

Análisis comparativo ACMG-Intervar vs ACMG-ClinGen

Mejoramos la performance en la clasificación de variantes genéticas al 90% con un nuevo algoritmo en colaboración con la Universidad de Buenos Aires.

Por: Nicolás Aguirre y Ana Rius

Introducción

En Bitgenia, nos dedicamos desde hace años a ofrecer servicios diagnósticos de calidad. Para ello, contamos con métodos bioinformáticos semiautomatizados, que han sido fundamentales en nuestra labor de identificar variantes genéticas responsables de causar enfermedades. En los últimos meses nos hemos embarcado en el desarrollo de un nuevo algoritmo, adaptado a las revisiones más recientes y a los avances en el campo de la Genómica.

Este trabajo fue realizado en conjunto con la facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires. Se compararon los dos criterios de clasificación de variantes genéticas, el usado hasta el momento ACMG-2015¹ y la revisión actualizada ClinGen-Rev².

Los resultados revelan un significativo cambio en el veredicto clínico al adoptar el algoritmo de ClinGen-Rev, alcanzando una precisión en la clasificación de variantes del 90% superando el 67% alcanzado por ACMG-2015, obteniéndose un impacto del 8% en la priorización de las variantes.

Diagnóstico de EPoFs

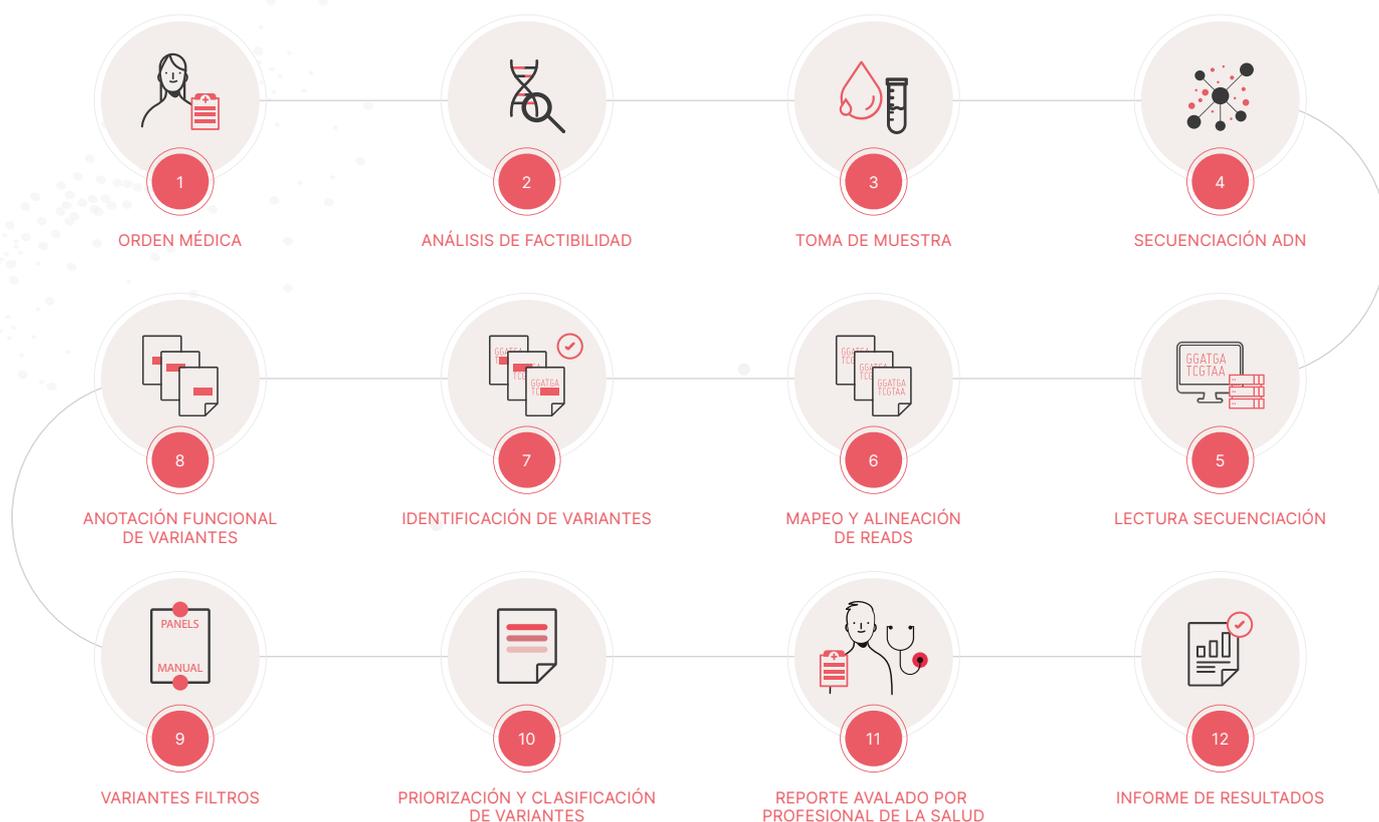
Con el rápido advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva, ha surgido una disciplina orientada al análisis de variantes genéticas para el diagnóstico genético (o molecular) de enfermedades, en particular en Enfermedades Poco Frecuentes (EPoFs), que consiste en determinar cuál es la (o las) variantes que serían responsables del desarrollo de la patología.

El genoma humano de cada persona es aproximadamente 99.9% idéntico al genoma de referencia, y solo difiere en un 0.1%, lo que comprende diferencias que se distribuyen a lo largo del genoma y que técnicamente se denominan variantes. La amplia mayoría de las variantes tienen poco o ningún efecto en la apariencia externa, el correcto metabolismo y funcionamiento de nuestro organismo, pero unas pocas pueden ser directamente responsables de causar ciertas enfermedades.

El proceso de diagnóstico de EPoFs es un proceso laborioso compuesto por sucesivos pasos, para poder encontrar, finalmente, la variante responsable de la patología, que se asemeja a buscar un agujero en un pajar.

¹ Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.

² <https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/>



Interpretación de variantes, surgimiento de ACMG

En el año 2015, el ACMG-AMP desarrolló un conjunto de recomendaciones para ponderar la evidencia presentada por cada una de las variantes, y de este modo llegar a una clasificación estandarizada que permita interpretar y reportar sus consecuencias. Para esto a cada variante se le han asignado "etiquetas" de acuerdo a sus propiedades biológicas. Una vez obtenidas las etiquetas de cada variante, la misma se clasifica en una de las siguientes categorías: "pathogenic" (P), "likely pathogenic" (LP), "uncertain significance" (VUS), "likely benign" (LB) y "benign" (B).

Las variantes "Likely benign" y "likely pathogenic" significan que tenemos, una probabilidad mayor del 90% de que la variante sea benigna, o causante de la enfermedad según el caso, y las "benign" y "pathogenic" a un nivel de confianza del 99%. Las variantes "uncertain significance" son aquellas en el medio, cuya información no es suficiente para descartar que tenga un posible efecto en la patología, y/o que presentan etiquetas contradictorias. Existen 28 etiquetas diferentes, las cuáles se las pueden agrupar en distintas categorías de evidencia, relacionadas con efecto molecular, desarrollo de ensayos funcionales, frecuencia alélica poblacional y relación con el fenotipo particular.

Automatización del proceso de clasificación

Considerando que el genoma de un individuo, presenta entre 2 a 5 millones de variantes, y siendo aproximadamente unas 100 mil en el exoma, el proceso de anotación de variantes y su clasificac-

ión (también referido como interpretación) resulta inviable de realizar manualmente.

Desde los inicios de Bitgenia, se implementó el algoritmo de código abierto de InterVar con ligeras modificaciones, el cual está específicamente diseñado para la clasificación de variantes en cada una de las cinco categorías, basado en las guías de ACMG-AMP 2015. En el año 2023, y en marco de un proyecto de investigación y desarrollo, el equipo de Bitgenia desarrolló un algoritmo bioinformático propio con el objetivo de mejorar la calidad del anotado con bases datos poblacionales, datos funcionales y modelos de predicción específicos, conjuntamente con árboles de decisión, para decidir en cada variante qué criterios de evidencias asignar. Adicionalmente, se buscó incluir todas las recomendaciones nuevas que destaca el SVI de ClinGen.

De la anotación al diagnóstico

A partir de la interpretación automática lograda para cada una de las variantes, se deben seleccionar aquellas con mayor probabilidad de ser causantes del fenotipo observado y descartar aquellas que sean benignas. A este proceso se lo denomina priorización de variantes. Se trata de un trabajo laborioso de revisión y curado manual que busca variantes que han logrado ser clasificadas como P, LP o VUS y podrían estar relacionadas con la sintomatología presentada. En otras palabras, variantes con significancia clínica. Una vez encontradas (o no) aquellas que resulten clínicamente relevantes se procede a confeccionar el informe de las mismas dirigido al profesional de la salud, que será el responsable de terminar el diagnóstico y diseñar un asesoramiento genético y/o tratamiento adecuado.

Actualización de los criterios de ACMG

En los últimos 5 años, The Clinical Genome Resource (ClinGen), se ocupó de la revisión de estos criterios, particularmente focalizándose en los requerimientos y el peso de cada etiqueta, con el objetivo de refinar la clasificación. Por ejemplo, se buscó disminuir la cantidad de variantes clasificadas como “*uncertain significance*”, es decir, aquellas cuya evidencia disponible no es suficiente para la toma de decisiones clínicas. Para esto, algunas clasificaciones fueron redefinidas, y otras se desdoblaron en subclasificaciones. A estas modificaciones se las conoce como modificaciones de ClinGen (ClinGen-Rev).

En resumen, los criterios del ACMG/AMP-2015 cubrieron las bases necesarias para iniciar a clasificar variantes con una dirección estandarizada. Sin embargo, muchas decisiones quedaban a la libre interpretación del investigador, pudiendo resultar en una falla sistemática de criterio cuando el etiquetado es automatizado.

Desde nuestra empresa, nos propusimos actualizar nuestro algoritmo de etiquetado incorporando las modificaciones propuestas por ClinGen, en busca de un enfoque más estructurado para la evaluación de variantes a modo de convertir los criterios en herramientas de diagnóstico cada vez más objetivas y precisas.

Etiquetado

Los pipelines bioinformáticos desarrollados comienzan su trabajo a partir de un archivo (.vcf) con variantes genéticas provenientes de la secuenciación y lo recorren anotando las variantes y colocando las etiquetas acorde a la evidencia recopilada. En la tabla se muestran las principales diferencias de criterios de etiquetado de cada algoritmo.

| | ACMG-2015 | ClinGen-Rev |
|------|--|--|
| BA1 | La frecuencia del alelo es mayor al 5% en proyecto de secuenciado de exoma, proyecto 1000 genomas o ExAC. | La frecuencia del alelo es mayor al 5% en cualquier base de datos de frecuencia poblacional con más de dos mil alelos testeados. Hay una lista de excepciones. |
| BS1 | La frecuencia del alelo es mayor de lo esperado para el trastorno | Se define la frecuencia alélica máxima esperada para cada enfermedad: $BS1_{\text{Punto de corte}} = \frac{\text{Prevalencia} * \text{Heterogeneidad genética}}{\text{Penetrancia}}$ Se desdobra la categoría en distintos niveles de evidencia (<i>Strong, supporting, moderate</i>) |
| BP4 | Múltiples líneas/predictores de evidencia computacional sugieren que no hay impacto en el producto genético (criterios de conservación, impacto evolutivo, plegado, etc.) | Se dan recomendaciones de qué algoritmos usar (por ejemplo REVEL score). Se pondera según una serie de umbrales para cada fuerza. |
| BP7 | Una variante sinónima que computacionalmente no se predicen cambios en el <i>splicing</i> y el nucleótido no está altamente conservado. | Se aplica a variantes sinónimas, intrónicas y de <i>splicing</i> utilizado spliceAI y algoritmos de conservación. Se realizan consideraciones específicas para los distintos tipos de pérdida de función. |
| PVS1 | Variante (<i>nonsense, frameshift, codón de inicio, deleterio única o múltiple</i>) en un gen donde su falta de función es un mecanismo conocido de enfermedad. -Precaución donde la pérdida de función no es un mecanismo conocido. -Precaución interpretando variantes en la región 3'. -Precaución con variantes de <i>splicing</i> que evitan un exón pero la proteína no cambia. -Precaución con la presencia de múltiples transcritos. | Se propone el seguimiento del Árbol de decisión de Abou Tayoun et al. (PMID: 30192042). |
| PM1 | Se trata de un <i>hot spot</i> mutacional o un dominio funcional bien estudiado sin variantes benignas. | Se emplean los Missense Regional Constraints determinados por gnomAD v2, v4 y la relación entre variantes <i>Missense</i> Patogénicas vs. Benignas. |
| PM2 | Ausencia de controles o frecuencia extremadamente baja si es recesivo en Exome Sequencing Project, 1000Genomes Project, o Exome Aggregation Consortium. | Se propone que la rareza es bastante común, se reduce el valor de la etiqueta PM2 a PM2-Supporting. Se expanden/actualizan las bases de datos recomendadas; gnomAD v2, y 3 (en breve v4.1). |
| PP2 | Variante <i>missense</i> en un gen con baja tasa de variantes <i>missense</i> benignas, y en los genes en que las variantes <i>missense</i> son un mecanismo conocido de desarrollo de enfermedad. | Constraint del gen >= 3.09. |
| PP3 | Múltiples líneas de evidencia computacional que apoyan el efecto deletéreo en el gen o su producto. | Se dan recomendaciones de qué algoritmos usar (por ejemplo REVEL score). Se pondera según una serie de umbrales para cada fuerza. |

Resultados

Para evaluar la precisión de ambos algoritmos, se analizaron un conjunto de 4764 variantes revisadas por panel de expertos, extraídas del repositorio de ClinGen. Estas variantes al estar curadas proveen un buen conjunto de datos testigo para la evaluación de la presión de cada algoritmo. Además, resultan un buen control positivo, pues intentan ser una muestra representativa cubriendo ejemplos de diferentes tipos de variantes como ser: *missense*, *frameshift*, *nonsense*, alta y baja frecuencia poblacional.

Para simplificar los análisis cuantitativos la mayoría de los gráficos, a continuación agrupan las variantes en benignas las benignas y probablemente

benignas y en patogénico las probablemente patogénicas y patogénicas. En la figura 1 se observa en cada fila la clasificación provista por el consorcio ClinGen y en colores la alcanzada por cada uno de los protocolos evaluados: ACMG-2015 o ClinGen-Rev. Los resultados se analizan por separado para cada una de las 3 categorías.

Como puede observarse en la figura, de las 700 variantes "benign" analizadas, ACMG-2015 solo clasifica correctamente el 55.71%, marcando el resto como de significado incierto; en cambio ClinGen-Rev resulta más preciso, ya que clasifica correctamente el 99.5% de las variantes benignas, respecto a la clasificación provista por los expertos de ClinGen.

Clasificación diferencial alcanzada por cada criterio de etiquetado

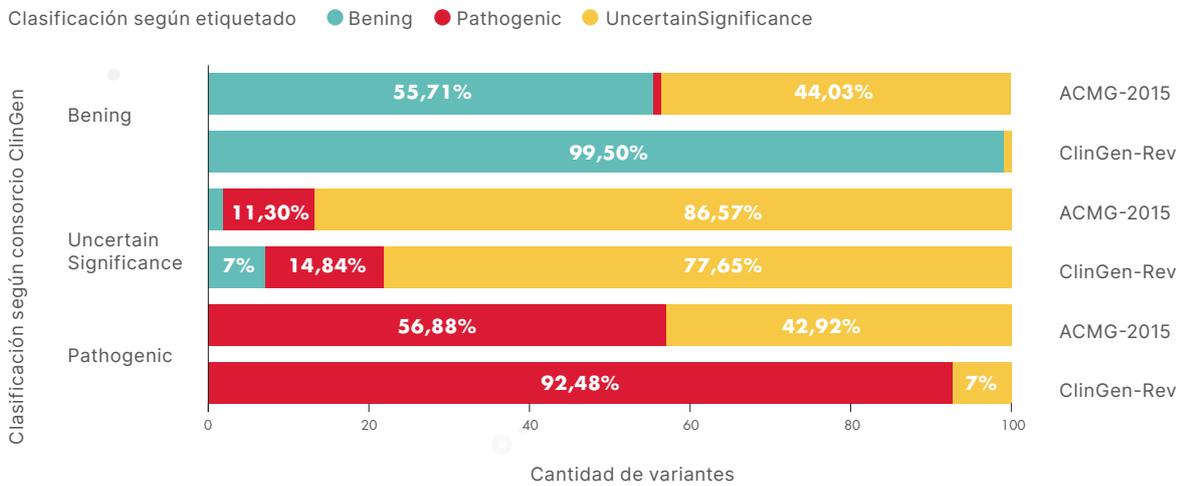


Figura 1: Análisis comparativo entre la performance en la clasificación automática entre los algoritmos de clasificación ClinGen-Rev vs ACMG-2015 vs las variantes curadas.

En el otro extremo de las clasificaciones, para las variantes patogénicas, también se observa una notoria mejoría en la precisión, ya que mientras ACMG-2015 consigue una coincidencia con el consorcio de 56.88%, ClinGen-Rev logra clasificar correctamente un 92.48%, de las patogénicas.

Es importante destacar, que tanto para las B como para las P las variantes "mal" clasificadas, en líneas generales terminan siendo clasificadas como VUS, no encontrándose saltos de probable benigna a probable patogénica y vice-versa. Esto es importante ya que muestra que los errores de ambos criterios son moderados y no drásticos.

Coincidencia con consorcio ClinGen

True False



Figura 2: Gráficos de torta reflejando la tasa de éxito de cada algoritmo.

El algoritmo ClinGen Rev posee una precisión del 90% mientras que ACMG sólo del 67%, lo que evidencia la relevancia clínica y potencial impacto de utilizar las recomendaciones de ClinGen. Conociendo la precisión de cada pipeline, dada la clasificación de una variante cualquiera, se puede observar que el veredicto provisto por ClinGen-Rev tiene mayor probabilidad de estar en lo correcto.

En líneas generales los resultados son esperados, pues uno de los conceptos claves de las modificaciones de ClinGen-Rev fue reducir el potencial patogénico de diversas etiquetas de manera tal de no sobre-ponderar las

clasificaciones. Así, ClinGen-Rev se identifica mejor a las variantes benignas, de entre de las VUS o LP; que son las que podrían tener significación clínica para el caso. De esta manera, se facilita enormemente el trabajo de análisis, ya que las variantes benignas son usualmente descartadas de la priorización de manera automática al no poseer relevancia clínica.

Por otro lado, la observación de una fuerte disminución de las variantes clasificadas como patogénicas, implica la reducción de falsos positivos (variantes reportadas como patogénicas que no lo son).

Clasificación diferencial alcanzada por cada criterio de etiquetado: ACMG-2015 vs. ClinGen-Rev

Clasificación alcanzada por ClinGen-Rev Bening Pathogenic UncertainSignificance

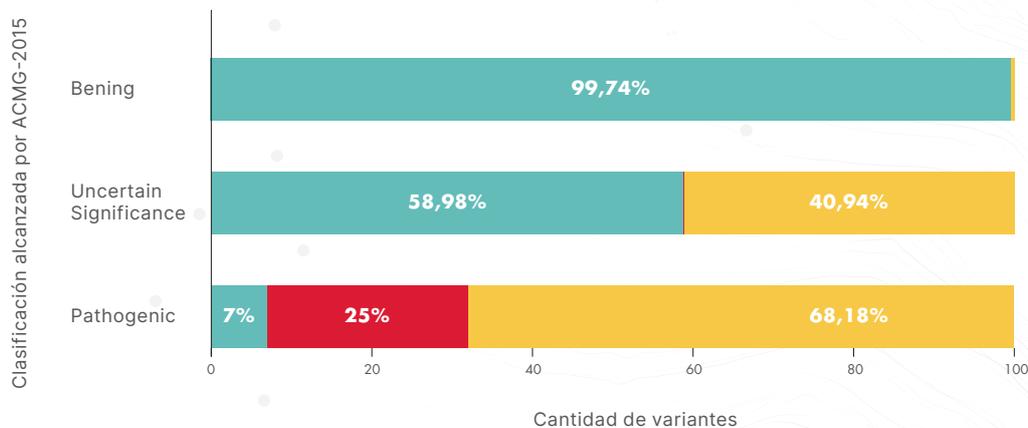
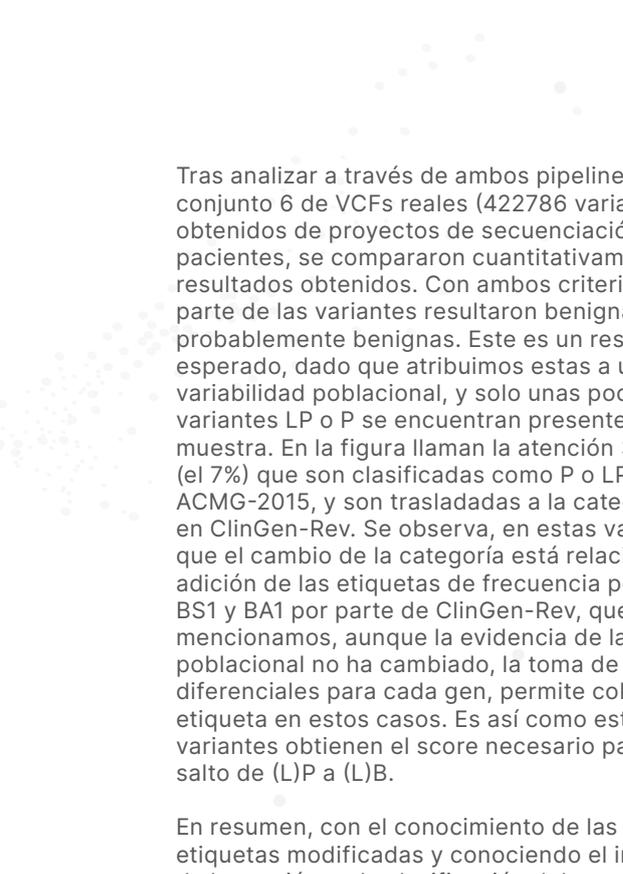


Figura 3: Análisis comparativo entre la performance en la clasificación automática entre los algoritmos de clasificación ClinGen-Rev vs ACMG-2015 en 6 de VCFs de pacientes reales.



Tras analizar a través de ambos pipelines un conjunto 6 de VCFs reales (422786 variantes) obtenidos de proyectos de secuenciación de pacientes, se compararon cuantitativamente los resultados obtenidos. Con ambos criterios la mayor parte de las variantes resultaron benignas o probablemente benignas. Este es un resultado esperado, dado que atribuimos estas a una variabilidad poblacional, y solo unas pocas variantes LP o P se encuentran presentes en cada muestra. En la figura llaman la atención 3 variantes (el 7%) que son clasificadas como P o LP según ACMG-2015, y son trasladadas a la categoría B o LB en ClinGen-Rev. Se observa, en estas variantes, que el cambio de la categoría está relacionado a la adición de las etiquetas de frecuencia poblacional BS1 y BA1 por parte de ClinGen-Rev, que como ya mencionamos, aunque la evidencia de la frecuencia poblacional no ha cambiado, la toma de umbrales diferenciales para cada gen, permite colocar la etiqueta en estos casos. Es así como estas variantes obtienen el score necesario para dar el salto de (L)P a (L)B.

En resumen, con el conocimiento de las principales etiquetas modificadas y conociendo el incremento de la presión en la clasificación del nuevo protocolo, se puede argumentar que la categorización de las variantes es más certera con

ClinGen-Rev. Nuevamente impresiona que, ClinGen-Rev vuelve las variantes un “poco más benignas”, reduciendo notoriamente la cantidad de variantes que son marcadas como patogénicas y VUS, en contraste con ACMG-2015. Hablar de un impacto del 7.97% de diferencia entre las categorizaciones alcanzadas por cada criterio resulta quizá poco. Sin embargo, implica una reducción de un 40% en variantes VUS y de un 68% de patogénicas, resultado muy valorable a la hora de tener que realizar la priorización, agilizando el proceso manual de curado de las mismas, y facilitando la llegada al diagnóstico final.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este análisis comparativo refuerzan nuestra convicción de que la innovación constante es fundamental para ofrecer diagnósticos genéticos de calidad. La implementación de ClinGen-Rev en nuestra práctica demuestra nuestro compromiso con la mejora continua y la adopción de las últimas tecnologías y metodologías en el campo de la genética médica. Nuestro objetivo es continuar en este desafío, no solo para beneficiar a nuestros pacientes, sino también para contribuir al avance en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades genéticas.