

Desenvolvimento de um ensaio de sequenciação de nova geração para acelerar o diagnóstico molecular das doenças lisossomais de sobrecarga

Development of a next generation sequencing assay for a prompt molecular diagnosis of lysosomal storage disorders

Marisa Encarnação¹, Maria Francisca Coutinho¹, Lisbeth Silva¹, Liliana Matos¹, Diogo Ribeiro¹, Célia Nogueira², Paulo Gaspar², Laura Vilarinho², Sandra Alves¹

sandra.alves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

(2) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

_Resumo

As doenças lisossomais de sobrecarga (DLS) são um grupo de cerca de 70 doenças hereditárias do metabolismo. A sua apresentação clínica é muito heterogénea, variando desde formas pré-natais, até apresentações infantis ou na idade adulta, sendo frequente a presença de atraso psicomotor e neurodegeneração progressiva. Nas DLS, um diagnóstico molecular preciso é muito importante dado que novas terapias têm sido desenvolvidas e se encontram disponíveis. Para a maioria destas doenças o diagnóstico é difícil devido à considerável heterogeneidade clínica e à sobreposição de sintomas com outras doenças, podendo os doentes permanecer sem diagnóstico durante décadas. A sequenciação de nova geração (NGS), sendo a tecnologia de sequenciação mais avançada no momento, torna-se uma metodologia essencial num laboratório dedicado ao diagnóstico de doenças metabólicas, incluindo as DLS. Desde o início de 2017, foram incluídos neste projeto 18 doentes com suspeita clínica de DLS, tendo sido esclarecida a etiologia molecular em 39% (7/18). Este estudo contribuiu assim para alargar o espectro mutacional das DLS, permitindo o aconselhamento genético aos familiares, oferecer diagnóstico pré-natal molecular e selecionar a abordagem terapêutica mais adequada.

_Abstract

Lysosomal storage disorders (LSD) are a group of approximately 70 inherited metabolic disorders, characterized by a broad clinical spectrum with respect to severity of symptoms, progression and age of onset. The molecular diagnosis is very important once new therapeutic solutions are emerging but using traditional approaches the diagnosis can be time consuming, since the patients present overlapping symptoms and several genes have to be tested. Next generation sequencing (NGS) is an essential methodology for the diagnosis of metabolic diseases, namely LSD. Since 2017, we have studied 18 patients with a clinical suspicion of LSD and we were able to find the disease-causing mutation in 39% (7/18). This project contributed to expand the mutational spectrum in the etiology of these disorders and, most important to provide a molecular diagnosis and prenatal counseling to the affected families. In some cases it has allowed health professionals/physicians to provide the access to therapy.

_Introdução

As doenças lisossomais de sobrecarga (DLS) formam um grupo de cerca de 70 doenças metabólicas ⁽¹⁾ com uma prevalência aproximada a nível mundial que pode atingir 1:5000 nados-vivos quando todas as DLS são consideradas ⁽²⁾. Na população portuguesa a prevalência das DLS no seu conjunto é cerca de 1:4000 recém-nascidos ⁽³⁾. Estas patologias caracterizam-se, a nível primário, pela acumulação no lisossoma de substratos não degradados ou parcialmente degradados, e, posteriormente, pela lesão de outros organelos ⁽¹⁾, culminando em disfunção tecidual e orgânica generalizada. Os defeitos ocorrem em genes que codificam para proteínas lisossomais membranares e solúveis, para proteínas ativadoras e também para proteínas não lisossomais (residentes no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi) ⁽⁴⁾.

As DLS têm uma apresentação clínica muito heterogénea tanto no que diz respeito à complexidade e variedade dos sintomas como à idade de aparecimento dos primeiros sintomas, situação que depende da atividade residual da enzima afetada, das propriedades bioquímicas do material armazenado e ainda do tipo de células onde maioritariamente ocorre a sobrecarga ^(1,5). Os sinais clínicos mais frequentes são alterações neurológicas, oculares, ósseas, cardiovasculares, cutâneas, hematológicas, organomegalia e dismorfia facial ⁽⁶⁾.

O número de terapias disponíveis nos últimos anos tem aumentado consideravelmente, estando de momento disponíveis abordagens terapêuticas para dez doenças ⁽⁷⁾. A maioria destas abordagens é de terapia de substituição enzimática, mas também existem terapias de redução de substrato e tera-

pias de *chaperone*. Em alguns casos o transplante de células estaminais hematopoiéticas é também possível. Atualmente, estão em desenvolvimento abordagens de terapias génica e outras abordagens moleculares inovadoras (7). No entanto, a eficácia de muitas terapias é limitada porque os tratamentos são geralmente iniciados quando o doente apresenta sintomas, o que significa que as alterações nos órgãos-alvo já ocorreram. Para contornar esta situação, é essencial que o diagnóstico molecular seja efetuado o mais precocemente possível (8). É também muito importante conhecer o defeito molecular para saber se outros familiares têm a mutação ou mutações causais e, se aplicável, poderem iniciar um tratamento.

_Objetivo

Desenvolver um fluxo de trabalho de sequenciação de nova geração (NGS) (painel de genes) para a identificação das mutações causais em doentes com quadro clínico de DLS, permitindo num único teste a análise simultânea de 96 genes envolvidos em vias metabólicas relacionadas com o lisossoma e o peroxissoma com uma rapidez e um custo por análise que as metodologias clássicas não permitem.

_Doentes e métodos

Entre 2017 e 2018 foram estudados 23 doentes, provenientes de vários Centros Hospitalares do país e ainda do Hospital Farhat Hached – Sousse da Tunísia e do Hospital Amrita na Índia. Estes doentes foram assinalados com suspeita clínica e/ou parâmetros bioquímicos sugestivos de DLS. Para a preparação das amostras foi utilizado DNA genómico extraído a partir de sangue periférico e foram seguidas as instruções do fabricante para painéis customizados (SureSelect QXT da Agilent). A análise foi realizada num sequenciador MiSeq (Illumina), adquirido através do projeto de investigação do NORTE 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014 DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”). Os resultados foram analisados com programas já otimizados para esta tecnologia de NGS (9).

As variantes previamente classificadas na literatura como mutações patogénicas ou variantes novas com previsões *in-silico* sugestivas de patogenicidade, foram confirmadas por sequenciação de Sanger. Quando disponíveis amostras de outros membros da família realizaram-se estudos de co-segregação. Para 3 doentes estão a ser efetuados estudos funcionais, de forma a clarificar o impacto das mutações novas encontradas.

_Resultados

Após a avaliação dos parâmetros de qualidade da corrida, procedeu-se à análise dos resultados, tendo-se obtido uma profundidade de leitura média de 261x por amostra. Foram analisados 23 doentes, dos quais 5 foram incluídos como controlos positivos para validar o painel de genes (a mutação causal já era conhecida). Dos 18 doentes sem diagnóstico foram identificadas as mutações causadoras de doença em 7 casos (figura 1), das quais 4 não estavam descritas nas principais bases de dados. A patogenicidade das mutações não descritas foi estudada numa primeira fase por *pipelines* bioinformáticas e os resultados foram consistentes.

Relativamente aos diagnósticos moleculares que nos foi possível efetuar, o primeiro doente apresentava uma suspeita de lipofuscinose ceróide neuronal (NCL), tendo sido encontrada uma mutação patogénica no gene *MFSD8*, o que corresponde a uma variante infantil tardia da doença – CLN7. O segundo tinha uma suspeita de doença de Krabbe e o terceiro apresentava um quadro neurológico mas sem nenhuma suspeita do tipo em particular, tendo-se identificado a mutação causal em ambos os casos, nos genes *GALC* e *GM2A*, respetivamente. Os restantes 4 doentes diagnosticados tinham uma suspeita clínica de Niemann-Pick (NP), de Beta-manosidose, de Mucopolissacaridose tipo III (MPS III) e doença de Gaucher. A análise molecular permitiu-nos a identificação de mutações causais nos genes *NPC1*, *MAN2B1*, *NAGLU* e *GBA* e a reclassificação de 3 doentes para NP tipo C, Alfa-manosidase e MPS IIIB (tabela 1).

Figura 1: Representação esquemática do fluxo de trabalho de análise das variantes obtidas no painel de NGS.

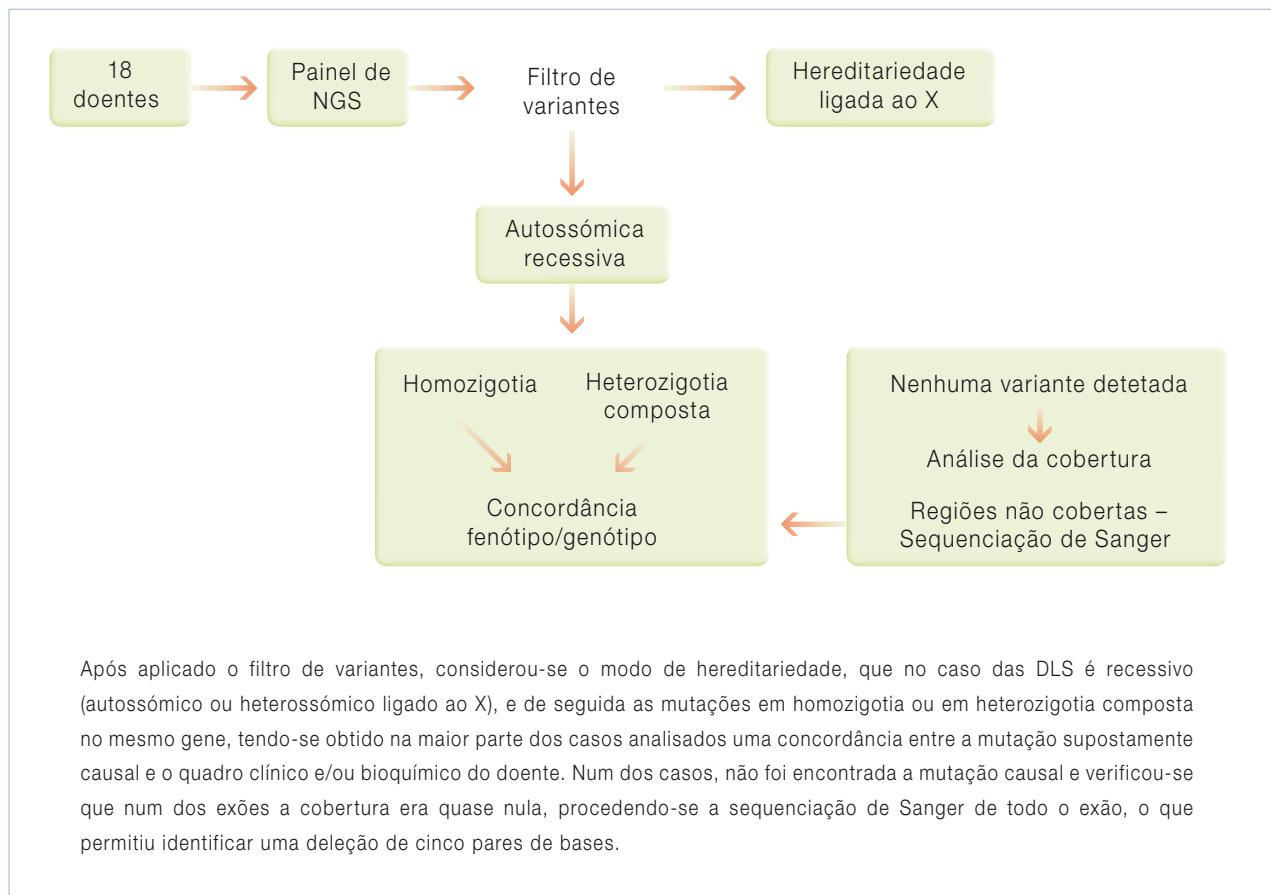


Tabela 1: Apresentação dos casos de DLS diagnosticados por NGS: identificação da mutação causal para classificação mais precisa da doença.

Diagnóstico clínico	Gene	Diagnóstico molecular
Lipofuscinose Ceróide Neuronal	<i>MFSD8</i>	CLN7 Variante infantil tardia de NCL
Doença de Krabbe	<i>GALC</i>	Doença de Krabbe
Sem suspeita específica (quadro neurológico indicativo de DLS)	<i>GM2A</i>	Gangliosidose GM2 variante AB
Niemann-Pick	<i>NPC1</i>	Niemann-Pick tipo C
Beta-manosidose	<i>MAN2B1</i>	Alfa-manosidose
Mucopolissacaridose	<i>NAGLU</i>	Mucopolissacaridose tipo IIIB
Doença de Gaucher	<i>GBA</i>	Doença de Gaucher

_Discussão

A sequenciação de larga escala é muito importante no diagnóstico das DLS devido ao seu largo espectro fenotípico e sobreposição de sintomas. Em especial, para os casos em que o diagnóstico bioquímico não está disponível ou quando existe um grupo de doenças em que a clínica é muito semelhante mas o gene afetado é diferente, como é o caso das NCL, um subgrupo das DLS. Também no caso da Gangliosidose GM2, as três variantes da doença são muito semelhantes clinicamente e o diagnóstico bioquímico não está disponível na maior parte dos laboratórios. No entanto, esta plataforma de NGS possibilitou o diagnóstico molecular da Gangliosidose GM2A variante AB, que é uma variante com poucos casos descritos a nível mundial.

Em resumo, o presente estudo permitiu esclarecer a etiologia molecular de 39% dos doentes estudados, valor que se aproxima do obtido noutros estudos (10,11).

Relativamente aos 11 doentes que permanecem sem diagnóstico molecular, não se pode excluir a presença de mutações nas regiões intrónicas (o painel só cobre as regiões intrónicas flanqueadoras), grandes deleções ou inserções uma vez que estas não são detetadas por esta técnica de NGS. De forma a fazer o acompanhamento destes doentes, o plano a médio prazo é incluir estes doentes num painel de genes mais alargado (cerca de 200), bem como em estudos de sequenciação do genoma *Whole Exome Sequencing* (WES), na tentativa de identificar mutações exónicas em novos genes.

_Conclusão

Na última década, o diagnóstico molecular por NGS tem-se revelado muito importante pois permite sequenciar um elevado número de genes de um modo mais rápido e económico. A transferência desta tecnologia da investigação para o diagnóstico de rotina, na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, vai melhorar o diagnóstico das DLS, permitindo oferecer um aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal às famílias afetadas. Em determinados casos, pode também decidir se um doente pode iniciar a terapia disponível para o seu caso.

Agradecimentos:

Estudo financiado pelo Programa NORTE 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014, DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”) - aquisição de equipamentos para a realização da sequenciação de nova geração.

Referências bibliográficas:

- (1) Cox TM, Cachon-Gonzalez MB. The cellular pathology of lysosomal diseases. *J Pathol.* 2012;226(2):241-54.
- (2) Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Chapter 2 - Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G (eds). *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis, 2006.
- (3) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(2):87-92. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (4) Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):684-96. Epub 2008 Dec 8. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.001>
- (5) Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol.* 2012;199(5):723-34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3514785/>
- (6) Coutinho MF, Alves S. From rare to common and back again: 60 years of lysosomal dysfunction. *Mol Genet Metab.* 2016; 117(2):53-65. Epub 2015 Aug 18.
- (7) Beck M. Treatment strategies for lysosomal storage disorders. *Dev Med Child Neurol.* 2018;60(1):13-18. Epub 2017 Nov 1.
- (8) Meikle PJ, Hopwood JJ. Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis. *Eur J Pediatr.* 2003;162(Suppl 1):S34-7.
- (9) Nogueira C, Pereira C, Silva L, et al. Avanços no diagnóstico das doenças mitocondriais através da sequenciação de nova geração. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2018;7(21):5-8. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5546>
- (10) Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion.* 2013;13(4):379-87.
- (11) Legati A, Reyes A, Nasca A, et al. New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1857(8):1326-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbmbio.2016.02.022>