo aparecen como pacientes con TSC edad, también examinamos la correlación entre el estado de mutación y la edad. No hubo una diferencia significativa en los rangos de edad entre estas tres categorías de estado de mutación (Fig. 3C), lo que sugiere que una diferencia en la edad no explicó la correlación entre la gravedad de la enfermedad y el estado de detección de la mutación.

Discusión

En este trabajo, informamos sobre el análisis de 53 pacientes con CET en quienes no se identificó ninguna mutación tras el análisis molecular convencional de CET1 y CET2. Estudiamos muestras de ADN de sangre y saliva, y realizamos una o más biopsias cutáneas de tumores de CET en seis sujetos. Se identificaron mutaciones en 45 de 53 sujetos (85%). Se observó mosaicismo en estas mutaciones en la mayoría (26 de 45, 58%). Las mutaciones intrónicas fueron inusualmente frecuentes, identificándose en 18 de 45 sujetos (40%). Seis sujetos presentaron mutaciones en la región codificante o en el sitio de empalme consenso con una frecuencia alélica heterocigótica completa, aparentemente no detectadas en análisis previos.

Cinco de los seis sujetos en los que se biopsiaron tumores de piel para análisis genético demostraron una Mayor prevalencia de la mutación en la biopsia de piel que en el ADN de sangre o saliva. Esto era previsible dada la hipótesis de que los fibroblastos clonales que dieron origen al tumor cutáneo se habrían originado a partir de las células portadoras de la mutación en mosaico inicial. Se observaron mutaciones secundarias en los tres tumores cutáneos en los que se realizó NGS completa, lo que concuerda con la mutación puntual como un segundo evento clave para eliminar la función normal de TSC2. En un sujeto (P17), no hubo enriquecimiento de la mutación en la biopsia del tumor cutáneo, posiblemente debido a que la biopsia no penetró la dermis (el sitio de los fibroblastos mutantes) o a que la lesión no era un verdadero tumor relacionado con TSC.

Se han identificado mutaciones intrónicas profundas en múltiples genes que causan trastornos mendelianos y, en algunos casos, hacen una contribución significativa a la carga total de mutaciones [29–31]. Además, se han identificado varias mutaciones intrónicas profundas en TSC, todas relacionadas con TSC2 [26,32,33]. En este estudio, identificamos mutaciones intrónicas en 18 sujetos, de las cuales 15 no afectaron a los nucleótidos en los motivos canónicos del sitio de empalme. Las mutaciones intrónicas observadas en cinco de estos 15 sujetos (33%) fueron completamente nuevas, según nuestro conocimiento, mientras que las mutaciones en los 10 restantes ya se habían observado previamente, aunque varias no contaban con información definitiva al respecto.

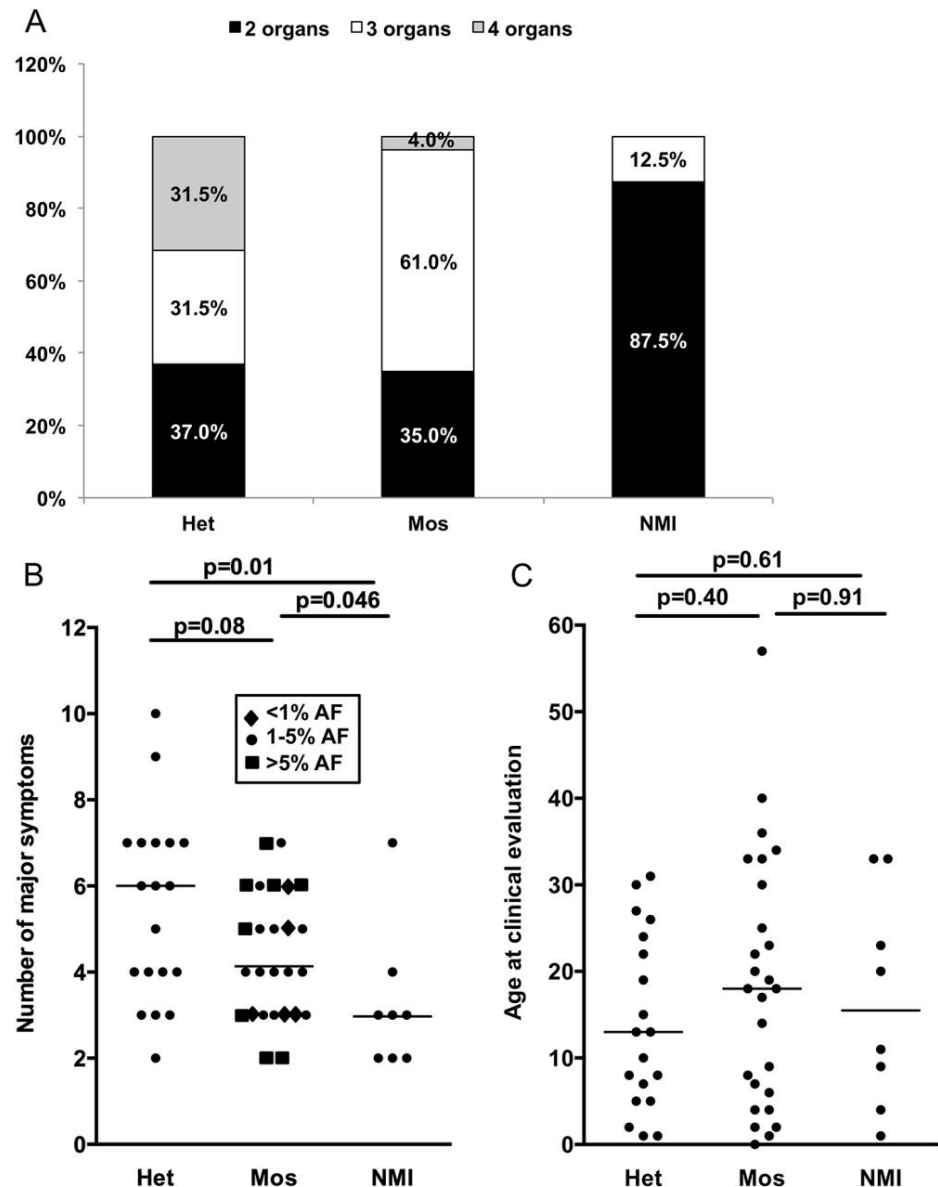


Figura 3. Correlación entre las características clínicas y el estado de mutación en 53 sujetos con NMI. (A) Proporción de sujetos con 2, 3 o 4 órganos afectados; con mutaciones heterocigotas o en mosaico, o con estado de NMI persistente. $P = 0.003$. (B) Número de síntomas principales observados en cada sujeto clasificados según el estado de mutación. Tenga en cuenta que los diferentes niveles de mosaicismo tienen símbolos distintos según la frecuencia alélica (AF). (C) Edad en el momento de la evaluación clínica, clasificada según el estado de mutación. Het: heterocigoto; Mos: mosaico. Los valores de p se determinaron mediante la prueba de chi cuadrado (A) y la prueba de Mann-Whitney para muestras no pareadas (B y C). Los resultados con $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

doi:10.1371/journal.pgen.1005637.g003

Patogenicidad. Las mutaciones en el sitio de empalme representan aproximadamente el 9% de todas las mutaciones de TSC1 y el 16% de todas las mutaciones de TSC2 [3], mientras que representaron el 40% de las mutaciones identificadas en este grupo de sujetos con NMI, lo que indica que son un factor principal en la falta de identificación de mutaciones en la población de NMI con TSC.

Mosaicismo somático (generalizado) y germinal (gonadal confinado) para TSC1 y TSC2

Se han descrito mutaciones en muchos pacientes con CET y sus padres, respectivamente [15,16,20,34–41]. Se informó mosaicismo en el 26% y el 15% de los pacientes con CET de dos series.

que tenían grandes deleciones y reordenamientos genómicos en TSC1 o TSC2 [41,36]. Sin embargo, ____ El mosaicismo somático parece ser mucho menos común que éste para pequeñas mutaciones en TSC1 y TSC2 [10,15,34,38,42–44]. De hecho, nuestro análisis previo de sujetos con TSC NMI utilizando Una técnica temprana de NGS identificó mutaciones en mosaico en solo dos de 38 (5,3%) [45]. Aquí ____ Se identificaron mutaciones en mosaico en 26 de los sujetos NMI estudiados, de los cuales 17 (65%) fueron Se observaron con una frecuencia alélica < 5%, cinco con una frecuencia alélica < 1% y se identificaron dos Sólo se observaron en biopsias de tumores de piel y no se observaron con una frecuencia apreciable en sangre o saliva. ADN. Estos resultados indican que el mosaicismo es mucho más común en el TSC que antes. Se agradece. La mayoría de las mutaciones en mosaico se habrían pasado por alto utilizando métodos convencionales. Secuenciación de Sanger o NGS con baja profundidad de lectura. Es particularmente notable la aparición de lo que llamamos «mosaicismo extremo», con una representación del alelo mutante inferior al 1 % en el ADN de la saliva o la sangre. El mosaicismo es bien conocido en muchos síndromes de genes supresores de tumores y ha... Se ha descrito con particular detalle para la NF2 [46]. Más del 25% de los casos esporádicos de NF2 son mosaico, con la mutación a menudo detectada sólo en el material tumoral y no en el ADN de los linfocitos [47,48]. Dado que la categoría NMI ha representado alrededor del 15% de la población de TSC en el pasado, Nuestro hallazgo de mutaciones en mosaico en la mitad (26 de 53) de estos individuos sugiere que el mosaicismo Se presenta en al menos el 7,5% de las personas que presentan esclerosis tuberosa.

La asociación que observamos entre la mutación (heterocigótica vs. mosaico vs. NMI persistente) estado) y el fenotipo obviamente se ajusta a las expectativas, en el sentido de que la prevalencia más baja de un gen TSC Se esperaría que la mutación en un individuo redujera tanto los efectos de haploinsuficiencia como Propensión a una segunda inactivación bialélica, lo que conduce a menos tumores y sistemas de órganos involucrados. De hecho, la aparición de TSC diagnosticable en individuos con mosaicismo extremo es Quizás sorprendente. Sin embargo, la prevalencia del alelo mutante en tejidos críticos susceptibles... La inducción de tumores durante el desarrollo no se puede estimar a partir de las muestras de tejido de que disponemos.

Reconocemos que existen varias limitaciones potenciales en nuestro estudio y que algunas de nuestras Los datos deben interpretarse con cautela. En primer lugar, el número de sujetos que hemos estudiado es No es grande, aunque es sustancial. Las comparaciones de fenotipos que hemos hecho entre sujetos... según el estado de mutación (heterocigoto vs. mosaico vs. estado NMI persistente) se basan Tras el análisis de subconjuntos relativamente pequeños, y aunque estadísticamente significativos, deben considerarse desde esa perspectiva. En segundo lugar, un estándar ideal para la confirmación del mosaicismo en un paciente podría... Incluyen: confirmación de una mutación en mosaico mediante dos metodologías diferentes; y/o confirmación de mosaicismo en dos o más muestras de tejido. En este estudio, 14 de 26 (54%) variantes en mosaico fueron validados por una tecnología alternativa en una sola muestra: 5 pequeñas mutaciones validadas por Sanger; 6 pequeñas mutaciones validadas por SNaPshot; y 3 deleciones genómicas validadas por PCR a través de la unión de delección seguida de secuenciación de Sanger. 7 de 26 (27%) variantes de mosaico que identificados se observaron en más de una muestra, y 4 de los 7 se observaron en 3 o 4 muestras (S2 ____ Tabla). Para las 5 variantes de mosaico restantes de las 26 (19%) solo se disponía de una única muestra, Los hallazgos se validaron mediante NGS de amplicones (Tabla S2). Por lo tanto, 21 de las 26 variantes en mosaico detectadas (81%) se confirmaron según estos estándares ideales. En tercer lugar, los hallazgos de mutaciones. Se debe considerar con cautela la presencia de <1% de AF o solo en biopsias de lesiones cutáneas, aunque no lo hicimos. Realizar análisis confirmatorios en cada uno de estos casos. Como se indica en la Tabla S2, se observaron nucleótidos variantes con baja frecuencia en las muestras de control (máximo 0,43 %, más comúnmente en el rango de 0 a 0,3%) debido al ruido intrínseco que se produce en la secuenciación de nueva generación. Sin embargo, la AF mutante siempre fue mayor en las muestras de sujetos (Tabla S2). Además, el hallazgo de la misma mutación en el progenitor TSC (P51) con baja frecuencia alélica (0,07% y 0,21% en sangre y saliva) que tuvieron un hijo afectado con frecuencia heterocigota completa, proporciona una sólida evidencia de que las mutaciones observadas con AF < 1% son reales, al menos en algunos casos. En cuarto lugar, podríamos estar exagerando nuestra tasa de éxito en la identificación de mutaciones al retener a sujetos con diversas

mutaciones que deberían o podrían haberse encontrado mediante análisis previos, incluyendo el individuo único (P29) con una delección genómica de TSC1, todos aquellos con mutaciones heterocigotas en exones o sitios de empalme canónicos ($n = 6$), mutaciones intrónicas no canónicas previamente conocidas como patógenas ($n = 4$) y mutaciones en mosaico observadas en $AF > 15\%$ ($n = 5$). Sin embargo, abrimos este estudio a cualquier individuo con TSC que estuviera en la categoría de NMI por estudio previo y examinamos los informes de pruebas de laboratorio para asegurar que se habían realizado pruebas completas. Por lo tanto, creemos que es más apropiado retener a todos los sujetos en consideración de la tasa de éxito de la identificación de mutaciones y los hallazgos generales. Si estos sujetos se excluyen de la consideración, entonces nuestra tasa de éxito de identificación de mutaciones se convierte en 29 de 37 (78%), lo cual sigue siendo sustancial. En quinto lugar, las tres mutaciones intrónicas que identificamos y para las cuales no pudimos identificar productos de RT-PCR aberrantes mediante electroforesis en gel o secuenciación deben considerarse algo tentativas, aun cuando demostramos que habían ocurrido de novo, con confirmación de paternidad y maternidad para las muestras de ADN parental.

En resumen, pudimos identificar una mutación en TSC1 o TSC2 en la gran mayoría de los individuos con TSC que no presentaban ninguna mutación en estudios previos. Esto implica varias implicaciones.

En primer lugar, en nuestra opinión, es muy improbable que exista un gen adicional que cause la TSC típica. Parece mucho más probable que los individuos con NMI persistente se encuentren en la categoría de mosaico extremo, y la NGS de los tumores relacionados con la TSC de estos sujetos podría dar como resultado la detección de mutaciones. En segundo lugar, se requiere un análisis exhaustivo de los loci TSC1 y TSC2 para tener una identificación robusta de mutaciones en la TSC, y se requiere un análisis NGS con alta profundidad de lectura ($> 500\times$) en la región codificante y las regiones intrónicas flanqueantes (mínimo 50 nt) para tener una alta sensibilidad para la detección del mosaicismo. El análisis de cada gen completo (incluidos los intrones y las regiones flanqueantes) por captura híbrida también es necesario para la detección de delecciones genómicas de bajo mosaico mediante el análisis de lecturas de extremos pareados, de las cuales tres se observaron en esta serie. En tercer lugar, el análisis de los tumores relacionados con la TSC es un enfoque eficaz para aumentar la capacidad de detectar mutaciones en TSC1/TSC2 en individuos con TSC. En cuarto lugar, el uso de estas estrategias conducirá a un asesoramiento genético más eficaz para una fracción sustancial de individuos con TSC en quienes los estudios anteriores no lograron una mutación causal.

Materiales y métodos

Declaración de ética

Todos los pacientes y/o sus padres dieron su consentimiento informado por escrito para esta investigación, y el estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Humana de Partners, la Junta de Revisión Institucional de los Hospitales Partners (1999P010781 y 2013P002667).

Asignaturas del TSC

Pacientes con TSC y estado NMI fueron inscritos entre 2010 y 2015 en el Boston Children's Hospital, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Massachusetts General Hospital, y por una convocatoria abierta para pacientes a través de la Tuberous Sclerosis Alliance. Todos los pacientes y/o sus padres dieron su consentimiento informado por escrito para esta investigación, y el estudio fue aprobado por el Partners Human Research Committee, la Institutional Review Board para los Partners Hospitals. 52 sujetos proporcionaron muestras de sangre y/o saliva para la

extracción de ADN, y en un caso se proporcionó ADN de un feto que murió debido a complicaciones de TSC. Todos los pacientes cumplieron los criterios clínicos estándar para el diagnóstico de TSC [4], y habían sido estudiados previamente mediante secuenciación de Sanger de los exones TSC1 y TSC2 y análisis de delección/amplificación de TSC2, sin que se identificara ninguna mutación. Se obtuvieron informes de pruebas moleculares para todos los sujetos y se revisaron directamente para confirmar que se habían realizado pruebas completas.

Se recogieron datos demográficos y clínicos de todos los sujetos. Tanto la revisión de la historia clínica como los autoinformes de los sujetos se utilizaron para evaluar la presencia o ausencia de las siguientes características de TSC (agrupadas por sistema de órganos): piel (tres o más máculas hipomelanóticas, tres o más angiofibromas faciales o placa frontal, dos o más fibromas ungueales, parche de piel de tiburón); afectación del SNC (tubérculos, nódulos subependimarios, astrocitomas subependimarios de células gigantes, hamartomas retinianos, convulsiones, espasmos infantiles, deterioro cognitivo); rabdomiomas cardíacos; angiomiolipomas y quistes renales, y linfangioleiomiomatosis pulmonar (LAM) ([Tabla S1](#)). Los cuatro sistemas de órganos indicados (piel, SNC, [corazón](#) y riñón/pulmón) se utilizaron para evaluar el número de sistemas de órganos afectados. Debido a la evidencia de que el angiomiolipoma renal y la LAM tienen mutaciones comunes y una patogénesis compartida [2], se consideraron un solo sistema de órganos para este análisis.

Se obtuvieron biopsias de tumores cutáneos de seis pacientes (nueve angiofibromas faciales y un fibroma ungueal) y se sometieron a análisis mutacional. El estudio de biopsia de tumores cutáneos fue aprobado por el Comité de Investigación Humana de Partners.

Transformación y cultivo de células linfoblastoides. Se utilizaron muestras

de sangre de sujetos con posibles mutaciones en el sitio de empalme para generar líneas celulares linfoblastoides B transformadas por el virus de Epstein-Barr (VEB) en el Centro de Cultivo Tisular del CHGR, Hospital General de Massachusetts, Boston. Las líneas celulares linfoblastoides se cultivaron en medio RPMI 1640 con L-glutamina, con 10 % de SFB y 1 % de Pen Strep (Gibco) a 37 ° C y 5 % de CO₂.

Análisis de ADN y ARN

Se aisló ADN genómico de células sanguíneas y salivales con el kit QIAamp DNA (Qiagen) y de muestras de piel con el kit Puregene Genomic DNA Isolation (Qiagen). El ARN total se extrajo de cultivos de líneas celulares linfoblastoides con el kit RNeasy Mini (Qiagen).

Examen de grandes deleciones genómicas en TSC1

Los sujetos inscritos que no habían tenido un análisis previo de delección/amplificación de TSC1 (n = 17) fueron examinados utilizando un ensayo de amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple (MLPA) con conjuntos de sondas para todos los exones de TSC1, disponibles en MRC-Holland, como se describió anteriormente [41].

Secuenciación de próxima generación (NGS) y análisis computacional La secuenciación de próxima

generación de la extensión genómica de TSC1 y TSC2 se realizó como se describió anteriormente [23,49] en ADN extraído de muestras de sangre, saliva y piel fresca en los instrumentos HiSeq2000 o HiSeq 2500 (Illumina). Las bibliotecas de secuenciación se prepararon utilizando dos métodos: PCR de largo alcance seguida de fragmentación; y captura de Agilent SureSelect Target Enrichment (Agilent Technologies), seguida del uso del kit KAPA DNA Library Prepa-ration. Brevemente, se realizó PCR de largo alcance (amplicones de 3–8 kb) para amplificar todos los exones codificantes, promotores, UTR y la mayor parte de la secuencia intrónica de TSC1 y TSC2 de muestras de ADN de 40 sujetos con TSC. Los amplicones se purificaron y se utilizaron para preparar una biblioteca de fragmentos pequeños.

Se generaron bibliotecas de diferentes muestras utilizando índices únicos y se mezclaron en una proporción equimolar para el análisis de secuenciación mediante lecturas de extremos emparejados de 50 a 75 nt en el Centro de Secuenciación de ADN de Medicina Genética Personalizada del Partners Center, Cambridge, MA. El conjunto de cebos de captura híbridos Agilent SureSelect cubrió la totalidad de los genes TSC1 y TSC2, incluyendo 10 kb aguas arriba y 10 kb aguas abajo, y las regiones codificantes de DEPTOR, PRAS40, TBC1D7, DEPDC5, NPRL2 y

NPRL3. Estas bibliotecas se prepararon y secuenciaron en el Centro para el Descubrimiento del Genoma del Cáncer, Instituto Oncológico Dana Farber, Boston.

Para ambos tipos de bibliotecas, los datos de secuencia primaria se deconvolucionaron utilizando secuencias de índice a archivos de muestra individuales y convertidos al formato FASTQ, alineados con el genoma humano usando bwa-0.5.8c (Alineación de Burrows-Wheeler) [50], filtrados para eliminar lecturas de baja calidad y reducir la redundancia a 50 lecturas uniformes comenzando en cada posición de nucleótido de interés en cada dirección. Los datos se analizaron luego para variantes de secuencia usando herramientas del Genome Analysis Toolkit (GATK) [51], incluyendo IndelGenotyperV2 y UnifiedGenotyper, para identificar indels y variantes de un solo nucleótido. Un segundo enfoque se usó en paralelo para analizar los datos de secuencia, con captura de llamadas de lectura en todas las posiciones usando SAMtools Pileup [52], seguido de procesamiento personalizado en Python y Matlab para determinar la frecuencia de llamada de base en cada posición en cada orientación de lectura. Estos datos se filtraron luego para eliminar llamadas de variantes observadas en una sola orientación de lectura, o vistas en múltiples muestras para excluir artefactos derivados del proceso de secuenciación. Todas las variantes observadas con una frecuencia del 1% se revisaron directamente con Integrative Genomics Viewer [53] para identificar variantes auténticas y excluir artefactos de secuenciación o alineamiento. Para lograr una mayor sensibilidad en las muestras sin hallazgos de mutación en este análisis inicial, el valor de corte de la frecuencia de variantes se redujo al 0,5% y tres lecturas para las variantes de un solo nucleótido (SNV), y al 0,2% y dos lecturas para las variantes indel.

La profundidad de lectura media para los exones codificantes de TSC1 y TSC2 fue de 5.000x para las muestras analizadas. lisis mediante PCR de largo alcance y 500x para bibliotecas generadas por captura híbrida.

Se identificaron deleciones genómicas (tamaño > 1 kb) en las muestras analizadas mediante captura híbrida, utilizando información de secuenciación de extremos emparejados para determinar el tamaño del fragmento de inserción. Se marcaron las lecturas con tamaños de inserción > 1200, y se consideraron las lecturas con un tamaño de inserción > 2000 y agrupamiento de al menos tres lecturas en una región de 500 nt, o con un tamaño de inserción de entre 1200 y 2000 y agrupamiento de al menos cinco lecturas en una región de 500 nt. Todas las deleciones genómicas candidatas se confirmaron mediante PCR a través de la unión de fusión de la deleción.

Las SNV y las indeles identificadas como nuevas o de posible significación se confirmaron mediante secuenciación bidireccional de Sanger cuando se observaron con una proporción alélica del 15 %; el análisis SNaPshot para aquellos observados con una proporción alélica del 2-15 %; y la secuenciación de secuenciación de nucleótido único (NGS) de amplicones para aquellos observados con una proporción alélica <2-5 %. El análisis SNaPshot se realizó como se describió previamente [45] utilizando el kit ABI Prism SNaP-shot Multiplex (Applied Biosystems), el análisis de los productos de extensión en un secuenciador ABI 3100 y la cuantificación de los alelos utilizando GeneMapper versión 3.0 (Applied Biosystems).

Se realizó NGS de amplicones cortos específicos mediante análisis NGS de amplicones individuales, lo que generó entre 10 000 y 1 000 000 de lecturas de secuenciación. Estos archivos de lectura, así como los archivos de lectura originales primarios, se analizaron mediante grep de Unix con una secuencia de 20 nt que coincidía con el alelo silvestre y el alelo mutante, para determinar la frecuencia precisa de las lecturas mutantes y silvestres. Se emplearon métodos similares, contando el número de lecturas con tamaño de inserto normal frente a grande, para determinar la frecuencia alélica de deleciones genómicas grandes.

Las variantes de sentido erróneo y las posibles variantes en sitios de empalme se compararon con los hallazgos de la base de datos de mutaciones de la esclerosis tuberosa LOVD [27] para evaluar la patogenicidad. Las variantes observadas con cualquier frecuencia en el servidor de variantes 1000 Genomes [54], el servidor de variantes de exoma NHLBI [55] o el navegador del Consorcio de Agregación de Exoma ExAC [56] no se consideraron en mayor profundidad, ya que probablemente se trataba de variantes no funcionales. Solo se identificó una nueva variante de sentido erróneo, que PolyPhen2 [57,58] y SIFT [59,60] predijeron como perjudicial.

Se realizó un ensayo MLPA con conjuntos de sondas para todos los exones de TSC2, disponibles en MRC-Holland. formado en sujetos con estado NMI persistente, como se describió anteriormente [41].

Se realizó PCR de transcripción inversa

(RT-PCR) en ARN preparado a partir de cultivos de células linfoblastoides no tratadas y tratadas con puromicina (300 µg/ml durante seis horas) utilizando el kit OneStep RT-PCR (Qiagen) y cebadores específicos para regiones de ADNc de TSC1 y TSC2.

Huella de ADN de microsatélites

Se analizaron muestras de ADN de tres sujetos con TSC esporádico (P1, P35 y P41) y sus padres mediante la identificación genética de microsatélites con los siguientes marcadores: amelogenina, D3S1358, D13S317, D18S51, VWA, D21S11, D7S820, D5S818, D8S1179 y FGA; estas muestras se realizaron en el laboratorio de tipificación tisular del Hospital Brigham and Women's de Boston para confirmar el estado familiar. Todos estos sujetos presentaron variantes de novo en el sitio de empalme con frecuencia heterocigótica.

Análisis estadísticos Se

realizaron comparaciones estadísticas utilizando la prueba de chi cuadrado (χ^2) para características binarias y la prueba de Mann-Whitney no pareada para comparar medidas cuantitativas.

Información complementaria S1 Fig.

Análisis de RT-PCR de mutaciones intrónicas. (A) A la izquierda se muestran bandas aberrantes observadas en gel de agarosa del producto de RT-PCR de los exones 1-7 de TSC2 para P10. A la derecha hay un trazo de secuenciación de Sanger que demuestra que la secuenciación se duplica al final del exón 2, y una de las secuencias adyacentes es la del exón 6. (B) Se observó una mancha aberrante de alto peso molecular para P34 en amplicones de RT-PCR que cubren los exones 28-33 y 29-32 de TSC2 (carriles 1 y 2, respectivamente). Los mismos amplicones para la muestra de control no muestran este efecto (carriles 3 y 4). La variante de empalme en P34 se encuentra en el intrón 29 de TSC2. El ARN se preparó a partir de cultivos de LCL tratados con puromicina para (A) y (B).

(TIF)

Fig. S2 . Análisis de RT-PCR de SNP exónicos que demuestran sesgo alélico en los productos de RT-PCR. (A) P35: comparación del ADN genómico (izquierda) y el ADN de RT-PCR (cadenas derecha, directa e inversa). La secuenciación de Sanger demuestra sesgo en la representación alélica de los alelos G y A en el análisis de RT-PCR. (B) P41: comparación del ADN genómico (izquierda) y el ADN de RT-PCR (cadenas derecha, directa e inversa). La secuenciación de Sanger demuestra sesgo en la representación alélica de los alelos C y T en el análisis de RT-PCR.

(TIF)

Fig. S3 . Capturas de pantalla de IGV para deleciones grandes detectadas mediante NGS. (A) Delección de 13.282 nt observada en P9. (B) Delección de 12.591 nt observada en P28. Las lecturas de extremos emparejados de NGS se muestran como recuadros conectados por una línea fina, que representa el tamaño de inserción inferido.

(TIF)

Tabla S1. Características clínicas de 53 sujetos con TSC NMI.

(PDF)

Tabla S2. Frecuencia de alelos mutantes (FA) para mutaciones confirmadas por NGS.

(PDF)

Tabla S3. Secuencias de cebadores utilizadas en este estudio.

(PDF)

Agradecimientos

Agradecemos a todos los sujetos que participaron en este y otros estudios relacionados.

Contribuciones del autor

Concepción y diseño de los experimentos: MET DJK. Realización de los experimentos: MET ART LL DJK. Análisis de los datos: MET DJK. Aportación de reactivos, materiales y herramientas de análisis: KAD JG SC YC DK DNF EAT MS. Redacción del artículo: MET DJK. Revisión y comentarios del manuscrito: KAD JG SC YC ART LL DK DNF EAT MS.

Referencias

- Herencia Mendeliana en Línea en el Hombre, OMIM. Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD. Números MIM: 191100, 613254. <http://www.omim.org>.
- Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. El complejo de la esclerosis tuberosa. *N Engl J Med*. 2006; 355(13):1345–56. PMID: [17005952](#)
- Kwiatkowski DJ, Thiele EA, Whittemore VH. Complejo de esclerosis tuberosa. Weinheim, Alemania. Wiley-VCH; 2010. 409 págs.
- Northrup H, Krueger DA. Actualización de los criterios diagnósticos del complejo de esclerosis tuberosa: recomendaciones de la Conferencia Internacional de Consenso sobre el Complejo de Esclerosis Tuberosa de 2012. *Pediatr Neurol*. 2013; 49(4):243–54. Publicación electrónica: 24/09/2013. doi: [10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.001](#) PMID: [24053982](#)
- Ali M, Girimaji SC, Markandaya M, Shukla AK, Sacchidanand S, Kumar A. Análisis de mutaciones y polimorfismos de los genes TSC1 y TSC2 en pacientes indios con complejo de esclerosis tuberosa. *Acta Neurol Scand*. 2005; 111(1):54–63. PMID: [15595939](#)
- Apak A, Haliloglu G, Kose G, Yilmaz E, Anlar B, Aysun S. Análisis de mutaciones del gen TSC2 en 33 casos familiares turcos de esclerosis tuberosa. *Turk J Pediatr*. 2003; 45(1):1–5. PMID: [12718362](#) 7. Au K-S, Rodríguez JA, Finch JL, Volcik KA, Roach ES, Delgado MR, et al. Análisis mutacional de la línea germinal del gen TSC2 en 90 pacientes con esclerosis tuberosa. *Am J Hum Genet*. 1998; 62:286–94. PMID: [9463313](#)
- Au KS, Williams AT, Roach ES, Batchelor L, Sparagana SP, Delgado MR, et al. Genotipo/fenotipo correlación en 325 personas remitidas para diagnóstico de complejo de esclerosis tuberosa en los Estados Unidos. *Genet Med*. 2007; 9(2):88–100. PMID: [17304050](#) 9. Choi JE, Chae JH, Hwang YS, Kim KJ. Análisis mutacional de TSC1 y TSC2 en pacientes coreanos con Complejo de esclerosis tuberosa. *Brain Dev*. 2006; 28(7):440–6. PMID: [16554133](#)
- Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, et al. El análisis mutacional en una cohorte de 224 pacientes con esclerosis tuberosa indica una mayor gravedad de la enfermedad por TSC2 en múltiples órganos, en comparación con la enfermedad por TSC1. *Am J Hum Genet*. 2001; 68(1):64–80. PMID: [11112665](#)
- Hung CC, Su YN, Chien SC, Liou HH, Chen CC, Chen PC, et al. Análisis moleculares y clínicos de 84 pacientes con complejo de esclerosis tuberosa. *BMC Med Genet*. 2006; 7:72. PMID: [16981987](#)
- Langkau N, Martin N, Brandt R, Zugge K, Quast S, Wiegele G, et al. Mutaciones de TSC1 y TSC2 en la esclerosis tuberosa, fenotipos asociados y un modelo para explicar las razones de frecuencia observadas de TSC1/TSC2. *Eur J Pediatr*. 2002; 161(7):393–402. PMID: [12111193](#)
- Niida Y, Lawrence-Smith N, Banwell A, Hammer E, Lewis J, Beauchamp RL, et al. Análisis de ambos TSC1 y TSC2 para mutaciones de la línea germinal en 126 pacientes no emparentados con esclerosis tuberosa. *Hum Mutat*. 1999; 14(5):412–22. PMID: [10533067](#)
- Rendtorff ND, Bjerregaard B, Frodin M, Kjaergaard S, Hove H, Skovby F, et al. Análisis de 65 pacientes con complejo de esclerosis tuberosa (CET) mediante secuenciación por PCR de largo alcance de TSC2 DGGE, TSC1/TSC2 MLPA y TSC1, e informe de 28 mutaciones nuevas. *Hum Mutat*. 2005; 26(4):374–83. PMID: [16114042](#) 15. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, et al. Análisis mutacional de los genes TSC1 y TSC2 en un contexto diagnóstico: correlaciones genotipo-fenotipo y comparación de técnicas diagnósticas de ADN en el complejo de esclerosis tuberosa. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(6):731–41. PMID: [15798777](#)
- van Slegtenhorst M, Verhoef S, Tempelaars A, Bakker L, Wang Q, Wessels M, et al. Espectro mutacional del gen TSC1 en una cohorte de 225 pacientes con esclerosis tuberosa: sin evidencia de correlación genotipo-fenotipo. *J Med Genet*. 1999; 36(4):285–9. PMID: [10227394](#)
- Yamashita Y, Ono J, Okada S, Wataya-Kaneda M, Yoshikawa K, Nishizawa M, et al. análisis de todos Exones de los genes TSC1 y TSC2 para mutaciones germinales en pacientes japoneses con esclerosis tuberosa: informe de 10 mutaciones. *Am J Med Genet*. 2000; 90(2):123–6. PMID: [10607950](#)

18. Consorcio Europeo de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16. Identificación y caracterización del gen de la esclerosis tuberosa en el cromosoma 16. *Cell*. 1993; 75:1305–15.
19. Sampson JR, Scahill SJ, Stephenson JB, Mann L, Connor JM. Aspectos genéticos de la esclerosis tuberosa en Oeste de Escocia. *J Med Genet*. 1989; 26(1):28–31. PMID: [2918523](#)
- Identificación del gen TSC1 de la esclerosis tuberosa en el cromosoma 9q34. *Science*. 1997; 277(5327): 805–8. PMID: [9242607](#)
21. Camposano SE, Greenberg E, Kwiatkowski DJ, Thiele EA. Características clínicas distintivas de pacientes con complejo de esclerosis tuberosa sin mutación identificada. *Ann Hum Genet*. 2009; 73(2):141–6. doi: [10.1111/j.1469-1809.2008.00496.x](#) Identificador de grupo: [19133941](#)
22. Boronat S, Shaaya EA, Doherty CM, Caruso P, Thiele EA. Complejo de esclerosis tuberosa sin tubérculos ni nódulos subependimarios: un estudio fenotipo-genotipo. *Clin Genet*. 2014; 86(2):149–54. doi: [10.1111/cge.12245](#) PMID: [23909698](#)
23. Tyburczy ME, Wang JA, Li S, Thangapazham R, Chekaluk Y, Moss J, et al. Causas de la exposición al sol Mutaciones somáticas de segundo impacto y desarrollo de angiofibroma en el complejo de esclerosis tuberosa. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(8):2023–9. doi: [10.1093/hmg/ddt597](#) PMID: [24271014](#)
24. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S, et al. Análisis exhaustivo de mutaciones de TSC1 y TSC2 y correlaciones fenotípicas en 150 familias con esclerosis tuberosa. *Am J Hum Genet*. 1999; 64(5):1305–15. PMID: [10205261](#)
25. Young JM, Burley MW, Jeremiah SJ, Jeganathan D, Ekong R, Osborne JP, et al. Un análisis de mutaciones del gen TSC1 revela 26 mutaciones de truncamiento de proteínas y una mutación en el sitio de empalme en un panel de 79 pacientes con esclerosis tuberosa. *Ann Hum Genet*. 1998; 62(Pt 3):203–13. PMID: [9803264](#)
26. Mayer K, Ballhausen W, Leistner W, Rott H. Tres nuevos tipos de aberraciones de empalme en el gen TSC2 de la esclerosis tuberosa, causadas por mutaciones ajenas a las secuencias consenso de empalme. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1502(3):495–507. PMID: [11068191](#)
27. Povey S, Ekong R. Base de datos de esclerosis tuberosa. <http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC>.
28. Jeganathan D, Fox MF, Young JM, Yates JR, Osborne JP, Povey S. La desintegración del ARN mediada por secuencias sin sentido en el gen TSC1 sugiere una herramienta útil para la clonación preposicional y posposicional. *Hum Genet*. 2002; 111 (6):555–65. PMID: [12436247](#)
29. King K, Flinter FA, Nihalani V, Green PM. Mutaciones intrónicas profundas inusuales en el gen COL4A5 causan el síndrome de Alport ligado al cromosoma X. *Hum Genet*. 2002; 111(6):548–54. PMID: [12436246](#)
30. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Asociación de mutaciones sin sentido y del sitio de empalme 5' en tau con la demencia hereditaria FTDP-17. *Nature*. 1998; 393(6686):702–5. PMID: [9641683](#)
31. Harland M, Mistry S, Bishop DT, Bishop JA. Una mutación intrónica profunda en CDKN2A se asocia con enfermedad en un subconjunto de genealogías de melanoma. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(23):2679–86. PMID: [11726555](#) 32. Nellist M, Brouwer RW, Kockx CE, van Veghel-Plandsoen M, Withagen-Hermans C, Prins-Bakker L, et al. La secuenciación dirigida de nueva generación revela mutaciones no identificadas previamente en TSC1 y TSC2. *BMC Med Genet*. 2015; 16:10. doi: [10.1186/s12881-015-0155-4](#) PMID: [25927202](#)
33. Mayer K, Ballhausen W, Rott HD. El cribado de mutaciones de las regiones codificantes completas de los genes TSC1 y TSC2 mediante la prueba de truncamiento de proteínas (PTT) identifica defectos frecuentes de empalme. *Hum Mutat*. 1999; 14(5):401–11. PMID: [10533066](#)
34. Kwiatkowska J, Wigowska-Sowinska J, Napierala D, Slomski R, Kwiatkowski DJ. Mosaicismo en la esclerosis tuberosa como posible causa del fracaso del diagnóstico molecular. *N Engl J Med*. 1999; 340 (9):703–7. PMID: [10053179](#)
35. Rose VM, Au KS, Pollom G, Roach ES, Prashner HR, Northrup H. Mosaicismo de la línea germinal en la esclerosis tuberosa: ¿Cuán común es? *Am J Hum Genet*. 1999; 64(4):986–92. PMID: [10090883](#) 36. Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, et al. Enfermedad renal quística Enfermedad en la esclerosis tuberosa: papel del gen de la enfermedad renal poliquística 1. *Am J Hum Genet*. 1997; 61 (4):843–51. PMID: [9382094](#)
37. Jones AC, Sampson JR, Cheadle JP. Mosaicismo de bajo nivel detectable por DHPLC, pero no por secuenciación directa. *Hum Mutat*. 2001; 17(3):233–4. PMID: [11241845](#) 38. Emmerson P, Maynard J, Jones S, Butler R, Sampson JR, Cheadle JP. Caracterización de mutaciones en muestras con bajo nivel de mosaicismo mediante la recolección y análisis de heterodúplex fraccionados por DHPLC. *Hum mutat*. 2003; 21(2):112–5. PMID: [12552557](#)
39. Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM, Hesselings-Janssen AL, Mazurczak T, Jozwiak S, et al. Alta tasa de mosaicismo en el complejo de esclerosis tuberosa. *Soy J Hum Genet*. 1999; 64(6):1632–7. PMID: [10330349](#)

40. Yates JR, van Bakel I, Sepp T, Payne SJ, Webb DW, Nevin NC, et al. Mosaicismo germinal femenino en esclerosis tuberosa confirmado mediante análisis genético molecular. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(13):2265–9. PMID: [9361032](#)
41. Kozlowski P, Roberts P, Dabora S, Franz D, Bissler J, Northrup H, et al. Identificación de 54 grandes deleciones/duplicaciones en TSC1 y TSC2 mediante MLPA y correlaciones genotipo-fenotipo. *Hum Genet.* 2007; 121(3–4):389–400. PMID: [17287951](#)
42. Verhoef S, Vrtel R, van ET, Bakker L, Sikkens E, Halley D, et al. Mosaicismo somático y variación clínica en el complejo de esclerosis tuberosa. *Lancet.* 1995; 345(8943):202. PMID: [7823706](#)
43. Roberts PS, Dabora S, Thiele EA, Franz DN, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. El mosaicismo somático es poco frecuente en padres no afectados de pacientes con esclerosis tuberosa esporádica. *J Med Genet.* 2004; 41(5):e69. PMID: [15121797](#)
44. Sampson JR. TSC1 y TSC2: genes mutados en la esclerosis tuberosa, un trastorno genético humano. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 3):592–6. PMID: [12773162](#)
45. Qin W, Kozlowski P, Taillon BE, Bouffard P, Holmes AJ, Janne P, et al. La secuenciación ultraprofunda detecta una baja tasa de mutaciones en mosaico en el complejo de esclerosis tuberosa. *Hum Genet.* 2010; 127(5):573–82. Publicación electrónica: 19/02/2010. doi: [10.1007/s00439-010-0801-z](#) PMID: [20165957](#)
46. Evans DG, Ramsden RT, Shenton A, Gokhale C, Bowers NL, Huson SM, et al. Mosaicismo en neurofibromatosis tipo 2: actualización del riesgo basado en la uni/bilateralidad del schwannoma vestibular en la presentación y análisis de mutaciones sensibles, incluyendo la amplificación de sondas dependiente de ligación múltiple. *J Med Genet.* 2007; 44(7):424–8. PMID: [17307835](#)
48. Evans DG, Trueman L, Wallace A, Collins S, Strachan T. Correlaciones genotipo/fenotipo en la neurofibromatosis tipo 2 (NF2): evidencia de una enfermedad más grave asociada con mutaciones truncantes. *J Med Genet.* 1998; 35(6):450–5. PMID: [9643284](#)
49. Tyburczy ME, Jozwiak S, Malinowska IA, Chekaluk Y, Pugh TJ, Wu CL, et al. Una lluvia de eventos de segundo impacto como causa de carcinoma multifocal de células renales en el complejo de esclerosis tuberosa. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(7):1836–42. doi: [10.1093/hmg/ddu597](#) PMID: [25432535](#)
50. Li H, Durbin R. Alineación rápida y precisa de lecturas largas con la transformada de Burrows-Wheeler. *Bioinformática.* 2010; 26(5):589–95. Publicación electrónica 19/01/2010. doi: [10.1093/bioinformática/btp698](#) PMID: [20080505](#)
51. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, et al. El kit de herramientas de análisis del genoma: un marco de MapReduce para analizar datos de secuenciación de ADN de nueva generación. *Genome Res.* 2010; 20(9):1297–303. Publicación electrónica 21/07/2010. doi: [10.1101/gr.107524.110](#) PMID: [20644199](#)
52. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. El formato de alineación/mapa de secuencias y SAMtools. *Bioinformática.* 2009; 25(16):2078–9. Publicación electrónica: 10/06/2009. doi: [10.1093/bioinformatics/btp352](#) PMID: [19505943](#)
53. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Visualizador genómico integrativo. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(1):24–6. Publicación electrónica: 12/01/2011. doi: [10.1038/nbt.1754](#) PMID: [21221095](#)
54. Consorcio del Proyecto 1000 Genomas, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. Mapa integrado de la variación genética de 1092 genomas humanos. *Nature* 2012; 491:56–65 (1 de noviembre de 2012). <http://www.1000genomes.org/>. doi: [10.1038/nature11632](#) PMID: [23128226](#)
55. Servidor de variantes del exoma, Proyecto de secuenciación del exoma NHLBI GO (ESP), Seattle, WA. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
56. Consorcio de Agregación de Exomas (ExAC), Cambridge, MA. <http://exac.broadinstitute.org/>.
57. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. Un método y un servidor para predecir mutaciones de sentido erróneo perjudiciales. *Nat Methods.* 2010; 7(4):248–9. Publicación electrónica: 1 de abril de 2010. doi: [10.1038/nmeth0410-248](#) PMID: [20354512](#)
58. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. Un método y un servidor para predecir mutaciones de sentido erróneo perjudiciales. *Nat Methods* 2010; 7(4):248–249. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. doi: [10.1038/nmeth0410-248](#) PMID: [20354512](#)
59. Ng PC, Henikoff S. Predicción de sustituciones deletéreas de aminoácidos. *Genome Res.* 2001; 11(5):863–74. Publicación electrónica 5/5/2001 PMID: [11337480](#)
60. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicción de los efectos de la codificación de variantes no sinónimas en la función proteica mediante el algoritmo SIFT. *Nat Protoc.* 2009; 4(7):1073–81. <http://sift.jcvi.org/>. doi: [10.1038/nprot.2009.86](#) PMID: [19561590](#)