

_Porfirias – implementação do Laboratório Nacional de Referência para o Diagnóstico Bioquímico e Molecular

Porphyrias – National Reference Laboratory implementation for Biochemical and Molecular Diagnosis

Filipa Ferreira¹, Célia Carmona¹, Célia Nogueira², Cristina Pereira², Altina Lopes², Laura Vilarinho^{1,2}

filipa.ferreira@insa.min-saude.pt

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

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

_Resumo

As porfirias são um grupo de oito doenças metabólicas raras, resultantes de diferentes deficiências enzimáticas na biossíntese do grupo heme. Cada uma dessas deficiências resultará na acumulação e excreção de precursores do heme, nomeadamente o ácido delta-aminolevulínico, o porfobilinogénio e as porfirinas. Cada porfíria tem um perfil característico de acumulação de biomarcadores, que será utilizado na diferenciação das diferentes porfirias. Estas doenças raras têm atingimento multisistémico (podendo mimetizar outras doenças) e apresentam uma heterogeneidade de sintomas, o que torna desafiante o seu diagnóstico.

O papel do laboratório é preponderante no diagnóstico de porfíria. O conhecimento acerca da casuística nacional e da história natural das porfirias é escasso, devido à inexistência de critérios para o diagnóstico, dificuldade na interpretação dos resultados bioquímicos e a inexistência de um laboratório de referência para o diagnóstico bioquímico e molecular.

Desde 2022, tem vindo a ser desenvolvido e implementado, na URN-INSA, um laboratório de referência nacional para o diagnóstico bioquímico e molecular de porfirias, agudas e cutâneas, de modo a dar resposta a este grupo de doenças. Este trabalho é pioneiro no estabelecimento do diagnóstico bioquímico de porfirias utilizando, respetivamente, dois algoritmos no diagnóstico de porfirias agudas e cutâneas. Através destes algoritmos, num total de cerca de 200 amostras testadas, caracterizamos 9 porfirias agudas e 21 porfirias cutâneas.

Desta forma, e comparativamente com o descrito na literatura, os algoritmos desenvolvidos demonstraram uma boa sensibilidade, especificidade e robustez no diagnóstico de porfirias.

_Abstract

Porphyrias are a group of eight rare metabolic diseases resulting from different enzyme deficiencies in heme biosynthesis. Each of these deficiencies will result in the accumulation and excretion of heme precursors, namely delta-aminolevulinic acid, porphobilinogen, and porphyrins. Each porphyria has a characteristic biomarker accumulation profile, which will be used to differentiate between the different porphyrias. These rare diseases have multisystem involvement (may mimic other diseases) and present a heterogeneity of symptoms, which makes their diagnosis challenging. The role of the laboratory is paramount in the diagnosis of porphyria. Knowledge about national case studies and the natural history of porphyrias is scarce, probably due to a lack of diagnostic criteria, difficulty in interpreting biochemical results, and the lack of a reference laboratory for performing biochemical and molecular diagnosis.

Since 2022, the URN-INSA has been developing and implementing a national reference laboratory for the biochemical and molecular diagnosis of acute and cutaneous porphyrias, in order to respond to this group of diseases.

This work is pioneering in establishing biochemical diagnosis of porphyrias, using two algorithms for diagnosing acute and cutaneous porphyrias, respectively. Using these algorithms, we characterised 9 acute porphyrias and 21 cutaneous porphyrias in a total of around 200 samples tested.

Compared to what is described in the literature, the developed algorithms demonstrated good sensitivity, specificity, and robustness in diagnosing porphyrias.

_Introdução

As porfirias são um grupo de doenças raras, maioritariamente hereditárias do metabolismo da via da biossíntese do heme, e resultam de uma deficiência de uma das 8 enzimas que fazem parte desta via metabólica.

As porfirias são classificadas, fisiopatologicamente, em hepáticas ou eritropoiéticas (relativamente ao local onde se acumulam os intermediários do heme) ou, clinicamente, em agudas (anteriormente hepáticas agudas) e cutâneas, sendo esta última categoria ainda subdividida em bolhosas e não bolhosas (ou tendo fragilidade cutânea quando exposta à luz solar). A primeira e as últimas três reações enzimáticas da via metabólica, ocorrem na mitocôndria, enquanto as outras quatro localizam-se no citoplasma (**figura 1**). Assim, temos quatro porfirias agudas: Porfíria Aguda Intermitente (PAI, OMIM #176000), Porfíria Variegada (PV, OMIM#176200), Coproporfíria Hereditária (CPH, OMIM#121300) e a Porfíria por Deficiência do Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase (ADP, OMIM# 612740, também conhecida por porfíria de Döss), e quatro porfirias cutâneas: Protoporfíria Eritropoiética (PPE; OMIM# 17000), Protoporfíria Eritropoiética ligada ao X (PPE-XL OMIM# 300752), Porfíria Cutânea Tarda (PCT; OMIM# 176100) e a Porfíria Eritropoiética Congénita (PEC; OMIM# 263700) (**figura 1** e **tabela 1**).

Cada uma destas deficiências enzimáticas resulta na acumulação específica das porfirinas e dos seus precursores, imediatamente anteriores ao bloqueio enzimático. Enquanto os precursores das porfirinas (o ácido delta-aminolevulínico - ALA e o porfobilinogénio-PBG), são moléculas lineares não fluorescentes, as porfirinas (Uroporfirinas -Uro, Heptaporfirinas -Hepta, Hexaporfirinas -Hexa, Pentaporfirinas -Penta, coproporfirinas -Copro, protoporfirinas -Proto) são moléculas circulares e que emitem fluorescência quando excitadas com luz a um determinado comprimento de onda. É com base nestes biomarcadores que se estabelece o diagnóstico bioquímico de uma porfíria (1-3). A maioria das porfirias tem um padrão de hereditariedade autossómico dominante (PAI, PV, CPH), à exceção de PPE, PEC, PHE (Porfíria Hepato Eritropoiética) e ADP, cuja hereditariedade é autossómica recessiva. De salientar, que no caso da PCT, podemos ter uma PCT familiar (ou tipo 2), por deficiência na enzima URO-descarboxilase de hereditariedade autossómica dominante, ou PCT adquirida (ou tipo 1). Uma terceira condição ocorre, quando no gene *UROD*, os 2 alelos encontram-se afetados. Neste caso, trata-se da PHE, uma forma mais grave da PCT. Por outro lado, as variantes que afetam a forma eritróide da ALAS (*ALAS2*) estão, regra geral, associadas ao cromossoma X, como é o caso da PPE-XL, onde em vez de haver uma deficiência enzimática, ocorre um ganho de função.

Relativamente à PCT adquirida, esta, está regra geral, associada a um consumo abusivo de álcool. Outros fatores desencadeantes podem ser também as infeções víricas, nomeadamente pelo vírus da hepatite C (VHC) e a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), o tabagismo, a exposição prolongada a pesticidas, a sobrecarga em ferro (indivíduos com variantes patogénicas no gene da Hemocromatose - *HFE* têm um risco acrescido) e a toma de estrogénios (4). Apenas 25% dos casos de PCT são do tipo familiar (5).

Nos casos de ADP, as variantes só estão descritas num número reduzido de famílias (6), enquanto noutras porfirias, o efeito fundador leva a que algumas variantes tenham sido amplamente distribuídas por algumas populações. O caso mais comum é

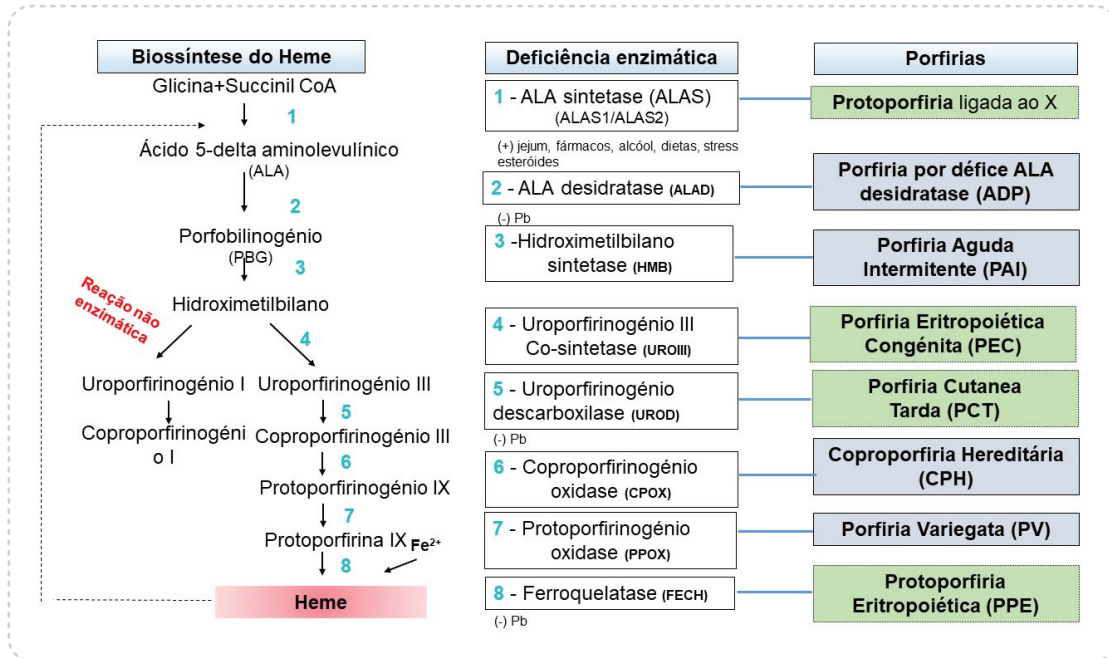
o da variante c.175C>T (p.Arg59Trp) no gene *PPOX*, com uma prevalência de 3:1000 habitantes, na população caucasiana da África do Sul (95% dos casos de PV). Este efeito fundador foi originado por um casal de colonos holandeses que se instalaram na cidade do Cabo, no séc. XVII (7). O efeito fundador também está descrito para o gene *HMBS*, na Suécia e Noruega, para a variante8 (c.593G>A) (p.Trp198*) (8), estimando-se que seja responsável por 50% dos casos de PAI, no norte da Suécia. As porfirias apresentam também diferentes penetrâncias clínicas e, para a mesma mutação, podem apresentar diferentes fenótipos, mesmo em indivíduos da mesma família.

As porfirias são conhecidas há mais de 150 anos. A primeira porfíria descrita na literatura médica remonta a 1874 (9). Também ao longo da história existem relatos da presença de porfíria, como por exemplo o retratado no filme *The Madness of King George III*, de Alan Bennett, assim como em Portugal, a loucura e o *delirium* de Maria I, em 1766. A loucura do pintor Vincent Van Gogh (1853-1890), provavelmente atribuídos a uma porfíria aguda intermitente (PAI) e desencadeada por fatores porfirinogénicos como a má nutrição e essencialmente pelo abuso de substâncias aditivas (ex.: álcool-absinto, as tintas – tinha por hábito “mordisca-las”) (10) e, por último, o folclore em torno dos “lobisomens” e dos vampiros, este último associado ao conde Drácula, Vlad III (1431-1476).

Não existem dados sobre a prevalência das porfirias em Portugal. Na década de 70, os estudos de Palma-Carlos & Palma-Carlos (1974) (11) identificaram 12 casos de Porfíria Variegata, num total de 64 casos de porfirias, o que de acordo com aqueles autores, daria uma prevalência da ordem dos 19% (12-14). Em 2015, Guerreiro e Amado (15), publicaram sobre “porfirias cutâneas em idade pediátrica” e, em 2023 foi publicado um “Consenso Português de Porfirias Agudas: Diagnóstico, Tratamento, Monitorização e Referência” (16), por um painel multidisciplinar de especialistas.

Epidemiologicamente, considera-se que a PAI é o tipo de porfíria mais comum das porfirias agudas, a PCT a porfíria mais comum das cutâneas (1:10 000), e a porfíria ADP, a mais rara das porfirias (<0,001:1 000 000). Estima-se que na Europa a prevalência sintomática de PAI seja de 5,9:1 000 000, no entanto, a prevalência de indivíduos com variantes no gene

Figura 1: Via de biossíntese do heme.



Caixas verdes – porfirias cutâneas, caixas cinza claro – porfirias agudas, (-)Pb – enzima inibida pelo chumbo, (+) compostos que estimulam a via de síntese do heme) (modificado de: de Souza PVS, et al., 2021) (17).

Tabela 1: Tipos de porfiria de acordo com a deficiência enzimática, hereditariedade, sintomatologia, idade ao diagnóstico e prevalência por género (modificado IPNET).

Tipo de porfiria (OMIM)	Enzima afetada	Hereditariedade	Casos neuroviscerais	Fragilidade cutânea, pele bolhosa	Fotossensibilidade aguda	Nº mutações (HGMD*)	Idade ao diagnóstico, género
ADP (#612740)	ALAD	AR	+	-	-	15	Extremamente rara, infância, adolescência
PAI (#176000)	HMBS	AD	+	-	-	546	Adolescência, adultos, > ♀
PV (#121300)	PPOX	AD	+ ¹	+ ¹	-	211	Adolescência, adultos, lesões cutâneas em 60%; > ♀
CPH (#121300)	CPOX	AD	+ ¹	+ ¹	-	94	Adolescência, adultos, lesões cutâneas em 30%; > ♀
PCT (PCT,tipo I) (#176090)	-	Adquirida ² (80%)	-	+	-	-	Adultos
PCT (PCT,tipo II; f-PCT) (#176100)	UROD	AD (20%)	-	+	-	149	Porfiria mais comum, adultos, M>F
PHE (#176100)	UROD	AR	-	+	-	16	Extremamente rara, infância, M=F
PEC (#263700)	UROS	AR	-	+	-	61	Menos comum, porfiria cutânea mais grave, infância, M=F
PPE (#177000)	FECH	AD/AR	:	-	+	231	Comum, infância, adolescência (1-6a); M=F
PPE-XL (#300752)	ALAS2	Ligado X ³	:	-	+	2	Infância, adolescência, M>F

ADP – porfiria por défice do ácido delta aminolevulínico; PAI – porfiria aguda intermitente; PV – porfiria variegata; PCT – porfiria cutânea tarda; PHE – porfiria hepatoeritropoiética; PEC – porfiria eritropoiética congénita; PPE – protoporfiria eritropoiética; PPE-XL – protoporfiria eritropoiética ligada ao cromossoma X; AR – autossómica recessiva, AD – autossómica dominante; ALAS2 – ALA sintetase 2; ALAD – ácido delta aminolevulínico desidratase; CPOX – coproporfirinogénio oxidase; FECH – ferroquelatase; HMBS – hidroximetilbilano sintetase; PPOX – protoporfirinogénio oxidase; UROD – uroporfirinogénio descarboxilase; UROS – uroporfirinogénio III sintetase, F – feminino; M – masculino; XL – ligado ao cromossoma X; ¹ podem ocorrer simultaneamente sintomas neuroviscerais e lesões cutâneas; ² cerca de 80% dos casos são devido a causas exógenas, fatores ambientais; ³ quando ocorre em mulheres, o fenótipo pode ir desde assintomático até muito grave, como acontece no homem, devido à inativação do cromossoma X. * Human Gene Mutation Database (HGMD®); <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

HMBS será de 1:1 782, com uma penetrância clínica de 1-10% (6,18,19). Para a PV estima-se que a prevalência seja de cerca de 3,2:1 000 000 (4) e para a CPH de 1:10 000 000. A PAI sintomática é muito rara e manifesta-se usualmente depois da puberdade, entre a segunda e a quinta década de vida (15-45 anos) (20,21). As crises são mais comuns nas mulheres do que nos homens, sendo desencadeadas maioritariamente por fatores hormonais, relacionados com o ciclo menstrual, medicamentos, drogas, dietas restritas, jejum prolongado, condições de stress extremo ou mesmo processos infecciosos (22). Na Suécia e Noruega, devido ao efeito fundador, a prevalência é mais elevada (1:1 000) (2,23,24). A PPE é a porfíria mais comum em crianças (9,2:1 000 000) (6). Nas restantes porfirias, a prevalência é muito baixa; <1:1 000 000.

_Objetivo

O facto das porfirias se encontrarem subdiagnosticadas em Portugal, deve-se provavelmente, entre outras limitações, à inexistência de critérios para o diagnóstico e de um laboratório especializado neste tipo de patologias. Apresenta-se, neste artigo, a experiência da Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (URN-INSA) no desenvolvimento de um laboratório de referência para o diagnóstico bioquímico e molecular de porfirias de modo a aprofundar o conhecimento neste grupo de doenças, a sua real incidência, bem como a caracterização bioquímica e genética de casos suspeitos, mas sem diagnóstico definitivo.

_Material e métodos

Desde que iniciámos as ações de sensibilização para a necessidade de pensar e diagnosticar porfirias, recebemos desde 2022, cerca de 200 amostras (constituídas por amostras de urina, fezes e sangue).

Diagnóstico bioquímico de porfirias

O diagnóstico das porfirias é baseado em testes bioquímicos que utilizam três matrizes biológicas: urina, sangue e fezes, de preferência colhidas simultaneamente.

De acordo com a suspeita clínica, o tipo de amostra biológica será preponderante no diagnóstico (tabela 2). Uma amostra não adequada, quer por não cumprimento dos requisitos de acondicionamento e/ou armazenamento, quer pela não colheita da amostra apropriada, poderá induzir a falsos negativos. A urina, deverá ser uma urina ocasional e nunca uma urina de 24 horas (24h). Atualmente, a determinação da atividade enzimática residual associada a estas patologias, raramente é utilizada no diagnóstico, recorrendo-se preferencialmente ao estudo genético.

Assim, do que foi explanado, e após a implementação e validação das técnicas de cromatografia de alta pressão (HPLC) com deteção de fluorescência, da cromatografia líquida de troca iónica e de espectrofotometria (tabela 2) na deteção e quantificação dos precursores do heme, surgiu a necessidade de elaboração de algoritmos de diagnóstico bioquímico que, de uma forma intuitiva, permitissem auxiliar no diagnóstico de porfirias.

Desenvolvimento de algoritmos para o diagnóstico bioquímico de porfirias

Porfirias agudas

Testes de 1ª linha

A análise laboratorial dos precursores das porfirinas (ALA e PBG) em amostras de urina ocasional, é o primeiro passo no diagnóstico de uma porfíria aguda (tabela 2 e figura 2). Se houver suspeita clínica de uma porfíria aguda, o teste de Hoesch (teste *screening* do PBG) deverá ser efetuado. Se o teste *screening* do PBG for positivo, é necessário então quantificar o PBG, o ALA e as porfirinas totais urinárias (PTU). Se persistir a suspeita clínica, devemos passar para os testes de 2ª linha caso haja uma elevação do ALA, isoladamente (PBG normal ou ligeiramente aumentado), dever-se-á suspeitar da porfíria por déficit ADP, sempre após excluir outras causas, como a tirosinemia tipo I e intoxicação por chumbo (Saturnismo) (figuras 1 e 2).

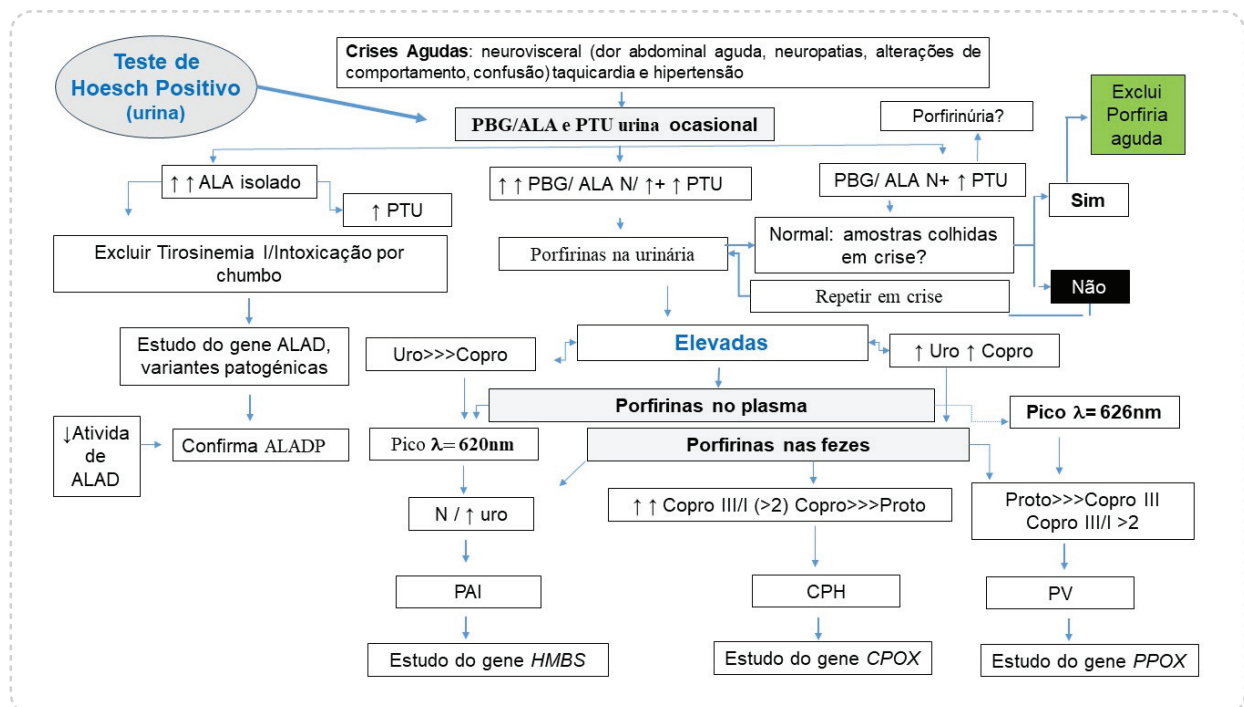
No caso de todos os parâmetros terem sido negativos e persistir a suspeita de uma porfíria, devemos efetuar o estudo genético.

Tabela 2: ⚡ Marcadores bioquímicos mais relevantes, nas diferentes matrizes biológicas, consoante o tipo de porfíria.

Porfíria	Urina		Fezes	Sangue	
	PBG/ALA	Porfirinas urinárias	Porfirinas fecais	Porfirinas eritrocitárias	Pico de fluorescência plasmática
ADP	↑ ↑ ALA	Copro III	N	ZnPP	–
PAI	PBG>>>ALA	Uro I+Copro III	N/ ↑	N	λ=619-620nm
PV	PBG>ALA ¹	Copro III	Proto>>Copro III	N	λ=626-628nm
PEC ⁴	N	Uro I, Copro I	Copro I	↑ ZnPP, Copro I, Uro I, Proto	λ=619-620nm
PCT ² /PHE	N	↑ Uro I+Hepta	Isocopro, Hepta	N	λ=619-620nm
PPE ³	N	N	Proto	↑ PP IX (Proto livre 80%>> ZnPP)	λ=634-636nm
PPE-XL	N	N	Proto	↑ PP IX (ZnPPIX 40%)	λ=634-636nm

ALA – ácido delta aminolevulínico, PBG – porfobilinogénio, Copro – coproporfirina, Uro – uroporfirina, Hepta – heptaporfirina, Isocopro – isocoproporfirina, Proto – protoporfirina, ZnPP – protoporfirina zincada, PPIX – protoporfirina livre, N – normal, ↑ – aumentado, >>> – muito aumentado. ¹ podem ocorrer simultaneamente sintomas neuroviscerais e leões cutâneas; ² As porfirinas urinárias são úteis numa suspeita de PCT em presença de lesões cutâneas típicas (bolhas), ³ O pico máximo de emissão de fluorescência plasmática é o teste bioquímico de eleição numa suspeita de PPE juntamente com as lesões cutâneas após exposição solar; ⁴ Acumulação de protoporfirina na biliar, pele, fígado e dentes.

Figura 2: ⚡ Algoritmo de diagnóstico para as porfirias agudas.



Diagnóstico diferencial de porfirias agudas – 2ª linha

Com um teste de PBG positivo (o ALA normal ou ligeiramente aumentado), o passo seguinte é identificar o tipo de porfiria, através da diferenciação e quantificação dos diferentes isómeros das porfirinas, em amostras urinárias e fecais (**tabela 2**). Outro teste bioquímico essencial é a medição do pico máximo de emissão de fluorescência plasmática. Este teste é essencial no diagnóstico de PV, uma vez que esta porfiria é a única que apresenta um pico máximo de emissão de fluorescência plasmática entre os comprimentos de onda de 626 e 628nm. (**tabela 2**) (25). O estudo deve ser complementado com a determinação das porfirinas totais nas fezes, e do seu fracionamento por HPLC, à semelhança do que acontece com a amostra de urina.

Porfirias cutâneas

Nas porfirias cutâneas (**figura 3**), o ALA e o PBG não são informativos. Neste caso havendo uma suspeita, dever-se-á efetuar a análise das porfirinas plasmáticas (através da determinação do pico máximo de emissão de fluorescência plasmática) e quantificação das porfirinas urinárias totais na urina e do seu fracionamento (26). A determinação de um pico máximo de emissão de fluorescência plasmática e a quantificação da protoporfirina eritrocitária, deverão ser realizadas sempre que ocorram manifestações agudas dolorosas de fotossensibilidade. De salientar que, em ambas as porfirias (agudas e cutâneas) o contacto do laboratório com o clínico é muito importante, pois dependendo da existência dos sintomas, diferentes estratégias de diagnóstico poderão ser adotadas (**figuras 2 e 3**).

Quer nas porfirias, agudas e cutâneas, após a confirmação bioquímica do tipo de porfiria devemos considerar uma 3ª linha de diagnóstico: a caracterização molecular através da realização por sequenciação de nova geração (NGS) de um painel de 9 genes (*ALAD, ALAS2, CPOX, FECH, HFE, HMBS, PPOX, UROD, UROS*) associado a porfirias e sequenciado na plataforma Illumina, identificando assim a mutação causal no caso índice, e o respetivo estudo familiar.

_Resultados e discussão

Com a metodologia implementada e validada em consonância com as diretrizes dos laboratórios internacionais, especializados no diagnóstico de porfirias (<https://new.porphyrinet.org/en/content/ipnet-working-groups>, *International Porphyria Network-IPNET*), e através da utilização dos algoritmos apresentados (**figuras 2 e 3**), num total de cerca de 200 amostras estudadas, caracterizamos do ponto de vista bioquímico e molecular, 9 porfirias agudas e 21 porfirias cutâneas (**gráfico 1**).

Atualmente, já podemos assumir que Portugal tem casuística relativamente às porfirias agudas uma vez que são já conhecidos (incluindo as porfirias diagnosticadas neste trabalho), 19 casos (dados não publicados), distribuídos por PAI (N=5+5*), PV (N=2+5*) e 2 casos de CPH. Relativamente às porfirias cutâneas, identificamos 18 PCT e 3 PPE, embora devam existir, ainda muitos casos não diagnosticados no nosso país (**gráfico 1**) (* Casos já diagnosticados, anteriores ao estudo).

Provavelmente, existirão mais casos, mas os resultados deverão estar dispersos pelos diversos hospitais ou unidades de saúde. De salientar que, para a PAI, o tratamento já foi aprovado em 2023, pelo INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Dos dados obtidos, a PCT é a mais comum das porfirias. Relativamente às amostras testadas, não se obteve nenhum falso positivo (confirmadas pelo estudo molecular). No que concerne aos falsos negativos, uma vez que o diagnóstico das porfirias é essencialmente realizado através da análise dos precursores do heme, bioquimicamente, não havendo um incremento destes, e cumprindo todas as normas de colheita das amostras e matrizes biológicas, os resultados negativos permitiram excluir o diagnóstico de porfiria. Apesar da caracterização molecular ser a ferramenta de referência para a confirmação do diagnóstico, não deverá ser utilizada como único teste, principalmente nas porfirias agudas, dada a baixa penetrância clínica destas. O facto de se confirmar uma variante patogénica, não é indicador de que a doença está activa. No entanto, o estudo molecular é extremamente importante, quer na caracterização do caso índice, quer no estudo de familiares (portadores assintomáticos, de modo a evitarem os compostos porfirinogénicos). Parece não existir

Figura 3: Algoritmo de diagnóstico para as porfirias cutâneas.

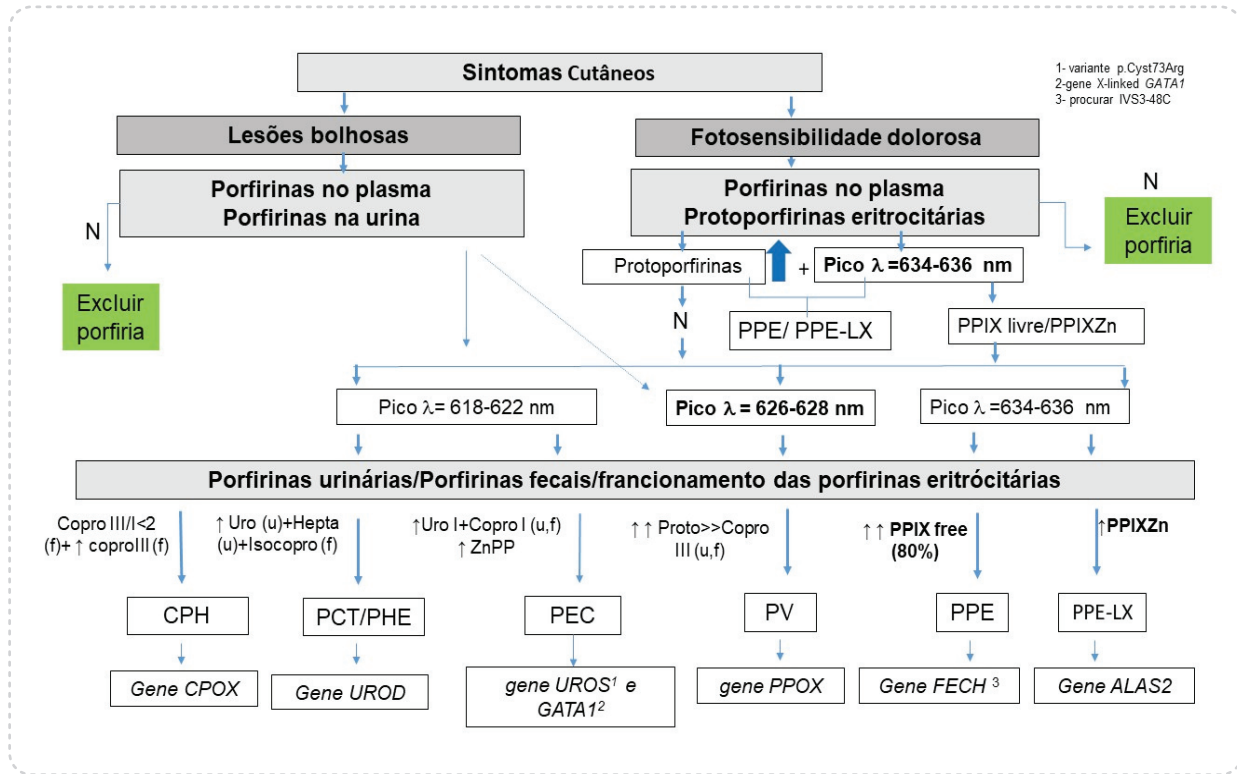
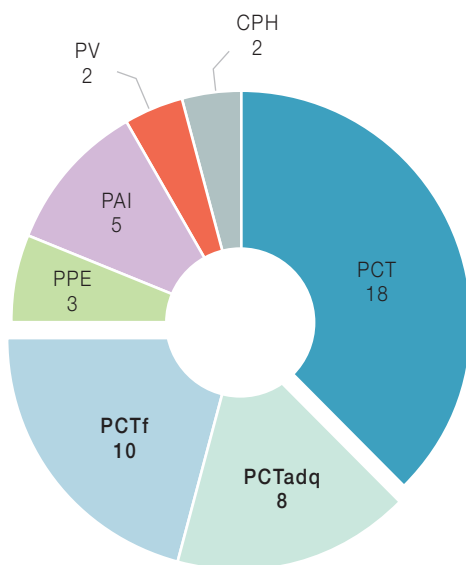


Gráfico 1: Número de casos de porfirias diagnosticadas desde 2022.



PCT – Porfiria Cutanea Tarda; PCTadq – PCT adquirida; PCTf – PCT familiar; PPE – Protoporfiria Eritropoiética; PAI – Porfiria Aguda Intermitente; PV – Porfiria Variegata; CPH – Coproporfiria Hereditária.

uma correlação linear entre o genótipo e o fenótipo, de modo a prever a gravidade da doença ou o prognóstico. Do que se encontra descrito na literatura, existem certas variantes genéticas que são associadas a crises recorrentes, no caso de PAI, e outras variantes que parecem ter um efeito protector, limitando o número de crises nas porfirias agudas (27). De qualquer forma, estes testes deverão sempre ser realizados em laboratórios especializados e com experiência neste tipo de diagnóstico (19).

Em regra geral, dever-se-á pensar num diagnóstico de porfiria aguda quando o ALA, PBG e as PTU estão aumentadas, juntamente com a presença de um pico de emissão de fluorescência plasmática. A diferenciação do tipo de porfiria terá de ter em conta todos estes parâmetros (tabela 2), juntamente com a análise do perfil das diferentes isoformas. Dada a heterogeneidade de sintomas, o diagnóstico de porfiria pode ser desafiante (figuras 2 e 3). Também se deve ter em atenção, aquando do diagnóstico diferencial de uma porfiria, que os resultados dos biomarcadores (ALA, PBG, PTU, fluorescência plasmática e fracionamento das

porfirinas), devem ser analisados sempre em conjunto, e não isoladamente (**tabela 2**), uma vez que determinadas patologias podem originar aumentos inespecíficos de certas porfirinas (porfirinúria) e se individualmente se valorizar, incorre-se no erro de diagnosticar erradamente uma porfiria (3). A hiperbilirubinemia é um exemplo de diagnóstico diferencial de porfiria, onde pode existir uma coproporfirinúria (neste caso, a razão dos isómeros da coproporfirina será utilizada como diagnóstico diferencial). Outro exemplo é a síndrome de Dubin-Johnson (SDJ), sendo que neste caso, verifica-se um aumento da coproporfirina I, enquanto na doença de Gilbert ocorre um aumento em ambos os isómeros de coproporfirina I e III. A porfirinúria também pode ocorrer nas disfunções hepáticas, no consumo de estupefacientes e medicamentos, no consumo excessivo de álcool ou de outros compostos metabolizados pelo citocromo P450. O total das porfirinas fecais também pode estar aumentado devido à degradação bacteriana da amostra, quando as condições de armazenamento não tiverem sido cumpridas. Um laboratório especializado deverá ser capaz de reconhecer e/ou avaliar a hipótese de estarmos perante estas causas secundárias de aumento de produção de porfirinas. Por exemplo, também pode ocorrer aumentos secundários de protoporfirina no sangue, em resultado de anemias ou mesmo intoxicação por metais pesados, e estes aumentos não são exclusivos de uma porfiria.

Apesar de se terem diagnosticado 19 porfirias agudas, comparativamente com o que se encontra descrito na literatura, o número ainda fica aquém do esperado, considerando o que está descrito para a Europa, através dos países que participam na IPNET.

Um diagnóstico atempado é a chave essencial para o sucesso do tratamento, diminuição da morbilidade e aumento de qualidade de vida do doente porfírico. A otimização dos procedimentos laboratoriais, dos algoritmos de diagnóstico bioquímico, das ações de sensibilização, da intervenção em inúmeros fóruns médicos, e uma resposta rápida e alicerçada com os padrões internacionais, atestam a capacidade técnica e científica da Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, do Instituto

Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (URN-INSA) para diagnosticar todos os tipos de porfiria. A execução das metodologias necessárias, a interpretação dos resultados e a participação nos esquemas de qualidade da IPNET (<https://new.porphyrinet.org/en/content/worldwide-network>), tem contribuído para a consolidação do laboratório de referência no estudo destas patologias.

Pensar porfiria, será sempre o primeiro passo para direcionar o diagnóstico, e o facto destas doenças serem multisistémicas (podendo mimetizar outras doenças) e apresentarem uma heterogeneidade de sintomas, leva a que o diagnóstico de uma porfiria seja desafiante, onde o papel do laboratório é preponderante na confirmação do diagnóstico bioquímico de porfiria ou na exclusão deste. A publicação do Consenso Português de Porfirias Agudas (16), veio reforçar o papel da URN-INSA, no diagnóstico bioquímico e molecular de porfirias.

_Considerações finais

Do nosso conhecimento e até à presente data, este trabalho é pioneiro no estabelecimento do diagnóstico bioquímico de porfirias, utilizando os algoritmos apresentados, e um laboratório, a nível nacional, que disponibiliza para as porfirias agudas e cutâneas um diagnóstico integrado (bioquímico e molecular). A não existência, até recentemente, de casuística em Portugal relativamente às porfirias, era essencialmente devido à baixa suspeita clínica para o diagnóstico e a complexidade inerente à confirmação do mesmo.

Presentemente, com todas as ações de sensibilização e formação junto da comunidade médica e demais profissionais de saúde, relativamente ao tipo de amostras a estudar, o seu acondicionamento, e o facto de existir neste momento um laboratório de referência para o estudo bioquímico desta doença (URN-DGH), tem contribuído para contrariar esta tendência. Ações de sensibilização para pensar porfiria (brochura informativa <http://hdl.handle.net/10400.18/10544>), testar e referenciar, tem sido determinante para o conhecimento e diagnóstico deste grupo de doenças raras.

Agradecimentos:

Os autores agradecem aos médicos pelo envio das amostras dos doentes, nomeadamente Dra Sónia Moreira, Dra Anabela Oliveira, Dr Patrício Aguiar, Dr Luís Brito-Avô, Dra Fátima Ferreira, Dra Joana Araújo, Dra Carolina Pavão, Dra Fátima Oliveira, Dr Rui Pimenta, Dra Luz Brasão, Dr Nuno Ladeira, Dra Ema Freitas, Dra Graça Araújo, Dr Fábio Murteira, Dra Bárbara Soeiro, Dra Patrícia Queirós, Dr António Mesquita, Dra Conceição Viegas, Dra Eduarda Couto, Dr João Madaleno, Dra Teresa Campos, Dra Joana Araujo, Dra Márcia Pereira e aos doentes pela sua colaboração.

Referências bibliográficas:

- (1) Floderus Y, Sardh E, Möller C, et al. Variations in porphobilinogen and 5-aminolevulinic acid concentrations in plasma and urine from asymptomatic carriers of the acute intermittent porphyria gene with increased porphyrin precursor excretion. *Clin Chem*. 2006 Apr;52(4):701-7. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.058198>
- (2) Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrins. *Lancet*. 2010 Mar 13;375(9718):924-37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61925-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61925-5)
- (3) Di Pierro E, De Canio M, Mercadante R, et al. Laboratory Diagnosis of Porphyrin. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jul 26;11(8):1343. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081343>
- (4) Lefever S, Peersman N, Meersseman W, et al. Development and validation of diagnostic algorithms for the laboratory diagnosis of porphyrias. *J Inherit Metab Dis*. 2022 Nov;45(6):1151-62. <https://doi.org/10.1002/jimd.12545>
- (5) Badminton MN, Whatley SD, Sardh E, et al. Porphyrins and the porphyrias. In: Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6th ed. Elsevier, 2018, pp. 776-99.
- (6) Elder G, Harper P, Badminton M, et al. The incidence of inherited porphyrias in Europe. *J Inherit Metab Dis*. 2013 Sep;36(5):849-57. Epub 2012 Nov 1. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9544-4>
- (7) Meissner PN, Corrigan AV, Hift RJ. Fifty years of porphyria at the University of Cape Town. *S Afr Med J*. 2012 Mar 2;102(6):422-6. <https://doi.org/10.7196/samj.5710>
- (8) Tjensvoll K, Bruland O, Floderus Y, et al. Haplotype analysis of Norwegian and Swedish patients with acute intermittent porphyria (AIP): Extreme haplotype heterogeneity for the mutation R116W. *Dis Markers*. 2003-2004;19(1):41-6. <https://doi.org/10.1155/2003/384971>
- (9) Schultz JH, 1874. A case of Pemphigus Leprosus, complicated by visceral leprosy. (Dissertation. Greifswald, 1874).
- (10) Loftus LS, Arnold WN. Vincent van Gogh's illness: acute intermittent porphyria? *BMJ*. 1991 Dec 21-28;303(6817):1589-91. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6817.1589>
- (11) Palma-Carlos ML, Palma-Carlos AG. Diagnóstico laboratorial das porfirias humanas. *J Soc Cíenc Med Lisboa*. 1974;138:353.
- (12) Palma-Carlos AG, Candeias O. Porfirias. *Med de Hoje*. 1969;2:9.
- (13) Silva JAM, Manso C. Padrões urinários e fecais dos precursores do Heme em algumas doenças hepáticas. *Revista de Medicina de Lourenço Marques*. 1971;4:121.
- (14) Palma-Carlos AG. Porfirias hepáticas. Aspectos clínicos. *Soc Cienc Med Lisboa*. 1974;138:365.
- (15) Guerreiro A, Amado C. Porfirias cutâneas em idade pediátrica. *SPDV*. 2015;73(3):331-40. <https://doi.org/10.29021/spdv.73.3.456>
- (16) Brito-Avô L, Pereira L, Oliveira A, et al. Consenso Português de Porfirias Agudas: Diagnóstico, Tratamento, Monitorização e Referenciação. *Acta Med Port*. 2023 Nov 2;36(11):753-64. <https://doi.org/10.20344/amp.20323>
- (17) de Souza PVS, Badia BML, Farias IB, et al. Acute Hepatic Porphyria: Pathophysiological Basis of Neuromuscular Manifestations. *Front Neurosci*. 2021;15:715523. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.715523>
- (18) Anderson KE, Sassa S, et al. X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw Hill, 2001. pp. 2991-3062. <https://doi.org/10.1036/ommbid.153>
- (19) Chen B, Solis-Villa C, Hakenberg J, et al. Acute Intermittent Porphyria: Predicted Pathogenicity of HMBS Variants Indicates Extremely Low Penetrance of the Autosomal Dominant Disease. *Hum Mutat*. 2016 Nov;37(11):1215-22. <https://doi.org/10.1002/humu.23067>
- (20) Elder GH. Hepatic porphyrias in children. *J Inherit Metab Dis*. 1997 Jun;20(2):237-46. <https://doi.org/10.1023/a:1005313024076>
- (21) Hultdin J, Schmauch A, Wikberg A, et al. Acute intermittent porphyria in childhood: a population-based study. *Acta Paediatr*. 2003 May;92(5):562-8. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2003.tb02507.x>
- (22) Bonkovsky HL, Dixon N, Rudnick S. Pathogenesis and clinical features of the acute hepatic porphyrias (AHPs). *Mol Genet Metab*. 2019 Nov;128(3):213-18. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.03.002>
- (23) Thunell S, Floderus Y, Henrichson A, et al. Porphyria in Sweden. *Physiol Res*. 2006;55(Suppl 2):S109-118. <https://doi.org/10.33549/physiolres.930000.55.S2.109>
- (24) Rossetti MV, Granata BX, Giudice J, et al. Genetic and biochemical studies in Argentinean patients with variegate porphyria. *BMC Med Genet*. 2008 Jun 20;9:54. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-54>
- (25) Szlendak U, Bykowska K, Lipniacka A. Clinical, Biochemical and Molecular Characteristics of the Main Types of Porphyria. *Adv Clin Exp Med*. 2016 Mar-Apr;25(2):361-8. <https://doi.org/10.17219/acem/58955>
- (26) To-Figueras J, Erwin AL, Aguilera P, et al. Congenital erythropoietic porphyria. *Liver Int*. 2024 Aug;44(8):1842-1855. <https://doi.org/10.1111/liv.15958>
- (27) Andersson C, Floderus Y, Wikberg A, et al. The W198X and R173W mutations in the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria have higher clinical penetrance than R167W. A population-based study. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000 Nov;60(7):643-8. <https://doi.org/10.1080/003655100300054891>