

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 (HCRC) 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: Painéis de genes associados a patologias do desenvolvimento sexual (PDS)

Patologia	Painel de Genes
Determinação primária do sexo	<i>ATRX; DHH; DMRT1; LHCGR; MAP3K1; NROB1; NR5A1; SOX9; SRY; WNT4; WT1</i>
Diferenciação Sexual	<i>AMH; AMHR2; AR; ATRX; BMP15; CYP17A1; CYP19A1; DHH; DMRT1; FSHR; HSD17B3; INSL3; LHCGR; MAMLD1; MAP3K1; NROB1; NR5A1; RXFP2; SRD5A2; SRY; STAR; WT1</i>
Esteroidogénese	<i>CYP11B1; CYP17A1; CYP19A1; HSD3B2; HSD17B3+NR0B1; NR5A1; POR; STAR</i>
Infert.masculina/femina; Hipog. Hipog	<i>DMRT1; NROB1; NR5A1; ANOS1(KAL1); FGFR1; FSHR; INSL3; LHCGR; PROKR2; RXFP2; CHD7; GNRHR; TAC3; SPRY4; IL17RD; SOX10; TEX11</i>
Infert. Feminina: Falência ovárica prematura	<i>BMP15; FOXL2; FSHR; LHCGR; NR5A1; NOBOX; WNT4</i>
Infertilidade e Ciliopatias (S.Kartagener)	<i>DNAH5; DNAH11; DNAI1; DNAI2; NME8(TXND3); DNAAF2(KTU); RSPH9; RSPH4A</i>

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)	HCRC	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/HCRC
7 BMPRIA (5)	HCRC	54 MSH2 (3)(4)	HBOC/HCRC
8 BRCA1 (1;2;3)	HBOC	55 MSH6 (3)(4)	HBOC/HCRC
9 BRCA2 (1;2;3)	HBOC	56 MUTYH (5)	HBOC/HCRC
10 BRIP1 (3)	HBOC	57 NBN (2;3)	HBOC/NBS
11 BUB1B (5)	HCRC	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/HCRC
18 CEP57	MVA2	65 PRF1	FHL
19 CHEK2 (2;3)	HBOC	66 PRKARIA	MNS
20 CYLD	FC	67 PTCHI (5)	BCNS
21 DDB2	XP	68 PTEN (1;2;3)(5)	HBOC/HCRC
22 DICER1	PPB	69 RAD51C (3)	HBOC
23 DIS3L2	PS	70 RAD51D (3)	HBOC
24 EGFR	LC	71 RBI	RB/LC
25 EPCAM (4)	HCRC	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)	HCRC
36 FANCD2	FA	83 SMARCB1	RTPS
37 FANCE	FA	84 STK11 (1;2;3)(5)	HBOC/HCRC
38 FANCF	FA	85 SUFU	BCNS
39 FANCG	FA	86 TMEM127	PCC
40 FANCI	FA	87 TP53 (1;2;3)	HBOC/HCRC
41 FANCL	FA	88 TSC1	LAM
42 FANCM	FA	89 TSC2	TSC
43 FH	LRCC	90 VHL	VHLD
44 FLCN	BHD	91 WRN	WRN
45 GATA2	MDS	92 WTI	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; **BOC-** 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; **HCRC-** Hereditary Colorectal Cancer; **HP-** Hereditary Paraganglioma; **HPT-** Hyperparathyroidism; **LC-** Lung Cancer; **LAM-** Lymphangioliomyomatosis; **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); HCRC:(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/).

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/accompanhamento clínico e respetivos tratamentos.

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