

Doenças lisossomais de sobrecarga em Portugal: 10 anos de experiência em estudos moleculares no INSA (2006-2016)

Lysosomal storage diseases in Portugal: 10 years of experience in molecular studies at National Health Institute (2006-2016)

Maria Francisca Coutinho, Ana Joana Duarte, Liliana Matos, Juliana Inês Santos, Olga Amaral, Sandra Alves

sandra.alves@insa.min-saude.pt

Grupo de Investigação em Doenças Lisossomais de Sobrecarga. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

_Resumo

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLS) são um grupo de mais de 50 doenças hereditárias do metabolismo, sendo a maioria causada por defeitos em enzimas lisossomais específicas. A característica distintiva das DLS é a acumulação lisossomal do(s) substrato(s) não degradado(s), bem como a acumulação de outro material secundariamente à disfunção lisossomal. A apresentação clínica destas patologias é bastante heterogénea, variando desde formas pré-natais, até apresentações infantis ou na idade adulta, sendo frequente a presença de atraso psicomotor e neurodegeneração progressiva. Neste artigo são apresentados os resultados de vários estudos de caracterização molecular efetuados ao longo da última década (2006-2016) em doentes portugueses com as seguintes DLS: Mucopolissacaridose II, Mucopolissacaridose IIIA, Mucopolissacaridose IIIB, Mucopolissacaridose IIIC, Sialidose, Galactosialidose, Gangliosidose GM1, Mucolipidose II alfa/beta, Mucolipidose III alfa/beta, Mucolipidose III gama e Doença de Unverricht-Lundborg. De um modo geral, estes trabalhos permitiram conhecer as variações genéticas associadas a estas DLS, analisar a sua distribuição na população portuguesa e compreender o seu papel na forma de apresentação clínica destas patologias.

_Abstract

Lysosomal Storage Diseases (LSDs) are a group of more than 50 inherited metabolic diseases which in the majority of cases, result from a defective function of specific lysosomal enzymes. The classical hallmark of LSDs is the lysosomal accumulation of unhydrolyzed substrate(s) as well as storage of other material secondary to lysosomal dysfunction. LSD clinical presentation has considerable heterogeneity, ranging from prenatal forms to later onset infantile or adult presentations, often with psycho-motor delay and progressive neurodegeneration. In this paper we present the results of several molecular studies performed over the last decade (2006-2016) in Portuguese patients with the following LSDs: Mucopolysaccharidosis II, Mucopolysaccharidosis IIIA, Mucopolysaccharidosis IIIB, Mucopolysaccharidosis IIIC, Sialidosis, Galactosialidosis, GM1 Gangliosidosis, Mucolipidosis II alpha/beta, Mucolipidosis III alpha/beta, Mucolipidosis III gamma and Unverricht-Lundborg disease. Globally these studies have provided valuable data regarding the underlying genetic causes of these LSDs and the frequency of their causative mutations the Portuguese population, further contributing to a better understanding of their role in the clinical presentation of the symptoms.

_Introdução

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLS) constituem um grupo de doenças hereditárias do metabolismo. Estas patologias raras caracterizam-se por uma acumulação intralisossomal de substratos não degradados e de produtos do catabolismo, podendo dever-se a defeitos genéticos que alterem hidrolases lisossomais, proteínas ativadoras ou ainda proteínas da membrana do lisossoma. Atualmente estão descritas mais de 50 DLS, sendo a grande maioria autossómicas recessivas. Há ainda a considerar as chamadas doenças “*lysosome-related*”, onde surge disfunção lisossomal com etiologia diversa. Na população portuguesa a prevalência conjunta das DLS está estimada em cerca de 1/4000 recém-nascidos⁽¹⁾.

As DLS apresentam uma grande variedade de sintomas clínicos que vão desde a presença de doença neurológica grave, a casos menos graves ou até assintomáticos. Os sintomas surgem geralmente nos primeiros meses/anos de vida e os sinais mais frequentes são alterações neurológicas, ósseas, cardiovasculares, cutâneas, oculares, hematológicas, organomeia e dismorfia facial⁽²⁾.

Embora para a maioria das DLS, não exista um tratamento totalmente eficaz, nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidas várias terapêuticas de substituição enzimática e de redução do substrato (gráfico 1), estando neste momento disponíveis no mercado soluções que possibilitam o tratamento de oito doenças⁽²⁾.

As DLS são normalmente monogénicas mas, para a maioria dos casos, estão descritas várias mutações no mesmo gene. As mutações mais comuns são *missense*, *nonsense*, *splicing*,

artigos breves_ n. 4

deleções parciais e inserções. Algumas das mutações provocam a inativação da enzima em causa enquanto outras alteram a função da proteína mutada.

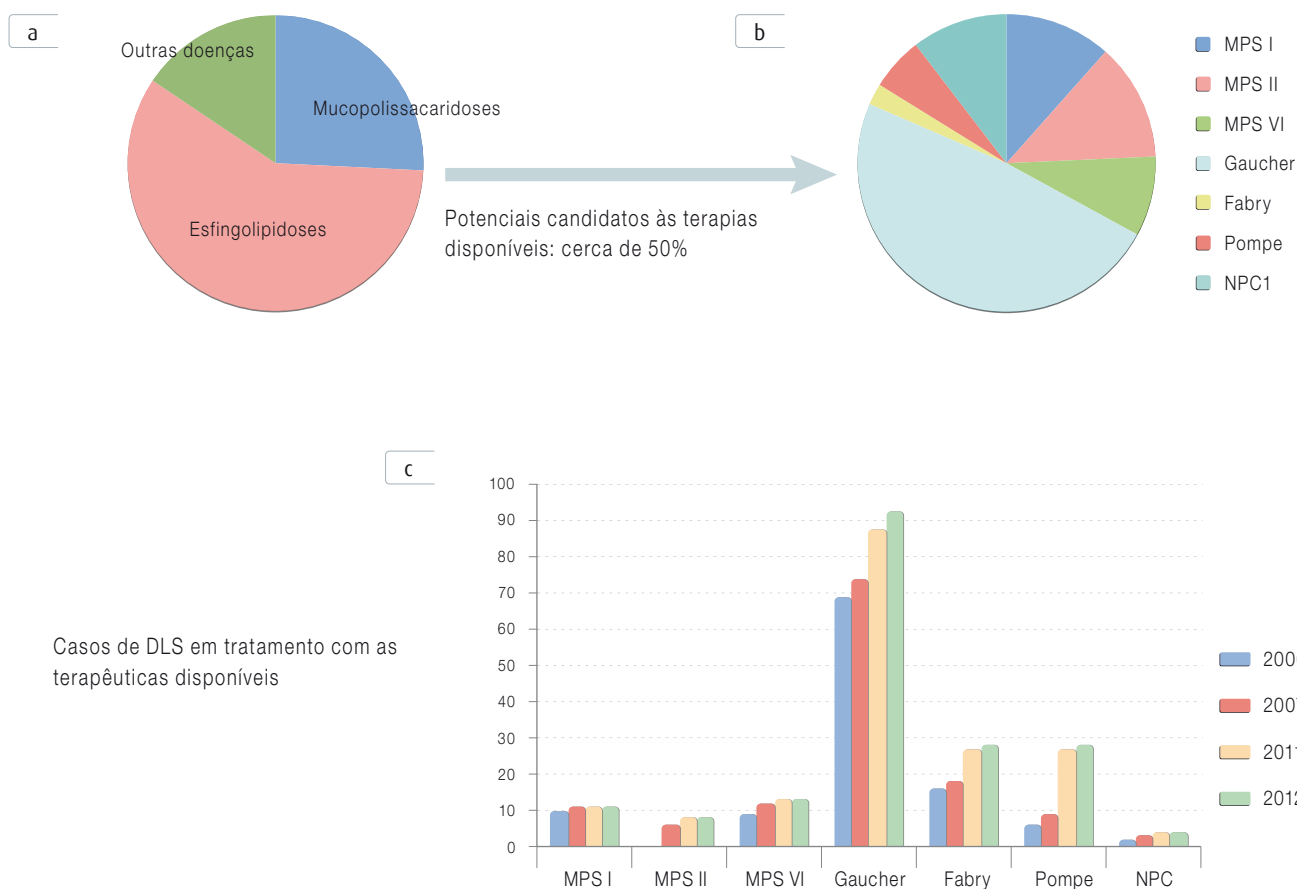
_Objetivo

Neste artigo são apresentados resultados de vários estudos de caracterização molecular realizados ao longo da última década (2006-2016). Neste período foram desenvolvidos métodos de biologia molecular com a finalidade de detetar as variações genéticas ao nível de diversos genes associados a DLS que ainda não tinham sido analisados em Portugal.

_Material e métodos

Foram analisados 64 doentes portugueses divididos por 11 patologias (Mucopolissacaridoses tipo II, IIIA, IIIB e IIIC; Galactosialidose; Sialidose; Gangliosidose GM1; Mucolipidoses tipo II alfa/beta, tipo III alfa/beta e tipo III gama e Doença de Unverricht-Lundborg). Nestes doentes as mutações foram identificadas através de uma estratégia analítica que englobou o estudo do gDNA e do cDNA.

Gráfico 1 (a-c): ⬇ Grupos principais de DLS e patologias com terapias disponíveis.



Adaptado de *The prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal*⁽¹⁾ (n=353) e dos relatórios técnicos sobre o Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais, 2007, 2011 e 2012⁽³⁻⁵⁾ (ao longo do tempo o número dos doentes em tratamento varia, aumentando com a disponibilização de novas terapias – n=185 em 2012).
MPS: Mucopolissacaridose; NPC1: Doença de Niemann-Pick tipo C1.

artigos breves_ n. 4

Na maioria dos casos estudou-se também o impacto das mutações encontradas ao nível do RNA através de PCR quantitativo em tempo real e procurou-se, sempre que possível, analisar a correlação genótipo-fenótipo.

No sentido de esclarecer se a presença de duas mutações frequentes em doentes com duas DLS (Mucopolidose tipo II alfa/beta, causada por mutações no gene *GNPTAB* e Mucopolissacaridose tipo IIIB, causada por mutações no gene *NAGLU*) se deve a um efeito fundador ou se, pelo contrário, resulta de eventos mutacionais independentes, foram efetuados estudos haplotípicos utilizando polimorfismos intragénicos e marcadores polimórficos do tipo microssatélite localizados na proximidade desses genes.

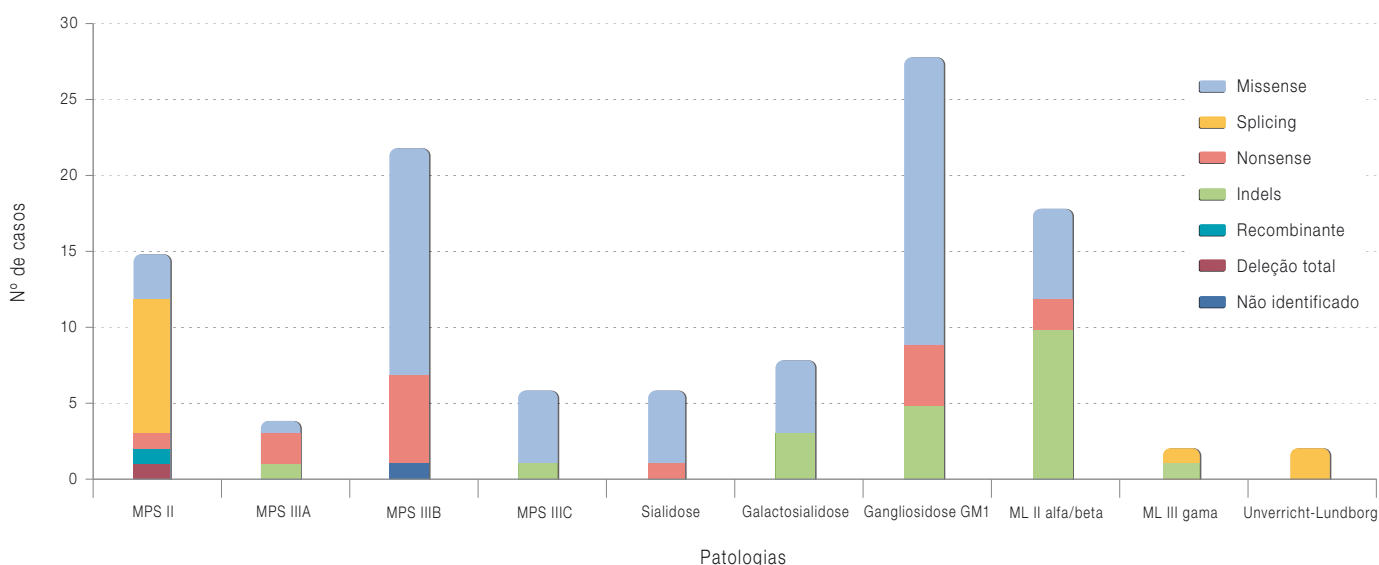
Resultados

Foi possível identificar as lesões moleculares causais em todos os doentes analisados. No gráfico 2 é apresentada a distribuição relativa dessas mutações, de acordo com o tipo de lesão/defeito molecular encontrada por patologia.

Para a maioria dos doentes, a avaliação do potencial patogénico de cada uma das mutações foi bastante coerente, tendo-se observado uma forte correlação entre o fenótipo clínico observado e o tipo de lesão molecular previamente identificada.

Na maioria dos casos as mutações encontradas são únicas ou muito raras, mas foram também encontradas duas mutações frequentes nos doentes portugueses. No gene *GNPTAB* a deleção c.3503_3504delTC está presente em aproximadamente 50% dos alelos mutados⁽⁶⁾ e no gene *NAGLU* a mutação p.R234C representa cerca de 30% dos alelos mutados portugueses⁽⁷⁾. A análise de três SNPs intragénicos e 2 microssatélites que flanqueiam o gene *GNPTAB* num total de 44 doentes e 16 portadores da deleção, provenientes de diferentes regiões geográficas, levou à identificação de um haplótipo comum em todos os cromossomas com a deleção c.3503_3504delTC. Relativamente à mutação p.R234C, que é igualmente o alelo mutado mais comum em doentes espanhóis (33%), a análise de um polimorfismo intragénico e de dois microssatélites que flanqueiam o gene *NAGLU* em doentes

Gráfico 2: Distribuição de tipo de mutações por patologia.



Compilação de dados publicados em diferentes artigos, organizados por patologias ou grupo de patologias: Mucopolissacaridose II (16 casos; 15 mutações, 6 das quais novas)⁽⁹⁾; Mucopolissacaridose IIIA (2 casos; 3 mutações distintas, todas previamente descritas)⁽¹⁴⁾; Mucopolissacaridose IIIB (11 casos; 9 mutações, 5 das quais novas)⁽⁷⁾; Mucopolissacaridose IIIC (3 casos; 2 mutações, ambas novas)⁽¹⁵⁾; Sialidose, Galactosialidose e Gangliosidose GM1 (3 casos de sialidose, 4 de galactosialidose e 14 de gangliosidose GM1, em que foram identificadas, respetivamente 4, 4 e 6 mutações diferentes, sendo todas as mutações de sialidose novas, bem como 3 das mutações associadas a galactosialidose)⁽¹⁶⁾; Mucopolidose II alfa/beta, Mucopolidose III alfa/beta e Mucopolidose III gama (10 casos, 5 mutações no gene *GNPTAB*, 3 das quais novas e 2 mutações novas no *GNPTG*)⁽⁶⁾; Unverricht-Lundborg (1 caso, no qual foi identificada uma nova mutação em homocigotia)⁽⁴⁾.

MPS: Mucopolissacaridose; ML: Mucopolidose.

portugueses e espanhóis permitiu a identificação de um haplótipo comum no qual a mutação p.R234C terá surgido.

_Discussão

De uma forma geral, estes estudos permitiram: (a) identificar o espectro mutacional em doentes portugueses com estas patologias; (b) analisar a distribuição dessas mutações na nossa população; (c) melhorar o aconselhamento genético nas famílias afetadas facultando o diagnóstico pré-natal e a identificação de portadores e (d) estabelecer correlações entre o genótipo molecular e a apresentação fenotípica da doença. Apesar de grande parte das mutações reportadas ser privada ou rara⁽⁸⁻¹⁰⁾, também foram encontradas algumas mutações frequentes. Por exemplo, a deleção c.3503_3504delTC, identificada no gene *GNPTAB*, em quase todos os casos de Mucopolidose II⁽⁶⁾ e a mutação p.R234C, detetada no gene *NAGLU*, em vários casos de Mucopolissacaridose IIIB⁽⁷⁾. No sentido de esclarecer se a frequência observada se devia a um efeito fundador realizaram-se estudos haplotípicos. No caso da c.3503_3504delTC, também frequente em outras populações, foi possível analisar doentes e portadores de diferentes regiões geográficas e concluir que esta mutação é relativamente antiga e foi originada por uma lesão molecular fundadora com origem peri-mediterrânica⁽¹¹⁾. No caso da mutação p.R234C, também frequente nos doentes MPS IIIB espanhóis, realizou-se uma análise dos doentes portugueses e espanhóis, cujo resultado demonstrou uma origem comum para esta mutação na Península Ibérica⁽⁶⁾.

Este tipo de observação não é, aliás, inédito no que se refere às DLS. De facto, já foram reportados casos semelhantes para outras DLS, nomeadamente na doença de Gaucher⁽¹²⁾, em NPC1⁽¹³⁾, na variante B1 de Gangliosidose GM2⁽¹⁴⁾, em MPS I⁽¹⁵⁾ e até em Leucodistrofia Metacromática⁽¹⁶⁾, nas quais o perfil das mutações identificadas indica a existência de movimentos populacionais que terão permitido a dispersão de algumas mutações a partir de uma origem comum, sendo que também na maioria destes casos, a Península Ibérica surge como origem de várias mutações causais de DLS.

_Conclusão

Os estudos de caracterização molecular efetuados permitiram obter dados sobre as causas moleculares destas DLSs na população portuguesa contribuindo também, para um melhor conhecimento a nível mundial das bases moleculares destas doenças. Por outro lado, estes estudos são extremamente importantes na medida em que a análise mutacional permite a realização de um diagnóstico pré-natal molecular, a identificação de portadores nos restantes membros do núcleo familiar, nomeadamente em famílias onde ocorra consanguinidade, e um diagnóstico mais preciso aos familiares de doentes recentemente diagnosticados, melhorando consideravelmente o aconselhamento genético.

Agradecimentos:

Estudos parcialmente financiados pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, Ministério da Saúde (P.I. nº 99/2007 e nº 100/2007) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PIC/IC/83252/2007 e PIC/IC/82822/2007).

Referências bibliográficas:

- (1) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(2):87-92. www.nature.com/ejhg/journal/v12/n2/full/5201044a.html
- (2) Coutinho MF, Alves S. From rare to common and back again: 60years of lysosomal dysfunction. *Mol Genet Metab.* 2016;117(2):53-65. Epub 2015 Aug 18.
- (3) Centro Nacional Coordenador do Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais. Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais: relatório 2007. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2008.
- (4) Grupo de Trabalho Coordenador do Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais. Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais: relatório 2011. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1803>
- (5) Grupo de Trabalho Coordenador do Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais. Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais: relatório 2012. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2214>
- (6) Alves S, Mangas M, Prata MJ, et al. Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis type II shows evidence that the IDS gene is prone to splicing mutations. *J Inher Metab Dis.* 2006;29(6):743-54.
- (7) Pinto E, Freitas J, Duarte AJ, et al. Unverricht-Lundborg disease: homozygosity for a new splicing mutation in the cystatin B gene. *Epilepsy Res.* 2012;99(1-2):187-90. Epub 2011 Dec 10.
- (8) Duarte AJ, Ribeiro D, Chaves J, et al. Characterization of a rare Unverricht-Lundborg disease mutation. *Mol Genet Metab Rep.* 2015;4:68-71. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750610/

artigos breves_ n. 4

- (9) Encarnação M, Lacerda L, Costa R, et al. Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolidosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet.* 2009;76(1):76-84.
- (10) Mangas M, Nogueira C, Prata MJ, et al. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis type IIIB in Portugal: evidence of a single origin for a common mutation (R234C) in the Iberian Peninsula. *Clin Genet.* 2008;73(3):251-6.
- (11) Coutinho MF, Encarnação M, Gomes R, et al. Origin and spread of a common deletion causing mucopolidosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity. *Clin Genet.* 2011;80(3):273-80. Epub 2010 Sep 29.
- (12) Diaz GA, Gelb BD, Risch N, et al. Gaucher disease: the origins of the Ashkenazi Jewish N370S and 84GG acid beta-glucosidase mutations. *Am J Hum Genet.* 2000;66(6):1821-32. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1378046/
- (13) Ribeiro I, Marcão A, Amaral O, et al. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet.* 2001;109(1):24-32.
- (14) dos Santos MR, Tanaka A, Sá Miranda MC, et al. GM2-gangliosidosis B1 variant: analysis of beta-hexosaminidase alpha gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am J Hum Genet.* 1991;49(4):886-90. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683169/
- (15) Ribeiro D. Study of W402X mutation: frequency of the lysosomal a-L-iduronidase variant in the Portuguese population and function analysis. *Dissertação de mestrado, Universidade do Minho, 2012.* <http://hdl.handle.net/1822/24478>
- (16) Lugowska A, Amaral O, Berger J, et al. Mutations c.459+1G>A and p.P426L in the ARSA gene: prevalence in metachromatic leukodystrophy patients from European countries. *Mol Genet Metab.* 2005;86(3):353-9.
- (17) Mangas M. *Caracterização Molecular das Mucopolissacaridoses tipo IIIA e IIIB em Portugal.* Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2006.
- (18) Coutinho MF, Lacerda L, Prata MJ, et al. Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis IIIC: two novel mutations in the HGSNAT gene. *Clin Genet.* 2008;74(2):194-5.
- (19) Coutinho MF, Lacerda L, Macedo-Ribeiro S, et al. Lysosomal multienzymatic complex-related diseases: a genetic study among Portuguese patients. *Clin Genet.* 2012;81:379-93.