

Dos años de PAMPA

Por: Guadalupe Buda¹ y Marcelo Martí²

El Programa Argentino de Medicina de Precisión en enfermedades Autoinflamatorias, mejor conocido como PAMPA (<https://apps.bitgenia.com/pampa/>), nació a comienzos del año 2018 con el apoyo de Novartis y el acompañamiento de un consejo asesor, compuesto por médicos y bioquímicos especializados en Genética, Inmunología y Reumatología. El proyecto tuvo como objetivo realizar un diagnóstico preciso, utilizando tecnología genómica, de pacientes con diagnóstico tentativo de Enfermedades Autoinflamatorias (EAI) de forma gratuita, promoviendo un tratamiento adecuado en el contexto de una verdadera medicina personalizada.

Como ya hemos mencionado en numerosas oportunidades, la variabilidad clínica de las EAI y el elevado -y creciente- número de genes asociados a las mismas, convierte a este grupo de desórdenes en un caso ideal para su abordaje por técnicas de secuenciación masiva. Actualmente, estas tecnologías permiten determinar, en tiempos y costos accesibles, la secuencia completa de las regiones codificantes de la mayoría de nuestros genes, dándonos la oportunidad de precisar cuál (o cuáles) son las variantes (también llamadas mutaciones) responsables del desarrollo patológico en un porcentaje moderado de los casos.



Figura 1. Número de casos aceptados agrupados en función del diagnóstico tentativo.

1. Bitgenia, Alicia Moreau de Justo 1750, 3° "H", CABA. Argentina C1107AFH. 2. Novartis Argentina S.A. Ramallo 1851, CABA. Argentina C1429DUC.

Dos años de PAMPA

Recordamos que en abril del 2018 se lanzó la primera versión del proyecto, y durante el transcurso del mismo se postularon 94 casos, 60 de los cuales fueron incorporados al proyecto, secuenciados y analizados. La segunda versión del Proyecto, llevada a cabo durante el año 2019 y principios del 2020, contó con 81 postulaciones totales, y con la incorporación de 55 casos de pacientes con sospecha de EAI.

En la figura 1 se puede observar el número de casos totales postulados, y aceptados de acuerdo con el diagnóstico presuntivo. Adicionalmente, es importante remarcar el carácter federal del proyecto para ambas versiones, resaltando que se recibieron casos de pacientes provenientes de numerosas provincias/ciudades.

En esta oportunidad, desde Bitgenia (www.bitgenia.com) queremos comunicarles los principales resultados y aprendizajes de esta segunda versión del proyecto, el cual tiene desde mediados del 2020 su tercera edición.

Para el análisis de variantes se utilizó, en esta segunda edición, un panel de 61 genes (como se detalla en la Figura 3), lo que representa un ampliación respecto de la primera, en función de:

- Nueva evidencia bibliográfica,
- Sugerencias del Dr. Matías Oleastro
- Resultados obtenidos en la primera edición.

Además, para todas aquellas variantes encontradas dentro de alguno de los genes incluidos en la base de datos de Infevers (Internet Fevers; <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers>, un sitio web dedicado a las mutaciones responsables de enfermedades autoinflamatorias hereditarias), se buscó información asociada a las más de 1600 variantes caracterizadas en la misma. Finalmente, para las variantes reportadas en pacientes con FMF, MKD, TRAPS y CAPS, también se recurrió a las bases de datos Eurofevers, que recientemente aporta información sobre la correlación genotipo-fenotipo de estas entidades; y, por supuesto, ClinVar, Uniprot y LOVD.

Para analizar el grado de éxito alcanzado, cada caso fue clasificado en una de las siguientes categorías de acuerdo al tipo y nivel de evidencia disponible para las variantes encontradas, al grado de asociación entre el diagnóstico presuntivo (o los síntomas) del paciente, y al fenotipo patológico reportado para defectos en el gen que las contenga:

- Categoría 1, casos donde se encontró una o más variantes (posiblemente) patogénicas, conocidas y con evidencia previa de asociación con el diagnóstico presuntivo (categoría 1 A), o sin evidencia previa en la literatura pero con clasificación ACMG (probablemente) patogénica (categoría 1 B);

Panel de genes para enfermedades autoinflamatorias

ACP5, ACTB, ADAM17, ADAR, ADGRE2, AGBL3, AP1S3, ARPC1B, CARD14, CECR1, COPA, DDX58, DNASE2, EGFR, IFIH1, IL10RA, IL10RB, IL1RN, IL36RN, ISG15, LACC1, LPIN2, MEFV, MVK, NCSTN, NLR4, NLRP1, NLRP12, NLRP3, NLRP7, NOD2, OSMR, OTULIN, PLCG2, POLA1, POMP, PSMA3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMG2, PSTPIP1, RBCK1, RELA, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF31, SAMHD1, SH3BP2, SHARPIN, SLC29A3, STIM1, TMEM173, TNFAIP3, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TREX1, TRNT1, USP18, WDRI.

Figura 3. Panel de genes contemplado en el análisis de los casos.

Dos años de PAMPA

ii) Categoría 2, casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante novel potencialmente patogénica, acompañada de una variante conocida en un modelo de heterocigosis compuesta (categoría 2A), o sola en un modelo de herencia dominante (categoría 2B). En caso de que se hayan encontrado dos variantes de estas características en el mismo gen en un modelo de heterocigosis compuesta se clasificó al caso como 2C.

iii) Categoría 3, aquellos casos donde se encontró una variante nueva de significado incierto (VUS) en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico.

iv) Categoría 4, casos donde se encontraron una o más variantes de riesgo en genes directamente asociados con el Dx. tentativo o en los genes contemplados en el estudio.

v) Categoría 5, casos donde no se encontró ninguna variante relevante para ser informada.

El número de casos resultante para cada categoría se muestra en la Tabla 1. Como puede observarse, cerca del 10% de los casos caen dentro de la Categoría 1, y 20% en la 2.

Dos años de PAMPA

Categoría		Descripción	# de Casos
1	1A	Casos donde se encontró una o más variantes conocidas con evidencia previa de asociación con el diagnóstico presuntivo.	2
	1B	Casos donde se encontró una o más variantes cuya clasificación de acuerdo con los criterios de ACMG resultó patogénica o probablemente patogénica, pero sin evidencia previa en la literatura.	3
2	2A	Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante nueva potencialmente patogénica, acompañada de una variante conocida en un modelo de heterocigosis compuesta.	0
	2B	Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante de significado incierto en heterocigosis, pudiendo explicar modelos de herencia dominantes.	7
	2C	Casos donde se encontraron, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, dos variantes VUS en el mismo gen, sugiriendo un modelo de heterocigosis compuesta.	3
3		Casos donde se encontró una variante nueva de significado incierto (VUS) en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico.	4
4		Casos donde se encontraron una o más variantes de riesgo en genes directamente asociados con el Dx. tentativo o en los genes contemplados en el estudio.	7
5		No se encontró ninguna variante relevante para ser informada.	29
Total		Total de casos secuenciados	55

4

Tabla 1. Clasificación de los casos de acuerdo a las categorías 1 a 5.

Dos años de PAMPA

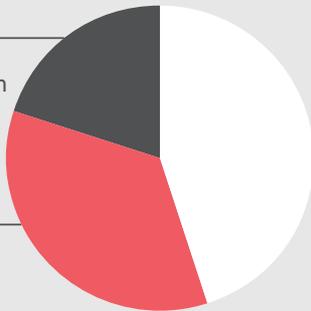
Resultados Proyecto Pampa 1 y 2

Reporte positivo

Genes con moderada asociación
12 casos
20%

Reporte positivo

Genes principales
20 casos
35%

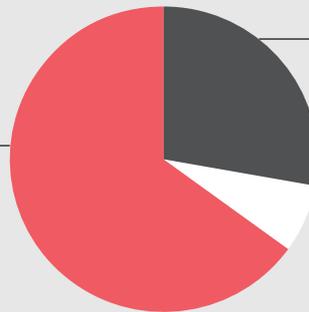


Reporte negativo

28 casos
45%

Reporte negativo

36 casos
65%



Reporte positivo

Genes principales
15 casos
28%

Reporte positivo

Genes con moderada asociación
4 casos
7%

Figura 4. Porcentaje de casos clasificados en función del tipo de reporte entregado para los Proyectos PAMPA 1 y 2.

De forma gráfica, otra manera de evaluar las estadísticas del proyecto es catalogando a los casos en función del tipo de reporte entregado, como también se refleja en la Figura 4 y Tabla 2. Se consideran como resultados "positivos" tanto aquellos casos en los cuales se reportó una o más variantes directamente relacionadas con la sospecha clínica como aquellos donde se reportó alguna/s potencial/es variante/s que podría/n considerarse como hipótesis de trabajo y explicar parcialmente el fenotipo observado. Se consideran como resultados "negativos" aquellos casos donde no se encontró ninguna variante relevante para ser informada tanto en el/los gen/es directamente relacionados con la sospecha clínica, como en otros genes que podrían estar asociados con los signos y síntomas evidenciados.

Si consideramos a los 19 casos positivos como exitosos, vemos que la tasa de éxito es cercana al 34%, lo que es compatible con lo reportado en la literatura para la aplicación de estas tecnologías

al diagnóstico molecular preciso de enfermedades poco frecuentes (Shashi et.al., 2014; Sawyer et.al., 2016). Sin embargo, es importante destacar que estrictamente hablando, los casos comprendidos en las categorías 2 y 3 deben ser considerados hipótesis de trabajo, sobre las que se debe profundizar el estudio en el grupo familiar y en la asociación genotipo-fenotipo. Si fuera posible, para las variantes noveles, sería esencial incluir ensayos funcionales en modelos celulares in-vitro y/o de actividad proteica, tarea que podrá desarrollarse cuando se habiliten los laboratorios para la realización de estos análisis en un reducido número de genes, dentro del contexto de un convenio con Novartis.

Los resultados y la experiencia obtenidos en las dos ediciones de PAMPA evidencian la enorme relevancia e impacto que tiene el desarrollo de proyectos conjuntos entre los médicos, el consejo asesor de especialistas y, en este caso, las empresas Novartis-Bitgenia. También reflejan, creemos,

Dos años de PAMPA

Resultados	Observaciones	Número de casos
Positivo	Se consideran como resultados "positivos" tanto aquellos casos en los cuales se reportó una o más variantes directamente relacionadas con la sospecha clínica como aquellos donde se reportó alguna/s potencial/es variante/s que podría/n considerarse como hipótesis de trabajo y explicar parcialmente el fenotipo observado.	19
Negativo	Se consideran como resultados "negativos" aquellos casos donde no se encontró ninguna variante relevante para ser informada tanto en el/los gen/es directamente relacionados con la sospecha clínica, como en otros genes que podrían estar asociados con los signos y síntomas evidenciados.	36
Total	Número total de casos incorporados, secuenciados, procesados y analizados para esta edición del Proyecto.	55

6

Tabla 2. Número de casos "positivos" y "negativos" en función del criterio mencionado.

la complejidad inherente a la implementación de proyectos de medicina traslacional, particularmente la genómica y la necesidad de contar con equipos transdisciplinarios para llevarlos adelante con éxito. En ese contexto, creemos que PAMPA es una excelente prueba de concepto que esperamos pueda ser tomado como ejemplo y replicado en otros grupos de patologías.

Finalmente, en función de los resultados obtenidos durante las dos ediciones del proyecto y, con el objetivo de aumentar la tasa de éxito en la versión 2020, queremos destacar ciertos aspectos que serán tenidos en cuenta en la preselección y posterior evaluación de los futuros casos postulados. En primer lugar, es necesario identificar precisamente aquellos casos clínica y etiológicamente compatibles con los criterios de inclusión que se detallan en la página del proyecto y postular únicamente aquellos casos en los que fueron descartadas enfermedades infecciosas, oncohematológicas e inmunodeficiencias. A modo de ejemplo, casos con diagnóstico tentativo

de PFAPA y/o FMF con buena respuesta sostenida al tratamiento con esteroides y colchicina respectivamente, -criterio considerado como diagnóstico-, serán considerados únicamente en el caso de que presenten manifestaciones atípicas o rechazo al tratamiento. Resultará de suma importancia la valoración inmunológica previa a la postulación de casos, particularmente en aquellos con diagnóstico tentativo de Hiper IgD/ Deficiencia de MVK. Por otro lado, los casos de AIJ sistémica son interesantes, pero con altas probabilidades de tratarse de una entidad multifactorial/poligénica. En este sentido, el Proyecto busca priorizar aquellos casos de pacientes con una alta sospecha de enfermedad monogénica. Particularmente, es importante que los profesionales que postulan el caso, puedan describir con el mayor detalle posible los motivos -y evidencia asociada- que llevaron al diagnóstico tentativo y/o alternativo, ya que esto es esencial al momento de evaluar la postulación y, posteriormente, a la hora de priorizar y valorar las variantes encontradas.

Dos años de PAMPA

Confiamos que este Proyecto haya contribuido y aportado información genética de relevancia que les haya permitido a los profesionales recibir asesoramiento y una orientación diagnóstica en un alto (o moderado) porcentaje de los casos y que podamos continuar trabajando en forma conjunta para acercar estas tecnologías a pacientes de todo el país.

Este Programa también posibilitó el hallazgo de nuevas variantes en pacientes afectados y motivó colaboraciones, permitiendo la escritura de Case Reports. En esta oportunidad, les queremos compartir dos papers recientemente publicados, que hacen alusión a la colaboración de un equipo multidisciplinario, que incluyó médicos, biólogos, bioquímicos e informáticos, entre otros múltiples ayudantes.

- Buda, G., Valdez, R.M., Biagioli, G. et al. Inflammatory cutaneous lesions and pulmonary manifestations in a new patient with autosomal recessive ISG15 deficiency case report. *Allergy Asthma Clin Immunol* 16, 77 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13223-020-00473-7>

- Martin-Fernandez M, Bravo García-Morato M, Gruber C, et al. Systemic Type I IFN Inflammation in Human ISG15 Deficiency Leads to Necrotizing Skin Lesions. *Cell Rep.* 2020;31(6):107633. doi:10.1016/j.celrep.2020.107633

Debido al éxito de las primeras ediciones y a nuestra iniciativa de acercar la genómica a la sociedad con el apoyo de Novartis, recordamos a los lectores que se encuentra actualmente abierta una nueva convocatoria para participar de la Tercera Edición del Proyecto PAMPA, que buscará incluir 50 casos de pacientes con sospecha de EAI.

Para más información:

<https://www.bitgenia.com/pampa/>

Criterios de inclusión:

<https://www.bitgenia.com/pampa/files/pmp3-criterios-inclusion.pdf>

Para postular tu caso:

https://docs.google.com/forms/d/1bpDH-YkYyGUBpUuTt1FrHpiogEVOXyx6PWmwU9KHncY/viewform?edit_requested=true