

IMPORTÂNCIA DO ESTUDO MULTIGÉNICO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DOENÇAS RARAS POR SEQUENCIAÇÃO DE NOVA GERAÇÃO

João Gonçalves^{1,2,3}, Pedro Rodrigues¹, Beatriz Oliveira¹, Iris Pereira Caetano¹, Patrícia Theisen¹

1 - Unidade de Genética Molecular, Departamento de Genética Humana (DGH), Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa (INSA);
2 – ToxOmics - Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Faculdade de Ciências Médicas, Nova Medical School, Lisbon, Portugal.

³ Email: joao.goncalves@insa.min-saude.pt

Introdução: Os testes genéticos de base molecular realizados no âmbito de diagnóstico de doenças genéticas raras, cujos resultados dos meios complementares de diagnóstico e respetivos fenótipos patológicos sugerem inequivocamente o estudo de um único gene específico, continuam a realizar-se recorrendo predominantemente a tecnologia tradicional (exemplos na Tab. 1).

Considerando que o conhecimento do Genoma Humano com a identificação de novos genes levou à verificação de que determinadas doença específicas pode ser causadas por genes diferentes, atendendo também ao desenvolvimento tecnológico ocorrido paralelamente na análise do material genético, a conjugação destes desenvolvimentos técnicos e científicos contribuíram para a conceção e implementação da nova tecnologia “Sequenciação de Nova Geração” (NGS), a qual revolucionou o diagnóstico molecular das doenças raras (DR). Tornou-se assim possível, a análise simultânea de múltiplos genes, a obtenção de resultados mais rápidos e com custos inferiores comparativamente à análise sequencial dos mesmos genes. Atualmente a **NGS**, usando diferentes abordagens metodológicas, possibilita o estudo do genoma (WGS), do exoma (WES), de genes individuais ou de painéis multigénicos (**NGS-PMG**), estes últimos podem ser especificamente concebidos para o estudo molecular de doenças raras. **Evidenciam-se abaixo diversos painéis de genes associados a cancro hereditário da mama e ovário (HBOC), cancro colorretal hereditário (HCRG) e a patologias do desenvolvimento sexual (PDS), implementados para o estudo de diversas doenças raras.**

Objetivos: Validação e Implementação de NGS-PMG no estudo/diagnóstico molecular de doenças raras.

Resultados Validação NGS: *APC, MLH1, MSH2, STK11, MUTYH, BRCA1, BRCA2, TP53*; Nº Amostras: 64; Nº Alt: 412 (exões, intrões, missense, del., ins., F.Shift).
Sensib. : 100%; **Especificidade:** 99,3%; **Exatidão:** 99,8%
Apto para usar no diagnóstico.

Tabela 1 : Exemplos de patologias/genes com diagnóstico molecular realizado por metodologias tradicionais (PCR e sequenciação cíclica de Sanger) na Unidade de Genética Molecular do DGH do INSA :
> **Cancro hereditário da mama e ovário/BRCA1 e BRCA2**
> **Cancro do colorretal hereditário/MLH1, MSH2**
> **Insensibilidade aos androgénios/AR**
> **Doenças hemorrágicas hereditárias/F8,F9**
> **Fibrose quística/CFTR**
> **Hemocromatose hereditária/HFE**
> **Hemoglobinopatias/HBB**
> **Infertilidade masculina/AZF**
> **Malignidade hematológica/BCR-ABL, JAK2(p.V617F)**
> **Polineuropatia Amiloidótica familiar/TTR**
> **Trombofilias hereditárias/PROS1, SERPINC1, PROC**

Tabela 3: Paineis de genes associados a patologias do desenvolvimento sexual (PDS)	
Patologia	Painel de Genes
Determinação primária do sexo	ATRX; DHH; DMRT1; LHCGR; MAP3K1; NR0B1; NR5A1; SOX9; SRY; WNT4; WT1
Diferenciação Sexual	AMH; AMHR2; AR; ATRX; BMP15; CYP17A1; CYP19A1; DHH; DMRT1; FSHR; HSD17B3; INSL3; LHCGR; MAMLD1; MAP3K1; NR0B1; NR5A1; RXFP2; SRD5A2; SRY; STAR; WT1
Esteroidogénese	CYP11B1; CYP17A1; CYP19A1; HSD3B2; HSD17B3+NR0B1; NR5A1; POR; STAR
Infert.masculina/femini na; Hipog. Hipog	DMRT1; NR0B1; NR5A1; ANOS1(KAL1) ; FGFR1; FSHR; INSL3; LHCGR; PROKR2; RXFP2; CHD7; GNRHR; TAC3; SPRY4; IL17RD; SOX10; TEX11
Infert. Feminina: Falência ovárica prematura	BMP15; FOXL2; FSHR; LHCGR; NR5A1; NOBOX ; WNT4
Infertilidade e Ciliopatias (S.Kartagener)	DNAH5; DNAH11; DNAI1; DNAI2; NME8(TXNDC3); DNAAF2(KTU) ; RSPH9; RSPH4A

Conclusões: A validação de painéis de NGS no âmbito do cancro hereditário e das patologias do desenvolvimento sexual permite-nos alargar o estudo molecular a um maior número de genes, a diferentes tipos de cancro e a uma melhor caracterização molecular de doenças raras específicas (ex. PDS). A NGS contribui para aumentar taxa de diagnóstico, confirmando-se num maior número de casos o diagnóstico clínico, o que tem implicações diretas no aconselhamento genético e para a prevenção da doença genética na família. No âmbito do cancro hereditário, a identificação da base molecular contribui para melhorar a vigilância/acompanhamento clínico e respetivos tratamentos.

Tabela 2: Genes (n=94) incluídos no painel “TruSight cancer” e respetivos cancros associados					
Gene		§ Confere risco para:	Gene		§ Confere risco para:
1	AIP	PA	48	HRAS	CCR/TC/LC
2	ALK	NB	49	KIT	GIT
3	APC (5)	HCRG	50	MAX	PCC
4	ATM (2;3)	BOC	51	MEN1	MEN
5	BAP1	CMM/TPS	52	MET	RCC
6	BLM	BS	53	MLH1 (3)(4)	HBOC/HCRG
7	BMPRIA (5)	HCRG	54	MSH2 (3)(4)	HBOC/HCRG
8	BRCA1 (1;2;3)	HBOC	55	MSH6 (3)(4)	HBOC/HCRG
9	BRCA2 (1;2;3)	HBOC	56	MUTYH (5)	HBOC/HCRG
10	BRIP1 (3)	HBOC	57	NBN (2;3)	HBOC/NBS
11	BUB1B (5)	HCRG	58	NF1	NF1
12	CDC73	HPT	59	NF2	NF2
13	CDH1 (1;2;3)	HBOC	60	NSD1	AML
14	CDK4	CMM	61	PALB2 (2;3)	HBOC
15	CDKN1C	BWS	62	PHOX2B	NB
16	CDKN2A	CMM	63	PMS1 (4;5)	CRC
17	CEBPA	AML	64	PMS2 (3)(4)	HBOC/HCRG
18	CEP57	MVA2	65	PRF1	FHL
19	CHEK2 (2;3)	HBOC	66	PRKARIA	MNS
20	CYLD	FC	67	PTCH1 (5)	BCNS
21	DDB2	XP	68	PTEN (1;2;3)(5)	HBOC/HCRG
22	DICER1	PPB	69	RAD51C (3)	HBOC
23	DIS3L2	PS	70	RAD51D (3)	HBOC
24	EGFR	LC	71	RBI	RB/LC
25	EPCAM (4)	HCRG	72	RECQL4	BLM/WRN
26	ERCC2	XP	73	RET	MEN/MTC
27	ERCC3	XP	74	RHBDF2	ESCR
28	ERCC4 (2;3)	HBOC/XP	75	RUNX1	AML
29	ERCC5	XP	76	SBDS	SDS/AA
30	EXT1	CHDSA/EXT	77	SDHAF2	HP
31	EXT2	EXT	78	SDHB	GST/HP
32	EZH2	WS	79	SDHC	GST/HP
33	FANCA	FA	80	SDHD	GST/HP
34	FANCB	FA	81	SLX4	FA
35	FANCC	FA	82	SMAD4 (5)	HCRG
36	FANCD2	FA	83	SMARCB1	RTPS
37	FANCE	FA	84	STK11 (1;2;3)(5)	HBOC/HCRG
38	FANCF	FA	85	SUFU	BCNS
39	FANCG	FA	86	TMEM127	PCC
40	FANCI	FA	87	TP53 (1;2;3)	HBOC/HCRG
41	FANCL	FA	88	TSCI	LAM
42	FANCM	FA	89	TSC2	TSC
43	FH	LRCC	90	VHL	VHLD
44	FLCN	BHD	91	WRN	WRN
45	GATA2	MDS	92	WT1	WT
46	GPC3	SGBS1	93	XPA	XP
47	HNF1A	HA	94	XPC	XP

Materias e Métodos: Preparação de bibliotecas de sequências-alvo a partir de DNA genómico, utilizando a captura com sondas (Trusight Cancer-Rapid Capture, Illumina) ou amplicões (painéis customizados - AmpliSeq, Illumina). Seleção de genes de interesse a partir de bibliografia científica e de diferentes bases de dados (B1). Sequenciação no MiSeq (Illumina) e posterior análise bioinformática com os programas *MiSeq Reporter, Enrichment, DNA Amplicon, Variant Interpreter (Illumina), Alamut Visual, Integrative Genomics Viewer, VarAFT e panelcnMOPS*. Confirmação de variantes por sequenciação de Sanger e MLPA quando aplicável.

A cor do sombreado corresponde ao mesmo tipo de cancro que pode ter como origem alterações num dos genes que lhe estão associados podendo estes ser integrados no mesmo painel de análise por NGS.

§AA- Aplastic Anemia; **AML-** Acute Myeloid Leukemia; **BCNS-** Basal Cell Nevus Syndrome; **BHD-** Birt-Hogg-Dube syndrome; **BLM-** Bloom Syndrome; **BS-** Bloom syndrome; **BWS-** Beckwith-Wiedemann syndrome; **CMM-** cutaneous malignant melanoma; **CHDSA-** Chondrosarcoma; **ESCR-** Esophageal Cancer; **EXT-** Exostoses; **FA-** Fanconi Anemia; **FC-** Familial cylindromatosis; **FHL-** Familial Hemophagocytic lymphohistiocytosis; **GST-** Gastrointestinal Stromal Tumor; **GIT-**Gastrointestinal Tumor; **HA-** Hepatic adenoma; **HBOC-** Hereditary Breast Ovarian Cancer; **HCRG-** Hereditary Colorectal Cancer; **HP-** Hereditary Paraganglioma; **HPT-** Hyperparathyroidism; **LC-** Lung Cancer; **LAM-** Lymphangioleiomyomatosis; **LRCC-** Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer; **MEN-** Multiple endocrine neoplasia 1; **MDS-** Myelodysplastic syndromes; **MNS-** Multiple Neoplasia Syndrome; **MTC-** Medullary Thyroid Carcinoma; **MVA2-** Mosaic Variegated Aneuploidy-2; **NB-**Neuroblastoma; **NBS-** Nijmegen Breakage Syndrome; **NF1-** Neurofibromatosis; **NF2-** Neurofibromatosis; **NHL-** Non-Hodgkin Lymphoma, **PA-** Pituitary adenoma; **PCC-** Pheochromocytoma; **PPB-** Pleuropulmonary Blastoma; **PS-** Perlman syndrome; **RB-** Retinoblastoma; **RCC-** Renal cell carcinoma; **RTPS-** Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome 1; **SDS-** Shwachman-Diamond Syndrome; **SGBS1-** Simpson-Golabi-Behmel syndrome; **TC-** Thyroid Cancer; **TPS-**Tumor Predisposition syndrome; **TSC-** Tuberous Sclerosis; **VHLD-** Von Hippel-Lindau Syndrome; **WS-** Weaver syndrome; **WRN-** Werner syndrome; **WT-** Wilms Tumor; **XP-** Xeroderma Pigmentosum.
Sub-painéis multi-génicos-HBOC:(1);(2);(3); HCRG:(4)(5)

Referências:
B1-OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man®(<https://www.omim.org/>);
Orphanet (<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?Ing=EN>); BioMart: <https://www.ensembl.org/info/data/biomart/index.html>;HGMD - The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>); GARD - Genetic and Rare Diseases Information Center (<https://rarediseases.info.nih.gov/>); Genetics Home Reference (<https://ghr.nlm.nih.gov/>); GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

Trabalho parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Projeto: UID/BIM/0009/2016