

_DESVENDAR “DEScobrir, VENcer as Doenças rARas”

DESVENDAR “DEScobrir, VENcer as Doenças rARas”

Célia Nogueira^{1,2}, Lisbeth Silva¹, Cristina Pereira², Altina Lopes², Marisa Encarnação¹, Maria Francisca Coutinho¹, Olga Amaral¹, Sandra Alves¹, Laura Vilarinho^{1,2}

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

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

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

_Resumo

As Doenças Raras apresentam uma incidência inferior a 5 casos em cada 10.000 pessoas, estando identificadas cerca de 7.000 a nível mundial, das quais 80% são origem genética. Estima-se que em Portugal existam 600.000 a 800.000 doentes portadores destas patologias. O projeto de investigação DESVENDAR “DEScobrir, VENcer as Doenças rARas”, financiado pelo Norte 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014), possibilitou a implementação da tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) no nosso laboratório, contribuiu para grandes avanços no diagnóstico genético das doenças hereditárias do metabolismo, uma vez que tem a capacidade de gerar uma enorme quantidade de dados num curto espaço de tempo e a um custo acessível, fornecendo informações importantes aos profissionais de saúde e aos doentes, no âmbito da medicina personalizada. A translação de conhecimentos de NGS para a área de prestação de serviços permite obter um diagnóstico preciso destas doenças raras, detetar com maior celeridade a existência de casos semelhantes e diminuir o peso no Sistema Nacional de Saúde devido a tratamentos paliativos prolongados e pouco específicos. Esta investigação translacional está a capacitar o nosso país com novas abordagens tecnológicas, reforçando o nosso Centro como laboratório de referência para o estudo destas patologias.

_Abstract

Rare Diseases have an incidence of less than 5 cases per 10.000 people, with around 7.000 identified worldwide, being 80% of genetic origin. It is estimated that in Portugal there are 600,000 to 800,000 patients with rare diseases. The research project DESVENDAR “DEScobrir, VENcer as Doenças rARas”, funded by Norte 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014), allowed the implementation of Next Generation Sequencing (NGS) technology in our laboratory, which is underlying major advances in genetic diagnosis of rare metabolic diseases, as it has the capacity to generate a huge amount of data in a short time and at an affordable cost, providing practical information to health professionals and patients within the scope of personalized medicine. The translation of NGS knowledge to the laboratorial routine is facilitating a better understanding of these rare diseases and is allowing a quicker detection of similar cases, reducing the costs in the national health system due to prolonged and unspecific palliative treatments. This translational research is enabling our country with new technological approaches, strengthening our Center as a reference laboratory for the study of these pathologies.

_Introdução

Na União Europeia, as Doenças Raras (DR) são definidas por uma prevalência inferior a 5 casos por 10 000 pessoas (Decisão 1295/1999/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 29-04-1999), afetando, segundo as últimas estatísticas publicadas, cerca de 6 a 8% da população. Em Portugal, estima-se que existam 600.000 a 800.000 portadores destas doenças. O número total de DR é cada vez maior, sendo estimado que, a cada semana, sejam descritas cinco novas doenças a nível mundial.

No nosso país a verdadeira dimensão do problema permanece desconhecida, dada a inexistência de uma identificação adequada destas doenças, bem como o reduzido número e dimensão dos estudos epidemiológicos realizados até à data. No entanto, a publicação da Estratégia Integrada para as DR 2015-2020 está a melhorar o conhecimento destas doenças no país ⁽¹⁾. De acordo com a literatura, cerca de 25% dos doentes espera pelo diagnóstico definitivo entre 5 a 30 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas ⁽²⁾. Este facto é revelador das dificuldades com que se deparam os doentes afetados por estas doenças. O prognóstico destes doentes é, em geral, desfavorável, sendo as DR responsáveis por 35% da mortalidade antes da idade de 1 ano, 10% entre os 1 e 5 anos e 12% entre os 5 e os 15 anos ⁽³⁾. A gestão das DR exige além da prestação de cuidados de saúde altamente especializados, uma ação intersectorial conjunta para a consensualização de boas práticas para a utilização eficiente dos recursos, partilha de bases de dados, definição de prioridades, fornecimento de informação detalhada aos doentes e monitorização dos resultados de avanços na investigação. Torna-se assim imperioso aprofundar a investigação focando estas patologias, com vista a aumentar o conhecimento

sobre as suas bases moleculares e, conseqüentemente, melhorar o diagnóstico dos doentes raros tornando mais célere e mais precisa a resposta aos clínicos, facilitando o acesso dos doentes à terapia, quando existente, ou à informação. Note-se que a informação, por si só, é já uma enorme mais-valia na área das DR de base genética uma vez que permite oferecer às famílias afetadas aconselhamento genético, despiste de portadores e mesmo diagnóstico pré-natal. A identificação da causa de uma DR representa, tanto para a família afetada como para a comunidade médico-científica, um enorme avanço.

A Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), no Porto, é o braço laboratorial do Programa Nacional do Rastreio Neonatal, sendo dos únicos centros de investigação do Ministério da Saúde exclusivamente dedicados ao estudo das Doenças Hereditárias do Metabolismo (DHM). O INSA, enquanto laboratório de estado, conjuga as vertentes de investigação e desenvolvimento (I&D) e de prestação de serviços. Assim, esta investigação translacional permitiu a transferência de conhecimentos e técnicas resultantes de abordagens de I&D no âmbito do estudo das doenças raras, para a área assistencial, de modo a serem disponibilizados como prestação de serviços pelo INSA.

_Objetivo

O principal objetivo desta investigação foi implementar a tecnologia de NGS para a investigação da etiologia molecular de DR e transferir os respetivos conhecimentos e técnicas resultantes destas abordagens de investigação para a unidade de prestação de serviços, com base na medicina personalizada.

_Doentes e métodos

Em 2016 foi adquirido para o nosso laboratório um Sequenciador de Nova Geração, MiSeq (Illumina), ao abrigo do projeto DESVENDAR “DEScobrir, VENcer as Doenças rARas”, financiado pelo Norte 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014). Seguidamente foi implementada a tecnologia de NGS para a investigação da etiologia molecular de DR, permitindo assim a identificação de novas mutações causadoras de doença de

uma forma mais rápida e eficaz através do desenvolvimento de novos testes de diagnóstico.

Foram estudados 335 doentes pediátricos e adultos com idades compreendidas entre 1 dia e os 80 anos, provenientes de vários Centros Hospitalares do país, com suspeita de doença genética de origem metabólica.

Para a preparação das amostras foi utilizado DNA genómico extraído a partir de sangue periférico, utilizando o kit QIAamp DNA Blood (QIAGEN).

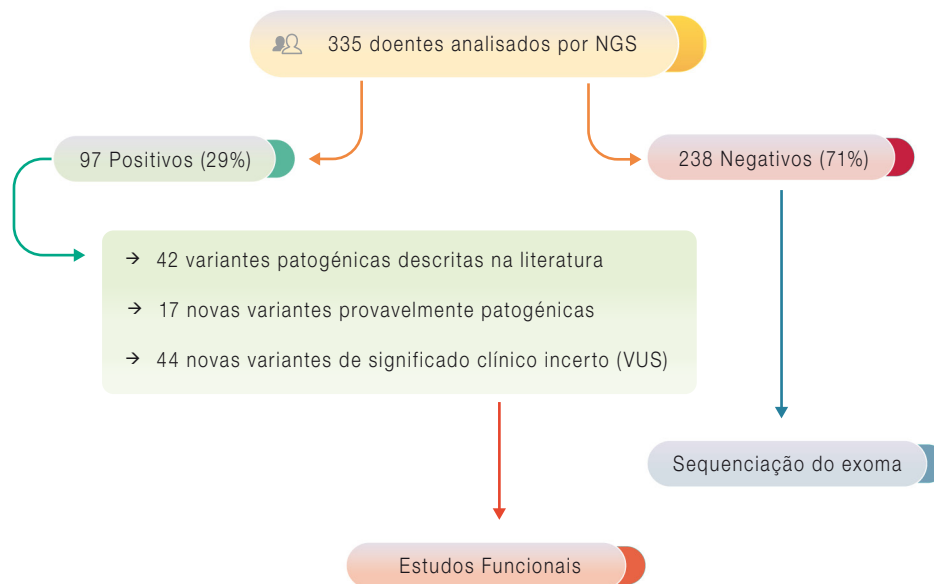
Foram utilizados diferentes painéis de genes para as várias DHM, desenhados especificamente e de acordo com a metodologia SureSelect QXT da Agilent, aplicados à investigação de doenças metabólicas (Aminoacidopatias, Acidúrias Orgânicas, Doenças da β -oxidação Mitocondrial dos Ácidos Gordos e Glicogenoses), Doenças Mitocondriais (4), Doenças Lisossomais de Sobrecarga e Doenças Peroxissomais (5).

Os resultados foram analisados utilizando programas de análise disponíveis (Surecall e Anovar). As variantes foram filtradas através de uma *pipeline* bioinformática desenvolvida *in house*, tendo em conta o tipo de mutação, a frequência populacional, a presença em bases de dados (dbSNP, HGMD, ClinVar, etc) e preditores *in-silico* (6).

_Resultados

Através da sequenciação dos vários painéis de genes associados a DHM nos 335 doentes investigados obteve-se uma profundidade de leitura média de 213x por amostra. A média de variantes identificadas para cada amostra foi de 422 e após a análise destas, filtrando através de vários parâmetros, identificamos a variante ou variantes causais em 97 casos estudados (29%). Das 103 variantes identificadas, 42 eram variantes patogénicas descritas na literatura, 17 novas variantes provavelmente patogénicas e 44 novas variantes de significado clínico incerto (VUS). Para averiguar a patogenicidade das VUS identificadas está em curso o desenvolvimento de estudos funcionais. Todas as variantes causais foram confirmadas pelo método de Sanger e efetuaram-se estudos familiares de co-segregação. Nos restantes 238 doentes em que não se identificou nenhuma variante suspeita, iremos prosseguir o estudo através da sequenciação do exoma clínico (Figura 1).

Figura 1: Resultados do estudo de 335 doentes suspeitos de Doenças Raras analisados por NGS.



_Discussão

O recente desenvolvimento da tecnologia de NGS revolucionou o diagnóstico molecular das DR de base genética, que em geral não têm biomarcador patognomónico. O presente estudo possibilitou esclarecer a etiologia molecular de 29% dos doentes estudados, permitindo o seu diagnóstico definitivo.

A implementação desta tecnologia de NGS está a contribuir para a melhoria significativa da capacidade de diagnóstico instalada, incrementando a oferta de prestação de serviços com novos testes diagnósticos para DR (Figura 2), mais rápidos, precisos e potencialmente rentáveis.

A identificação da causa de uma DR diminui a ansiedade da família e permite a melhoria da condição do doente através do acesso a cuidados específicos.

Figura 2: Painéis de genes disponibilizados como prestação de serviços pelo INSA.

Painéis de NGS	Nº genes
DNA mitocondrial completo	37
Doenças Mitocondriais (genes nucleares)	202
Doenças Lisossomais de Sobrecarga	70
Doenças Peroxissomais	30
Doenças da β -oxidação mitocondrial dos Ácidos Gordos	22
Glicogenoses	14
Ceroide Lipofuscinose Neuronal	30
Rabdomiólise	58
Hipoglicemia	37
Hiperamonémia	
Exoma Clínico ou Mendelioma	~ 5.000
Exoma Completo	~ 20.000

_Conclusão

Esta investigação translacional está assim a proporcionar o desenvolvimento de uma medicina personalizada com tratamentos orientados para cada doente e para um aconselhamento genético adequado às famílias afetadas. Possibilitará ainda à comunidade médico-científica compreender melhor a etiologia das DR, detetar com maior celeridade a existência de casos semelhantes e reforçar o nosso Centro como laboratório de referência para o estudo destas patologias.

Agradecimentos

- Aos clínicos dos vários centros Hospitalares que nos enviaram os casos para este estudo, assim como aos doentes que colaboraram nesta investigação.
- Ao Norte 2020 pelo financiamento deste projeto de investigação (NORTE-01-0246-FEDER-000014 DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”).
- À UTI do DGH_INSA pela colaboração na confirmação das variantes identificadas pelo método de Sanger.

Referências bibliográficas:

- (1) Ministérios da Saúde, da Educação e Ciência e da Solidariedade, Emprego e Segurança Social. Despacho n.º 2129-B/2015, 26 de fevereiro. DR 2ª Série, n.º 41(2º supl.):5190-(8)-(10). Aprova a Estratégia Integrada para as Doenças Raras 2015-2020. <https://dre.pt/application/file/66622142>
- (2) Isidro G and Brito e Costa P. Observar as Doenças Raras em Portugal. Boletim Epidemiológico Observações. 2015;5(Supl 7):1-2. <http://hdl.handle.net/10400.18/3783>
- (3) Background Paper on Orphan Diseases for the WHO Report on Priority Medicines for Europe and the World. 2013
- (4) Nogueira C 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>
- (5) Encarnação M et al., Desenvolvimento de um ensaio de sequenciação de nova geração para acelerar o diagnóstico molecular das doenças lisossomais de sobrecarga. Boletim Epidemiológico Observações. 2018 maio-agosto;7(22):34-37. <http://hdl.handle.net/10400.18/5589>
- (6) Nogueira et al., Targeted next generation sequencing identifies novel pathogenic variants and provides molecular diagnoses in a cohort of pediatric and adult patients with unexplained mitochondrial dysfunction. Mitochondrion. 2019 Jul;47:309-317. doi: 10.1016/j.mito.2019.02.006.