



UNIVERSIDAD DE  
**COSTA RICA**

Sistema de Estudios de Posgrado  
Posgrado en Especialidades en Microbiología  
Especialidad en Inmunología Clínica

**Diagnóstico molecular como herramienta para la  
intervención terapéutica oportuna de pacientes con  
enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas en  
Costa Rica.**

Trabajo Final de Investigación Aplicada sometido a la  
consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en  
Especialidades en Microbiología para optar por el grado y título  
de Especialista en Inmunología Clínica.

Andony Alexis Cordero Jiménez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica.

Junio, 2021

## **Dedicatoria**

A mi familia, quienes me han apoyado absolutamente en todas las decisiones y retos que he asumido hasta el día de hoy, para así continuar cumpliendo mis metas. Gracias por su amor incondicional, por ser el motor que impulsa mis sueños y por celebrar mis triunfos.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente me han impulsado a seguir dando lo mejor de mí en cada objetivo que me he planteado.

## **Agradecimientos**

A Dios por darme la oportunidad de vivir, la fortaleza para culminar una etapa más en mi vida y por permitirme seguir formándome académica y profesionalmente en lo que tanto me apasiona.

A mi Comité Asesor, Dr. Clas Allan Une, Dra. Laura Barzuna Venegas y Dra. Lucía Figueroa Protti, quienes con sus conocimientos me orientaron y apoyaron a través de cada una de las etapas de este proyecto de investigación.

**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA**

**ACTA-56-2021**

**Acta presentación de Requisito Trabajo Final de Graduación de Investigación**

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el viernes 25 de junio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **Andony Alexis Cordero Jiménez** carné # **B22010**, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Inmunología Clínica**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Lucía Figueroa Protti, Esp., quien preside, lectora, Laura Barzuna Venegas, MSc., lectora y Clas Une, PhD., tutor.

**ARTICULO 1**

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **“Diagnóstico molecular como herramienta para la intervención terapéutica oportuna de pacientes con enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas en Costa Rica”**.

**ARTICULO 2**

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

**ARTICULO 3**

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado  Reprobado

**ARTICULO 4**

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 17:08 horas.

<b>Nombre</b>	<b>No. Cédula</b>
<u>Lucía Figueroa Protti, Esp.</u> Quien preside	<u>1-1357-0278</u>
<u>Clas Une, PhD.</u>	<u>175200001011</u>
<u>Laura Barzuna Venegas, MSc.</u>	<u>1-0777-0951</u>
<u>Andony Alexis Cordero Jiménez</u> Estudiante	<u>1-1525-0371</u>

Observaciones: Mención de Honor

---

---

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

**Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones**

## Tabla de contenidos

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Resumen.....	vii
Lista de tablas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Capítulo 1.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Perspectiva histórica.....	2
1.1.2 Epidemiología.....	4
1.2 Marco referencial.....	6
1.2.1 Descripción de las enfermedades autoinflamatorias.....	6
1.2.1.1 Introducción y definición general.....	6
1.2.1.2 Clasificación general.....	7
1.2.1.3 Bases fisiopatológicas.....	8
1.2.2 Características clínicas de las enfermedades autoinflamatorias.....	10
1.2.2.1 Genotipo y patrón de herencia.....	10
1.2.2.2 Fenotipo clínico.....	11
1.2.2.3 Biomarcadores inflamatorios.....	11
1.2.3 Abordaje terapéutico de las enfermedades autoinflamatorias.....	12
1.2.3.1 Colchicina.....	12
1.2.3.2 Bloqueadores de IL-1.....	12
1.2.3.3 Agentes anti IL-6.....	12
Capítulo 2.....	13
2.1 Justificación.....	14
2.2 Problema de investigación.....	15

## Tabla de contenidos

<b>2.3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Objetivo general.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo 3</b>	<b>.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Marco metodológico.....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo 4</b>	<b>.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Fiebre Mediterránea Familiar.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2</b>	<b>Síndrome Periódico asociado al Receptor del TNF.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Deficiencia de Mevalonato Kinasa.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Síndromes Periódicos asociados a la Criopirina.....</b>	<b>42</b>
<b>Capítulo 5</b>	<b>.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Principales variantes patogénicas descritas para FMF.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2</b>	<b>Principales variantes patogénicas descritas para TRAPS.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3</b>	<b>Principales variantes patogénicas descritas para MKD/HIDS.....</b>	<b>64</b>
<b>5.4</b>	<b>Principales variantes patogénicas descritas para CAPS.....</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo 6</b>	<b>.....</b>	<b>74</b>
<b>6.1</b>	<b>Secuenciación de Sanger.....</b>	<b>75</b>
<b>6.2</b>	<b>Secuenciación de Nueva Generación.....</b>	<b>77</b>
<b>6.3</b>	<b>Aplicaciones de NGS: Secuenciación dirigida, secuenciación del exoma y del genoma completo .....</b>	<b>82</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas futuras.....</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>90</b>

## **Resumen**

El principal objetivo de este estudio es describir los métodos de diagnóstico molecular que permiten intervenciones terapéuticas oportunas de pacientes con enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas en Costa Rica.

Este es un grupo complejo de desórdenes genéticamente diversos, asociados a errores en vías de regulación de la inmunidad innata, que presentan actualmente poca difusión de su información clínica, inmunológica y genética en la comunidad médica y el personal de salud en general.

Por lo anterior, este estudio pretende servir como referencia de información biomédica actual para orientar al personal de salud de nuestro país para sospechar ante un fenotipo clínico congruente, y así orientar hacia un diagnóstico definitivo y un abordaje terapéutico oportuno a los pacientes con estas enfermedades autoinflamatorias, lo que impactaría positivamente en la calidad de vida de estos pacientes.

La investigación que se ha desarrollado es una revisión bibliográfica estructurada, para la cual se utilizaron revistas científicas indexadas y de alto impacto, así como motores de búsqueda académicos.

En síntesis, se describieron puntualmente aspectos relevantes de las enfermedades autoinflamatorias en estudio, como el fenotipo y hallazgos clínicos característicos, así como la patogénesis molecular subyacente, criterios de clasificación e intervenciones terapéuticas respaldadas por evidencia clínica y científica recientemente descrita.

Además, se determinaron detalladamente las principales variantes patogénicas descritas para las enfermedades autoinflamatorias monogénicas desarrolladas en esta investigación, así como su correlación con el fenotipo y potenciales implicaciones terapéuticas.

Finalmente, se describieron detalladamente los métodos moleculares más utilizados actualmente para el diagnóstico de estas enfermedades autoinflamatorias, como lo son la secuenciación de Sanger y las aplicaciones de la secuenciación de nueva generación, como la secuenciación dirigida por paneles de genes, secuenciación del exoma y del genoma completo.

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Criterios diagnósticos de Tel-Hashomer para FMF.....	25
<b>Tabla 2.</b> Criterios diagnósticos de Livneh para FMF.....	26
<b>Tabla 3.</b> Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la FMF .....	27
<b>Tabla 4.</b> Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la TRAPS.....	33
<b>Tabla 5.</b> Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la MKD/HIDS.....	40
<b>Tabla 6.</b> Manifestaciones clínicas de los subfenotipos de CAPS.....	44
<b>Tabla 7.</b> Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la CAPS. ....	47
<b>Tabla 8.</b> Otros criterios de clasificación y de diagnóstico para enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas.....	50
<b>Tabla 9.</b> Recomendaciones para el diagnóstico genético de FMF.....	57
<b>Tabla 10.</b> Variantes patogénicas asociadas a FMF registradas en la base de datos InFever.....	58
<b>Tabla 11.</b> Variantes patogénicas asociadas a TRAPS registradas en la base de datos InFever.....	63
<b>Tabla 12.</b> Variantes patogénicas asociadas a MKD/HIDS registradas en la base de datos de InFever.....	69
<b>Tabla 13.</b> Variantes patogénicas asociadas a CAPS registradas en la base de datos InFever.....	74



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Espectro de enfermedades inmunológicas con componentes de autoinflamación y autoinmunidad.....	7
<b>Figura 2.</b> Flujograma de la estrategia de selección de estudios para la revisión bibliográfica.....	19
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de variantes en el gen <i>MEFV</i> asociadas a FMF.....	58
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de variantes en el gen <i>TNFRSF1A</i> asociadas a TRAPS.....	63
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de variantes en el gen <i>MVK</i> asociadas tanto a MKD/HIDS como a AM.....	67
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de variantes en el gen <i>NLRP3</i> asociadas a CAPS.....	73

## **Lista de abreviaturas**

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

AD: Autosómico dominante

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AGS: Síndrome de Aicardi-Goutieres

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

AR: Autosómico recesivo

CAPS: Síndrome periódico asociado a la criopirina

CRD: Cysteine-rich domain

CRP: Proteína C Reactiva

CNV: Variaciones en el número de copias

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DFNA34: Deafness, autosomal dominant, 34, with or without inflammation

DMARD: Disease-modifying antirheumatic drugs

ddNTPS: Dideoxynucleótidos trifosfatos

dNTPS: Deoxynucleótidos trifosfatos

FMF: Fiebre Mediterránea Familiar

FPAPA: Fiebre periódica con adenopatía y faringitis

GOF: Gain-of-function

HGMD: Human Gene Mutation Database

HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee

IFN: Interferón

IL-18: Interleuquina 18

IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 beta

IL-6: Interleuquina 6

INDELS: Inserciones o deleciones

ISSAID: Sociedad Internacional para Enfermedades Autoinflamatorias Sistémicas

IUIS: Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas

LASID: Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LOF: Loss-of-function

LPS: Lipopolisacárido

miARNs: Micro ácido ribonucleicos

MKD: Deficiencia de mevalonato kinasa

MLPA: Multiplex ligation-dependent probe amplification

MRI: Magnetic resonance imaging

NF- $\kappa$ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NGS: Secuenciación de nueva generación

NLR: NOD-like receptor

NOMID: Enfermedad autoinflamatoria multisistémica de inicio neonatal

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PASD: Poroqueratosis actínica superficial diseminada

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLAD: Pre-Ligand Assembly Domain

preARNm: Pre ácido ribonucleico mensajero

proIL-18: Pro interleuquina 18

proIL-1 $\beta$ : Pro interleuquina 1 beta

PRES: Paediatric Rheumatology European Society

PRR: Receptores de reconocimiento de patrón

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RVCL: Leucodistrofia cerebral con vasculopatía retinal

SAA: Amiloide sérico A

SAVI: Vasculopatía de comienzo Infantil Asociada a STING

SJIA: Artritis idiopática juvenil sistémica

SMS: Síndrome de Singleton-Merten

SNV: Single Nucleotide Variant

SPENCD: Espondiloencondrodisplasia

sTNFR: Soluble tumor necrosis factor receptors

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TNF $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa

TRAPS: Síndrome periódico asociado al receptor de TNF

UPR: Unfolded protein response

VES: Velocidad de eritrosedimentación

VUS: Variant of Uncertain Significance

WES: Secuenciación del exoma completo

WES: Secuenciación del genoma completo



**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Andony Alexis Cordero Jiménez, con cédula de identidad 1-1525-0371, en mi condición de autor del TFG titulado Diagnóstico molecular como herramienta para la intervención terapéutica oportuna de pacientes con enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas en Costa Rica.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Andony Alexis Cordero Jiménez.

Número de Carné: B22010 Número de cédula: 1-1525-0371.

Correo Electrónico: andony.cordero@ucr.ac.cr.

Fecha: 01 de julio de 2021 Número de teléfono: \_\_\_\_\_.

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Clas Allan Une.

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

# **CAPÍTULO 1**

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Perspectiva histórica**

Las primeras descripciones en la literatura científica de posibles casos de pacientes con manifestaciones congruentes con enfermedades autoinflamatorias se remontan a inicios del siglo XX.

En 1908 se describe el caso de una adolescente judía de 16 años que sufría de ataques periódicos de fiebre recurrente y dolor abdominal, sin embargo, los investigadores lo asociaron con un síndrome metabólico y de predisposición a infecciones recurrentes (Janeway y Mosenthal, 1908).

Posteriormente, en 1945 se describen casos clínicos de pacientes con episodios recurrentes de fiebre y dolor abdominal y se sugirió el concepto de peritonitis paroxística benigna (Siegal, 1945) que correspondería posteriormente a lo que se conoce hoy como fiebre mediterránea familiar (FMF).

En 1948 se propone el concepto de síndrome de fiebres periódicas sin aún tener clara la etiopatogenia subyacente de las manifestaciones clínicas y las causas de su recurrencia y periodicidad (Reimann, 1948).

En 1987 se describen casos clínicos de pacientes pediátricos con episodios periódicos de fiebre recurrente, estomatitis aftosa y faringitis que se mantenían asintomáticos entre los periodos febriles, con crecimiento y desarrollo normal y que respondían muy bien al tratamiento con corticoesteroides, pero con una respuesta mínima o ausente a antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Marshall *et al.*, 1987), ya que estos fármacos tienen distintos mecanismos de acción y blancos terapéuticos.

No es sino hasta finales del siglo XX que se da el establecimiento de las enfermedades autoinflamatorias como un grupo definido de desórdenes clínicos, al identificarse las causas genéticas subyacentes de las enfermedades autoinflamatorias monogénicas de mayor prevalencia gracias al surgimiento y desarrollo de análisis genéticos (Moghaddas y Masters, 2018).

Inicialmente se utilizaron análisis de ligamiento genético junto con métodos como clonación posicional y mapeo de homocigosidad para la descripción de las primeras enfermedades autoinflamatorias monogénicas, métodos que eventualmente fueron reemplazados por técnicas moleculares novedosas (Hashkes *et al.*, 2019), de mayor precisión y menos laboriosas como la secuenciación de nueva generación (NGS) que ha sido utilizada desde el 2012 para la descripción de otras enfermedades autoinflamatorias (Moghaddas y Masters, 2018).

En 1997 dos grupos independientes identificaron variantes en el gen *MEFV* asociado a la fiebre mediterránea familiar (FMF) (The French FMF Consortium, 1997) y en 1999 se identifican variantes en el gen *TNFRSF1A* que codifica por el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus en inglés) relacionadas con el denominado síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS, por sus en inglés) (McDermott *et al.*, 1999).

Justamente en el estudio en el que se describe al TRAPS, los autores proponen la definición de enfermedades autoinflamatorias como “enfermedades caracterizadas por episodios inflamatorios aparentemente no provocados con ausencia de títulos altos de autoanticuerpos o linfocitos T antígeno-específicos” (McDermott *et al.*, 1999), definición que posteriormente se redefiniría para englobar y delimitar de mejor forma a las enfermedades autoinflamatorias.

En el periodo del 2001 a 2002 se identifican variantes en el gen *NLRP3* en pacientes con distintos fenotipos de Síndromes Periódicos Asociados a Criopirina (CAPS, por sus en inglés) y se describen estos fenotipos como nuevos miembros de la familia en expansión de las enfermedades autoinflamatorias (Hoffman *et al.*, 2001) (Aksentijevich *et al.*, 2002) (Feldman *et al.*, 2002).

En el 2006 se propone un modelo en el que se postula que la autoinmunidad y la autoinflamación son extremos opuestos en el espectro inmunológico de desregulación de la inmunidad innata y adaptativa, y que en medio de espectro inmunológico hay enfermedades en las que se traslapan características de estos extremos (McGonagle y McDermott, 2006).



La segunda década de la era de las enfermedades autoinflamatorias inicia en el 2009 con la propuesta de un esquema en la que se propone una clasificación fisiopatológica de las enfermedades autoinflamatorias desde un punto de vista molecular (Masters *et al.*, 2009).

En la última década ha incrementado significativamente la descripción de más enfermedades autoinflamatorias monogénicas gracias en gran medida a la revolución de tecnologías de secuenciación masiva que han permitido dilucidar la biología de desórdenes de la inmunidad innata.

### **1.1.2 Epidemiología**

Las enfermedades autoinflamatorias se consideran enfermedades raras, pues a nivel global tienen una baja incidencia. A pesar de ser enfermedades con un componente hereditario, los antecedentes familiares se presentan en tan solo aproximadamente un 10% de los casos (Aróstegui, 2010) lo que dificulta aún más el diagnóstico, por lo que en muchos casos los pacientes se suelen diagnosticar tardíamente en la infancia y en la adolescencia.

La FMF es la enfermedad autoinflamatoria de mayor prevalencia a nivel global, se ha reportado que presenta una mayor incidencia en poblaciones con ascendencia turca (1:1000-1:4000), judía no Askenazi (1:1000) y armenia (1:500) (Krainer *et al.*, 2020). Se estima que en judíos sefarditas y armenios la frecuencia poblacional de portadores heterocigotos es tan alta como 1:4 a 1:6 y que a nivel global hay aproximadamente 120 000 pacientes con FMF (Georgin-Lavialle *et al.*, 2019) (Hashkes *et al.*, 2019).

En cuanto a la epidemiología de CAPS se ha reportado a nivel global en todos los continentes, con una prevalencia estimada en Norteamérica y Europa de 1:300000 a 1:1000000 (Hashkes *et al.*, 2019). Particularmente en Francia se ha estimado una prevalencia de 1:360000 (Krainer *et al.*, 2020).

La enfermedad autoinflamatoria multisistémica de inicio neonatal (NOMID, por sus siglas en inglés), es el fenotipo más severo y menos común en el espectro de CAPS, y se ha propuesto que este fenotipo podría afectar la reproducción de los pacientes y transmisión de su enfermedad (Hashkes *et al.*, 2019).

Se estima que a nivel global hay unos 200 pacientes con deficiencia de mevalonato kinasa (MKD, por sus siglas en inglés), la mayoría de casos en Europa Occidental, especialmente en Holanda, Francia e Italia. Se ha visto que la mayoría de los pacientes con MKD son de origen caucásico y ambos sexos se ven afectados por igual (Hashkes *et al.*, 2019).

Particularmente en Holanda la prevalencia aproximada de MKD es de 5:1000000 y la frecuencia de portadores de variantes en el gen MVK es de 1:153, dado posiblemente por un efecto fundador (Gaggiano *et al.*, 2019) (Hashkes *et al.*, 2019)

Para TRAPS la prevalencia global se ha estimado en 1:1000000, la mayoría de los pacientes diagnosticados son de Europa, aunque también se han reportado casos de pacientes de Asia y África (Krainer *et al.*, 2020) (Gaggiano *et al.*, 2019).

En los últimos 20 años se han incluido más de 40 entidades clínicas al grupo de enfermedades autoinflamatorias por la Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas (IUIS, por sus siglas en inglés) y la Sociedad Internacional para Enfermedades Autoinflamatorias Sistémicas (ASSAID, por sus siglas en inglés) (Moghaddas, 2019).

La Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID, por sus siglas en inglés) ha registrado casos de enfermedades autoinflamatorias gracias a la contribución de 174 instituciones de 18 países de la región. Al mes de mayo de 2021, se han registrado 12 casos de FMF, 5 casos de MKD, 3 casos de TRAPS y 3 casos de CAPS en América Latina (LASID, 2021).

Cabe resaltar que en el contexto de Costa Rica a la fecha no se han reportado casos de enfermedades autoinflamatorias, pero dada la globalización y la alta migración de poblaciones que se da hoy en día no sería raro tener portadores e incluso pacientes con enfermedades autoinflamatorias en nuestro país, pero que dada su baja frecuencia y dificultad diagnóstica podrían pasar desapercibidos para el sistema de salud.

## **1.2 Marco referencial**

### **1.2.1 Descripción de las enfermedades autoinflamatorias**

#### **1.2.1.1 Introducción y definición general**

La inmunidad innata representa un sistema ancestral de defensa que ha coevolucionado con los microorganismos y sus funciones principales incluyen la eliminación de patógenos, remoción de células dañadas, iniciación de la reparación tisular, así como la activación y regulación de respuestas inmunes adaptativas. Las respuestas inmunes innatas median los signos cardinales de la inflamación: rubor, calor, dolor y edema (Efthimiou *et al.*, 2019).

Los receptores de reconocimiento de patrón (PRR, por sus en inglés) permiten la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus en inglés) que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ , por sus en inglés) e interferón (IFN) tipo I, que son citoquinas que reclutan y activan células inmunes efectoras como neutrófilos y macrófagos, que en la mayoría de casos logran eliminar el patógeno y la resolución de la inflamación, lo que representa uno de los primeros mecanismos fisiológicos de defensa a agentes perjudiciales.

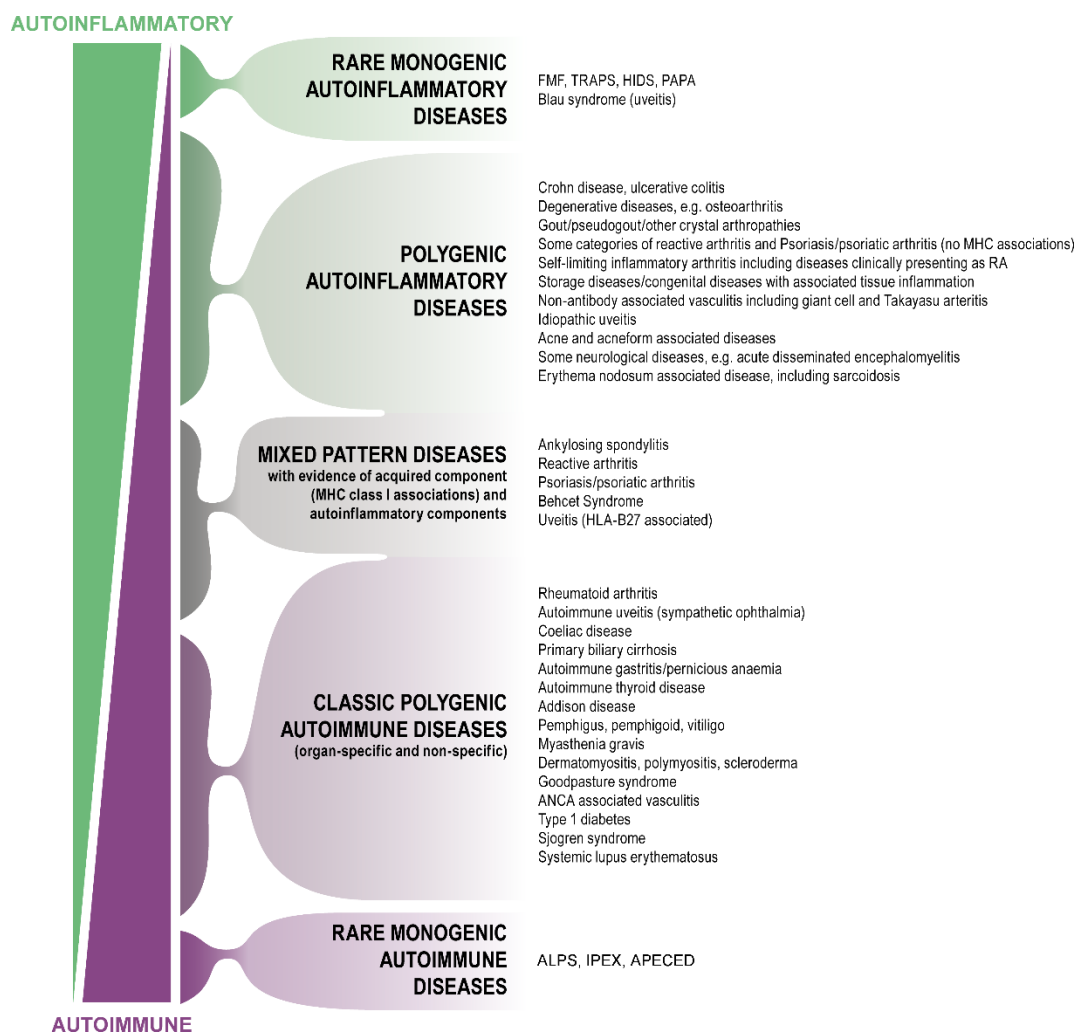
Por el contrario, la autoinflamación representa una respuesta inadecuada de la inmunidad innata por errores innatos en distintos componentes que llevan a una activación inmunológica caótica y espontánea asociada a una producción incrementada de citoquinas proinflamatorias, que causan las manifestaciones sistémicas y órgano-específicas observadas en enfermedades autoinflamatorias (Efthimiou *et al.*, 2019).

Las enfermedades autoinflamatorias sistémicas se pueden definir entonces como un grupo complejo de desórdenes genéticamente diversos y clínicamente similares, que se presentan con episodios inflamatorios agudos como consecuencia de la desregulación de distintos elementos de la inmunidad innata (Krainer *et al.*, 2020).

El campo emergente de las enfermedades autoinflamatorias se estableció recientemente y está en continua expansión, en gran medida debido a avances vertiginosos en análisis genéticos y en la profunda comprensión de aspectos inmunológicos que han permitido identificar las bases moleculares de distintos desórdenes de la inmunidad innata.

### 1.2.1.2 Clasificación general

Actualmente distintos grupos de investigación han propuesto diversos modelos para la clasificación de las enfermedades autoinflamatorias. Recientemente se ha propuesto modelos de clasificación de enfermedades inmunológicas que incluye enfermedades autoinmunes en un extremo y autoinflamatorias en el extremo opuesto (McGonagle y McDermott, 2006).



**Figura 1.** Espectro de enfermedades inmunológicas con componentes de autoinflamación y autoinmunidad. Tomado de McGonagle y McDermott, 2006

También se han propuesto clasificaciones en el contexto de las citoquinas implicadas en la enfermedad, como IL-1 $\beta$ /IL-18 y su contraparte IFN tipo I, involucradas en la patogénesis de la desregulación inmune, así como modelos basados en la ganancia o pérdida de función por variantes en componentes de la inmunidad innata (Efthimiou *et al.*, 2019).

Una de las clasificaciones más utilizadas en la literatura divide el grupo de las enfermedades autoinflamatorias según los genes involucrados en enfermedades autoinflamatorias monogénicas y en enfermedades autoinflamatorias poligénicas.

Las fiebres recurrentes hereditarias (FMF, CAPS, TRAPS y MKD) son un subgrupo reconocido históricamente que pertenece a la clasificación de enfermedades autoinflamatorias monogénicas, en el modelo de citoquinas se clasifican como enfermedades mediadas por IL-1 $\beta$ /IL-18 y en el espectro inmunológico están en el extremo de autoinflamación.

Por otra parte, las enfermedades autoinflamatorias poligénicas son enfermedades complejas de etiología multifactorial. La patogénesis de muchas de estas enfermedades aún no está totalmente esclarecida, ejemplo de estas enfermedades son la enfermedad de Behçet, la fiebre periódica con adenopatía y faringitis (FPAPA, por sus siglas en inglés) y la artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA, por sus siglas en inglés) (Krainer *et al.*, 2020).

### **1.2.1.3 Bases fisiopatológicas**

Las enfermedades autoinflamatorias se pueden agrupar según su mecanismo fisiopatológico en inflamomasopatías, desórdenes de plegamiento de proteínas de la inmunidad innata, reopatías e interferenopatías (Krainer *et al.*, 2020)

Los inflamomas son complejos multiproteicos que funcionan como plataforma molecular para el ensamblaje de caspasas activadoras de precursores de citoquinas, como prointerleuquina 1 beta (proIL-1 $\beta$ ) y prointerleuquina 18 (proIL-18), y de la gasdermina D, que media un tipo de muerte celular programada conocida como piroptosis (Lucherini *et al.*, 2018).

Las inflamomasopatías incluyen enfermedades como FMF, CAPS y MKD. Se presentan por variantes patogénicas en receptores intracelulares que inducen una activación incrementada del inflamoma que lleva a un aumento de citoquinas proinflamatorias (Georgin-Lavialle *et al.*, 2018).

En los desórdenes de mal plegamiento de proteínas se tienen enfermedades como espondiloartropatías y TRAPS, esta última se da por variantes en el receptor TNFRSF1A, que resultan en una desregulación estructural importante de enlaces disulfuro, esto deriva en una acumulación intracelular de dichos receptores que subsecuentemente inducen estrés celular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y alteración de la autofagia (Krainer *et al.*, 2020).

Las relopáticas agrupan a las enfermedades autoinflamatorias causadas por una activación inapropiada del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés), que es un importante regulador de múltiples vías inmunológicas, como la generación de respuestas inflamatorias y en este grupo se incluyen enfermedades como haploinsuficiencia A20, deficiencia de HOIL-1L/HOIP, haploinsuficiencia p65 y variantes bialélicas de RIPK1 (Kacar *et al.*, 2019).

Las interferenopatías son un grupo heterogéneo de enfermedades autoinflamatorias en las que se da una activación excesiva de IFN tipo I, que se produce por reconocimiento de nucleótidos a nivel intracelular por moléculas de la inmunidad innata como cGAS, STING, RIG-1 y MDA5. La respuesta inflamatoria por IFN tipo I es regulada por proteínas como TREX1, SAMHD1 y ARNasa H2 (Efthimiou *et al.*, 2019).

Variantes genéticas en estas moléculas sensoras y reguladoras puede llevar a enfermedades como vasculopatía de comienzo infantil asociada a STING (SAVI, por sus siglas en inglés), leucodistrofia cerebral con vasculopatía retinal (RVCL, por sus siglas en inglés), síndrome de Singleton Merten (SMS, por sus siglas en inglés), síndrome de Aicardi-Goutieres (AGS, por sus siglas en inglés) y espondiloencondrodisplasia (SPENCD, por sus siglas en inglés) (Efthimiou *et al.*, 2019).

## 1.2.2 Características clínicas de las enfermedades autoinflamatorias

### 1.2.2.1 Genotipo y patrón de herencia

Actualmente se tienen identificadas las regiones cromosómicas en las que se localizan los genes asociados a enfermedades autoinflamatorias como FMF, CAPS, TRAPS y MKD, que corresponden a los genes *MEFV*, *NLRP3*, *TNFSFR1A* y *MVK*, respectivamente, por lo que se clasifican como enfermedades genéticamente definidas (Gül, 2018) (Lucherini *et al.*, 2018).

Asimismo, se tienen identificadas las proteínas para las que codifican estos genes, la vía inmunológica asociada a las distintas variantes patogénicas que generan pérdida o ganancia de su función y su implicación en la patogénesis. (Krainer *et al.*, 2020) (Hashkes *et al.*, 2019).

Para las distintas enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas se tienen identificados los exones en los que se presentan más frecuentemente las variantes patogénicas asociadas con el fenotipo clínico, así como variantes con distinto significado clínico, lo que tiene valor diagnóstico para el desarrollo e implementación de técnicas moleculares para el estudio específico del exoma implicado (Efthimiou, 2019) (Marino *et al.*, 2020).

Se han descrito también los patrones de herencia de estas enfermedades autoinflamatorias y se tienen tanto patrones de herencia autosómicos recesivos (AR) en el caso de FMF y MKD, así como autosómicos dominantes (AD) como es el caso de CAPS y TRAPS, lo cual puede ser de utilidad en la sospecha clínica de los pacientes con fenotipos congruentes (Marino *et al.*, 2020).

Además, se han descrito pacientes con variantes somáticas en distintos genes asociados a enfermedades autoinflamatorias, en los que solo una fracción de sus células presentan la variante patogénica; lo que se conoce como mosaicismo genético (Georgin-Lavialle *et al.*, 2018) (Lucherini *et al.*, 2018).

### **1.2.2.2 Fenotipo clínico general**

La edad de inicio de la sintomatología en los pacientes con enfermedades autoinflamatorias monogénicas suele ser en la infancia, con fiebre recurrente como la manifestación más prevalente. Se ha descrito que existe una expresión clínica diferencial dependiente del sitio de la variante en el gen implicado para ciertas enfermedades autoinflamatorias monogénicas (Georgin-Lavialle *et al.*, 2018).

La edad de aparición de los síntomas es variable para las distintas enfermedades autoinflamatorias, así como la duración de la fase activa y la periodicidad con la que se presentan, lo que puede orientar la sospecha clínica y un posterior diagnóstico. Algunas manifestaciones comunes son la serositis, dolor abdominal y rash (Kacar *et al.*, 2019).

### **1.2.2.3 Biomarcadores inflamatorios**

La determinación de biomarcadores inflamatorios puede resultar en una herramienta de utilidad clínica para el monitoreo de la actividad de las enfermedades autoinflamatorias durante su fase de activación de la inmunidad innata. Se ha descrito que la determinación de biomarcadores inflamatorios puede ser clínicamente relevante en el seguimiento de la respuesta terapéutica de los pacientes (Hashkes *et al.*, 2019) (Efthimiou *et al.*, 2019).

En las enfermedades autoinflamatorias, los reactantes de fase aguda están generalmente elevados durante la fase de actividad sistémica, como por ejemplo la proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), amiloide sérico A (SAA, por sus siglas en inglés), ferritina, proteínas S100 y velocidad de eritrosedimentación (VES). El hemograma completo puede presentar hallazgos como leucocitosis leve, neutrofilia, linfopenia, eosinopenia y trombocitosis; y los niveles de complemento pueden estar normales o elevados (Hashkes *et al.*, 2019) (Efthimiou *et al.*, 2019).



### **1.2.3 Abordaje terapéutico de las enfermedades autoinflamatorias**

#### **1.2.3.1 Colchicina**

La colchicina es un alcaloide obtenido originalmente de la planta *Colchicum autumnale* que inicialmente se recomendó para el tratamiento de la gota. Se ha utilizado para condiciones inflamatorias como cirrosis biliar primaria, hepatitis alcohólica, psoriasis y amiloidosis.

El mecanismo de acción más probable se ha sugerido que es dado por interacción con el citoesqueleto celular, al unirse a la tubulina que forma los microtúbulos, lo que afecta la división celular, transducción de señales, expresión génica y migración celular, lo que en última instancia resulta en una disminución de la inflamación (Hashkes *et al.*, 2019).

#### **1.2.3.2 Bloqueadores de IL-1**

La IL-1 $\beta$  es probablemente una de las citoquinas con mayor actividad proinflamatoria. En las enfermedades autoinflamatorias es relevante tanto en la patogénesis como en las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes en los episodios inflamatorios. Por ello se han desarrollado distintos agentes para bloquear la vía de la IL-1, como receptores antagonistas y anticuerpos monoclonales que difieren en su mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica, pero con resultados clínicos similares (Hashkes *et al.*, 2019).

#### **1.2.3.3 Agentes anti IL-6**

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que es secretada por distintas células inmunes y no inmunes como células endoteliales y fibroblastos. La señalización intracelular derivada de la IL-6 está implicada en diversas funciones celulares como proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis, inducción de reactantes de fase aguda como la CRP y el SAA (Hashkes *et al.*, 2019).

La intervención terapéutica con bloqueadores de IL-6 se ha realizado sobre todo en pacientes con enfermedades autoinflamatorias que han sido refractarias a otras estrategias terapéuticas y se ha descrito que puede ser clínicamente útil en pacientes con amiloidosis (Hashkes *et al.*, 2019).

## **CAPÍTULO 2**

## 2.1 Justificación

Las enfermedades autoinflamatorias son un grupo complejo de desórdenes genéticamente diversos asociados a errores en vías celulares y moleculares que regulan distintas respuestas inflamatorias, y que se presentan usualmente sin una etiología infecciosa, neoplásica o autoinmune subyacente.

Las enfermedades autoinflamatorias monogénicas se presentan con una baja incidencia y prevalencia a nivel global, por lo que se consideran enfermedades raras. Sin embargo, dentro de este grupo de enfermedades sobresale un subgrupo históricamente conocido como síndromes febriles periódicos o enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas, que presentan una mayor prevalencia respecto a los otros miembros de este grupo de enfermedades.

Dado los recientes avances en novedosos métodos de diagnóstico molecular ha sido posible dilucidar nuevos mecanismos moleculares y vías de señalización que han permitido describir la patogénesis de distintas enfermedades autoinflamatorias. Sin embargo, frecuentemente las herramientas disponibles en los laboratorios clínicos no son capaces de realizar un diagnóstico definitivo y de ahí la relevancia de conocer los principales análisis genéticos disponibles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de estas enfermedades.

Actualmente en nuestro país hay un potencial subregistro de pacientes con autoinflamatorias monogénicas clásicas, pues no se han reportado diagnósticos de casos incluso cuando existen sospechas clínicas congruentes con el genotipo asociado, lo que podría implicar repercusiones clínicas en la sobrevida de estos pacientes o en la progresión de su enfermedad, al no ser abordados correctamente desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico.

Por lo anterior, esta investigación documental pretende recopilar información mediante una revisión bibliográfica en revistas indexadas de alto impacto con el fin de poder determinar las principales variantes patogénicas y mejores herramientas moleculares diagnósticas y de seguimiento que se proponen en la actualidad, para que sirva como referencia de información biomédica actual y así los clínicos de nuestro país puedan dar un correcto abordaje diagnóstico y posterior abordaje terapéutico de potenciales pacientes con enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas.

## **2.2 Problema de investigación**

Descripción de métodos de diagnóstico molecular actuales que permiten intervenciones terapéuticas oportunas de pacientes con enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas en Costa Rica.

### **2.3.1 Objetivo general**

Describir los métodos de diagnóstico molecular actuales que permiten intervenciones terapéuticas oportunas de pacientes con enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas en Costa Rica.

### **2.3.2 Objetivos específicos**

- 2.3.2.1 Describir las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas.
- 2.3.2.2 Identificar las principales variantes patogénicas descritas para las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas.
- 2.3.2.3 Detallar los métodos moleculares más utilizados actualmente para el diagnóstico de las enfermedades autoinflamatorias clásicas monogénicas.

## **CAPÍTULO 3**

### **3.1 Marco metodológico**

#### **Tipo de estudio**

El tipo de estudio de esta investigación es una revisión bibliográfica.

#### **Criterios de inclusión**

Se incluirán estudios publicados en revistas con revisión por pares, tesis de posgrado, libros de texto sobre el tema, meta-análisis y revisiones sistemáticas, publicados del año 2010 al 2020, realizados en seres humanos y publicados en los idiomas español e inglés.

#### **Criterios de exclusión**

Se excluirán resúmenes de congresos, cartas al editor, artículos de opinión, prepublicaciones y revistas no indexadas, así como estudios en modelos animales y líneas celulares, estudios duplicados y sin el resumen disponible.

#### **Recolección de datos**

Los estudios y datos utilizados para esta revisión se extraerán de las siguientes bases de datos: PubMed, ScienceDirect y Medline; además de los siguientes motores de búsqueda: Google Scholar y la herramienta de búsqueda MeSH.

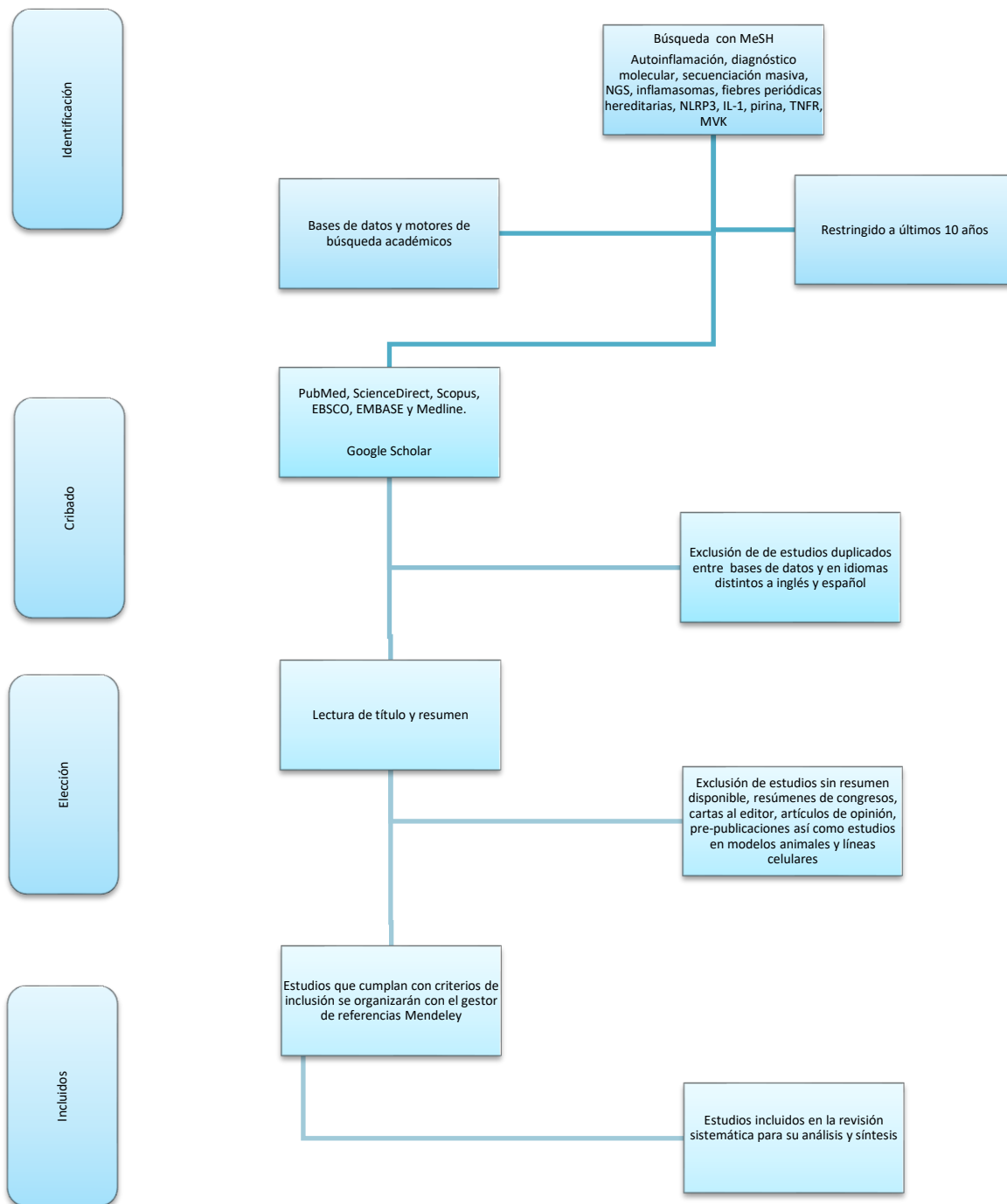
#### **Metodología**

Se realizará una búsqueda bibliográfica estructurada en las bases de datos y con los motores de búsqueda académicos seleccionados. Se usarán palabras claves relacionadas con el tema de investigación como: autoinflamación, diagnóstico molecular, secuenciación masiva, NGS, secuenciación de Sanger, inflamomas, fiebres periódicas hereditarias, NLRP3, IL-1, pirina, TNFR1A, MVK, MEFV, MKD, HIDS, TRAPS, TNFRSF1A, variantes patogénicas.

Se realizará una lectura crítica de títulos y resúmenes para seleccionar aquellas publicaciones que se ajusten a los criterios de selección establecidos. Los estudios seleccionados se organizarán con el gestor de referencias Mendeley y con el software de ofimática Microsoft Excel.

### **Análisis de información**

Se analizará la información para realizar una síntesis de los aspectos más relevantes para este estudio como lo son las vías fisiopatológicas, clínica, variantes patogénicas, genes implicados y métodos actuales de diagnóstico molecular de las enfermedades autoinflamatorias, para discutir la información disponible y dar recomendaciones sobre los métodos moleculares diagnósticos más oportunos que se pueden utilizar en Costa Rica para un abordaje terapéutico temprano de los pacientes con enfermedades autoinflamatorias.



**Figura 2.** Flujograma de la estrategia de selección de estudios para la revisión bibliográfica.



## **CAPÍTULO 4**

#### **4. Descripción las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas.**

Las enfermedades autoinflamatorias monogénicas comprenden un grupo heterogéneo de desórdenes hereditarios, genéticamente determinados por disfunción en moléculas reguladoras de la inmunidad innata, que se presentan clínicamente con episodios recurrentes de inflamación generalizada, sin evidencia de procesos infecciosos, autoinmunes o de malignidad; y que generalmente tienen un inicio temprano durante la infancia (Federici *et al.*, 2012) (Montealegre *et al.*, 2013) (Migita *et al.*, 2018). Además, se caracterizan por presentar un patrón de herencia mendeliano dado por variaciones de penetrancia variable en un único gen (Touitou *et al.*, 2013) (Martorana *et al.*, 2017).

A diferencia de las inmunodeficiencias primarias clásicas, que se dan por respuestas inmunes defectuosas, y de las enfermedades autoinmunes, que se dan por alteraciones celulares y/o humorales de la respuesta inmune adaptativa, las enfermedades autoinflamatorias se dan por defectos en genes que codifican por proteínas que regulan directa o indirectamente la respuesta inmune innata y que ocasionan activaciones constitutivas y producción continua de mediadores proinflamatorios (Touitou *et al.*, 2013) (Russo y Brogan, 2014) (Beck y Aksentijevich, 2019).

Concretamente, las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas corresponden al grupo históricamente conocido como fiebres periódicas hereditarias, y que se caracterizan clínicamente por presentarse en la infancia con episodios febriles recurrentes y poliserositis (Sarrabay *et al.*, 2015). Además, este subgrupo acoge a las enfermedades autoinflamatorias de mayor prevalencia, que fueron las primeras en ser recientemente descritas (del año 1999 a 2001), como lo son FMF, TRAPS, MKD y CAPS (Manthiram *et al.*, 2017).

## 4.1 Fiebre Mediterránea Familiar (FMF)

### 4.1.1 Fenotipo clínico

En 1997, dos grupos independientes identificaron el gen mutado en esta enfermedad, designado como gen *MEFV*, que codifica por el elemento del inflammasoma denominado pirina/marenostrina/TRIM20 (Migita *et al.*, 2018). La FMF corresponde a la enfermedad autoinflamatoria monogénica más común y que globalmente afecta a más de 100 mil personas, afectando principalmente poblaciones mediterráneas (Montealegre *et al.*, 2013) (Skendros *et al.*, 2019).

Aproximadamente, el 70% de los pacientes con FMF tienen un inicio de la enfermedad antes de los 5 años y hasta un 90% antes de los 20 años. Clínicamente, se caracteriza por episodios febriles que van generalmente de 12 hasta 72 horas, que se presentan con manifestaciones inflamatorias como: serositis, pleuritis, peritonitis, sinovitis, rash, artritis monoarticular, artralgiyas y eritemas similares a erisipela en miembros inferiores (Federici *et al.*, 2012) (Montealegre *et al.*, 2013).

Se han propuesto 3 fenotipos clínicos para la FMF: a) tipo 1, fenotipo asociado con episodios inflamatorios recurrentes de corta duración y serositis; b) tipo 2, en el que se presenta amiloidosis secundaria como manifestación clínica en pacientes previamente asintomáticos; y c) tipo 3 en el que se presenta homocigosis o heterocigosis compuesta silente, pues presentan variantes patogénicas bialélicas en el gen *MEFV* sin signos ni síntomas clínicos o elevación de reactantes de fase aguda (Shohat y Halpern, 2011) (Soriano y Manna, 2012).

Generalmente, solo un órgano es afectado durante un ataque inflamatorio, siendo el peritoneo el primariamente afectado, por lo que muchas veces ante un primer ataque con dolor abdominal agudo no es raro que se plantee la sospecha clínica de apendicitis aguda o peritonitis (Georgin-Lavialle *et al.*, 2019).

Se ha evidenciado que los ataques agudos pueden resolver espontáneamente, que recurren periódicamente con intervalos libres de sintomatología entre los episodios agudos, además que se presentan sin una periodicidad determinada y con una frecuencia ampliamente variable de un paciente a otro, incluso en distintos periodos de la vida del mismo paciente (Georgin-Lavialle *et al.*, 2019).

Asimismo, los ataques inflamatorios se suelen presentar con elevaciones de reactantes de fase aguda, por lo que es usual hallazgos como leucocitosis, trombocitosis, neutrofilia, elevación de CRP, SAA, fibrinógeno e inmunoglobulinas (Schnappauf *et al.*, 2019) (Efthimiou, *et al.*, 2020).

Se ha descrito que algunos factores pueden ser detonantes de los ataques inflamatorios como estrés, infecciones virales o incluso algunos fármacos. En algunos pacientes, se ha documentado inflamación subclínica persistente, que deriva en un mayor riesgo de desarrollar complicaciones como amiloidosis secundaria, que es la secuela clínica más seria para estos pacientes (Migita *et al.*, 2018) (Skendros *et al.*, 2019).

#### 4.1.2 Complicaciones secundarias a la FMF

La amiloidosis se puede dar como consecuencia de la elevación de reactantes de fase aguda, propiamente por el SAA, que se puede depositar extracelularmente como material amiloide insoluble principalmente a nivel renal, aunque también en muchos otros órganos como bazo, glándulas suprarrenales, tiroides, pulmón y tracto gastrointestinal (Efthimiou, *et al.*, 2020).

Dado que la presentación clínica de la amiloidosis es principalmente renal e incluso si el paciente no recibe tratamiento podría progresar potencialmente desde proteinuria hasta fallo renal, se sugiere el seguimiento periódico de estos pacientes con indicadores tempranos de función renal, como microalbuminuria (Hashkes *et al.*, 2019) (Havnaer y Han, 2019) (Efthimiou, *et al.*, 2020).

#### 4.1.3 Criterios clínicos y de laboratorio para la clasificación para FMF

A finales de la década de 1990, con el objetivo de establecer criterios para el diagnóstico de FMF, se analizaron las características y manifestaciones clínicas de mayor prevalencia en pacientes con FMF. Por ello, en ese entonces se planteó lo que se conoce como los criterios de Tel-Hashomer (Tabla 1), que establecen un “diagnóstico definitivo de FMF” al presentarse dos o más criterios mayores, o al presentarse un criterio mayor más dos criterios menores. Además, se establece un “diagnóstico probable de FMF” en caso de presentarse un criterio mayor más un criterio menor (Bashardoust, 2015)

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de Tel-Hashomer para FMF. Adaptado de Bashardoust, 2015.

<b>Criterios mayores</b>	<p>Episodios febriles con peritonitis, sinovitis o pleuritis.</p> <p>Amiloidosis de tipo AA sin una enfermedad predisponente.</p> <p>Respuesta favorable al tratamiento con colchicina.</p>
<b>Criterios menores</b>	<p>Episodios febriles recurrentes.</p> <p>Eritema similar a erisipela.</p> <p>Antecedentes familiares de FMF en primer grado de consanguinidad.</p>

Además, se propusieron también los criterios de Livneh (Tabla 2), que planteaba un diagnóstico definitivo al presentarse al menos un criterio mayor o dos criterios menores. Asimismo, se sugería que los ataques típicos debían incluir ciertas características como: recurrencia ( $\geq 3$  o más episodios), cuadros febriles ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) y ser de corta duración (12 a 72 h) (Bashardoust, 2015).

Los ataques incompletos, que también son recurrentes, se planteaban que diferían de los ataques típicos en una o dos de las siguientes características: temperatura  $< 38^{\circ}\text{C}$ , menor o mayor duración de los ataques, ausencia de peritonitis durante los ataques, ataques abdominales localizados y artritis en otros sitios distintos a cadera, rodillas o tobillos (Bashardoust, 2015).

**Tabla 2.** Criterios diagnósticos simplificados de Livneh para FMF. Adaptado de Bashardoust, 2015.

<b>Criterios mayores</b>	Ataques típicos de: Peritonitis generalizada Pleuritis unilateral o pericarditis Monoartritis (rodilla, tobillo, cadera) Fiebre aislada Ataques abdominales incompletos
<b>Criterios menores</b>	Ataques incompletos que afectan a uno o más de los siguientes: Tórax Articulaciones Dolor en extremidades inferiores con el esfuerzo Respuesta favorable a la colchicina

Recientemente, se identificaron las características clínicas más importantes reportadas por los médicos que abordan las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas (Tabla 3), con el objetivo de establecer nuevos criterios de clasificación y así estimar un score basado en evidencia según la relevancia diagnóstica de los hallazgos, dado que actualmente no existe un consenso de la forma de combinar criterios clínicos, análisis de laboratorio y análisis genéticos (Federici *et al.*, 2019).

**Tabla 3.** Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la FMF.

Adaptado de Federici et al., 2019

<b>Variable</b>	<b>Score promedio</b>
Patrón clásico de fiebre recurrente	8,2
Variantes genéticas en el gen <i>MEFV</i>	7,5
Duración de los ataques inflamatorios de 1 a 3 días	7,5
Respuesta al tratamiento con colchicina	6,5
Etnia (población turca, árabe, armenia, kurda y judía)	6,5
Serositis	6,1
Incrementos de los reactantes de fase aguda y SAA durante episodios febriles	6,1
Amiloidosis	5,9
Dolor abdominal	5,5
Episodios inflamatorios autolimitados	5,2
Bienestar entre episodios agudos	5,2
Antecedentes familiares	5,0
Dolor en el pecho	4,3
Rash similar a erisipela	4,2
Artritis	3,9
Artralgia	3,3

#### 4.1.4 Intervenciones terapéuticas

En la mayoría de los pacientes con FMF el abordaje terapéutico de los ataques inflamatorios se logra satisfactoriamente con administración de colchicina, que previene los ataques inflamatorios y que generalmente es bien tolerado. En el caso de pacientes con resistencia o intolerancia a colchicina (10-15% pacientes con FMF), la intervención terapéutica se basa en inhibidores de IL-1 $\beta$ , con medicamentos biológicos efectivos y seguros como Anakinra y Canakinumab. Se sugiere continuar con la administración con colchicina al recibir la terapia biológica, pues se desconoce si estos últimos previenen la amiloidosis (Hashkes *et al.*, 2019) (Havnaer y Han, 2019).

#### 4.1.5 Patogénesis molecular de la FMF

##### 4.1.5.1 Estructura, función y regulación de la pirina

La pirina es una proteína que se expresa en células inmunes, principalmente en neutrófilos, y en menor medida, en monocitos y células dendríticas. Su expresión puede ser exacerbada por varios estímulos inflamatorios como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y LPS (lipopolisacárido) (Heilig y Broz, 2018).

Estructuralmente, la pirina está compuesta por 5 dominios funcionales: el dominio PYD, el dominio B-box, el dominio CC, el factor de transcripción básico bZIP y el dominio B30.2; que juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria y en muerte celular (Lucherini *et al.*, 2018).

Funcionalmente, la pirina se vincula principalmente con el ensamblaje de inflamomas, que son complejos multiproteicos que inducen respuestas inflamatorias y están formados por proteínas sensoras, proteínas adaptadoras y que sirven de plataforma para la activación de proteínas efectoras como procaspasas, que en su forma madura son proteínas inductoras de muerte celular y activadoras de pro-interleuquinas (Heilig y Broz, 2018).

La evidencia actual apunta a que la pirina, en su función de PRR a nivel citosólico, reconoce de forma indirecta modificaciones en Rho GTPasas inducidas por ciertas toxinas bacterianas, lo que deriva en la activación del inflamoma pirina y, consecuentemente, en un incremento de la secreción de IL-1 $\beta$  (Migita *et al.*, 2018).

Las Rho GTPasas son proteínas G monoméricas que regulan distintas vías de señalización intracelulares. En condiciones fisiológicas, las Rho GTPasas activan las serin-treonin kinasas denominadas PKN1 y PKN2, que a su vez inducen la fosforilación de los residuos de pirina Ser-208 y Ser-242. Esta fosforilación permite la interacción con la proteína reguladora llamada 14-3-3, y esto inhibe finalmente la formación del inflamoma pirina, por lo que este mecanismo actúa como bloqueo molecular de la activación de este inflamoma (Park *et al.*, 2016) (Schnappauf *et al.*, 2019).



La inactivación de Rho GTPasas representa un importante mecanismo de patogenicidad bacteriano, puesto que impide la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto de las células afectadas, y con ello inhibe funciones celulares trascendentales para la respuesta inmunológica, como lo son la migración leucocitaria, fagocitosis y degranulación (Oda y Kastner, 2017).

#### 4.1.4.2 Inmunopatología de la FMF

El inflammasoma pirina se ensambla espontáneamente a su forma activa cuando presenta variantes patogénicas o en respuesta a ciertas toxinas bacterianas, lo que deriva en un incremento de la producción de IL-1 $\beta$ . Las variantes asociadas a FMF inhiben la interacción de la pirina con las quinasas PKN1/PKN2, lo que disminuye su fosforilación y posterior unión a la proteína reguladora 14-3-3 (Aksentijevich y McDermott, 2017).

Estructuralmente, la región N-terminal de la pirina posee un dominio PYD, que media la interacción homotípica con el dominio PYD de la proteína adaptadora ASC, que a su vez induce la oligomerización de la proteína ASC en largos filamentos helicoidales (Hashkes *et al.*, 2019).

Posteriormente, se da el reclutamiento de la pro-caspasa-1, que a través de su dominio CARD interactúa con el dominio CARD de la ASC y se da un agrupamiento de las moléculas pro-caspasas. Este agrupamiento induce la actividad caspasa por autoproteólisis, lo que consecuentemente estimula la formación del tetrámero p10/p20 de la caspasa-1, que finalmente madura a la pro-IL-1 $\beta$  y la pro-IL-18 a su forma bioactiva para mediar sus funciones proinflamatorias (Schnappauf *et al.*, 2019).

Las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 son importantes moléculas iniciadoras y amplificadoras potentes de respuestas inmunes innatas y promueven distintos procesos fisiológicos e inmunológicos como fiebre, hematopoyesis, quimiotaxis, activación leucocitaria y producción de inmunoglobulinas (Schnappauf *et al.*, 2019).

Se han postulado distintas hipótesis sobre la forma en la que el dominio B30.2 en la región C-terminal mantiene a la pirina en un estado inactivo, dado que es en este dominio donde se localizan las variantes patogénicas más importantes.

El dominio B30.2 podría actuar como una plataforma molecular, que permite la interacción de las kinasas PKN1/PKN2 o la proteína 14-3-3, otra hipótesis es que este dominio es necesario para una conformación proteica determinada que mantiene a la pirina en un estado autoinhibitorio, por lo que las variantes patogénicas interferirían con estos posibles mecanismos de regulación (Schnappauf *et al.*, 2019).

Otro mecanismo inflamatorio importante mediado por el inflamasoma pirina en FMF es la activación proteolítica de la gasdermina D (GSDMD) por la caspasa-1, esto ocasiona que el dominio N-terminal (GSDMD<sub>N</sub>) se separe del dominio inhibitorio C-terminal (GSDMD<sub>C</sub>) (Schnappauf *et al.*, 2019).

Consecuentemente, el dominio GSDMD<sub>N</sub> oligomeriza y se inserta en la membrana plasmática formando poros, con pérdida de la integridad y lisis celular. Además, se ha visto en modelos murinos que la piroptosis es primordial para la secreción de IL-1 $\beta$ , la producción de citoquinas proinflamatorias y la neutrofilia que se observa en pacientes con FMF (Kanneganti *et al.*, 2018).

Recientemente, se ha planteado que el inflamasoma NLRP3 también está implicado en la sobreproducción de IL-1 $\beta$  en pacientes con FMF, puesto que se ha postula que la unión de la pirina con la proteína adaptadora ASC es capaz de inhibir el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 (Lucherini *et al.*, 2018).

Dado que las variantes en el gen *MEFV* implican una actividad alterada de la pirina, consecuentemente esto deriva en una mayor activación del inflamasoma NLRP3, lo que igualmente promovería la secreción de citoquinas proinflamatorios como IL-1 $\beta$  y la inducción de piroptosis (Skendros *et al.*, 2019).

En síntesis, los pacientes con FMF presentan una activación constitutiva del inflamasoma pirina, que en última instancia promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias y la inducción de muerte celular por piroptosis, lo cual media las manifestaciones de inflamación sistémica observadas en estos pacientes.

Dada la poca restricción étnica y geográfica de las variantes en *MEFV*, la posibilidad de un efecto fundador es limitada, en contraste, se ha planteado que estas variantes genéticas podrían representar una ventaja selectiva posiblemente por presión patogénica para las poblaciones afectadas (Stoffels y Kastner, 2016) (Heilig y Broz, 2018), puesto que estas variantes incrementan la actividad del inflammasoma y esto explicaría la alta tasa de heterocigotas en dichas poblaciones.

Se ha descrito que las variantes genéticas podrían conferir una ventaja evolutiva por resistencia a microorganismos patógenos endémicos y a sus toxinas como *Clostridium*, *Yersinia*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Burkholderia*, *Histophilus somni* y otros microorganismos que alteran las enzimas Rho GTPasas (Martorana *et al.*, 2017).

Interesantemente, a pesar de que la FMF es una enfermedad autoinflamatoria monogénica, se ha planteado que ciertos factores epigenéticos, ambientales e incluso la microbiota del paciente podrían influenciar la expresión fenotípica de la enfermedad (Migita *et al.*, 2018).

## 4.2 Síndrome Periódico Asociado al Receptor del TNF (TRAPS)

### 4.2.1 Fenotipo clínico

TRAPS es una enfermedad autoinflamatoria monogénica que se da como consecuencia de defectos genéticos en el gen *TNFRSF1A*, que codifica por el receptor 1A del TNF- $\alpha$  (TNFR1A, por sus siglas en inglés). Inicialmente, fue descrita como una entidad clínica propia de poblaciones de origen irlandés y escocés, por ello esta enfermedad fue descrita inicialmente como Fiebre Hiberniana Familiar, no obstante, hoy en día se sabe que se presenta en distintas poblaciones con frecuencias similares (Federici *et al.*, 2012) (Havnaer y Han, 2019).

Clínicamente, el TRAPS se presenta con ataques inflamatorios que se presentan generalmente en la infancia y la adolescencia (la edad promedio de inicio de los síntomas es 4 años), con episodios febriles de una duración de 1-3 semanas (14 días de duración en promedio) y con manifestaciones como fiebre, mialgias, artralgias, peritonitis, rash, dolor abdominal y de pecho; y manifestaciones oculares como edema periorbital y conjuntivitis recurrente, y raras veces uveítis (Ozen, 2019) (Havnaer y Han, 2019).

Característicamente, los pacientes con TRAPS pueden presentar rash pseudo-celulítico con lesiones en piel eritematosas, edematosas, con bordes irregulares, de tamaño variable y con un curso migratorio, que se presentan generalmente en extremidades inferiores, superiores y en pecho. Estas lesiones suelen presentarse con mialgias focales dolorosas, que es otra de las manifestaciones particulares de los episodios inflamatorios de los pacientes con TRAPS (Federici *et al.*, 2012).

Los estudios radiológicos y patológicos pueden apoyar el diagnóstico clínico de pacientes con TRAPS, como por ejemplo Imágenes por Resonancia Magnética (MRI, por sus siglas en inglés) en las que se puede observar edema muscular segmental y en biopsias de tejido muscular se puede evidenciar fascitis monocítica (Montealegre *et al.*, 2013), mientras que en biopsias cutáneas es posible encontrar infiltrados linfocíticos y depósitos perivasculares de complemento en dermis papilar (Hashkes *et al.*, 2020).

Durante episodios agudos están elevados los marcadores inflamatorios (neutrofilia, trombocitosis, VES, CRP, SAA, haptoglobina y fibrinógeno) y generalmente se mantienen incrementados incluso entre los ataques inflamatorios, lo que sugiere un nivel basal elevado de actividad inflamatoria en pacientes con TRAPS (Hashkes *et al.*, 2020). En casos de pacientes no tratados, se puede tener anemia por enfermedad crónica con hipergammaglobulinemia policlonal.

#### 4.2.2 Criterios de clasificación clínicos y de laboratorio para TRAPS

Para TRAPS, también se han propuesto recientemente criterios de clasificación clínicos y de laboratorio que eventualmente pueden orientar al clínico para el abordaje diagnóstico y terapéutico de estos pacientes.

**Tabla 4.** Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la TRAPS. Adaptado de Federici *et al.*, 2019

<b>Variable</b>	<b>Score promedio</b>
Variantes genéticas en el gen TNFRSF1A	8,6
Episodios febriles prolongados y recurrentes	8,6
Episodios febriles irregulares y de larga duración	8,2
Ataques inflamatorios de 1-3 semanas de duración	8,1
Fiebre por más de 7 días	7,3
Rash maculopapular doloroso	6,8
Fascitis monocítica	6,7
Incrementos de los reactantes de fase aguda y SAA durante episodios febriles	6,5
Mialgia intensa localizada	5,9
Antecedentes familiares	5,9
Edema periorbital	5,2
Rash migratorio	4,7
Mialgia	4,5
Dolor abdominal	4,4
Conjuntivitis	4,3
Rash	4,0
Artralgia	3,7

### 4.2.3 Intervenciones terapéuticas

El abordaje terapéutico consiste en la administración de corticoesteroides, que puede disminuir la severidad del episodio inflamatorio, en tanto que la colchicina ha demostrado no ser efectiva en prevenir ataques inflamatorios ni amiloidosis, que igualmente es la complicación más seria a largo plazo, pero históricamente con una incidencia mucho menor que en FMF (Georgin-Lavialle *et al.*, 2019).

Además, se ha reportado que el uso de bloqueadores biológicos de IL-1 $\beta$  ha resultado clínicamente efectivo en algunos pacientes, como Canakinumab y Anakinra.

En los fenotipos severos, los ataques inflamatorios son persistentes y también requieren el uso de AINEs. Además, se han logrado respuestas clínicas favorables, aunque parciales en muchos pacientes, mediante el bloqueo de TNF- $\alpha$  con inhibidores biológicos como Etanercept, que es una proteína de fusión recombinante que bloquea la acción del TNF- $\alpha$  (Federici *et al.*, 2012) (Havnaer y Han, 2019).

Por otro lado, no se recomienda el uso de anticuerpos monoclonales anti-TNF, como Infliximab, pues se han registrado reacciones inflamatorias severas en estos pacientes, mientras que se han logrado beneficios terapéuticos con terapia biológica contra la IL-1 $\beta$  (Moghaddas, 2020).

### 4.2.4 Patogénesis molecular del TRAPS

#### 4.2.4.1 Estructura y función del receptor de TNF- $\alpha$

La proteína TNFR1A (también conocida como p55/CD120a), es una proteína de 55 kDa miembro de la superfamilia de receptores de TNF que están involucrados en distintas funciones como supervivencia celular, apoptosis, inflamación y regulación de respuesta inmune. TNFR1A se expresa constitutivamente en la superficie celular de la mayoría de tejidos, y estructuralmente se caracteriza por poseer 3 dominios funcionales: una porción extracelular, una región transmembrana y un dominio intracelular DD para transducción de señales por vías como NF- $\kappa$ B y JNK (Lucherini *et al.*, 2018).

El receptor TNFR1A posee un péptido señal de 29 aminoácidos en la región N-terminal, un dominio extracelular (aminoácidos 30-211), región transmembrana (aminoácidos 212-232) y un dominio citoplasmático en la región C-terminal (aminoácidos 233-455) que incluye un dominio de la muerte (aminoácidos 356-441) (Cudrici *et al.*, 2020).

Estructuralmente, el TNFR1A presenta un ectodominio con dominios ricos en cisteína (CRD, por sus siglas en inglés) que son particularmente importantes para la patogénesis del TRAPS: CRD1, CDR2, CRD3 y CRD4; que están asociados en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares y puentes de hidrógeno relevantes para el correcto plegamiento y conformación tridimensional de la proteína (Efthimiou *et al.*, 2019).

Se han asociado fenotipos severos de la enfermedad con interferencias estructurales en enlaces disulfuro específicos del dominio CRD2 como C88Y; o en la estabilización de puentes de hidrógeno altamente conservados en el dominio CRD1 como T50M/K (Aksentijevich y Kastner, 2011) (Hashkes *et al.*, 2020).

#### 4.2.4.2 Inmunopatología del TRAPS

La patogénesis molecular del TRAPS es compleja e involucra múltiples mecanismos alternativos celulares no excluyentes y posiblemente convergentes, dada la complejidad de las vías de señalización asociadas al TNF (Hashkes *et al.*, 2020). Se ha reportado que para la expresión fenotípica de la enfermedad se requiere de la coexpresión del TNFR1 mutado, el cual desencadena los procesos inflamatorios a nivel intracelular, y del TNFR1 salvaje (*wild-type*), que se sugiere que amplifica la señalización inflamatoria en la superficie celular (Aksentijevich *et al.*, 2011) (Hashkes *et al.*, 2020).

Inicialmente, se planteaba que la patogénesis del TRAPS se basaba en que las variantes patogénicas bloqueaban el corte proteolítico mediado por metaloproteasas del TNFR1A tras la unión con su ligando TNF, lo que genera una señalización proinflamatoria constitutiva. Dichas variantes evitarían también la secreción del receptor soluble de TNF (sTNFR, por sus siglas en inglés) que actúa como receptor neutralizante del TNF- $\alpha$  (Manthiram *et al.*, 2017), pero se ha documentado que este mecanismo patogénico no está universalmente presente en los pacientes con TRAPS.

Actualmente, se sugiere un modelo ligando independiente en el que las variantes patogénicas en el gen *TNFRSF1A* generan un mal plegamiento del TNFR1A, lo que produce una desregulación de la proteostasis, que se refiere a los mecanismos dinámicos que regulan un proteoma funcional, al controlar la biogénesis, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas (Martinon y Aksentijevich, 2014).

Dichas variantes patogénicas en *TNFRSF1A* involucran principalmente alteraciones en los dominios CRD de la porción extracelular del TNFR1A, que son sumamente importantes para el correcto plegamiento de la proteína, y que por ello estas variantes inducen una alteración de la oligomerización y acumulación intracelular del TNFR1A a nivel de retículo endoplasmático (RE); y parece ser que este mecanismo tiene un papel protagónico en la patogénesis de los pacientes con TRAPS (Martinon y Aksentijevich, 2014) (Lucherini *et al.*, 2018).

Se ha descrito que en pacientes con TRAPS la acumulación intracelular del TNFR1A promueve la activación de la vía del NF- $\kappa$ B, producción de ROS y de citoquinas proinflamatorias, que lleva a las manifestaciones autoinflamatorias que presentan los pacientes (Havnaer y Han, 2019). Incluso, se ha demostrado *in vitro* que a nivel epigenético se induce una sobreexpresión de miARNs asociados con regulación de procesos inflamatorios (Lucherini *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha propuesto que el TNFR1A a nivel de RE y en el contexto de estrés celular, está involucrado directamente en la activación de vías de señalización proinflamatorias, pues se ha reportado que el TNFR1A se puede asociar con endoribonucleasas como IRE1, para estimular la activación dependiente de ROS de kinasas como JNK y MAPK, que promueven la transcripción de mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF (Montealegre *et al.*, 2013) (Martinon y Aksentijevich, 2014).

Recientemente, se han realizado estudios que proponen que la acumulación de TNFR1A se da tanto por defectos en autofagia como una sobreexpresión del gen *TNFRSF1A* (Marino *et al.*, 2020). Además, en diversos estudios se han abordado otros potenciales mecanismos patogénicos, como autofagia defectuosa del TNFR1A, incremento de la producción de ROS mitocondrial, activación del inflammasoma NLRP3, retención del TNFR1A en agregados con reducción de la expresión en la superficie celular y alteración de la apoptosis (Moghaddas y Masters, 2018).



Otros mecanismos patogénicos propuestos como consecuencia de la acumulación intracelular del TNFR1A es la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), que incrementa la síntesis de chaperonas para mejorar el tráfico de proteínas mutadas del RE y disminuir la traducción de proteínas, y si esto no logra disminuir el estrés celular a nivel de RE, la célula entra en muerte celular programada (Hashkes *et al.*, 2020).

Se han propuesto respuestas independientes de la UPR clásica, ya que como resultado de las variantes en TNFR1A se incrementa la actividad de otras moléculas como XBP1 y PERK. Estas moléculas regulan la expresión de genes asociados a mecanismos inflamatorios y pueden disminuir el umbral de activación de la inmunidad innata, por síntesis de citoquinas, producción de ROS e hiperreactividad a LPS, lo que globalmente se presenta como respuestas celulares inapropiadas que llevan al fenotipo autoinflamatorio asociado a TRAPS (Dickie *et al.*, 2012).

### 4.3 Deficiencia de Mevalonato Kinasa (MKD)

#### 4.3.1 Fenotipo clínico

MKD es una enfermedad autoinflamatoria monogénica descrita en 1999 por dos grupos independientes, que inicialmente se postulaba que se manifestaba en poblaciones holandesas y que actualmente se sabe que se presenta en muchas otras poblaciones (Russo y Brogan, 2013). La MKD se da por defectos genéticos en el gen *MVK*, que codifica por la enzima mevalonato kinasa, involucrada en un paso temprano de la biosíntesis del colesterol e isoprenoides (Aksentijevich, 2011) (Havnaer y Han, 2019).

Clínicamente, el fenotipo HIDS se presenta en la infancia, usualmente antes del año de edad, con episodios febriles recurrentes con una duración de 3-7 días y que se presentan cada 4-8 semanas, con manifestaciones como dolor abdominal con vómitos y diarrea, poliartralgias, artritis, linfadenopatía cervical, hepatoesplenomegalia, rash eritematoso maculopapular similares a urticaria, estomatitis aftosa y ulceraciones genitales (Havnaer y Han, 2019) (Schnappauf *et al.*, 2019).

Característicamente, el primer episodio de la enfermedad suele ser desencadenada por vacunación, traumas físicos menores, infecciones, cirugías o estrés. Muchos pacientes con MKD presentan niveles elevados de IgD, concomitantemente con niveles elevados de IgA (Federici *et al.*, 2012), sin embargo, esto también puede presentarse en FMF y TRAPS, por lo que niveles de IgD elevados no son específicos de MKD/HIDS (Georgin-Lavialle *et al.*, 2019).

Inclusive, los pacientes con MKD/HIDS pueden presentar niveles normales de IgD, por lo tanto, esto reafirma que su determinación tiene escasa utilidad diagnóstica dada su baja especificidad diagnóstica y la ausencia de correlación con la severidad de la enfermedad, a diferencia de la determinación de ácido mevalónico urinario, que se ha documentado que tiene mayor utilidad diagnóstica (Moghaddas, 2018) (Krainer *et al.*, 2020).

Durante los episodios inflamatorios se da elevación de reactantes de fase aguda como VES, CRP, SAA, neutrofilia, así como niveles altos de ácido mevalónico urinario (Schappauf *et al.*, 2019). La sintomatología tiende a ser más leve conforme avanza la edad del paciente, aunque muchos pacientes pueden seguir presentando episodios febriles frecuentes en la adultez y rara veces amiloidosis secundaria (Russo y Brogan, 2013).

Se tienen dos posibles fenotipos para variantes en el gen *MVK*, la forma leve y autoinflamatoria referida como Síndrome de Hiper IgD (HIDS, por sus siglas en inglés) que se da por deficiencia parcial de la enzima *MVK*, con actividad enzimática <10% por alteración de la estabilidad de la proteína (Beck y Aksentjevich, 2019).

Por otro lado, la deficiencia enzimática prácticamente total de *MVK* (0,1% respecto a controles normales) causa un fenotipo muy severo conocido aciduria mevalónica (AM) (Russo y Brogan, 2013), que es un error congénito del metabolismo. Generalmente este fenotipo es fatal pues ocasiona una enzima truncada, que se manifiesta con un fenotipo similar a HIDS, pero que además se presenta con retraso psicomotor, rasgos dismórficos, ataxia progresiva, miopatía, uveítis e hipotonía (Moghaddas, 2018).

Interesantemente, se ha descrito en ciertas poblaciones de origen chino, una enfermedad fenotípicamente distinta también mediada por variantes en el gen *MVK*, pero con un modo de herencia AD, denominada poroqueratosis actínica superficial diseminada (PASD) (OMIM #175900) (Manthiram *et al.*, 2017).

#### 4.3.2 Criterios de clasificación clínicos y de laboratorio para MKD/HIDS

Para MKD/HIDS, también se han propuesto recientemente criterios de clasificación clínicos y de laboratorio que eventualmente pueden orientar al clínico para el abordaje diagnóstico y terapéutico de estos pacientes.

**Tabla 5.** Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la MKD/HIDS. Adaptado de Federici et al., 2019

<b>Variable</b>	<b>Score promedio</b>
Variantes genéticas en el gen MVK	8,7
Inicio de la enfermedad (< 1 año de edad)	8,1
Duración de los ataques inflamatorios (3-7 días)	6,7
Actividad enzimática de la MVK	6,7
Aumento del ácido mevalónico urinario durante los ataques inflamatorios	6,5
Presencia de factores desencadenantes (vacunación, infección, traumatismo menor o cirugía)	6,2
Inicio de la enfermedad (<2 años de edad)	6,1
Incrementos de los reactantes de fase aguda y SAA durante episodios febriles	5,8
Aumento de los niveles de IgD	5,6
Manifestaciones gastrointestinales	5,4
Ataques inflamatorios autolimitados	4,8
Linfadenopatía (generalmente dolorosa)	4,8
Rash maculopapular	4,5
Adenopatías cervicales	4,4
Dolor abdominal	4,1
Diarrea	4,1
Aftas orales	3,8

#### 4.3.3 Intervenciones terapéuticas

Actualmente, no existe una terapia estándar establecida para el abordaje de MKD/HIDS. Los Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés) como la ciclofosfamida, azatioprina, tacrolimus y metotrexato no han demostrado eficacia terapéutica, así como los AINEs y la colchicina (Efthimiou *et al.*, 2019).

Inicialmente, se sugería el uso de estatinas dado que regulan los niveles de colesterol e isoprenoides, no obstante, resultaron ser clínicamente no efectivos en pacientes con MKD/HIDS (Montealegre *et al.*, 2013).

Se ha sugerido que el uso de agentes bloqueadores de IL-1 es la terapia más efectiva en el abordaje de la MKD/HIDS (Hashkes *et al.*, 2019), como Anakinra que es efectivo en pacientes con un MKD/HIDS crónico y con complicaciones a largo plazo, mientras que el Canakinumab ha mostrado lograr mejorías de los episodios febriles y en ciertos casos logra remisión completa.

Se ha documentado que el uso de agentes bloqueadores de TNF como el Etanercept, disminuye la actividad de la enfermedad y en muchos casos puede ayudar a alcanzar la remisión completa (Efthimiou *et al.*, 2019). Generalmente, los episodios febriles responden a la administración de corticoesteroides, sin embargo, se requiere aumentar la dosis conforme progresa la enfermedad (Krainer *et al.*, 2020).

Además, se ha demostrado *in vitro* que la administración de geranigeranil pirofosfato o ácido mevalónico puede revertir el fenotipo de MKD/HIDS (Henderson y Goldbach-Mansky, 2010), y que la colchicina no es terapéuticamente útil en pacientes con MKD/HIDS dado que es incapaz de activar Rho GTPasas que no estén localizadas en la membrana celular (Park *et al.*, 2016).

#### 4.3.4 Inmunopatología de la MKD

La patogénesis molecular de MKD/HIDS aún es parcialmente comprendida, así como la asociación de los defectos metabólicos que dan lugar a las manifestaciones clínicas e inmunológicas, puesto que el fenotipo es altamente variable (Hashkes *et al.*, 2020).

Inicialmente, se planteó la hipótesis de que las patogénesis y manifestaciones inflamatorias asociadas a MKD/HIDS estaban mediadas por los altos niveles de ácido mevalónico (Federici *et al.*, 2012).

Incluso, en estudios recientes se ha observado que excesos de mevalonato a nivel intracelular pueden inducir fenotipos inflamatorios en células inmunes como monocitos, mediados por reprogramación funcional a nivel epigénético que se conoce con el concepto de inmunidad innata entrenada, que llevan a un estado de síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  (Hashkes *et al.*, 2020).

No obstante, estudios posteriores demostraron que la disminución de isoprenoides, más que el incremento de ácido mevalónico, juega un papel más protagónico en la patogénesis de la MKD/HIDS (Moghaddas, 2018).

La enzima mevalonato kinasa se expresa a nivel citoplasmático en todas las células nucleadas del organismo. Las variantes en el gen *MVK* implican una disminución de la actividad enzimática y en consecuencia de la biosíntesis de isoprenoides como farnesil, geranil y ubiquinona, que se han asociado con diversos procesos celulares como degradación proteica y apoptosis (Efthimiou *et al.*, 2019).

Se ha descrito que los bajos niveles de isoprenoides desencadenan una desregulación por alteración de la prenilación de GTPasas monoméricas, como Ras, Rac y RhoA. La ausencia de isoprenilación de RhoA GTPasas bloquea la activación de estas moléculas, que consecuentemente deriva en la activación constitutiva del inflamasoma pirina con producción incrementada de IL-1 $\beta$  (Heilig y Broz, 2018).

La función fisiológica de la enzima *MVK* es catalizar la conversión ATP-dependiente de ácido mevalónico a 5-fosfomevalonato, y regula los niveles de otros intermediarios como el geranilgeranil pirofosfato, que es un isoprenoide no esteroideo necesario para la modificación post-traduccional lipídica denominada isoprenilación, dada su capacidad de unirse covalentemente a proteínas (Heilig y Broz, 2018).

A través de la modificación por isoprenilación se da la regulación de GTPasas monoméricas como las Rho GTPasas, que para su activación deben translocarse del citosol a la membrana celular, este tráfico celular y función biológica es directamente dependiente de la modificación por dicha isoprenilación (Schnappauf *et al.*, 2019).

Como se explicó anteriormente en el capítulo de FMF, las Rho GTPasas inhiben indirectamente al inflamasoma pirina al activar a PKNs, que fosforilan a la molécula pirina, lo que permite la unión con la proteína reguladora 14-3-3, que a su vez bloquea el ensamblaje del inflamasoma pirina y la producción de citoquinas proinflamatorias.

Además, se ha descrito que la prenilación por geranilgeranilación es importante para la activación inducida por TLR de kinasas como PI3K, por interacción con otras GTPasas monoméricas como Kras (Heilig y Broz, 2018).

Se ha observado que la alteración de la activación enzimática de PI3K resulta en una activación constitutiva de la pirina, pues en condiciones fisiológicas la señalización dada por PI3K-AKT mantiene al inflamasoma pirina en un estado de inhibición (Manthiram *et al.*, 2017) (Schnappauf *et al.*, 2019). Asimismo, la alteración de la señalización por PI3K-AKT desencadena la activación vía de transcripción del NF- $\kappa$ B (Hashkes *et al.*, 2020).

## **4.4 Síndromes Periódicos Asociados a la Criopirina**

### 4.4.1 Fenotipo clínico

Los Síndromes Periódicos Asociados a Criopirina (CAPS), conocidos también como criopirinopatías, agrupan tres subfenotipos que incluyen ciertas características clínicas únicas y también características compartidas.

En orden ascendente de severidad, estas formas clínicas se conocen como Síndrome Autoinflamatorio Familiar inducido por Frío (FCAS, por sus siglas en inglés); Síndrome de Muckle-Wells (MWS, por sus siglas en inglés) y la Enfermedad Autoinflamatoria Multisistémica de Inicio Neonatal (NOMID, por sus siglas en inglés) que es conocida también como Síndrome Crónico, Infantil, Neurológico, Cutáneo y Articular (CINCA, por sus siglas en inglés).

Se ha descrito que los pacientes con CAPS pueden presentar un traslape en los signos y síntomas que se manifiestan en estas formas clínicas, por ejemplo, cabe resaltar que el exantema urticariforme de inicio temprano es una de las características principales en todos los subfenotipos (Fingerhutová *et al.*, 2019).

Actualmente, se plantea que existe un espectro clínico de CAPS con distintos grados de severidad, más que tres distintos subfenotipos definidos (Efthimiou *et al.*, 2019). A pesar de lo anterior, la descripción de fenotipos tiene utilidad clínica dada las diferencias en la severidad de la enfermedad como el daño a órganos a corto y largo plazo, que derivan en una distinta intensidad del abordaje terapéutico (Hashkes, *et al.*, 2019).

**Tabla 6.** Manifestaciones clínicas de los subfenotipos de CAPS. Adaptado de Hashkes *et al.*, 2019.

	Fenotipo leve		Fenotipo moderado		Fenotipo severo	
	FCAS		MWS		NOMID/CINCA	
Edad de inicio	Infancia-adultez		Infancia temprana-adultez		Perinatal	
Manifestaciones	Inflamación aguda	Daño crónico	Inflamación aguda	Daño crónico	Inflamación aguda	Daño crónico
Inflamación sistémica	Fiebre y elevación de reactantes de fase aguda	Amiloidosis poco común (2%)	Fiebre y elevación de reactantes de fase aguda	Amiloidosis hasta en 25% de casos	Fiebre, hepatoespleno megalia, linfadenopatía, elevación de reactantes de fase aguda	Amiloidosis en pacientes sin intervención terapéutica
Dermatológicas	Urticaria neutrofílica inducida por frío	N/A	Urticaria neutrofílica	N/A	Urticaria neutrofílica	N/A
Oculares	Conjuntivitis	N/A	Conjuntivitis episcleritis, papiledema	Opacificación corneal	Conjuntivitis, uveítis, papiledema	Papiledema crónico, atrofia óptica que resulta en amaurosis progresiva, opacificación corneal
Auditivas	N/A	N/A	Edema coclear	Pérdida auditiva progresiva neurosensorial	Edema coclear	Pérdida auditiva progresiva neurosensorial
SNC	Cefalea	N/A	Cefalea, meningitis intermitente	N/A	Cefalea, meningitis crónica aséptica	Presión intracraneal elevada, encefalomegalia, atrofia cerebral y daño cognitivo
Musculo-esqueléticas	Mialgia y artralgia	N/A	Mialgia, artralgia y oligoartritis	N/A	Mialgia, artralgia y artritis	Artritis crónica, sobrecrecimiento óseo epifiseal, discrepancia en longitud de extremidades



#### 4.4.2 Síndrome Autoinflamatorio Familiar inducido por Frío (FCAS)

FCAS fue descrito inicialmente en 1940, corresponde a la forma clínica más leve y con pronóstico más favorable de los subfenotipos del CAPS. Se puede presentar con ciertas características clínicas distintivas como exantema urticariforme inducido por frío, con placas eritematosas y fiebre acompañada frecuentemente de escalofríos y conjuntivitis (Kuemmerle-Deschner, 2015). Además, los pacientes con FCAS presentan compromiso muscular y articular, con dolor en las extremidades y mialgia, mientras que la amiloidosis es infrecuente (Sánchez *et al.*, 2016).

Se han descrito otros factores desencadenantes de episodios inflamatorios en pacientes con FCAS, como exposición al aire, inmersión en agua y cambios bruscos de temperatura. La sintomatología se da tras 10 minutos a 8 horas después de la exposición, con una duración aproximada de hasta 3 días (Sánchez *et al.*, 2016).

En el diagnóstico diferencial se debe considerar la urticaria por frío adquirida, que es autolimitada, esporádica y las biopsias de piel muestran un infiltrado con predominio de eosinófilos y linfocitos, mientras que en FCAS el infiltrado muestra predominio dado por neutrófilos (Sánchez *et al.*, 2016).

#### 4.4.3 Síndrome de Muckle-Wells (MWS)

MWS fue descrito inicialmente en 1962 y corresponde al subfenotipo clínico de CAPS que se manifiesta con severidad moderada. Frecuentemente, los pacientes con MWS presentan fiebre, cefalea, dolor abdominal, artralgia y mialgia, con compromiso mono u oligoarticular a nivel de rodillas, tobillos y muñecas, ocasionalmente con edema periarticular doloroso (Kuemmerle-Deschner, 2015) (Tran, 2017). Los episodios inflamatorios suelen tener una duración aproximada de 2-5 días, con una frecuencia anual de 6-8 episodios (Sánchez-Segura, *et al.*, 2016).

Además, los pacientes con MWS y NOMID/CINCA pueden presentar pérdida progresiva neurosensorial secundaria a inflamación crónica y atrofia del nervio coclear que lleva a la degeneración de estructuras sensoriales (Sánchez *et al.*, 2016). Inicialmente, se presenta con afectación sensorial de frecuencias altas y posteriormente afectación progresiva de frecuencias bajas, por lo que esta alteración auditiva podría no ser reconocida hasta que se establezca un daño irreversible (Fingerhutová *et al.*, 2019) (Efthimiou *et al.*, 2019).

A nivel oftalmológico, en MWS se puede presentar conjuntivitis mientras que otras alteraciones como uveítis y epiescleritis se presentan en formas clínicas severas de CAPS (Tran, 2017). Se ha descrito que la severidad de la forma clínica no predice asociación con amiloidosis, de hecho, los pacientes con MWS se asocian con un riesgo elevado de amiloidosis sistémica, que se puede presentar con daño renal y síndrome nefrótico por depósito amiloide (Fingerhutová *et al.*, 2019).

#### 4.4.4 Enfermedad Autoinflamatoria Multisistémica de Inicio Neonatal/Síndrome Crónico, Infantil, Neurológico, Cutáneo y Articular (NOMID/CINCA)

NOMID/CINCA fue descrita inicialmente en 1982, corresponde al subtipo de mayor severidad del CAPS, que clínicamente se puede presentar con artritis poliarticular crónica con deformación ósea y articular (Kuemmerle-Deschner, 2015). A nivel neurológico, se puede presentar presión intracraneal elevada que puede llevar a edema papilar, hidrocefalia, atrofia óptica, atrofia cerebral, encefalomegalia y amaurosis progresiva (Hashkes *et al.*, 2019).

Se han descrito otros compromisos oculares bilaterales como queratitis intersticial, conjuntivitis, epiescleritis, uveítis no granulomatosa, corioretinitis focal y vasculitis retinal que pueden estar asociados con meningitis crónica aséptica (Kuemmerle-Deschner, 2015).

Además, los pacientes con NOMID/CINCA suelen presentar baja estatura, artropatía severa y dismorfia facial con hallazgos como prominencia frontal, aplanamiento del dorso nasal, hipoplasia medio facial (Sánchez *et al.*, 2016), así como otras anormalidades como proliferación cartilaginosa y calcificación anormal epifisiaria, asimetría en el crecimiento de las extremidades por reducción unilateral del crecimiento longitudinal, que puede llevar a movilidad limitada (Tran, 2017) (Efthimiou *et al.*, 2019) (Hashkes *et al.*, 2019).

La manifestación neurológica más frecuente es la meningitis crónica aséptica, que se puede manifestar con irritabilidad, convulsiones, hidrocefalia, vómitos y cefalea, incremento en el volumen de los ventrículos cerebrales, papiledema uni o bilateral y cambios en la celularidad del LCR (líquido cefalorraquídeo).

#### 4.4.5 Criterios de clasificación clínicos y de laboratorio para CAPS

Para CAPS, también se han propuesto recientemente criterios de clasificación clínicos y de laboratorio que eventualmente pueden orientar al clínico para el abordaje diagnóstico y terapéutico de estos pacientes.

**Tabla 7.** Criterios de clasificación clínicos, de laboratorio y score promedio para la CAPS. Adaptado de Federici et al., 2019

<b>Variable</b>	<b>Score promedio</b>
Fiebre recurrente	7,9
Rash urticariforme	7,9
Variantes genéticas en el gen <i>NLRP3</i>	7,8
Respuesta terapéutica a agentes bloqueadores de IL-1	6,8
Inicio de la enfermedad (< 1 año de edad)	6,6
Incremento de los reactantes de fase y SAA durante episodios febriles	6,4
Urticaria crónica	6,1
Episodios inflamatorios desencadenados por exposición al frío	5,8
Compromiso neurológico	5,7
Pérdida auditiva	5,5
Compromiso ocular	5,5
Osteoartropatía	5,3
Sobrecrecimiento cartilaginoso	4,7
Meningitis crónica	4,4
Antecedentes familiares	4,4
Conjuntivitis	4,3
Artralgia	2,9

#### 4.4.6 Intervenciones terapéuticas

El abordaje de los pacientes con CAPS se basa en el uso de agentes bloqueadores de la actividad biológica de la IL-1 como diana terapéutica, pues ha resultado ser exitoso a pesar de la heterogeneidad clínica entre pacientes.

Una de las tres alternativas terapéuticas aprobadas por FDA es el Anakinra, que actúa como antagonista del receptor de IL-1. También, se tiene como opción el Rilonacept, proteína de fusión dimérica que consiste en la fracción Fc de la IgG y el receptor de la IL-1; y la tercera opción terapéutica es el Canakinumab, que es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la IL-1.

La dosis terapéutica de los agentes bloqueadores de IL-1 se debe ajustar según la severidad del subfenotipo de CAPS para el control de la sintomatología, así como prevenir el desarrollo y la progresión del daño orgánico dado por la inflamación crónica. El daño orgánico se puede monitorear por CRP, determinación de proteinuria, evaluaciones auditivas, oftalmológicas, radiografías y estudio de LCR.

#### 4.4.7 Inmunopatología del CAPS

La patogénesis del CAPS deriva de variantes en el gen *NLRP3*, el cual codifica por la proteína denominada criopirina (conocida también como NLRP3, NALP3), componente central del inflamasoma NLRP3, que a la fecha representa el inflamasoma más estudiado y mejor caracterizado. El inflamasoma NLRP3 actúa como plataforma molecular para la maduración de procaspasas y posterior activación de prointerleuquinas.

Dichas variantes resultan en un incremento significativo de la actividad del inflamasoma, y esto consecuentemente induce una mayor producción de IL-1 (Abdul-Sater y Philpott, 2016), no obstante, el mecanismo molecular específico asociado a estas variantes patogénicas aún no está dilucidado (Hashkes *et al.*, 2019).

El inflamasoma NLRP3 constituye un complejo macromolecular de aproximadamente 700 kDa, su ensamblaje se da en respuesta a PAMPs y DAMPs como LPS, ADN bacteriano, ARN viral, cristales de urato, colesterol, hialuronato y pirofosfato de calcio (Buelvas y Suárez, 2015).

En condiciones fisiológicas, la activación del inflamasoma NLRP3 es regulada por medio de dos señales para su ensamblaje. La primera señal está dada por distintos agonistas de TLR que en última instancia resultan en la producción mediada por NF- $\kappa$ B de componentes del inflamasoma y de la pro-IL-1, mientras que la segunda señal es mediada por DAMPs, PAMPs y factores ambientales como cristales de sílica o asbesto, que promueven la oligomerización del inflamasoma NLRP3 (Abdul-Sater y Philpott, 2016).

Propiamente, la proteína criopirina pertenece a la familia de las proteínas NLR (del inglés *NOD-like receptor*), que actúan como sensores intracelulares y poseen tres dominios: un dominio PYD, un dominio NBS y un dominio LRR. La criopirina forma el complejo multimolecular del inflamasoma NLRP3, al reclutar a la proteína adaptadora ASC y dos moléculas procaspasa-1 (Jesús y Goldbach-Mansky, 2014)

A pesar que tanto el inflammasoma pirina como el inflammasoma NLRP3 inducen la producción de IL-1 $\beta$ , se ha descrito que el inflammasoma NLRP3 contribuye en mayor medida a los niveles celulares de IL-1 $\beta$  (Monie, 2017).

Además, la pirina y el NLRP3 difieren en su patrón de expresión celular, pues la pirina se expresa principalmente en granulocitos mientras que NLRP3 se expresa en monocitos, macrófagos, condrocitos y linfocitos T activados, lo que aumenta el impacto a nivel sistémico de las variantes patogénicas en NLRP3 (Dedeoglu y Kim, 2016) (Monie, 2017).

#### 4.5 Otros criterios de clasificación y diagnóstico para las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas

El Proyecto Eurofever, es un registro internacional promovido por la Sociedad Europea de Reumatología Pediátrica (PRES, por sus siglas en inglés) que tiene entre sus objetivos el proveer información de la presentación clínica, respuesta terapéutica y complicaciones de las enfermedades autoinflamatorias que oriente y colabore para un diagnóstico temprano por parte de los clínicos.

El Proyecto Eurofever registra pacientes con enfermedades autoinflamatorias de distintos países y etnias, y a partir de esto se han desarrollado criterios de clasificación provisionales que se deben ser aplicados luego de la exclusión de otras condiciones clínicas que se presentan con fiebre recurrentes, como procesos infecciosos, neoplásicos y otros desórdenes inflamatorios (Hashkes *et al.*, 2019).

**Tabla 8.** Otros criterios de clasificación y de diagnóstico para enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas. Adaptado de Hashkes *et al.*, 2019.

FMF		TRAPS		MKD/HIDS		CAPS	
Presencia	Score	Presencia	Score	Presencia	Score	Presencia	Score
Etnia mediterránea-oriental <sup>a</sup>	22	Edema periorbital	21	Diarrea (frecuente)	37	Exantema urticariforme	25
Dolor en el pecho	13	Duración de los episodios >6 días	19	Diarrea (ocasional)	20	Pérdida auditiva neurosensorial	25
Dolor abdominal	9	Exantema migratorio	18	Ganglios linfáticos dolorosos	13	Conjuntivitis	10
Duración de los episodios <2 días	9	Antecedentes familiares	7	Estomatitis aftosa	11		
Etnia mediterránea del norte <sup>a</sup>	7	Mialgia	6	Edad de inicio <2 años	10		
<b>Ausencia</b>		<b>Ausencia</b>		<b>Ausencia</b>		<b>Ausencia</b>	
Exantema urticariforme	15	Estomatitis aftosa	15	Dolor en el pecho	11	Faringitis exudativa	25
Duración de los episodios >6 días	13	Vómitos	14			Dolor abdominal	15
Adenopatías cervicales	10						
Estomatitis aftosa	9						
Valor de corte	≥60	Valor de corte	≥43	Valor de corte	≥42	Valor de corte	≥52

<sup>a</sup>Etnia mediterránea oriental: armenios, turcos, judíos no Ashkenazi y árabes. Etnia mediterránea del norte: griegos, italianos y españoles.

## **CAPÍTULO 5**

## **5. Principales variantes patogénicas descritas para las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas.**

En los últimos 20 años, se han identificado más de 30 nuevos genes asociados con enfermedades autoinflamatorias. El diagnóstico genético se basa en la identificación de variantes patogénicas incluso en casos clínicamente atípicos, por lo que estos deberían ser solicitados por médicos que reconozcan el espectro clínico de la presentación de las enfermedades autoinflamatorias (Hashkes *et al.*, 2019).

Es importante resaltar que estas enfermedades pueden manifestar una sintomatología parcial o sintomatología que se traslapa entre las distintas enfermedades, lo que dificulta el diagnóstico diferencial y hace aún más evidente el apoyo en análisis genéticos (Rowczenio y Lachmann, 2019).

Generalmente, la solicitud médica de análisis genéticos en el contexto de enfermedades autoinflamatorias debería considerar ciertas características clínicamente relevantes, como evidencia de inflamación sistémica, edad de inicio de la sintomatología, antecedentes familiares y la existencia de un gen candidato causal (Hashkes *et al.*, 2019).

La identificación de una variante patogénica en enfermedades autoinflamatorias con un modo de herencia AD (TRAPS y CAPS) o de variantes patogénicas ya sea en homocigosidad o heterocigosidad compuesta en enfermedades autoinflamatorias con un modo de herencia AR (FMF y MKD), debería ser suficiente para la confirmación diagnóstica (Rowczenio y Lachmann, 2019), sin embargo, se debe considerar la sensibilidad del ensayo genético.

Los ensayos genéticos no deben ser usados como criterios de exclusión diagnóstica, dado que algunos pacientes con enfermedades autoinflamatorias cumplen con los criterios clínicos de clasificación sin presentar alguna de las variantes patogénicas descritas (Koga y Kawami, 2019).



Recientemente, el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG, por sus siglas en inglés) ha recomendado la clasificación de variantes genéticas según su patogenicidad en:

- Variantes patogénicas
- Probablemente patogénicas
- Variantes de significado incierto
- Variantes probablemente benignas
- Variantes benignas

Para la clasificación de las variantes genéticas, se utilizan distintos criterios, como el tipo de variante genética, predicciones *in silico* como sustituciones de aminoácidos, frecuencia alélica, segregación familiar de la variante con el fenotipo, reportes de variantes en el mismo codón y resultados de estudios funcionales previos (Hashkes *et al.*, 2019).

### 5.1 Principales variantes patogénicas descritas para FMF.

La FMF (OMIM #249100) es una enfermedad monogénica transmitida por un modo de herencia AR asociada al gen *MEFV* (OMIM #608107), único gen causal relacionado con FMF. En 1992, el gen *MEFV* fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3), posteriormente en 1997 fue clonado por la técnica de clonación posicional.

Los pacientes con FMF presentan variantes patogénicas bialélicas en el gen *MEFV* con variantes homocigotas o heterocigotas compuestas (Hashkes *et al.*, 2019). A pesar de que actualmente existe una mayor documentación de casos de FMF, no ha sido posible establecer claramente una correlación genotipo-fenotipo y aunado a lo anterior, no existen ensayos funcionales para corroborar dicha correlación (Heilig y Broz, 2017) (Rowczenio y Lachmann, 2019).

En enfermedades heredadas de forma recesiva como la FMF, se recomienda realizar análisis genéticos a los padres para confirmar el diagnóstico clínico, pues el gen *MEFV* es altamente polimórfico e incluso en algunos pacientes se han reportado variantes heredadas *in cis* (variantes en un mismo alelo) (Hashkes *et al.*, 2019).

El gen *MEFV* posee 10 exones, abarca aproximadamente 14,6 Kb de ADN genómico y codifica por un transcripto de ARN de 3.7 Kb, que brinda las instrucciones para producir la proteína denominada pirina, la cual posee 781 aminoácidos con un peso molecular de 95 kDa (Martorana *et al.*, 2017). La pirina se expresa casi exclusivamente en granulocitos maduros, actúa como regulador intracelular de la producción de IL-1 $\beta$  y posee varios dominios implicados directamente en la patogénesis de la FMF (Skendros, *et al.*, 2019).

Estructuralmente, la pirina presenta el dominio PYD que es un dominio específico de 90 aminoácidos ubicado en la región N-terminal, que permite la unión a la proteína adaptadora ASC (Federici *et al.*, 2012) (Martorana *et al.*, 2017).

En la región C-terminal se ubica un dominio denominado B30.2/SPRY (codificado en el exón 10), de 170 aminoácidos y que interactúa con la pro-caspasa. Propiamente, es en el dominio B30.2/SPRY que se han identificado las variantes genéticas de mayor severidad clínica y más frecuentemente asociadas con complicaciones de FMF (Schnappauf *et al.*, 2019).

Se han reportado diferencias fenotípicas significativas entre las distintas variantes en el gen *MEFV*, no obstante, se ha descrito que las variantes presentes en el *hotspot* delimitado por los residuos de aminoácidos 680 y 694 del exón 10, causan un inicio temprano y un curso severo de la enfermedad (Rowczenio y Lachmann, 2019).

Actualmente, se ha discutido si las variantes causales de la FMF son mediadas por ganancia (GOF, por sus siglas en inglés) o pérdida de función (LOF, por sus siglas en inglés), pues en modelos experimentales los resultados han sido controversiales (Migita *et al.*, 2018).

En modelos animales *knock-out* para el gen *MEFV*, se ha observado un incremento en la secreción de IL-1 $\beta$  por macrófagos (Hesker *et al.*, 2012), sin embargo, en modelos homocigotas *knock-in* para variantes en el dominio B30.2/SPRY, se ha documentado activación inflamatoria espontánea, similar a lo que ocurre en pacientes con FMF (Chae *et al.*, 2011).

Dado que se han reportado pacientes con un único alelo mutado y no se han determinado variantes nulas en pacientes con FMF, se plantea que la FMF se da como consecuencia de variantes con GOF con un efecto de dosis génica (Oda y Kastner, *et al.*, 2017) (Manthiram *et al.*, 2017).

Se ha reportado que las distintas variantes genéticas de pacientes con FMF se pueden presentar a lo largo de todo el gen *MEFV*, no obstante, es importante resaltar que alrededor del 85% de los pacientes presentan una de las cinco variantes genéticas clasificadas como patogénicas localizadas en el exón 10 (Tabla 10) (Figura 3) (Federici *et al.*, 2012).

Globalmente, las variantes patogénicas más frecuentes son la M694V, M680I y V726A, y cabe destacar que de ellas la variante homocigota M694V es la más frecuente y se ha asociado ampliamente con un fenotipo clínico severo de la enfermedad, un inicio temprano y con mayor riesgo de progresión a amiloidosis tipo AA (Lucherini *et al.*, 2018) (Skendros, *et al.*, 2019).

A nivel terapéutico, la variante homocigota M694V se ha relacionado con la necesidad de dosis elevadas de colchicina y con una menor respuesta terapéutica (Grossman *et al.*, 2019).

Asimismo, se ha evidenciado que esta variante tiene una mayor asociación con enfermedades relacionadas con FMF, como enfermedad de Crohn, enfermedad de Behcet, púrpura de Henoch-Schonlein, espondilitis anquilosante, pero no fibromialgia (Grossman *et al.*, 2019).

Se ha descrito que pacientes con variantes como E148Q y R761H pueden presentar una sintomatología más leve de FMF (Yildirim *et al.*, 2019). Particularmente, la variante E148Q, presenta una frecuencia alélica similar en poblaciones sanas y pacientes con FMF, representa el segundo polimorfismo más frecuente en la población general, por lo que se discute su rol en la enfermedad (Koga y Kawakami, 2018) (Efthimiou *et al.*, 2019).

Además, se han reportado pacientes que presentan variantes heterocigotas compuestas, por ejemplo, variantes como M694V en combinación con otras variantes como E148Q, M680I y V726A. Las variantes genéticas presentes en el exón 2 como E148Q y R202Q se han asociado con un fenotipo de menor severidad, inicio tardío y desenlace favorable (Bilge *et al.*, 2019).

En 2015, el proyecto SHARE (del inglés *Single Hub and Access point for pediatric Rheumatology in Europe*) propuso recomendaciones basadas en evidencia para el diagnóstico genético de FMF para clínicos sin experiencia en FMF. El nivel de evidencia para cada recomendación fue establecido usando procedimientos operativos estandarizados de la EULAR (del inglés, *European League against Rheumatism*) (Tabla 9) (Giancane *et al.*, 2015).

**Tabla 9.** Recomendaciones para el diagnóstico genético de FMF. Adaptado de Giancane *et al.*, 2015.

Recomendación	Nivel de evidencia
Individuos homocigotos para la variante M694V que se presentan asintomáticos deben ser monitoreados y evaluados para considerar abordaje terapéutico.	A
La FMF se basa en un diagnóstico clínico que puede ser apoyado, pero no excluido, por análisis genéticos.	B
Pacientes homocigotas para la variante M694V tienen un riesgo alto de desarrollar un fenotipo severo de FMF.	B
Pacientes con FMF que presentan variantes homocigotas o heterocigotas compuestas, como la variante M694V o variantes en las posiciones 680-694 del exón 10, tienen mayor riesgo de tener un curso severo de FMF.	B
La variante E148Q es una variante frecuente y clasificada como de significado patogénico incierto, por ello, como única variante del gen <i>MEFV</i> no apoya el diagnóstico de FMF.	B
Individuos con dos variantes patogénicas para FMF que se presentan asintomáticos, si existen factores de riesgo para amiloidosis (nacionalidad, antecedentes familiares, biomarcadores inflamatorios persistentemente elevados, en particular el amiloide sérico A) se debe dar seguimiento y considerar abordaje terapéutico.	B
Pacientes homocigotas para la variante M694V están en riesgo de tener un inicio temprano de FMF.	C
Consultar con especialistas en enfermedades autoinflamatorias puede ser útil para la indicación e interpretación de análisis genéticos	C

A: Evidencia de categoría I, B: Evidencia de categoría II o recomendaciones extrapoladas de la evidencia de categoría I, C: Evidencia de categoría III o recomendaciones extrapoladas de la evidencia de categoría II y D: Evidencia de categoría IV o recomendaciones extrapoladas de la evidencia de categoría III.

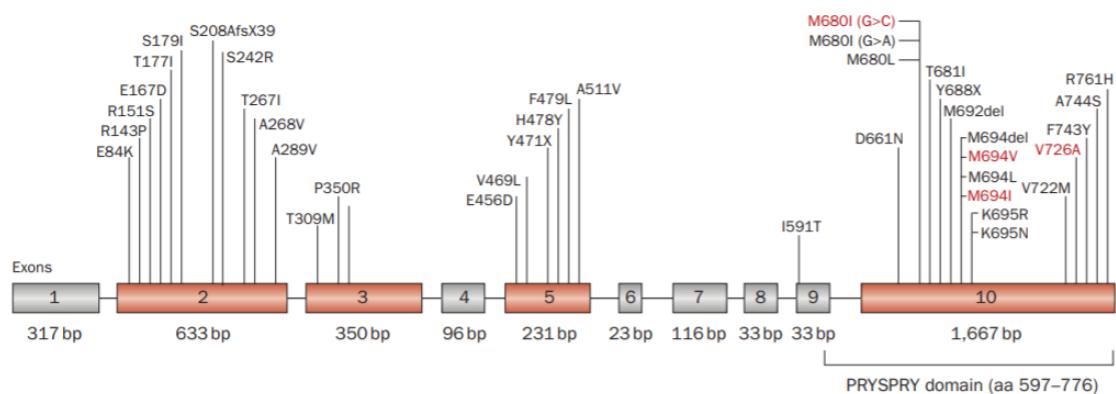
Actualmente, se han registrado en la base de datos InFever (asociada a la ISSAID) un total 385 variantes del gen *MEFV*, en distintos loci como en los exones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10; los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 9 y regiones reguladoras como 3'-UTR, 5'-UTR y 5' flanking (<https://infervers.umai-montpellier.fr/web/index.php>) (Accesado en abril del 2021). Según la clasificación de la ACMG, las 385 variantes reportadas en el gen *MEFV* se clasifican de la siguiente forma:

- 5 variantes patogénicas
- 56 variantes probablemente patogénicas
- 111 variantes de significado incierto (VUS, por sus siglas en inglés),
- 124 variantes probablemente benignas
- 9 variantes benignas
- 43 variantes sin clasificar
- 37 variantes sin resolver

**Tabla 10.** Variantes patogénicas asociadas a FMF registradas en la base de datos InFevers.

Nombre común	Variante nucleotídica según HGVS <sup>a</sup>	Alteración proteica según HGVS	Localización
M694V	c.2080A>G	p.(Met694Val)	Exón 10
M694I	c.2082G>A	p.(Met694Ile)	Exón 10
V726A	c.2177T>C	p.(Val726Ala)	Exón 10
M680IGC	c.2040G>C	p.(Met680Ile)	Exón 10
M680IGA	c.2040G>A	p.(Met680Ile)	Exón 10

<sup>a</sup>HGVS (del inglés *Human Genome Variation Society*)



**Figura 3.** Representación esquemática de variantes en el gen MEFV asociadas a FMF. Se muestra solo un subgrupo de variantes halladas en pacientes con FMF. Las variantes patogénicas (mostradas en color rojo) se localizan en el exón 10, que codifica por el dominio B30.2. Adaptado de Aksentijevich y Kastner, 2011.

Estudios genéticos de pacientes con FMF sugieren que las variaciones en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés), duplicaciones y deleciones no representan los mecanismos mutacionales más significativos para esta condición, en contraste con las sustituciones puntuales con cambio de sentido, que tienen un papel relevante en la patogénesis de la FMF (Martorana *et al.*, 2017).

Recientemente, se han asociado alelos complejos (variantes *in cis*) como p.M694I;p.E148Q y también la deleción p.Met694del en el exón 10 con un patrón de herencia AD (Ozen *et al.*, 2019). Además, las variantes heterocigotas con cambio de sentido en el exón 8 como p.(T577N), p.(T577S) y p.(T577A) se han relacionado con una

enfermedad autoinflamatoria de herencia AD similar a FMF que responde a la colchicina (Stoffels *et al.*, 2014) (Hashkes *et al.*, 2019).

Respecto a las complicaciones a largo plazo de la FMF, se ha correlacionado la amiloidosis tipo AA (amiloidosis secundaria por amiloide A) con la variante M694V (Martorana *et al.*, 2017). Se ha descrito que el genotipo SAA1.1/SAA1.1 se asocia con amiloidosis renal, y se ha postulado que el amiloide podría activar el inflamasoma NLRP3 (Efthimiou *et al.*, 2019).

Se ha observado que en algunos pacientes con un fenotipo incompleto o incluso típico presentan variantes heterocigotas simples (Martorana *et al.*, 2017) y se ha propuesto que se debe considerar que pacientes con fenotipos congruentes con FMF sin variantes patogénicas descritas podrían presentar variantes en regiones intrónicas o incluso variantes en genes modificadores, por lo que se deben abordar clínicamente como FMF (Ozen *et al.*, 2019).

Asimismo, es importante considerar que se han estudiado pacientes con fenotipos de FMF sin variantes en el gen *MEFV*, con un fenotipo clínico de menor severidad, de inicio más tardío y con menor asociación de historia familiar, lo que sugiere la posibilidad de que existan variantes en genes alternativos o incluso desregulación epigenética (Álvarez-Errico *et al.*, 2017).

Además, dada la penetrancia incompleta y la expresión variable del fenotipo de FMF, se ha sugerido que ciertos factores ambientales podrían afectar la expresión de la enfermedad (Efthimiou *et al.*, 2019).

Adicionalmente, es importante considerar que las variantes heterocigotas con cambio de sentido localizadas en las posiciones p.S242 o p.E244 en el exón 2 del gen *MEFV* (Hashkes *et al.*, 2019), se han asociado con otra enfermedad autoinflamatoria descrita en 2016 y denominada como PAAND (Autoinflamación asociada a Pirina con Dermatitis Neutrófilica).

A diferencia de la FMF, la PAAND se transmite por un modo de herencia AD y clínicamente se presenta con episodios febriles recurrentes de más de 7 días, artralgia, mialgia, miosis y dermatosis neutrófilica que incluye acné severo, abscesos dérmicos, vasculitis neutrófilica de vasos pequeños y pioderma gangrenoso con artritis piogénica (Hashkes *et al.*, 2019).

## 5.2 Principales variantes patogénicas descritas para TRAPS.

TRAPS (OMIM #142680) es una enfermedad monogénica transmitida por un modo de herencia AD asociado al gen *TNFRSF1A* (OMIM #191190), con amplia heterogeneidad genética y penetrancia variable. El gen *TNFRSF1A* está localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.31), fue identificado en 1999 como gen candidato por clonación posicional basado en estudios de ligamiento genético y corroborado por estudios de mapeo de desequilibrio de ligamiento (Hashkes *et al.*, 2019).

TRAPS se da principalmente por variantes heterocigotas de línea germinal en el gen *TNFRSF1A* (Tabla 11), que abarca aproximadamente 20,3 Kb de ADN genómico y posee 10 exones que codifican por el receptor del TNF denominado TNFR1 (conocido también como CD120 o p55), compuesto por 455 aminoácidos con un peso molecular de 55 kDa.

La mayoría de las variantes identificadas en el gen *TNFRSF1A* corresponden a sustituciones de un solo nucleótido, no obstante, se han reportado algunas inserciones y deleciones (Zegarska *et al.*, 2021). Las variantes asociadas a TRAPS se clasifican como variantes de alta penetrancia y variantes de baja penetrancia.

Las variantes de alta penetrancia son clasificadas como variantes con cambio de sentido, ubicadas principalmente en los dominios ricos en cisteína CRD1 y CRD2 de la región extracelular del TNFR1 (Efthimiou *et al.*, 2019). Precisamente, el dominio extracelular representa un hotspot mutacional que sugiere que esta región tiene un papel relevante en la función del TNFR1 (Hashkes *et al.*, 2019).

Los dominios CRD codifican por un dominio de ensamblaje de unión pre-ligando (PLAD, por sus siglas en inglés) y por un dominio de unión a ligando, involucrados en la formación de enlaces disulfuro y puentes de hidrógenos que estabilizan y le permiten tener un correcto plegamiento al TNFR1 (Aksentijevich y Kastner, 2011).

La mayoría de variantes de alta penetrancia involucran residuos de cisteína altamente conservados y son conocidas como variantes estructurales (Lucherini *et al.*, 2018). Estas variantes alteran el plegamiento del dominio extracelular del TNFR1, que está codificado por los exones 2 al 6, tienen una alta penetrancia genética, mayor asociación con un fenotipo de mayor severidad y progresión a amiloidosis (Cudrici *et al.*, 2020).



Las variantes de baja penetrancia se han asociado con la adición o eliminación de residuos de prolina, que por la estructura cíclica de su cadena lateral puede potencialmente alterar la estructura secundaria de la proteína al interferir con la formación de enlaces peptídicos (Greco *et al.*, 2015).

Particularmente, las variantes de baja penetrancia como R92Q y P46L, son las variantes más frecuentes y se han relacionado con un fenotipo leve e incluso se puede hallar en individuos asintomáticos (Hashkes *et al.*, 2019). Característicamente, estas variantes presentan un inicio tardío de manifestaciones clínicas y tienen menor riesgo de progresión a amiloidosis (Lucherini *et al.*, 2018).

Además, se ha postulado que las variantes de baja penetrancia podrían representar un factor de susceptibilidad para otras condiciones inflamatorias como esclerosis múltiple y enfermedad de Behcet (Cudrici *et al.*, 2020).

Por su parte, no se han asociado claramente variantes ubicadas en el dominio intracelular del TNFR1 o variantes nulas con el fenotipo clínico de TRAPS (Hashkes *et al.*, 2019)

Específicamente, la variante T50M/K representa la variante más frecuente en pacientes con TRAPS, que altera un puente de hidrógeno esencial para el plegamiento del TNFR1. Además, se han asociado específicamente las variantes I170N y V173D en el CRD3 con alteración del sitio de escisión del dominio extracelular que permite generar la forma soluble del TNFR1 (Figura 4) (Aksentjevich y Kastner, 2011).

Como se explicó anteriormente, el receptor TNFR1 mutado se acumula en agregados intracelulares en el RE y desencadena vías de señalización como la vía del NF- $\kappa$ B, autofagia y la vía UPR con producción de ROS y citoquinas proinflamatorias, que lleva a las manifestaciones inflamatorias que se asocian al fenotipo clínico de TRAPS (Hashkes *et al.*, 2020).

El mosaicismo genético describe la presencia de dos o más líneas celulares con distintos genotipos dentro de un individuo. El mosaicismo se puede clasificar como mosaicismo gonadal si ocurren variantes postzigóticas en gametos, mosaicismo somático si ocurre en células somáticas o mosaicismo gonosomal si ocurre tanto en gametos como en células somáticas (Efthimiou *et al.*, 2019).

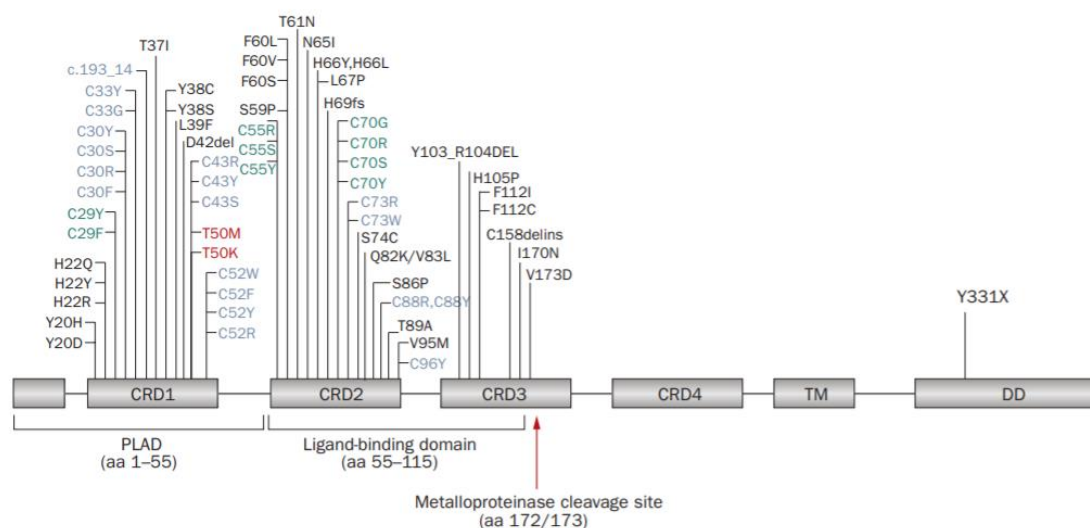
En el año 2016, se reportó el primer caso de mosaicismo gonosomal asociado a TRAPS como resultado de una delección somática *in-frame* de 24 nucleótidos en el exón 3

(c.255\_278del), detectado por secuenciación de Sanger y confirmado por NGS. (Rowczenio *et al.*, 2016). El mosaicismo gonosomal se presenta con riesgo de transmisión del alelo mutado a la descendencia y de desarrollo de manifestaciones clínicas.

Estudios recientes de expresión génica en pacientes con TRAPS han demostrado una sobreexpresión de otros genes asociados a distintas vías de la inmunidad innata, como NF- $\kappa$ B, MAPK14, TLR5 y MMP9, que con intervenciones terapéuticas como agentes bloqueadores de IL-1 se puede disminuir la expresión de estos genes y la respuesta proinflamatoria (Torene *et al.*, 2017).

Actualmente, se han registrado en la base de datos InFever (asociada a la ISSAID) un total 178 variantes del gen *TNFRSF1A*, en distintos loci como en los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10; los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y regiones no codificantes como 5' flanking y 3' UTR (<https://infervers.umai-montpellier.fr/web/index.php>). (Accesado en abril del 2021). Según la clasificación de la ACMG, las 178 variantes reportadas en el gen *TNFRSF1A* se clasifican de la siguiente forma:

- 44 variantes patogénicas (Tabla 11).
- 59 variantes probablemente patogénicas.
- 21 variantes de significado incierto (VUS, por sus siglas en inglés).
- 34 variantes probablemente benignas.
- 1 variante benigna.
- 19 variantes sin clasificar.



**Figura 4.** Representación esquemática de variantes en el gen *TNFRSF1A* asociadas a TRAPS. Los dominios CRD1, CRD2 y CRD3 de la región extracelular están codificados desde el exón 2 hasta el exón 6. Adaptado de Aksentijevich y Kastner, 2011.

**Tabla 11.** Variantes patogénicas asociadas a TRAPS registradas en la base de datos InFevers.

Nombre común	Variante nucleotídica según HGVS <sup>a</sup>	Alteración proteica según HGVS	Localización
Y20D	c.145T>G	p.(Tyr49Asp)	Exón 2
H22Y	c.151C>T	p.(His51Tyr)	Exón 2
C29R	c.172T>C	p.(Cys58Arg)	Exón 2
C29G	c.172T>G	p.(Cys58Gly)	Exón 2
C29F	c.173G>T	p.(Cys58Phe)	Exón 2
C29Y	c.173G>A	p.(Cys58Tyr)	Exón 2
C29S	c.173G>C	p.(Cys58Ser)	Exón 2
C30R	c.175T>C	p.(Cys59Arg)	Exón 2
C30S	c.176G>C	p.(Cys59Ser)	Exón 2
C30Y	c.176G>A	p.(Cys59Tyr)	Exón 2
C30F	c.176G>T	p.(Cys59Phe)	Exón 2
C33G	c.184T>G	p.(Cys62Gly)	Exón 2
C33Y	c.185G>A	p.(Cys62Tyr)	Exón 2
c.193-14G>A	c.194-14G>A	-	Intrón 2
D42del	c.211_213delGAC	p.(Asp71del)	Exón 3
C43R	c.214T>C	p.(Cys72Arg)	Exón 3
C43G	c.214T>G	p.(Cys72Gly)	Exón 3
C43Y	c.215G>A	p.(Cys72Tyr)	Exón 3
C43S	c.215G>C	p.(Cys72Ser)	Exón 3
C43F	c.215G>T	p.(Cys72Phe)	Exón 3
T50M	c.236C>T	p.(Thr79Met)	Exón 3
C52R	c.241T>C	p.(Cys81Arg)	Exón 3
C52F	c.242G>T	p.(Cys81Phe)	Exón 3

C52Y	c.242G>A	p.(Cys81Tyr)	Exón 3
C52S	c.242G>C	p.(Cys81Ser)	Exón 3
C52W	c.243C>G	p.(Cys81Trp)	Exón 3
C55R	c.250T>C	p.(Cys84Arg)	Exón 3
C55S	c.251G>C	p.(Cys84Ser)	Exón 3
C55Y	c.251G>A	p.(Cys84Tyr)	Exón 3
F60L(264C>G)	c.265T>C	p.(Phe89Leu)	Exón 3
F60L(267A>G)	c.267C>A	p.(Phe89Leu)	Exón 3
N65I	c.281A>T	p.(Asn94Ile)	Exón 3
C70R	c.295T>C	p.(Cys99Arg)	Exón 3
C70S	c.295T>A	p.(Cys99Ser)	Exón 3
C70G	c.295T>G	p.(Cys99Gly)	Exón 3
C70Y	c.296G>A	p.(Cys99Tyr)	Exón 3
C88R	c.349T>C	p.(Cys117Arg)	Exón 4
C88Y	c.350G>A	p.(Cys117Tyr)	Exón 4
C96Y	c.374G>A	p.(Cys125Tyr)	Exón 4
C96F	c.374G>T	p.(Cys125Phe)	Exón 4
C96W	c.375T>G	p.(Cys125Trp)	Exón 4
C98c	c.379T>C	p.(Cys127Arg)	Exón 4
C98Y	c.380G>A	p.(Cys127Tyr)	Exón 4
F112I	c.421T>A	p.(Phe141Ile)	Exón 4

### 5.3 Principales variantes patogénicas descritas para MKD/HIDS.

MKD/HIDS (OMIM #260920) es una enfermedad monogénica transmitida por un modo de herencia AR asociado al gen *MVK* (OMIM #251170), que está localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q24.11) (Hashkes *et al.*, 2019) y fue identificado como gen candidato por clonación posicional en 1999.

El gen *MVK* también está relacionado con el error congénito del metabolismo denominado como aciduria mevalónica (AM), como consecuencia de variantes genéticas asociadas a una disminución severa de la actividad enzimática de la *MVK* (Lucherini *et al.*, 2018), mientras que en MKD/HIDS las variantes genéticas derivan en niveles variables reducidos de esta actividad enzimática.

El gen *MVK* abarca aproximadamente 22 Kb de ADN genómico, posee 11 exones y 10 intrones. El exón 1 codifica por la mayoría de la región 5'UTR, mientras que el exón 11 codifica por el codón de terminación y el total de la región 3'UTR. El gen *MVK* codifica por la enzima mevalonato kinasa (EC 2.7.1.36), que posee 396 aminoácidos y un peso molecular de 42,5 kDa (NCI Thesaurus, 2021).

Las variantes asociadas a MKD/HIDS son mediadas por variantes con LOF en ambos alelos del gen *MVK*, que se pueden presentar en todos los exones del gen. Se han documentado desde sustituciones de aminoácidos hasta variantes con cambio en el marco de lectura (Hashkes *et al.*, 2019). La mayoría de los pacientes tienen variantes con cambio de sentido en estado de heterocigosis compuesta (Sinha *et al.*, 2012).

Asimismo, se han reportado variantes nulas en el gen *MVK*, que no son halladas en estado de homocigosis, únicamente en heterocigosis compuesta en conjunto con variantes de menor severidad (Hashkes *et al.*, 2019). Lo anterior indica que se requiere cierta actividad enzimática de la mevalonato kinasa para el desarrollo embrionario.

Las variantes asociadas al gen *MVK* resultan en la disminución de la producción del geranylgeranyl pirofosfato, molécula necesaria para la prenilación y activación de Rho GTPasas que regulan indirectamente al inflamasoma pirina, por lo que en última instancia las variantes genéticas impiden la regulación del inflamasoma y desencadenan el incremento de su activación con producción de citoquinas proinflamatorias, como se explicó anteriormente en la sección 4.3.4

A pesar de que se han descrito más de 200 variantes asociados al gen *MVK*, las variantes V377I, I268T, H20P y P167L representan más del 70% del espectro total de variantes halladas en pacientes con MKD/HIDS (Martorana *et al.*, 2017), no obstante, no se ha demostrado claramente la asociación clínica con la variante P167L (Esposito *et al.*, 2014), pues actualmente está clasificada como variante probablemente patogénica.

En el 2016, se describieron las características genéticas de la cohorte más grande de pacientes con MKD/HIDS hasta la fecha. Se documentó que la variante V377I fue la más frecuentemente hallada en los pacientes (84%), seguida de la variante I268T (25%) (Ter Haar *et al.*, 2016).

Se ha hipotetizado que las variantes en el gen *MVK* que resultan en un fenotipo MKD/HIDS son variantes exclusivamente con pérdida de sentido, relacionadas con una disminución leve de la actividad enzimática de la mevalonato kinasa (Martorana *et al.*, 2017). Por su parte, que las variantes como cambios en el marco de lectura y variantes sin sentido se asociarían con el fenotipo de AM, dado que producen proteínas truncadas.

Además, se ha evidenciado que pacientes con heterocigosidad compuesta por V377I/I268T presentan amiloidosis tipo AA más frecuentemente, mientras que pacientes que no presentan la variante V377I tienen más frecuentemente compromiso musculoesquelético (Ter Haar *et al.*, 2016).

A diferencia de las otras enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas, en el gen *MVK* son más usuales las variantes genéticas del tipo inserciones, deleciones, duplicaciones, rearrreglos y variantes sin sentido (Zhang, 2016).

La MKD/HIDS es una enfermedad monogénica con un patrón de herencia AR, no obstante, se han descrito patrones de herencia de pseudodominancia, por lo que la enfermedad no puede ser excluida únicamente basado en el patrón de herencia (Esposito *et al.*, 2014).

La pseudodominancia hace referencia a la aparición inesperada de un fenotipo recesivo en un heterocigoto debido a la deleción de un alelo dominante homólogo con efecto enmascarador (Griffiths *et al.*, 2021), por lo que un único alelo recesivo podría ser expresado.

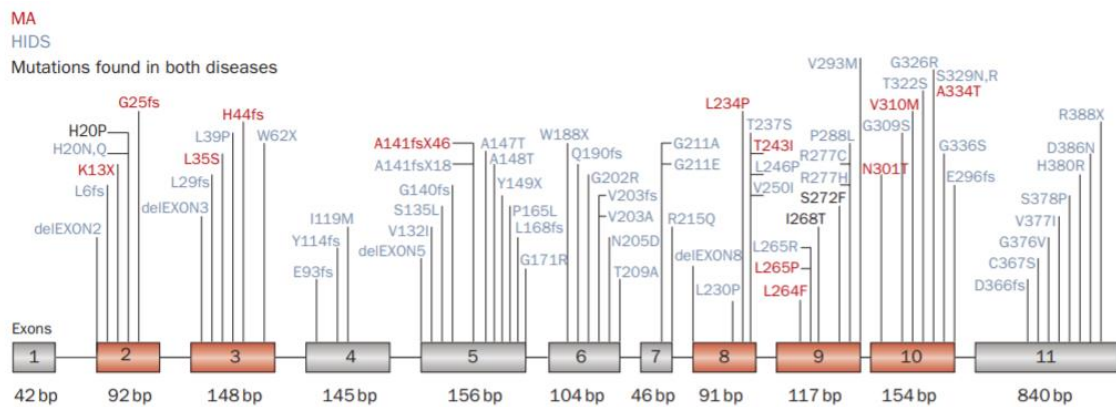
Interesantemente, se han descrito casos de pacientes con variantes simultáneas tanto en el gen *MVK* (en homocigosis) como en el gen *MEFV* (en heterocigosis compuesta) (Moussa *et al.*, 2015), por lo que se ha planteado la posibilidad de que exista un patrón de herencia digénico.

El patrón de herencia digénico se refiere a la interacción de dos genes que potencialmente puede alterar la expresión del fenotipo de una enfermedad, mostrando un traslape en las características clínicas y una alteración en la respuesta terapéutica (Çakan *et al.*, 2017).

Se han reportado variantes de sitio de splicing en el gen *MVK*, que son aquellas que se dan en el sitio específico no codificante en el que se da el splicing alternativo del procesamiento del preARNm, como la variante c.226+2delT (Govindaraj *et al.*, 2020). Estas variantes pueden resultar en una pérdida de exones o la incorporación de intrones (NCI Dictionary of Genetics Terms, 2021), alterando así el transcripto de ARNm y generando la posibilidad de inducir la producción de una proteína no funcional.

Actualmente, se han registrado en la base de datos InFever (asociada a la ISSAID) un total 264 variantes del gen *MVK*, en distintos loci como en los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11; los intrones 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 y regiones no codificantes como 5' flanking, 3'-UTR y 5'-UTR (<https://infevers.umai-montpellier.fr/web/index.php>). (Accesado en abril del 2021). Según la clasificación de la ACMG, las 264 variantes reportadas en el gen *MVK* se clasifican de la siguiente forma:

- 52 variantes patogénicas
- 116 variantes probablemente patogénicas
- 25 variantes de significado incierto (VUS, por sus siglas en inglés)
- 32 variantes probablemente benignas
- 4 variantes benignas
- 23 variantes sin clasificar
- 12 variantes sin resolver



**Figura 5.** Representación esquemática de variantes en el gen *MVK* asociadas tanto a MKD/HIDS como a AM. Adaptado de Akseptijevich y Kastner, 2011.

Asimismo, se han relacionado ciertas variantes patogénicas en el gen *MVK* con la poroqueratosis actínica superficial diseminada (PASD), la cual causa lesiones queratóticas en piel, que característicamente presenta placas y pápulas anulares con atrofia central, eritema leve, bordes definidos, que se extienden de forma centrífuga y con ausencia de sintomatología asociada a HIDS (Manthiram *et al.*, 2017).

Recientemente, se evidenció que existe una relación entre ciertas variantes en el gen *MVK* con la retinitis pigmentosa (RP) no sindrómica, que se caracteriza por ceguera nocturna y pérdida de la visión periférica que puede llevar a ceguera, lo que amplía el espectro clínico de variantes asociadas al gen *MVK* (Siemiakowska *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en los análisis genéticos se debe tomar en cuenta que ciertas variantes patogénicas en el gen *MVK* se han asociado a otras enfermedades distintas a MKD/HIDS (40 variantes patogénicas) (Tabla 12), como AM (16 variantes patogénicas), DASP (4 variantes patogénicas) y RP (2 variantes patogénicas) e incluso una misma variante puede estar asociado a más de una de estas enfermedades, por lo que se debe correlacionar muy bien la clínica con el diagnóstico molecular para el diagnóstico definitivo.



**Tabla 12.** Variantes patogénicas asociadas a MKD/HIDS registradas en la base de datos InFevers.

<b>Nombre común</b>	<b>Variante nucleotídica según HGVS<sup>a</sup></b>	<b>Alteración proteica según HGVS</b>	<b>Localización</b>
M1L	c.1A>C	p.0	Exón 2
L6fs	c.16_34del	p.(Leu6Glyfs*16)	Exón 2
H20N	c.58C>A	p.(His20Asn)	Exón 2
H20P	c.59A>C	p.(His20Pro)	Exón 2
H20Q	c.60T>A	p.(His20Gln)	Exón 2
del EXON 3	c.79_226del	p.(Val27Serfs*16)	Exón 3
A28T	c.82G>A	p.(Ala28Thr)	Exón 3
L29fs	c.86del	p.(Leu29Argfs*5)	Exón 3
L39P	c.116T>C	p.(Leu39Pro)	Exón 3
W62X(c.185)	c.185G>A	p.(Trp62*)	Exón 3
E93fs	c.277_283del	p.(Glu93Glnfs*38)	Exón 4
L97fs	c.289del	p.(Leu97Cysfs*36)	Exón 4
Y114fs	c.340_344del	p.(Tyr114Ilefs*71)	Exón 4
del EXON 5	c.372_527del	p.(Ala125_Arg176del)	Exón 5
V132I	c.394G>A	p.(Val132Ile)	Exón 5
W134X	c.401G>A	p.(Trp134*)	Exón 5
A141fs (delG)	c.421del	p.(Ala141Argfs*18)	Exón 5
Y149X	c.447C>G	p.(Tyr149*)	Exón 5
T159fs	c.475_478del	p.(Thr159Cysfs*9)	Exón 5
G171R	c.511G>A	p.(Gly171Arg)	Exón 5
W188X	c.564G>A	p.(Trp188*)	Exón 6
Q190fs	c.571del	p.(Gln191Lysfs*5)	Exón 6
G202R	c.604G>A	p.(Gly202Arg)	Exón 6
V203A	c.608T>C	p.(Val203Ala)	Exón 6
G211E	c.632G>A	p.(Gly211Glu)	Exón 7
G211del	c.635_637del	p.(Gly212del)	Exón 7
R215X	c.643C>T	p.(Arg215*)	Exón 7
Q218X	c.652C>T	p.(Gln218*)	Exón 7
T237S	c.709A>T	p.(Thr237Ser)	Exón 8
R241C	c.721C>T	p.(Arg241Cys)	Exón 8
V247fs	c.737del	p.(Val247Trpfs*19)	Exón 8
c.790del	c.790del	p.(Leu264Serfs*2)	Exón 9
L265R	c.794T>G	p.(Leu265Arg)	Exón 9
I268T	c.803T>C	p.(Ile268Thr)	Exón 9
R277C	c.829C>T	p.(Arg277Cys)	Exón 9
E284Kfs*17	c.850del	p.(Glu284Lysfs*17)	Exón 9
G309S	c.925G>A	p.(Gly309Ser)	Exón 10
V377I	c.1129G>A	p.(Val377Ile)	Exón 11
R388X	c.1162C>T	p.(Arg388*)	Exón 11
Stop397R	c.1189T>C	p.(*397Argext*?)	Exón 11

#### 5.4 Principales variantes patogénicas descritas para CAPS.

CAPS es una enfermedad monogénica transmitida por un modo de herencia AD asociado al gen *NLRP3* (OMIM #606416). El gen *NLRP3* está localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q44), fue identificado en 2001 como gen asociado a CAPS y las variantes genéticas están relacionadas a distintos fenotipos, que difieren en severidad clínica: FCAS (OMIM #120100), MWS (OMIM #191900) y NOMID/CINCA (OMIM #607115) (Hashkes *et al.*, 2019).

El gen *NLRP3* (también conocido como *CIAS1* y *PYPAF1*) es altamente polimórfico, abarca aproximadamente 32,95 Kb, y el ADNc presenta 9 exones codificantes con un marco de lectura abierto de 3105 pares de bases, que da lugar hasta a 11 transcritos distintos de ARNm (Hoffmann *et al.*, 2001).

*NLRP3* codifica por la proteína denominada criopirina, que su principal isoforma consiste de 920 aminoácidos con un peso molecular de 105,7 kDa (Hoffmann *et al.*, 2001) y su secuencia proteica incluye un dominio PYD en la región N-terminal, un dominio NACHT y un dominio LRR en la región C-terminal (Jesús y Goldbach-Mansky, 2014)

CAPS es causado como consecuencia de variantes heterocigotas con GOF en el gen *NLRP3*, variantes que en el año 2001 fueron identificadas para FCAS y MWS, y un año más tarde para NOMID/CINCA (Hashkes *et al.*, 2019). Estas variantes resultan en la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3, con lo que incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (Aksentijevich y Kastner, 2011).

La mayoría de las variantes en el gen *NLRP3* son clasificadas como variantes con cambio de sentido por sustituciones de un solo nucleótido (Hashkes *et al.*, 2019), ubicadas mayoritariamente en el dominio de oligomerización NACHT/NBS, que está codificado en el exón 3 y representa el principal dominio regulatorio de la proteína criopirina (Lucherini *et al.*, 2018).

Particularmente, el fenotipo de mayor severidad NOMID/CINCA se ha asociado hasta en un 60% de los casos con variantes *de novo* en el gen *NLRP3* (Nair *et al.*, 2018) (Booshehri y Hoffman, 2019), mientras que en los fenotipos FCAS y MWS predomina el patrón de herencia AD.

Además, muchos pacientes con NOMID/CINCA no presentan variantes en la región codificante del gen *NLRP3*, por lo que se ha planteado que en estos casos podrían estar involucrados genes modificadores, aunque no difieran clínicamente de pacientes con variantes genéticas en *NLRP3* (Finetti *et al.*, 2016)

Es importante resaltar que no se han asociado regiones específicas de dominios proteicos con subfenotipos de CAPS, no obstante, existe una buena correlación genotipo-fenotipo de cada variante genética asociada con uno de los subfenotipos del espectro clínico de CAPS (Hashkes *et al.*, 2019).

Además, se ha propuesto que podrían haber ciertos *hotspots* mutacionales puesto que se han determinado múltiples variantes que se ubican en el mismo residuo de aminoácido (Figura 6) (Boosheri y Hoffman, 2019), como por ejemplo el residuo de arginina en la posición 260 que se ha asociado con tres variantes patogénicas distintas (Figura 5 y Tabla 13).

En el año 2005 se reportó el primer caso de mosaicismo somático en el gen *NLRP3* por secuenciación de Sanger, en un paciente con manifestaciones clínicas de CAPS, que presentaba resultados negativos para variantes genéticas de línea germinal en *NLRP3* (Lucherini *et al.*, 2018) (Moghaddas y Masters, 2018)

Se ha descrito que hasta un 10% de pacientes con FCAS, un 25% con MWS y hasta un 50% de pacientes con NOMID/CINCA no presentan variantes de línea germinal en el gen *NLRP3* (Booshehri y Hoffman, 2019), la mayoría de ellos mostrando mosaicismo genético con restricción celular o tisular dentro del linaje mieloide, por lo que las células que presentan la variante genética representan <10% del total de células accesibles (Hashkes *et al.*, 2019).

Interesantemente, se han descrito variantes en residuos de aminoácidos inmediatamente adyacentes que causan subfenotipos distintos de criopirinopatías, por ejemplo, la variante L353P se ha asociado con FCAS, mientras que la variante A352V se ha asociado con MWS (Aksentijevich y Kastner, 2011). Incluso, se ha observado que ciertas variantes que alteran el mismo aminoácido pueden ser asociadas con los tres subfenotipos de CAPS.

Asimismo, se han reportado variantes de baja penetrancia como Q703K, R488K y V198M hasta en un 10% de cohortes control (Hashkes *et al.*, 2019), no obstante, se han descrito también dichas variantes en pacientes con sintomatología clásica y atípica de CAPS (Efthimiou *et al.*, 2019), por lo que su significancia funcional es controversial.

A pesar de que se ha evidenciado cierta correlación genotipo-fenotipo en CAPS en pacientes que presentan la misma variante y que están cercanos en el espectro clínico, se ha reportado heterogeneidad fenotípica en miembros de una misma familia que incluso portan la misma variante, por ejemplo, la variante E311K asociada a MWS (Hashkes *et al.*, 2019).

Dado la alta heterogeneidad fenotípica, se ha postulado que podría haber otros mecanismos amplificadores de la enfermedad, como regulación epigenética (Lucherini *et al.*, 2018), por ejemplo, pacientes con CAPS sin abordaje terapéutico presentan una demetilación de ADN incrementada de genes asociados al inflammasoma como *IL1B*, *IL1RN* y *ASC* (Moghaddas y Masters, 2018).

Se han identificado ciertos alelos de riesgo elevado relacionados con manifestaciones orgánicas severas y tempranas (Efthimiou *et al.*, 2019), como las variantes genéticas T348M, E311K y A439V ubicadas en el exón 3 (Figura 5), que se han asociado con pérdida auditiva neurosensorial y sordera temprana (Kuemmerle-Deschner *et al.*, 2013).

Además, se ha evidenciado que las variantes ubicadas en los dominios LRRs, los cuales están codificados del exón 4 al exón 9, se asocian con manifestaciones clínicas atípicas y un fenotipo de menor severidad (Aksentijevich y Kastner, 2011).

En el 2016, se describió un fenotipo heterogéneo que se presenta con urticaria inducida por frío, conjuntivitis y uveítis anterior asociado a la variante A439V, por lo que se planteó como un síndrome de traslape FCAS-MWS (Sobolewska *et al.*, 2016).

Se ha reportado el hallazgo simultáneo de variantes en los genes *MEFV* y *NLRP3*, que probablemente no tengan un efecto sinérgico, pero que puede resultar en potenciales interacciones locus-locus y fenotipos de herencia digénica (Neocleous *et al.*, 2016).

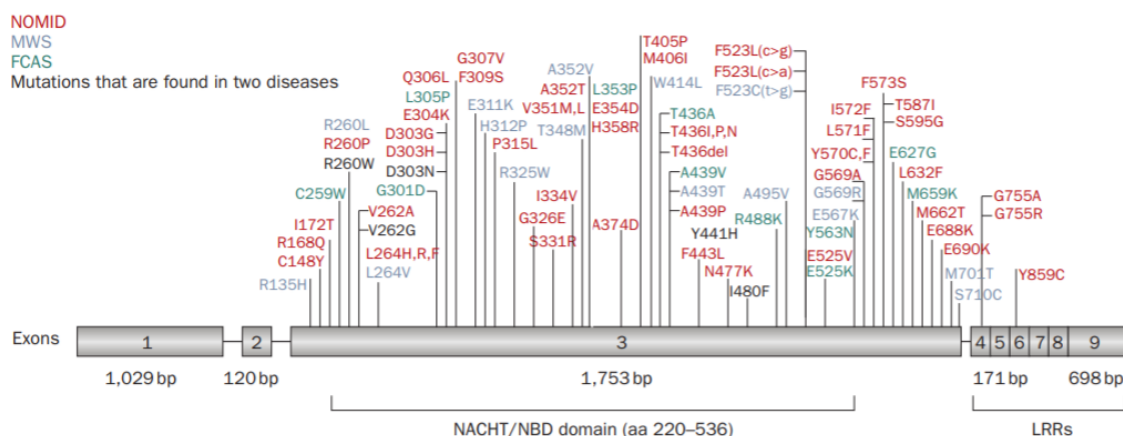
Es importante considerar que se han asociado ciertas variantes en el gen *NLRP3* con otras entidades clínicas no incluidas actualmente en el espectro clínico de CAPS. Por ejemplo, la variante heterocigota tipo transición con cambio de sentido R198Q, localizada en el exón 7, se ha asociado con la sordera autosómica dominante 34 con o sin inflamación

(DFNA34, por sus siglas en inglés) (OMIM #617772), que se presenta sin manifestaciones sistémicas de CAPS (Nakanishi *et al.*, 2017).

Asimismo, la variante D21H en el exón 1 del gen *NLRP3*, que resulta en la sustitución con cambio de sentido por transversión y posterior cambio en un residuo de histidina altamente conservado, se ha asociado con la keratoendotelitis fugax hereditaria (KEFH, OMIM #148200), que se presenta sin otras manifestaciones sistémicas asociadas al espectro de CAPS (Turunen *et al.*, 2018).

Actualmente, se han registrado en la base de datos InFever (asociada a la ISSAID) un total 248 variantes del gen *NLRP3*, en distintos loci como en los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; los intrones 1, 2, 4, 6 y 8 y regiones no codificantes como 3'-UTR y 5'-UTR. (<https://infevers.umai-montpellier.fr/web/index.php>) (Accesado en abril del 2021). Según la clasificación de la ACMG, las 248 variantes reportadas en el gen *NLRP3* se clasifican de la siguiente forma:

- 20 variantes patogénicas (ubicadas en el exón 3 y exón 4)
- 93 variantes probablemente patogénicas
- 47 variantes de significado incierto (VUS, por sus siglas en inglés)
- 37 variantes probablemente benignas
- 16 variantes benignas
- 29 variantes sin clasificar
- 6 variantes sin resolver



**Figura 6.** Representación esquemática de variantes en el gen *NLRP3* asociadas a CAPS (FCAS, MWS y NOMID/CINCA). Adaptado de Aksentijevich y Kastner, 2011.

**Tabla 13.** Variantes patogénicas asociadas a CAPS registradas en la base de datos InFever.

<b>Nombre común</b>	<b>Variante nucleotídica según HGVS<sup>a</sup></b>	<b>Alteración proteica según HGVS</b>	<b>Localización</b>
R260W	c.778C>T	p.(Arg260Trp)	Exón 3
R260L	c.779G>T	p.(Arg260Leu)	Exón 3
R260P	c.779G>C	p.(Arg260Pro)	Exón 3
L264H	c.791T>A	p.(Leu264His)	Exón 3
D303N	c.907G>A	p.(Asp303Asn)	Exón 3
D303G	c.908A>G	p.(Asp303Gly)	Exón 3
E304K	c.910G>A	p.(Glu304Lys)	Exón 3
L305P	c.914T>C	p.(Leu305Pro)	Exón 3
T348M	c.1043C>T	p.(Thr348Met)	Exón 3
A352V	c.1055C>T	p.(Ala352Val)	Exón 3
T436I	c.1307C>T	p.(Thr436Ile)	Exón 3
A439V	c.1316C>T	p.(Ala439Val)	Exón 3
F444V	c.1330T>G	p.(Phe444Val)	Exón 3
F523C	c.1568T>G	p.(Phe523Cys)	Exón 3
G569R	c.1705G>C	p.(Gly569Arg)	Exón 3
E627G	c.1880A>G	p.(Glu627Gly)	Exón 3
L632F	c.1896G>T	p.(Leu632Phe)	Exón 3
M659K	c.1976T>A	p.(Met659Lys)	Exón 3
G755RG>C	c.2263G>C	p.(Gly755Arg)	Exón 4
G755RG>A	c.2263G>A	p.(Gly755Arg)	Exón 4

## **CAPÍTULO 6**

## **6. Métodos moleculares más utilizados actualmente para el diagnóstico de las enfermedades autoinflamatorias clásicas monogénicas.**

### 6.1 Secuenciación de Sanger

La secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye la determinación exacta por métodos de biología molecular, de la estructura primaria de la molécula del ADN, es decir, la determinación del orden de sus cuatro componentes químicos básicos o nucleótidos, que están compuestos por desoxirribosa, un grupo fosfato y que difieren en su base nitrogenada (adenina, citosina, guanina y timina).

Clínicamente la utilidad de la secuenciación radica en la determinación de alteraciones en la secuencia del ADN como variantes puntuales, inserciones/deleciones (INDELs) y CNV, alteraciones que pueden ser diagnósticas de ciertas enfermedades genéticas.

Específicamente, la secuenciación de Sanger o secuenciación de primera generación, es un método de secuenciación basado en síntesis desarrollado en 1977, que se basa en el uso de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs, por sus siglas en inglés) químicamente modificados, sin el grupo 3'-OH, que son conocidos como dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs, por sus siglas en inglés) (Sanger *et al.*, 1977).

Los ddNTPS (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) al ser incorporados por la ADN polimerasa detienen la síntesis de ADN, pues la enzima requiere de un grupo 3'-OH libre para la extensión de la cadena de ADN (Sanger *et al.*, 1977).

La secuenciación de Sanger requiere una desnaturalización previa del ADN, seguido de una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y luego la reacción de secuenciación, en la que se agrega una mezcla definida de dNTPs y ddNTPs marcados con fluorocromos, los últimos funcionan como terminadores de la síntesis de ADN.

Por consenso, los ddNTPs corresponden a los siguientes colores de fluorescencia: ddATP (verde), ddCTP (azul), ddGTP (amarillo) y ddTTP (rojo). Los dNTPs son utilizados por la enzima ADN polimerasa para sintetizar una nueva cadena de ADN. En el momento que se incorpora un ddNTP, termina la síntesis de ADN y se generan fragmentos de ADN de distinto tamaño y finalizados por los ddNTPs en cada una de las posiciones de nucleótidos (Jackson *et al.*, 2018).



Es así que al añadir ddNTPs se van a producir millones de fragmentos de ADN que difieren en una base de longitud, que luego son separados por tamaño en electroforesis capilar, dado que por movilidad electroforética se desplazan más rápidamente las cadenas de ADN de menor longitud (Gomes y Korf, 2018).

El color de fluorescencia asociado a cada fragmento de ADN va a ser detectado y registrado por un láser y un sistema óptico, esta información en conjunto con el tamaño del fragmento posibilita la generación de un electroferograma e identificar así la secuencia del ADN analizado (Gomes y Korf, 2018).

Propiamente, en el electroferograma se grafican los fragmentos de ADN separados por tamaño e identificados por color de fluorescencia (Jackson *et al.*, 2018), los picos sucesivos representan fragmentos que son un nucleótido más largo que el anterior y mediante la fluorescencia se identifica el nucleótido en cada posición del ADN.

Actualmente, la secuenciación de Sanger es una herramienta molecular que es usada para validar variantes genéticas identificadas por NGS en casos en los que la veracidad de la variante hallada está en duda (Hagemann, 2015), como en casos en que la presencia de la variante no sea biológicamente posible.

Además, la secuenciación de Sanger se usa para análisis de genes individuales o pequeñas regiones específicas, así como para resecuenciar regiones con una cobertura de secuenciación muy baja obtenida por NGS (Hagemann, 2015).

Respecto a las limitaciones de la técnica, resalta que es una metodología que puede resultar de alto costo por base secuenciada respecto a metodologías de secuenciación masiva (Gomes y Korf, 2018), por lo que está orientada principalmente a genes específicos o a un grupo pequeño de genes. Asimismo, presenta limitaciones para detectar variantes somáticas de baja frecuencia alélica debido a su profundidad de secuenciación.

El uso de secuenciación de Sanger en el diagnóstico de enfermedades autoinflamatorias debe ser orientado a pacientes que manifiestan un fenotipo clínico altamente sugestivo. Las variantes que son identificadas por secuenciación de Sanger incluyen variantes silentes, con cambio de sentido, sin sentido, pequeñas INDELS y variantes de splicing.

Se debe considerar que es posible obtener resultados falsos negativos por heterogeneidad genética, modos de herencia complejos, mosaicismo genético, rendimiento limitado de la técnica molecular para regiones génicas específicas, o variantes distintas a sustituciones de un solo nucleótido o INDELS (Hashkes *et al.*, 2019).

## 6.2 Secuenciación de Nueva Generación

La Secuenciación de Nueva Generación (NGS) permite el estudio simultáneo de millones de secuencias en múltiples pacientes al ser una herramienta de secuenciación masiva multiparalela, y que gracias a su comercialización desde el año 2005 ha permitido plantear un nuevo paradigma de la forma de secuenciar genomas en la práctica clínica para el diagnóstico de enfermedades de base genética (Rubio *et al.*, 2020).

Actualmente, existen distintas plataformas con distintas metodologías para la implementación de NGS, como Ion Torrent e Illumina, que en los últimos años han sido de las tecnologías más utilizadas y brindan una secuenciación de alto rendimiento y un menor costo por base.

En general, el proceso de secuenciación implica inicialmente extracción de ADN, cuantificación fluorométrica y la preparación de una librería de fragmentos de ADN, en la que se requiere previamente de una fragmentación del ADN.

Luego, se ligan los fragmentos obtenidos a adaptadores (oligonucleótidos de secuencia conocida) en sus extremos (Yohe y Thyagarajan, 2017), para realizar una amplificación clonal de cada fragmento de ADN. Además, se pueden añadir secuencias índice para diferenciar cada muestra y así procesar varias muestras paralelamente en un mismo ensayo.

Posteriormente, ambas plataformas se basan en la determinación de la secuencia de nucleótidos en el método de secuenciación por síntesis. Para ello, la librería de fragmentos se utiliza como plantilla para sintetizar un nuevo fragmento de ADN, en ciclos de incorporación de nucleótidos que son detectados por distintas metodologías.

#### 6.2.1.1 Ion Torrent: Amplificación clonal de librerías genómicas

Luego de la preparación de la librería genómica, se realiza una amplificación clonal por PCR. La plataforma de Ion Torrent utiliza PCR en emulsión para amplificar los fragmentos unidos a microesferas (Berglund *et al.*, 2011). Estas microesferas se encuentran en una emulsión aceite-agua y están recubiertas de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores de los fragmentos de ADN.

A partir del fragmento unido a la microesfera, la ADN polimerasa sintetiza una cadena reversa, y luego de la amplificación se liberan las cadenas complementarias, quedando millones de copias de un mismo fragmento de ADN, proceso que se repite en miles de microesferas que luego son colocadas en pocillos individuales para iniciar la secuenciación (Rubio *et al.*, 2020).

#### 6.2.1.2 Ion Torrent: Secuenciación

La secuenciación por Ion Torrent se basa en la detección de cambios de pH en un chip semiconductor, al liberarse iones de  $H^+$  tras la incorporación del nucleótido al fragmento de ADN en síntesis (Quail *et al.*, 2012), y esta tecnología representa la primera plataforma de NGS sin detección por sensor óptico.

Detalladamente, tras la unión del nucleótido complementario a la cadena de ADN, se forma un enlace covalente que libera un ión  $H^+$ , moléculas que poseen carga eléctrica positiva, por lo que se genera un cambio de pH de la solución del pocillo (Rubio *et al.*, 2020).

La corriente eléctrica generada es detectada por un sensor ISFET (del inglés, *Ion-Sensitive Field-Effect Transistor*) y un elemento CMOS (del inglés, *Integrated Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*) (Goodwin *et al.*, 2016). Si el nucleótido no es complementario, se agrega otro hasta que haya detección de voltaje, en caso de haber regiones de homopolímeros, el pH disminuye y el voltaje aumenta proporcionalmente al número de nucleótidos detectados (Buermans y den Dunnen., 2014).

### 6.2.2.1 Illumina: Amplificación clonal de librerías genómicas

En Illumina se utiliza PCR en puente, para amplificar clonalmente los fragmentos unidos a la superficie de una celda de flujo separada por carriles (Quail *et al.*, 2012). Cada carril de la celda de flujo está recubierto de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores en los extremos de los fragmentos a amplificar, lo que permite su unión.

Tras la unión de los fragmentos, la ADN polimerasa sintetiza la cadena reversa complementaria, se retira la cadena original, la cadena reversa se dobla sobre sí misma y se une a su oligonucleótido complementario quedando en forma de puente (Rubio *et al.*, 2020).

Luego, a partir de la cadena reversa plegada, la ADN polimerasa sintetiza nuevamente una cadena complementaria idéntica a la cadena original (Rubio *et al.*, 2020), y el proceso se repite masivamente para formar clústeres con millones de copias de cada fragmento de ADN.

### 6.2.2.2 Illumina: Secuenciación

En la tecnología Illumina, la secuenciación se basa en la detección de la fluorescencia derivada de la incorporación de dNTPs modificados químicamente para actuar como terminadores reversibles, al tener acoplados un fluorocromo en la posición 3'-OH (Quail *et al.*, 2012).

Posterior a finalizar la amplificación clonal, se remueven las cadenas reversas y quedan las cadenas de ADN con secuencia idéntica a la original, y a partir de las mismas, se inician los ciclos de secuenciación. En cada ciclo, se va a agregar una mezcla de los cuatro dNTPs individualmente marcados con un fluorocromo, bloqueados en el extremo 3'-OH para evitar unión de otro nucleótido (Rubio *et al.*, 2020).

Tras la incorporación de un único nucleótido a la cadena complementaria, se remueven los dNTPs no incorporados y se registra la fluorescencia para identificar así el dNTP incorporado (Goodwin *et al.*, 2016). Para iniciar un nuevo ciclo, el fluorocromo debe removerse antes de la incorporación del siguiente dNTP y este proceso se repite paralelamente con todas las cadenas de ADN del clúster.

### 6.2.3 Análisis bioinformático de los datos generados

Una vez finalizada la secuenciación, los datos generados deben ser analizados por herramientas bioinformáticas. Actualmente, existen muchas herramientas disponibles en línea de libre acceso y paquetes de software para los análisis bioinformáticos de los datos generados.

En general, el análisis bioinformático requiere de demultiplexación en el que los *reads* son clasificados por secuencias índice y se analiza la calidad de los datos (archivo FASTQ), se mapean los *reads* contra un genoma de referencia (archivo BAM) y se anota/identifica la variante y se determina su fracción alélica (archivo VCF) (Yohe y Thyagarajan, 2017).

En las tecnologías de secuenciación por NGS es muy relevante considerar la cobertura y profundidad de secuenciación, y su valor depende de la aplicación de NGS (paneles de genes, secuenciación del exoma completo, secuenciación del genoma completo) y la frecuencia alélica de las variantes (Rubio *et al.*, 2020).

La cobertura hace referencia al porcentaje de bases del genoma consenso o de referencia que están siendo secuenciadas cierta cantidad de veces (Sims *et al.*, 2014), mientras que la profundidad se refiere al promedio de veces que cada base del genoma consenso es secuenciada en los fragmentos de ADN (Sims *et al.*, 2014).

El preprocesamiento de los datos generados también debe incluir la eliminación de los adaptadores y de los *reads* de baja calidad (Hashkes *et al.*, 2019), así como el mapeo de los *reads* contra una secuencia de referencia validada para determinar errores en la secuenciación y corroborar la calidad de los datos (Moghaddas y Masters, 2018).

Luego, se deben determinar la presencia de variantes genéticas, corroborar su registro en bases de datos como InFevers, ClinVar, OMIM y HGMD para evaluar la asociación de la variante hallada con una enfermedad (Rubio *et al.*, 2020).

Ciertas herramientas bioinformáticas como PolyPhen o MutationTaster pueden predecir *in-silico* el efecto biológico de la variante genética en la proteína codificada y su funcionalidad. Se pueden buscar reportes de casos clínicos relacionados con las variantes genéticas halladas para verificar si hay asociación patogénica (Rubio *et al.*, 2020).

Además, se puede secuenciar el genoma de familiares si existen dudas de la significancia clínica de las variantes genéticas halladas, así como confirmar hallazgos con otras técnicas como secuenciación de Sanger (Strom *et al.*, 2014).

NGS permite abarcar un espectro de variantes genéticas más amplio como inversiones, traslocaciones y duplicaciones, mientras que la secuenciación por Sanger está dirigido básicamente a sustituciones de un sólo nucleótido (SNV, por sus siglas en inglés) y pequeñas INDELS (Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012).

NGS presenta limitaciones en la amplificación clonal por PCR en regiones con un alto contenido de G/C, repeticiones en tándem y secuencias altamente homólogas como duplicaciones segmentarias, que complican el mapeo de reads (Behjati y Tarpey, 2013).

Además, a diferencia de la secuenciación de Sanger, la NGS tiene una mayor sensibilidad para detectar variantes somáticas, que al ser de origen postzigótico se presentan en solo una proporción de la población celular (Behjati y Tarpey, 2013), incluso es posible aumentar la sensibilidad diagnóstica de la técnica de NGS incrementando la profundidad de secuenciación.

De hecho, se han reportado casos de pacientes diagnosticados clínicamente como NOMID/CINCA y MWS, con ausencia de variantes en *NLRP3*, lo que podría estar asociados a variantes somáticas (Nishikomori *et al.*, 2019), variantes que pueden ser determinadas por NGS dada su mayor cobertura de secuenciación.

Sin embargo, las limitaciones de las NGS, especialmente WGS incluye una menor cobertura de secuenciación en relación a la secuenciación de Sanger, por lo que se podría pasar por alto ciertas regiones con variantes significativas (Rubio *et al.*, 2020). Además, hay una disminución significativa de la longitud de los *reads* generados, que dificulta el análisis de datos (Rubio *et al.*, 2020).

### 6.3 Aplicaciones de NGS: Secuenciación dirigida, secuenciación del exoma y del genoma completo.

#### 6.3.1 Secuenciación dirigida por NGS: paneles de genes y exoma clínico

La secuenciación dirigida por paneles de genes analiza principalmente regiones codificantes de un grupo determinado y específico de genes o de regiones génicas de interés que tienen asociación con vías fisiopatológicas o fenotipo clínico en común (Yohe y Thyagarajan, 2017). Generalmente, representa la primera opción de evaluación de desórdenes genéticos.

El uso de paneles de genes por NGS está orientado a casos en los que los pacientes presenten un fenotipo clínico congruente con una enfermedad genética (Rubio *et al.*, 2020), como las enfermedades autoinflamatorias monogénicas. Las casas comerciales pueden ofrecer paneles con genes preseleccionados para investigación o práctica clínica o incluso se pueden personalizar para incluir regiones de interés.

Los paneles de genes por NGS se basan en la capacidad de capturar regiones específicas del genoma basado en dos metodologías de enriquecimiento (Bewicke-Copley *et al.*, 2019):

- Fragmentación e hibridación de los fragmentos de ADN con sondas complementarias biotiniladas que son capturadas por esferas con estreptavidina,
- PCR multiplex con primers específicamente diseñados para amplificar solo las regiones de interés lo que permite realizar un tamizaje en distintos genes simultáneamente.

En general, la metodología de captura por hibridación permite una selección de genes con mayor uniformidad y precisión, mientras que la metodología por PCR multiplex se usa en ensayos a baja escala, tiene menor costo y requiere menor cantidad de muestra inicial. (Bewicke-Copley *et al.*, 2019).

Actualmente, los paneles de genes son utilizados para el estudio de enfermedades con alta heterogeneidad genética, enfermedades que comparten manifestaciones clínicas, de difícil diagnóstico diferencial o enfermedades que son producidas por alteración de una vía común (Santillán-Garzón *et al.*, 2015), como por ejemplo las inflamomas.

Respecto a otras aplicaciones de NGS, los paneles de genes son comercializados con un menor costo económico, presentan una mayor profundidad de secuenciación, alta precisión y sensibilidad, hay menor probabilidad de hallazgos de VUS, tienen posibilidad de escalabilidad, reducen la carga biocomputacional y a su vez, el tiempo de los análisis de los resultados (Cifaldi *et al.*, 2019).

En virtud de su alta profundidad de secuenciación, los paneles de genes por NGS permiten determinar variantes patogénicas que se presenten en una fracción de la población celular como las variantes somáticas, que se presentan con frecuencias alélicas bajas (Bewicke-Copley *et al.*, 2019).

Las limitaciones de los paneles de genes por NGS incluyen que la determinación de variantes se restringe a los genes previamente seleccionados, requieren de actualizaciones constantes conforme se describen nuevas entidades clínicas y además no son capaces de detectar ciertas variantes como variantes estructurales y CNVs (Seleman *et al.*, 2017).

Los paneles de genes de NGS determinan principalmente variantes exónicas de los genes incluidos en el panel, no obstante, es posible incluir el análisis de variantes en regiones intrónicas, intergénicas, reguladoras o promotoras con asociación clínica (Dilliot *et al.*, 2018), excluyendo el análisis de variantes genéticas irrelevantes que pueden interferir en el diagnóstico molecular.

### 6.3.2 Secuenciación del exoma clínico

Una estrategia de análisis molecular que actualmente está incrementando su uso en la práctica clínica, para desórdenes genéticos heterogéneos, es la secuenciación del exoma clínico, que se basa en la determinación de variantes genéticas en regiones de genes con relevancia clínica (Lee *et al.*, 2014), basado en lo indicado por bases de datos de referencia como HGMD, HGNC, ClinVar y OMIM, así como lo sugerido por expertos en el tema.

El grupo de genes incluidos en estos paneles varía según la casa comercial, particularmente los paneles desarrollados para enfermedades autoinflamatorias incluyen genes asociados con las enfermedades autoinflamatorias monogénicas de mayor prevalencia como FMF, TRAPS y CAPS, pero también con otras enfermedades autoinflamatorias como SAVI, SMS, SPENCD, AGS, RVCL, entre otras.



En el contexto de Costa Rica, actualmente se tiene disponible en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Hospital Nacional de Niños el panel dirigido para secuenciación del exoma clínico denominado TruSight One Sequencing Panel (Illumina, San Diego, California, USA).

Este panel de genes incluye el análisis de 4811 genes con relevancia clínica y aproximadamente 62000 exones, que se procesa en el secuenciador de Illumina MiSeq<sup>TM</sup> con una cobertura  $\geq 20X$  para el 95% de las regiones génicas en estudio. Particularmente, este panel de secuenciación dirigida incluye 66 genes asociados a enfermedades autoinflamatorias tanto monogénicas como poligénicas (Batlle-Masó *et al.*, 2020).

Específicamente, este panel de secuenciación dirigida incluye los genes asociados a las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas descritos en esta revisión bibliográfica (*MEFV*, *TNFRSF1A* y *NLRP3*) a excepción del gen *MVK*.

A pesar de que específicamente este análisis del exoma clínico no incluye todos los genes candidatos causales, se ha validado recientemente como un ensayo de secuenciación dirigida apropiado para detectar variantes patogénicas y probablemente patogénicas de enfermedades autoinflamatorias monogénicas en general (Batlle-Masó *et al.*, 2020).

No obstante, comercialmente el gen *MVK* está incluido en otro panel de secuenciación dirigida ampliado, el cual analiza 6794 genes y aproximadamente 86000 exones, denominado TruSight One Expanded Sequencing Panel (Illumina, San Diego, California, USA) y que eventualmente podría ser utilizado en el país.

Además, en el Hospital Nacional de Niños se dispone de otro panel comercial de 200 genes para secuenciación dirigida denominado Inmunodeficiencias-GeneSGKit<sup>®</sup> (Ascires Sistemas Genómicos, Valencia, España) orientado a la determinación de variantes genéticas asociadas a los principales errores innatos de la inmunidad según IUIS, en las que se incluye las enfermedades autoinflamatorias. En este panel de genes se incluyen los genes *MEFV*, *TNFRSF1A*, *NLRP3* y *MVK*, así como otros genes asociados a distintos desórdenes inmunológicos.

### 6.3.3 Secuenciación del exoma y del genoma completo por NGS

#### 6.3.3.1 Secuenciación del exoma completo

La secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés) está orientado al análisis de los exones o regiones codificantes de los genes, es decir, las regiones que posterior a la transcripción formarán parte del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y que se traducirán a una proteína.

Por lo general, WES abarca más del 90% del exoma humano y se utiliza como segunda línea de evaluación de desórdenes genéticos, en los que los resultados de secuenciación dirigida por NGS se reportan como no concluyentes o no informativos (Yohe y Thyagarajan, 2017).

Las NGS en general han permitido un gran avance en la identificación de variantes de genes asociados a enfermedades autoinflamatorias de reciente descubrimiento, pues casi una tercera parte de los genes causales de enfermedades autoinflamatorias hereditarias se han descubierto por NGS (Hashkes *et al.*, 2019).

El uso de WES se basa en que un 85% de las variantes patogénicas asociadas a enfermedades genéticas se han hallado en regiones codificantes del genoma. Dado que el exoma está conformado por aproximadamente 30 000 genes o un 1-2% del total del genoma humano (Seleman *et al.*, 2017), es posible secuenciarlo con una mayor profundidad de secuenciación y a un menor costo respecto a WGS.

Las limitaciones de WES incluyen que el paso de enriquecimiento no es homogéneo en todas las regiones del ADN debido a variaciones en el contenido G/C, secuencias de alta homología y repeticiones de nucleótidos (Richardson *et al.*, 2018).

Además, WES no abarca regiones intrónicas o reguladoras en las que se pueden hallar variantes patogénicas y dada la gran cantidad de exones evaluados presenta una disminución en la cobertura de secuenciación por capturas incompletas del genoma (Seleman *et al.*, 2017), lo que puede derivar en resultados falsos negativos.

Dado que por WES y por secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) se pueden identificar numerosas variantes e incluso nuevos genes causales (Rowczenio y Lachman, 2019), se ha sugerido complementar estos análisis con estudios familiares y estrategias que permitan priorizar variantes potencialmente patogénicas (Moghaddas y Masters, 2018).

### 6.3.3.2 Secuenciación del genoma completo

Las distintas plataformas de NGS se han comercializado desde el año 2012 en el contexto de enfermedades autoinflamatorias, y esto ha permitido un incremento exponencial de la descripción de nuevas entidades clasificadas en este grupo de enfermedades (Moghaddas y Masters, 2018), que se concibió como grupo de enfermedades hace apenas 22 años.

El Colegio Americano de Genética Médica y Genómica recomienda confirmar los resultados de NGS por otras metodologías independientes, cuando la tasa de falsos positivos es alta o no ha sido establecida claramente, especialmente con WES y WGS. (Stoddard *et al.*, 2014).

Propiamente, el análisis por WGS contempla la totalidad del genoma humano (3,2 billones de pares de bases), lo que incluye tanto regiones codificantes como no codificantes, por lo que se sugiere para pacientes con alta sospecha clínica de una enfermedad autoinflamatoria monogénica y que no ha sido diagnosticado luego de otros análisis genéticos (Rowczenio y Lachman, 2019).

La selección entre WGS y WES dependerá de varios factores, como el costo económico y el nivel de cobertura de secuenciación requerido. Una de las ventajas de WGS reside en su particularidad de que no requiere enriquecimiento por hibridación o PCR (Richardson *et al.*, 2018), por lo que brinda una cobertura genómica más homogénea.

Además, WGS a su vez brinda menor sesgo para determinar variantes estructurales o CNVs, que igualmente se sugiere que deben ser corroborados por otras metodologías como amplificación por sondas dependientes de ligandos múltiples (MLPA, por sus siglas en inglés) (Richardson *et al.*, 2018).

La utilidad de WGS radica en el contexto clínico en el que se sospecha de una probable causa genética para un fenotipo clínico que no está claramente establecido, y que eventualmente el gen candidato no está contenido en opciones como la secuenciación dirigida por paneles de genes (Gomes y Korf, 2018).

Asimismo, por WGS es posible determinar variantes genéticas en regiones con un alto contenido G/C, secuencias compartidas con pseudogenes y revelar nuevos genes candidatos asociados a una entidad clínica (Chinn *et al.*, 2019).

Las limitaciones de la WGS residen en su alto costo económico, menor cobertura de secuenciación, mayor tasa de errores de secuenciación y gran volumen de datos generados que requieren de un análisis computacional sumamente complejo (Seleman *et al.*, 2017), que a su vez requiere una gran capacidad de almacenamiento de datos y de personal especializado en el área de bioinformática (Chinn *et al.*, 2019).

Además, con una mayor frecuencia que las otras aplicaciones de NGS, se suelen hallar variantes de significado clínico incierto o de potenciales hallazgos genéticos incidentales (Gomes y Korf, 2018), por lo que actualmente no está muy extendido a nivel regional su uso en la práctica clínica.

El análisis molecular brinda confirmación genética del diagnóstico de enfermedades autoinflamatorias, que en un contexto clínico congruente y con el hallazgo de variantes genéticas, por homocigosidad o heterocigosidad compuesta, confirma el diagnóstico (Federici *et al.*, 2012). Sin embargo, dado que se han reportado cientos de variantes y muchas de estas sin un papel patogénico claro, se debe hacer una interpretación clínica meticulosa de los resultados genéticos (Marino *et al.*, 2020).

## **7. Conclusiones y perspectivas futuras**

Dado que las enfermedades autoinflamatorias son un grupo complejo de desórdenes genéticamente diversos, de relativamente reciente descripción, que se pueden presentar con manifestaciones que se pueden solapar con otras entidades clínicas, frecuentemente no son consideradas en el diagnóstico diferencial de los pacientes que portan estas enfermedades.

Por ello, en esta investigación se realizó una revisión bibliográfica de los aspectos clínicos, inmunopatológicos y moleculares más relevantes de las enfermedades autoinflamatorias monogénicas clásicas, con el fin de recopilar información biomédica actualizada, que pretende orientar a los clínicos de nuestro país a brindar un correcto abordaje diagnóstico que impacte positivamente en un posterior abordaje terapéutico.

En síntesis, se describieron puntualmente aspectos clínicos como el fenotipo general, manifestaciones clínicas, complicaciones secundarias, hallazgos de laboratorio, intervenciones terapéuticas y patogénesis molecular involucrada, así como criterios de clasificación y diagnóstico recientemente propuestos para las enfermedades autoinflamatorias históricamente conocidas como fiebres periódicas hereditarias.

Además, se determinaron detalladamente las principales variantes patogénicas descritas para las enfermedades autoinflamatorias monogénicas estudiadas en esta investigación, así como su principal modo de herencia, penetrancia genética, potenciales hotspots mutacionales, alelos de riesgo, asociaciones fenotipo-genotipo, tipos de variantes genéticas y frecuencia alélica, lo que permitiría orientar un abordaje genético a los pacientes sospechosos que presenten un fenotipo congruente con estas enfermedades.

Asimismo, se describieron detalladamente los métodos moleculares más utilizados actualmente para el diagnóstico de las enfermedades autoinflamatorias, como lo es la secuenciación de Sanger, NGS y sus aplicaciones como secuenciación dirigida por paneles de genes, WES y WGS, respecto a aspecto como principios de las metodologías, principales opciones de plataformas de secuenciación en el mercado, ventajas y limitaciones, así como su disponibilidad para diagnóstico molecular en Costa Rica.

De lo anteriormente expuesto, surge la necesidad de abordar con una evaluación clínica exhaustiva a aquellos pacientes sospechosos de padecer de enfermedades autoinflamatorias, considerando aspectos relevantes de la presentación clínica, historia familiar así como el origen poblacional, que en conjunto pueden orientar correctamente hacia el diagnóstico molecular y definitivo de su enfermedad, así como a la evaluación de otros miembros de la familia, al diagnóstico prenatal y al asesoramiento genético familiar.

Es importante difundir ampliamente en la comunidad médica la información clínica, inmunológica y genética sobre estas enfermedades, así como los métodos moleculares diagnósticos que pueden precisar la confirmación de la etiología subyacente, no obstante, se debe considerar posibles escenarios en los que esto puede representar un reto mayor, como los fenómenos de mosaicismo y modificadores epigenéticos y/o ambientales, en los que aspectos clínicos como el fenotipo, historia clínica y antecedentes familiares adquieren aún mayor relevancia en el abordaje diagnóstico.

Dada la baja frecuencia, reciente descripción y poca difusión de estas enfermedades, usualmente no son consideradas dentro del diagnóstico diferencial de las fiebres de origen desconocido, lo que consecuentemente puede derivar un potencial subregistro, importantes retrasos diagnósticos y aunado a esto un abordaje terapéutico inapropiado por hasta décadas, lo que impacta negativamente en la calidad de vida de los pacientes con enfermedades autoinflamatorias.

Uno de los principales retos en Costa Rica de la implementación a mayor escala de los métodos moleculares diagnósticos, como la secuenciación de Sanger y las distintas aplicaciones de NGS, reside en su relativamente alto costo de equipos, reactivos e insumos, así como la necesidad de requerir personal especializado y calificado para la interpretación de variantes genéticas.

No obstante, es importante resaltar que ya se han dado avances importantes en ciertos laboratorios clínicos que poseen la infraestructura y el personal para incursionar en la biología molecular aplicada a la práctica clínica, por lo que a futuro con una mayor difusión de la información de este grupo de enfermedades, pueden brindar apoyo a médicos especialistas como inmunólogos, reumatólogos, pediatras y genetistas con el diagnóstico molecular de las enfermedades autoinflamatorias para un correcto diagnóstico definitivo y un abordaje terapéutico dirigido.

## Referencias bibliográficas

- Abdul-Sater, A. A., & Philpott, D. J. (2016). Inflammasomes. *Encyclopedia of Immunobiology*, 2(II), 447–453. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.10020-7>
- Aksentijevich, I., Nowak, M., Mallah, M., Chae, J. J., Watford, W. T., Hofmann, S. R., ...Goldbach-Mansky, R. (2002). De Novo CIAS1 Mutations, Cytokine Activation , and Evidence for Genetic Heterogeneity in Patients With Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID). *Arthritis & Rheumatology*, 46(12), 3340–3348. <https://doi.org/10.1002/art.10688>
- Aksentijevich, I., & Kastner, D. L. (2011). Genetics of monogenic autoinflammatory diseases: Past successes, future challenges. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(8), 469–478. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.94>
- Aróstegui, J. I. (2011). Enfermedades autoinflamatorias sistémicas hereditarias. *Reumatologia Clinica*, 7(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2010.01.010>
- Bashardoust, B. (2015). Familial Mediterranean fever; diagnosis, treatment, and complications. *Journal of Nephro pharmacology*, 4(1), 5–8.
- Batlle-Masó, L., Mensa-Vilaró, A., Solís-Moruno, M., Marquès-Bonet, T., Arostegui, J. I., & Casals, F. (2020). Genetic diagnosis of autoinflammatory disease patients using clinical exome sequencing. *European journal of medical genetics*, 63(5), 103920. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103920>
- Beck, D. B., & Aksentijevich, I. (2019). Biochemistry of autoinflammatory diseases: Catalyzing monogenic disease. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00101>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Bewicke-Copley, F., Arjun, E., Palladino, G., Korfi, K., & Wang, J. (2019). Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1348–1359. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.10.004>
- Booshehri, L. M., & Hoffman, H. M. (2019). CAPS and NLRP3. *Journal of Clinical Immunology*, 39(3), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00638-z>
- Buelvas Jiménez, N., Suárez Useche, R. (2015). Regulación del inflammasoma NLRP3: bioquímica y más allá de ella. *Abr-Jun IATREIA*, 28(2), 170–180. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n2a07.170>
- Buermans, H. P., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>

- Çakan, Mustafa & Ayaz, Nuray & Keskindemirci, Gonca & Karadağ, Şerife Gül. (2017). Two cases of periodic fever syndrome with coexistent mevalonate kinase and Mediterranean fever gene mutations. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 59(4). <https://doi.org/10.24953/turkjpeds.2017.04.015>.
- Chae, J. J., Cho, Y. H., Lee, G. S., Cheng, J., Liu, P. P., Feigenbaum, L., Katz, S. I., & Kastner, D. L. (2011). Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 $\beta$  activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity*, 34(5), 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.020>
- Chinn, I. K., Chan, A. Y., Chen, K., Chou, J., Dorsey, M. J., Hajjar, J., Jongco, A. M., Keller, M. D., Kobrynski, L. J., Kumanovics, A., Lawrence, M. G., Leiding, J. W., Lugar, P. L., Orange, J. S., Patel, K., Platt, C. D., Puck, J. M., Raje, N., Romberg, N., ... Walter, J. E. (2020). Diagnostic interpretation of genetic studies in patients with primary immunodeficiency diseases: A working group report of the Primary Immunodeficiency Diseases Committee of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(1), 46–69. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.009>
- Cifaldi, C., Brigida, I., Barzaghi, F., Zoccolillo, M., Ferradini, V., Petricone, D., Cicalese, M. P., Lazarevic, D., Cittaro, D., Omrani, M., Attardi, E., Conti, F., Scarselli, A., Chiriaco, M., Di Cesare, S., Licciardi, F., Davide, M., Ferrua, F., Canessa, C., ... Di Matteo, G. (2019). Targeted NGS platforms for genetic screening and gene discovery in primary immunodeficiencies. *Frontiers in Immunology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00316>
- Cudrici, C., Deutch, N., & Aksentijevich, I. (2020). Revisiting TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS): Current perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093263>
- Dedeoglu, F., & Kim, S. (2016). Autoinflammatory Disorders. In *Pediatric Allergy: Principles and Practice: Third Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29875-9.00014-8>
- Dickie, L. J., Aziz, A. M., Savic, S., Lucherini, O. M., Cantarini, L., Geiler, J., Wong, C. H., Coughlan, R., Lane, T., Lachmann, H. J., Hawkins, P. N., Robinson, P. A., Emery, P., McGonagle, D., & McDermott, M. F. (2012). Involvement of X-box binding protein 1 and reactive oxygen species pathways in the pathogenesis of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(12), 2035–2043. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201197>
- Dillio, A. A., Farhan, S. M. K., Ghani, M., Sato, C., Liang, E., Zhang, M., McIntyre, A. D., Cao, H., Racacho, L., Robinson, J. F., Strong, M. J., Masellis, M., Bulman, D. E., Rogaeva, E., Lang, A., Tartaglia, C., Finger, E., Zinman, L., Turnbull, J., ... Hegele, R. A. (2018). Targeted next-generation sequencing and bioinformatics pipeline to evaluate genetic determinants of constitutional disease. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(134), 1–10. <https://doi.org/10.3791/57266>
- Efthimiou, P. (2019). *Auto-Inflammatory Syndromes. Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Springer Nature Switzerland.



- Esposito, S., Ascolese, B., Senatore, L., Bosis, S., Verrecchia, E., Cantarini, L., & Rigante, D. (2014). Current advances in the understanding and treatment of mevalonate kinase deficiency. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(4), 491–498. <https://doi.org/10.1177/039463201402700404>
- Federici, S., Caorsi, R., & Gattorno, M. (2012). The autoinflammatory diseases. *Swiss Medical Weekly*, 142(June), 1–17. <https://doi.org/10.4414/sm.w.2012.13602>
- Federici, S., Vanoni, F., Ben-Chetrit, E., Cantarini, L., Frenkel, J., Goldbach-Mansky, R., Gul, A., Hoffman, H., Koné-Paut, I., Kuemmerle-Deschner, J., Lachmann, H. J., Martini, A., Obici, L., Ozen, S., Simon, A., Hofer, M., & Gattorno, M. (2019). An international delphi survey for the definition of new classification criteria for familial mediterranean fever, mevalonate kinase deficiency, TNF receptor-associated periodic fever syndromes, and cryopyrin-associated periodic syndrome. *Journal of Rheumatology*, 46(4), 429–436. <https://doi.org/10.3899/jrheum.180056>
- Feldmann, J., Prieur, A., Quartier, P., Berquin, P., Cortis, E., Teillac-hamel, D., ...Basile, D. Saint. (2002). Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular Syndrome Is Caused by Mutations in CIAS1, a Gene Highly Expressed in Polymorphonuclear Cells and Chondrocytes, 71(198), 198–203. <https://doi.org/10.1086/341357>
- Finetti, M., Omenetti, A., Federici, S., Caorsi, R., & Gattorno, M. (2016). Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular (CINCA) syndrome: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0542-8>
- Fingerhutová, Š., Fraňová, J., Hlaváčková, E., Jančová, E., Procházková, L., Beránková, K., Tesařová, M., Honsová, E., & Doležalová, P. (2019). Muckle-Wells syndrome across four generations in one Czech family: Natural course of the disease. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00802>
- Hagemann, I. S. (2015). Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. In *Clinical Genomics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0>
- Gaggiano, C., Rigante, D., Vitale, A., Lucherini, O. M., Fabbiani, A., Capozio, G., ...Cantarini, L. (2019). Hints for Genetic and Clinical Differentiation of Adult-Onset Monogenic Autoinflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3293145>
- Georgin-Lavialle, S., Fayand, A., Rodrigues, F., Bachmeyer, C., Savey, L., & Grateau, G. (2019). Autoinflammatory diseases: State of the art. *Presse Medicale*, 48(1), e25–e48. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.12.003>
- Giancane, G., Haar, N. M. T., Wulffraat, N., Vastert, S. J., Barron, K., Hentgen, V., Kallinich, T., Ozdogan, H., Anton, J., Brogan, P., Cantarini, L., Frenkel, J., Galeotti, C., Gattorno, M., Grateau, G., Hofer, M., Kone-Paut, I., Kuemmerle-Deschner, J., Lachmann, H. J., ... Ozen, S. (2015). Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(4), 635–641. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206844>

- Gomes, A., & Korf, B. R. (2018). Genetic Testing Techniques. In *Pediatric Cancer Genetics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Govindaraj, G. M., Jain, A., Peethambaran, G., Bhoyar, R. C., Vellarikkal, S. K., Ganapati, A., Sandhya, P., Edavazhippurath, A., Dhanasooraj, D., Puthenpurayil, J. M., Chakkiyar, K., Mishra, A., Batra, A., Punnen, A., Kumar, S., Sivasubbu, S., & Scaria, V. (2020). Spectrum of clinical features and genetic variants in mevalonate kinase (MVK) gene of South Indian families suffering from Hyperimmunoglobulin D Syndrome. *PLoS ONE*, 15(8 August 2020), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237999>
- Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J. & Lewontin, R., 2021. *Glossary*. [Online] ncbi.nlm.nih.gov. Disponible en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21325/>> [Accesado el 26 de abril de 2021].
- Grossman, C., Kassel, Y., Livneh, A., & Ben-Zvi, I. (2019). Familial Mediterranean fever (FMF) phenotype in patients homozygous to the MEFV M694V mutation. *European Journal of Medical Genetics*, 62(6). <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.08.013>
- Gül, A. (2018). Dynamics of inflammatory response in autoinflammatory disorders: Autonomous and hyperinflammatory states. *Frontiers in Immunology*, 9(2422), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02422>
- Hashkes, P. J., Laxer, R. M., & Simmon, A. (2019). *Textbook of Autoinflammation*. Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-98605-0>
- Havnaer, A., & Han, G. (2019). Autoinflammatory Disorders: A Review and Update on Pathogenesis and Treatment. *American Journal of Clinical Dermatology*, 20(4), 539–564. <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00440-y>
- Heilig, R., & Broz, P. (2018). Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *European Journal of Immunology*, 48(2), 230–238. <https://doi.org/10.1002/eji.201746947>
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A., & Kolodner, R. D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle – Wells syndrome. *Nature Genetics*, 29(november), 301–305. <https://doi.org/10.1038/ng756>
- Janeway, T. C., & Mosenthal, H. O. (1908). an Unusual Paroxysmal Syndrome, Probably Allied To Recurrent Vomiting. *Southern Medical Journal*, 1(5), 341–342. <https://doi.org/10.1097/00007611-190811000-00019>
- Jesus, A., & Goldbach-Mansky, R. (2014). IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annual review of medicine*, 65, 223–244. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-061512-150641>

- Kacar, M., Pathak, S., & Savic, S. (2019). Hereditary systemic autoinflammatory diseases and Schnitzler's syndrome. *Rheumatology (United Kingdom)*, 58, VI31–VI43. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez448>
- Kanneganti, A., Malireddi, R. K. S., Saavedra, P. H. V., Walle, L. Vande, Van Gorp, H., Kambara, H., Tillman, H., Vogel, P., Luo, H. R., Xavier, R. J., Chi, H., & Lamkanfi, M. (2018). GSD MD is critical for autoinflammatory pathology in a mouse model of Familial Mediterranean Fever. *Journal of Experimental Medicine*, 215(6), 1519–1529. <https://doi.org/10.1084/jem.20172060>
- Krainer, J., Siebenhandl, S., & Weinhäusel, A. (2020). Systemic autoinflammatory diseases. *Journal of Autoimmunity*, 109(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102421>
- Koga, T., & Kawakami, A. (2019). Diagnosis and treatment of autoinflammatory diseases in adults: a clinical approach from rheumatologists. *Immunological Medicine*, 41(4), 177–180. <https://doi.org/10.1080/25785826.2018.1524105>
- Kuemmerle-Deschner, J. B., Koitschev, A., Ummenhofer, K., Hansmann, S., Plontke, S. K., Koitschev, C., Koetter, I., Angermair, E., & Benseler, S. M. (2013). Hearing loss in muckle-wells syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, 65(3), 824–831. <https://doi.org/10.1002/art.37810>
- Kuemmerle-Deschner, J. B. (2015). CAPS — pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. *Seminars in Immunopathology*, 37(4), 377–385. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0491-7>
- Lee, H., Deignan, J. L., Dorrani, N., Strom, S. P., Kantarci, S., Quintero-Rivera, F., Das, K., Toy, T., Harry, B., Yourshaw, M., Fox, M., Fogel, B. L., Martinez-Agosto, J. A., Wong, D. A., Chang, V. Y., Shieh, P. B., Palmer, C. G., Dipple, K. M., Grody, W. W., Vilain, E., ... Nelson, S. F. (2014). Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*, 312(18), 1880–1887. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14604>
- Lucherini, O. M., Rigante, D., Sota, J., Fabiani, C., Obici, L., Cattalini, M., ... Cantarini, L. (2018). Updated overview of molecular pathways involved in the most common monogenic autoinflammatory diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 36(5), S3–S9.
- Manthiram, K., Zhou, Q., Aksentijevich, I., & Kastner, D. L. (2017). The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. *Nature Immunology*, 18(8), 832–842. <https://doi.org/10.1038/ni.3777>
- Marino, A., Tirelli, F., Giani, T., & Cimaz, R. (2020). Periodic fever syndromes and the autoinflammatory diseases (AIDs). *Journal of Translational Autoimmunity*, 3, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2019.100031>
- Martinon, F., & Aksentijevich, I. (2015). New players driving inflammation in monogenic autoinflammatory diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.158>

- Martorana, D., Bonatti, F., Mozzoni, P., Vaglio, A., & Percesepe, A. (2017). Monogenic autoinflammatory diseases with mendelian inheritance: Genes, mutations, and genotype/phenotype correlations. *Frontiers in Immunology*, 8(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00344>
- Marshall, G. S., Edwards, K. M., Butler, J., & Lawton, A. R. (1987). Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *The Journal of Pediatrics*, 110(1), 43–46. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(87\)80285-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(87)80285-8)
- McDermott, M. F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E. M., William Ogunkolade, B., Centola, M., ...Kastner, D. L. (1999). Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1A, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, 97(1), 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80721-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80721-7)
- McGonagle, D., & McDermott, M. F. (2006). A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Medicine*, 3(8), 1242–1248. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030297>
- Migita, K., Asano, T., Sato, S., Koga, T., Fujita, Y., & Kawakami, A. (2018). Familial Mediterranean fever: overview of pathogenesis, clinical features and management. *Immunological Medicine*, 41(2), 55–61. <https://doi.org/10.1080/13497413.2018.1481579>
- Moghaddas, F. (2020). Monogenic autoinflammatory disorders: beyond the periodic fever. *Internal Medicine Journal*, 50(2), 151–164. <https://doi.org/10.1111/imj.14414>
- Moghaddas, F., & Masters, S. L. (2018). The classification, genetic diagnosis and modelling of monogenic autoinflammatory disorders. *Clinical Science*, 132(17), 1901–1924. <https://doi.org/10.1042/CS20171498>
- Monie, T. P. (2017). The Innate Immune System in Health and Disease. *The Innate Immune System*, 189–207. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804464-3.00006-5>
- Montealegre Sánchez, G. A., Almeida de Jesus, A., & Goldbach-Mansky, R. (2013). Monogenic Autoinflammatory Diseases. Disorders of Amplified Danger Sensing and Cytokine Dysregulation. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 39(4), 701–734. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2013.08.001>
- Moussa, T., Aladbe, B., Taha, R. Z., Remmers, E. F., El-Shanti, H., & Fathalla, B. M. (2015). Overlap of familial Mediterranean fever and hyper-IgD syndrome in an Arabic kindred. *Journal of Clinical Immunology*, 35(3), 249–253. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0140-x>
- Nair, S. B., Chavan, P. P., Athalye, A. S., Aksentijevich, I., & Khubchandani, R. P. (2019). Detection of a novel mutation in NLRP3/CIAS1 gene in an Indian child with Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID). *Clinical Rheumatology*, 38(2), 403–406. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4225-9>
- Nakanishi, H., Kawashima, Y., Kurima, K., Chae, J. J., Ross, A. M., Pinto-Patarroyo, G., Patel, S. K., Muskett, J. A., Ratay, J. S., Chattaraj, P., Park, Y. H., Grevich, S., Brewer, C. C.,

Hoa, M., Kim, H. J., Butman, J. A., Broderick, L., Hoffman, H. M., Aksentijevich, I., ... Griffith, A. J. (2017). NLRP3 mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34 responsive to anakinra therapy. *PNAS*, *114*(37), E7766–E7775. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702946114>

National Cancer Institute (2021) NCI Dictionary of Genetics Terms. [Online] Disponible en: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/splice-site-mutation>> [Accesado el 26 de abril de 2021].

National Cancer Institute (2021). NCI Thesaurus. [Online] Disponible en: <[https://nciterns.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&code=C176453&ns=ncit](https://nciterns.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&code=C176453&ns=ncit)> [Accesado el 29 de abril de 2021].

Neocleous, V., Byrou, S., Toumba, M., Costi, C., Shammass, C., Kyriakou, C., Christophidou-Anastasiadou, V., Tanteles, G. A., Hadjipanayis, A., & Phylactou, L. A. (2016). Evidence of digenic inheritance in autoinflammation-associated genes. *Journal of Genetics*, *95*(4), 761–766. <https://doi.org/10.1007/s12041-016-0691-5>

Nishikomori, R., Izawa, K., Kambe, N., Ohara, O., & Yasumi, T. (2019). Low-frequency mosaicism in cryopyrin-associated periodic fever syndrome: mosaicism in systemic autoinflammatory diseases. *International immunology*, *31*(10), 649–655. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz047>

Oda, H., & Kastner, D. L. (2017). Genomics, Biology, and Human Illness: Advances in the Monogenic Autoinflammatory Diseases. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, *43*(3), 327–345. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2017.04.011>

Ozen, S. (2019). What's new in autoinflammation? *Pediatric Nephrology*, *34*(12), 2449–2456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s0047-018-4155-4>

Park, Y. H., Wood, G., Kastner, D. L., & Chae, J. J. (2016). Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nature Immunology*, *17*(8), 914–921. <https://doi.org/10.1038/ni.3457>

Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, *13*, 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>

Reimann, H. A. (1948). Periodic Disease. A Probable Syndrome Including Periodic Fever, Cyclic Neutropenia and Intermittent Arthralgia. *Journal of the American Medical Association*, *136*(4), 239–244.

Richardson, A. M., Moyer, A. M., Hasadsri, L., & Abraham, R. S. (2018). Diagnostic Tools for Inborn Errors of Human Immunity (Primary Immunodeficiencies and Immune

Dysregulatory Diseases). *Curr Allergy Asthma Rep*, 18(19).  
<https://doi.org/10.1007/s11882-018-0770-1>

- Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnostico Prenatal*, 23(2), 56–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>
- Rowczenio, D. M., & Lachmann, H. J. (2019). How to prescribe a genetic test for the diagnosis of autoinflammatory diseases? *Presse Medicale*, 48(1), e49–e59.  
<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.08.015>
- Russo, R. A. G., & Brogan, P. A. (2014). Monogenic autoinflammatory diseases. *Rheumatology (United Kingdom)*, 53(11), 1927–1939.  
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu170>
- Rubio, Santiago, Pacheco-Orozco, Rafael Adrián, Milena Gómez, Ana, Perdomo, Sandra, & García-Robles, Reggie. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, 61(2), 49-63.  
<https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467.
- Sarrabay, G., Tachon, G., Mechin, D., & Touitou, I. (2015). NGS for the diagnosis of autoinflammatory diseases: The experience of Montpellier. *Pediatric Rheumatology*, 13(Suppl 1), O17. <https://doi.org/10.1186/1546-0096-13-S1-O17>
- Sánchez Segura, M., Marsán Suárez, V., Pino Blanco, D., Díaz Domínguez, G., & Macías Abraham, C. (2016). Síndromes periódicos asociados a criopirina: Etiopatogenia, características clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(3), 325–339.
- Santillán-Garzón, S., Álvarez D., Buades, C., Romera-López, A., Pérez-Cabornero, L., Valero-Hervás, D., Cantalapiedra, D., Felipe-Ponce, V., Hernández-Poveda, G., Roca, M., M., Casañas, C., Fernández-Pedrosa, V.,... Ballester, A. (2015). Diagnóstico molecular de enfermedades genéticas: Del diagnóstico genético al diagnóstico genómico con la secuenciación masiva. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(4), 458–469.  
<https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.07.004>
- Schnappauf, O., & Aksentijevich, I. (2019). Current and future advances in genetic testing in systemic autoinflammatory diseases. *Rheumatology (United Kingdom)*, 58, VI44–VI55.  
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez294>
- Schnappauf, O., Chae, J. J., Kastner, D. L., & Aksentijevich, I. (2019). The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, 10(August), 1745.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01745>
- Seleman, M., Hoyos-Bachiloglu, R., Geha, R. S., & Chou, J. (2017). Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Frontiers in immunology*, 8(847). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00847>

- Shohat, M., & Halpern, G. J. (2011). Familial mediterranean fever-a review. *Genetics in Medicine*, 13(6), 487–498. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182060456>
- Siegal, S. (1945). Benign Paroxysmal Peritonitis. *Annals of Internal Medicine*, 23(1), 1-21
- Siemiatkowska, A. M., Van Den Born, L. I., Van Hagen, P. M., Stoffels, M., Neveling, K., Henkes, A., Kipping-Geertsema, M., Hoefsloot, L. H., Hoyng, C. B., Simon, A., Den Hollander, A. I., Cremers, F. P. M., & Collin, R. W. J. (2013). Mutations in the mevalonate kinase (MVK) gene cause nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 120(12), 2697–2705. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.07.052>
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
- Sinha, A., Waterham, H. R., Vijesh Sreedhar, K., & Jain, V. (2012). Novel mutations causing hyperimmunoglobulin D and periodic fever syndrome. *Indian Pediatrics*, 49(7), 583–585. <https://doi.org/10.1007/s13312-012-0099-0>
- Skendros, P., Papagoras, C., Mitroulis, I., & Ritis, K. (2019). Autoinflammation: Lessons from the study of familial Mediterranean fever. *Journal of Autoimmunity*, 104(July), 102305. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102305>
- Sobolewska, B., Angermair, E., Deuter, C., Doycheva, D., Kuemmerle-Deschner, J., & Zierhut, M. (2016). NLRP3 A439V mutation in a large family with cryopyrin-associated periodic syndrome: Description of ophthalmologic symptoms in correlation with other organ symptoms. *Journal of Rheumatology*, 43(6), 1101–1106. <https://doi.org/10.3899/jrheum.150681>
- Soriano, A., & Manna, R. (2012). Familial Mediterranean fever: New phenotypes. *Autoimmunity Reviews*, 12(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.019>
- Stoddard, J. L., Niemela, J. E., Fleisher, T. A., & Rosenzweig, S. D. (2014). Targeted NGS: A Cost-Effective Approach to Molecular Diagnosis of PIDs. *Frontiers in immunology*, 531(5). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00531>
- Stoffels, M., & Kastner, D. L. (2016). Old Dogs, New Tricks: Monogenic Autoinflammatory Disease Unleashed. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 245–272. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025334>
- Strom, S. P., Lee, H., Das, K., Vilain, E., Nelson, S. F., Grody, W. W., & Deignan, J. L. (2014). Assessing the necessity of confirmatory testing for exome-sequencing results in a clinical molecular diagnostic laboratory. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 16(7), 510–515. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.183>
- ter Haar, N. M., Jeyaratnam, J., Lachmann, H. J., Simon, A., Brogan, P. A., Doglio, M., Cattalini, M., Anton, J., Modesto, C., Quartier, P., Hoppenreijns, E., Martino, S., Insalaco, A., Cantarini, L., Lepore, L., Alessio, M., Calvo Penades, I., Boros, C., Consolini, R., ... Gattorno, M. (2016). The Phenotype and Genotype of Mevalonate Kinase Deficiency: A

Series of 114 Cases From the Eurofever Registry. *Arthritis and Rheumatology*, 68(11), 2795–2805. <https://doi.org/10.1002/art.39763>

The French FMF Consortium. (1997). A candidate gene for Familial Mediterranean Fever. *Nature Genetics*, 17, 25–31.

Touitou, I. (2013). Inheritance of autoinflammatory diseases: Shifting paradigms and nomenclature. *Journal of Medical Genetics*, 50(6), 349–359. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101577>

Torene, R., Nirmala, N., Obici, L., Cattalini, M., Tormey, V., Caorsi, R., Starck-Schwartz, S., Letzkus, M., Hartmann, N., Abrams, K., Lachmann, H., & Gattorno, M. (2017). Canakinumab reverses overexpression of inflammatory response genes in tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(1), 303–309. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209335>

Tran, T. (2017). Muckle–Wells syndrome: clinical perspectives. *Open Access Rheumatology: research and reviews*, 9, 123–129. <https://doi.org/10.2147/OARRR.S114447>

Turunen, J. A., Wedenoja, J., Repo, P., Järvinen, R. S., Jääntti, J. E., Mörtenhumer, S., Riikonen, A. S., Lehesjoki, A. E., Majander, A., & Kivelä, T. T. (2018). Keratoendotheliitis Fugax Hereditaria: A Novel Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome Caused by a Mutation in the Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich Repeat Family, Pyrin Domain-Containing 3 (NLRP3) Gene. *American Journal of Ophthalmology*, 188, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.01.017>

Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11), 1544–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>

Zegarska, J., Wiesik-Szewczyk, E., Hryniewiecka, E., Wolska-Kusnierz, B., Soldacki, D., Kacprzak, M., Sobczynska-Tomaszewska, A., Czerska, K., Siedlecki, P., Jahnz-Rozyk, K., Bernatowska, E., Zagozdzon, R., & Paczek, L. (2021). Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS) with a New Pathogenic Variant in TNFRSF1A Gene in a Family of the Adult Male with Renal AA Amyloidosis—Diagnostic and Therapeutic Challenge for Clinicians. *Journal of Clinical Medicine*, 10(3), 465. <https://doi.org/10.3390/jcm10030465>

Zhang, S. (2016). Natural history of mevalonate kinase deficiency: A literature review. *Pediatric Rheumatology*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12969-016-0091-7>