

Un año de PAMPA. Análisis de Resultados.

Por: Guadalupe Buda¹, Marcelo Martí¹ y Daniela Campanella².

El Programa Argentino de Medicina de Precisión en enfermedades Autoinflamatorias, mejor conocido como PAMPA nació a comienzos del año 2018 con el apoyo de Novartis y el asesoramiento de un consejo asesor, compuesto por médicos y bioquímicos especializados en Reumatología e Inmunología. El proyecto tuvo como objetivo realizar un diagnóstico preciso gratuito de pacientes con diagnóstico tentativo de Enfermedades Autoinflamatorias (EAI), utilizando tecnología genómica y promoviendo un tratamiento adecuado en el contexto de una verdadera medicina personalizada.

La variabilidad clínica de las EAI y el elevado 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 a costos accesibles, la secuencia completa de nuestros genes dándonos la oportunidad de precisar cuál (o cuáles) son las variantes (también llamadas mutaciones) y los genes responsables del desarrollo patológico.

En abril del 2018 se lanzó el proyecto y durante el transcurso del mismo se postularon cerca de 100 casos, 50 de los cuales fueron inicialmente incorporados al proyecto, secuenciados y analizados. En las figuras 1 y 2 se puede observar el número de casos totales y aceptados de acuerdo con el diagnóstico presuntivo o la ciudad de procedencia, evidenciando el carácter federal del proyecto.

1

Por Diagnóstico presuntivo

	TOTALES	ACEPTADOS
FMF	16	12
TRAPS	9	8
PFAPA	5	2
HIDS/MKD	5	3
CAPS	12	8
CANDLE	3	3
DITRA/DIRA	2	2
PAPA	2	2
Otros	20	10

Otros: Kawasaki, Still, CU, Behcet, SAM, Síndrome H, pericarditis, vasculitis, psoriasis, paniculitis lupica, Blau, CRMO.

DIAGNÓSTICO TENTATIVO
CASOS TOTALES Y ACEPTADOS

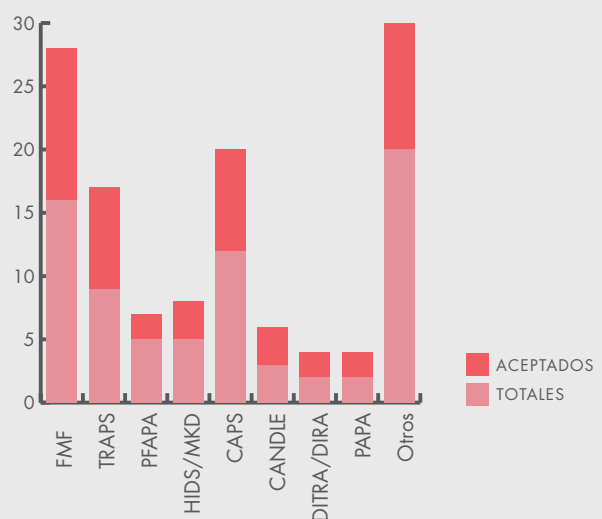
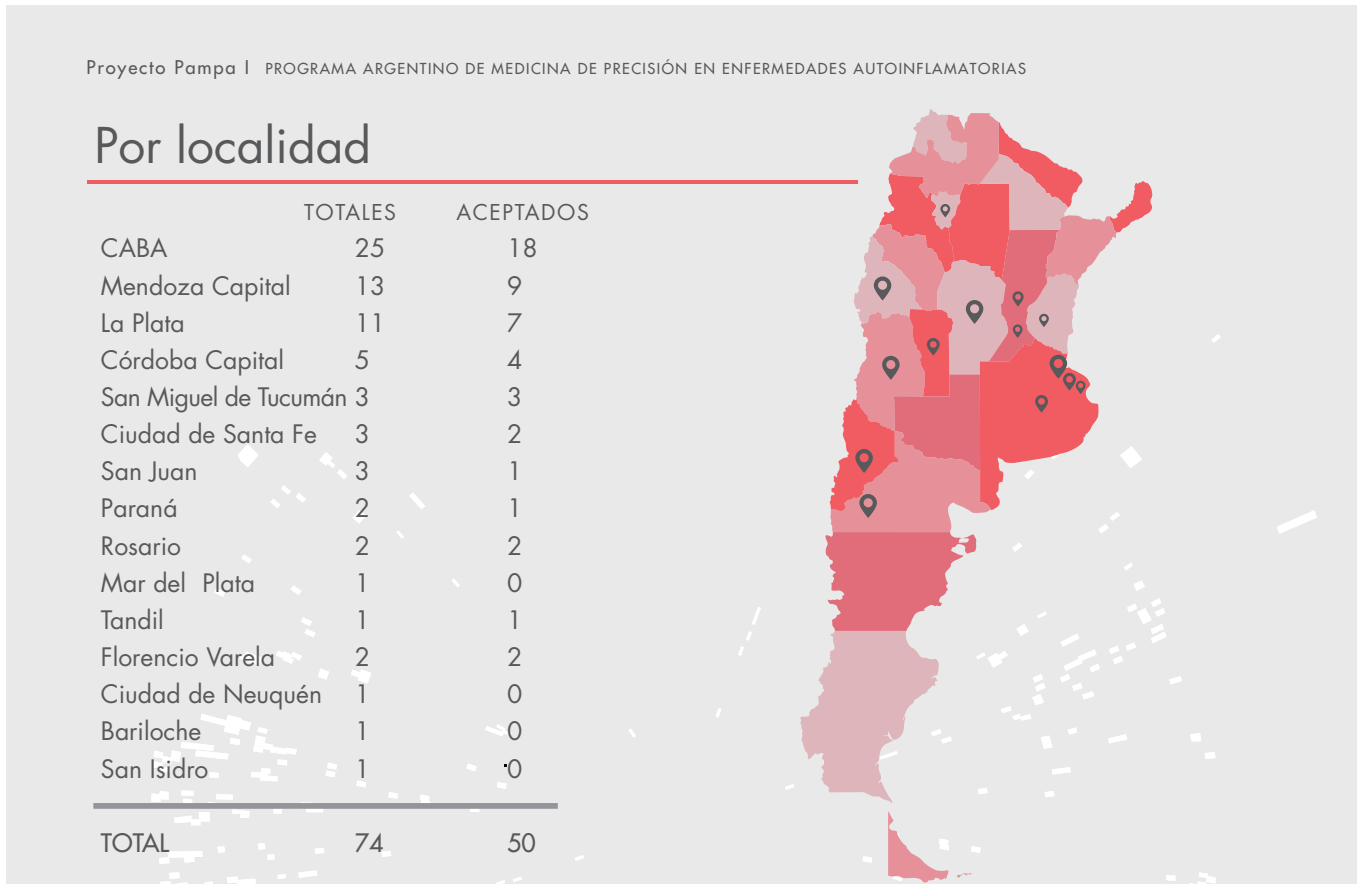


Figura 1. Número de casos totales y aceptados agrupados en función del diagnóstico tentativo.

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

Un año de PAMPA. Análisis de Resultados.



2

Figura 2. Número de casos totales y aceptados agrupados por localidad de procedencia.

En esta oportunidad, desde Bitgenia (www.bitgenia.com/pampa) queremos comunicarles los principales resultados y aprendizajes del proyecto.

Para el análisis de variantes se seleccionó inicialmente un panel de 40 genes, que luego fue ampliado a 54, (como se detalla en la Figura 3), en función de la evidencia aportada por casos recientes reportados en la literatura. Asimismo, se analizaron también variantes presentes en un panel de genes extendido (VIP 2) sugerido para autoinflamación y vasculitis por Omoyinmi et. al, 2017. Además, para todas aquellas variantes encontradas dentro de alguno de los 31 genes incluidos en la base de datos de Infervers (Internet

Fevers; <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers>, un sitio web dedicado a las mutaciones responsables de enfermedades autoinflamatorias hereditarias) se buscó información asociada a las más de 1600 variantes caracterizadas. Finalmente, para las variantes reportadas en pacientes con FMF, MVK, 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 y Uniprot.

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, y al

Un año de PAMPA. Análisis de Resultados.

Paneles de genes analizados

Nuevo Panel de Enfermedades Autoinflamatorias (54 genes)

ACP5, ADAM17, ADAR1, ADGRE2, AGBL3, AP1S3, CARD14, CECR1, COPA, DDX58, DNASE2, HOIL-1L, IFIH1, IL10RA, IL10RB, IL1RN, IL36RN, LPIN2, MEFV, MVK, NCSTN, NLRC4, NLRP1, NLRP12, NLRP3, NLRP7, NOD2, OTULIN, OSMR, PLCG2, POLA1, POMP, PSMA3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSTPIP1, RBCK1, RIG1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF31, SAMHD1, SHARPIN, SH3BP2, SLC29A3, TMEM173, TNFAIP3, TNFRSF1A, TNFRSF11A, TREX1, USP18, WDR1.

Panel de Enfermedades Autoinflamatorias extendido (Omoyinmi et. al, 2017)

ACP5, ACTA2, ADA2, ADAM17, ADAR, AICDA, AP1S3, AP3B1, APOA1, APOA2, APOA4, APOC3, APOE, B2M, BMPR2, BTK, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C2, C3, C4A, C5, C6, C7, C8A, C8B, C9, CARD14, CASP10, CASP8, CBL, CBS, CD40LG, CFH, CFHR5, CFI, CFP, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL5A2, COL7A1, CORO1A, CST3, CTC1, CTPS1, CYBA, CYBB, DCLRE1C, DNASE1, DNASE1L3, DNASE2, DOCK8, ELN, FAS, FASLG, FBN1, FBN2, FERMT1, FGA, FOXP3, G6PC3, GLA, GSN, GUCY1A1, GUCY1A3, GUCY2C, HFE, HPS1, HPS4, HPS6, HTRA1, ICOS, IFNGR1, IFNGR2, IKBKG, IL10, IL10RA, IL10RB, IL1RN, IL2RA, IL36RN, ITGB2, LPIN2, LRBA, LYN, LYST, LYZ, MAGT1, MASP2, MBL2, MEFV, MVK, MYH11, MYLK, NCF1, NCF2, NCF4, NF1, NLRC4, NLRP12, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NOD2, NOTCH1, NOTCH3, NRAS, PIK3CD, PIK3R1, PLCG2, PLOD1, POMP, PRF1, PRKCD, PRKG1, PSMA3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSTPIP1, PTEN, PYCARD, RAB27A, RBCK1, RET, RHOD, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF213, SAA1, SAA2, SAA4, SAMHD1, SERPING1, SH2D1A, SH3BP2, SKI, SKIV2L, SLC29A3, SLC2A10, SLC37A4, SMAD3, SMAD4, STK4, STX11, STXBP2, TGFB2, TGFB1, TGFB2, TMEM173, TNFAIP3, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TRAP1, TREX1, TRNT1, TTC37, TTR, UNC13D, VPS13B, WAS, WDR1, XIAP.

Fuente: Omoyinmi E, Standing A, Keylock A, Price-Kuehne F, Melo Gomes S, Rowczenio D, et al. (2017) Clinical impact of a targeted next-generation sequencing gene panel for autoinflammation and vasculitis. *PLoS ONE* 12(7): e0181874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181874>

Figura 3. Paneles de genes incorporados al análisis de los casos.

grado de asociación entre el diagnóstico presuntivo (o los síntomas) del paciente y el fenotipo patológico reportado para defectos en el gen que las contenga: i) categoría 1, casos donde se encontró una o más variantes (posiblemente) patogénicas, conocidas y con evidencia previa de asociación con el diagnóstico presuntivo 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, potencialmente patogénica, en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico y iv) categoría 4, casos donde no se encontró ninguna variante relevante para ser informada. **Ver Tabla 1.**

De forma gráfica, otra manera de evaluar las estadísticas del proyecto es catalogando a los casos en función del tipo de reporte entregado. **Ver Figura 4.**

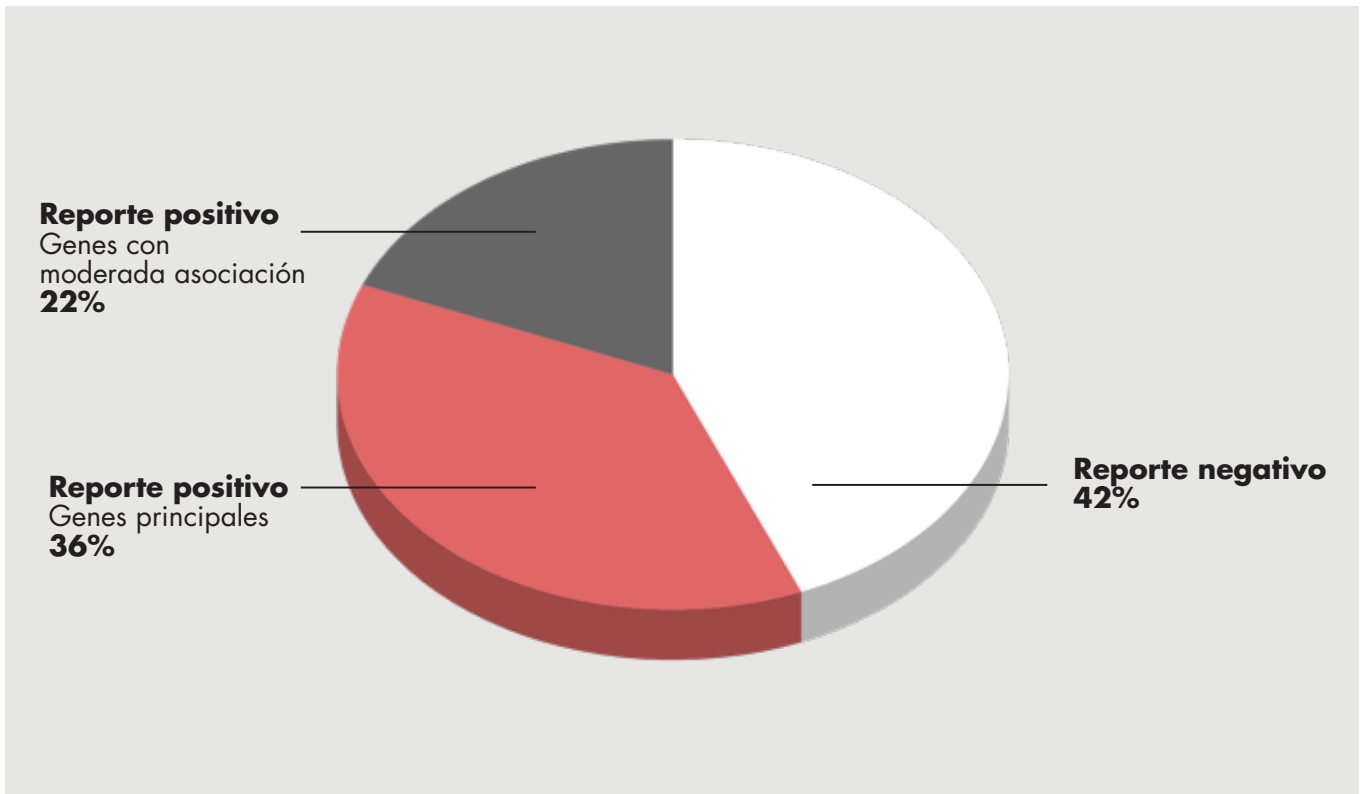
Un año de PAMPA. Análisis de Resultados.

Categoría		Descripción	# de Casos	# de Variantes encontradas
1		Casos donde se encontró una o más variantes conocidas con evidencia previa de asociación con el diagnóstico presuntivo.		6
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.	13	1
	2B	Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante nueva potencialmente patogénica (o de significado incierto) en un modelo de herencia dominante.		11
	2C	Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, dos variantes nuevas potencialmente patogénicas en el mismo gen en un modelo de heterocigosis compuesta.		1
3		Casos donde se encontró una variante nueva potencialmente patogénica (VUS) en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico.	11	9
4		No se encontró ninguna variante relevante para ser informada.	21	-
Total		Total de casos secuenciados	50	31

4

Tabla 1. Clasificación de los casos de acuerdo a las categorías 1 a 4.

Un año de PAMPA. Análisis de Resultados.



5

Figura 4. Porcentaje de casos clasificados en función del tipo de reporte entregado. Reporte positivo en genes principales: hace referencia a aquellos casos donde existe una fuerte correlación genotipo-fenotipo, incluyendo a las categorías 1 y 2 de la Tabla 1. Reporte positivo en genes con moderada asociación: hace referencia a aquellos casos donde existe una moderada o baja correlación genotipo-fenotipo e incluye a la categoría 3 de la Tabla 1. Reporte negativo: hace referencia a aquellos casos donde no se encontraron variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS con características patogénicas dentro de los genes analizados, por lo que fueron incluidos dentro de la categoría 4 de la Tabla 1.

Si consideramos aquellos casos donde se encontraron variantes de asociación clínica conocida (categoría 1) o con alta probabilidad de ser patogénicas (categoría 2) como exitosos, vemos que la tasa de éxito es cercano al 50%, lo que es ligeramente mayor a 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 de la categoría 2 deben ser considerados hipótesis de trabajo, sobre las que se debe profundizar el estudio, en el grupo familiar, en la asociación genotipo-fenotipo y si fuera posible, para las variantes novedales incluir ensayos funcionales en modelos celulares in-vitro y/o de actividad proteica.

A continuación y, a modo de ejemplo, describimos

Un año de PAMPA. Análisis de Resultados.

BOX 1

El primer caso corresponde a un paciente con diagnóstico clínico tentativo de CANDLE y diagnóstico alternativo de Síndrome H. En este caso se encontraron dos variantes en el gen SLC29A3, que codifica para un transportador que regula el influjo y eflujo de nucleósidos en organelas intracelulares, y para el cuál mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta, como el presente caso, se asocian con el Síndrome de histiocitosis con linfadenopatía (OMIM: 602782), un grupo de trastornos que incluye al Síndrome H y produce signos y síntomas multisistémicos compartidos. Las variantes corresponden, respectivamente, a un cambio de aminoácido (missense) NM_018344.5.0.728T>G (p.Leu243Arg), y a un cambio en el marco de lectura (frameshift) NM_018344.5.0.728T>G (p.Leu243Arg), ambas en heterocigosis. De acuerdo a las recomendaciones del ACMG¹, la primera variante se clasifica como de significado incierto (por falta de evidencia adicional y no por poseer propiedades que se asocian con una variante benigna) y la segunda, como probablemente patogénica (1 PVS y 1 PM). La presencia de ambas variantes, con potencial patogénica, en un gen con una fuerte asociación con el fenotipo clínico del paciente sugieren fuertemente que las mismas serían las responsables del cuadro observado y que, por lo tanto, se ha arribado a un diagnóstico molecular certero.

BOX 2

El segundo caso corresponde a un paciente con historia familiar de hipoacusia, y un diagnóstico clínico tentativo de NOMID/CINCA. El análisis principal no reveló la presencia de variantes reportadas previamente como (posiblemente) patogénicas dentro de los genes asociados a CINCA. Sin embargo, se halló una variante posiblemente patogénica en el gen OSMR (OMIM: 601743), NM_003999.2.c.1790A>G(p.Tyr597Cys), que posee muy baja frecuencia poblacional y predicción patogénica por múltiples programas bioinformáticos. Mutaciones en este gen, que codifica para el receptor β de oncostatina M (OSMRB) -uno de los componentes del receptor de OSM de tipo II y del receptor IL-31- están relacionadas con amiloidosis cutánea primaria familiar (FPLCA, por sus siglas en inglés, OMIM: 105250), un trastorno autosómico dominante cuyos síntomas concordaban con aquellos observados en el paciente. La variante se clasifica como probablemente patogénica de acuerdo a las recomendaciones del ACMG (criterio: 2PM y 2PP). Por otro lado, se reportó una variante encontrada en el gen MYOZA (OMIM: 276903), NM_000260.3.c.2597G>A p.Arg866His, que codifica para una miosina no convencional que se expresa en el oído interno y donde mutaciones se asocian a deficiencias auditivas tanto sindrómicas como no sindrómicas, entre las que destaca el Síndrome de Usher atípico, que presenta una herencia autosómica recesiva y la Sordera neurosensorial no sindrómica de tipo II, de herencia autosómica dominante (DFNA11, OMIM: 601317). En este caso las variantes encontradas tienen el potencial de explicar varios de los síntomas principales del paciente, pero deben ser consideradas hipótesis de trabajo sobre las cuales se debe profundizar el análisis.

6

¹ Richards et. al, Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5.

² Wali, A. et al. Familial primary localized cutaneous amyloidosis results from either dominant or recessive mutations in OSMR. (2015) Acta Derm. Venereol.

Un año de PAMPA. Análisis de Resultados.

los resultados obtenidos para dos casos en particular

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

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