

ANÁLISE DE MUTAÇÕES POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO NAS PARAPARESIAS ESPÁSTICAS HEREDITÁRIAS

Aluna: Daniela Burguêz; Orientador: Jonas Alex Morales Saute; Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Palavras-chave: paraparesia espástica familiar, SPG, sequenciamento de nova geração

Contatos: dburguez@hcpa.edu.br
jsaute@hcpa.edu.br

Financiamento: MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (460941/2014-3), FIPE-HCPA

INTRODUÇÃO

As paraparesias espásticas hereditárias (PEH) são um grupo heterogêneo de doenças neurodegenerativas caracterizadas por espasticidade e fraqueza muscular. As PEH são classificadas em formas puras ou complicadas de acordo com a presença de achados neurológicos adicionais (Ex: deficiência intelectual, ataxia, neuropatia periférica, etc...). Há grande heterogeneidade genética nas PEH com ao menos 71 loci e 54 genes relacionados. Objetivamos avaliar o rendimento do sequenciamento de nova geração (NGS) de painel com 12 genes relacionados às PEH em famílias não relacionadas com esta suspeita e avaliar o perfil epidemiológico destas condições no Estado do Rio Grande do Sul (RS).

MÉTODOS

Casos índices de famílias consecutivas atendidas desde abril de 2011 foram recrutados no ambulatório de Neurogenética do HCPA. Além da suspeita de PEH, a presença de pelo menos um dos seguintes critérios era necessária para inclusão no estudo: recorrência familiar, consanguinidade ou presença de corpo caloso afilado. O NGS de painel de 11 genes (regiões codificantes) relacionados às formas mais frequentes de PEH em outras populações *ATL1*, *BSCL2*, *CYP7B1*, *KIAA0196*, *KIF5A*, *NIPA1*, *REEP1*, *SPAST*, *SPG7*, *SPG11* e *ZFYVE26* e do gene *CYP27A1*, relacionado à xantomatose cerebrotendínea (CTX), foi realizado no Ion Torrent *Personal Genome Machine*. Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas classificadas de acordo com os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* de 2015 foram confirmadas por sequenciamento de Sanger. A análise das variantes identificadas nos casos índices foi realizada por sequenciamento de Sanger para os demais familiares sintomáticos avaliados. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (GPPG-HCPA 14-0695). Todos os sujeitos de pesquisa ou seus responsáveis assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da participação no estudo.

RESULTADOS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

	Sexo	Início anos	Idade anos	Duração anos
Todos	19F/10M	25,7 (15,2)	45,9 (12,1)	20,2 (10,4)
Com diagnóstico	11F/5M	25,1 (15,7)	46,7 (11,5)	18,9 (11,3)
Sem diagnóstico	8F/5M	24,7 (16,0)	45,0 (13,1)	20,3 (10,8)

Dados em média (desvio padrão). F feminino, M masculino

TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO DE PACIENTES E VARIANTES

Fam	Sexo	Início (anos)	Duração (anos)	SPRS	Gene	Variante	Tipo de mutação	Classificação
2*	M	25	12	20	SPAST	p.Arg581*/-	nonsense	Patogênica
3	F	23	8	20	SPAST	p.Val423Leu/-	missense	Patogênica
10	F	30	11	22	SPAST	c.1492_1493+2delAGGT/-	deletion	Patogênica*
10	F	41	3	22	SPAST	c.1492_1493+2delAGGT/-	deletion	Patogênica*
10	F	48	20	37	SPAST	c.1492_1493+2delAGGT/-	deletion	Patogênica*
13	F	1	27	10	SPAST	p.Ala425Pro/-	missense	Patogênica*
13	M	1	7	19	SPAST	p.Ala425Pro/-	missense	Patogênica
13	M	1	2	18	SPAST	p.Ala425Pro/-	missense	Patogênica
13	M	1	3	8	SPAST	p.Ala425Pro/-	missense	Patogênica
21	F	7	26	31	SPAST	p.Gly471Asp/-	missense	Patogênica*
21	F	4	2	5	SPAST	p.Gly471Asp/-	missense	Patogênica
30	F	55	4	20	SPAST	p.Arg460Cys/-	missense	Patogênica
30	F	62	0	8	SPAST	p.Arg460Cys/-	missense	Patogênica
30	F	73	10	20	SPAST	p.Arg460Cys/-	missense	Patogênica
30	M	45	11	13	SPAST	p.Arg460Cys/-	missense	Patogênica
38	M	45	10	14	SPAST	p.Arg581*/-	nonsense	Patogênica
6	M	45	6	23	SPG11	c.6776_6784delTATTAAGT(x2)	deletion	Provavelmente patogênica*
8	F	15	15	44	SPG11	c.2444+1G>C(x2)	splicing	Patogênica
36	F	20	9	41	SPG11	p.Gln541*/-	nonsense	Patogênica
						p.Ala2334Pro/-	missense	Patogênica
42	M	14	41	35	SPG11	p.Met245Valfs(x2)	frameshift	Patogênica
46	F	18	20	28	SPG11	p.Gln145Profs(x2)	frameshift	Patogênica*
46	F	20	24	38	SPG11	p.Gln145Profs(x2)	frameshift	Patogênica
32	F	34	20	ND	SPG7	c.1450_1_1457delGGAGAGGGCG/-	deletion	Patogênica*
						p.Gly672Arg/-	missense	Patogênica
33	M	22	39	ND	SPG7	c.1450_1_1457delGGAGAGGGCG/-	deletion	Patogênica*
						p.Ala572Val/-	missense	Patogênica
33	F	40	28	ND	SPG7	c.1450_1_1457delGGAGAGGGCG/-	deletion	Patogênica*
						p.Ala572Val/-	missense	Patogênica
33	M	22	48	ND	SPG7	c.1450_1_1457delGGAGAGGGCG/-	deletion	Patogênica*
						p.Ala572Val/-	missense	Patogênica
9	F	22	22	32	CYP27A1	p.Arg474Gln(x2)	missense	Patogênica
22*	M	29	6	ND	CYP27A1	p.Arg479Gly/ p.Arg479Cys	missense	Patogênica
						p.Glu321Lys	missense	Provavelmente patogênica*
1	M	30	20	30	CYP7B1	p.Thr297Ala	missense	Provavelmente patogênica*
11	F	45	12	18	ZFYVE26	p.Arg1862Cys(x2)	missense	Provavelmente patogênica*

Dados em média (desvio padrão). F feminino, M masculino, ND não disponível, SPRS, Spastic Paraplegia Rating Scale. * indica mutações novas. # controles positivos. Os casos índices em que foi realizado NGS estão destacados em negrito.

Casos índices de 29 famílias (13 formas puras e 16 formas complicadas) foram analisados (Tabela 1). O diagnóstico molecular foi confirmado em 45% dos casos (13/29); sete com formas puras (6 SPG4, 1 SPG7) e seis com formas complicadas (4 SPG11, 1 SPG7 e 1 CTX). Em outros três casos, um provável diagnóstico foi indicado pela presença de variantes provavelmente patogênicas: dois para formas puras (SPG5 e SPG11) e um para forma complicada (SPG15). Desta forma, 55,2% (16/29) dos casos tiveram ao menos o diagnóstico provável da PEH indicado pelo método utilizado. Conforme a Tabela 1, as características clínicas foram semelhantes entre os grupos com e sem diagnóstico estabelecido. O tempo médio até o diagnóstico final foi de 20 anos (16,5 anos para genes com herança dominante e 21,3 anos para genes com herança recessiva). Após a realização do painel por NGS confirmamos as variantes identificadas nos casos índices e analisamos seus familiares também acometidos por sequenciamento de Sanger. Desta forma, identificamos no total 16 pacientes com SPG4 (6 famílias e 1 paciente que foi utilizado como controle positivo do painel), 6 pacientes com SPG11 (5 famílias, 1 destas com diagnóstico provável), 4 pacientes com SPG7 (2 famílias), 2 pacientes com CTX (2 famílias, 1 destas utilizada como controle positivo do painel), 1 paciente com SPG5 e 1 com SPG15 (ambos com diagnóstico provável). Os dados estão apresentados na Tabela 2.

As Figuras 1 e 2 apresentam o rendimento diagnóstico do painel de 12 genes relacionados às PEH por NGS de acordo com o fenótipo clínico e com o tipo de herança.

FIGURA 1 – RENDIMENTO DO PAINEL POR FENÓTIPO

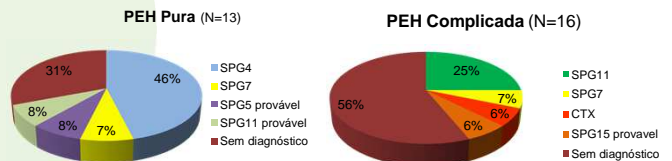
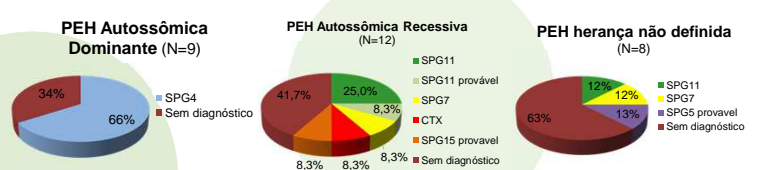


FIGURA 2 – RENDIMENTO DO PAINEL POR HERANÇA



CONCLUSÃO

As PEH são um grupo heterogêneo de doenças raras e negligenciadas em que a análise molecular é essencial para confirmação diagnóstica e adequado aconselhamento genético. O NGS de painel de 12 genes relacionados às PEH apresentou adequado rendimento diagnóstico (55,2%) para as famílias com suspeita de PEH no RS. O rendimento do painel para as formas com herança recessiva (58,3%) foi maior do que o relatado na literatura em estudos que utilizaram sequenciamento de Sanger de genes candidatos em outras populações, 20-29%.¹

A forma mais frequente no RS de PEH-dominante foi a SPG4 (6/10, 60%) e de PEH-recessiva a SPG11 (4/15, 26%). A frequência relativa de ambas as formas foi maior no RS do que é relatado na literatura para outras regiões do mundo, entre 37-46% para SPG4 e entre 15-21% para SPG11.¹ Entre as PEH, diagnosticamos 2 casos de CTX, uma doença do metabolismo dos sais biliares potencialmente tratável e que deve ser considerada no diagnóstico diferencial das PEH.²

O NGS de painel de 12 genes relacionados às PEH parece ser uma estratégia custo e tempo efetiva para o diagnóstico das PEH e pode ser empregado em outros serviços de saúde no Brasil tanto para fins diagnósticos quanto de pesquisa.

Bibliografia

- 1 - Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*. 2014;42(3):174-83.
- 2 - Saute JA, Giugliani R, Merkens LS, Chiang JP, DeBarber AE, de Souza CF. Look carefully to the heels! A potentially treatable cause of spastic paraplegia. *J Inher Metab Dis*. 2015 Mar;38(2):363-4.