

TECNOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE VARIANTES FARMACOGENÉTICAS

El campo de la farmacogenómica (PGx) se está desarrollando rápidamente. En los últimos 20 años, no solo ha habido un gran progreso en el desarrollo de las pautas de PGx, también ha habido un avance tecnológico significativo que ha aportado nuevas tecnologías para evaluar variantes genéticas. En un principio, solo las técnicas de secuenciación Sanger, de genotipado de un solo SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) y de genotipado de paneles de SNPs estaban disponibles como métodos para la identificación de variantes. Hasta la fecha, los paneles de SNPs siguen siendo la tecnología más utilizada en la práctica clínica. Sin embargo, si bien es eficiente y tiene un bajo coste, los paneles SNP no pueden detectar todas las variaciones genéticas importantes, como nuevas variantes raras o variantes estructurales. Actualmente, se encuentran disponibles múltiples técnicas de secuenciación (por ejemplo, exoma o genoma completo), que producen gran cantidad de información genética [1-3]. Sin embargo, estos todavía no se utilizan de forma rutinaria en la práctica clínica, a pesar de su potencial [4,5]

1. Paneles SNV

La prueba de paneles de SNP es la tecnología más utilizada en la práctica de PGx, ya sea a través de paneles comerciales o personalizados. Los cuales pueden contener un conjunto preseleccionado de SNP, que, según el panel o la plataforma, pueden variar desde unas pocas variantes en un solo gen hasta miles de variantes en todo el genoma.

Los paneles disponibles comercialmente contienen típicamente variantes que están vinculadas a la respuesta al fármaco en las pautas de PGx o en PharmGKB [6]. La evidencia subyacente a las variantes seleccionadas puede variar, desde arrays que solo contienen las variantes más fuertemente asociadas, hasta paneles que contienen todas las variantes teóricamente asociadas con la respuesta al fármaco, por ejemplo, incluidos todos los genes conocidos relacionados con el fármaco. Casi todas las paneles disponibles utilizan PCR, secuenciación por síntesis y nanoesferas o perlas, combinada con una forma de detección de fluorescencia o quimioluminiscencia para identificar la

variante que está presente en el sitio de interés [7-9]. Otra tecnología es el uso de espectrometría de masas, que se basa en las diferencias de masa entre el nucleótido *wt* y mutantes [10]. La preselección de variantes y la cantidad relativamente baja de datos para procesar permiten un resultado rápido de bajo coste.

Arrays comerciales.

Hay muchos paneles disponibles que se pueden utilizar para PGx, por ejemplo el panel ADME de VeraCode (Illumina) o VeriDose (Agena BioScience, cuya lista de variantes se basa en un panel de genes biológicamente más relevantes con un impacto clínico conocido y sus variantes comunes clínicamente accionables. Además, es posible expandir el panel si se desea [7,11].

Hay otros paneles más extensos como Pharmacoscan (ThermoFisher) que incluye CNVs y genes como HLA [9].

Estos tipos de paneles son ampliamente utilizados en estudios clínicos de implementación de PGx, tanto en la práctica clínica como con fines de investigación.

Arrays customizados

Esto es posible desarrollar un propio panel clínico personalizado con un conjunto más enfocado en variantes clínicamente procesables. Por lo general, estos paneles personalizados se realizan utilizando pruebas basadas en un solo gen que cubren sólo las variantes con aplicabilidad clínica directa.

Este formato permite una caracterización completa de algunos genes, así como un enfoque más amplio centrado en un panel de variantes comunes en múltiples genes. Este tipo de paneles también se utiliza en estudios de implementación clínica.

Arrays de genoma completo

Hay disponibles arrays comerciales con cobertura de todo el genoma. Un beneficio adicional del genoma completo es que también permiten el análisis GWAS además de proporcionar información PGx. Ejemplos son Illumina GSA que contiene más de 600.000 SNV en todo el genoma, incluidos 17.750 marcadores PGx [12] y las matrices Axiom de ThermoFisher que contienen cobertura de todo el genoma [13].

2. Next generation sequencing

Las tecnologías NGS aún no se aplican de forma rutinaria en PGx clínica. Sin embargo, se utilizan a menudo en investigación PGx y en estudios genéticos de enfermedades [14,15].

Los paneles SNP solo cubren un conjunto limitado de variantes seleccionadas, mientras que los datos de secuenciación cubren el exoma o genoma completo.

Las tecnologías NGS son capaces de secuenciar lecturas de 100 a 200 pb con un alto rendimiento, lo que permite la secuenciación de un genoma completo en cuestión de horas. Estas lecturas se alinean con el genoma de referencia y las variantes se identifican en función de las variaciones con la referencia. Las aplicaciones de NGS se pueden clasificar aproximadamente en tres enfoques: secuenciación del exoma completo (WES) se centra en la secuenciación de las regiones codificantes del genoma, que cubre aproximadamente el 1-2% de todo el genoma, secuenciación del genoma completo (WGS), cuyo objetivo es secuenciar todo el genoma, tanto las regiones codificantes como las no codificantes y secuenciación dirigida de una región o panel de genes de interés [16-18].

Si bien NGS actualmente se puede realizar con costos relativamente bajos, la gran cantidad de datos hace que el procesamiento sea más desafiante

Uso de NGS para farmacogenómica

Si bien NGS se ha convertido en el estándar para el diagnóstico clínico y en la investigación, aún no se ha adoptado ampliamente para PGx clínico.

No obstante, en un entorno de investigación, NGS se ha utilizado para PGx durante varios años.

WES solo cubre los exones y por lo tanto, por definición, no puede cubrir todas las variantes relevantes si están ubicadas en las regiones intrónicas o intergénicas.

WGS, por otro lado, también cubre regiones intrónicas que conducen a una cobertura ampliada. No obstante, las variantes intrónicas son de importancia clínica en PGx.

Un enfoque de secuenciación dirigida puede combinar los costos más bajos de WES con los avances de los datos de WGS. Este tipo de panel va dirigido a genes de interés, tanto

Comentado [1]: ¿cabría especificar, o bien en este título, o bien en los párrafos de este apartado que se habla de "short-read" NGS? Veo que el apartado 3 está dedicado a long-read. Esto puede depender de cómo cada uno clasifica las tecnologías, y determinar si hablar de NGS sobreentiende que es "short-read" o todo tipo de NGS.

en regiones intrónicas como exónicas. Esto resulta en costos más bajos mientras se mantiene la precisión y abundancia de datos de WGS.

3. Long-Read Sequencing

Las tecnologías de secuenciación de lectura larga han surgido en el campo y lentamente están ganando terreno sobre los enfoques de lectura corta en el campo de la investigación [18,19]. Tanto la tecnología Pacific Bioscience (PacBio) como la Oxford Nanopore Technologies (ONT) se están convirtiendo en una parte integral de los enfoques genéticos [20].

PacBio utiliza la secuenciación SMRT (molécula única en tiempo real) para poder secuenciar lecturas de hasta 45 kB. Las células SMRT utilizan micropocillos, cada uno de los cuales contiene una única hebra de ADN que luego se secuencia mediante ensamblaje y se registra en tiempo real [21].

Oxford Nanopore Technologies utiliza nanoporos a través de los cuales se extrae la hebra de ADN; la interrupción de la corriente es específica de un codón, lo que permite el ensamblaje completo de la secuencia de ADN [22].

Se puede generar una gran cantidad de datos mediante secuenciación de lectura larga, pero el procesamiento es significativamente más intensivo en comparación con los paneles SNP y NGS.

Long-Read para farmacogenética

Se ha demostrado que la secuenciación de lectura larga es capaz de resolver loci complejos en todo el genoma [5,23]

Actualmente diagnósticos de enfermedades genéticas complejas ya utilizan la secuenciación de lectura larga. No obstante, solo se han realizado unos pocos estudios de secuenciación de larga duración para farmacogenes.

El gen más complejo y estudiado minuciosamente en PGx es CYP2D6, que contiene tanto SNPs como SVs. (Variantes estructurales) Se ha demostrado que con la secuenciación de lectura larga, el gen CYP2D6 (~ 6,6 kbp) puede secuenciarse en una lectura completa y resolverse completamente en haplotipos en fase, incluidas las variantes estructurales [24,25]. Lo mismo se ha observado para los genes HLA [5,23].

La secuenciación de lectura larga en PGx está actualmente, limitada a estudios de un solo gen y no se han realizado estudios a gran escala que apliquen secuenciación de lectura larga en PGx clínica

Referencias

1. Reisberg, S.; Krebs, K.; Kals, M.; Magi, R.; Metsalu, K.; Lauschte, V.M.; Vilo, J.; Milani, L. Translating genotype data of 44,000 biobank participants into clinical pharmacogenetic recommendations: Challenges and solutions. *Genet. Med.* **2019**, *21*, 1345–1354.
2. Cousin, M.A.; Matey, E.T.; Blackburn, P.R.; Boczek, N.J.; McAllister, T.M.; Kruisselbrink, T.M.; Babovic-Vuksanovic, D.; Lazaridis, K.N.; Klee, E.W. Pharmacogenomic findings from clinical whole exome sequencing of diagnostic odyssey patients. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2017**, *5*, 269–279.
3. Van der Lee, M.; Allard, W.G.; Bollen, S.; Santen, G.W.E.; Ruivenkamp, C.A.L.; Hoffer, M.J.V.; Kriek, M.; Guchelaar, H.J.; Anvar, S.Y.; Swen, J.J. Repurposing of Diagnostic Whole Exome Sequencing Data of 1,583 Individuals for Clinical Pharmacogenetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2020**, *107*, 617–627.
4. Krebs, K.; Milani, L. Translating pharmacogenomics into clinical decisions: Do not let the perfect be the enemy of the good. *Hum. Genom.* **2019**, *13*, 39.
5. Ameur, A.; Kloosterman, W.P.; Hestand, M.S. Single-molecule sequencing: Towards clinical applications. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 72–85.
6. PharmGKB. DPWG: Dutch Pharmacogenetics Working Group. Available online: <https://www.pharmgkb.org/page/dpwg> (acceso 17 Diciembre 2020).
7. Illumina Inc. VeraCode ADME Core Panel. Available online: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_veracode_adme_core_panel.pdf(acceso 17 Diciembre 2020).
8. Arbitrio, M.; Di Martino, M.T.; Scionti, F.; Agapito, G.; Guzzi, P.H.; Cannataro, M.; Tassone, P.; Tagliaferri, P. DMETTM (Drug Metabolism Enzymes and Transporters): A pharmacogenomic platform for precision medicine. *Oncotarget* **2016**, *7*, 54028–54050.
9. ThermoFisher Scientific. Pharmacoscan Assay. Available online: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/903010TS>(acceso 17 Diciembre 2020).
10. Gabriel, S.; Ziaugra, L.; Tabbaa, D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2009**.
11. Agenda Bioscience. VeriDose Core Panel. Available online: <https://agenabio.com/products/panel/veridose-core-panel/> (acceso 17 Diciembre 2020).

12. Illumina Inc. Illumina Global Screening Array. Available online: <https://emea.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-global-screening.html>(acceso 17 Diciembre 2020).
13. ThermoFisher Scientific. Axiom Genotyping Solutions. Available online: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/axiom_solution_brochure.pdf(acceso 17 Diciembre 2020).
14. Vilella, A. Next-Generation-Sequencing, v1.5.7. Available online: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1GMMfhyLK0-q8XkIo3YxIWaZA5vVMuhU1kg41g4xLkXc/htmlview?hl=en_GB (acceso 17 Diciembre 2020).
15. Huang, S.M.; Goodsaid, F.; Rahman, A.; Frueh, F.; Lesko, L.J. Application of pharmacogenomics in clinical pharmacology. *Toxicol. Mech. Methods*. **2006**, *16*, 89–99.
16. Mardis, E.R. Next-generation sequencing platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *6*, 287–303.
17. Slatko, B.E.; Gardner, A.F.; Ausubel, F.M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2018**, *122*, e59.
18. Levy, S.E.; Myers, R.M. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2016**, *17*, 95–115.
19. Mantere, T.; Kersten, S.; Hoischen, A. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 426.
20. Ameer, A.; Kloosterman, W.P.; Hestand, M.S. Single-molecule sequencing: Towards clinical applications. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 72–85.
21. Rhoads, A.; Au, K.F. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2015**, *13*, 278–289.
22. Bowden, R.; Davies, R.W.; Heger, A.; Pagnamenta, A.T.; de Cesare, M.; Oikonen, L.E.; Parkes, D.; Freeman, C.; Dhalla, F.; Patel, S.Y.; et al. Sequencing of human genomes with nanopore technology. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1. 1869.
23. Wenger, A.M.; Peluso, P.; Rowell, W.J.; Chang, P.C.; Hall, R.J.; Concepcion, G.T.; Ebler, J.; Fungtammasan, A.; Kolesnikov, A.; Olson, N.D.; et al. Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 1155–1162.
24. Qiao, W.; Yang, Y.; Sebra, R.; Mendiratta, G.; Gaedigk, A.; Desnick, R.J.; Scott, S.A. Long-Read Single Molecule Real-Time Full Gene Sequencing of Cytochrome P450-2D6. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 315–323.
25. Buermans, H.P.; Vossen, R.H.; Anvar, S.Y.; Allard, W.G.; Guchelaar, H.J.; White, S.J.; den Dunnen, J.T.; Swen, J.J.; van der Straaten, T. Flexible and Scalable Full-Length CYP2D6 Long Amplicon PacBio Sequencing. *Hum. Mutat.* **2017**, *38*, 310–316.