



Observações

Boletim Epidemiológico

sumário

Editorial

Departamento de Genética Humana do INSA: 50 anos de atividade em diagnóstico, prevenção e investigação da doença genética em Portugal p03

Department of Human Genetics of INSA: 50 years of activity in diagnosis, prevention, and research of genetic disease in Portugal

Glória Isidro, Coordenadora do DGH, INSA

Artigos breves

Diagnóstico prenatal e neonatal

1_ Diagnóstico pré-natal: história, impacto e perspetivas futuras p04

Prenatal diagnosis: history, impact, and future prospects

Bárbara Marques, Hildeberto Correia

2_ Avaliação externa da qualidade do diagnóstico pré-natal de anomalias cromossómicas da Unidade de Citogenética do INSA – 30 anos de evolução (1994-2024) p10

External quality assessment in prenatal diagnosis of chromosomal anomalies within the Cytogenetics Unit of INSA – 30 years of evolution (1994-2024)

External quality assessment in prenatal diagnosis of chromosomal anomalies within the Cytogenetics Unit of INSA – 30 years of evolution (1994-2024)

Marisa Silva, Hildeberto Correia

3_ O Impacto do diagnóstico pré-natal e da ecografia obstétrica na deteção de anomalias congénitas: uma análise nacional e regional entre 2011 e 2019 p15

The role of prenatal diagnosis and obstetric ultrasound in the diagnosis of congenital anomalies: a national and regional analysis with data from 2011 and 2019

The role of prenatal diagnosis and obstetric ultrasound in the diagnosis of congenital anomalies: a national and regional analysis with data from 2011 and 2019

Paula Braz, Ausenda Machado, Carlos Aniceto, Carlos Matias Dias

4_ História do Programa Nacional de Rastreio Neonatal p19

History of the National Neonatal Screening Program in Portugal

History of the National Neonatal Screening Program in Portugal

Laura Vilarinho; Comissão Executiva do Programa Nacional do Rastreio Neonatal em Portugal

5_ Vinte anos de rastreio neonatal alargado de doenças metabólicas em Portugal (2004-2024) p27

Twenty years of expanded newborn screening for metabolic diseases in Portugal (2004-2024)

Hugo Rocha, Carmen Sousa, Helena Fonseca, Ana Marcão, Laura Vilarinho

6_ Rastreio neonatal da fibrose quística em Portugal: etapas de uma história de sucesso p33

Cystic fibrosis newborn screening in Portugal: stages of a successful story

Ana Marcão, Lurdes Lopes, Conceição Pinho, Fábio Guimarães, Laura Vilarinho

Da investigação ao diagnóstico de doenças genéticas / raras

7_ Genética molecular das hemoglobinopatias no Departamento de Genética Humana do INSA: uma trajetória de contributos para a ciência e para a sociedade p38

Molecular genetics of hemoglobinopathies in the Department of Human Genetics of INSA: a trajectory of contributions to science and society

Paula Faustino, Pedro Loureiro, Susana Gomes, Pedro Lopes, João Gonçalves

8_ Departamento de Genética Humana do INSA pioneiro na caracterização molecular de patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias na população portuguesa p44

Department of Human Genetics of INSA, a pioneer in the molecular characterization of inherited bleeding and thrombotic disorders in the Portuguese population

Isabel Moreira, Célia Ventura, Rita Certã, João Gonçalves, Dezsó David

9_ Diagnóstico e investigação bioquímica e molecular das citopatias mitocondriais em Portugal: três décadas de história (1993-2024) p50

Biochemical and molecular diagnosis and research of mitochondrial cytopathies in Portugal: three decades of history (1993-2024)

Célia Nogueira, Cristina Pereira, Laura Vilarinho





Observações

Boletim Epidemiológico

10_ Doenças lisossomais de sobrecarga em Portugal: aspetos bioquímicos, genéticos e epidemiológicos p 55

Lysosomal storage diseases in Portugal: biochemical, genetic, and epidemiological aspects

Paulo Gaspar, Raquel Neiva, Lisbeth Silva, Laura Vilarinho

11_ Doenças lisossomais de sobrecarga: da epidemiologia genética ao desenvolvimento de modelos de doença p 60

Lysosomal storage disorders: from genetic epidemiology to disease model development

Luciana Moreira, Maria Francisca Coutinho, Maria Eduarda Moutinho, Matilde Barbosa Almeida, Francisca Gonçalves, Sofia Carvalho, Olga Amaral, Ana Joana Duarte, Marisa Encarnação, Paulo Gaspar, Mariana Gonçalves, Liliana Matos, Diogo Ribeiro, Hugo Rocha, Juliana Inês Santos, Sandra Alves

12_ Porfirias – Implementação do Laboratório Nacional de Referência para o Diagnóstico Bioquímico e Molecular p 67

Porphyrias – National Reference Laboratory Implementation for Biochemical and Molecular Diagnosis

Filipa Ferreira, Célia Carmona, Célia Nogueira, Cristina Pereira, Altina Lopes, Laura Vilarinho

13_ Diagnóstico molecular das síndromes de cancro hereditário da mama-ovário e colorretal: a experiência do Departamento de Genética Humana do INSA (1994-2025) p 76

Molecular genetic diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer and colorectal cancer syndromes: experience from the Department of Human Genetics of INSA (1994-2025)

Patrícia Theisen, Pedro Rodrigues, Glória Isidro, João Gonçalves

14_ Sinopse do diagnóstico molecular de patologias do desenvolvimento sexual no Departamento de Genética Humana do INSA: dos primeiros estudos à relevância de uma abordagem multigénica por sequenciação de nova geração p 84

Synopsis of the molecular diagnosis of disorders of sexual development in the Department of Human Genetics of INSA: from early studies to the relevance of a multigenic approach through next-generation sequencing

Iris Pereira-Caetano, Susana Gomes, João Gonçalves

_ Doenças genómicas e genómica funcional

15_ Genómica funcional – a investigação do RNA mensageiro e da proteína dele resultante no âmbito da missão do Departamento de Genética Humana do INSA p 90

Functional genomics – the investigation of messenger RNA and its resulting protein within the scope of the Department of Human Genetics' mission at INSA

Peter Jordan, Luísa Romão

16_ Análise genómica no Serviço Nacional de Saúde: modelo colaborativo INSA-ULSSM para implementação da análise de variantes patogénicas no exoma p 97

Genomic analysis in the National Health Service: an INSA-ULSSM collaborative model for implementing the analysis of pathogenic variants in the exome

José Ferrão, Catarina Macedo, Lara Neto, Joana Mendonça, Sara Rangel, Hugo Martiniano, Marta Soares, Sónia Custódio, Maria Rosário Santos, Ana Cristina Sousa, Ana Berta Sousa, Luís Vieira

17_ Doenças genómicas no Departamento de Genética Humana do INSA: da resolução de mapa físico à medicina genómica personalizada p 102

Genomic diseases at the Department of Human Genetics of INSA: from physical map resolution to personalized genomic medicine

Dezso David, Barbara Marques, Joana Fino, Andreas Gal

_ Toxicologia genética

18_ Biomonitorização humana e genotoxicidade ambiental: quatro décadas de investigação translacional sobre interação gene-ambiente e seu impacto em saúde pública p 109

Human biomonitoring and environmental genotoxicity: four decades of translational research on gene-environment interplay and its public health impact

Henriqueta Louro, Célia Ventura, Ana Tavares, Maria João Silva

Departamento de Genética Humana do INSA: 50 anos de atividade em diagnóstico, prevenção e investigação da doença genética em Portugal

Department of Human Genetics of INSA: 50 years of activity in diagnosis, prevention, and research of genetic disease in Portugal

Celebrar os cinquenta anos da Genética Humana no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge é revisitar uma trajetória alicerçada na visão, no pioneirismo e no compromisso com a saúde pública em Portugal. Foi em 1975, num período de mudança e renovação, que se lançou a base de um percurso científico que viria a transformar profundamente a forma como se compreendem, diagnosticam e acompanham as doenças genéticas no país.

Ao longo destas cinco décadas, o Instituto acompanhou os avanços científicos e tecnológicos que marcaram as últimas décadas, mantendo inalterada a sua missão essencial: colocar o conhecimento ao serviço das pessoas. Do diagnóstico pré-natal, neonatal e pós-natal ao longo da vida, à investigação em citogenética, molecular e bioquímica; da caracterização de doenças raras e genómicas à avaliação do impacto das interações gene-ambiente, cada etapa deste percurso do Departamento de Genética Humana espelha não apenas a inovação, mas também a dedicação, o rigor e o sentido de responsabilidade institucional.

Este número especial do *Boletim Epidemiológico Observações* constitui mais do que uma retrospectiva. Representa um testemunho vivo da relevância da genética humana no passado, um reconhecimento do impacto que assume no presente e uma projeção confiante para o futuro, no qual a investigação translacional, a colaboração internacional e a aposta em metodologias emergentes continuarão a produzir efeitos transformadores na vida de inúmeras pessoas e famílias.

O percurso aqui apresentado evidencia uma constante capacidade de adaptação e evolução, acompanhando os extraordinários avanços tecnológicos das últimas décadas. Do diagnóstico citogenético convencional às metodologias de alta resolução, da implementação pioneira do rastreio neonatal à integração da genómica funcional e da medicina personalizada, o Departamento de Genética Humana consolidou-se como uma referência nacional e internacional na área da genética médica e da saúde pública.

Assinalar este meio século é, sobretudo, prestar homenagem a todos aqueles que, com o seu trabalho, competência e visão, contribuíram para construir esta história e projetá-la no futuro.

Glória Isidro

Coordenadora do Departamento de Genética Humana
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
gloria.isidro@insa.min-saude.pt

Diagnóstico pré-natal: história, impacto e perspetivas futuras

Prenatal diagnosis: history, impact, and future prospects

Bárbara Marques; Hildeberto Correia

hildeberto.correia@insa.min-saude.pt

Unidade de Citogenética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

O diagnóstico pré-natal (DPN) engloba procedimentos destinados a avaliar a integridade estrutural e genética do feto, utilizando diferentes métodos complementares de diagnóstico. Este trabalho apresenta a evolução histórica e a implementação do DPN genético em Portugal, com ênfase nos avanços tecnológicos e nos resultados obtidos na Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana (UCI-DGH), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), entre 1979 e junho de 2025.

Nesse período, foram analisadas 27464 amostras de líquido amniótico e vilosidades coriônicas, com 1974 casos de anomalias cromossômicas: 1421 numéricas e 553 estruturais. Foram ainda realizados, desde 2017, 5563 testes de rastreio pré-natal não invasivo (NIPS), tendo sido identificados 78 casos com risco aumentado para trissomia.

A progressiva implementação de metodologias de citogenética e citogenética molecular aumentou significativamente a precisão e rapidez do DPN genético. A transição de técnicas convencionais para abordagens moleculares de alta resolução - incluindo rastreios não invasivos - melhorou a taxa de deteção e reduziu a necessidade de procedimentos invasivos. Desde 1979, a UCI-DGH tem desempenhado um papel fundamental nesta área, contribuindo para a diminuição da mortalidade e morbidade perinatal através de decisões clínicas mais informadas e aconselhamento genético eficaz.

_Abstract

Prenatal diagnosis (PND) encompasses procedures designed to assess the structural and genetic integrity of the foetus, using different complementary diagnostic methods. This paper presents the historical evolution and implementation of genetic PND in Portugal, with an emphasis on technological advances and the results obtained at the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge (INSA), Cytogenetics Unit of the Department of Human Genetics, between 1979 and June 2025.

During this period, 27464 samples of amniotic fluid and chorionic villi were analyzed, with 1974 cases of chromosomal abnormalities: 1421 numerical and 553 structural. Since 2017, 5563 non-invasive prenatal screening (NIPS) tests have been performed, identifying 78 cases with an increased risk of trisomy.

The progressive implementation of cytogenetic and molecular cytogenetic methodologies has significantly increased the accuracy and speed of genetic PND. The transition from conventional techniques to high-resolution molecular approaches - including non-invasive screening - has improved the detection rate and reduced the need for invasive procedures. Since 1979,

INSA has played a key role in this area, contributing to the reduction of perinatal mortality and morbidity through more informed clinical decisions and effective genetic counselling.

_Introdução

O diagnóstico pré-natal (DPN) engloba um conjunto de procedimentos destinados a avaliar a integridade morfológica e genética de um embrião ou feto, recorrendo a meios complementares de diagnóstico. A aplicação das técnicas de imagiologia, iniciada em 1958, e o seu aperfeiçoamento ao longo dos anos permitem a deteção, não invasiva, de anomalias congénitas (AC) ⁽¹⁾.

O diagnóstico pré-natal genético surgiu em 1966 e tem evoluído significativamente desde então. Paralelamente aos avanços nas técnicas invasivas de colheita de amostras fetais, os progressos nas áreas da citogenética e biologia molecular ampliaram a capacidade de diagnosticar doenças cromossômicas e monogénicas, permitindo a deteção de um maior número de alterações genéticas patogénicas. Atualmente, procedimentos como amniocentese e biópsia das vilosidades coriônicas (BVC) permitem o diagnóstico de quase todas as doenças genéticas conhecidas. Em casos com múltiplas anomalias, é possível realizar estudos por *microarray* cromossômico ou sequenciação do genoma ou do exoma, de forma a investigar a etiologia subjacente ⁽²⁻⁴⁾. Por sua vez, os métodos não invasivos de rastreio de DNA fetal livre (cfDNA) no sangue materno (NIPS), têm ganho destaque na deteção das aneuploidias mais comuns - trissomias 21, 18 e 13 ⁽⁵⁾ (**figura 1**).

artigos breves_ n. 1

As AC afetam cerca de 3 a 6% das gravidezes, sendo muitas identificadas ainda durante a gestação, nos exames ecográficos ou de rastreio (6). Nesse contexto, o DPN genético é fundamental, pois permite confirmar suspeitas ecográficas /clínicas, planejar intervenções pré e pós-natais, oferecer orientação reprodutiva e apoiar o aconselhamento genético ao casal, contribuindo para a redução da mortalidade e morbilidade perinatais, assim como para a tomada de decisões devidamente fundamentada.

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), foi pioneiro em Portugal ao realizar, em 1979, o primeiro cariótipo fetal, no então Laboratório de Genética Humana (LGH). Este foi um marco relevante no campo do DPN, consolidando o INSA como referência nacional no DPN citogenético (figura 2).

Figura 1: Evolução das técnicas de citogenética e biologia molecular (abaixo da linha) e sua aplicação ao DPN (acima da linha).

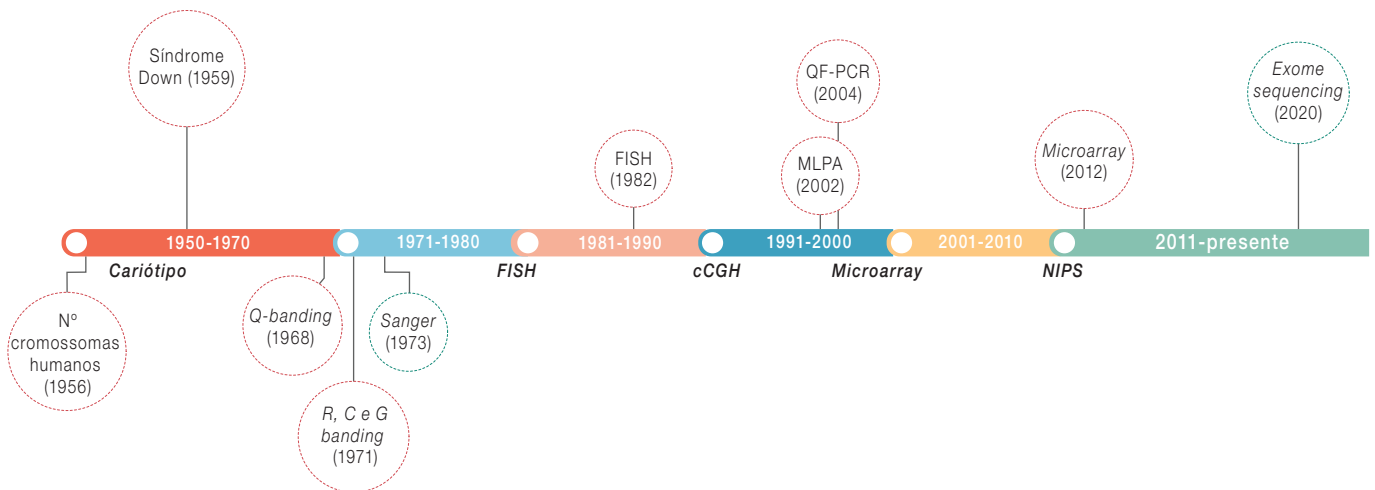
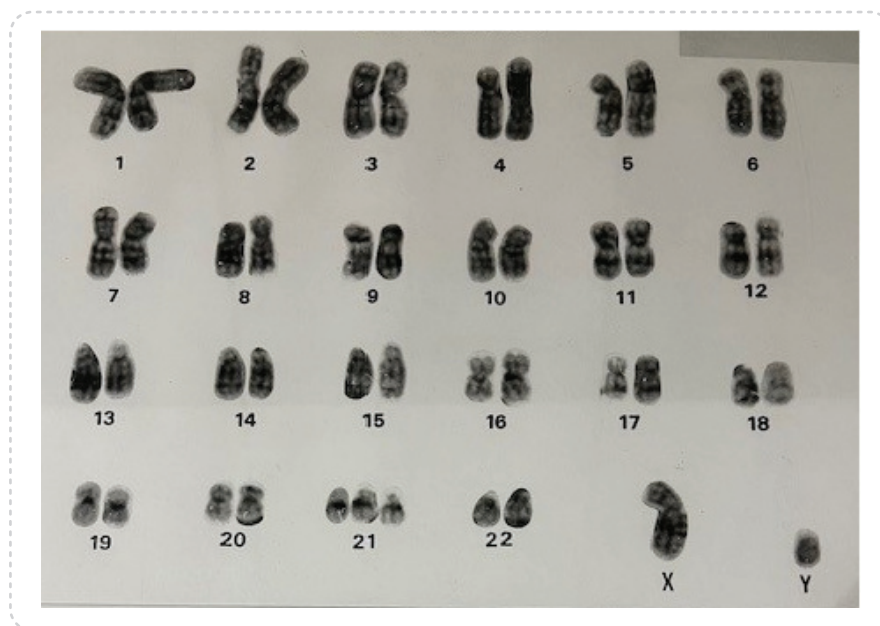


Figura 2: Primeiro cariótipo fetal, realizado na UCI, onde foi detetada a presença de três cromossomas 21, possibilitando assim o diagnóstico da primeira trissomia 21 em DPN.



Durante as décadas de 1980 e 1990, o LGH evoluiu significativamente, dando origem ao atual Departamento de Genética Humana (DGH), que inclui a Unidade de Citogenética (UCI). Este período foi caracterizado por importantes avanços técnico-científicos, nomeadamente a implementação de novos métodos de coloração cromossómica, como o bandamento G, que permitiu uma análise mais detalhada dos cromossomas e facilitou a deteção de alterações estruturais. Em 1989, foi implementada a metodologia de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH), permitindo a visualização ao microscópio de sequências específicas de ácidos nucleicos nos cromossomas. Com esta inovação, a UCI-DGH tornou-se o primeiro laboratório nacional a realizar o diagnóstico rápido de aneuploidias (DRA), com resultados em 24 a 48 horas. Com o aumento da procura deste teste, foi necessário implementar metodologias com maior *output*, mantendo os tempos de resposta. Nesse sentido, em 2006 foi introduzida a metodologia de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), substituída em 2012 pela *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR), que colmatou algumas limitações da metodologia anterior.

Este avanço técnico-científico ocorreu simultaneamente com o aumento significativo da procura destes testes pelos Centros de Diagnóstico Pré-Natal (CDPN), refletindo uma maior sensibilização, tanto dos profissionais de saúde como da população em geral, para a importância do rastreio pré-natal e do diagnóstico genético durante a gestação.

Como resultado da contínua evolução na área da genética, novas metodologias foram sendo implementadas, destacando-se o *microarray* híbrido de polimorfismos de nucleotídeo único (SNParray), introduzido na UCI-DGH em 2013, e o NIPS (*Non-Invasive Prenatal Screening Test*), em 2017. O SNParray possibilita uma análise de alta resolução de variações genéticas de número de cópia (CNV) e alterações de heterozigotia, aumentando significativamente a frequência de deteção. Por se tratar de uma metodologia não invasiva, o NIPS revolucionou o DPN ao permitir o rastreio das aneuploidias mais comuns através da análise do DNA fetal livre circulante no sangue materno, a partir da 10.ª semana de gestação. Este apresenta uma sensibilidade e especificidade próximas de 100%, reduzindo a necessidade

de procedimentos invasivos e melhorando significativamente a taxa de deteção destas aneuploidias.

A introdução destas metodologias no DPN permitiu diagnósticos cada vez mais rápidos e precisos, além da deteção precoce de condições genéticas no feto, contribuindo para um melhor acompanhamento das gestantes e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção mais eficazes.

_Objetivo

Este trabalho apresenta a evolução histórica e a implementação do diagnóstico pré-natal genético em Portugal, com ênfase nos avanços tecnológicos e nos resultados obtidos na Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, entre 1979 e junho de 2025.

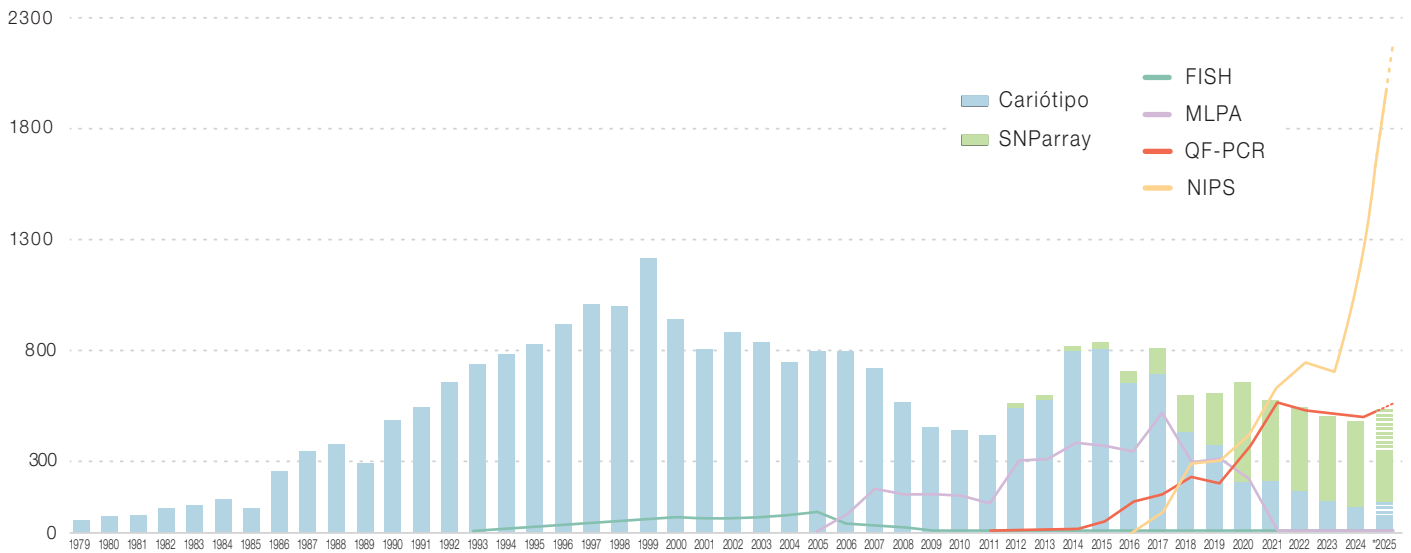
_Resultados

Entre 1979 e junho de 2025, foram rececionadas 27464 amostras de LA e BVC, provenientes de diversos CDPN de referência, para a realização de testes genéticos de diagnóstico, os quais, inicialmente, consistiam exclusivamente em cariótipo fetal. Com o tempo, foram sendo gradualmente implementados testes de citogenética molecular/citogenómica, os quais representam atualmente cerca de 95% das solicitações.

Em 25490 das amostras (92,8%), foi observado um resultado normal, sem alterações numéricas, estruturais ou CNVs. Entre as 1974 amostras com anomalia, 1421 apresentavam anomalias numéricas (72%) e 553 anomalias estruturais (28%). Relativamente ao NIPS, entre 2017 e junho de 2025, foram analisadas 5563 amostras, tendo sido detetado risco aumentado em 78 (1,40%) (**gráficos 1 e 2**).

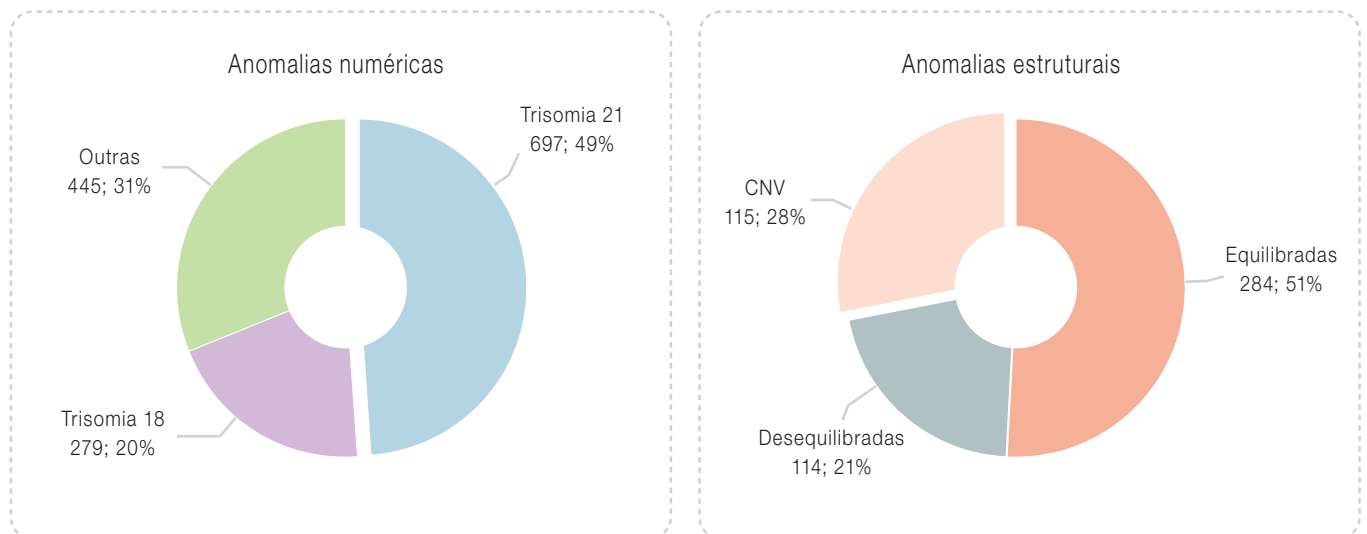
De forma a garantir o cumprimento dos padrões de qualidade exigidos, todos os testes realizados na UCI são submetidos, desde 1994, a programas de Avaliação Externa da Qualidade, tendo a UCI-DGH, demonstrado sempre um desempenho com classificações entre Bom e Excelente.

Gráfico 1: Número de testes de DPN genético e NIPS realizados na UCI ao longo do tempo.



O número de testes referentes a 2025 foi extrapolado a partir dos dados de janeiro a junho, inclusive (linha tracejada). Os testes de Hibrição *in situ* Fluorescente (FISH), *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR) foram realizados no âmbito do Diagnóstico Rápido de Aneuploidias (DRA), ao qual se seguiu teste de cariótipo ou SNParrray. O NIPS, como teste de rastreio, não se encontra contabilizado no número total de amostras para DPN genético.

Gráfico 2: Anomalias cromossómicas detetadas na UCI através das várias abordagens metodológicas implementadas.



CVN - variação do número de cópias

_Discussão

Atualmente, a UCI-DGH realiza um conjunto de testes citogenéticos/citogenómicos, que incluem: cariótipo fetal, testes de diagnóstico das aneuploidias mais comuns, SNParray e NIPS, entre outros.

A análise do nosso universo de amostras revela um aumento substancial dos testes pré-natais invasivos entre 1979 e 2006, refletindo não só os avanços tecnológicos significativos no diagnóstico genético ao longo desse período, como também uma maior acessibilidade das gestantes aos serviços de saúde. Para além disso, a recomendação clínica crescente, impulsionada pela consciencialização dos benefícios do rastreio e diagnóstico precoce e pela evolução das práticas clínicas, contribuiu para o aumento da procura. Este aumento reforça a importância do DPN genético como uma ferramenta essencial para a deteção precoce de AC, contribuindo de forma significativa para a redução da mortalidade e morbidade associadas. As AC representam atualmente a segunda causa de morte perinatal e infantil em Portugal, tendo ainda um impacto profundo na qualidade de vida dos doentes e das suas famílias.

A partir de 2006 observa-se uma tendência para um decréscimo deste tipo de testes, resultante de vários fatores, de entre os quais se destaca, a normalização do rastreio ecográfico em gravidez de baixo risco (7), bem como o reconhecimento de que a idade materna, considerada isoladamente, não constitui um bom indicador de risco de trissomia 21. Podem ainda ter contribuído para esta tendência a implementação generalizada do rastreio combinado (8) e o aumento da disponibilização deste tipo de testes.

Os resultados obtidos na UCI-DGH mostram que as alterações cromossómicas mais frequentes são numéricas (72%), em concordância com a literatura. A trissomia 21 foi a aneuploidia mais comum (35,3%), seguida da trissomia 18 (14,1%). As aneuploidias de outros autossomas e dos cromossomas sexuais representaram 22,5% dos casos. As aneuploidias de outros autossomas estão frequentemente associadas a aborto espontâneo, morte fetal ou sobrevivência limitada

devido a malformações, enquanto as dos cromossomas sexuais originam síndromes com variabilidade fenotípica e desenvolvimento geralmente normal. As alterações estruturais desequilibradas e as CNVs corresponderam a 13,6% dos casos, podendo afetar gravemente o desenvolvimento do feto e estar na origem de síndromes genéticas raras, com impacto e risco de recorrência que variam conforme a natureza e localização da alteração.

O trabalho desenvolvido pela UCI-DGH, tanto ao nível do diagnóstico como do rastreio, tem contribuído para os bons resultados reportados ao longo dos anos relativamente à prevalência das AC na população portuguesa, conforme Relatório Nacional de Anomalias Congénitas, instrumento estratégico na vigilância epidemiológica a nível nacional.

Por outro lado, a recente publicação da Orientação Técnica 01/2024, de 1 de março de 2024 da Direção-Geral da Saúde, determina que o NIPS seja disponibilizado pelo INSA a todos os CDPN do Serviço Nacional de Saúde. O teste é acessível a grávidas com risco intermédio de aneuploidias no rastreio combinado do primeiro trimestre, com o objetivo de aumentar a acuidade do rastreio e reduzir o número de atos invasivos. Os dados disponíveis à data indicam que o NIPS contribuiu de forma significativa para uma redução de cerca de 70% dos procedimentos invasivos realizados (9), o que está em concordância com a evolução do número e tipo de amostras rececionadas na UCI-DGH.

Perspetivas para a próxima década

Na próxima década, o NIPS evoluirá do rastreio de aneuploidias para incluir o rastreio/diagnóstico de alterações cromossómicas estruturais e variantes genéticas de doenças monogénicas, tornando-se uma ferramenta mais abrangente. A integração da sequenciação genómica completa (NGS/WGS) permitirá diagnósticos mais precisos e rápidos, ampliando a deteção de doenças raras e complexas. A redução significativa nos custos dos testes genéticos complexos democratizará o acesso ao diagnóstico, promovendo equidade nos cuidados materno-infantis. Neste âmbito, as parcerias internacionais serão essenciais para ampliar a

capacidade de diagnóstico e o acesso a tecnologias inovadoras. A inteligência artificial e o *big data* melhorarão a análise dos dados genéticos, aumentando a precisão e personalização dos diagnósticos. O desenvolvimento de terapias *in utero* representa uma abordagem promissora para tratar doenças genéticas durante a gestação. Por fim, é de salientar a necessidade crucial de ampliar o quadro de especialistas em genética humana, na UCI-DGH, recrutando profissionais de diversas áreas, integrados numa carreira comum, para enfrentar os novos desafios emergentes na saúde materno-infantil.

Considerações éticas e desafios

Com o avanço da capacidade do diagnóstico genético, surgem desafios éticos importantes, como a identificação de características genéticas não associadas a doenças, o que levanta questões sobre os limites da intervenção genética e a seleção de características fenotípicas. É fundamental garantir que os casais, ao receber o resultado do teste genético relativo ao feto, tenham acesso a aconselhamento genético e apoio psicológico adequados, assegurando a compreensão dos resultados, das opções disponíveis e das implicações para a saúde e o desenvolvimento futuros da criança.

_Conclusão

O progresso do DPN genético na UCI, ao longo de 46 anos, reflete uma trajetória marcada pela inovação e excelência. Desde a realização do primeiro cariótipo fetal, esta Unidade tem tido a capacidade de evoluir e adaptar-se aos avanços científicos e tecnológicos incorporando novas metodologias, contribuindo de forma significativa para a melhoria da saúde materno-fetal em Portugal. Com os avanços previstos para a próxima década, a UCI-DGH encontra-se bem posicionada para continuar a liderar esta área, mantendo um compromisso sólido com a ética, a equidade no acesso aos cuidados de saúde e a inovação científica.

Agradecimentos:

Agradece-se a todos os colaboradores da UCI-DGH pela sua dedicação, sem a qual não teria sido possível a evolução técnico-científica e os êxitos alcançados.

Referências bibliográficas:

- (1) Campbell S. A short history of sonography in obstetrics and gynaecology. *Facts Views Vis Obgyn*. 2013;5(3):213-29. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3987368/>
- (2) Boavida MG, et al. Diagnóstico pré-natal de anomalias cromossómicas: estudo de 488 casos. *Separata de O Médico*. 1985;1762(113):533-37.
- (3) Wojcik MH, Reimers R, Poorvu T, et al. Genetic diagnosis in the fetus. *J Perinatol*. 2020 Jul;40(7):997-1006. Epub 2020 Feb 24. <https://doi.org/10.1038/s41372-020-0627-z>
- (4) Martins MC, Olim G, Melo J, et al. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet*. 1993 Mar;30(3):235-9. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.3.235>
- (5) Hui L, Ellis K, Mayen D, et al. Position statement from the International Society for Prenatal Diagnosis on the use of non-invasive prenatal testing for the detection of fetal chromosomal conditions in singleton pregnancies. *Prenat Diagn*. 2023 Jun;43(7):814-28. Epub 2023 May 16. <https://doi.org/10.1002/pd.6357>
- (6) Xie X, Pei J, Zhang L, et al. Global birth prevalence of major congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2025 Feb 4;25(1):449. <https://doi.org/10.1186/s12889-025-21642-6>
- (7) Portugal. Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa n° 10/DSMIA de 07/05/2001. Modelos de relatórios de ecografia obstétrica. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/-normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-10dsmia-de-07052001-pdf.aspx>
- (8) Portugal. Direção-Geral da Saúde. Norma n° 023/2011 de 29/09/2011 (atualizada a 21/05/2013). Exames Ecográficos na Gravidez de baixo risco. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0232011-de-29092011-atualizada-a-21052013-jpg.aspx>
- (9) Grace MR, Hardisty E, Dotters-Katz SK, et al. Cell-Free DNA Screening: Complexities and Challenges of Clinical Implementation. *Obstet Gynecol Surv*. 2016 Aug;71(8):477-87. <https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000342>

Avaliação externa da qualidade do diagnóstico pré-natal de anomalias cromossómicas da Unidade de Citogenética do INSA – 30 anos de evolução (1994-2024)

External quality assessment in prenatal diagnosis of chromosomal anomalies within the Cytogenetics Unit of INSA – 30 years of evolution (1994-2024)

Marisa Silva, Hildeberto Correia

hildeberto.correia@insa.min-saude.pt

Unidade de Citogenética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A participação em programas de avaliação externa da qualidade (AEQ), com o apoio de uma (ou mais) entidade(s) externa(s), é um dos requisitos que os laboratórios de genética médica devem ter sobre a gestão e controlo da qualidade das práticas laboratoriais. O principal objetivo dessa participação é minimizar as taxas de erro e proporcionar, tanto a doentes como a clínicos requisitantes, a garantia de que o diagnóstico laboratorial é efetuado de forma competente e produz resultados fiáveis e precisos.

A Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana do INSA participa em AEQ internacionais de Citogenética Clínica desde 1994, nomeadamente na área do diagnóstico pré-natal de anomalias cromossómicas. Esta participação regular envolveu desde o desempenho do laboratório, de acordo com padrões internacionalmente definidos, até à comparação do mesmo entre grupos de laboratórios internacionais. As avaliações incluíram uma componente quantitativa (score numérico) e uma qualitativa (classificação global).

O bom desempenho foi consistente, ao longo do período em estudo, com classificações entre Bom, Muito Bom e Excelente. As capacidades analíticas e de interpretação dos profissionais foram essenciais para as boas classificações e resultaram de um conhecimento profundo da etiologia das anomalias cromossómicas e cromossomopatias, bem como dos respetivos fatores de risco. Adicionalmente, o reconhecimento da qualidade científica dos profissionais permitiu-nos contribuir para o desenho e definição das boas práticas internacionais atualmente em vigor nesta área científica.

A principal vantagem da participação regular nestes programas de AEQ inclui uma constante atualização e validação, bem como uma melhoria contínua nas abordagens analíticas, na forma de reportar os resultados dos testes e, consequentemente, na qualidade global dos serviços prestados às utentes.

_Abstract

External quality assessment (EQA), supported by one (or more) independent provider(s), is a requirement for clinical laboratories in terms of quality management and control. The main goal of participating in an EQA is to minimize error rates and assure users and referring physicians that the laboratory is competent to provide results and that these are accurate and reliable.

The Cytogenetics Unit of the Department of Human Genetics of INSA has been participating in international clinical cytogenetics EQAs since 1994, namely in prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. This participation included the laboratory's performance against internationally set standards, as well as international interlaboratory comparisons. The

assessments relied both on quantitative (numerical score) and on qualitative components (global score).

Overall, our laboratory achieved consistently high performances, ranging from Good, Very Good to Excellent classifications. The team's analytical and interpretation skills were essential to achieve those performances, and stem from a deep knowledge of both etiology and risk factors of chromosomal anomalies and diseases.

Additionally, the recognition of the high expertise of several team members allowed us to co-coordinate, contribute, and bring forth the current international best practice and guidelines in clinical cytogenetics/cytogenomics.

The main advantage of our regular participation in these EQAs includes the constant update and validation, as well as continuous improvement in the laboratory's analytical approaches, in the reporting and, therefore in the overall quality of the health services provided.

_Introdução

A procura e disponibilização de testes genéticos na área da saúde tem aumentado nos últimos anos e é expectável que essa tendência se mantenha num futuro próximo. Dado que os testes genéticos são, geralmente, efetuados uma única vez na vida dos indivíduos, e podem também ter consequências na vida de vários familiares, é essencial garantir a qualidade no decurso das várias fases desses testes – fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. Adicionalmente, é crucial que os testes efetuados, bem como os respetivos relatórios, sejam adequados aos casos específicos (1).

A Organização Mundial da Saúde define programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) como um sistema retrospectivo de verificação de resultados laboratoriais através de uma entidade externa. Segundo esta definição, o principal objetivo de um AEQ é estabelecer uma compatibilidade interlaboratorial (2). Tal significa que um AEQ pode abranger uma ou mais fases

de um ciclo de testes, incluindo a interpretação de resultados (3). A entidade externa poderá existir dentro de um sistema nacional ou internacional.

Na ausência de AEQs nacionais na área da citogenética clínica, nomeadamente do diagnóstico pré-natal de anomalias cromossómicas, a Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana do INSA (UCI-DGH) desenvolveu uma estratégia consistente de participação anual em AEQs internacionais. Uma das principais vantagens desta estratégia é o reconhecimento internacional do cumprimento de padrões de qualidade nesta área. Este reconhecimento foi reforçado com o convite para colaboradores da UCI integrarem comissões de avaliação de diferentes AEQs, na qualidade de peritos, e para a co-coordenação da equipa responsável pela elaboração das guidelines internacionais em vigor na área da citogenética constitucional (4).

Inicialmente, a UCI-DGH integrou-se no grupo de participantes do *United Kingdom National Quality Assessment Scheme* (UK-NEQAS; 1994-2014), um programa da responsabilidade do Reino Unido. Esta participação decorreu de 1994 a 2014. Posteriormente, esse programa estendeu-se oficialmente a vários países europeus com o consórcio *Cytogenetics Quality Assessment Scheme* (CEQAS; 2014-2017). A partir de 2018, o consórcio sofreu novo alargamento, sendo que nos EQAs do designado *Genomics Quality Assessment Consortium* (5) participam, atualmente, laboratórios dos vários continentes.

Os resultados aqui incluídos descrevem apenas uma parte da participação da UCI em programas de AEQ, a qual abrange, ainda, as áreas de diagnóstico pós-natal e de citogenética molecular.

_Objetivo

Avaliar o contexto, as vantagens e desvantagens da participação em programas internacionais de avaliação externa da qualidade em diagnóstico pré-natal citogenético, ao longo de 30 anos (1994 a 2024).

_Materiais e métodos

Foram consideradas as participações da UCI-DGH nos diversos AEQs de diagnóstico pré-natal citogenético, de 1994 a 2024.

Em termos de classificações obtidas, o presente estudo cinge-se ao período de 2003 a 2014 dado que, de 1994 a 2002, a participação no AEQ era conjunta, englobando todas as áreas da UCI à data e com avaliação global de dados estatísticos. Acresce, ainda, que o resultado dessa avaliação não era traduzido numa classificação final, pelo que não seria possível a comparação da evolução com os anos subsequentes.

A partir de 2003 até 2014, o AEQ passou a envolver a troca interlaboratorial de 3 casos. O estudo era efetuado em preparações cromossómicas, obtidas após cultura celular e colheita, anonimizadas e acompanhadas das respetivas documentações, igualmente anonimizadas. Posteriormente, cada laboratório emitia um relatório final para cada caso, à semelhança dos que emitiria na sua atividade analítica diária. A avaliação final englobava, assim, a qualidade do trabalho técnico (fase pré-analítica), dos resultados (fase analítica) e da interpretação dos mesmos (fase pós-analítica).

A partir de 2014, os AEQs evoluíram para um controlo da qualidade totalmente *on-line*. O estudo passou a ser realizado em 2 casos-cenário por AEQ, com base em imagens (de casos reais), e respetiva documentação, disponibilizadas *on-line*. A avaliação passou, assim, a incidir sobre fase analítica e pós-analítica do teste.

As imagens estudadas correspondiam a cromossomas em metafase, obtidos a partir de amostras de biópsias de vilosidades do córion (BVC) ou de líquido amniótico (LA). Dadas as particularidades que o estudo de cada tipo de amostra envolve, existiam AEQs individualizados com 2 casos, para cada um deles.

Já sob a égide do GenQA, e desde 2018, os AEQs para BVC e LA passaram a estar englobados num só, consistindo em 3 casos por EQA (dois de LA e um de BVC). As participações, anuais, são totalmente *online*, desde o registo até ao envio (*upload*) do relatório final.

As avaliações incidem sobre a capacidade de identificação da anomalia (se presente), a correção no uso da nomenclatura internacional (6) e a interpretação do resultado no contexto específico do caso em estudo, tendo como base as guidelines internacionais em vigor (4).

Ao longo dos anos, a designação das classificações sofreu alterações, deixando de haver distinção qualitativa correspondente às pontuações médias e elevadas. Inicialmente, o desempenho do laboratório era classificado numa escala de “excelente, muito bom, aceitável, fraco”. Posteriormente, a escala passou a ser apenas “satisfatória, não-satisfatória”.

Resultados e discussão

Desde 1994 até à data, a UCI-DGH participou em 28 AEQs. De notar que não houve interrupções ao longo dos anos, inclusive em 2020, apesar das restrições e constrangimentos provocados pela pandemia da COVID-19.

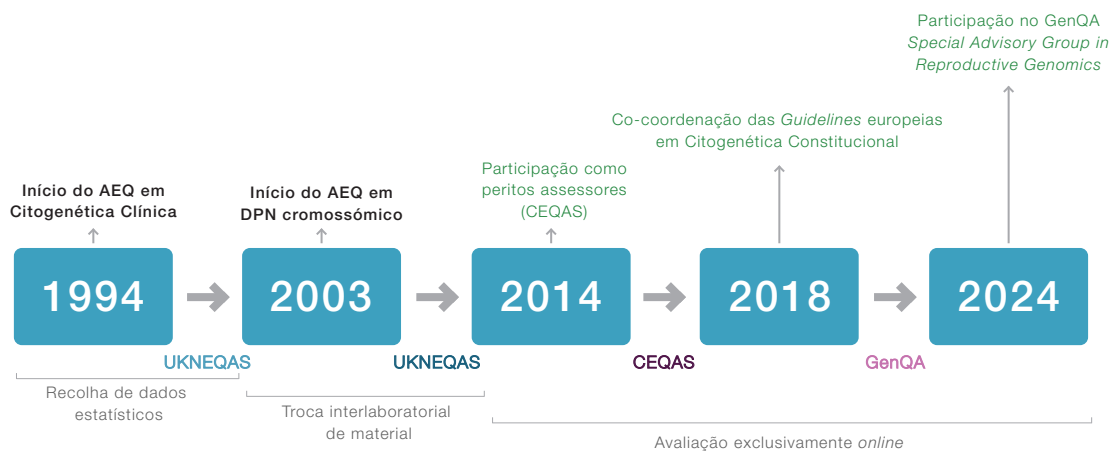
De 2003 a 2014, houve uma troca interlaboratorial de 33 casos de LA (figura 1). Destes, 14 correspondiam a fetos com anomalias cromossómicas numéricas (aneuploidias), 18 a rearranjos estruturais, e um sem alterações. De notar que dois dos casos enviados pela UCI, foram utilizados

no programa de AEQ para efeitos educativos, já que, originalmente, o laboratório de destino não detetou os rearranjos cromossómicos presentes. Por outro lado, no período compreendido entre 2014 e 2024, foram analisados exclusivamente online 25 casos. Destes 6 correspondiam a aneuploidias, 17 a rearranjos estruturais desequilibrados, e 2 a casos sem alterações cromossómicas.

No global do período avaliado, não houve falhas analíticas, isto é, a unidade identificou não só as anomalias cromossómicas, quando as mesmas estavam presentes na amostra estudada, como a ausência de alterações em fetos cromossomicamente normais.

A qualidade do desempenho da UCI-DGH tem sido consistente, ao longo dos anos e nos diversos tipos de cenários avaliados.

Figura 1: Cronologia da participação em Avaliação Externa da Qualidade em Diagnóstico Pré-Natal de Anomalias Cromossómicas na Unidade de Citogenética do INSA (1994-2024).



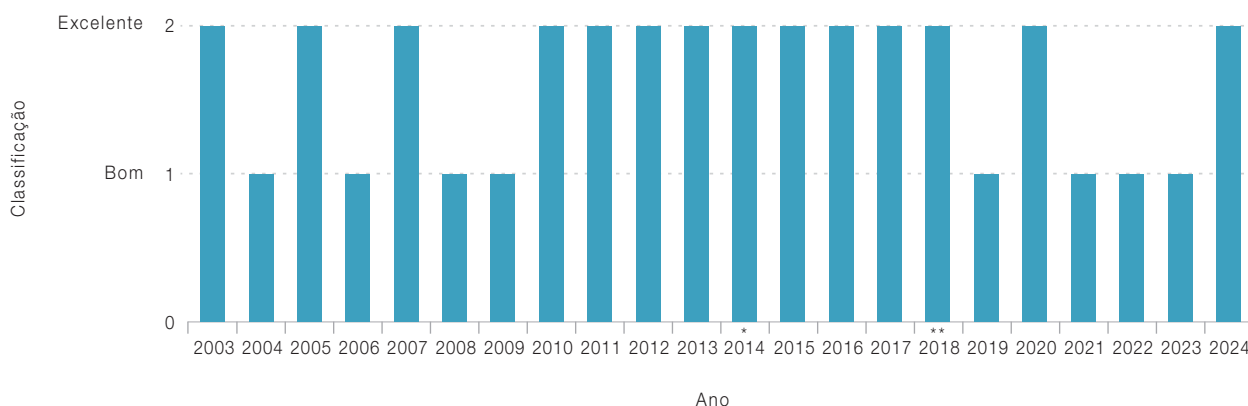
AEQ: Avaliação Externa da Qualidade; DPN: Diagnóstico Pré-Natal; UKNEQAS: *United Kingdom National External Quality Assessment Scheme*; CEQAS: *Cytogenetics External Quality Assessment Scheme*; GenQA: *Genomics Quality Assessment*.

Em todas as participações nos AEQ de DPN citogenético, de 2003 a 2024, a UCI obteve sempre uma classificação de Excelente/ Muito Bom/ Satisfatório, e nota máxima (sem reparos ou penalizações) em 12 delas (**gráfico 1**). Nos anos em que houve penalizações, nenhuma envolveu qualquer falha grave, seja na qualidade das preparações, deteção de anomalias cromossómicas ou interpretação de resultados. De notar que a maioria dos comentários se referiu a pontos relacionados com o aconselhamento genético, específico para o cenário em causa e que, nos casos reais, em Portugal, seriam discutidos no âmbito de consultas da especialidade de Genética Médica.

Este ponto tem sido alvo de evolução ao longo dos anos na nossa Unidade. Inicialmente, os relatórios de casos com anomalia cromossómica apenas reportavam a presença da mesma remetendo a informação sobre o significado da mesma para as consultas de aconselhamento genético. No entanto, a escassez de especialistas implicava que esse aconselhamento fosse tardio. Adicionalmente, a ausência dessa informação nos relatórios emitido constituía motivo de reparos consecutivos nas avaliações do laboratório, já que não correspondia aos padrões internacionais.

Assim, a partir de 2010, todos os relatórios de Citogenética Clínica passaram a incluir uma interpretação e informação das potenciais consequências presentes e futuras da presença de anomalia cromossómica no feto. Esta alteração de estratégia proporciona uma fase inicial de informação, importante para a tomada de decisões clínicas atempadas e especialmente em contextos em que a Consulta de Aconselhamento Genético não está prontamente disponível, por escassez de recursos. A inclusão dessa informação nos relatórios de citogenética constitucional constitui, também, uma das recomendações das guidelines europeias para citogenómica constitucional, em vigor (4,7).

Gráfico 1: Classificações anuais da participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade em Diagnóstico Pré-Natal de Anomalias Cromossómicas na Unidade de Citogenética do INSA, de 2003 a 2024.



AEQ: Avaliação Externa da Qualidade; DPN: Diagnóstico Pré-Natal; UKNEQAS: United Kingdom National External Quality Assessment Scheme; CEQAS: Cytogenetics External Quality Assessment Scheme; GenQA: Genomics Quality Assessment; *alteração para avaliação exclusivamente online; **alteração da escala de classificação (máx.: Satisfatório, que inclui Bom e Muito Bom).

_Conclusão

O objetivo principal de manutenção e de melhoria da qualidade, especialmente na fase pós-analítica, traduz-se numa constante atualização dos relatórios emitidos. A clareza e utilização da informação específica para cada cenário/caso em estudo tem sido uma preocupação constante na emissão de relatórios dos testes realizados.

Adicionalmente, a evolução das metodologias e abordagens utilizadas, tais como o diagnóstico rápido de aneuploidias e o teste genético de *microarray*, leva a que os relatórios emitidos reflitam uma perspetiva integrada dos resultados de vários testes prévios e/ou posteriores, e não apenas dos resultados de parâmetros isolados. Esta evolução traduz-se cada mais por ganhos em saúde, nomeadamente em termos de acompanhamento e apoio à decisão terapêutica materno-fetal.

Referências bibliográficas:

- (1) Hastings RJ, Howell RT. The importance and value of EQA for diagnostic genetic laboratories. *J Community Genet.* 2010 Mar;1(1):11-17. <https://doi.org/10.1007/s12687-010-0009-x>
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22422356/>
- (2) World Health Organization. Regional Office for Europe. External quality assessment of health laboratories: report on a WHO working group, Brussels, 4-7 December 1979. Copenhagen: WHO, 1981. <https://iris.who.int/handle/10665/381787>
- (3) Payne DA, Russomando G, Linder MW, et al ; IFCC Committee for Molecular Diagnostics (C-MD). External quality assessment (EQA) and alternative assessment procedures (AAPs) in molecular diagnostics: findings of an international survey. *Clin Chem Lab Med.* 2020 May 8;59(2):301-6. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0101>
- (4) Silva M, de Leeuw N, Mann K, et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet.* 2019 Jan;27(1):1-16. Epub 2018 Oct 1. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0244-x>
- (5) Genomic Quality Assessment (GenQA) [Internet]. [acedido a 09/04/2025]. Disponível em: <https://genqa.org/>
- (6) ISCN 2024 - An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2024). *Cytogenet Genome Res.* 2024;164(Suppl 1):1-224. Epub 2024 Nov 20. <https://doi.org/10.1159/000538512>
- (7) Deans ZC, Ahn JW, Carreira IM, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing. *Eur J Hum Genet.* 2022 Sep;30(9):1011-16. Epub 2022 Apr 1. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01091-0>

O impacto do diagnóstico pré-natal e da ecografia obstétrica na deteção de anomalias congénitas: uma análise nacional e regional entre 2011 e 2019

The role of prenatal diagnosis and obstetric ultrasound in the diagnosis of congenital anomalies: a national and regional analysis with data from 2011 and 2019

Paula Braz, Ausenda Machado, Carlos Aniceto, Carlos Matias Dias

paula.braz@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

O diagnóstico pré-natal, ao integrar um conjunto de procedimentos que permitem determinar se um embrião ou feto é portador de uma anomalia congénita (AC), é um recurso essencial na deteção das gestações de alto risco de patologia fetal.

Uma vigilância adequada da gravidez, em Portugal, deve incluir a realização de ecografias obstétricas e de testes de rastreio, para além de exames invasivos, testes genéticos ou outros, em gestações que tenham risco aumentado de patologia fetal.

Em Portugal, entre 2011 a 2019, foram reportados ao RENAC, 11931 casos com pelo menos uma AC *major*, 58,6% das quais foram detetadas na fase pré-natal. Esta deteção durante a gravidez evoluiu de 51,4% em 2011 para 62,9% em 2019, a nível nacional.

A nível regional, de acordo com o local de residência da grávida agregada por NUTS II, a identificação de casos com AC na fase pré-natal variou entre os 71,1% da Região Norte e os 34,6% da Região Autónoma da Madeira (RAM), para o total dos anos em estudo.

Em todo o país, a ecografia obstétrica foi o principal exame pré-natal a detetar uma AC, tendo-se observado frequências superiores a 85% em todas as regiões.

_Abstract

Prenatal diagnosis, by integrating a set of procedures designed to identify congenital anomalies (CAs) in embryos or fetuses, plays a critical role in identifying pregnancies at high risk of foetal pathology. Adequate pregnancy surveillance should include in Portugal obstetric ultrasound and screening tests, in addition to invasive examinations, genetic or other tests, in pregnancies that have an increased risk of foetal pathology.

In Portugal, between 2011 and 2019, 11,931 cases with at least one CA were reported to RENAC, 58.6% of which were detected in the prenatal phase. This detection during pregnancy increased from 51.4% in 2011 to 62.9% in 2019, at a national level.

At regional level, according to the place of residence of the pregnant woman aggregated by NUTS II, the identification of cases with CA in the prenatal phase varied between 71.1% in the North Region and 34.6% in the Autonomous Region of Madeira (RAM).

Across the country, obstetric ultrasound was the main prenatal examination to detect CA, with frequencies above 85% observed in all regions.

_Introdução

Em Portugal nas últimas décadas, verificaram-se mudanças significativas na área da saúde materna e infantil, observando-se uma diminuição da mortalidade infantil por doenças evitáveis. As doenças genéticas e as anomalias congénitas (AC) surgiram então como importantes fatores de incapacidade a longo prazo, podendo ter um impacto significativo sobre os indivíduos, as famílias, os sistemas de cuidados de saúde e a sociedade.

Na área da vigilância da gravidez, o diagnóstico pré-natal, ao integrar um conjunto de procedimentos que permitem determinar se um embrião ou feto é portador de uma AC, é um essencial recurso na deteção das gestações com elevada probabilidade de patologia fetal.

Uma vigilância adequada da gravidez deve incluir a realização de ecografias obstétricas e de testes de rastreio. Podem também ser oferecidos exames invasivos, testes genéticos ou outros, a fim de aumentar e melhorar a taxa de deteção de AC, em gestações que tenham risco aumentado de patologia fetal.

Os exames ecográficos preconizados para a vigilância da gravidez permitem diagnosticar malformações *major* e concorrer para avaliar o risco de aneuploidias - ecografia do 1º trimestre; malformações potencialmente fatais, com tempo de vida limitado ou associadas a elevada morbilidade - ecografia do 2º trimestre; AC de aparecimento tardio - ecografia do 3º trimestre (1).

_Objetivo

Este estudo teve como finalidade descrever a proporção de casos com anomalias congénitas diagnosticados na fase pré-natal em Portugal, a nível nacional e regional (NUTS II), para o período de 2011-2019.

_Material e métodos

Estudo descritivo, transversal que utilizou dados notificados no Registo Nacional de Anomalias Congénitas (RENAC) entre 2011 e 2019.

A população em estudo foram os nascimentos com AC (nados-vivos, fetos mortos e interrupções médicas da gravidez), reportados no período em estudo. Foram calculadas frequências relativas a nível nacional e regional, distribuídas por área de residência da mãe durante a gravidez, segundo NUTS II.

_Resultados e discussão

Entre 2011 e 2019, foram notificados no RENAC 11931 casos com AC, tendo a gravidez terminado no nascimento de uma criança viva em 70,0% dos casos. Nos restantes houve a opção por interromper a gravidez devido a malformação fetal grave (27,5%) ou aconteceu a morte fetal (2,5%).

Quando se analisa o trabalho desenvolvido na área do diagnóstico pré-natal (DPN), a nível nacional, ao longo dos anos (**gráfico 1**), observa-se uma evolução da frequência de casos com AC detetadas na fase pré-natal, variando entre 51,4% em 2011 e 62,9% em 2019.

No entanto, para o total dos anos em estudo, em 58,6% (n=6986) dos casos notificados a nível nacional, a identificação de pelo menos uma AC aconteceu durante a gravidez. A ecografia obstétrica foi o principal exame pré-natal a detetar uma AC (88,4%), seguida do rastreio bioquímico (5,7%) e dos exames invasivos (4,0%) (**tabela 1**).

A nível regional, a identificação de casos com AC na fase pré-natal variou entre os 71,1% na Região Norte e os 34,6% na Região Autónoma da Madeira (RAM) (**tabela 1**). A ecografia obstétrica foi o principal exame pré-natal a detetar uma AC em todas as regiões, tendo oscilado entre os 95,5% na RAM e os 86,3% na Região Autónoma dos Açores (RAA). O rastreio bioquímico foi o segundo exame a detetar uma AC nas Regiões Norte, Centro, Área Metropolitana de Lisboa e RAA, enquanto os testes invasivos foram o segundo exame nas Regiões Alentejo, Algarve e RAM (**tabela 1**).

A idade gestacional em que se observou uma maior frequência de diagnóstico ecográfico é diferente nas várias regiões geográficas. Na Região Norte a maior percentagem de casos com AC foi detetada antes das 14 semanas de gestação (31,4%), enquanto nas regiões Centro, AML e Alentejo foi na ecografia entre as 14 e as 22 semanas que essa deteção se verificou com maior frequência. Já nas RA dos Açores e da Madeira, a maior frequência de deteção observou-se na ecografia realizada após as 22 semanas de gestação.

Gráfico 1: Distribuição percentual do momento do diagnóstico de Anomalias Congénitas nos casos relativos aos anos 2011 a 2019, e notificados ao Registo Nacional de Anomalias Congénitas.

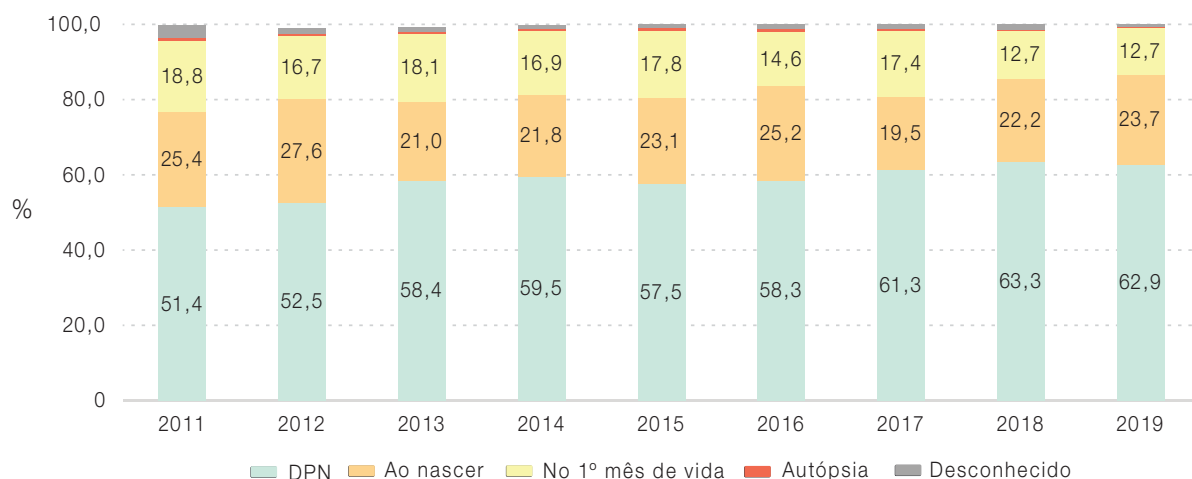


Tabela 1: Número de notificações e distribuição percentual de casos com Anomalias Congénitas em Portugal e nas sete regiões geográficas (NUTS II), entre 2011 e 2019, de acordo com o momento de identificação da 1ª anomalia, o 1º exame pré-natal alterado, notificados ao Registo Nacional de Anomalias Congénitas.

2011-2019	Portugal	Região Norte	Região Centro	Área Metropolitana Lisboa	Região Alentejo	Região Algarve	Região Autónoma da Madeira	Região Autónoma dos Açores
Momento de identificação da 1ª anomalia congénita	%	%	%	%	%	%	%	%
Diagnóstico pré-natal	58,6	71,1	48,6	61,8	41,6	47,6	34,6	47,6
Ao nascer	23,2	16,0	22,5	24,4	35,1	38,0	46,9	33,1
Até 1 semana de vida	12,5	8,4	20,0	9,0	16,6	11,0	13,9	16,0
Entre 1 e 4 semanas de vida	3,7	2,2	7,2	2,5	4,4	2,0	3,9	2,3
Entre 1 mês e 12 meses	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pós-natal, idade desconhecida	0,6	0,2	0,1	0,4	0,1	0,3	0,8	0,0
Na autópsia	0,5	0,8	0,3	0,4	0,5	0,4	0,0	0,5
Desconhecido	0,9	1,3	1,3	1,4	1,7	0,7	0,0	0,5
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Primeiro exame pré-natal alterado	%	%	%	%	%	%	%	%
Ecografia, IG* < 14 semanas	26,9	31,4	25,7	23,3	22,1	29,3	4,4	17,9
Ecografia, IG* 14 - 22 semanas	31,6	29,7	34,5	33,3	33,3	29,1	35,6	29,5
Ecografia, IG* > 22 semanas	26,2	23,7	28,1	28,1	26,8	26,2	46,7	35,3
Ecografia, IG* desconhecida	3,7	5,2	1,9	2,0	5,3	2,3	8,9	3,7
Rastreio bioquímico	5,7	6,3	5,1	6,7	5,6	5,4	0,0	4,7
Amniocentese/Biópsia de vilosidades	4,0	2,2	3,7	5,2	6,9	7,7	4,4	3,2
Teste pré-natal não invasivo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	2,1
Outros testes positivos	1,4	1,3	0,8	1,3	0,0	0,0	0,0	3,7
Desconhecido	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* IG - Idade de gestação

_Discussão

Alguns estudos têm demonstrado que a vigilância ecográfica, associada ou não a outros testes, quando integrados em programas de DPN, são essenciais na deteção precoce de AC (2,3). O conjunto de exames utilizados em DPN possibilita a estratificação de risco e o aconselhamento genético, promovendo a autonomia dos pais na tomada de decisões informadas sobre a continuidade da gestação e o planeamento do cuidado neonatal.

Do ponto de vista epidemiológico, a deteção pré-natal de AC permite a implementação de estratégias de intervenção multidisciplinares, com potencial para reduzir a morbi-mortalidade perinatal e minimizar as sequelas a longo prazo.

_Conclusões

A implementação de protocolos de diagnóstico pré-natal (DPN) configura-se como uma intervenção de saúde pública de elevada relevância, visando a otimização dos desfechos perinatais.

A implementação de redes de referência para o acompanhamento de gestações de alto risco e a padronização de protocolos de intervenção neonatal são cruciais para a maximização dos benefícios do DPN, com impacto positivo na saúde individual e coletiva.

Referências bibliográficas:

- (1) Direção-Geral da Saúde. Consulta Pré-concepcional. Programa Nacional para a Vigilância da Gravidez de Baixo Risco. Lisboa: DGS, 2015. www.dgs.pt/em-destaque/programa-nacional-para-a-vigilancia-da-gravidez-de-baixo-risco-pdf11.aspx
- (2) Paladini D, Volpe P. Ultrasound of Congenital Fetal Anomalies: Differential Diagnosis and Prognostic Indicators. 2nd ed. London: CRC Press, 2018. <https://doi.org/10.4324/9780429462450>
- (3) Poenaru M-O, Bogheanu D-M, Sima R-M, et al. Ultrasound-based differential diagnosis of fetal abdominal wall defects in early pregnancy. 2024 Mar 28;43(1):30-35. <https://revistaginecologia.ro/index.php/arhiv/489>

História do Programa Nacional de Rastreio Neonatal

History of the National Neonatal Screening Program in Portugal

Laura Vilarinho; Comissão Executiva do Programa Nacional do Rastreio Neonatal em Portugal

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

O Programa Nacional de Rastreio Neonatal teve o seu início em 1979 no Instituto de Genética Médica com o rastreio da Fenilcetonúria e atualmente rastreia universalmente 28+1 (estudo-piloto) doenças raras.

Este Programa, que possui uma taxa de cobertura superior a 99,5%, é coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, através da sua Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, do Departamento de Genética Humana.

As campanhas de divulgação do PNRN (vulgarmente conhecido como "teste do pezinho"), aliadas a uma logística bem implementada e a um acesso universal e desburocratizado ao teste, explicam a enorme confiança dos pais e profissionais de saúde neste rastreio.

_Abstract

The National Neonatal Screening Program began in 1979 at the Institute of Medical Genetics with screening for Phenylketonuria and currently universally screens for 29 rare diseases.

This program has a coverage rate of over 99.5% and is coordinated by the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, through its Neonatal Screening, Metabolism, and Genetics Unit, within the Department of Human Genetics.

The PNRN (commonly known as the "heel prick test") publicity campaigns, combined with well-implemented logistics and universal, streamlined access to the test, explain the great confidence parents and healthcare professionals have in this screening.

_Introdução

O rastreio neonatal teve início na década de 1960, quando o médico bacteriologista americano Robert Guthrie (Buffalo, New York) demonstrou que uma gota de sangue colhida no pezinho do bebé para um cartão de papel de filtro (*Guthrie cards*) podia ser utilizada para quantificação da fenilalanina que permitiria o rastreio da Fenilcetonúria (PKU) através do *Guthrie test* (1).

Desde os anos 50 que o tratamento para a PKU era conhecido, após o pediatra alemão, Horst Bickel, ter demonstrado que, se os doentes PKU efetuassem restrição do aminoácido fenilalanina na dieta desde os primeiros dias de vida, teriam um desenvolvimento normal. Provou ainda que, a deficiência cognitiva nestes doentes estava relacionada com valores elevados de fenilalanina e que quanto mais cedo a doença fosse diagnosticada e iniciado o tratamento, melhor o prognóstico pelo que era fundamental efetuar o seu rastreio neonatal.

Deste modo, em 1963 *Guthrie* e colegas, após várias tentativas para convencer a comunidade científica da viabilidade de rastreio em massa para a PKU, foi o estado de Massachusetts (EUA) o primeiro a estabelecer uma lei obrigando a realização do teste de rastreio em todos os RN desse Estado. Assim, em 1964, já 400.000 RN tinham sido testados em 29 Estados americanos e detetados 39 casos positivos de PKU (1/10.000 RN) (2).

Posteriormente, em 1972, o médico e investigador Jean Dussault (Quebec, Canadá) impulsionou o rastreio neonatal do hipotireoidismo congénito (HC) determinando a tiroxina total (T4) na mesma amostra (3).

_Objetivos

Este texto pretende partilhar a história do rastreio neonatal em Portugal e discutir os seus determinantes e desafios ao longo do tempo.

_PNRN: da implementação até à atualidade

Em Portugal, a estratégia para a implementação do rastreio neonatal foi iniciada em 1978 pelo Doutor Jacinto Magalhães, com a colaboração do Dr. Rui Vaz Osório que efetuou um estágio no Hôpital Necker-Enfants Malades, em Paris, com objetivo principal de identificar as melhores práticas e estratégias utilizadas na organização do rastreio neonatal, já iniciado em França no final da década de 60, de forma a implementar um programa similar em Portugal.

Deste modo, o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (PNDP) teve início em 1979, por iniciativa do Instituto de Genética Médica, no Porto, tendo por objetivo diagnosticar, nas primeiras semanas de vida, doenças, quase sempre genéticas, que uma vez identificadas, permitam o tratamento precoce que evite a ocorrência de atraso mental, doença grave irreversível ou a morte da criança.

No âmbito deste programa são realizados testes de rastreio de algumas doenças raras em todos os recém-nascidos, o chamado “teste do pezinho”.

A infraestrutura laboratorial foi implementada e a primeira colheita para o rastreio é efetuada pelo Dr. Rui Vaz Osório a 14 de maio de 1979 na Maternidade Júlio Dinis, deslocan-

do-se este, diariamente às instalações da Maternidade para efetuar a picada no pezinho aos bebés, bem como esclarecer as mães dos objetivos do teste. Dada a boa aceitação, foi decidido alargar o rastreio a outras regiões, começando pelo norte do país. Rapidamente foi percebido que a colheita não deveria ser efetuada nos Hospitais, mas nos centros de saúde, uma vez que não deveria ser efetuada antes do 4º ou 5º dia de vida (4).

Inicia-se a fase de formação e capacitação dos Centros de Saúde do país, de forma a esclarecer o procedimento e a finalidade do teste aos profissionais de saúde. Por cada Centro de Saúde visitado, mais uma área passava a ser coberta pelo rastreio, sendo desta forma progressivamente alargado a todo o país. Nesse ano de 1979, foi elaborado o primeiro folheto informativo para os pais (figura 1), que era entregue nas consultas de vigilância da gravidez e antes da recolha da amostra de sangue para o rastreio neonatal. “No pezinho do bebé pode estar o seu futuro” era o slogan da campanha de sensibilização lançada pela Comissão Nacional de Diagnóstico Precoce que foi transmitida diariamente pela Rádio e Televisão de Portugal (RTP) durante um ano.

Figura 1: 📄 Primeiro folheto informativo do PNDP para os pais (1979).

“Uma gota de sangue, obtida através de uma simples picada, pode mudar o rumo de uma vida”

*“No pezinho do bebé está o seu futuro”
Jacinto de Magalhães*



Pelo despacho ministerial de 13 de abril de 1981 foi criado, no Instituto de Genética Médica, a Comissão Nacional para o Diagnóstico Precoce.

Ainda no decurso de 1981, e após implementação de um laboratório com a respetiva regulamentação para trabalhar com material radioativo, é iniciado o rastreio do Hipotiroidismo Congénito. Os casos positivos eram enviados para os Centros de Tratamento Especializados mais próximos da sua residência para a instituição precoce do tratamento com hormona tiroideia, prevenindo assim as sequelas irreversíveis associadas ao Hipotiroidismo Congénito.

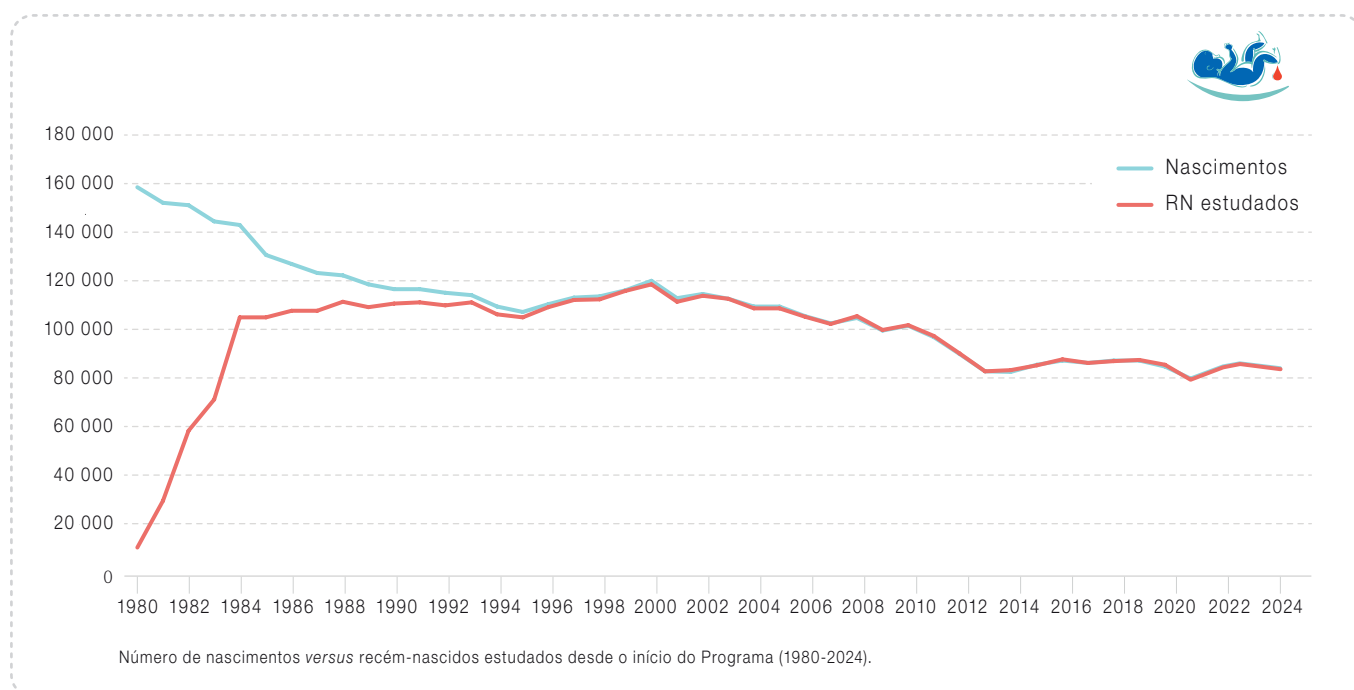
Nesse ano, foi criado em Lisboa o segundo Centro Regional de Rastreios, no sentido de alargar a área de influência do rastreio a todo o sul do País. Porém, em fins de 1983 esse Centro foi encerrado, passando todas as colheitas do “teste do pezinho” a ser enviadas para o Centro de Rastreios do Instituto de Genética Médica, no Porto, e começando assim a organização a estruturar-se em moldes semelhantes aos atuais, com um laboratório único a nível nacional (5,6). A taxa de cobertura a nível nacional era então de cerca de 70%, atingindo os 85% em 1986 (figura 2).

Após a implementação dos rastreios da PKU e do Hipotiroidismo Congénito, procedeu-se ao rastreio experimental da Hiperplasia Congénita das Supra-renais em 100.000 recém-nascidos entre 1986 e 1987, no sentido de determinar o interesse da institucionalização deste rastreio a nível nacional. O tempo médio de início de tratamento era então de 20-25 dias, o que levou a concluir que o rastreio não deveria continuar, enquanto não fosse possível baixar esse tempo para 10-12 dias (7,8).

Em 1988 conseguiu-se a participação do Ministério da Saúde para o preço dos produtos dietéticos hipoproteicos utilizados no tratamento dos doentes com aminoacidopatias e acidúrias orgânicas, o que permitiu avançar com o projeto “Escola de Cozinha” e com a publicação do primeiro livro de receitas de forma a facilitar a dieta hipoproteica para as crianças fenilcetonúricas.

Em 1990/1992 procedeu-se ao rastreio-piloto da deficiência em biotinidase. Esse estudo processou-se em 100.000 recém-nascidos. Dada a baixa incidência desta patologia (1/50.000), optou-se pela não continuidade do rastreio sistemático, procedendo-se, porém, com o rastreio seletivo baseado nos sinais clínicos da doença.

Figura 2: Taxa de cobertura do PNRN de 1980-2024.



Em 1992 atingiu-se o 1º milhão de crianças rastreadas, e deram-se os primeiros passos para a criação da Associação Portuguesa de Fenilcetonúria (APOFEN), e do relacionamento dos pais e doentes PKU portugueses com os de outros países europeus (*European Society for PKU - ESPKU*).

Entre 1992 e 1995 procedeu-se ao rastreio experimental da Fibrose Quística, nos Distritos do Porto e de Coimbra, em colaboração com os Hospital de Crianças Maria Pia e Hospital Pediátrico de Coimbra. Esse rastreio não teve continuidade pelos seguintes motivos: falta de tratamento eficaz, falta de especificidade do marcador de tripsina imunoreativa (IRT) com cerca de 1% de falsos positivos e baixa frequência da mutação Phe508del na população portuguesa (incidência menor do que a inicialmente esperada).

A firme implantação do PNDP a nível nacional bem como a existência de uma organização segura e já estabilizada, permitiu então voltar a atenção para a melhoria dos aspetos técnicos e assistenciais do programa. Assim, nos anos seguintes, foram revistos alguns indicadores do programa, nomeadamente, os valores de chamada inicialmente estabelecidos (cut-offs), encurtando o tempo médio de início de tratamento. Foi melhorada a taxa de cobertura, estendida a ação da APOFEN a outras doenças metabólicas que também necessitam de dieta pobre em determinados aminoácidos, alargada a gama de alimentos disponíveis, treinados dietistas para a Madeira e Açores e reorganizado o rastreio nas Regiões Autónomas (9).

Efetuar-se ainda estudos sobre a PKU que levaram à identificação das mutações causais nos doentes portugueses, procedeu-se ao estudo comparativo por Ressonância Magnética Nuclear cerebral de jovens com PKU com e sem dieta alimentar rigorosa. Iniciou-se o estudo de cintilografia tiroideia sistemática dos recém-nascidos com Hipotiroidismo Congénito e estabeleceu-se o diagnóstico etiológico de todas as formas de Hipotiroidismo Congénito no grupo etário acima dos 3 anos de idade.

No decurso de 2002 recebemos a boa notícia de que o projeto para alargamento do rastreio das Doenças Hereditárias do Metabolismo submetido ao “Programa Operacional Saúde XXI” tinha sido financiado.

Após aquisição de dois espectrómetros de massa em tandem (*tandem-mass - MS/MS*) adquiridos neste âmbito e em colaboração com a Universidade de Aveiro, preparou-se um novo *software* especificamente destinado ao rastreio neonatal. No ano seguinte implementou-se todas as condições estruturais e com recursos humanos especializados para o funcionamento deste tipo de tecnologia inovadora sensível e específica para o rastreio de Doenças Raras.

Em finais de 2004 dá-se início à expansão do rastreio metabólico (nessa altura no PNDP eram só rastreadas duas doenças). Foi iniciado um estudo-piloto na região Norte que, progressivamente foi alargado às regiões do Centro e do Sul, ficando o país todo coberto a partir de junho de 2006, permitindo o rastreio de 18 Doenças Hereditárias do Metabolismo (10,11).

Em 2004 é criado o *website* (www.diagnósticoprecoce.org) onde os pais podem consultar o resultado do teste através da *Internet*. Após obtido o consentimento da Comissão Nacional de Proteção de Dados iniciou-se a distribuição de novos cartões (*Guthrie cards*), com um código de barras apenas ao cartão e outro destacável, que era entregue aos pais no ato da colheita para estes terem acesso ao resultado do seu bebé (figura 3). Na altura tratou-se de uma experiência pioneira na Europa. Os resultados negativos passaram a ser assim disponibilizados, enquanto os resultados positivos continuarão a ser comunicados através dos Centros de Referência para o Tratamento.

Os cartões de recolha das amostras têm sofrido evolução ao longo dos anos, acompanhando a inovação técnica e legal exigíveis. Contam, no verso, com as instruções para recolha e envio das amostras.

Figura 3: Cartão para recolha da amostra com os respetivos códigos de barras.

PROGRAMA NACIONAL DO RASTREIO NEONATAL

Se esta colheita for uma repetição, assinala com uma cruz

Nome da Mãe _____

Endereço _____

C. Postal _____

Localidade _____

Nascimento _____ Idade Gestacional _____ N° Utente da Mãe _____
(Obrigatório)

Colheita _____ Peso _____ Sexo _____ Gémeos 1º 2º 3º

Alimentação - Peito Outra Ictericia S N M F

Medicação - Qual? _____

Local de Colheita _____ Distrito _____

COLABORE CONNOSCO
no pezinho do bebé
pode estar o seu futuro

ENVIAR PARA: INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DOUTOR RICARDO JORGE
Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética
Rua Alexandre Herculano, 321
4000-055 Porto Telef. 223 401 168 / 76 / 70

9003™
7286123W211
2028-02-28
520230000001
520230000001

Para se País **ENVERME ESTETALIO**
Confirme a recepção da ficha e o
resultado do teste ao seu filho em
semanas após a colheita, com este número de código
de barras e o seu número de telefone de contacto.

Em 2007 e por decisão do Conselho de Ministros, o Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães foi integrado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), o que originou também a integração do PNDP.

O processo de integração originou uma reforma profunda na organização do PNDP. Foi criada a Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética (URN), incluindo o Laboratório Nacional de Rastreio e o respetivo Secretariado. A Comissão Nacional foi substituída pela Comissão Executiva, e foi criada a Comissão Técnica Nacional, de carácter consultivo, que integra, além da Comissão Executiva, personalidades de reconhecido mérito científico e profissional e, eventualmente, representantes de Associações ou Sociedades Científicas.

Por despacho de 6 de janeiro de 2010 (Despacho n.º 752/2010) do Secretário de Estado Adjunto e da Saúde, foi aprovado o PNDP, sob a responsabilidade do INSA, para dar enquadramento institucional ao rastreio neonatal. Este Despacho estabelece o primeiro regulamento do Programa e os Órgãos de Coordenação do PNDP, compostos por um Presidente (por inerência, Presidente do Conselho Diretivo do INSA I.P.), uma Comissão Executiva e uma Comissão Técnica Nacional. Posteriormente, o Despacho n.º 4502/2012, atualizado pelo Despacho n.º 7352/2015, nomeiam os Órgãos de Coordenação.

O leque das Doenças Hereditárias do Metabolismo a rastrear foi alargado a 24 patologias, seguindo o princípio base de que a doença a rastrear deve sempre ser passível de tratamento específico.

Em finais de 2013 teve início um estudo-piloto para o rastreio da Fibrose Quística, a qual foi integrada no painel das doenças rastreadas em 2018, após um estudo nacional que incluiu 255.000 RN (12).

Foram criados Centros de Referência Nacionais de Tratamento para as Doenças Hereditárias do Metabolismo pelo Despacho n.º 3653/2016 e para a Fibrose Quística pelo Despacho n.º 6669/2017 com a finalidade de acompanhar clinicamente os casos identificados.

Em 2015, e no âmbito da política da qualidade do INSA, foi concedida a acreditação pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) de acordo com a norma internacional NP EN ISO 15189 a dois dos testes, executados pelo Departamento de Genética Humana (DGH), que fazem parte do PNDP: o Hipotireoidismo Congénito - T4 e TSH. O processo de acreditação laboratorial para o rastreio neonatal da Fibrose Quística (FQ) foi obtido em 2018. A acreditação assim obtida é o culminar de intensa atividade técnica e de gestão que decorreu ao longo de vários anos.

Em 2019 é publicado no *Diário da República* o Despacho n.º 7276/2019 que revê o PNDP, renomeia-o de Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) e atualiza a composição da Comissão Técnica Nacional, para melhor refletir o âmbito do programa e a terminologia em uso no plano internacional.

No dia 5 de abril de 2019, o Ministério da Saúde, em sessão comemorativa do Dia Mundial da Saúde, homenageou o “Programa Nacional de Diagnóstico Precoce – Teste do Pezinho” com a Medalha de Serviços Distintos do Ministério da Saúde – Grau Ouro.

Desde 2019, no *website* é apresentado a página onde os pais podem consultar a receção e o resultado do “Teste do Pezinho”, assim como descarregar o relatório do rastreio neonatal do recém-nascido.

Em maio de 2021, o PNRN deu início ao estudo-piloto do rastreio neonatal da Drepanocitose (Anemia de Células Falciformes). Numa primeira fase rastream-se os recém-nascidos dos distritos de Lisboa e Setúbal, onde se previa que a prevalência ao nascimento da doença fosse mais acentuada, tendo em conta as características sociodemográficas desses distritos, nomeadamente pela elevada percentagem de famílias oriundas de zonas de risco. Em fevereiro de 2022 estavam reunidas todas as condições para que o estudo-piloto do rastreio neonatal da Drepanocitose fosse alargado a todos os recém-nascidos em Portugal. Em 2023 esta doença foi integrada no painel das doenças universalmente rastreadas.

Em abril de 2021, a URN e o grupo de investigação associado, iniciaram um estudo prospetivo no âmbito do PNRN, com enfoque no Hipotiroidismo Congénito. O objetivo deste estudo foi identificar as variantes genéticas ligadas ao Hipotiroidismo Congénito Familiar (disormonogénese) em doentes identificados e referenciados pelos Centros de Tratamento, com o intuito de caracterizar molecularmente essa população a nível nacional. Deverá ter-se em consideração que só cerca de 10 a 15% dos casos de Hipotiroidismo Congénito tem causa genética.

Em outubro de 2022, procedeu-se ao início do estudo-piloto da Atrofia Muscular Espinal, o qual ainda se manteve em fase de estudo piloto até ao final de 2024. O teste utilizado de genética molecular consistia em pesquisar a deleção do exão 7 em homozigotia, do gene SMN1 localizado no cromossoma 5q13 dado que cerca de 95% dos casos são causadas por esta deleção. Após a deteção de um caso positivo, o recém-nascido seria referenciado a um Centro de Tratamento Especializado, para confirmação do diagnóstico clínico e determinação do número de cópias do gene SMN2 (protocolo com a Prof. Dra. Rosário Santos – Centro Hospitalar e Universitário do Porto).

A possibilidade da deteção da Atrofia Muscular Espinal na amostra do “teste do pezinho” e o aparecimento de novos e inovadores tratamentos, que mudam drasticamente o curso clínico da doença se iniciados precocemente, fazem com que esta patologia seja, atualmente, o principal alvo dos programas de rastreio neonatal a nível mundial, no que diz respeito a novas patologias a rastrear.

Em 2022 foi também iniciado um estudo piloto de uma plataforma de redundância, a “Neocheck”. de forma a assegurar que todas as colheitas do “teste do pezinho” são rececionadas na URN do INSA. Esta plataforma informática permite que cada teste seja registado no local da recolha e que a receção da amostra seja confirmada no laboratório. Assim se pretende detetar possíveis extravios de amostras. Os locais incluídos neste estudo-piloto foram o Centro de Saúde São João no Porto, o Centro Hospitalar Universitário de Santo António, o Centro Hospitalar Universitário de São João e o Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho. Aguarda-se que seja permitida, pelos Serviços Partilhados do Ministério da Saúde - SPMS, a disponibilização desta plataforma a todos os locais de colheita do nosso país.

Em 2024, a Assembleia da República através da Resolução n.º 92/2024, publicada em *Diário da República*, 1.ª série, n.º 211, de 30 de outubro de 2024, recomenda ao Governo que, em articulação com o INSA, estude a viabilidade da realização de rastreio da Imunodeficiência Combinada Grave (SCID-Severe Combined Immunodeficiency) a todos os bebés recém-nascidos em Portugal que efetuem o rastreio neonatal, ponderando a criação de um projeto-piloto.

Em 1 de abril de 2025 deu-se início ao estudo piloto da SCID em 100 000RN que é realizado no sangue seco do teste do pezinho, através da quantificação de *T-cell Receptor Excision Circles* (TREC). O transplante de células hematopoiéticas continua a ser a principal abordagem terapêutica. Este estudo foi iniciado após ter sido assegurado o tratamento de todos os doentes identificados no rastreio neonatal com a colaboração do Instituto Português de Oncologia (IPO) do Porto e dos Centros Especializados para o Tratamento.

Os casos positivos ou suspeitos são encaminhados, sempre que possível, para os Centros de Referência da sua área de residência, onde o diagnóstico é confirmado e o tratamento instituído por equipas multidisciplinares de profissionais de saúde. Os Centros de Referência Nacionais são reconhecidos pelo seu elevado padrão de competência na prestação de cuidados de saúde em situações clínicas complexas, que exigem recursos técnicos e tecnológicos altamente especializados, além de profundo conhecimento e experiência, devido à baixa prevalência dessas doenças. Os Centros para as Doenças Hereditárias do Metabolismo e para a Fibrose Quística foram estabelecidos pelos Despachos n.º 3653/2016 e n.º 6669/2017, respetivamente. Também foram definidos Centros Especializados para tratamento do Hipotiroidismo Congénito, da Drepanocitose, da Atrofia Muscular Espinal e da SCID, atendendo à excelência e mérito nacional das suas consultas bem estruturadas.

Apesar do sucesso e da relação custo-efetividade dos programas de rastreio neonatal, muitos países ainda não conseguiram alcançar uma cobertura nacional universal: de acordo com o consenso publicado em 2021 e 2023, 70% dos bebés em todo o mundo ainda não têm acesso ao rastreio metabólico, e a maioria deles vive em áreas com deficiência de iodo, o que aumenta o risco de deficiência do neurodesenvolvimento no período mais vulnerável da vida.

Na Europa, embora com boa cobertura, a implementação e a abrangência desses programas variam significativamente entre os países, refletindo diferentes prioridades de saúde pública, recursos disponíveis e políticas nacionais (13).

_Considerações finais

Ao longo dos anos o PNRN tem mantido uma estreita colaboração com diversas Associações de Doentes, em particular com aquelas que representam os doentes diagnosticados através do “teste do pezinho”, dando a sua contribuição técnico-científica sempre que solicitada. Em 2019 foi assinado o protocolo de colaboração entre o INSA e a APOFEN, em 2020, o protocolo de colaboração com as duas Associações de Doentes da Fibrose Quística: Associação Nacional de Fibrose Quística (ANFQ) e Associação Portuguesa de Fibrose Quística (APFQ), em 2024 o protocolo de cooperação com a Associação Portuguesa de Pais e Doentes com Hemoglobinopatias (APPDH) e em 2025 o protocolo com a Associação Portuguesa de Neuromusculares (APN).

Desde o início deste Programa que existe uma ligação estreita entre os Centros de Tratamento Especializados, os locais de colheita do “teste do pezinho” e a URN.

As atividades de I&D estão também profundamente ligadas ao Programa com as características do PNRN que se traduzem em ganhos significativos em saúde pública e, conseqüentemente, conduzem a uma diminuição da morbidade e mortalidade infantis.

Será ainda de salientar que, desde 2004, que a URN tem mantido, de forma permanente, um dos seus objetivos, que consiste em contribuir para a disseminação do conhecimento através do aumento da capacitação e da literacia no âmbito do rastreio neonatal, desenvolvendo ações de formação designadas “Um dia com o Rastreio Neonatal”, com periodicidade bianual, para além das inúmeras visitas de estudo à Unidade.

O PNRN é um programa dinâmico, que se tem mantido atento às recomendações internacionais, a inovações tecnológicas e terapêuticas e às possibilidades de melhoria dos seus indicadores e que tem trazido um valor acrescido à deteção precoce de algumas patologias (14). Envolvendo profissionais de saúde das áreas laboratorial e clínica, bem como decisores políticos e associações de doentes, o PNRN mantém-se como um programa de referência a nível nacional e internacional. A taxa de cobertura nacional mantém-se próximo dos 100%, o

que constitui um excelente indicador de aceitação e adesão da população a este programa nacional, não obrigatório, de saúde pública. Anualmente a Comissão Executiva reúne com a Comissão Técnica Nacional do PNRN onde é discutido o relatório anual de atividades do ano anterior e assuntos de índole geral e particular. Entre os vários assuntos abordados, tem sido dado especial destaque à tomada de decisão da integração de mais doenças, no painel de doenças rastreadas e, eventualmente, de novos rastreios e o seu impacto, em termos de saúde pública. Sempre que é iniciado um rastreio é contactada a respetiva Associação de doentes que colabora e dá o seu apoio.

O rastreio neonatal é uma conquista de saúde pública que muda vidas e pode ajudar a reduzir a morbilidade e mortalidade de doenças raras tratáveis em todo o mundo.

Agradecimentos:

Reconhecimento a todos os profissionais de saúde dos Centros de colheitas públicos e privados e Centros de Tratamento Especializados nas patologias rastreadas, pelo seu profissionalismo e dedicação e empenho a este Programa Nacional.

Referências bibliográficas:

- (1) Guthrie R. Blood Screening for Phenylketonuria. *JAMA*. 1961;178(8):863. <https://doi.org/10.1001/jama.1961.03040470079019>
- (2) Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963 Sep;32(3):338-43. <https://doi.org/10.1542/peds.32.3.338>
- (3) Dussault JH. The anecdotal history of screening for congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec;84(12):4332-4. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.12.6221>
- (4) Osório RV. A picada no pezinho... uma dúzia de histórias. Porto: Campo das Letras, 2004.
- (5) Magalhães J, Osório R. O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. *J Med*. 1984;2080:322-5.
- (6) Magalhães J, Osório R, Alves J, et al. Le Dépistage de la Phénylcétonurie et de l'Hypothyroïdie Congénitale au Portugal. *La Dépeche*. 1986;:40-7.
- (7) Osório R, Vilarinho L. Dépistage expérimentale de l'hyperplasie congénitale des surrénales. *La Depeche*. 1989;14:15-20.
- (8) Osório RV, Vilarinho L. Assessment of a trial screening program for congenital adrenal hyperplasia in Portugal based on an antibody-coated tube RIA for 17 alpha-OH-progesterone. *Clin Chem*. 1989 Dec;35(12):2338-9. <https://doi.org/10.1093/clinchem/35.12.2338>

- (9) Vaz Osório R, Vilarinho L, Pires Soares J, et al. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce – 20 anos de Rastreio Neonatal. *Arq Med*. 1999;13(3):163-68.
- (10) Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, et al. Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Pediatr Port*. 2006;37(5):6. <https://ojs.pjp.spp.pt/article/view/4805/3607>
- (11) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis*. 2010 Dec;33(Suppl 3):S133-8. Epub 2010 Feb 23. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9048-z>
- (12) Marcão A, Barreto C, Pereira L, et al. Cystic Fibrosis Newborn Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies. *Int J Neonatal Screen*. 2018 Jun 29;4(3):22. <https://doi.org/10.3390/ijns4030022>
- (13) Loeber JG, Platis D, Zetterström RH, et al. Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010. *Int J Neonatal Screen*. 2021 Mar 5;7(1):15. <https://doi.org/10.3390/ijns7010015>
- (14) Gonçalves MM, Marcão A, Sousa C, et al. Portuguese Neonatal Screening Program: A Cohort Study of 18 Years Using MS/MS. *Int J Neonatal Screen*. 2024 Mar 20;10(1):25. <https://doi.org/10.3390/ijns10010025>

Vinte anos de rastreio neonatal alargado de doenças metabólicas em Portugal (2004-2024)

Twenty years of expanded newborn screening for metabolic diseases in Portugal (2004-2024)

Hugo Rocha, Carmen Sousa, Helena Fonseca, Ana Marcão, Laura Vilarinho

hugo.rocha@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

O Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) identifica doentes com doenças raras através de um rastreio de âmbito nacional. Atualmente, são identificadas 28 doenças, das quais 24 são doenças metabólicas, abrangendo aproximadamente 100% dos recém-nascidos, nascidos em Portugal.

Em 2004, o PNRN implementou um novo método de rastreio, a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) que possibilitou a deteção simultânea de 24 doenças metabólicas através da análise de aminoácidos e acilcarnitinas, dando origem ao que se designa por rastreio neonatal alargado.

De forma a melhorar a eficácia da deteção laboratorial das patologias rastreadas foi implementado um grupo de provas de segundo nível (doseamento da succinilacetona, homocisteína total, ácido metilmalónico, deteção da propionilglicina e separação dos isómeros de C5-carnitina), e a sua incorporação nos fluxogramas de deteção, com ganhos significativos em sensibilidade e especificidade. Esta estratégia foi fundamental para o PNRN apresentar taxas de falsos positivos e falsos negativos, para o rastreio de doenças metabólicas, muito baixas aumentando, desta forma, o valor que aporta em saúde pública.

Desde a sua implementação, em 2004, foram analisados 1 755 043 recém-nascidos por MS/MS o que permitiu a identificação de várias centenas de recém-nascidos afetados, resultando em intervenções clínicas precoces e melhoria clara nos resultados clínicos.

_Abstract

The Portuguese Neonatal Screening Program (PNRN) identifies patients with rare diseases through nationwide screening. At present, 28 conditions are included, of which 24 are inborn errors of metabolism, covering approximately 100% of newborns.

In 2004, the PNRN introduced tandem mass spectrometry (MS/MS), enabling the simultaneous detection of 24 metabolic disorders by measuring amino acids and acylcarnitines, thus establishing expanded neonatal screening in Portugal.

To enhance diagnostic accuracy, a panel of second-tier tests was subsequently incorporated, including quantification of succinylacetone, total homocysteine, and methylmalonic acid, detection of propionylglycine, and separation of C5-carnitine isomers. Integration of these assays into disease-specific diagnostic algorithms significantly improved both sensitivity and specificity. This approach has been crucial for maintaining very low false-positive and false-negative rates in the screening of metabolic diseases, thereby increasing the program's public health impact.

Since the implementation of MS/MS in 2004, a total of 1,755,043 newborns have been screened, leading to the identification of several hundred affected infants. This has enabled timely clinical interventions and contributed to markedly improved health outcomes.

_Introdução

As doenças metabólicas são um grupo de doenças genéticas raras, onde o correto funcionamento do metabolismo celular está comprometido. Estima-se que, atualmente, sejam conhecidas aproximadamente 1450 doenças metabólicas ⁽¹⁾ que afetam as mais variadas vias metabólicas, incluindo defeitos em proteínas, transportadores, cofatores, etc. Desde a sua origem, que o rastreio neonatal está invariavelmente associado às doenças metabólicas. O Rastreio Neonatal teve o seu início com os trabalhos pioneiros de Robert Guthrie ⁽²⁾, nos anos sessenta do século passado, que desenvolveu um método simples e económico para realizar uma avaliação semi-quantitativa dos níveis de fenilalanina em sangue de recém-nascidos, colhido em papel de filtro, de forma a rastrear a fenilcetonúria. Foram as vantagens da utilização deste tipo de amostra, a simplicidade, eficiência e baixo custo do teste, associados aos excelentes resultados clínicos de um tratamento precoce da fenilcetonúria, que foram os grandes impulsionadores da expansão dos Programas de Rastreio Neonatal por todo o mundo ⁽³⁾. A seguinte grande revolução dos Programas de Rastreio Neonatal esteve, também ela, relacionada com as doenças metabólicas e foi a adaptação e introdução da espectrometria de massa em tandem nos laboratórios de rastreio neonatal. A adaptação desta metodologia ocorreu em meados dos anos noventa do século passado e ficou fundamentalmente a dever-se aos trabalhos de David Millington ⁽⁴⁾ e Don Chace ⁽⁵⁾. Sendo uma tecnologia multianalítica, veio possibilitar o rastreio de mais de 20 doenças metabólicas simultaneamente, numa única análise, através da quantificação de aminoácidos e conjugados de carnitina, dando origem ao que se passou a chamar de Rastreio Neonatal Alargado.

O Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) é um programa de saúde pública que teve o seu início em 1979, com o rastreio da fenilcetonúria. O Programa sempre se caracterizou por uma forte dinâmica na procura de aumentar os ganhos em saúde que aporta à população, o que se traduziu na realização de vários estudos piloto para avaliação de exequibilidade e benefícios de novos rastreios (6,7). Em 2004 deu-se início a um estudo piloto para o rastreio alargado de doenças metabólicas por espectrometria de massa (8) que, após avaliação positiva, resultou na incorporação de mais 23 doenças metabólicas no painel do PNRN (tabela 1), em 2006 (9). O PNRN é um programa público de participação voluntária e que apresenta uma taxa de cobertura superior a 99,5%, o que é um reflexo da sua forte implementação e aceitação pela sociedade. Todas as análises laboratoriais de suporte ao funcionamento do PNRN são efetuadas num único laboratório, a Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, onde são processadas aproximadamente 88 000 amostras por ano (± 350 amostras por dia). As colheitas das amostras são realizadas maioritariamente em centros de

saúde ou unidades hospitalares e enviadas para o laboratório, fundamentalmente, por correio postal (7).

_Objetivo

Neste trabalho apresenta-se os resultados de 20 anos (2004-2024) do rastreio neonatal alargado a doenças metabólicas na população portuguesa.

_Material e métodos

Este estudo inclui 1 755 043 amostras de sangue em papel de filtro de recém-nascidos nascidos em Portugal colhidas, maioritariamente, entre o 3º e o 6º dia de vida (garantindo 48 horas de alimentação ajustada ao peso do recém-nascido), entre 2004 e 2024. As análises de aminoácidos e acilcarnitinas foram efetuadas por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) (9), sendo rastreadas as 24 doenças metabólicas indicadas na tabela 1, pertencentes ao grupo das aminoacidopatias, défices do ciclo da ureia, acidúrias orgânicas e défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.

Tabela 1: 📄 Painel de doenças metabólicas rastreadas no âmbito da atividade do PNRN.

Aminoacidopatias	Fenilcetonúria / Hiperfenilalaninémias Tirosinemia tipo I Tirosinemia tipo II/III Leucínose (MSUD) Homocistinúria clássica Hipermetioninemia (déf. MATI/III)
Doenças do Ciclo da Ureia	Citrulinemia tipo I Acidúria Arginino-succínica Hiperargininemia
Acidúrias Orgânicas	Acidúria Propiónica (PA) Acidúria Metilmalónica (déf. em metilmalonil CoA mutase/cobalaminas) Acidúria Isovalérica (IVA) Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG) Acidúria Glutárica tipo I (GA I) 3-Metilcrotonilglucínúria (3-MCC) Acidúria Malónica
Doenças da β -Oxidação Mitocondrial dos Ácidos Gordos	Défice da desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia curta (SCHAD) Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD) Défice da desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia longa (LCHAD/TFP) Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa (VLCAD) Défice da carnitina-palmitoil transferase I (CPT I) Défice da carnitina-palmitoil transferase II (CPT II / CACT) Défice múltiplo das desidrogenases dos ácidos gordos (MADD / Acidúria glutárica tipo II) Défice primário em carnitina (CUD)

_Resultados

Desde 1979, já foram rastreados 4 309 181 recém-nascidos para a fenilcetonúria e 1 755 043 para as restantes 23 doenças metabólicas (desde 2004), tendo sido identificados mais de

1000 recém-nascidos afetados, em que foi possível intervir, alterando positivamente o curso clínico da doença.

Tabela 2:  Resultados cumulativos do rastreio neonatal de doenças metabólicas em Portugal.

Doenças hereditárias do metabolismo	Positivos	Prevalência
Aminoacidopatias	509	1: 6.134
Fenilcetonúria (PKU)*	376	1: 11.461
Hiperfenilalaninemia/DHPR **	45	1: 37.964
Leucínose (MSUD) **	22	1: 79.775
Tirosinemia tipo I (Tyr I) **	6	1: 292.507
Tirosinemia tipo II/III (Tyr II/III) **	9	1: 195.005
Homocistinúria clássica (Hcy) **	7	1: 250.720
Deficiência em Metionina Adenosiltransferase II/III (MAT II/III) **	44	1: 39.887
Doenças do Ciclo da Ureia	29	1: 60.519
Citrulinemia tipo I (Cit I) **	12	1: 146.254
Acidúria Argininosuccínica (AAS) **	9	1: 195.005
Argininemia (Arg) **	8	1: 219.380
Acidúrias Orgânicas	127	1: 13.819
3-Metilcrotonilglicínúria (3-MCC) / Deficiência em Holocarboxilase Sintetase (Def. HCS) **	43	1: 40.815
Acidúria Isovalérica (IVA) **	9	1: 195.005
Acidúria Propiónica (PA) **	5	1: 351.009
Acidúria Metilmalónica tipo mut- (MMA mut-) / Défices do Metabolismo das Cobalaminas **	35	1: 50.144
Acidúria Glutárica tipo I (GA1) **	21	1: 83.573
Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG) **	11	1: 159.549
Acidúria Malónica (MA) **	3	1: 585.014
Défices da β-Oxidação Mitocondrial dos Ácidos Gordos	344	1: 5.102
Deficiência da Desidrogenase dos Ácidos Gordos de Cadeia Média (MCAD) **	273	1: 6.429
Deficiência da Desidrogenase de 3- Hidroxi-Acil-CoA de Cadeia Longa (LCHAD) / Deficiência da Proteína Tifuncional Mitocondrial (TFP) **	18	1: 97.502
Deficiência Múltipla das Acil-CoA Desidrogenases dos Ácidos Gordos (MADD) **	13	1: 135.003
Deficiência primária em carnitina (CUD) **	15	1: 117.003
Deficiência da Desidrogenase dos Ácidos Gordos de Cadeia Muito Longa (VLCAD) **	14	1: 125.360
Deficiência da Carnitina-Palmitoil Transferase I (CPT I) **	4	1: 438.761
Deficiência da Carnitina-Palmitoil Transferase I (CPT II) / Deficiência da Carnitina-acilcarnitina translocase (CACT) **	5	1: 351.009
Deficiência da Desidrogenase de 3- Hidroxi-Acil-CoA de Cadeia Curta (SCHAD) **	2	1: 877.522
Total	1.009	1: 2.232

Recém-nascidos rastreados: *4309181; **1755043

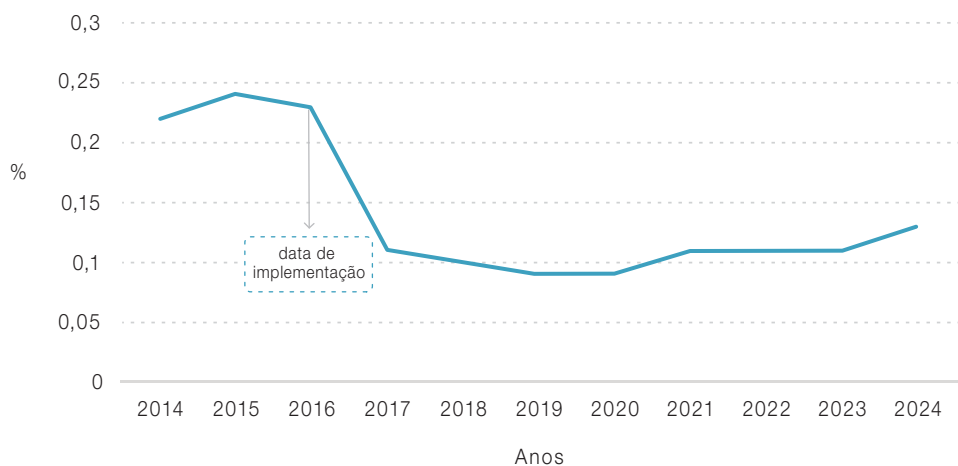
Das doenças metabólicas rastreadas, a que apresenta uma maior prevalência em Portugal é a deficiência na desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD), com uma prevalência de 1:6429 recém-nascidos, uma das mais elevada reportada em todo o mundo (10). Isto deve-se ao facto da maioria dos doentes (mais de 95%) ser de etnia cigana, uma comunidade com um elevado grau de consanguinidade e prevalência de doenças genéticas (11). Globalmente, as doenças metabólicas rastreadas (considerando os dados do rastreio da fenilcetonúria desde 1979) apresentam uma prevalência ao nascimento de 1: 2232 recém-nascidos, tendo sido identificados mais de 1000 crianças afetadas onde foi possível instituir uma intervenção terapêutica precoce. Para além das doenças incluídas no painel de rastreio, foram igualmente detetados doentes com outras patologias, através de diagnósticos diferenciais das rastreadas, nomeadamente deficiência em holocarboxilase sintetase, deficiência em β -cetotiolase, síndrome de Brown-Vialetto-Van-Laere, deficiência total da proteína trifuncional mitocondrial e deficiência na translocase da carnitina/acilcarnitina. Durante este período foram igualmente identificadas situações de doenças/condições maternas que tiveram efeito no resultado do rastreio neonatal dos seus filhos. Foram identificadas, através de alterações no rastreio neonatal dos filhos, mães com MCAD (n=1), com acidúria glutárica tipo I (n=5), com deficiência primária em carnitina (n=9), 3-metilcrotonilglicinúria (n=18) e deficiências maternas em vitamina B₁₂ (n=35). Embora a deteção de doenças/condições maternas não seja um dos objetivos primários do rastreio neonatal, a verdade é que ela aporta vantagens em saúde, não apenas para as mães como também, em algumas situações, para os recém-nascidos. O melhor exemplo são as deficiências maternas em vitamina B₁₂, muitas vezes associadas a desequilíbrios alimentares, e que podem comprometer de forma significativa o desenvolvimento dos recém-nascidos, sendo importante uma deteção e correção precoces nos recém-nascidos (12).

Os Programas de Rastreio Neonatal devem garantir o máximo de ganhos em saúde para a população a que se dirigem. De forma a atingir este objetivo é necessário, do

ponto de vista laboratorial, que estejam implementados sistemas de melhoria contínua e de controlo de indicadores relevantes, como é o caso da sensibilidade, especificidade, falsos positivos ou falsos negativos. Após, em 2004, se ter procedido ao maior alargamento da sua história, no que a doenças rastreadas diz respeito, verificou-se que para algumas das patologias então rastreadas a sensibilidade e/ou especificidade eram melhoráveis, nomeadamente no caso da tirosinemia tipo I, acidúria isovalérica, homocistinúria clássica, acidúria propiónica, acidúria metilmalónica e défices do metabolismo das cobalaminas. De forma a colmatar essas situações, a abordagem definida passou por implementar provas de segundo nível (testes mais específicos, realizados sobre a amostra inicial de rastreio, quando se detetam alterações no rastreio inicial), nomeadamente o doseamento da succinilacetona, homocisteína total, ácido metilmalónico, deteção da propionilglicina e separação dos isómeros de C5-carnitina, e a sua incorporação nos fluxogramas de deteção das patologias (13,14). Esta estratégia traduziu-se na melhoria dos indicadores do PNRN para o rastreio de doenças metabólicas, nomeadamente no valor preditivo positivo e na taxa de falsos positivos. Efetuando-se a comparação dos indicadores do ano de 2016 com o ano de 2017 (ano em que foram adotadas as provas de segundo nível, com exceção do doseamento da succinilacetona, que o havia sido em 2006), o valor preditivo positivo passou de 21% para 31% (um aumento de 48%) e a taxa de falsos positivos diminuiu de 0,17% para 0,10% (uma diminuição de 41%) (gráfico 1). Estas melhorias não refletem o impacto do doseamento da succinilacetona, o que faria com que a melhoria nos indicadores tivesse uma magnitude ainda mais expressiva. No entanto, as vantagens da adoção destas provas de segundo nível não se esgotam na redução dos falsos positivos, manifestando-se também num aumento de sensibilidade na identificação das patologias. Neste contexto, é relevante salientar que foi a implementação destas provas que possibilitou a identificação de deficiências de vitamina B₁₂ que resultam em fenótipo bioquímico detetável nos recém-nascidos, cuja intervenção precoce é reconhecidamente vantajosa e importante para o normal desenvolvimento do indivíduo.

De forma a garantir a qualidade analítica, o laboratório tem implementado um sistema de qualidade com procedimentos de controlo interno, participando também em vários programas de avaliação externa de qualidade, no âmbito do rastreio de doenças metabólicas, nomeadamente do CDC – *Center for Disease Control and Prevention*, UKNEQAS – *external quality assessment laboratories* e SIMMESN – *Italian Society for the Study of Inherited Metabolic Diseases and Neonatal Screening*, sempre com ótimos resultados.

Gráfico 1: ▾ Variação da taxa de falsos positivos no rastreio de doenças metabólicas, antes e depois da implementação das provas de segundo nível.



_Discussão e conclusão

Ao longo de toda a sua existência, o PNRN sempre se caracterizou por uma dinâmica contínua em busca de aumentar o impacto positivo que aporta à população portuguesa. Esta dinâmica inclui, não apenas a procura permanente de melhores e mais eficazes abordagens ao rastreio das patologias, mas também a realização de estudos piloto para avaliar a possibilidade de rastrear mais doenças, a melhoria da informação prestada aos pais e profissionais de saúde e a otimização da comunicação/articulação entre todos os envolvidos no processo de rastreio neonatal, desde a realização da colheita até à disponibilização do melhor tratamento e acompanhamento possíveis.

Pese embora algumas dúvidas iniciais, o rastreio neonatal alargado de doenças metabólicas revelou-se extremamente vantajoso e permitiu a intervenção clínica precoce em centenas de recém-nascidos em Portugal, com uma influência muito positiva no seu curso clínico e uma diminuição significativa das morbidade e mortalidade associadas às patologias rastreadas. A incorporação deste rastreio num programa solidamente implementado e integrado nas políticas de saúde pública do país, traduz-se em diagnósticos atempados, intervenções clínicas precoces e de acordo com as melhores práticas internacionais, culminando num melhor prognóstico e qualidade de vida dos recém-nascidos e das suas famílias.

Referências bibliográficas:

- (1) Ferreira CR, Rahman S, Keller M, et al ; ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis.* 2021 Jan;44(1):164-17. <https://doi.org/10.1002/jimd.12348>
- (2) Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963 sep;32:338-43. <https://doi.org/10.1542/peds.32.3.338>
- (3) Castiñeras DE, Couce ML, Marín JL, et al. Newborn screening for metabolic disorders in Spain and worldwide. *An Pediatr (Engl Ed).* 2019 Aug;91(2):128e1-128e14. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2019.05.005>
- (4) Millington DS, Kodo N, Norwood DL, et al. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 1990;13(3):321-4. <https://doi.org/10.1007/BF01799385>
- (5) Chace DH, Millington DS, Terada, et al. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 1993 Jan;39(1):66-71. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.1.66>
- (6) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce: 35 anos de atividade (1979-2014). *Boletim Epidemiológico Observações.* 2015;14:3-6. <http://hdl.handle.net/10400.18/3222>
- (7) Rocha H, Marcão A, Sousa C, et al. Programa Português de Cribado Neonatal. *Rev Esp Salud Pública.* 2021;95:e1-7. <https://ojs.sanidad.gob.es/index.php/resp/article/view/484>
- (8) Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, et al. Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Pediatr Port.* 2006;37(5):6. <https://ojs.pjp.spp.pt/article/view/4805?articlesBySameAuthorPage=1>
- (9) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Dec;33(Suppl 3):S133-8. Epub 2010 Feb 23. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9048-z>
- (10) Rocha H, Castiñeras D, Delgado C, et al. Birth Prevalence of Fatty Acid β -Oxidation Disorders in Iberia. *JIMD Rep.* 2014;16:89-94. Epub 2014 Jul 11. https://doi.org/10.1007/8904_2014_324
- (11) Ventura FV, Leandro P, Luz A, Rivera IA, et al. Retrospective study of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Portugal. *Clin Genet.* 2014 Jun;85(6):555-61. Epub 2013 Jul 28. <https://doi.org/10.1111/cge.12227>
- (12) Lipari Pinto P, Florindo C, Janeiro P, et al. Acquired Vitamin B12 Deficiency in Newborns: Positive Impact on Newborn Health through Early Detection. *Nutrients.* 2022 Oct 20;14(20):4397. <https://doi.org/10.3390/nu14204397>
- (13) Rocha H. ¿Qué hay de nuevo en el cribado neonatal de enfermedades metabólicas? *Acta Pediatr Esp.* 2015;73 (suppl):S12-3. https://www.actapediatrica.com/index.php/suplementos/download/1733_7902c06bd928c7f07ba75232a4ff7f5b
- (14) Gonçalves MM, Marcão A, Sousa C, et al. Portuguese Neonatal Screening Program: A Cohort Study of 18 Years Using MS/MS. *Int J Neonatal Screen.* 2024 Mar 20;10(1):25. <https://doi.org/10.3390/ijns10010025>

Rastreio neonatal da fibrose quística em Portugal: etapas de uma história de sucesso

Cystic fibrosis newborn screening in Portugal: stages of a successful story

Ana Marcão, Lurdes Lopes, Conceição Pinho, Fábio Guimarães, Laura Vilarinho

ana.marcao@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A Fibrose Quística (FQ) é uma doença genética com transmissão autossómica recessiva, resultante da deficiência na proteína CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Associada a esta patologia, está descrita uma mutação prevalente, presente em mais de 90% dos alelos dos doentes do Norte da Europa (p.Phe508del), mas foram identificadas mais de 2000 outras variantes no gene CFTR.

O rastreio neonatal desta patologia é possível desde 1979, baseado na determinação de elevadas concentrações de Tripsinogénio Imunorreativo (IRT) sanguíneo, nos recém-nascidos (RN) afetados. Atualmente, são utilizadas diferentes combinações de marcadores bioquímicos e vários níveis de análise genética, em algoritmos de rastreio neonatal complexos.

Em Portugal, este rastreio decorre a nível nacional desde 2013, após um primeiro estudo-piloto regional. Foram rastreados 949 624 RN e identificados 92 doentes, o que se traduz numa prevalência de 1:10 322 RN.

Este trabalho descreve a implementação do rastreio neonatal da FQ em Portugal, desde os estudos-piloto (1991-1995 e 2013-2016) até à sua integração oficial no Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN), em 2018, salientando a importância dos fatores epidemiológicos, económicos e ético-legais na implementação e otimização do rastreio neonatal.

_Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disorder with autosomal recessive inheritance, resulting from a deficiency in the CFTR protein (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). A prevalent mutation, p.Phe508del, is present in over 90% of alleles in patients of Northern European descent, but more than 2,000 other variants have been identified in the CFTR gene.

Neonatal screening for this disease has been possible since 1979, based on the detection of elevated levels of immunoreactive trypsinogen, in the blood of affected newborns. Currently, various combinations of biochemical markers and multiple levels of genetic analysis are used in complex newborn screening algorithms.

In Portugal, nationwide screening has been in place since 2013, following an initial regional pilot study. A total of 949,624 newborns have been screened, with 92 patients identified, corresponding to a prevalence of 1 in 10,322 live births.

This paper describes the implementation of neonatal CF screening in Portugal, from the pilot studies (1991–1995 and 2013–2016) to its official integration into the National Neonatal Screening Program in 2018, highlighting the importance of epidemiological, economic, and ethical-legal factors in the implementation and optimization of neonatal screening.

_Introdução

A Fibrose Quística (FQ) foi descrita, pela primeira vez, em 1938 por Dorothy Andersen, como uma doença do pâncreas, sendo posteriormente reconhecido o envolvimento pulmonar. As primeiras, e mais frequentes, manifestações clínicas desta patologia são infeções respiratórias recorrentes e baixo peso, devido à insuficiência pancreática, e surgem habitualmente nos primeiros meses de vida. A qualidade de vida dos doentes é gravemente afetada, podendo ocorrer a morte muito precoce. A perda excessiva de sal no suor é uma característica da doença e a descoberta de elevadas concentrações de iões cloreto (Cl⁻) no suor destes doentes levou ao desenvolvimento do “teste do suor”, ainda hoje o teste mais utilizado na confirmação do diagnóstico da FQ. Muitas outras manifestações clínicas surgem associadas a esta patologia (1).

A FQ é uma doença genética com transmissão autossómica recessiva e resulta da deficiência na proteína *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)*, um canal iónico responsável pelo transporte dos iões Cl⁻ e bicarbonato (HCO₃⁻) através da membrana apical das células epiteliais, e codificada pelo gene *CFTR* (2). Mais de 2000 variantes foram identificadas neste gene, e o prognóstico clínico a partir das mutações identificadas é limitado, devido à fraca correlação genótipo-fenótipo, especialmente para os sintomas pulmonares. Apesar de estar presente na generalidade das populações, a prevalência da FQ é superior nas populações de origem europeia, onde apresenta um valor médio de 1:3 500 RN. Esta elevada frequência está associada a uma mutação prevalente (p.Phe508del, gene *CFTR*), presente em mais de 90% dos alelos dos doentes do norte da Europa (3,4).

O tratamento da FQ inclui a suplementação com enzimas pancreáticas lipossolúveis, o que permite a melhoria significativa do estado nutricional destes doentes, e a utilização de potentes antibióticos e mucolíticos na resolução das infeções respiratórias persistentes (5,6). Recentemente, a utilização de moduladores genéticos altamente eficientes que atuam corrigindo, a nível molecular, as alterações estruturais ou de função da proteína CFTR, teve um elevado impacto na melhoria da saúde e qualidade de vida dos doentes com FQ (5,7-9).

O aumento do Tripsinogénio Imunorreativo (IRT) sanguíneo, ao nascimento, permite efetuar o rastreio neonatal da FQ, desde 1979 (10). A identificação do gene e proteína envolvidos na FQ, em 1989 (2), e a demonstração, em 2005 (11), de valores sanguíneos elevados para a Proteína Associada à Pancreatite (PAP), nos RN com FQ, vieram permitir a introdução de testes de segunda linha nos algoritmos de rastreio, permitindo uma melhoria significativa do seu desempenho. Muitos programas de rastreio neonatal utilizam atualmente algoritmos complexos, combinando a utilização de marcadores bioquímicos (IRT e PAP), e também vários níveis de análise genética (12). Os doentes com quadros clínicos de *íleo meconial* apresentam, frequentemente, valores normais de IRT ao nascimento, pelo que não são identificados no rastreio neonatal, com as estratégias habituais. Estas crianças devem realizar o teste do suor, ou efetuar o estudo do gene *CFTR*, mesmo que o resultado do rastreio neonatal seja negativo.

_Objetivo

A integração da fibrose quística num programa de rastreio neonatal exige a otimização do algoritmo de rastreio a utilizar, atendendo às condições peculiares de cada população. Este trabalho descreve a implementação desse rastreio em Portugal, que decorre a nível nacional desde 2013, salientando a importância dos fatores epidemiológicos, económicos e ético-legais, particulares da nossa população, e que condicionaram quer a implementação, quer a otimização do algoritmo de rastreio.

_Recém-nascidos rastreados e metodologia

Foi efetuado um estudo-piloto regional no Grande Porto, entre 1991 e 1993, incluindo 40 000 RN. Em 1994, este estudo passou a ser efetuado na região centro, tendo sido estudados 4 533 RN (PNDP- relatório 1993 (13)). Foi utilizada uma estratégia IRT/IRT, e o IRT foi determinado utilizando o método DELFIA® da *PerkinElmer*. Em 2013, iniciou-se um estudo-piloto a nível nacional, que se prolongou até 2016, e incluiu 255 000 RN. Foi utilizada uma estratégia IRT/PAP/IRT, e a quantificação do IRT e da PAP foram, respetivamente, efetuadas pelo sistema *AutoDELFIA*® da *PerkinElmer* e pelo *kit MucoPAP-F* da *Dynabio* (14).

Os casos positivos foram referenciados para o Centro de Tratamento (CT) da FQ mais próximo da área de residência dos pais. No CT, é efetuada a avaliação clínica, realizado o teste do suor, e solicitado o consentimento informado dos pais, para realização do estudo do gene *CFTR*, nos casos positivos ou duvidosos. O estudo genético foi efetuado a dois níveis: pesquisa da mutação mais frequente (p.Phe508del) por PCR alelo-específico (método adaptado de Ferrie, *et al.* (15)), e pesquisa de 62 mutações mais frequentes na Península Ibérica, utilizando um *kit* da *Elucigene*® (*CF-EU2v1* e *CF Iberian Panel kit*).

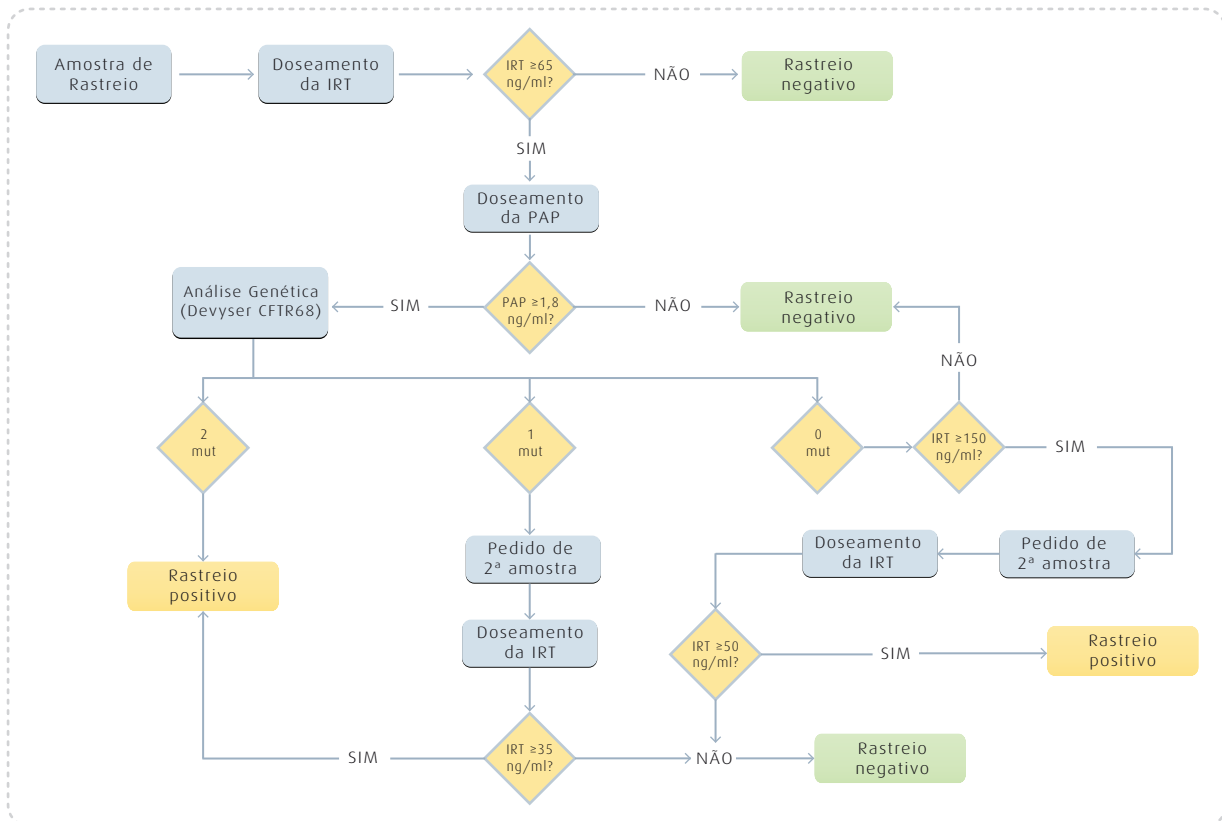
Entre 2017 e 2022, este rastreio prosseguiu baseado na estratégia IRT/PAP/IRT, com ligeiras alterações ao algoritmo (16). Em 2022, o estudo genético passou a ser efetuado com o *kit CFTR68* da *Devyser*®, que permite a pesquisa de 68 mutações consideradas significativas na população europeia atual.

Em 2023, foi alterada a estratégia de rastreio neonatal da FQ, que passou a ser do tipo IRT/PAP/DNA, considerando-se positivos, e passíveis de referência, todos os casos com, pelo menos, uma mutação identificada. Os casos com IRT ≥ 150 ng/mL na amostra de rastreio, que mantiveram um valor aumentado na amostra de repetição (IRT ≥ 100 ng/mL), foram também referenciados. Desde o início de 2024, passou a ser também solicitada uma amostra de repetição, para o doseamento do IRT, em todos os casos com apenas uma mutação identificada, isto é, uma estratégia IRT/PAP/DNA/IRT (figura 1). A quantificação do IRT é efetuada pelo sistema *GSP*® da *Rewity*, desde 2024. Os doseamentos do IRT e da

PAP estão acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), segundo a Norma NP EN ISO 15189 (Laboratórios clínicos: Requisitos para a qualidade e competência), desde 2019.

Globalmente, desde 2013, foram rastreados 949 624 RN, a nível nacional.

Figura 1: Algoritmo do rastreio neonatal da fibrose quística desde 2024.



Resultados e discussão

No primeiro estudo-piloto realizado em Portugal para o rastreio neonatal da FQ (1991-1993), foram identificados 4 casos positivos na região do Grande Porto, daqui resultando uma prevalência de 1: 10 000 RN. Na região Centro (1994-1995) não foi identificado nenhum doente. Os resultados obtidos ficaram muito aquém do esperado: o número de doentes identificados indicava uma prevalência ao nascimento para a FQ de metade do previsto, e o método de rastreio utilizado resultava num elevado número de casos falsos positivos, com necessidade de convocar um grande número de RN para efetuar o teste do suor, afetando, negativamente, muitas famílias. Estes resultados, associados ao questionável benefício clínico que a identificação precoce dos doentes trazia nessa altura, resultaram na suspensão desse rastreio (PNDP - relatório 1995 (17)).

Em 2013, surgiu a oportunidade de realizar um segundo estudo-piloto com o projeto “Rastreio, Diagnóstico e Tratamento Precoce da Fibrose Quística”, financiado pelo Alto Comissariado para a Saúde e envolvendo várias Associações de Doentes, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e os hospitais com consulta especializada na FQ. A continuidade deste projeto que, inicialmente, previa incluir 80 000 RN, foi assegurada pelo INSA até 2016, e foram estudados 255 000 RN. Foram referenciados setenta e oito casos e 32 foram confirmados como positivos. Os resultados deste estudo-piloto foram publicados em 2018 (15). Identificaram-se, neste período, três casos falsos negativos, um deles com *íleo meconial*, por suspeita clínica. Considerando os 35 casos identificados, observou-se uma prevalência de 1:7 285 RN. A introdução da determinação da PAP, na estratégia de

rastreio, possibilitava um custo-benefício aceitável para a comunidade, e permitia contornar a questão do rastreio genético, legalmente e economicamente não aceitável em Portugal, nessa altura. Em 2017, foram criados os Centros de Referência Nacionais (CR) para a área da FQ (Despacho n.º 6669/2017), passando todos os casos com rastreio neonatal positivo a ser referenciados para estes centros. No final de 2018, a FQ foi oficialmente integrada no painel nacional do PNRN. A estratégia de rastreio IRT/PAP/IRT manteve-se até final de 2022, com ligeiros ajustes nos valores de *cut-off* da PAP e IRT.

Em 2023, foi alterada a estratégia de rastreio da FQ, passando a incluir-se o estudo genético no algoritmo de rastreio [estratégia IRT/PAP/DNA (2023) e IRT/PAP/DNA/IRT (2024)], com um valor de segurança para valores muito elevados de IRT (≥ 150 ng/mL). Todas as alterações no algoritmo de rastreio neonatal da FQ foram efetuadas após reunião com os CR. A análise genética efetuada inclui apenas a pesquisa de mutações comprovadamente causais de FQ, de acordo com a base de mutações CFTR2, e frequentes na população europeia. Com a introdução do estudo genético no algoritmo de rastreio, o número de pedidos de novas amostras diminuiu significativamente, de 0,3% (2017-2022) para 0,04% (2024), e o valor preditivo positivo (VPP) para os casos referenciados passou de 30 para 50% (tabela 1). A diminuição do número de casos falsos positivos referenciados é especialmente

importante, por vários motivos: 1) representam uma sobrecarga desnecessária para os CR, 2) diminuem a confiança dos profissionais de saúde no rastreio neonatal, e 3) representam uma enorme ansiedade para as famílias.

Desde 2013, foram rastreados 949 624 RN e identificados 92 doentes, o que se traduz numa prevalência de 1:10 322 RN (PNRN- relatório 2024 (18)). Foram identificados oito casos falsos negativos, quatro dos quais apresentando quadros clínicos sugestivos de *íleo meconial*. Oito casos referenciados apresentaram valores de teste do suor intermédios ou variantes genéticas de significado incerto, e mantêm-se em vigilância clínica (casos CFSPID, *Cystic Fibrosis Screening Positive Inconclusive Diagnosis*). O doseamento da PAP apresenta uma dupla vantagem: é economicamente mais vantajoso, pois permite diminuir o número de estudos genéticos, e reduz significativamente o número de casos CFSPID e portadores identificados, relativamente a algoritmos em que o estudo genético é utilizado como teste de segunda linha (19). Por outro lado, a introdução do estudo genético, como teste de terceira linha, permite uma melhoria considerável do desempenho deste rastreio, com uma diminuição significativa da taxa de pedidos de segundas amostras e um aumento significativo do VPP (20). A análise dos resultados genéticos de todos os doentes identificados desde 2013, mostra que a mutação

Tabela 1: Comparação dos resultados do rastreio neonatal da FQ com a estratégia IRT/PAP/IRT e IRT/PAP/DNA/IRT.

Estratégia de rastreio	IRT/PAP/IRT (2017-2022)	IRT/PAP/DNA/IRT (2024)
Nº de RN rastreados	524 200	84 631
Pedidos de novas amostras (%)	0,3	0,04
Valor preditivo positivo (VPP)*	2,9	18
Sensibilidade*	95,3%	100%
Especificidade	99,7%	99,9%
Valor preditivo positivo (VPP)* para os casos referenciados	30	50
Prevalência ao nascimento	1: 11 649	1: 12 090

*Cálculos efetuados sem contabilizar casos com *íleo meconial*.

p.Phe508del está presente em 65% dos alelos. Cinco mutações adicionais foram identificadas com uma frequência alélica de mais de 2% (p.Gly542X, p.Arg334Trp, p.Ala561Glu, p.Gly85Glu e p.Asn1303Lys), apresentando todas as restantes mutações uma frequência inferior.

A prevalência da FQ ao nascimento mantém, desde o início do rastreio nacional, uma tendência decrescente. Esta diminuição, que acompanha o que acontece em outros países europeus, pode dever-se ao aconselhamento genético e ao diagnóstico pré-natal, mas também à alteração das características da população europeia em idade fértil. Fenómenos globais de migração, trouxeram para a Europa ocidental muitos indivíduos jovens, oriundos de populações com menor prevalência ao nascimento da FQ.

Conclusão

A otimização da estratégia do rastreio neonatal da fibrose quística (FQ) em Portugal, de acordo com os aspetos éticos, sociais, económicos e epidemiológicos da população portuguesa, tem-se revelado fundamental para a melhoria contínua do desempenho deste rastreio.

Cumprindo com as orientações internacionais e com os objetivos do Programa Nacional de Rastreio Neonatal, este rastreio tem contribuído para a excelência dos cuidados de saúde oferecidos aos doentes portugueses com FQ.

Agradecimentos:

Os autores agradecem todo o empenho e colaboração demonstrados para a implementação do rastreio neonatal da FQ: à Professora Doutora Celeste Barreto e à Professora Doutora Margarida Amaral, autoras do projeto “Rastreio, Diagnóstico e Tratamento Precoce da Fibrose Quística”, e às associações de doentes, Associação Nacional da Fibrose Quística (ANFQ) e Associação Portuguesa da Fibrose Quística (APFQ). Agradecem também aos Centros de Referência para a FQ, pela disponibilidade que sempre demonstraram em colaborar com PNRN, e aos doentes e respetivas famílias.

Referências bibliográficas:

- Travert G, Heeley M, Heeley A. History of Newborn Screening for Cystic Fibrosis--The Early Years. *Int J Neonatal Screen*. 2020 Jan 31;6(1):8. <https://doi.org/10.3390/ijns6010008>
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73. (Erratum in: *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437). <https://doi.org/10.1126/science.2475911>
- Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn Screening for CF across the Globe--Where Is It Worthwhile? *Int J Neonatal Screen*. 2020 Mar 4;6(1):18. <https://doi.org/10.3390/ijns6010018>
- Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002 Jun;19(6):575-606. <https://doi.org/10.1002/humu.10041>
- Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, et al. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2021 Jun 5;397(10290):2195-11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3)
- Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2016 Nov 19;388(10059):2519-31. Epub 2016 Apr 29. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6)
- Amaral MD, Harrison PT. Development of novel therapeutics for all individuals with CF (the future goes on). *J Cyst Fibros*. 2023 Mar;22(Suppl 1):S45-S49. Epub 2022 Oct 30. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.10.007>
- Amaral MD. How to determine the mechanism of action of CFTR modulator compounds: A gateway to therapeutics. *Eur J Med Chem*. 2021 Jan 15;210:112989. Epub 2020 Nov 5. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112989>
- Taylor-Cousar JL, Robinson PD, Shteinberg M, et al. CFTR modulator therapy: transforming the landscape of clinical care in cystic fibrosis. *Lancet*. 2023 Sep 30;402(10408):1171-84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01609-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01609-4)
- Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*. 1979 Mar 3;1(8114):472-4. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(79\)90825-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(79)90825-0)
- Sarles J, Berthéze P, Le Louarn C, et al. Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *J Pediatr*. 2005 Sep;147(3):302-5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.05.017>
- Barben J, Castellani C, Dankert-Roelse J, et al. The expansion and performance of national newborn screening programmes for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*. 2017 Mar;16(2):207-13. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.12.012>
- Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Centro de Diagnóstico Pré-natal: relatório de actividades em 1993. Porto: Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães, 1994. <http://hdl.handle.net/10400.18/4085>
- Marcão A, Barreto C, Pereira L, et al. Cystic Fibrosis Newborn Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies. *Int J Neonatal Screen*. 2018 Jun 29;4(3):22. <https://doi.org/10.3390/ijns4030022>
- Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, et al. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet*. 1992 Aug;51(2):251-62. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1682690/>
- Camacho B, Pereira L, Bragança R, et al. Evaluating the Impact of Newborn Screening for Cystic Fibrosis in Portugal: A Decade of Insights and Outcomes. *Int J Neonatal Screen*. 2025 Aug 27;11(3):69. <https://doi.org/10.3390/ijns11030069>
- Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Centro de Diagnóstico Pré-natal: relatório de actividades em 1995. Porto: Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães, 1996. <http://hdl.handle.net/10400.18/4087>
- Programa Nacional de Rastreio Neonatal: relatório 2024. Porto: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2025. <http://hdl.handle.net/10400.18/10520>
- Sommerburg O, Hammermann J. Pancreatitis-Associated Protein in Neonatal Screening for Cystic Fibrosis: Strengths and Weaknesses. *Int J Neonatal Screen*. 2020 Mar 30;6(2):28. <https://doi.org/10.3390/ijns6020028>
- Munck A, Berger DO, Southern KW, et al. ; European CF Society Neonatal Screening Working Group (ECFS NSWG). European survey of newborn bloodspot screening for CF: opportunity to address challenges and improve performance. *J Cyst Fibros*. 2023 May;22(3):484-95. Epub 2022 Nov 10. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.09.012>

Genética molecular das hemoglobinopatias no Departamento de Genética Humana: uma trajetória de contributos para a ciência e para a sociedade

Molecular genetics of hemoglobinopathies in the Department of Human Genetics of INSA: a trajectory of contributions to science and society

Paula Faustino^{1,2}, Pedro Loureiro³, Susana Gomes³, Pedro Lopes¹, João Gonçalves³

paula.faustino@insa.min-saude.pt

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

(2) Instituto de Saúde Ambiental e Laboratório Associado TERRA. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

As hemoglobinopatias são um conjunto de anemias hereditárias relacionadas com alterações quantitativas ou qualitativas da hemoglobina, associadas a elevada morbidade e mortalidade. São das doenças genéticas mais prevalentes no mundo, destacando-se as talassemias e a anemia das células falciformes ou drepanocitose.

No contexto das comemorações dos 50 anos do Departamento de Genética Humana (DGH), este artigo visa revisitar a trajetória dos estudos das hemoglobinopatias neste departamento, realçando-se o desenvolvimento dos estudos moleculares e funcionais e as consequentes contribuições científicas e sociais mais relevantes.

No âmbito do diagnóstico pós e pré-natal, o DGH assegura a identificação de casais em risco de transmitirem hemoglobinopatias graves, oferecendo testes moleculares e tornando possível o aconselhamento genético. Por outro lado, o diagnóstico neonatal, permite a deteção precoce de recém-nascidos afetados por doença das células falciformes, proporcionando o início atempado do acompanhamento clínico.

No domínio da investigação, salientam-se os estudos de pesquisa e validação de biomarcadores genéticos que permitem delinear estratégias preventivas e terapêuticas personalizadas. Paralelamente, a investigação de formas muito raras e complexas de hemoglobinopatias tem contribuído para o conhecimento da fisiopatologia da doença e revelado novos mecanismos de regulação génica. Destaca-se, ainda, o contributo para o desenvolvimento de uma abordagem inovadora de terapia génica dirigida à beta-talassemia.

Assim, ao longo das últimas décadas, o DGH tem sido uma referência nacional na área das hemoglobinopatias, integrando diagnóstico altamente especializado, investigação científica, referência laboratorial, apoio técnico a políticas de saúde pública, sensibilização e formação. Esta atuação integrada tem contribuído de forma decisiva para a mitigação do impacto destas doenças em Portugal.

_Abstract

Hemoglobinopathies are a group of hereditary anemias related to quantitative or qualitative alterations of hemoglobin, associated with high morbidity and mortality. They are among the most common genetic disorders worldwide, with thalassemia and sickle cell anemia being the most prevalent.

In the context of the 50th anniversary of the Department of Human Genetics (DGH), this article aims to revisit the history of hemoglobinopathy studies at the department, highlighting the molecular and functional studies, and the more significant scientific and social contributions.

Regarding prenatal and postnatal diagnosis, the DGH ensures the identification of couples at risk of transmitting severe hemoglobinopathies by providing molecular testing and enabling genetic counselling. Additionally, neonatal diagnosis allows the early detection of newborns affected by sickle cell disease, permitting timely initiation of clinical follow-up.

In the field of research, emphasis is placed on studies for the identification and validation of genetic biomarkers that facilitate the development of personalized preventive and therapeutic strategies. Concurrently, research on very rare and complex forms of hemoglobinopathies has contributed to understanding the disease's pathophysiology and revealed new mechanisms of gene regulation. Notably, there has also been a significant contribution to the development of an original gene therapy approach targeting beta-thalassemia.

Thus, over the past decades, the DGH has established itself as a national reference center in the field of hemoglobinopathies, combining highly specialized diagnosis, scientific research, laboratory reference services, technical support for public health policies, awareness-raising, and training. This integrated approach has played a decisive role in mitigating the impact of these diseases in Portugal.

_Introdução

As hemoglobinopatias são um conjunto de doenças genéticas que se caracterizam por alterações na estrutura ou na síntese da hemoglobina, sendo esta a proteína responsável pelo transporte do oxigénio no sangue. Estas doenças hereditárias apresentam transmissão autossómica recessiva e são, geralmente, causadas por alterações patogénicas nos genes que codificam as cadeias de globina, constituintes da molécula da hemoglobina, ou nas suas regiões regulatórias proximais e distais. Podem ser classificadas em duas categorias principais,

as talassemias e as variantes de hemoglobina. As primeiras resultam da redução ou ausência de síntese de uma cadeia globínica (sendo as mais predominantes a beta-talassemia e a alfa-talassemia), enquanto as segundas resultam na síntese de uma hemoglobina estruturalmente anómala (sendo a mais comum a “hemoglobina S”, na origem da drepanocitose, também designada como anemia das células falciformes).

Os indivíduos portadores (heterozigóticos) de hemoglobinopatia são, geralmente, clinicamente assintomáticos, mas podem possuir risco genético reprodutivo para hemoglobinopatia grave o que torna indispensável o aconselhamento genético em consulta de genética médica. Por outro lado, os indivíduos doentes apresentam elevada morbilidade e mortalidade. Nas formas mais graves de talassemia (major) os doentes apresentam anemia grave, são dependentes de transfusões sanguíneas, e têm complicações graves, tais como sobrecarga de ferro e endocrinopatia (1). Na drepanocitose, é de salientar a anemia hemolítica, inflamação crónica e infeções recorrentes. Nestes doentes, pode ocorrer falciformação dos glóbulos vermelhos, episódios vaso-oclusivos, crises de dor muito intensa, isquémia e lesões multiorgânicas (2).

As hemoglobinopatias destacam-se também por serem as doenças monogénicas mais prevalentes no mundo. São originárias de populações da África subsariana, da orla do Mediterrâneo, Médio Oriente, Sudeste Asiático e subcontinente Indiano (3). Contudo, múltiplos movimentos populacionais, forçados ou voluntários, conduziram à sua disseminação pelo mundo, levando a uma distribuição geográfica atualmente alargada a todos os continentes. Consequentemente, as hemoglobinopatias têm representado um importante desafio para a saúde pública mundial, devido à sua elevada prevalência, relevância clínica e impacto sobre os sistemas de saúde.

_Objetivo

No contexto das comemorações dos 50 anos do DGH, este artigo pretende visitar a trajetória dos estudos das hemoglobinopatias neste departamento, iniciados em 1984, destacando os principais contributos para a ciência e para a

sociedade resultantes das atividades de diagnóstico altamente especializado, investigação científica, referência laboratorial, apoio a políticas de saúde pública, bem como ações de sensibilização e formação.

_Métodos

Para a elaboração deste artigo histórico foram consultados os arquivos institucionais do departamento, incluindo bases de dados e artigos científicos. Foram também consultadas bases de dados públicas: *Globin Gene Server* (<https://globin.bx.psu.edu/>), *ITHANET* (<https://www.ithanet.eu/>) e *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

_Resultados e discussão

Contexto histórico, fundação e primeiros marcos

O ano de 1984 marcou o início dos estudos de genética molecular humana no INSA, com a criação do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), sob a coordenação do Doutor João Lavinha. Este laboratório foi pioneiro na introdução de diversas metodologias de biologia molecular na área da genética humana, tendo impulsionado a investigação e a implementação de testes moleculares de diagnóstico em várias doenças genéticas hereditárias, incluindo as hemoglobinopatias.

Dois anos mais tarde, em 1986, foi criado em Portugal o Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias (PNCH), em cooperação com a Organização Mundial de Saúde e coordenação do INSA e, inevitavelmente, contribuir para o referido programa foi um dos objetivos do LBM.

Desde o final dos anos 80 até ao início dos anos 90 realizaram-se os primeiros estudos de epidemiologia molecular das hemoglobinopatias em Portugal que complementaram o conhecimento anterior, baseado em parâmetros hematológicos e bioquímicos, no âmbito da prevalência da beta-talassemia e a da drepanocitose no país (4). Os resultados da referida investigação contribuíram para a publicação dos primeiros artigos científicos de epidemiologia molecular

revelando a identificação das principais lesões moleculares que constituem a base genética destas doenças no nosso país e o seu padrão de distribuição geográfica (5-8). Por conseguinte, o DGH passou a oferecer serviços de diagnóstico molecular de âmbito nacional para estas doenças genéticas e salienta-se, em 1990, a realização do primeiro diagnóstico molecular pré-natal de drepanocitose e, em 1991, o primeiro diagnóstico molecular pré-natal de talassodrepanocitose.

Os avanços tecnológicos e metodológicos, a acreditação e a referência

Desde então, os estudos na área das hemoglobinopatias desenvolvidos no DGH têm envolvido um investimento constante na inovação tecnológica e metodológica. De lembrar que as primeiras técnicas laboratoriais usadas no LBM eram morosas, requeriam o uso de radioatividade e de quantidades avultadas de material biológico para análise. A partir da implementação da *polymerase chain reaction* (PCR) e de outros métodos nela baseados, da sequenciação de Sanger e da *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) passaram a obter-se diagnósticos com tempos de resposta muito mais curtos, menos dispendiosos e mais completos.

Em paralelo com a inovação tecnológica e metodológica, e primando sempre pela qualidade, o DGH foi o primeiro laboratório no país a obter acreditação pelo IPAC no âmbito da Norma ISO 15189 para diversos testes genéticos, incluindo os das hemoglobinopatias (http://www.ipac.pt/pesquisa/ficha_15189.asp?id=E0015).

Consequentemente ao acima exposto, e também graças à colaboração ativa e complementar entre dois departamentos técnico-científicos, DGH e Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS), o INSA diferenciou-se como o Laboratório de Referência na área do diagnóstico das hemoglobinopatias em Portugal, albergando a prestação de serviços altamente especializados, tanto de âmbito hematológico e bioquímico (realizada no DPS), como de genética molecular (realizada no DGH) e o adequado apoio da investigação.

Como referido, no início dos anos 90 o DGH identificou as principais lesões moleculares que constituem a base genética das hemoglobinopatias no nosso país (5-8). No entanto, nos últimos anos temos verificado que, embora estas continuem a ser as predominantes, tem havido um alargamento considerável do espectro mutacional sendo este facto, certamente, resultado de fluxos migratórios recentes. A título de exemplo, apresenta-se na **tabela 1** uma compilação (referente aos últimos 15 anos) da diversidade de alterações identificadas no gene da beta-globina (gene *HBB*) ou nas suas regiões regulatórias, associadas a beta-talassemia. A negrito destacam-se as quatro alterações mais frequentes na população portuguesa (7), as quais têm a sua origem ancestral/geográfica na orla do Mediterrâneo ou em Portugal.

Tabela 1: Exemplo da diversidade de alterações identificadas no gene beta-globina associadas a beta-talassemia, diagnosticadas no Departamento de Genética Humana do INSA nos últimos 15 anos

Localização no gene ou natureza da alteração	Alteração no DNA	Consequência funcional	Região do Globo com maior prevalência / Origem da alteração ^(a)
Promotor do gene <i>HBB</i>	c.[-78A>C]	beta+	Azerbaijão
	c.[-92C>G]		Não definida
	c.[-133G>A]		Não descrita
	c.[-138C>T]		África
	c.[-140C>T]		Portugal
Deleções extensas que removem o gene <i>HBB</i> (total ou parcialmente)	[(<i>HBD</i> , <i>HBB</i>)del]	beta°	Não descrita
	[(<i>HBE</i> , <i>HBG1</i> , <i>HBG2</i> , <i>HBD</i> , <i>HBB</i>)del]		Não descrita
	[(<i>HBG1</i> , <i>HBG2</i> , <i>HBD</i> e <i>HBB</i>)del]		Índia
	c.[316-149_*342delinsAAGTAGA]		Paquistão
	c.[316-339_*7130del]		Cabo Verde
Criação de codão de terminação prematuro / desfasamento da grelha de leitura	c.[20delA]	beta°	Mediterrâneo
	c.[25_26delAA]		Rússia
	c.[27dupG]		Índia/Paquistão
	c.[47G>A]		Índia
	c.[48G>A]		Portugal
	c.[126_129delCTTT]		Ásia
	c.[118C>T]		Mediterrâneo
	c.[235delC]		México
	c.[75T>A]		beta+
Alteração do processamento do RNA	c.[92G>C]	beta°	Líbia/Tunísia/Índia
	c.[92+1G>A]		Mediterrâneo
	c.[92+1G>T]		Punjab
	c.[92+5G>C]	beta+	Índia/Bangladesh
	c.[92+6T>C]		Portugal/Mediterrâneo
	c.[93-21G>A]		Mediterrâneo
	c.[315+1G>A]	beta°	Médio Oriente
	c.[316-197C>T]	beta+	Ásia

HBE - gene ϵ -globina, *HBG2* - gene γ -globina, *HBG1* - gene α -globina, *HBD* - gene δ -globina, *HBB* - gene β -globina; del - deleção;

^(a) segundo *Globin Gene Server* ou *ITHANET*; beta+ = diminuição da síntese de cadeias beta-globina; beta° = ausência de síntese de cadeias beta-globina

Os avanços no conhecimento científico e contribuições para delinear novas estratégias terapêuticas

A investigação na área da genética molecular das hemoglobinopatias no DGH tem, ao longo dos anos, contribuído para desvendar a fisiopatologia destas doenças, ou seja, tem permitido compreender a nível estrutural e funcional as lesões moleculares que dão origem às doenças da hemoglobina e os modificadores genéticos da sua expressividade.

A investigação dos mecanismos de controlo da expressão génica nas hemoglobinopatias contribuiu com avanços pioneiros para o conhecimento científico. Aponta-se, como exemplo, o estudo do mecanismo *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) na beta-talassemia que demonstrou que a posição do codão de terminação prematuro no gene da beta-globina e a ação de fatores de tradução influenciam a ativação do NMD e a síntese residual da proteína, ajudando a explicar a variabilidade clínica entre doentes e a propor novas vias terapêuticas (9,10). Outro exemplo corresponde à identificação de um mecanismo de regulação génica a longa distância dos genes da alfa-globina, anteriormente considerado ausente em humanos. Este avanço possibilitou, no contexto de uma colaboração internacional, o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica inovadora para a beta-talassemia, baseada na edição genómica com CRISPR/Cas9, demonstrando o seu potencial como terapia génica para a atenuação dos sintomas da doença (11,12).

Importa ainda destacar a investigação no âmbito da drepanocitose, que tem contribuído significativamente para a descoberta e validação de modificadores genéticos de alguns subfenótipos da doença, como por exemplo, a vasculopatia cerebral e a gravidade da anemia e das crises vaso-oclusivas, em idade pediátrica. A identificação destes biomarcadores e sua validação é de elevada utilidade clínica pois este conhecimento permite a estratificação dos doentes pelo grau de risco e a aplicação de medicina personalizada preventiva (13,14).

Os avanços nas políticas públicas de prevenção

Recentemente, o DGH, através da sua Unidade de Rastreio Neonatal, conduziu um estudo piloto para a integração do rastreio da doença das células falciformes no Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN). Os resultados evidenciaram que, devido aos movimentos populacionais, esta doença tem aumentado de relevância em Portugal, refletindo assim a mesma tendência observada a nível europeu. Em janeiro de 2024, procedeu-se à inclusão definitiva desta patologia no painel do PNRN, permitindo, desde então, a deteção precoce destes doentes e o seu acompanhamento clínico nos centros de referência do Serviço Nacional de Saúde (15).

Ações de formação, capacitação e colaboração

No âmbito das hemoglobinopatias, o DGH tem desempenhado um papel relevante na formação pré- e pós-graduada, contribuindo significativamente para a obtenção de graus académicos, como mestrados e doutoramentos. Destaca-se também a promoção contínua de ações de formação e capacitação de profissionais de saúde, com relevância para os estágios de genética molecular humana integrados nos Internatos Médicos de Patologia Clínica e de Genética Médica, assim como na Residência Farmacêutica, bem como a divulgação de informação junto do público em geral. Paralelamente, o DGH tem mantido uma colaboração sólida e duradoura com os PALOP, abrangendo a formação, a colaboração em projetos de I&D (16,17) e a participação em programas de capacitação.

_Conclusões

O percurso do DGH, na área das hemoglobinopatias representa um excelente exemplo de integração entre investigação científica, inovação tecnológica, prestação de serviços, referência e formação. Desde a fundação da genética molecular no INSA, até à implementação de programas nacionais de rastreio, os avanços alcançados têm tido um impacto significativo na melhoria do conhecimento e do diagnóstico destas doenças em Portugal. A capacidade

de gerar conhecimento novo, com relevância internacional, aliada ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e à aposta na medicina personalizada, consolidou o papel do INSA como referência nacional e internacional nesta área. O compromisso com a formação contínua e com a cooperação com países de expressão portuguesa reforça ainda mais o seu contributo para a mitigação destas doenças.

Desafios e perspetivas futuras

O futuro da investigação e diagnóstico das hemoglobinopatias no DGH aponta para uma crescente aposta na inovação dos processos laboratoriais com a aplicação das tecnologias de sequenciação de nova geração em larga escala, associada à análise de grandes volumes de dados, o que permitirá uma caracterização mais abrangente dos doentes e a identificação de novos biomarcadores com valor prognóstico e terapêutico.

Paralelamente, prevê-se a continuação da investigação translacional, com foco no desenvolvimento de novas terapias inovadoras de precisão e personalizadas.

A nível internacional, o DGH continuará a investir em colaborações com centros de excelência e também na capacitação de técnicos de países de língua portuguesa, contribuindo para uma resposta global mais equitativa a estas doenças genéticas hereditárias. Estas perspetivas reforçam o compromisso do INSA em manter-se na vanguarda científica, tecnológica e social, contribuindo para a melhoria da saúde da população.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a todos os colaboradores do DGH, aos médicos, aos doentes e aos seus familiares que, ao longo dos anos, contribuíram para os estudos das hemoglobinopatias no departamento. Um louvor indispensável ao elemento fundador, Doutor João Lavinha, cuja curiosidade e ambição científica foram determinantes para a implementação e sucesso desta área de trabalho. Também um agradecimento especial à Doutora Luísa Romão pelos primeiros estudos de projeção internacional que marcaram, de forma pioneira, o sucesso da investigação nesta área.

Referências bibliográficas:

- (1) Nienhuis AW, Nathan DG. Pathophysiology and Clinical Manifestations of the β -Thalassemias. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Dec 1;2(12):a011726. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011726>
- (2) Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010 Dec 11;376(9757):2018-31. Epub 2010 Dec 3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
- (3) Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Sep 1;2(9):a011692. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011692>
- (4) Martins MC, Olim G, Melo J, et al. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet*. 1993 Mar;30(3):235-9. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.3.235>
- (5) Lavinha J, Gonçalves J, Faustino P, et al. Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Hum Biol*. 1992 Dec;64(6):891-901. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1427745/>
- (6) Romão L, Olim G, Martins MC, et al. Unusual molecular basis of Hb H disease in the Azores Islands, Portugal. *Hemoglobin*. 1990;14(6):607-16. <https://doi.org/10.3109/03630269009046969>
- (7) Faustino P, Osório-Almeida ML, Barbot J, et al. Novel promoter and splice junction defects add to the genetic, clinical or geographic heterogeneity of beta-thalassaemia in the Portuguese population. *Hum Genet*. 1992 Jul;89(5):573-76. <https://doi.org/10.1007/BF00219188>
- (8) Peres MJ, Romão L, Carreiro H, et al. Molecular basis of alpha-thalassaemia in Portugal. *Hemoglobin*. 1995;19(6):343-52. <https://doi.org/10.3109/03630269509005826>
- (9) Romão L, Inácio A, Santos S, et al. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood*. 2000;96(8):2895-901. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.8.2895>
- (10) Peixeiro I, Silva AL, Romão L. Control of human beta-globin mRNA stability and its impact on beta-thalassaemia phenotype. *Haematologica*. 2011 Jun;96(6):905-13. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.039206>
- (11) Coelho A, Picanço I, Seuanes F, et al. Novel large deletions in the human alpha-globin gene cluster: Clarifying the HS-40 long-range regulatory role in the native chromosome environment. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Aug 15;45(2):147-53. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.05.010>
- (12) Mettananda S, Fisher CA, Hay D, et al. Editing an α -globin enhancer in primary human hematopoietic stem cells as a treatment for β -thalassaemia. *Nat Commun*. 2017 Sep 4;8(1):424. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00479-7>
- (13) Silva M, Vargas S, Coelho A, et al. Biomarkers and genetic modulators of cerebral vasculopathy in sub-Saharan ancestry children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2020 Jul;83:102436. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2020.102436>
- (14) Silva M, Faustino P. From Stress to Sick(le) and Back Again-Oxidative/Antioxidant Mechanisms, Genetic Modulation, and Cerebrovascular Disease in Children with Sickle Cell Anemia. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Nov 7;12(11):1977. <https://doi.org/10.3390/antiox12111977>
- (15) Rodrigues D, Marcão A, Lopes L, et al. Newborn Screening for Sickle Cell Disease: Results from a Pilot Study in the Portuguese Population. *Int J Neonatal Screen*. 2025;11(1):10. <https://doi.org/10.3390/ijns11010010>
- (16) Germano I, Santos B, Delgado M, et al. Genetic modulation of anemia severity, hemolysis level, and hospitalization rate in Angolan children with Sickle Cell Anemia. *Mol Biol Rep*. 2022 Nov;49(11):10347-56. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07831-1>
- (17) Santos B, Ginete C, Gonçalves E, et al. Characterization of a cohort of Angolan children with sickle cell anemia treated with hydroxyurea. *Blood Cells Mol Dis*. 2024 Mar;105:102822. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2023.102822>

Departamento de Genética Humana do INSA pioneiro na caracterização molecular de patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias na população portuguesa

Department of Human Genetics of INSA, a pioneer in the molecular characterization of inherited bleeding and thrombotic disorders in the Portuguese population

Isabel Moreira^{1,2}, Célia Ventura^{1,3}, Rita Certã², João Gonçalves², Dezsó David^{1,3}

isabel.moreira@insa.min-saude.pt

(1) Sector de Trombose e Hemostase. Laboratório de Biologia Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

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

_Resumo

Reconhecendo a importância e o impacto das patologias hemorrágicas hereditárias na saúde humana, o Departamento de Genética Humana (DGH) do INSA foi o primeiro laboratório em Portugal a realizar a abordagem molecular destas doenças, com o objetivo inicial de identificar portadoras e possibilitar a realização de diagnósticos pré-natais (DPNs) em famílias com hemofilias A e B. Desde os primeiros estudos dedicados à identificação do alelo de risco, passando pela caracterização de variantes patogénicas através da análise exaustiva dos genes, pelo estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo e pelo esclarecimento de mecanismos patogénicos, a investigação tem acompanhado os avanços metodológicos. Concomitantemente, o âmbito das patologias estudadas foi alargado à doença de von Willebrand e às deficiências dos fatores VII, XI e, mais tarde, à deficiência de fator V. A investigação passou também a abranger trombofilias hereditárias, nomeadamente as deficiências de proteína C, proteína S e antitrombina III, incluindo ainda os fatores genéticos de predisposição para trombose.

O trabalho desenvolvido no DGH nesta área foi pioneiro na caracterização molecular de patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias na população portuguesa, tendo permitido a determinação da etiologia e caracterização molecular destas patologias em cerca de 1.000 famílias da nossa população, bem como o conhecimento do espectro de variantes nos diferentes genes e a adoção, em cada caso, das estratégias de análise mais adequadas. Foi determinado o estado de portador em mais de 1.600 familiares e realizaram-se 75 DPNs. Com o constante acompanhamento dos avanços científicos e tecnológicos, incluindo o recurso à sequenciação de nova geração, alargamento das patologias e respetivos genes, bem como das famílias estudadas, o DGH continua a ser uma referência nacional nesta área.

_Abstract

Recognising the importance and impact of hereditary bleeding disorders on human health, the Department of Human Genetics (DGH) of INSA was the first laboratory in Portugal to undertake the molecular approach to these diseases, with the initial objective of identifying carriers and enabling the performance of prenatal diagnoses (PNDs) in families with haemophilia A and B. From the earliest studies dedicated to identifying the risk allele, through the characterisation of pathogenic variants via exhaustive gene analysis, the establishment of genotype-phenotype correlations, and the elucidation of pathogenic mechanisms, the research has accompanied the methodological advances. Concurrently, the scope of studied pathologies

was expanded to include von Willebrand disease and deficiencies of factors VII, XI, and later, factor V deficiency. Research also came to encompass hereditary thrombophilias, namely deficiencies of protein C, protein S, and antithrombin III, as well as genetic factors predisposing to thrombosis.

The work carried out by the DGH in this field was pioneering in the molecular characterisation of hereditary bleeding and thrombotic disorders within the Portuguese population, enabling the determination of the aetiology and molecular characterisation of these conditions in around 1,000 families from our population, as well as providing knowledge of the spectrum of variants across different genes and the adoption, in each case, of the most appropriate analytical strategies. Carrier status was determined in more than 1,600 relatives, and 75 PNDs were performed. With constant monitoring of scientific and technological advances, including the use of next-generation sequencing, expansion of the range of disorders and their respective genes, as well as the families studied, the DGH continues to be a national reference in this area.

_Introdução

As doenças hemorrágicas e trombóticas hereditárias, ainda que raras, representam um desafio clínico e de saúde pública devido ao risco de complicações graves e à necessidade de tratamento especializado e prolongado. De entre as doenças hemorrágicas, destacam-se as deficiências de Fator VIII (hemofilia A) e de Fator IX (hemofilia B), associadas, respetivamente, aos genes *F8* e *F9*. A hemofilia A apresenta uma incidência de cerca de 1/5.000 indivíduos do sexo masculino, enquanto a hemofilia B ocorre em aproximadamente 1/25.000. A doença de von Willebrand, associada ao gene *VWF*, ainda que mais frequente, manifesta-se muitas vezes de forma ligeira e é subdiagnosticada. Outras deficiências hemorrágicas, mais raras, incluem as dos fatores VII e XI (genes *F7* e *F11*, respetivamente). No grupo das trombofilias hereditárias, salientam-se as deficiências de Antitrombina III

(*SERPINC1*), Proteína C (*PROC*) e Proteína S (*PROS1*), com prevalência inferior a 0,5%. As variantes FVLeiden (NM_000130.4:c.1601G>A, p.(Arg534Gln)) e Protrombina G20210A (NM_000506.5:c.*97G>A), mais comuns na população, estão ambas associadas a um risco aumentado de eventos trombóticos.

O diagnóstico precoce destas patologias é essencial para prevenir complicações, como hemorragias espontâneas ou trombozes recorrentes. Neste contexto, o diagnóstico molecular assume um papel determinante, permitindo a identificação das variantes genéticas associadas a cada quadro clínico, orientando a estratégia terapêutica e permitindo a identificação de portadoras e um aconselhamento genético mais preciso às famílias em risco. O diagnóstico pré-natal (DPN), quando clinicamente indicado, representa um recurso valioso para famílias com estas patologias, permitindo decisões informadas e um planeamento atempado dos cuidados médicos.

Desde 1987, o Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), através da implementação de diversas metodologias de diagnóstico e de investigação molecular aplicada, incluindo a abordagem inovadora da sequenciação de nova geração (NGS), e em estreita colaboração com centros clínicos de referência, tem possibilitado a identificação da base genética e da patologia molecular destas doenças na população portuguesa, bem como a melhoria dos cuidados de saúde prestados a doentes com patologias trombo-hemorrágicas.

_Objetivos

Este trabalho teve como objetivos principais: i) a revisão dos estudos moleculares desenvolvidos no Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge no âmbito da identificação da base e da patogénese molecular das patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias da população portuguesa; ii) a análise do impacto dos resultados nos cuidados de saúde e na prevenção da doença; e iii) a identificação das especificidades de cada patologia, sempre num contexto de investigação aplicada e na perspetiva de alargamento ao estudo de outras patologias.

_Materiais e métodos

A extração de DNA genómico a partir de amostras de sangue, de líquido amniótico ou de vilosidades coriônicas foi realizada por métodos manuais ou automatizados.

A identificação da base molecular das patologias acompanhou a evolução tecnológica. Nos primeiros estudos, a restrição enzimática e o *Southern blotting* foram as metodologias mais usadas para os estudos de *linkage* e estabelecimento de estados de portadora, tendo sido também a primeira metodologia utilizada na deteção das inversões envolvendo o intrão 22 do gene *F8* (INV22).

Até à automatização da sequenciação de Sanger, a análise de conformação de DNA em cadeia simples (SSCP) (1) foi utilizada em larga escala como método de rastreio de variantes, e constituiu-se como método de diagnóstico direto no caso de variantes conhecidas; a análise por DHPLC foi também utilizada nalguns casos como método de rastreio.

A amplificação enzimática de DNA (PCR) das regiões codificantes, intrónicas adjacentes e reguladoras relevantes dos genes, seguida de sequenciação de Sanger, tem sido o método mais utilizado na identificação e confirmação de variantes de nucleótido único (SNVs) e pequenas inserções/deleções (indels), continuando como *gold standard*. A PCR é usada na pesquisa das inversões INV22 (PCR longo) e INV1 do *F8* (2,3). A PCR específica de alelo (ARMS, *amplification refractory mutation system*) é utilizada em contextos específicos para deteção de variantes, incluindo a versão ARMS fluorescente.

A *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) é utilizada para identificação e confirmação de deleções ou duplicações.

Recentemente, foi desenvolvido e validado um painel customizado de sequenciação de nova geração (NGS) permitindo de forma mais célere e com custos inferiores, a análise simultânea de vários genes, incluindo os associados a patologias hemorrágicas e trombóticas.

Resultados e discussão

No seguimento da publicação da estrutura dos genes *F8* e *F9* (4,5), o Centro de Genética Humana (atual DGH) foi o primeiro laboratório, a nível nacional, a realizar estudos moleculares em famílias com hemofilia A, inicialmente efetuando a genotipagem de polimorfismos extragénicos e, posteriormente, intragénicos (6). Esta abordagem permitiu a determinação do alelo de risco, a identificação de portadoras em familiares de casos índice e a realização dos primeiros DPNs. Dadas as limitações metodológicas de então, o desconhecimento das sequências intrónicas e a grande extensão das regiões funcionalmente importantes do gene *F8* (constituído por 26 exões, sendo que o maior, exão 14, tem mais de 3000 nucleótidos), só após a identificação das sequências dos intrões adjacentes, realizada em colaboração internacional, foi possível o desenvolvimento de *primers* para amplificação das sequências essenciais do *F8*, incluindo as junções exões/intrões, tendo então sido publicados os primeiros diagnósticos diretos em famílias de hemofilia A, com análise por SSCP (7). Foram também identificadas as primeiras variantes do *F9* em famílias com hemofilia B (8,9).

Uma das primeiras confirmações do efeito molecular de uma variante de splicing no *F8*, utilizando RNA de expressão ectópica de sangue total, foi realizada por nós (10).

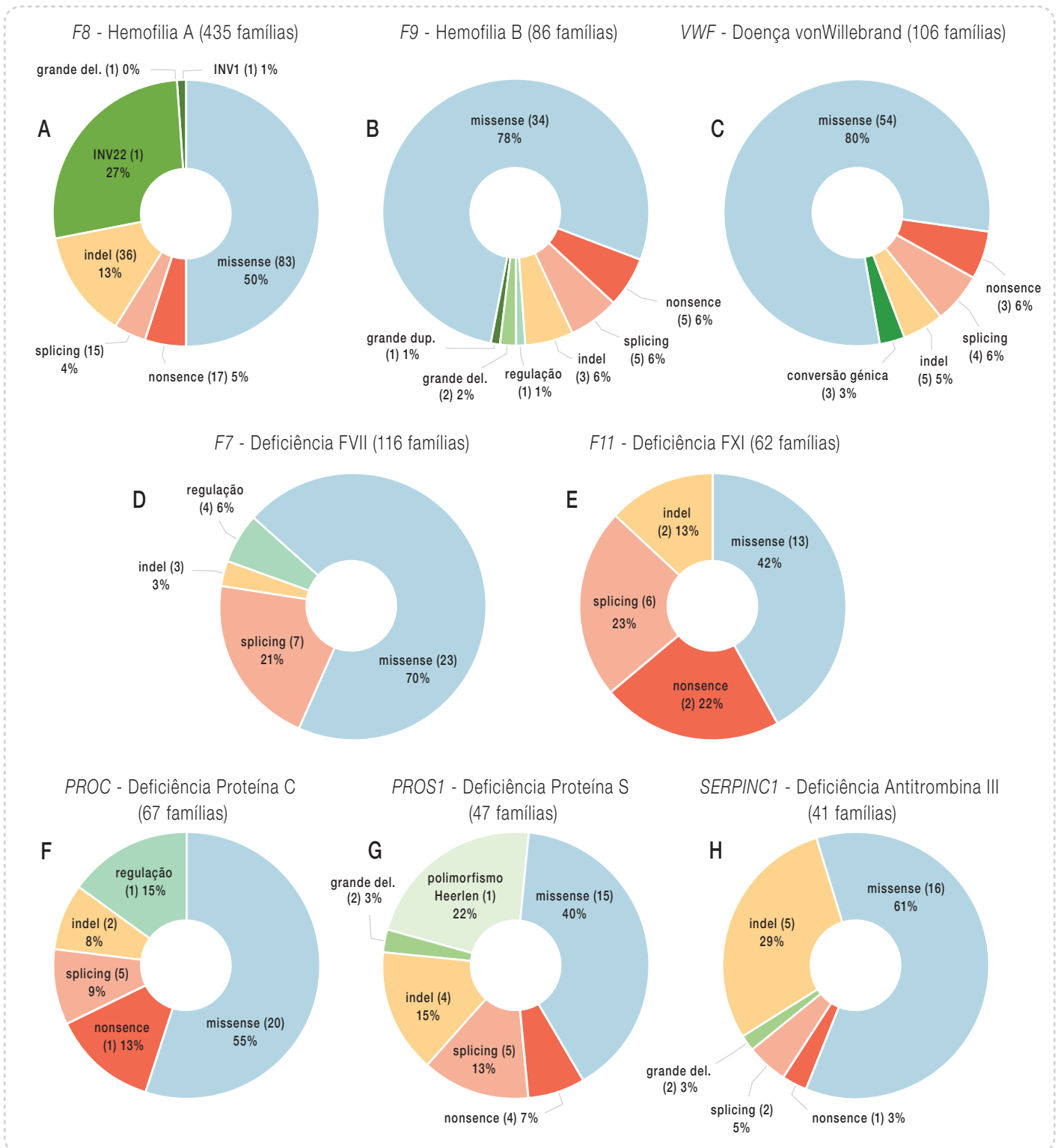
A introdução da pesquisa das inversões INV22 e INV1 do *F8*, a primeira associada a cerca de 50% dos casos graves de hemofilia A, permitiu identificar a base molecular num número significativo de famílias. Em 2006, o laboratório publicou o seu primeiro grande estudo descrevendo o espectro de variantes e a patogénese molecular num número relevante de doentes com hemofilia A, correlações genótipo-fenótipo, incluindo a associação de variantes aos diferentes fenótipos CRM (*cross-reacting material-negative*) e à presença de inibidores, bem como especificidades da patologia na população portuguesa (11). A **gráfico 1A** mostra a distribuição de variantes do *F8* identificadas em 435 famílias da população portuguesa estudadas até ao presente.

Progressivamente, alargou-se o diagnóstico molecular a outras patologias hemorrágicas hereditárias relevantes, nomeadamente doença de von Willebrand (o tipo 2 foi o primeiro alvo de estudo, associado a um número limitado de exões do VWF, de um total de 52), bem como deficiências de Fator VII e de Fator XI da coagulação (12). Observam-se diferenças notórias na distribuição do tipo de variantes genéticas associadas a cada patologia (**gráfico 1, B-E**), implicando a adoção de estratégias analíticas particulares em cada caso.

A distribuição dos pedidos de análise molecular para as principais patologias hemorrágicas e trombóticas mostra-se na **gráfico 2**. Os estudos moleculares das principais trombofilias hereditárias, nomeadamente, deficiências de Proteína S (13), Antitrombina III (14) e Proteína C (15), foram iniciados em 1993, sendo fundamentais para o estabelecimento da sua etiologia em cada família e contribuindo também para a caracterização molecular destas patologias na população portuguesa (**gráfico 1, F-H**).

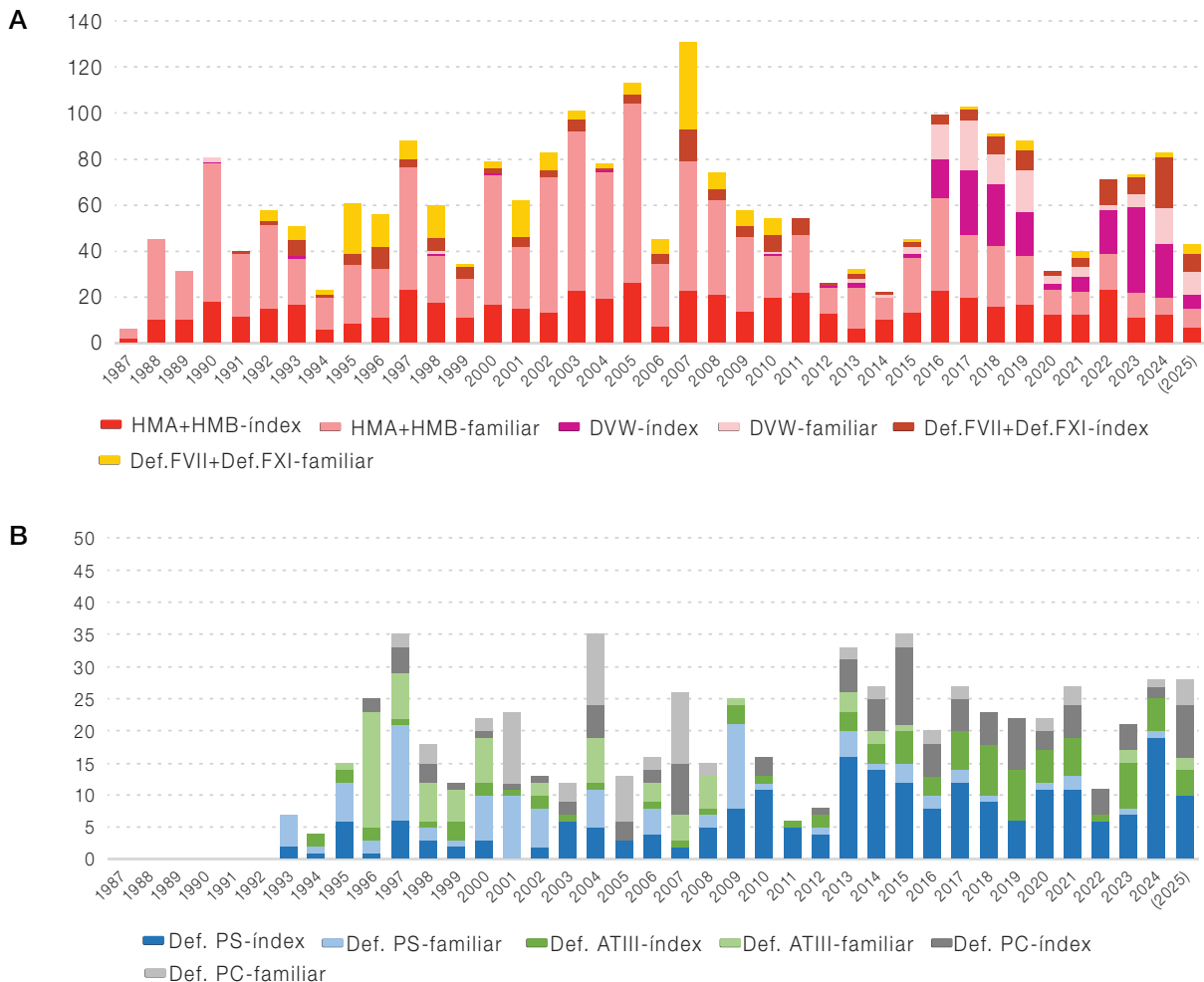
Em 1999, foi iniciada a pesquisa de FVLeiden em famílias com história de patologia trombótica sem causa aparente, tendo-se confirmado esta variante como fator genético predisponente a trombose na nossa população, tal como a variante Protrombina G20210A (16). Atualmente, são também pesquisadas as variantes MTHFR 677T e 1298A (NM_005957.5:c.677C>T, p.(Ala222Val); NM_005957.5:c.1298A>C, p.(Glu433Ala)) e a variante SERPINE1 5G/4G (NM_000602.5:c.-675_676insG (5G) / c.-675delG (4G)). Dada a elevada frequência das patologias trombóticas na nossa população e o facto destas variantes estarem também descritas em associação a outras condições clínicas, foram analisadas até agora cerca de 10.000 amostras neste âmbito.

Gráfico 1: Representação das variantes genéticas consideradas patogénicas identificadas em famílias portuguesas com patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias.



Indicam-se: número de famílias aparentemente não relacionadas, tipo e número de variantes únicas; percentagem das famílias com um tipo de variante. indel – inserção/deleção até 50 nucleótidos; grande del./ grande dup. – deleção/duplicação >50 nucleótidos, podendo envolver um a vários exões, ou a totalidade do gene; regulação – variante em região reguladora; INV1 e INV22 – inversões envolvendo o intrão 1 e o intrão 22 da F8, respetivamente; conversão génica – variante resultante de conversão génica do VWF com o seu pseudogene; polimorfismo Heerlen – variante NM_000313.4(PROS):c.1501T>C, p.(Ser501Pro).

Gráfico 2: Número de testes genéticos solicitados ao DGH-INSA para estudo de casos índice e de familiares para as principais (A) Patologias hemorrágicas hereditárias; (B) Trombofilias hereditárias.



Os dados de 2025 são uma estimativa, com base nas amostras recebidas de janeiro a junho. Para facilitar a análise da figura, agruparam-se os dados das patologias Hemofilia A e Hemofilia B (HMA + HMB), Deficiência de Fator VII e Deficiência de Fator XI (Def. FVII + Def. FXI); Def. PS – Deficiência de Proteína S; Def. ATIII – Deficiência de Antitrombina III. Def. PC – Deficiência de Proteína C.

O registo das variantes identificadas em bases de dados internacionais contribuiu para a partilha global de conhecimento, permitindo uma melhor caracterização destas patologias. O DGH tem também acompanhado a harmonização internacional da nomenclatura (20) e a classificação de variantes, nomeadamente através de aplicação dos critérios ACMG/AMP (*American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*) (21), e participa em programas internacionais de avaliação externa de qualidade relativamente a estes grupos de patologias, os quais têm comprovado a fiabilidade e qualidade dos resultados obtidos.

Globalmente, foram analisadas um total de cerca de 13.000 amostras, incluindo cerca de 1.000 doentes com patologias hemorrágicas e trombofilias hereditárias e mais de 1.600 familiares, tendo sido realizados 75 DPNs, demonstrando o impacto relevante destes estudos no diagnóstico e prevenção destas doenças. Os resultados obtidos têm contribuído significativamente para aprofundar o conhecimento da base molecular e especificidades das patologias estudadas, não apenas através da identificação das variantes genéticas causais, mas também com o esclarecimento dos mecanismos patogénicos subjacentes (10,17-19).

O desenvolvimento de um painel NGS customizado permitiu o estudo simultâneo de vários genes, simplificando a análise molecular, reduzindo custos e tempos de resposta. Com esta metodologia, passou a realizar-se o estudo de todos os exões e regiões intrónicas adjacentes do *VWF*, tendo também iniciado o estudo completo do *F5* em famílias com deficiência de Fator V. O DGH encontra-se na fase final de validação da metodologia de sequenciação de Exoma, o que permitirá o alargamento da investigação e do diagnóstico molecular a todos os genes relevantes na área da trombose e hemostase.

_Conclusões

No balanço dos 50 anos de atividade do DGH do INSA, a análise retrospectiva realizada no presente estudo ilustra o papel pioneiro deste laboratório na caracterização molecular das patologias hemorrágicas e trombóticas hereditárias em Portugal. Com o constante acompanhamento dos avanços científicos e metodológicos, o DGH tem contribuído de forma significativa para o esclarecimento da etiologia e patogénese molecular destas patologias, possibilitando o acompanhamento clínico e aconselhamento genético mais adequados, fundamentais na prevenção e na personalização dos cuidados de saúde, com reflexo na saúde pública, continuando uma referência nacional nesta área.

Agradecimentos:

Os autores agradecem ao Doutor João Lavinha, que deu início ao Laboratório de Biologia Molecular do atual DGH; aos doentes e seus familiares; a todos os colaboradores que no âmbito das suas funções contribuíram para os resultados; aos clínicos que conosco colaboraram ao longo dos anos; e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia e ao INSA, pelo financiamento de alguns projetos de investigação.

Referências bibliográficas:

- (1) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989 Nov;5(4):874-9. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90129-8)
- (2) Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92(4):1458-9. Erratum in: *Blood* 1999; 93(6):2141. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.4.1458>
- (3) Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):168-74. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.168>
- (4) Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984 Nov 22-28;312(5992):326-30. <https://doi.org/10.1038/312326a0>
- (5) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry*. 1985 Jul 2;24(14):3736-50. <https://doi.org/10.1021/bi00335a049>
- (6) David D, Mergulhão C, Capucho I, et al. DNA polymorphisms associated with the factor VIII:C gene in the Portuguese population. *Gene Geogr*. 1992 Apr-Aug;6(1-2):79-84.
- (7) David D, Moreira I, Lalloz MR, Rosa HA, et al. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Apr;5(2):257-64. <https://doi.org/10.1097/00001721-199404000-00016>
- (8) David D, Rosa HA, Pemberton S, et al. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the molecular pathology of hemophilia B. *Hum Mutat*. 1993;2(5):355-61. <https://doi.org/10.1002/humu.1380020506>
- (9) David D, Moreira I, Morais S, et al. Five novel factor IX mutations in unrelated hemophilia B patients. *Hum Mutat*. 1998;(Suppl 1):S301-3. <https://doi.org/10.1002/humu.1380110194>
- (10) David D, Tavares A, Lavinha J. Characterization of a splicing mutation in the factor VIII gene at the RNA level. *Hum Genet*. 1995 Jan;95(1):109-11. <https://doi.org/10.1007/BF00225086>
- (11) David D, Ventura C, Moreira I, et al. The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6):840-3
- (12) Ventura C, Santos AI, Tavares A, et al. Molecular genetic analysis of factor XI deficiency: identification of five novel gene alterations and the origin of type II mutation in Portuguese families. *Thromb Haemost*. 2000 Nov;84(5):833-40. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1614125>
- (13) Bustorff TC, Freire I, Gago T, Crespo F, et al. Identification of three novel mutations in hereditary protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 1997 Jan;77(1):21-5. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1655730>
- (14) David D, Ribeiro S, Ferrão L, Gago T, et al. Molecular basis of inherited antithrombin deficiency in Portuguese families: identification of genetic alterations and screening for additional thrombotic risk factors. *Am J Hematol*. 2004 Jun;76(2):163-71. <https://doi.org/10.1002/ajh.20067>
- (15) David D, Ferreira C, Ventura C, et al. Genetic defects in Portuguese families with inherited protein C deficiency. *Thromb Res*. 2011 Sep;128(3):299-302. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.05.001>
- (16) Araújo F, Santos A, Araújo V, et al. Genetic risk factors in acute coronary disease. *Haemostasis*. 1999;29(4):212-8. <https://doi.org/10.1159/000022504>
- (17) David D, Santos IM, Johnson K, et al. Analysis of the consequences of premature termination codons within factor VIII coding sequences. *J Thromb Haemost*. 2003 Jan;1(1):139-46. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00013.x>
- (18) David D, Saenko EL, Santos IM, et al. Stable recombinant expression and characterization of the two hemophilic factor VIII variants C329S (CRM(-)) and G1948D (CRM(r)). *Br J Haematol*. 2001 Jun;113(3):604-15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02399.x>
- (19) David D, Morais S, Ventura C, et al. Female hemophilic homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia*. 2003 Jan;9(1):125-30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00704.x>
- (20) den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. ; on behalf of the Human Genome Variation Society (HGVS), the Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organisation (HUGO). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016 Jun;37(6):564-9. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- (21) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Diagnóstico e investigação bioquímica e molecular das citopatias mitocondriais em Portugal: três décadas de história (1993-2024)

Biochemical and molecular diagnosis and research of mitochondrial cytopathies in Portugal: three decades of history (1993-2024)

Célia Nogueira^{1,2}, Cristina Pereira², 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, Portugal

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

_Resumo

As citopatias mitocondriais (CM) são causadas por disfunções ao nível do sistema da fosforilação oxidativa originando, conseqüentemente, uma deficiente produção de energia. No seu conjunto representam um grupo de doenças genética e fenotipicamente heterogêneas com uma incidência estimada de 1:5000 nados-vivos. Estas doenças raras podem surgir em qualquer idade, sendo mais frequentes em crianças, e podem ser causadas por defeitos genéticos no genoma mitocondrial, no genoma nuclear ou na interação entre os dois genomas. As vias metabólicas envolvidas na comunicação mito-nuclear são complexas e, segundo a literatura, o proteoma mitocondrial possui cerca de 1500 proteínas com um número de genes candidatos equivalentes.

O estudo destas patologias em Portugal foi implementado em 1993 pela Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética (URN), e, até à data, foram investigados mais de 4000 doentes. O objetivo deste trabalho foi esclarecer a etiologia molecular destes doentes suspeitos de CM. A investigação das CM tem sido um grande desafio, uma vez que é necessária uma abordagem multidisciplinar ao nível clínico, histológico, bioquímico e genético para se atingir um diagnóstico definitivo destes doentes.

Na última década, o desenvolvimento da tecnologia de sequenciação de nova geração revolucionou o diagnóstico molecular das doenças genéticas raras, de difícil diagnóstico, tais como as CM e proporcionou a caracterização molecular de mais de 30% dos doentes estudados. A atualização da abordagem molecular ao longo dos anos tem vindo a reforçar a URN como laboratório nacional de referência para o diagnóstico das CM.

_Abstract

Mitochondrial cytopathies (MC) most often refer to the dysfunction of the mitochondrial oxidative phosphorylation system leading to deficiency in the ATP production. They represent a group of genetically and phenotypically heterogeneous disorders with an estimated incidence of 1:5000 live births. These rare diseases can occur at any age, being more frequent in children, and can be caused by genetic defects in the mitochondrial genome, in the nuclear genome or in the interplay between the two genomes. The pathways involved in the nucleus-mitochondria communication are complex and over 1500 proteins are listed in the mitochondrial proteome with a corresponding number of candidate genes.

Since 1993 the Newborn Screening, Metabolism & Genetics Unit (URN) has been involved in the study of MC, and to date more than 4,000 patients have been investigated. The aim of this work was to clarify the molecular etiology of these patients, suspected of MC. The research

of these pathologies is a great challenge because a multidisciplinary approach at the clinical, histological, biochemical, and genetic levels is required to achieve a definitive diagnosis of these patients.

In the last decade, the development of next-generation sequencing technology has revolutionized the molecular diagnosis of rare, difficult-to-diagnose genetic diseases, such as MC, and has enabled the molecular characterization of over 30% of the studied patients. URN has been recognized as a reference laboratory for the study of these pathologies in Portugal.

_Introdução

As citopatias mitocondriais (CM) integram um grupo de doenças genéticas raras de expressão clínica e genética heterogênea que afetam, maioritariamente, órgãos e tecidos com alta dependência energética, podendo os sintomas clínicos surgir quer na infância quer na idade adulta (1).

A prevalência estimada destas patologias situa-se entre 1 em 4000 a 1 em 5000 indivíduos, tornando-as uma das doenças metabólicas hereditárias mais comuns (2,3). Apesar disso, continuam a ser uma causa relevante de morbilidade e mortalidade crónica, não existindo ainda terapias eficazes para a maioria dos casos.

As funções mitocondriais são reguladas pelo duplo envolvimento do genoma mitocondrial (mtDNA) e do genoma nuclear (nDNA), estando associadas, respetivamente, a hereditariedade materna e mendeliana (4).

Sob o ponto de vista médico, a suspeita de CM é muitas vezes efetuada com base em apresentações clínicas peculiares, no entanto o diagnóstico destas patologias é muitas vezes complexo e difícil, exigindo uma ampla avaliação clínica e laboratorial (5).

Aproximadamente 15-30% das mutações causais destas doenças encontram-se descritas no DNA mitocondrial (6,7), mas a maioria dos casos são causados por mutações no "mitoma", o grupo de mais de 1500 genes nucleares que codificam proteínas necessárias para a i) função e manutenção mitocondrial (replicação e expressão do mtDNA), ii) forma e dinâmica mitocondrial (fissão e fusão), iii) biossíntese da Coenzima Q10 e iv) rede complexa que controla a formação e atividade da cadeia respiratória mitocondrial (8,9). Em princípio, todos esses genes devem ser considerados candidatos potenciais para CM, embora, até ao momento, tenham sido descritas mutações causais em aproximadamente 400 destes genes.

A Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética (URN) foi pioneira na investigação das CM em Portugal e tem-se dedicado, nos últimos 30 anos, ao estudo bioquímico e molecular de mais de 4000 doentes clinicamente suspeitos destas patologias, com o objetivo de esclarecer a sua respetiva etiologia molecular.

O diagnóstico das CM teve início em 1993 na URN, no Porto (figura 1) e baseava-se essencialmente na determinação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) em biópsia muscular. Em 1995, os primeiros estudos moleculares realizados permitiram diagnosticar alguns destes doentes. No entanto, a maioria continuou sem a identificação da mutação causal.

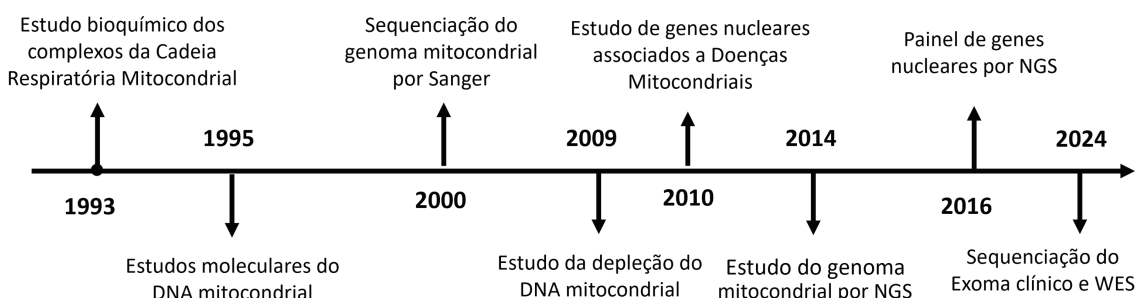
O diagnóstico definitivo das CM é efetuado com recurso a estudos moleculares, sendo um grande desafio por se tratar de um grupo heterogéneo de patologias com um curso de doença rapidamente progressivo e devastador na infância ou na primeira infância, onde as opções terapêuticas são escassas.

A sequenciação de nova geração (NGS) revolucionou o diagnóstico molecular destas doenças, uma vez que tem capacidade de gerar uma enorme quantidade de dados num curto espaço de tempo a um custo acessível, tornando esta abordagem ideal para uma vasta gama de aplicações, tais como: a sequenciação de um conjunto de genes previamente selecionados (painéis de NGS) ou a sequenciação do exoma humano completo (WES) ou do genoma humano completo (WGS) (10,11).

A introdução da tecnologia de NGS na URN possibilitou a sequenciação do mtDNA completo, assim como a implementação de um painel personalizado de genes nucleares associados a CM que, após a validação, foi utilizado num grupo de doentes com etiologia molecular desconhecida. Nos últimos anos iniciamos também a sequenciação do exoma clínico e WES em alguns doentes que continuavam sem diagnóstico molecular.

A abordagem multidisciplinar bem como a adoção das novas tecnologias tem-nos permitido efetuar o diagnóstico das CM de forma cada vez mais eficaz ao longo dos anos tornando a URN uma referência a nível nacional.

Figura 1: Cronograma da implementação do diagnóstico das citopatias mitocondriais no INSA (1993-2024).



NGS – Next Generation Sequencing; WES – Whole Exome Sequencing

_Objetivo

Este trabalho apresenta os resultados, de 1993 a 2004, da investigação de cerca de 4000 doentes suspeitos de doenças mitocondriais selecionados por clínicos especializados nas áreas de Neurologia, Pediatria, Neuropediatria, entre outras, com o objetivo de esclarecer a sua respetiva etiologia molecular.

Doentes e métodos

Ao longo destes 30 anos foram estudados mais de 4000 doentes com suspeita clínica e histológica de CM, em que cerca de 2500 realizaram biópsias musculares e os restantes realizaram colheita de sangue em EDTA.

O estudo bioquímico envolveu a determinação das atividades enzimáticas dos complexos I-IV e do complexo II+III da CRM, em homogeneizados de biópsia muscular, por espectrofotometria.

As mutações mais frequentes do mtDNA foram inicialmente pesquisadas pelas metodologias tradicionais de PCR/RFLP e sequenciação de Sanger. As grandes deleções do mtDNA foram investigadas por Southern-Blot e, posteriormente, por Long-Range PCR e NGS. Estes rearranjos foram pesquisados em DNA extraído a partir de biópsia muscular, à exceção dos casos com suspeita de Síndrome de Pearson e em alguns casos de síndrome de Kearns-Sayre, caracterizados por um número elevado de deleções no sangue. Inicialmente os estudos genéticos de genes nucleares associados a CM foram efetuados pelos procedimentos *standard* de Sequenciação de Sanger.

O NGS foi implementado na URN em 2014 para a sequenciação do mtDNA completo e um painel de genes nucleares associado a CM, tendo sido efetuado no sequenciador *MiSeq* (Illumina). Para capturar os genes nucleares, foi utilizado um painel personalizado com 213 genes associados a CM, de acordo com a metodologia SureSelect XT HS (Agilent Technologies). Para o mtDNA completo, utilizou-se a metodologia *Nextera XT* (Illumina). Para a análise procedeu-se como descrito anteriormente (12).

_Resultados

Desde 1993 este estudo envolveu cerca de 4000 doentes provenientes de sete hospitais nacionais, localizados no norte, centro e sul de Portugal. A idade de início da doença foi muito variável, dos 4 dias aos 78 anos de vida. Os sintomas neurológicos foram os mais frequentes, seguidos dos musculares, oftalmológicos, cardíacos e auditivos. O grupo pediátrico foi o mais representado apesar deste estudo inicialmente ter envolvido um grupo de adultos previamente selecionados com base em alterações histológicas na biópsia muscular.

Nos ~2500 doentes que realizaram biópsia muscular foram identificados 511 com alterações histológicas características ou com défices isolados ou combinados da CRM, 87 doentes com deleções simples do mtDNA, 111 com deleções múltiplas do mtDNA, 25 com depleção do mtDNA e 62 com mutações descritas no mtDNA.

Mais recentemente, dos ~1500 doentes estudados por NGS e/ou sequenciação de Sanger a partir do DNA de células sanguíneas, 66 apresentaram as mutações descritas no mtDNA e 117 mutações em genes nucleares associados às CM.

Este estudo permitiu identificar em biópsia muscular uma causa molecular em 10,4% dos doentes estudados (169/2500), todos com variantes no genoma mitocondrial, sendo a maioria adultos com grandes deleções. Nos 1500 doentes em que o estudo foi efetuado numa amostra de sangue a percentagem de casos positivos foi de 12,2%. De realçar que a maioria destes diagnósticos moleculares resultaram da abordagem por NGS em 450/1500 doentes, criteriosamente selecionados, e eram crianças em que se identificaram essencialmente mutações nos genes nucleares. Se considerarmos apenas os 450 doentes, como grupo de estudo, a percentagem de casos positivos é de 30% conforme publicado no estudo anterior (13). Neste grupo de 450 doentes identificamos 72 variantes patogénicas descritas na literatura, 20 novas variantes provavelmente patogénicas e 62 variantes de significado indeterminado (VUS), segundo os critérios do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (14), algumas já previamente descritas pela Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (URN-INSA) (12,13,15).

Discussão

O diagnóstico das CM evoluiu de métodos tradicionais como o PCR/RFLP e Sanger, para a NGS, o que permite analisar rapidamente quer o mtDNA completo e quer o painel de genes nucleares associados a CM. Atualmente o sangue é considerado a amostra de primeira linha em vez da biópsia muscular, sendo esta utilizada apenas para confirmar grandes deleções/depleção do mtDNA, avaliar a patogenicidade de VUS e determinar a percentagem de heteroplasmia.

Na URN a adoção da NGS permitiu efetuar um número crescente de diagnósticos tendo possibilitado, no caso do mtDNA, alargar o estudo para além das mutações pontuais mais comuns, e, relativamente aos genes nucleares foi fundamental uma vez que se passou da investigação de “gene a gene” para centenas de genes nucleares simultaneamente.

Os resultados apresentados permitiram demonstrar que na população adulta as grandes deleções no mtDNA constituem a alteração molecular mais comum e que para a identificação destes rearranjos é necessário dispor de uma biópsia muscular. Na população pediátrica as mutações no nDNA são as mais frequentes e uma abordagem por NGS numa amostra de sangue, através de um painel de genes associados a CM, permite uma investigação mais célere e com uma taxa de positividade 15-25% superior. A sequenciação da molécula de mtDNA completa por NGS é igualmente uma vantagem uma vez que tem permitido alargar o espectro de mutações neste genoma bem como a diversidade de fenótipos a que estão associadas.

Conclusões

Os resultados de três décadas de estudo e investigação das doenças mitocondriais (1993-2024), na URN do INSA-Porto, demonstram o contributo da tecnologia de NGS para esclarecer a etiologia molecular de doentes suspeitos destas patologias, alargar o espectro mutacional e oferecer em alguns casos um diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético aos casais em risco.

Apesar deste avanço tecnológico, muitos doentes permaneceram sem caracterização molecular, pelo que a aplicação de WES ou WGS será, no futuro, fundamental para permitir uma maior eficácia no diagnóstico das CM.

Financiamento:

Fundação da Ciência e Tecnologia (PTDC/DTP-PIC/2220/2014, Genetic Defects of Mitochondrial Diseases: a Next Generation Sequencing Approach); Ao Programa Norte 2020 (NORTE-01-0246--FEDER-000014, DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”).

Agradecimentos:

À Lisbeth Silva, Mateus Laranjeira, Altina Lopes e Raquel Neiva pelo apoio técnico na preparação e análise de dados de NGS e Sequenciação de Sanger. À UTI do DGH_INSA pela colaboração na confirmação das variantes identificadas, pelo método de Sanger. À Marisa Encarnação pelo apoio técnico no sequenciador MiSeq.

Referências bibliográficas:

- (1) Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol.* 2017 Jan;241(2):236-50. Epub 2016 Nov 2. <https://doi.org/10.1002/path.4809>
- (2) Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Oct 20;2:16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- (3) Grigalionienė K, Burnytė B, Ambrozaitytė L, et al. Wide diagnostic and genotypic spectrum in patients with suspected mitochondrial disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2023 Oct 2;18(1):307. doi: <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02921-0>
- (4) Martins MC, Olim G, Melo J, et al. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet.* 1993 Mar;30(3):235-9. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.3.235>
- (5) Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis ; Haas RH, Parikh S, Falk MJ, et al. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab.* 2008 May;94(1):16-37. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.018>
- (6) Ohtake A, Murayama K, Mori M, et al. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Apr;1840(4):1355-9. Epub 2014 Jan 24. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.025>
- (7) Tucker EJ, Compton AG, Thorburn DR. Recent advances in the genetics of mitochondrial encephalopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010 Jul;10(4):277-85. <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0112-8>
- (8) Herrmann JM, Longen S, Weckbecker D, et al. Biogenesis of mitochondrial proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:41-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_3
- (9) Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D1251-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003>

artigos breves_ n. 9

- (10) Carroll CJ, Brilhante V, Suomalainen A. Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *Br J Pharmacol.* 2014 Apr;171(8):1837-53. <https://doi.org/10.1111/bph.12469>
- (11) Wong L.J. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion.* 2013 Jul;13(4):379-87. Epub 2013 Mar 6. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.02.001>
- (12) Nogueira C, Pereira C, Silva Lisbeth, et al. Avanços no diagnóstico das doenças mitocondriais através da sequenciação de nova geração. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2018;7(21):5-8. <http://hdl.handle.net/10400.18/5546>
- (13) Nogueira C, Silva L, Pereira C, 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;47:309-17. <http://hdl.handle.net/10400.18/6560>
- (14) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. Epub 2015 Mar 5. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- (15) Nogueira C, Pereira C, Silva L, et al. Doenças mitocondriais na era da sequenciação de nova geração: estudo de 450 doentes. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2024;35:52-9. <http://hdl.handle.net/10400.18/9184>

Doenças lisossomais de sobrecarga em Portugal: aspetos bioquímicos, genéticos e epidemiológicos

Lysosomal storage diseases in Portugal: biochemical, genetic, and epidemiological aspects

Paulo Gaspar, Raquel Neiva, Lisbeth Silva, Laura Vilarinho

paulo.gaspar@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

As doenças de sobrecarga lisossomal (DLSs) são um grupo de doenças metabólicas hereditárias caracterizado pela acumulação de substratos no interior do lisossoma. Em Portugal, a prevalência descrita das DLS é de 25 por 100 000 nados vivos, notavelmente elevada, quando comparada com outros países. Este trabalho tem por objetivo fornecer uma visão global dos aspetos bioquímicos, genéticos e epidemiológicos das DLSs em Portugal, destacando novas metodologias e os potenciais avanços neste domínio.

A prevalência elevada de certas patologias, assim como a existência de mutações frequentes, sugerem a necessidade de protocolos de alerta, de novos métodos de diagnóstico e monitorização eficazes, tais como o uso de novos biomarcadores. As direções futuras da investigação incluem uma pesquisa mais aprofundada sobre a base genética das DLS em Portugal, estudos funcionais e o desenvolvimento de terapias mais eficazes e personalizadas.

_Abstract

Lysosomal Storage Disorders (LSDs) are a group of inherited metabolic diseases characterized by the accumulation of substrates within lysosomes. In Portugal, the described prevalence of LSDs is 25 per 100,000 live births, which is notably high compared to other countries.

This work aims to provide an overview of the biochemical, genetic, and epidemiological aspects of LSDs in Portugal, highlighting new methodologies and potential advances in this field.

The elevated prevalence of certain diseases, along with the existence of frequent mutations, suggests a need for awareness protocols and new, effective diagnostic and monitoring methods, such as the use of novel biomarkers. Future research directions include a deeper investigation into the genetic basis of LSDs in Portugal, functional studies, and the development of more effective and personalized therapies.

_Introdução

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs) são um grupo de cerca de 50 doenças, caracterizadas por deficiências de enzimas lisossomais, transportadores de membrana ou outras proteínas, levando a uma acumulação de substratos específicos dentro dos lisossomas (1). A acumulação progres-

siva destes compostos resulta numa disfunção generalizada das células e dos tecidos, provocando uma ampla gama de manifestações clínicas, incluindo organomegalias, neurodegeneração, alterações esqueléticas e mortalidade precoce (2). As DLSs representam um desafio significativo para a saúde pública, devido às manifestações clínicas variadas resultantes da heterogeneidade genética e às diferentes formas de evolução (3). Em 1980, surgiu em Portugal, o Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães (IGMJM) dedicado ao estudo das Doenças Hereditárias do Metabolismo, onde estava integrada a única unidade dedicada ao estudo e diagnóstico das DLSs, em Portugal. Assim, o estudo singular da prevalência de DLS em Portugal, remonta a 2004, tendo sido relatada uma prevalência de 25 por 100 000 nados-vivos no norte de Portugal, entre 1982 e 2001 (4). Em 2005, surgiu a Unidade do Lisossoma e do Peroxissoma (UniLipe) dedicada, essencialmente, à investigação das DLSs. Posteriormente, a Unidade de I&D e a Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética (URN), ambas fazendo parte do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (DGH-INSA), tornaram-se um dos principais centros de referência no estudo e investigação deste grupo de patologias. Consequentemente, as bases genéticas das DLSs e a frequência das respetivas mutações observadas na população portuguesa têm sido extensivamente estudadas, melhorando a compreensão das manifestações clínicas, assim como da história natural destas patologias (5-7). Apesar destes avanços, persistem desafios significativos no diagnóstico atempado e tratamento das DLSs, exigindo uma investigação contínua e o desenvolvimento de abordagens inovadoras.

_Objetivo

Este trabalho tem por objetivo fornecer uma visão global dos aspetos bioquímicos, genéticos e epidemiológicos das doenças lisossomais de sobrecarga em Portugal, destacando novas metodologias e os potenciais avanços neste domínio.

_Abordagem bioquímica

A implementação de novos ensaios para determinação de atividade enzimática, utilizando amostras de sangue seco (DBS), simplificou a colheita, o transporte, a análise e o armazenamento das amostras. Esta metodologia simples e rentável, permitiu o estudo de populações de risco, análise de grupos de patologias em simultâneo, exigindo apenas um pequeno volume de amostra de sangue (8). Assim, em muitos casos, tornou-se possível o estabelecimento de um diagnóstico num curto espaço de tempo. A utilização de biomarcadores ganhou importância fulcral no diagnóstico e monitorização de DLSs com tratamento específico. Os

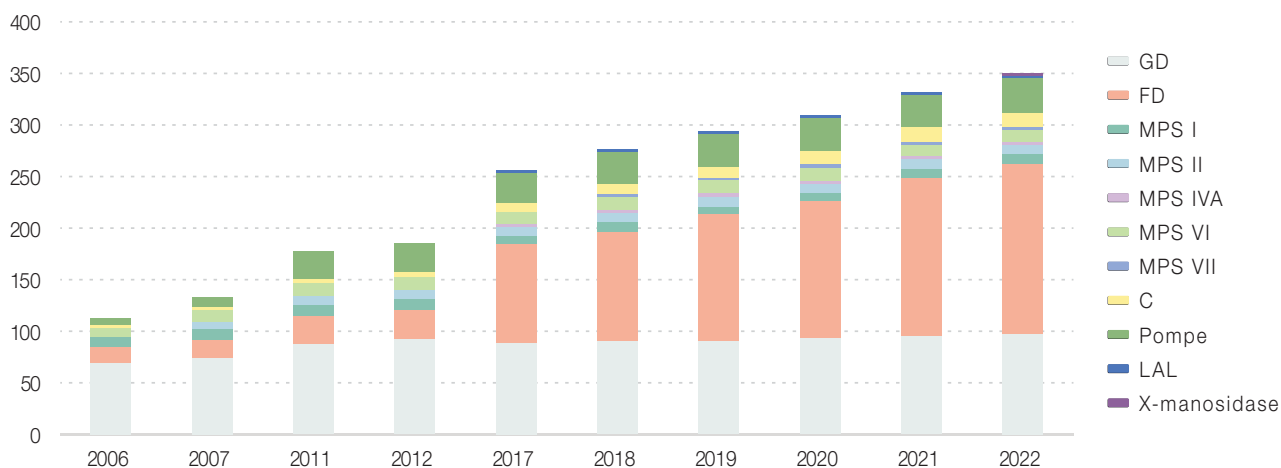
biomarcadores, tais como LisoGb3 (globotriaosilesfingosina), LisoGl1 (glucosilesfingosina), LisoSM (liso-esfingomiéline), e LisoSM-509 (liso-esfingomiéline-509), foram implementados na URN, de modo a permitir um diagnóstico atempado, possibilitar uma monitorização da eficácia do tratamento e compreender a progressão da doença (tabela 1) (9). O facto de se poder analisar estes compostos em simultâneo, permite o estudo de doenças com sobreposição fenotípica e a realização de diagnósticos diferenciais (9).

A deteção de excreção anómala de oligossacarídeos assim como a análise de fragmentos específicos de glicosaminoglicanos, em amostras de urina, são importantes metodologias para o diagnóstico bioquímico de, respetivamente, oligossacaridoses e mucopolissacaridoses. Assim, ao longo dos anos tem-se assistido a um crescente número de diagnósticos de doentes com patologia lisossomal e, conseqüentemente, do número de doentes em tratamento, permitindo assim diminuir/retardar os efeitos mais graves da doença (gráfico 1).

Tabela 1: Biomarcadores para as diferentes Doenças Lisossomais de Sobrecarga.

Doença	Gaucher	Fabry	Niemann-Pick A\B	Niemann-Pick C	Krabbe	Leucodistrofia Metacromática	Gangliosidoses
Biomarcador	LisoGl1	LisoGb3	LisoSM	LisoSM-509	Psicosina	Liso Sulfatídeos	Liso Ganglosídeos

Gráfico 1: Número de doentes em tratamento, por ano, por patologia.



GD – Doença de Gaucher; FD – Doença de Fabry; MPS – Mucopolissacaridose; C – Niemann-Pick, tipo C; Pompe – Doença de Pompe; LAL – Deficiência em Lipase ácida; X-manosidase – Alfa-manosidose

Fonte: Relatórios de atividades da Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga (CCTDLS) 2006-2022

_Abordagem bioquímica

A população portuguesa apresenta um amplo espectro de mutações nas DLSs, no entanto, existem certas patologias que apresentam mutações mais frequentes (**tabela 2**) (4).

Para a doença de Fabry, o estudo de populações de risco, conduziu à identificação de vários doentes com a mutação p.Phe113Leu, devido ao efeito fundador (8). Estes resultados enfatizam a importância da georeferenciação, para compreensão da epidemiologia e diversidade genética destas doenças. Atualmente, com recurso à Sequenciação de Nova Geração (NGS), a identificação da base molecular responsável pelas doenças tornou-se mais acessível pois, agrupando doenças com base no fenótipo apresentado, é possível desenhar painéis com diferentes números de genes, ou realizar o estudo de exomas clínicos por NGS (10). Estas novas abordagens, permitiram a identificação da patologia de sobrecarga lisossomal, em doentes que foram rececionados no laboratório com suspeita de outra Doença Hereditária do Metabolismo. O recurso a NGS, permitiu ainda a identificação de novas variantes, em que o estabelecimento de uma correlação com o fenótipo clínico e a apresentação bioquímica, são essenciais para a compreensão destas doenças multissistémicas e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas personalizadas.

_Epidemiologia

A prevalência ao nascimento de 29 DLSs diferentes na população do norte de Portugal é de 25 por 100.000 nados-vivos, sendo o dobro da prevalência descrita nas populações holandesa (14 por 100.000 nados-vivos) e australiana (12,9 por 100.000) (4). A população portuguesa apresentava, igualmente, maior prevalência de gangliosidoses GM2, Niemann-Pick tipo C e Leucodistrofia Metacromática, Mucopolioses II/III e menor prevalência das doenças de Pompe e Fabry em comparação com as populações holandesa e australiana (4). Entre 1982 e 2001, estavam identificados cerca de 353 doentes com DLSs (4). Atualmente, devido à aplicação de métodos mais sensíveis e específicos, assim como um melhor conhecimento da população portuguesa, a doença de Fabry e a doença de Gaucher, são das doenças mais prevalentes em Portugal, a par da Gangliosidose GM2, variante B1. Para alguns destes casos, foram reconhecidos fenómenos de “efeito fundador”, com uma origem ancestral comum, cujo background genético se foi transmitindo através da descendência, criando focos locais de incidência, em particular, daquela doença (8). No caso da doença de Fabry, por exemplo, foi até possível identificar o primeiro casal portador da doença: as origens da patologia remontam a 1650, a uma freguesia de Guimarães com 1500 habitantes. Só em Guimarães existem mais de 300 casos identificados (8).

Tabela 2: ⚡ Biomarcadores para as diferentes Doenças Lisossomais de Sobrecarga.

Doença (Gene)	Mutações frequentes na população portuguesa
Gangliosidose GM2 – variante B1 (HEXA)	p.Arg178His – muito frequente em casos juvenis
Doença de Gaucher (GBA)	p.Asn370Ser – alelo mais frequente (60% dos alelos identificados) p.Leu444Pro, p.Gly377Ser, p.Asn396Tht, 1066+1G>A outras mutações frequentes na população portuguesa
Leucodistrofia Metacromática (MLD; ARSA)	IVS2+1 G→A alelo mais frequente p.Cys300Phe, p.Pro425Thr, 1190_1191insC, g.2408delC outras mutações frequentes na população portuguesa
Niemann-Pick disease type C (NPC1 / NPC2)	p.Ala1035Val no NPC1
Doença de Fabry (GLA)	p.Phe113Leu

Abordagem terapêutica

As intervenções terapêuticas para as DLSs avançaram significativamente nos últimos 25 anos. Foram desenvolvidas várias abordagens, incluindo a terapia de substituição enzimática (ERT), a terapia de redução de substrato, o transplante de células estaminais hematopoiéticas, a terapia com chaperones farmacológicos e a terapia génica (11-13). A ERT tornou-se a terapia de eleição para várias DLSs, embora exija administrações múltiplas e dispendiosas e tenha eficácia limitada para algumas manifestações, nomeadamente as neurológicas, uma vez que as enzimas administradas, não atravessam a barreira hemato encefálica (12).

Nos últimos anos, têm-se registado um aumento no número de doentes em tratamento, devido à disponibilização de novas terapias, assim como a um melhor conhecimento da história natural destas doenças. Recentemente, tem-se assistido a avanços na terapia génica para a DLSs, com estudos pré-clínicos e clínicos a demonstrarem eficácia. Esta abordagem é de particular interesse na correção dos sintomas neurológicos, que não era conseguido com as demais terapias (12). No entanto, apesar destes avanços, muitas DLSs permanecem intratáveis ou inadequadamente tratadas, destacando a necessidade de uma investigação contínua e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Figura 1: Folhetos informativos do projeto LINCE (A) e do projeto FIND (B).



www.spdm.org.pt/recursos/recursos-para-profissionais/projeto-lince-diagnóstico-rápido/



www.projetofind.pt

Investigação e as DLSs

A translação da investigação para a área de prestação de serviços tem sido gradual, havendo uma sediação histórica destas competências na região Norte, IGMJM, UniLiPE e atualmente na URN (DGH-INSA) estendendo a sua ação de forma a abranger todo o país. As implicações dos nossos estudos estendem-se a informar as decisões das políticas de saúde, melhorar a precisão do diagnóstico e orientar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Os programas de sensibilização para populações pediátricas de risco, permitem uma maior consciencialização para certos grupos de patologia, disponibilizando um diagnóstico atempado, uma intervenção precoce e uma melhor compreensão da história natural de certas patologias (14). No caso do projeto LINCE, que visa o estudo de um grupo de doenças lisossomais, as Ceroides Lipofuscinoses Neuronalis, permitiu a identificação de um caso de NCL tipo I, enquanto o projeto dedicado às mucopolissacaridoses, o projeto FIND, já permitiu o estudo de 14 doentes, que beneficiaram de uma intervenção atempada (figura 1) (14). O modelo Zebrafish surgiu como um modelo vertebrado valioso para estudar as DLSs, assim como outras Doenças Hereditárias do Metabolismo, permitindo uma melhor compreensão da patogénese da doença aliados a diferentes modelos para realização de estudos funcionais e esclarecimento da patogénese das *Variants of Uncertain Significance* (VUS) (15). As terapêuticas baseadas em oligonucleótidos são uma área promissora, com um amplo leque de aplicação, nomeadamente em doenças neurológicas (16).

_Conclusões

As doenças lisossomais de sobrecarga em Portugal são caracterizadas por um perfil epidemiológico e genético distinto, com certas doenças e mutações sendo mais prevalentes devido a efeito fundador e contextos genéticos regionais.

Os avanços na investigação bioquímica, genética e clínica, juntamente com a implementação de estratégias inovadoras de diagnóstico e tratamento, continuam a melhorar a compreensão e o “gestão” desses distúrbios complexos.

A determinação de atividade enzimática residual e os perfis de biomarcadores, associados à caracterização molecular, são importantes para um diagnóstico preciso e para a compreensão da fisiopatologia das DLSS, fornecendo dados importantes à Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga (CCTDLS), sediada no INSA, nas suas decisões.

É crucial prosseguir a investigação sobre os aspetos bioquímicos e genéticos destas doenças, a fim de melhorar as estratégias de diagnóstico e as abordagens, progressivamente, mais personalizadas.

- (8) Azevedo O, Gal A, Faria R, et al. Founder effect of Fabry disease due to p.F113L mutation: Clinical profile of a late-onset phenotype. *Mol Genet Metab.* 2020 Feb;129(2):150-60. Epub 2019 Jul 24. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.07.012>
- (9) Gaspar P, Rocha H, Neiva R, et al. Biomarcadores nas doenças lisossomais de sobrecarga: o que são e o que nos dizem? *Boletim Epidemiológico Observações.* 2020 jan-abr;9(26):59-62. <http://hdl.handle.net/10400.18/7089>
- (10) Encarnação M, Coutinho MF, Silva L, et al. Assessing Lysosomal Disorders in the NGS Era: Identification of Novel Rare Variants. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 1;21(17):6355. <https://doi.org/10.3390/ijms21176355>
- (11) Ferla R, Claudiani P, Cotugno G, et al. Similar therapeutic efficacy between a single administration of gene therapy and multiple administrations of recombinant enzyme in a mouse model of lysosomal storage disease. *Hum Gene Ther.* 2014 Jul;25(7):609-18. Epub 2014 Apr 11. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.213>
- (12) Kobayashi H. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Brain Dev.* 2025 Aug 8;47(5):104399. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2025.104399>
- (13) Mohamed FE, Al-Gazali L, Al-Jasmi F, et al. Pharmaceutical Chaperones and Proteostasis Regulators in the Therapy of Lysosomal Storage Disorders: Current Perspective and Future Promises. *Front Pharmacol.* 2017 Jul 7;8:448. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.0044>
- (14) Gaspar P, Neiva R, Silva L, et al. Mucopolissacaridoses em população pediátrica: resultados de uma abordagem precoce no âmbito do projeto FIND. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2024 mai-ago;13(36):33-38. <http://hdl.handle.net/10400.18/9219>
- (15) Carvalho S, Moreira L, Santos JI, et al. Help Comes from Unexpected Places: How a Tiny Fairy and a Tropical Fish may help us Model Mucopolysaccharidoses. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2023 Nov 2. (Epub ahead of print). <https://doi.org/10.2174/0118715303277318231024055425>
- (16) Santos JI, Gonçalves M, Matos L, et al. Splicing Modulation as a Promising Therapeutic Strategy for Lysosomal Storage Disorders: The Mucopolysaccharidoses Example. *Life (Basel).* 2022 Apr 19;12(5):608. <https://doi.org/10.3390/life12050608>

Referências bibliográficas:

- (1) Neufeld EF. Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:257-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001353>
- (2) Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Jul;5(7):554-65. <https://doi.org/10.1038/nrm1423>
- (3) Cimaz R, Vijay S, Haase C, et al. Attenuated type I mucopolysaccharidosis in the differential diagnosis of juvenile idiopathic arthritis: a series of 13 patients with Scheie syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2006 Mar-Apr;24(2):196-202. <https://www.clinexprheumatol.org/article.asp?a=2821>
- (4) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004 Feb;12(2):87-92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (5) Duarte AJ, Ribeiro D, Oliveira P, et al. Mutation Frequency of Three Neurodegenerative Lysosomal Storage Diseases: From Screening to Treatment? *Arch Med Res.* 2017 Apr;48(3):263-69. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.04.001>
- (6) 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 Mar;73(3):251-6. Epub 2008 Jan 23. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00951.x>
- (7) Giraldo P, Alfonso P, Irún P, et al. Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Mar 19;7:17. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-17>

Doenças lisossomais de sobrecarga: da epidemiologia genética ao desenvolvimento de modelos de doença

Lysosomal storage disorders: from genetic epidemiology to disease model development

Luciana Moreira¹⁻³, Maria Francisca Coutinho¹⁻³, Maria Eduarda Moutinho¹⁻⁴, Matilde Barbosa Almeida^{1-3,5}, Francisca Gonçalves¹⁻⁴, Sofia Carvalho^{1-3,6}, Olga Amaral¹⁻³, Ana Joana Duarte¹⁻³, Marisa Encarnação¹⁻³, Paulo Gaspar⁷, Mariana Gonçalves^{1-3,8}, Liliana Matos¹⁻³, Diogo Ribeiro⁷, Hugo Rocha⁷, Juliana Inês Santos¹⁻³, Sandra Alves¹⁻³

sandra.alves@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação em Doenças Lisossomais de Sobrecarga. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Porto, Portugal

(2) Centro de Estudos de Ciência Animal. Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Laboratório Associado para a Ciência Animal e Veterinária, AI4Animals

(4) Departamento de Biologia. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(5) Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(6) Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

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

(8) Centro de Investigação e Tecnologia em Ciências Agroambientais e Biológicas, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

_Resumo

As doenças lisossomais de sobrecarga (DLS) são um grupo heterogéneo de cerca de 70 doenças metabólicas hereditárias raras, causadas por deficiências enzimáticas que comprometem a função do lisossoma, resultando em manifestações clínicas multissistémicas graves. Embora estejam disponíveis algumas abordagens terapêuticas, muitas DLS continuam sem opções eficazes de tratamento, e a validação funcional de variantes genéticas mantém-se um desafio na era da sequenciação de nova geração.

Neste trabalho, descrevemos a criação e caracterização de modelos experimentais inovadores para várias DLS, incluindo as Mucopolissacaridoses (MPS) I, II, IIIB, IIIC, IIID e VI e a Mucolipidose (ML) tipo II. Foram geradas linhas de células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos (SHEDs) e células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs), bem como modelos de peixe-zebra editados por CRISPR/Cas9. Estes sistemas recapitularam fenótipos típicos das doenças, como acumulação de glicosaminoglicanos e colesterol, défice enzimático e disfunção lisossomal.

Destacam-se a obtenção das primeiras linhas SHED para várias MPS, uma linha iPSC de ML II oficialmente registada (INSAi003-A) e a validação de modelos animais para MPS IIIB e ML II. Estes modelos constituem ferramentas complementares para estudar mecanismos patológicos, avaliar variantes de significado incerto e desenvolver terapias personalizadas, reforçando o papel do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge na investigação translacional de doenças raras.

_Abstract

Lysosomal storage diseases (LSDs) are a heterogeneous group of about 70 rare inherited metabolic disorders, resulting from enzymatic deficiencies that impair lysosomal function, leading to severe multisystemic clinical manifestations.

Although some therapeutic approaches exist, many LSDs still lack effective treatment options, and the functional validation of genetic variants remains a challenge in the era of next-generation sequencing. In this work, we

describe the creation and characterization of innovative experimental models for several LSDs, including Mucopolysaccharidoses (MPS) I, II, IIIB, IIIC and VI, and Mucolipidosis (ML) type II.

Stem cell lines from the dental pulp of exfoliated deciduous teeth (SHEDs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) were generated, and zebrafish models were engineered using CRISPR/Cas9. These systems recapitulated typical disease phenotypes, such as glycosaminoglycan and cholesterol accumulation, enzymatic deficiency, and lysosomal dysfunction. Highlights include the establishment of the first SHED lines for several MPSs, the first officially registered ML II iPSC line (INSAi003-A), and the validation of animal models for MPS IIIB and ML II.

These models represent complementary tools to study pathogenic mechanisms, evaluate variants of uncertain significance, and develop personalized therapies, reinforcing the National Health Institute Dr Ricardo Jorge role in translational research on rare diseases.

_Introdução

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLS) constituem um grupo de doenças metabólicas hereditárias raras, causadas por variantes patogénicas que afetam a função do lisossoma e resultam na acumulação progressiva de substratos não degradados ⁽¹⁾. Estão descritas cerca de 70 DLS, todas monogénicas, maioritariamente autossómicas recessivas, embora três apresentem modo de transmissão ligado ao X. São, em geral, causadas por variantes patogénicas em genes que codificam hidrolases ácidas, proteínas de membrana do lisossoma, ou transportadores, levando à acumulação de

substratos não degradados no interior do lisossoma e comprometendo processos essenciais como a regulação do seu pH, a autofagia, a endocitose e a homeostasia do cálcio, entre outros (2,3).

A apresentação clínica destas doenças é altamente variável, podendo ir de formas neonatais graves a manifestações tardias ou assintomáticas. Em geral, são doenças multissistémicas, com envolvimento neurológico nas formas mais severas, levando a neurodegeneração, défice cognitivo, epilepsia e morte precoce. Outros sinais frequentes incluem hepatoesplenomegalia, alterações esqueléticas e cardiopatias (4). Apesar de individualmente raras (1:50.000–1:250.000), a sua prevalência conjunta varia entre 1:5.000–1:5.500 nados-vivos, sendo mais elevada em Portugal (cerca de 1:4.000), com incidências ainda superiores em algumas populações devido a efeitos fundadores (1,5-7). Dada a heterogeneidade clínica destas doenças e sobreposição de sintomas com outras patologias, o diagnóstico continua a ser um desafio. Isto é particularmente relevante uma vez que a ausência de diagnóstico atempado pode comprometer a eficácia das intervenções terapêuticas atualmente disponíveis. Embora ainda não exista cura, têm sido desenvolvidas várias abordagens terapêuticas, incluindo terapia de substituição enzimática (ERT), terapia de redução de substrato, chaperones farmacológicos e transplante de células hematopoiéticas (1,8). Estão também em desenvolvimento estratégias terapêuticas de base genética como terapia génica, terapias de RNA e edição genética (1,8,9). Atualmente, estão disponíveis em Portugal múltiplas terapias aprovadas para diferentes DLS, nomeadamente para a Doença de Fabry, Doença de Gaucher, Deficiência de Lipase Ácida Lisossomal, MPS I, II, IVA, VI e VII, Niemann-Pick tipo C e Doença de Pompe. Para a Alfa-Manosidose e para a Deficiência da Esfingomielinase Ácida também estão disponíveis no nosso país duas abordagens de ERT na modalidade de autorização de utilização especial. No entanto, a maioria das DLS continua sem tratamento eficaz, e as opções existentes não garantem resposta clínica sustentada.

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem um papel central no diagnóstico bioquímico e molecular destas doenças, incluindo testes enzimáticos, doseamento de biomarcadores e diagnóstico molecular por sequenciação de Sanger e de nova geração (NGS), e tem contribuído, ao longo dos anos, com diversos estudos de caracterização de doentes portugueses (10-16). O INSA coordena ainda a Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga (CCTDLS), responsável pela avaliação e acompanhamento dos doentes com DLS em tratamento no nosso país. Segundo os dados publicados no relatório da CCTDLS de 2022, cerca de 350 doentes encontravam-se em tratamento em Portugal (17).

No domínio da investigação, o INSA, através do seu Departamento de Genética Humana (DGH), tem liderado vários projetos centrados nas DLS. Para além da investigação translacional, tem dado particular enfoque ao desenvolvimento de novos modelos *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de melhor compreender os mecanismos patológicos e testar terapias inovadoras. Embora os fibroblastos de doentes continuem a ser amplamente utilizados como modelo celular, permitindo o estudo da acumulação lisossomal e a avaliação de terapias, a sua limitação em replicar fenótipos de tecidos complexos, como o sistema nervoso central, tem motivado o desenvolvimento de abordagens mais avançadas. Nesse sentido, têm sido estabelecidos modelos neuronais a partir de células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos exfoliados (SHED, do inglês *Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth*) e de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced Pluripotent Stem Cells*) derivadas de fibroblastos de doentes, possibilitando o estudo direto dos efeitos das variantes patogénicas em tipos celulares mais relevantes. Paralelamente, estão a ser estabelecidos modelos animais de peixe-zebra com variantes específicas, gerados por CRISPR/Cas9. Estas ferramentas permitem avaliar a patogenicidade de variantes de significado incerto (VUS, do inglês *Variants of Uncertain Significance*) detetadas por NGS, estudar os mecanismos moleculares associados a cada doença e desenvolver terapias personalizadas, como as chamadas terapias *N-of-few*, direcionadas a variantes específicas.

_Objetivo e metodologia

Os principais objetivos deste artigo foram: (i) Divulgar a geração e caracterização de modelos *in vitro* de DLS, incluindo cinco modelos de SHEDs para MPS I, II, IIIB, IIIC e VI, e três modelos de iPSCs para MPS IIIC e IIID e ML II; (ii) Apresentar o desenvolvimento de modelos *in vivo* de peixe-zebra para MPS IIIB e ML II, obtidos por edição genética via CRISPR/Cas9 *knock-out* (KO) e *knock-in* (KI); (iii) Avaliar a relevância destes modelos para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos, validação de variantes genéticas e teste de novas estratégias terapêuticas. Para isso foi avaliado o fenótipo associado à respetiva doença lisossomal nestes modelos; (iv) Enquadrar o contributo destas metodologias para o avanço da medicina de precisão em doenças raras, com potencial impacto na melhoria dos cuidados de saúde prestados aos doentes em Portugal.

Todos os estudos aqui referidos foram conduzidos em conformidade com a Declaração de Helsínquia e aprovados pela Comissão de Ética do INSA [datas de aprovação: 28 de junho de 2020; 18 de maio de 2023 e 9 de outubro de 2023], bem como pela Comissão de Ética do *Cell Line and DNA Biobank from Patients Affected by Genetic Diseases do Istituto Giannina Gaslini* (quando aplicável).

Foi obtido consentimento informado por escrito dos indivíduos que forneceram as suas amostras para o estabelecimento de linhas celulares, e seu estudo subsequente.

_Resultados e discussão

A Unidade de Investigação e Desenvolvimento do DGH do INSA tem vindo a consolidar uma linha de investigação robusta e estratégica na área das DLS, centrada não só na caracterização bioquímica e genética dos doentes, mas também no desenvolvimento de modelos funcionais inovadores, com vista à validação de variantes genéticas e à exploração de novas abordagens terapêuticas.

O presente trabalho representa um avanço significativo neste contexto, ilustrando a geração de modelos celulares e animais específicos para várias DLS, nomeadamente MPS I, II, IIIB, IIIC, IIID e VI e ML II.

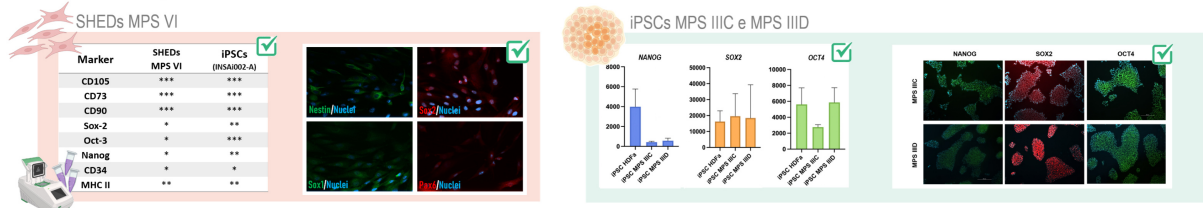
Geração de células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos exfoliados (SHEDs)

Foram estabelecidas, pela primeira vez, linhas SHEDs de vários doentes com MPS, nomeadamente: I, II, IIIB, IIIC e VI. Para isso, as SHEDs foram estabelecidas a partir de fragmentos de polpa dentária isolados de dentes de doentes com estas patologias de acordo com (18). Em geral, estas células apresentaram morfologia típica de células estaminais mesenquimais (MSCs) e viabilidade adequada. Confirmou-se a expressão de marcadores de MSCs (CD105, CD73 e CD90) e a capacidade de diferenciação nas três camadas germinativas reforçando o potencial inigualável destas células para modelar doenças neurodegenerativas. A caracterização destas células permitiu verificar a presença dos defeitos moleculares esperados bem como a ausência de atividade das enzimas em causa. Conseguimos também confirmar que apresentaram fenótipos típicos de doença lisossomal, como, por exemplo, acumulação significativa de glicosaminoglicanos (GAG), o que é indicativo de disfunção lisossomal. Poderão encontrar-se detalhes dos resultados observados para MPS II em (18), estando outros trabalhos em preparação (ver na figura 1 os resultados obtidos numa linha de MPS VI). Estes resultados são particularmente relevantes, pois demonstram que, apesar da sua elevada taxa de divisão celular e consequente nível de proliferação, estas células preservam o fenótipo de doença, o que as pode tornar adequadas para estudos iniciais de fisiopatologia e rastreio de terapias, dispensando, numa primeira fase, a diferenciação em tipos celulares específicos.

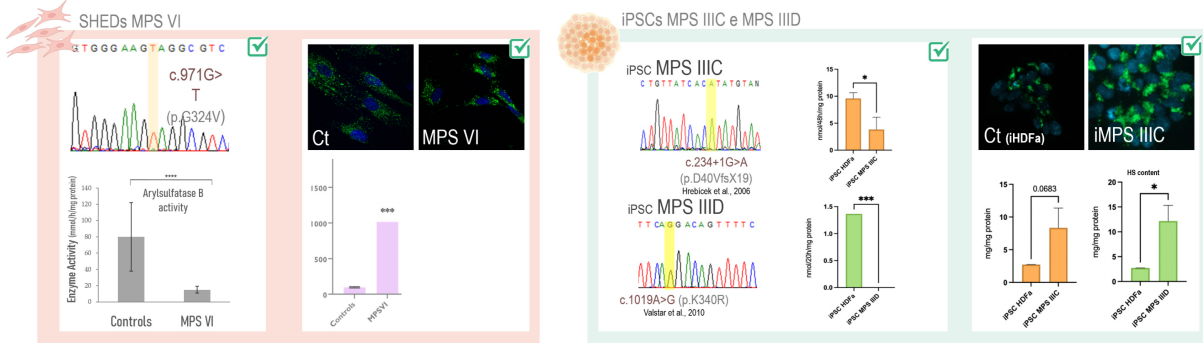
Figura 1: Representação esquemática das análises efetuadas *in vitro* para cada uma das linhas estaminais estabelecidas para MPS III e análise crítica comparativa dos métodos que nos permitiram estabelecê-las.

Análise das linhas estabelecidas

1: Confirmação da estaminalidade através de diferentes métodos



2: Confirmação da presença de marcadores de doença lisossomal de sobrecarga/MPS por diferentes métodos



Análise Crítica

Estabelecimento de culturas SHED:

- ✗ Curta janela temporal para garantir o sucesso da técnica: só funciona quando os dentes decíduos chegam ao laboratório no máximo 48h pós-queda;
- ✗ Cultura primária propensa a contaminação
- ✓ Protocolo eficiente em termos de tempo e custo
- ✓ Não requer tantos controlos de qualidade/testes de segurança quanto as iPSCs, uma vez que são 'naturally-occurring stem cells'.

Estabelecimento de culturas iPSC:

- ✗ Protocolo exigente em termos de tempo e custo
- ✗ Requer muitos/uma série de controlos de qualidade/testes de segurança, incluindo esterilidade, mycoplasma, análise da 'clearance' dos vectores usados para a reprogramação e análise de cariótipo
- ✓ Protocolo standardizado, bem validado, aceite internacionalmente por toda a comunidade científica
- ✓ Mais fácil de diferenciar em linhas celulares de interesse usando kits comerciais

A rosa estão representados os blocos relativos aos estudos em SHEDs, e a verde em iPSCs. Nesta ilustração, usámos apenas linhas MPS, por serem mais comparáveis entre si, e seleccionámos linhas cuja caracterização não foi ainda publicada a não ser no âmbito de teses. Para ilustrar os resultados obtidos em SHEDs, escolhemos apresentar imagens da linha MPS VI, enquanto que os resultados apresentados para iPSCs foram obtidos em linhas MPS IIIC e MPS IIID. 1) Confirmação da estaminalidade por vários métodos. Em ambos os casos, o fenótipo estaminal foi confirmado através da presença de marcadores standard de estaminalidade: NANOG, SOX2 e OCT3/4. A sua presença foi avaliada tanto quantitativa como qualitativamente, por RT-qPCR e imunofluorescência, respetivamente. No caso das SHEDs, avaliamos também um painel de outros marcadores de superfície, por RT-qPCR, para melhor validar o fenótipo de MSC. 2) Confirmação da presença de marcadores de doença lisossomal de sobrecarga/MPS. Para além da habitual confirmação da presença das variantes causais, e do seu defeito enzimático associado (défice em arilsulfatase B em SHEDs MPS VI, e em HGSNAT e GNS, em iPSCs MPS IIIC e IIID, respetivamente), confirmamos também, por LC-MS/MS, a presença de sulfato de heparano acumulado, e, por imunofluorescência, a alteração do padrão de distribuição da LAMP.

Geração de iPSCs

As linhas de iPSCs de ML II, MPS IIIC e IIID foram geradas a partir de fibroblastos de doentes com estas patologias, obtidos a partir de um biobanco (Instituto Giannina Gaslini).

Foi utilizada uma abordagem não integrativa seguindo o *workflow* previamente estabelecido pela equipa para a geração das primeiras iPSCs no INSA (19,20). Após adquirirem morfologia típica de células estaminais embrionárias humanas, realizaram-se várias análises visando a sua caracterização, incluindo a ausência de vetores de reprogramação, expressão endógena de fatores de transcrição e marcadores de superfície de pluripotência, bem como a capacidade de diferenciação nas três camadas germinativas. A caracterização genética validou a sua identidade por análise de *Short Tandem Repeats* (STR), estabilidade do cariótipo e presença da variante causadora da doença. Foi também excluída a contaminação por micoplasma. A nível bioquímico, para as linhas MPS IIIC e IIID confirmou-se a deficiência enzimática associada a cada uma das doenças, e avaliaram-se dois marcadores fenotípicos chave da MPS III, a acumulação de sulfato de heparano e o padrão de distribuição da LAMP, ambos alterados em comparação com os controlos, em concordância com o observado nas linhas parentais de fibroblastos (ver na [figura 1](#), MPS IIIC e IIID). Relativamente à ML II, foi gerada, pela primeira vez, uma linha de iPSCs para esta doença, a partir de fibroblastos de um doente homocigótico para a variante causal mais comum (c.3503_3504del no gene *GNPTAB*). A linha de iPSCs ML II apresentou todas as características de pluripotência, tendo sido oficialmente registada no *Human pluripotent stem cell registry* como INSAi003-A, e com preservação do fenótipo da doença. Os resultados obtidos nesta linha, estão já publicados (21).

Apesar de ainda não terem sido diferenciadas em tipos celulares relevantes para as respetivas doenças (ex: condrócitos, neurónios ou cardiomiócitos), o seu valor como modelo *in vitro* para estudos fenotípicos é enorme dado o seu potencial para futuras aplicações em investigação e desenvolvimento pré-clínico de terapias dirigidas. Exemplos são os oligonucleótidos antissense, ou outras moléculas

de RNA com potencial terapêutico, aos quais a nossa unidade tem também dedicado muita atenção ao longo dos últimos anos (22-26). A geração destes modelos celulares reforça o compromisso do INSA com a criação de recursos reprodutíveis e partilháveis para a comunidade científica, com potencial para apoiar projetos de investigação colaborativos e desenvolvimento pré-clínico de terapias.

Geração de modelos de peixe-zebra

Paralelamente, através da edição genética dirigida aos genes ortólogos *naglu* e *gnptab* por tecnologia CRISPR/Cas9, foram gerados modelos de peixe-zebra para a MPS IIIB e ML II, os quais apresentam impacto fenotípico mensurável, incluindo acumulação precoce de sulfato de heparano, alterações morfológicas e do comportamento locomotor.

Relativamente ao modelo de peixe-zebra para a MPS IIIB, a nível genético confirmou-se o KO do gene *naglu*, e a caracterização morfológica e bioquímica na fase de desenvolvimento embrionário revelou que este mimetiza o fenótipo observado nos doentes.

Quanto ao modelo de peixe-zebra para a ML II, foi introduzida a mutação ortóloga mais comum em humanos (c.3503_3504delTC) com uma elevada taxa de KI (54%). No entanto, a maioria dos embriões apresentou mosaïcismo, sendo objetivo futuro otimizar a estratégia para gerar uma linha estável de fundadores heterocigóticos modelo para ML II.

_Conclusões

Os modelos experimentais desenvolvidos neste estudo, baseados em células do próprio doente ou em organismos geneticamente modificados, não apenas mimetizam aspetos fundamentais da patologia humana, como também constituem uma plataforma versátil para o teste de novas terapias e para a triagem de variantes genéticas. Este último ponto é particularmente relevante face a um dos principais desafios da medicina genómica atual, o aumento exponencial da deteção de VUS resultante da expansão das tecnologias de NGS. Estes modelos contribuem, assim, para colmatar esta limitação crítica e acelerar a translação dos resultados para a prática clínica.

Adicionalmente, o trabalho aqui descrito posiciona o INSA como uma referência nacional na aplicação de estratégias de medicina de precisão às doenças raras, alinhando-se com as orientações estratégicas do *European Joint Programme on Rare Diseases* (EJP RD) e da nova *European Rare Diseases Research Alliance* (ERDERA). A participação ativa nestas redes reforça o papel do INSA enquanto entidade de interface entre diagnóstico, investigação e políticas de saúde.

Em suma, os resultados obtidos demonstram que os modelos desenvolvidos (SHEDs, iPSCs e peixe-zebra) são ferramentas eficazes e complementares para o estudo das DLS. Estes modelos não só permitem aprofundar os mecanismos moleculares subjacentes à doença, como abrem caminho à identificação de alvos terapêuticos, ao rastreio de fármacos e ao desenvolvimento de terapias personalizadas, como as abordagens *N-of-few*. O trabalho realizado constitui, por isso, um contributo relevante para a investigação em doenças raras, com impacto potencial na melhoria dos cuidados de saúde prestados aos doentes em Portugal e além-fronteiras.

Financiamento:

Estes trabalhos foram financiados através de fundos nacionais e internacionais. A nível nacional destacamos três projetos FCT—Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. [EXPL/BTM-SAL/0659/2021 (<http://doi.org/10.54499/EXPL/BTM-SAL/0659/2021>); ASOS2cureMPSIII-2022.04667.PTDC (<https://doi.org/10.54499/2022.04667.PTDC>) e ModellingMLII-2022.03836.PTDC (<https://doi.org/10.54499/2022.03836.PTDC>)] bem como os fundos anualmente distribuídos pelo próprio INSA e o apoio da Unidade de I&D CECA (UIDB/00211/2020) e do LA à qual pertence, o AL4AnimalS (LA/P/0059/2020). A nível internacional, destacamos o apoio recebido pela Sanfilippo Children's Foundation (2019DGH1656/SCF2019I&D).

Referências bibliográficas:

- (1) Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, et al. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Oct 1;4(1):27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
- (2) Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*. 2012 Nov 26;199(5):723-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208152>
- (3) Scerra G, De Pasquale V, Scarcella M, et al. Lysosomal positioning diseases: beyond substrate storage. *Open Biol*. 2022 Oct;12(10):220155. <https://doi.org/10.1098/rsob.220155>
- (4) Beck M. Variable clinical presentation in lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24(Suppl 2):47-51; discussion 45-6. <https://doi.org/10.1023/a:1012463605992>
- (5) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*. 2004 Feb;12(2):87-92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (6) Coutinho MF, Encarnação M, Gomes R, et al. Origin and spread of a common deletion causing mucopolidiosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity. *Clin Genet*. 2011 Sep;80(3):273-80. Epub 2010 Sep 29. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01539.x>
- (7) Azevedo O, Gal A, Faria R, et al. Founder effect of Fabry disease due to p.F113L mutation: Clinical profile of a late-onset phenotype. *Mol Genet Metab*. 2020 Feb;129(2):150-160. Epub 2019 Jul 24. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.07.012>
- (8) Leal AF, Espejo-Mojica AJ, Sánchez OF, et al. Lysosomal storage diseases: current therapies and future alternatives. *J Mol Med (Berl)*. 2020 Jul;98(7):931-46. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01935-6>
- (9) Beck M. Treatment strategies for lysosomal storage disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2018 Jan;60(1):13-18. Epub 2017 Nov 1. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13600>
- (10) 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 Inherit Metab Dis*. 2006 Dec;29(6):743-54. Epub 2006 Oct 25. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0403-z>
- (11) 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 Mar;73(3):251-6. Epub 2008 Jan 23. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00951.x>
- (12) Encarnação M, Lacerda L, Costa R, et al. Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolidiosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet*. 2009 Jul;76(1):76-84. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01185.x>
- (13) Coutinho MF, Lacerda L, Pinto E, et al. Molecular and computational analyses of genes involved in mannose 6-phosphate independent trafficking. *Clin Genet*. 2015 Aug;88(2):190-4. Epub 2014 Sep 17. <https://doi.org/10.1111/cge.12469>
- (14) Coutinho MF, Encarnação M, Matos L, et al. Molecular Characterization of a Novel Splicing Mutation underlying Mucopolysaccharidosis (MPS) type VI-Indirect Proof of Principle on Its Pathogenicity. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Jan 21;10(2):58. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10020058>
- (15) Encarnação M, Coutinho MF, Silva L, et al. Assessing Lysosomal Disorders in the NGS Era: Identification of Novel Rare Variants. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 1;21(17):6355. <https://doi.org/10.3390/ijms21176355>
- (16) Encarnação M, Coutinho MF, Cho SM, et al. NPC1 silent variant induces skipping of exon 11 (p.V562V) and unfolded protein response was found in a specific Niemann-Pick type C patient. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Nov;8(11):e1451. Epub 2020 Sep 15. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1451>
- (17) Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga. Tratamento de doenças lisossomais de sobrecarga: relatório 2022. Porto: INSA, 2024. <http://hdl.handle.net/10400.18/9212>
- (18) Carvalho S, Santos JI, Moreira L, et al. Modeling Lysosomal Storage Disorders in an Innovative Way: Establishment and Characterization of Stem Cell Lines from Human Exfoliated Deciduous Teeth of Mucopolysaccharidosis Type II Patients. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 21;25(6):3546. <https://doi.org/10.3390/ijms25063546>

artigos breves_ n. 11

- (19) Duarte AJ, Ribeiro D, Santos R, et al. Induced pluripotent stem cell line (INSAi001-A) from a Gaucher disease type 3 patient compound heterozygote for mutations in the GBA1 gene. *Stem Cell Res.* 2019 Dec;41:101595. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101595>
- (20) Duarte AJ, Ribeiro D, Santos R, et al. Induced pluripotent stem cell line (INSAi002-A) from a Fabry Disease patient hemizygote for the rare p.W287X mutation. *Stem Cell Res.* 2020 May;45:101794. Epub 2020 Apr 20. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101794>
- (21) Moutinho ME, Gonçalves M, Duarte AJ, et al. Establishment of a Human iPSC Line from Mucopolipidosis Type II That Expresses the Key Markers of the Disease. *Int J Mol Sci.* 2025 Apr 19;26(8):3871. <https://doi.org/10.3390/ijms26083871>
- (22) Matos L, Canals I, Dridi L, et al. Therapeutic strategies based on modified U1 snRNAs and chaperones for Sanfilippo C splicing mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Dec 10;9:180. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0180-y>
- (23) Matos L, Gonçalves V, Pinto E, et al. Functional analysis of splicing mutations in the IDS gene and the use of antisense oligonucleotides to exploit an alternative therapy for MPS II. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Dec;1852(12):2712-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.011>
- (24) Matos L, Duarte AJ, Ribeiro D, et al. Correction of a Splicing Mutation Affecting an Unverricht-Lundborg Disease Patient by Antisense Therapy. *Genes (Basel).* 2018 Sep 11;9(9):455. <https://doi.org/10.3390/genes9090455>
- (25) Matos L, Vilela R, Rocha M, et al. Development of an Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping Therapeutic Strategy for Mucopolipidosis II: Validation at RNA Level. *Hum Gene Ther.* 2020 Jul;31(13-14):775-783. Epub 2020 May 20. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.034>
- (26) Santos JI, Gonçalves M, Almeida MB, et al. mRNA Degradation as a Therapeutic Solution for Mucopolysaccharidosis Type IIIC: Use of Antisense Oligonucleotides to Promote Downregulation of Heparan Sulfate Synthesis. *Int J Mol Sci.* 2025 Feb 1;26(3):1273. <https://doi.org/10.3390/ijms26031273>

_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 porfiria 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 porfiria. 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: Porfiria Aguda Intermitente (PAI, OMIM #176000), Porfiria Variegata (PV, OMIM#176200), Coproporfiria Hereditária (CPH, OMIM#121300) e a Porfiria por Deficiência do Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase (ADP, OMIM# 612740, também conhecida por porfiria de Döss), e quatro porfirias cutâneas: Protoporfiria Eritropoiética (PPE; OMIM# 17000), Protoporfiria Eritropoiética ligada ao X (PPE-XL OMIM# 300752), Porfiria Cutânea Tarda (PCT; OMIM# 176100) e a Porfiria 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

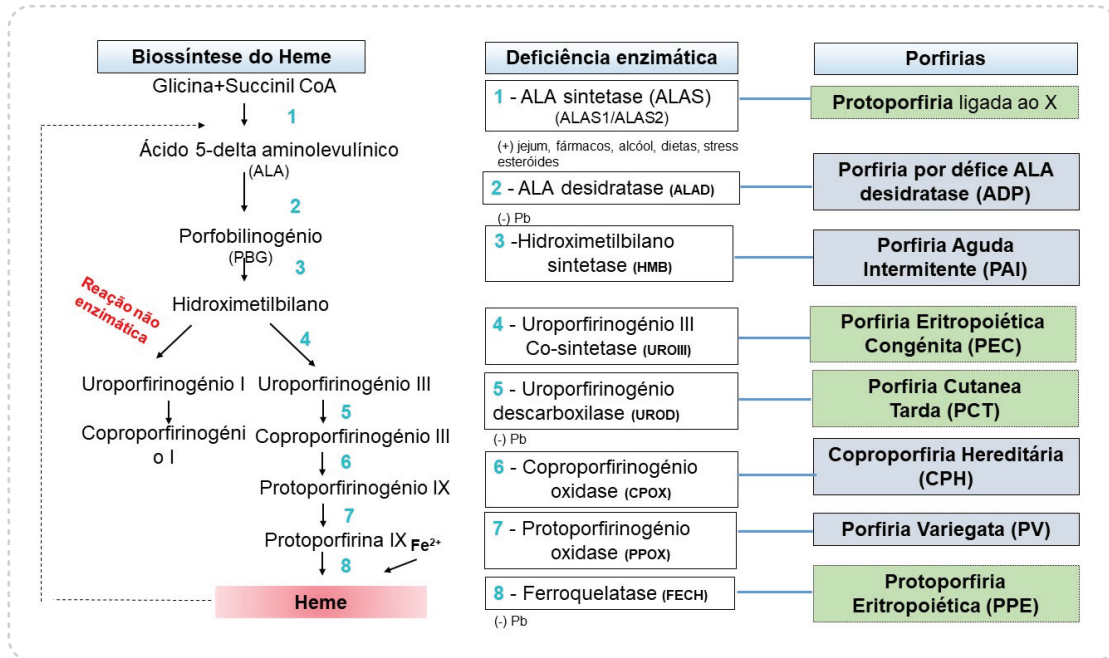
o da variante c.175C>T (p.Arg59Trp) no gene *PPOX*, com uma prevalência de 3:1000 habitantes, na população caucasiana da África do Sul (95% dos casos de PV). Este efeito fundador foi originado por um casal de colonos holandeses que se instalaram na cidade do Cabo, no séc. XVII (7). O efeito fundador 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 Referênciação” (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 cinzentas – 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 – protoporfíria eritropoiética; PPE-XL – protoporfíria 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 défice ADP, sempre após excluir outras causas, como a tirosinemia tipo I e intoxicação por chumbo (Saturnismo) (figuras 1 e 2).

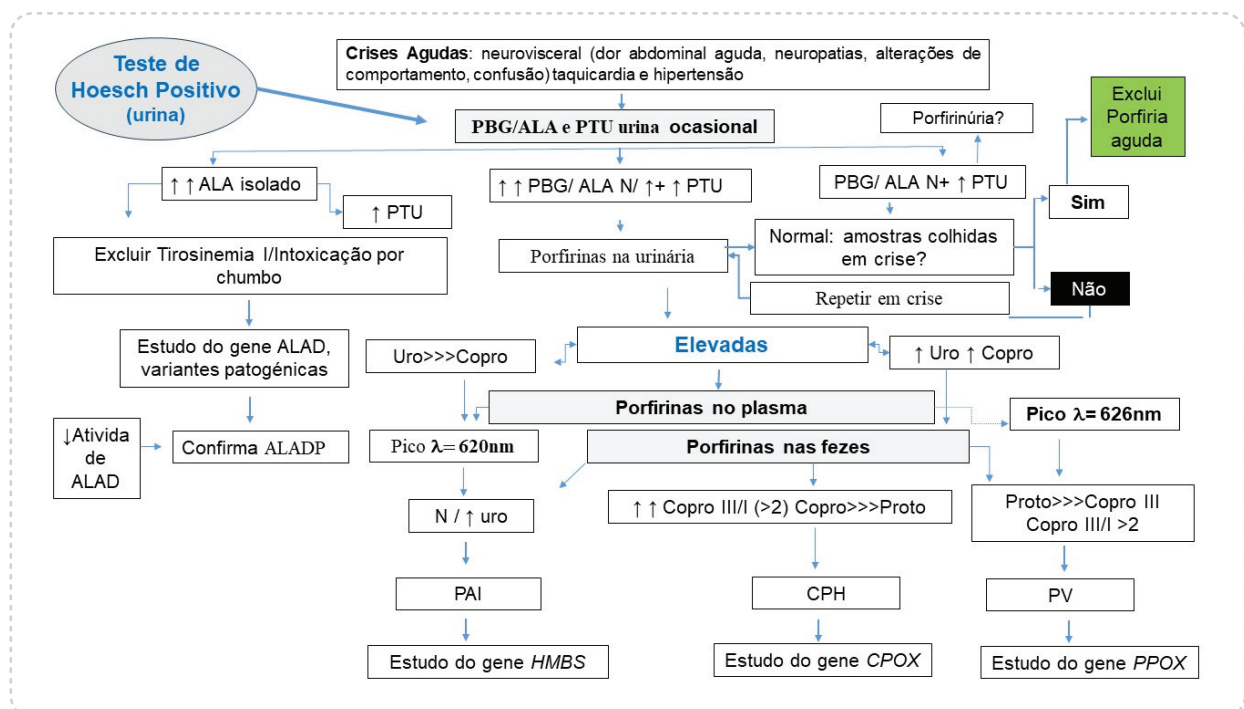
No caso de todos os parâmetros terem sido negativos e persistir a suspeita de uma porfíria, devemos efetuar o estudo genético.

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 bilis, 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.

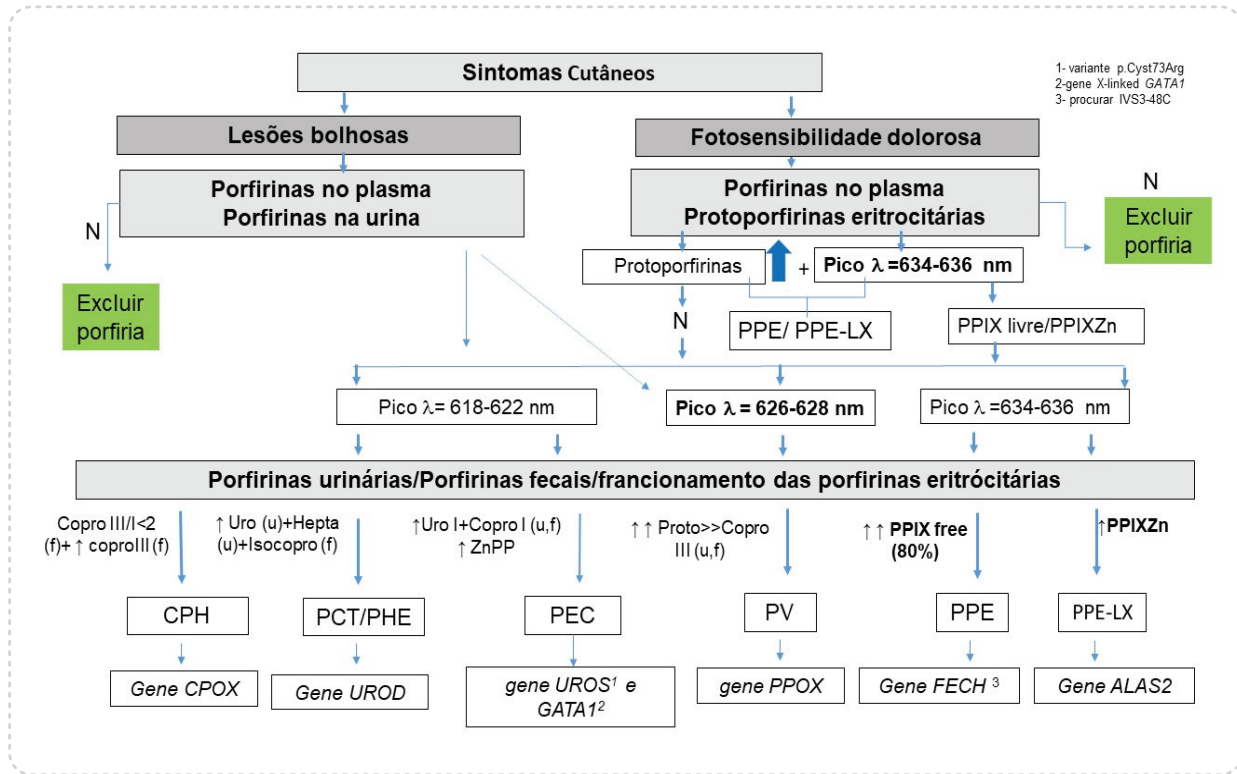
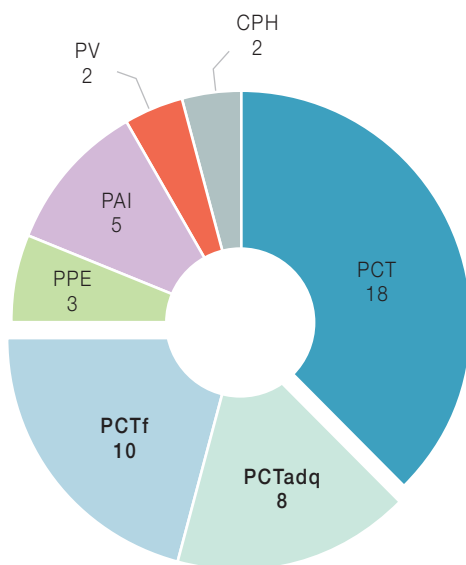


Gráfico 1: Número de casos de porfirias diagnosticadas desde 2022.



PCT – Porfíria Cutanea Tarda; PCTadq – PCT adquirida; PCTf – PCT familiar; PVE – Protoporfíria Eritropoiética; PAI – Porfíria Aguda Intermitente; PV – Porfíria Variegata; CPH – Coproporfíria 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 porfíria 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 porfíria 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 porfíria pode ser desafiante (figuras 2 e 3). Também se deve ter em atenção, aquando do diagnóstico diferencial de uma porfíria, 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. *Md de Hoje*. 1969;2:9.
- (13) Silva JAM, Manso C. Padrões urinários e fecais dos precursores do Heme em algumas doenças hepáticas. *Rei Cíenc Med 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>

Diagnóstico molecular das síndromes de cancro hereditário da mama-ovário e colorretal: a experiência do Departamento de Genética Humana do INSA (1994-2025)

Molecular genetic diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer and colorectal cancer syndromes: experience from the Department of Human Genetics of INSA (1994-2025)

Patrícia Theisen¹, Pedro Rodrigues¹, Glória Isidro², João Gonçalves¹

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes. Os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde indicam que o cancro da mama é o 2º tipo mais frequente de cancro e a 4ª causa de mortalidade, enquanto o cancro colorretal é o 3º tipo mais comum e a 2ª causa de mortalidade.

Considerando que os casos de cancro são na sua grande maioria de origem esporádica, cerca de 5 a 10% correspondem a síndromes de cancro hereditário, as quais estão associadas a variantes germinativas patogénicas, em diferentes genes, que conferem predisposição para cancro. A identificação de uma variante germinativa causal num indivíduo com cancro pode ter importantes consequências, desde o seu tratamento, à implementação de protocolos personalizados de vigilância e prevenção da doença oncológica, bem como à disponibilização do teste genético preditivo aos respetivos familiares em risco.

Por ocasião do 50º aniversário do Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, sintetiza-se a atividade de diagnóstico genético molecular desenvolvida neste departamento de 1994 a junho de 2025, no contexto das síndromes hereditárias de cancro da mama-ovário e de cancro colorretal, compreendendo a análise de mais de 1800 indivíduos.

Constatou-se, desde 1994, um aumento do número de testes genéticos para síndromes de cancro hereditário realizados no DGH, demonstrando a importância que estes têm para os doentes e seus familiares. A implementação da sequenciação de nova geração, em 2015, permitiu aumentar o número de genes de predisposição para cancro analisados, com a concomitante melhoria dos tempos de resposta e da taxa de diagnóstico. Face à estimativa de aumento da incidência de cancro nas próximas décadas, especialmente de cancro da mama e colorretal, é fundamental continuar a oferta deste diagnóstico, em consonância com a evolução do conhecimento e com a atualização tecnológica.

_Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, accounting for nearly 10 million deaths. The most recent data from the World Health Organization indicate that breast cancer is the 2nd most frequent type of cancer and the 4th leading cause of mortality, while colorectal cancer is the 3rd most common type and the 2nd leading cause of mortality.

Although most cancer cases are sporadic in origin, about 5 to 10% correspond to hereditary cancer syndromes, which are associated with

pathogenic germline variants in different genes that confer cancer predisposition. The identification of a causal germline variant in an individual with cancer can have important consequences, ranging from treatment to the implementation of personalized surveillance and prevention protocols, as well as the availability of predictive genetic testing for at-risk family members.

On the occasion of the 50th anniversary of the Department of Human Genetics (DGH) of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, we summarize the molecular genetic diagnostic activity carried out in this department from 1994 to June 2025, in the context of hereditary breast-ovarian cancer and colorectal cancer syndromes, covering the analysis of more than 1,800 individuals.

Since 1994, there has been an increase in the number of genetic tests for hereditary cancer syndromes performed in this department, demonstrating their importance for patients and their relatives. The implementation of next-generation sequencing in 2015 made it possible to expand the number of cancer predisposition genes analyzed, while also improving turnaround times and diagnostic yield. Given the expected increase in cancer incidence in the coming decades, especially breast and colorectal cancer, it is essential to continue providing this type of diagnosis, in line with advances in knowledge and technological progress.

_Introdução

Os testes de diagnóstico molecular para as síndromes hereditárias de cancro da mama-ovário (HBOC – *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) e de cancro colorretal (HCRC – *Hereditary Colorectal Cancer*) foram implementados no Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge a partir de 1994, constituindo um marco relevante em saúde pública, quer no apoio aos doentes quer aos seus familiares. Para além da sua importância na identificação da alteração genética associada à doença em indivíduos afetados – podendo contribuir para a definição de uma estratégia terapêutica personalizada e para

implementação de medidas de vigilância e prevenção de novos tumores - estes testes possibilitam, igualmente, a identificação de familiares com risco acrescido de desenvolvimento de neoplasias. Os testes de diagnóstico genético de síndromes de cancro hereditário assumem, deste modo, um papel central enquanto instrumentos de medicina preventiva, sustentando a gestão do risco em famílias afetadas, num contexto de elevada prevalência destas doenças com impacto significativo na saúde pública e na sociedade.

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, tendo sido responsável por quase 10 milhões de mortes em 2022. Considerando os dados mais recentes disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde (2022), relativamente à incidência de novos casos de cancro, o cancro da mama destacou-se como o segundo mais frequente (2 296 840; 11,5%), seguindo-se o cancro colorretal com 1 926 425 (9,6%) casos. Foram ainda registados 324 603 novos casos (1,6%) de cancro do ovário, sendo o 18º tipo de cancro mais frequente. Relativamente à mortalidade, o cancro colorretal foi a segunda causa mais frequente (9,3%), o da mama a 4ª (6,8%) e o do ovário a 14ª causa (2,1%) (1).

Embora a maioria dos tumores ocorra de forma esporádica, estima-se que cerca de 5 a 10% estejam associados a síndromes de cancro hereditário resultantes de variantes germinativas patogénicas que conferem um risco acrescido para o desenvolvimento de um ou mais tumores. Estes surgem, frequentemente, numa idade precoce quando comparados com os casos de cancro esporádico (2).

Estima-se que o HBOC corresponda a cerca de 5-10% da totalidade dos casos de cancro da mama, de 15% dos casos de cancro do ovário e, ainda, a cerca de 3% dos casos de cancro da próstata e pâncreas. Estes casos resultam de alterações germinativas patogénicas num gene de predisposição para cancro, entre mais de duas dezenas de genes que têm vindo a ser identificados ao longo dos anos. Destacam-se os genes *BRCA1* e *BRCA2*, descritos pela primeira vez, respetivamente, em 1994 e em 1995 (3,4). Trata-se de genes supressores tumorais envolvidos na

reparação de danos no DNA por recombinação homóloga, sendo responsáveis por cerca de metade dos casos de HBOC. Na população portuguesa, foi identificada uma variante patogénica fundadora no gene *BRCA2* (c.156_157insAlu), que deverá ser sempre pesquisada nos casos suspeitos de HBOC (5). Para além de *BRCA1/2*, outros genes de risco elevado para HBOC incluem *PALB2*, *TP53*, *STK11*, *CDH1* e *PTEN*, enquanto que genes como *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *BARD1*, *RAD51C* e *RAD51D* estão associados a risco moderado/reduzido (6).

No contexto do cancro colorretal, 5 a 6% dos casos têm origem hereditária, destacando-se a síndrome de Lynch (LS – *Lynch Syndrome*) e a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP – *Familial Adenomatous Polyposis*), correspondendo, respetivamente, a cerca de 3% e 1% da totalidade dos casos de cancro colorretal (7). A LS, designada inicialmente como cancro colorretal hereditário sem polipose, está associada a alterações nos genes de reparação de erros de emparelhamento/*mismatch repair* (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) ou a grandes deleções na região terminal do gene *EPCAM* que afetam a expressão de *MSH2* (8). A instabilidade de microssatélites (MSI – *Microsatellite Instability*), uma das características moleculares do cancro colorretal associadas a LS, é relevante para a orientação dos estudos moleculares nos referidos genes, para a compreensão da origem do tumor e para o eventual tratamento dos doentes. A FAP, causada por alterações no gene *APC*, apresenta penetrância elevada e caracteriza-se pelo desenvolvimento de dezenas a milhares de pólipos adenomatosos no cólon e reto. A polipose associada ao gene *MUTYH* (MAP – *MUTYH Associated Polyposis*) é a segunda síndrome de polipose mais frequente, seguindo-se outras mais raras como a síndrome de polipose juvenil (genes *SMAD4* e *BMPR1A*), a síndrome de Peutz-Jeghers (gene *STK11*) e as síndromes de hamartomas associadas ao gene *PTEN* (7).

Atendendo ao modo de herança, as síndromes de cancro hereditário referidas apresentam um padrão autossómico dominante, com risco de 50% de transmissão da alteração à descendência, com exceção da MAP, que apresenta um padrão autossómico recessivo (7).

A implementação da sequenciação de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) no DGH, constituiu um marco no diagnóstico molecular das síndromes em causa, caracterizadas por elevada heterogeneidade genética, ao permitir a análise simultânea de múltiplos genes em painéis dirigidos à predisposição para diferentes tipos de cancro, proporcionando maior celeridade e custos substancialmente inferiores aos da abordagem convencional.

O diagnóstico genético destas síndromes hereditárias constitui uma ferramenta essencial para a prevenção do cancro. Conhecendo-se a variante germinativa patogénica associada à predisposição para cancro, tal pode ter profundas implicações para o doente e seus familiares. Neste contexto, o doente poderá beneficiar de medicina personalizada e da implementação de protocolos clínicos de vigilância/prevenção adequados à sua situação. Os familiares em risco de herdarem a variante patogénica poderão, após aconselhamento genético, realizar o teste genético preditivo, permitindo atuar na prevenção da patologia em causa.

_Objetivo

Pretende-se, com este trabalho, apresentar de forma sucinta, os resultados globais obtidos, de 1994 a 2025, no âmbito do diagnóstico genético molecular das síndromes de cancro hereditário, nomeadamente cancro da mama/ovário e cancro colorretal.

_Material e métodos

Foram estudados 1825 indivíduos com história pessoal e/ou familiar sugestiva/confirmada de HCRC ou de HBOC. Esses casos compreenderam 1200 casos de HCRC (de 1994 a junho de 2025) e 625 casos no contexto de HBOC (de 2002 a junho de 2025), maioritariamente referenciados por médicos das especialidades de Oncologia ou de Genética Médica.

Após obtenção do consentimento informado, foi extraído DNA genómico de amostras de sangue periférico ou de amostras (tumor e tecido normal) fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE). O DNA extraído das amostras FFPE foi usado exclusivamente para pesquisa de MSI (144 amostras). Entre

os casos de HCRC, 1091 foram submetidos a sequenciação de um ou mais genes, incluindo 35 amostras para as quais foi realizada adicionalmente a pesquisa de MSI. Em 109 casos, foi somente pesquisada a MSI.

Até 2014, os genes *BRCA1* e *BRCA2* (HBOC), e os genes *APC*, *MUTYH*, *MLH1*, *MSH2* e *STK11* (HCRC), foram analisados recorrendo à abordagem convencional – PCR seguida de sequenciação de Sanger. A pesquisa de MSI foi realizada por PCR para os *loci* D2S123, BAT25, BAT26, D5S346 e D17S250 (painel de Bethesda) seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida.

A partir de 2015, o diagnóstico molecular destas síndromes passou a ser realizado por NGS com um painel de genes de predisposição para cancro (*TruSight Cancer Panel* - 94 genes, substituído em 2022 pelo *TruSight Hereditary Cancer Panel* - 113 genes, Illumina), a partir do qual foram definidos diversos sub-painéis para HBOC e HCRC contemplando, os mais alargados, respetivamente, 25 e 27 genes (tabela 1). A análise bioinformática de variantes, sua anotação e classificação, incluindo a previsão *in silico* de consequências funcionais, foi realizada com recurso a diferentes *softwares*, destacando-se os programas da Illumina (p. ex. *BWA Enrichment*, *DRAGEN Enrichment* e *Variant Interpreter*), *Exomiser* e *Franklin by Genoox*. entre outros. Realizou-se também a consulta a bases de dados populacionais (p. ex. gnomAD) ou clínicas (ClinVar, HGMD Professional, LOVD, BRCA Exchange, entre outras). As variantes foram classificadas como patogénicas (VP), provavelmente patogénicas (VPP), de significado clínico incerto (VUS – *Variant of Unknown Significance*), provavelmente benignas ou benignas, de acordo com os critérios da ACMG-AMP (*American College of Medical Genetics and Genomics-Association for Molecular Pathology*) (9,10) e com as recomendações gerais e específicas de genes da CanVIG-UK da ACGS (*Association for Clinical Genomic Science*) (11) e da ClinGen (12).

A pesquisa de alterações do número de cópias (CNV – *Copy Number Variant*) foi implementada no DGH em 2012, recorrendo ao MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MRC-Holland*), para os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1* e *MSH2*, e foi alargada a outros genes de predisposição para cancro, em função das solicitações. A pesquisa da variante patogénica *BRCA2*: c.156_157ins*Alu* (mutação fundadora na população portuguesa), realizou-se por PCR específica de alelo ou por MLPA.

A análise *in silico* de CNV foi implementada no DGH em 2019, usando a *pipeline panelcn.MOPS* (13,14) e, desde 2022, também o software *DRAGEN Enrichment*.

Todas as variantes patogénicas/ provavelmente patogénicas (VP/VPP) identificadas por NGS foram confirmadas por sequenciação de Sanger (variantes pontuais) ou por MLPA (CNV). A pesquisa de variantes familiares causais em indivíduos saudáveis (testes genéticos preditivos) realizou-se por sequenciação de Sanger ou MLPA, em função da natureza das mesmas.

Tabela 1: Painéis de genes de predisposição para cancro da mama-ovário hereditário (HBOC) e cancro colorretal hereditário (HCRC).

Painel	Genes
HBOC ¹	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDKN2A, CHEK2, EPCAM*, ERCC4, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RINT1, STK11, TP53</i>
HCRC	<i>AKT1, APC, ATM, BLM, BMPR1A, CDKN2A, CHEK2, EPCAM*, GREM1, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NTHL1, PIK3CA, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RINT1, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, STK11, TP53</i>

¹ - Inclui a pesquisa da inserção *Alu* em *BRCA2* e MLPA para *BRCA1* e *BRCA2*; * - inclui a pesquisa *in silico* de grandes deleções na região 3' deste gene.

_Resultados

As amostras biológicas recebidas para diagnóstico molecular de síndromes hereditárias de cancro até junho de 2025, corresponderam a um total de 1825 indivíduos analisados, 625 para HBOC e 1200 para HCRC (gráfico 1).

A maioria dos testes genéticos realizados para HBOC consistiu em testes de diagnóstico em indivíduos afetados (550/625), maioritariamente, com cancro de mama (74,6%), ovário (4,8%), próstata (3,2%) e pâncreas (2,1%). Os restantes testes (n=75) corresponderam a testes preditivos em indivíduos saudáveis que apresentavam história familiar comprovada (n=41, pesquisa da variante familiar) ou sugestiva de HBOC (n=34, painel de genes por NGS).

Nos indivíduos afetados, foram identificadas VP/VPP em 11,3% dos casos, distribuídas por vários genes (gráfico 2), e VUS em 17,1%. No contexto dos testes genéticos preditivos, dos 41 familiares saudáveis analisados, 24 eram portadores da variante pesquisada. Adicionalmente, não foi identificada

nenhuma variante causal nos 34 indivíduos com teste preditivo prescrito apenas com base na história familiar sugestiva de HBOC.

Das 64 VP/VPP identificadas nos 62 indivíduos afetados (gráfico 2), mais de metade (53,2%) ocorreram em *BRCA1/2* (36,0% em *BRCA2* e 17,2% em *BRCA1*). A variante *BRCA2*: c.156_157ins*Alu*, com efeito fundador na população portuguesa, foi detetada em 3 indivíduos afetados, correspondendo a 13,0% das VP/VPP identificadas em *BRCA2*. Adicionalmente, foram identificadas variantes causais noutros genes de reparação do DNA por recombinação homóloga como *ATM* (14,1%), *CHEK2* (7,8%), *PALB2* e *BRIP1* (ambos com 6,2%) e *RAD51C* (4,7%) (gráfico 2). Salientam-se dois indivíduos com história pessoal e familiar de cancro da mama e/ou ovário, ambos duplos heterozigóticos para variantes patogénicas em *BRCA1/2* e *ATM*.

artigos breves_ n. 13

No contexto do HCRC, foram analisados por sequenciação de Sanger/NGS, 1091 indivíduos, dos quais 621 afetados (teste diagnóstico) e 470 familiares saudáveis (teste preditivo). Dos 621 indivíduos, 359 tinham suspeita de síndromes de polipose, 232 de LS e os restantes 30 indivíduos com suspeita de HCRC indefinido (informação clínica não disponibilizada).

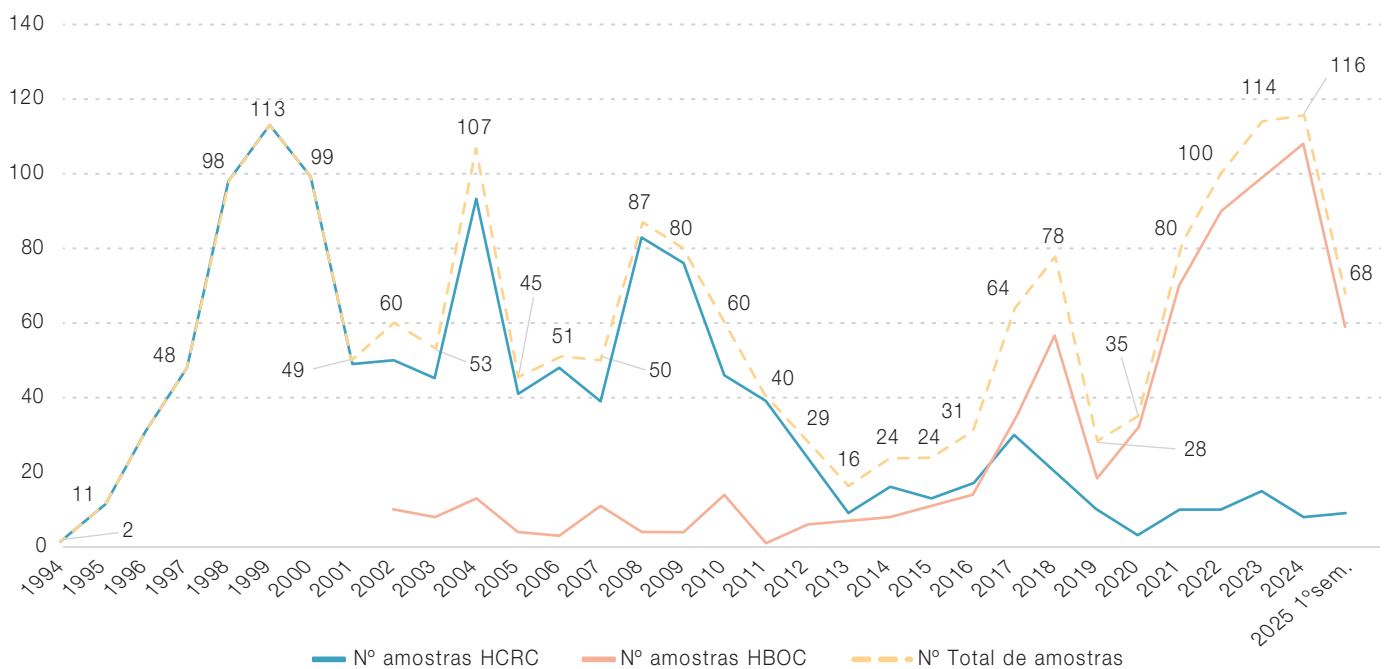
Foram identificados 202 indivíduos afetados com uma ou mais variantes das classes VP/VPP/VUS, designadamente 175 indivíduos com uma variante, 25 com duas variantes e dois com três variantes. Entre as 230 variantes, a maioria (219) foi classificada como VP/VPP (gráfico 3), tendo sido identificadas, maioritariamente, nos genes *APC* (37,6%) e *MUTYH* (34,4%), seguidos de *MSH2* (12,8%) e *MLH1* (10,6%). As VP/VPP no gene *MUTYH* foram detetadas em homocigotia (n=23), heterocigotia composta (n=21) ou heterocigotia (n=10), destacando-se as variantes p.Y179C e p.G396D como as mais frequentes. Foram ainda detetadas, nos indivíduos afetados, 11 VUS (*APC* n=1; *MLH1* n=3; *MSH2* n=4; *MUTYH* n=2 e *NTHL1* n=1). Foram identi-

ficadas VP/VPP em 23,7% dos indivíduos com suspeita de LS (55/232), em 37,0% dos doentes com polipose (133/359), e em 16,7% (5/30) dos casos com suspeita de HCRC indefinido.

Considerando os 470 casos familiares de HCRC, as variantes pesquisadas foram identificadas em 109 de 260 casos associados a poliposes e em 73 de 208 casos de LS (nos dois casos familiares com HCRC indefinido, a variante familiar não foi identificada).

Relativamente aos indivíduos para os quais foi realizada a pesquisa de MSI, foram identificadas 27 amostras com instabilidade elevada (MSI-H, instabilidade em dois ou mais *loci*), 7 com instabilidade baixa (MSI-L, instabilidade em apenas um *locus*) e 110 sem instabilidade. Entre as 35 amostras para as quais foram sequenciados os genes *MSH2* e/ou *MLH1*, detetaram-se VP/VPP em 10 casos (9 casos com MSI-H e 1 com MSI-L) e uma VUS, em *MSH2*, num caso com MSI-H.

Gráfico 1: Distribuição das amostras analisadas no DGH em contexto de síndromes de cancro hereditário no período de 1994 a junho de 2025.



HBOC - cancro da mama-ovário hereditário, HCRC - cancro colorretal hereditário.

Gráfico 2: Distribuição por gene das variantes germinativas classificadas como patogénicas/ provavelmente patogénicas identificadas nos indivíduos afetados com cancro da mama-ovário hereditário.

Total de 64 indivíduos, incluindo 2 duplos heterozigóticos (*BRCA1/BRCA2* e *ATM*).

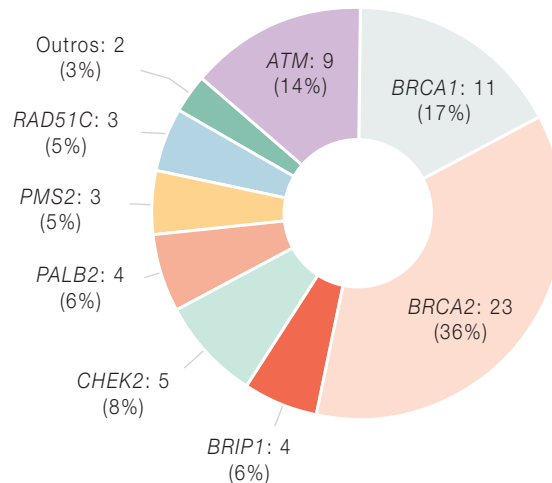
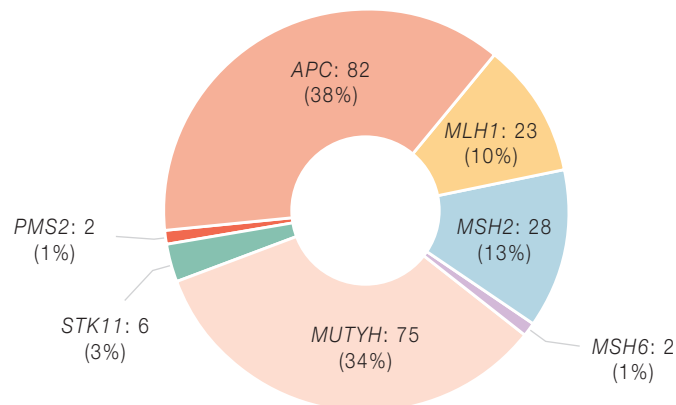


Gráfico 3: Distribuição por gene das variantes germinativas classificadas como patogénicas/ provavelmente patogénicas identificadas nos indivíduos afetados com cancro colorretal hereditário.

Total de 193 indivíduos, incluindo 23 homozigóticos, 21 heterozigóticos compostos e 10 heterozigóticos para variantes em *MUTYH*.



_Discussão

A implementação, em 2015, de painéis de sequenciação de genes de predisposição para cancro por NGS veio possibilitar um diagnóstico molecular mais abrangente, rápido e económico, relativamente às metodologias convencionais anteriormente utilizadas no DGH (15).

Considerando os casos de HBOC, a análise molecular permitiu confirmar o diagnóstico clínico presuntivo, com identificação de VP/VPP em 11,3% dos indivíduos afetados, em concordância com a proporção esperada de cerca de 10% de tumores

hereditários. Cerca de metade dos indivíduos afetados (54,8%) apresentaram variantes patogénicas em *BRCA1/2*, confirmando estes dois genes como os principais genes de predisposição para HBOC (gráfico 2). A identificação das variantes patogénicas nos restantes indivíduos afetados só foi possível com a implementação de painéis de NGS, uma vez que estas ocorreram noutros genes de predisposição para HBOC cuja análise por metodologia convencional não era então realizada. O teste genético preditivo, realizado em 41 familiares saudáveis, permitiu identificar 24 portadores da variante familiar pesquisada.

Este resultado possibilitou, por um lado, disponibilizar aos referidos portadores protocolos personalizados de vigilância e prevenção de tumores, visando reduzir a morbilidade e a mortalidade associadas ao cancro e, por outro, dispensar os não portadores de uma vigilância mais frequente por possuírem um risco de desenvolvimento de tumores equivalente ao da população em geral.

Apesar de os painéis de NGS terem aumentado consideravelmente a taxa de diagnóstico molecular, não foi possível identificar nenhuma VP/VPP em 88,7% dos indivíduos afetados no contexto de HBOC. Vários fatores podem explicar este resultado, incluindo as limitações conhecidas da metodologia de NGS, variantes em genes não analisados ou, mais provavelmente, o facto de muitos destes indivíduos possuírem tumores esporádicos e não hereditários. Em 19,3% destes indivíduos, foram identificadas VUS em genes de predisposição para HBOC as quais, por não poderem ser associadas à patologia em causa, não são clinicamente acionáveis, embora possam ser alvo de investigação adicional. As VUS devem, no entanto, ser devidamente avaliadas em consulta de Genética Médica face à história pessoal e familiar dos indivíduos em questão, independentemente da síndrome de cancro hereditário.

No contexto de HBOC, o aumento do número de VUS identificadas, reflexo do maior número de genes analisados, foi um dos maiores desafios que resultaram da introdução da NGS, cabendo aos laboratórios de diagnóstico genético a tarefa de reclassificação periódica dessas variantes, mediante novas evidências de estudos funcionais, dados da literatura e/ou critérios de classificação.

Relativamente aos casos de HCRC, a identificação de VP/VPP em cerca de 31,1% dos indivíduos afetados (193 em 621), permitiu confirmar o diagnóstico clínico presuntivo. Esta taxa, superior à obtida para os casos de HBOC, poderá ser explicada, em parte, pela existência de características fenotípicas específicas de algumas síndromes de HCRC, particularmente nos casos de poliposes, ou pela realização de testes genéticos de rastreio em casos suspeitos de SL, como a pesquisa de MSI. O número de VUS identificadas (n=11) foi bastante inferior comparativamente às detetadas nos casos de HBOC, o que

poderá dever-se ao número reduzido de casos analisados por NGS (apenas cerca de 10% da totalidade dos casos suspeitos de HCRC foram analisados por esta metodologia).

Considerando os genótipos mais raros, em que foram identificadas duplas heterozigotias, nomeadamente de VP nos genes *BRCA1/2* e *ATM* (HBOC), estes evidenciam a importância da utilização de painéis de genes no diagnóstico molecular em causa. A realização da análise molecular convencional, compreendendo apenas os genes *BRCA1/2*, não teria permitido a identificação das variantes patogénicas no gene *ATM*, privando as duas famílias em causa do adequado aconselhamento genético (16). Com a utilização da NGS prevê-se, assim, um aumento na deteção do número de indivíduos duplos heterozigóticos com síndromes de cancro hereditário (17).

Por fim, constata-se que o número de amostras, recebidas no DGH, relativas a casos de cancro de mama, tem vindo a aumentar significativamente nos últimos anos. Este aumento poderá, em parte, dever-se à elegibilidade de doentes portadores de VP/VPP germinativas em *BRCA1/BRCA2*, para a terapêutica personalizada com inibidores da poli-ADP-ribose polimerase (PARP) (2).

Conclusões

O aumento do número de testes realizados no DGH desde 1994 reflete, por um lado, a evolução das metodologias aplicadas ao diagnóstico molecular das síndromes de cancro hereditário, e por outro, a importância que os mesmos têm para os doentes e seus familiares.

A implementação da NGS permitiu aumentar o número de genes de predisposição para cancro analisados, com o concomitante aumento das taxas de diagnóstico, redução dos tempos de resposta dos testes genéticos e dos respetivos custos. Paralelamente, a NGS colocou como maior desafio, o aumento do número de alterações classificadas como VUS, o qual é proporcional ao número de genes analisados.

A reclassificação das VUS, mediante novas evidências resultantes de estudos funcionais, populacionais ou de segregação em famílias afetadas com síndromes de cancro hereditário,

pode ter um impacto clínico e psicológico significativo para os indivíduos em questão. A reclassificação de uma VUS como variante causal (VP/VPP) converte-a numa variante acionável, com a consequente implementação de medidas de vigilância/prevenção de tumores no indivíduo afetado e a possibilidade de oferecer o teste genético preditivo aos familiares em risco. Por outro lado, se uma VUS for reclassificada como variante benigna ou provavelmente benigna (como sucede na maioria dos casos), os indivíduos portadores deixam de apresentar risco de desenvolver cancro associado à variante reclassificada (18,19).

Neste contexto, compreende-se o vasto impacto que o diagnóstico molecular em causa tem na saúde pública, pelo que face à estimativa de aumento da incidência de cancro nas próximas décadas, especialmente de cancro da mama e colorretal, é fundamental a constante formação de recursos humanos especializados, acompanhada da devida atualização tecnológica.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a todos os colegas do DGH do INSA que ao longo dos anos, de forma direta ou indireta, contribuíram para estes resultados. Agradecimento extensivo a todos os médicos, doentes e familiares que igualmente contribuíram para os resultados apresentados. Enaltece-se a Doutora Maria Guida Boavida que iniciou, sempre com elevado interesse científico, dedicação, motivação e visão estratégica, estes estudos no DGH.

Referências bibliográficas:

- (1) International Agency for Research on Cancer [Internet]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>
- (2) Garutti M, Foffano L, Mazzeo R, et al. Hereditary Cancer Syndromes: A Comprehensive Review with a Visual Tool. *Genes (Basel)*. 2023 Apr 30;14(5):1025. <https://doi.org/10.3390/genes14051025>
- (3) Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66-71. <https://doi.org/10.1126/science.7545954>
- (4) Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92. <https://doi.org/10.1038/378789a0>
- (5) Peixoto A, Santos C, Rocha P, et al. The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Mar;114(1):31-8. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9978-4>
- (6) Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:747318. <https://doi.org/10.1155/2013/747318>
- (7) Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, et al. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044-58. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
- (8) Abildgaard AB, Nielsen SV, Bernstein I, et al. Lynch syndrome, molecular mechanisms and variant classification. *Br J Cancer*. 2023 Mar;128(5):726-34. Epub 2022 Nov 24. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-02059-z>
- (9) Richards S, Aziz N, Bale S, et al ; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- (10) Tavtigian SV, Harrison SM, Boucher KM, et al. Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines. *Hum Mutat*. 2020 Oct;41(10):1734-37. <https://doi.org/10.1002/humu.24088>
- (11) CanVIG-UK [Internet]. Disponível em: <https://www.cangene-canvaruk.org/gene-specific-recommendations>
- (12) ClinGen - Specific Guidelines - Criteria Specification Registry [Internet]. 2025. Disponível em: <https://cspec.genome.network/cspect/ui/svi/affiliation/50099>
- (13) Povysil G, Tzika A, Vogt J, et al. panelcn.MOPS: Copy-number detection in targeted NGS panel data for clinical diagnostics. *Hum Mutat*. 2017 Jul;38(7):889-97. <https://doi.org/10.1002/humu.23237>
- (14) Rodrigues P, Carvalho V, Theisen P, et al. In silico detection of copy-number variants in hereditary cancer syndromes using NGS panel data and panelcn.MOPS. Poster 3. 24th Annual Meeting of the Portuguese Society of Human Genetics (SPGH - Sociedade Portuguesa de Genética Humana); 2021 Jan 29; Medicine (Baltimore). 2021 Jan 29;100(4):e23585. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023585>
- (15) Theisen P, Silva C, Pereira Caetano I, et al. Diagnóstico molecular de cancros hereditários por sequenciação de nova geração: cancro da mama e cancro colorretal. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2016;5(7):38-40. <http://hdl.handle.net/10400.18/3792>
- (16) Theisen P, Rodrigues P, Silva C, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: two cases of double heterozygosity for pathogenic variants in the BRCA1 or BRCA2 and ATM genes. e-Poster P12.022.C. Abstr 53rd Eur Soc Hum Genet ESHG Conf Interact E-Posters. 2020 Dec;28(Suppl 1):141-797. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-00739-z>
- (17) Infante M, Arranz-Ledo M, Lastra E, et al. Increased Co-Occurrence of Pathogenic Variants in Hereditary Breast and Ovarian Cancer and Lynch Syndromes: A Consequence of Multigene Panel Genetic Testing? *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 29;23(19):11499. <https://doi.org/10.3390/ijms231911499>
- (18) Macklin S, Durand N, Atwal P, et al. Observed frequency and challenges of variant reclassification in a hereditary cancer clinic. *Genet Med*. 2018 Mar;20(3):346-50. Epub 2017 Dec 7. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.207>
- (19) Slaviv TP, Manjarrez S, Pritchard CC, et al. The effects of genomic germline variant reclassification on clinical cancer care. *Oncotarget*. 2019 Jan 11;10(4):417-23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26501>

Sinopse do diagnóstico molecular de patologias do desenvolvimento sexual no Departamento de Genética Humana do INSA: dos primeiros estudos à relevância de uma abordagem multigénica por sequenciação de nova geração

Synopsis of the molecular diagnosis of disorders of sexual development in the Department of Human Genetics of INSA: from early studies to the relevance of a multigenic approach through next-generation sequencing

Iris Pereira-Caetano^{1,2}, Susana Gomes¹, João Gonçalves^{1,2}

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Grupo de Patologias do Desenvolvimento Sexual. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

As patologias do desenvolvimento sexual (PDS) cujos primeiros estudos foram iniciados no Departamento de Genética Humana (DGH) em 1991, constituem um grupo heterogéneo de doenças congénitas caracterizadas por alterações no sexo cromossómico, gonadal e/ou anatómico. A sua incidência global é estimada em 5/1.000 nascimentos, variando, contudo, em função de características fenotípicas, desde a presença de hipospádias (cerca de 1/250 nascimentos do sexo masculino), a manifestações muito raras, como a disgenesia gonadal completa (1/50.000). A marcada sobreposição fenotípica e a heterogeneidade genética destas patologias dificultam o diagnóstico clínico e a orientação adequada dos doentes.

Esta sinopse de revisitação de doentes com PDS, resume os resultados do estudo molecular da hiperplasia suprarrenal congénita (CAH – *Congenital Adrenal Hyperplasia*), iniciado em 2002, num total de 411 doentes (em idade pediátrica), e reflete sobre o impacto da recente implementação, em 2019, de uma abordagem molecular multigénica por sequenciação de nova geração (NGS) na Unidade de Genética Molecular, no estudo mais alargado de outras PDS, comparativamente à metodologia clássica sequencial gene-a-gene. Atualmente, são analisados 40 genes, organizados em sete subpainéis: determinação primária do sexo, diferenciação sexual, esteroidogénese, infertilidade masculina ou feminina associadas a hipogonadismo hipogonadotrópico, e falência ovárica prematura. Até à data, foram estudados por NGS 58 doentes com manifestações fenotípicas e endocrinológicas características destas doenças raras (excluindo a CAH, não estudada por NGS). Foram identificadas 18 variantes patogénicas em 15 doentes, em 10 genes diferentes, e uma variante de significado clínico incerto no gene AR.

Concluimos que a NGS aumentou a taxa de deteção de variantes patogénicas e reduziu o tempo de resposta, potenciando significativamente o diagnóstico molecular das PDS, contribuindo assim para uma orientação clínica mais precisa, incluindo o aconselhamento genético e apoio na tomada de decisões reprodutivas.

_Abstract

Disorders of sexual development (DSD), whose initial studies began at the Department of Human Genetics (DGH) in 1991, are a heterogeneous group of congenital conditions characterised by alterations in chromosomal, gonadal and/or anatomical sex. Their overall incidence is estimated at 5 per 1,000 births; however, the incidence differs according to phenotypic

characteristics – ranging from the presence of hypospadias (approximately 1 in 250 male births) to very rare manifestations such as complete gonadal dysgenesis (1/50,000). The significant phenotypic overlap and genetic heterogeneity of these disorders make the clinical diagnosis and appropriate patient management challenging.

This synopsis revisits the patients studied with DSD and, besides briefly summarizing the molecular studies of congenital adrenal hyperplasia (CAH), initiated in 2002, involving a total of 411 pediatric patients, aims to reflect on the impact of the recent implementation, in 2019, of a multi-gene molecular approach using next-generation sequencing (NGS) in the Molecular Genetics Unit, which has expanded the study into other DSD, when compared to the traditional sequential gene-by-gene methodology. Currently, 40 genes are analyzed, arranged into seven sub-panels: primary sex determination, sexual differentiation, steroidogenesis, male or female infertility associated with hypogonadotropic hypogonadism, and premature ovarian failure. To date, 58 patients with phenotypic and endocrinological features characteristic of these rare disorders (excluding CAH, not studied by NGS) have been studied using NGS. Eighteen pathogenic variants were identified in 15 patients, involving 10 different genes, along with one variant of uncertain clinical significance in the AR gene.

We concluded that NGS increased the detection rate of pathogenic variants and reduced turnaround time, significantly enhancing the molecular diagnosis of PDS, thereby contributing to more accurate clinical management, including genetic counselling and support for reproductive decision-making.

_Introdução

O desenvolvimento sexual normal, essencial em múltiplas vertentes do Homem, caracteriza-se por um processo sequencial e altamente regulado, iniciando-se após a fertilização do óvulo pelo espermatozoide, com o estabelecimento do sexo cromossómico. Compreende a diferenciação das gónadas primordiais em testículos ou em ovários, o desenvolvimento dos órgãos genitais internos e externos e a diferenciação sexual secundária, culminando na formação completa do fenótipo sexual do

indivíduo (masculino ou feminino). Alterações genéticas que perturbem qualquer uma destas etapas — seja em genes que desencadeiam ou regulam o desenvolvimento das gónadas, os restantes órgãos genitais internos ou externos, ou as vias de biossíntese ou a ação hormonal ou endocrinológica — podem comprometer o desenvolvimento sexual normal, originando manifestações patológicas designadas por patologias do desenvolvimento sexual (PDS).

Assim, as PDS constituem um grupo bastante heterogéneo de manifestações clínicas nas quais o sexo cromossómico, gonadal e/ou anatómico pode ser atípico. Estas patologias possuem elevada sobreposição fenotípica e a possibilidade de ocorrerem em diferentes fases do desenvolvimento humano, desde o período embrionário até à idade adulta — podendo ocorrer genitais externos ambíguos, disgenesia gonadal, virilização e masculinização antecipadas, puberdade precoce, tardia ou ausente, ginecomastia, infertilidade (sem manifestações fenotípicas aparentes), entre outras — o que dificulta o diagnóstico clínico, mas torna o diagnóstico molecular essencial, tanto para a orientação clínica adequada, como para uma melhor integração social e familiar, e até para a decisão reprodutiva de cada indivíduo. A sua prevalência global é estimada em cerca de 5 por 1000 nascimentos, embora varie significativamente entre os diferentes fenótipos: por exemplo, as hipospádias ocorrem em cerca de 1/250 nascimentos do sexo masculino, enquanto outras condições clínicas raras, como a disgenesia gonadal, podem variar de 1/20.000 a 50.000 nascimentos (1,2).

O estudo molecular das PDS, iniciou-se em 1991 no Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e, num primeiro período, compreendeu a caracterização de cromossomas Y estruturalmente anormais, presentes, predominantemente, em doentes com órgãos genitais externos indefinidos, em homens inférteis ou em doentes com síndrome de Turner. Posteriormente, e mantendo-se a abordagem anterior nos casos aplicáveis, a análise molecular expandiu-se para o estudo de diversos genes, refletindo à data a sua descoberta (ex. *SRY*, *AR*, *KAL1/ANOS1*, *GNRHR*), em doentes cujos fenótipos típicos de PDS careciam de identificação da sua causa primária, proporcionando um diagnóstico clínico mais objetivo.

Embora esta sinopse não aborde os estudos moleculares em homens inférteis, que compreendem a análise das regiões AZF do cromossoma Y implicadas na espermatogénese, realizados no DGH desde 1992, importa destacar os desenvolvimentos subsequentes da caracterização de deleções nestas regiões, nomeadamente o contributo pioneiro, em 2002, na identificação de microdeleções parciais em AZFc associadas a oligozoospermia e a subsequente caracterização da diversidade genómica das mesmas cujos resultados foram publicados em 2007 (3,4).

Merece ainda particular ênfase, o estudo molecular da hiperplasia suprarrenal congénita (CAH), associada a deficiência em 21-hidroxilase, iniciado pela primeira vez em Portugal no DGH em 2002, cujos primeiros resultados foram publicados a nível internacional em 2006 (5).

Nos últimos anos, a implementação da Sequenciação de Nova Geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), a qual proporciona o estudo simultâneo de múltiplos genes e de diferentes doentes com diferentes fenótipos, tem impulsionado de forma significativa o aprofundar do conhecimento sobre as causas genéticas que constituem a base molecular das doenças raras em causa, proporcionando tempos de resposta e custos significativamente inferiores, comparativamente às metodologias anteriormente usadas.

_Objetivos

Neste trabalho, pretendeu-se resumidamente contextualizar os estudos moleculares realizados no Departamento de Genética Humana (DGH) do INSA desde 1991 para diferentes patologias do desenvolvimento sexual (PDS), com incidência concisa nos resultados da análise molecular da hiperplasia suprarrenal congénita associada à deficiência em 21-hidroxilase, e analisar o impacto da implementação, em 2019, na Unidade de Genética Molecular do DGH, de uma abordagem multigénica por NGS no estudo mais alargado das PDS, em comparação com a metodologia clássica sequencial gene-a-gene.

Abordagem metodológica

Ao longo das diferentes décadas, acompanhando o conhecimento científico internacional e a evolução tecnológica, recorreu-se sempre às metodologias que proporcionavam os melhores resultados, entre as quais o *Southern blotting*, muito usado nos estudos iniciais, a PCR, a sequenciação de Sanger e o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que, embora numa abordagem monogénica de estudo dos principais genes, conduziram a resultados clinicamente relevantes e definitivos para muitos doentes.

A recente implementação da NGS, usando um painel multigénico customizado, o qual inclui 40 genes associados a PDS (excluindo o gene *CYP21A2* associado a CAH), organizados em subpainéis específicos (tabela 1), visou caracterizar, a nível molecular e, de forma abrangente, as doenças raras em causa. Esta nova metodologia tem sido realizada de acordo com o protocolo AmpliSeq (Illumina®). A validação inicial da mesma foi baseada no uso de 61 amostras controlo com a deteção de múltiplas variantes presentes nas

mesmas e em diferentes genes, variantes essas previamente identificadas pelas metodologias tradicionais acima referidas, tendo-se obtido uma sensibilidade e especificidade de 100%. Nos doentes estudados (58 casos índice) as variantes detetadas por NGS foram confirmadas por sequenciação de Sanger, assim como todas as regiões com cobertura <20x.

No âmbito da CAH realça-se o estudo, de âmbito nacional, de doentes maioritariamente diagnosticados desde o nascimento até antes de atingirem 18 anos, cuja genotipagem do gene *CYP21A2*, iniciada por *Southern-blotting*, PCR e sequenciação de Sanger evoluiu com a substituição da primeira metodologia pelo MLPA, mantendo-se as restantes duas. Estes doentes foram clinicamente classificados de acordo com as três formas da CAH, ou seja, CAH com perda de Sal (CAH-PS, n=83), forma simplesmente virilizante (CAH-SV, n=61) e forma não clássica (CAH-NC, n=267), totalizando 411 doentes.

Tabela 1: Painéis de genes para as patologias do desenvolvimento sexual concebidos para análise por sequenciação de nova geração.

Designação da patologia ou do painel	Painel de genes
Determinação primária do sexo	<i>ATRX, DHH, DMRT1, LHCGR, MAP3K1, NR0B1, NR5A1, SOX9, SRY, WNT4, WT1</i>
Diferenciação sexual	<i>AMH, AMHR2, AR, ATRX, BMP15, CYP17A1, CYP19A1, DHH, DMRT1, FSHR, HSD17B3, INSL3, LHCGR, MAMLD1, MAP3K1, NR0B1, NR5A1, RXFP2, SRD5A2, SRY, STAR, WT1</i>
Esteroidogénese	<i>CYP11A1, CYP11B1, CYP17A1, CYP19A1, HSD3B2, HSD17B3, NR0B1, NR5A1, POR, STAR</i>
Hipogonadismo hipogonadotrófico	<i>ANOS1, CHD7, FGFR1, GNRHR, IL17RD, LHCGR, NR0B1(DAX1), PROKR2, SOX10, SPRY4, TAC3</i>
Falência ovárica prematura	<i>BMP15, FOXL2, FSHR, LHCGR, NOBOX, NR5A1, WNT4</i>
Infertilidade masculina e Hipogonadismo hipogonadotrófico	<i>ADGRG2, ANOS1, CFTR, CHD7, DMRT1, FGFR1, FSHR, GNRHR, IL17RD, INSL3, LHCGR, NR0B1, NR5A1, PROKR2, RXFP2, SOX10, SPRY4, TAC3, TEX11</i>
Infertilidade feminina e Hipogonadismo hipogonadotrófico	<i>CHD7, FGFR1, FSHR, GNRHR, IL17RD, LHCGR, NR5A1, PROKR2, SOX10, SPRY4, TAC3</i>

Os resultados do estudo molecular dos doentes com CAH revelou uma enorme diversidade de genótipos, a qual é característica do gene em causa. Neste âmbito, as três alterações mais frequentes detetadas em *CYP21A2*, associadas às três formas da doença, foram: c.293-13C>G, associada a CAH-PS, c.518T>A, associada a CAH-SV, e c.844G>T, associada a CAH-NC. Estas alterações coincidem com os dados da literatura internacional para a população de origem caucasiana, tendo-se obtido também uma elevada taxa de correlação genótipo/fenótipo, similar ao descrito na literatura (CAH-PS: 87,9%; CAH-SV: 60,7% e CAH-NC: 71,9%).

_Discussão

A aplicação da NGS às PDS referidas, resultou numa melhoria substancial da taxa de diagnóstico molecular nos doentes em causa e evidenciou uma grande diversidade na natureza das variantes patogénicas identificadas (*frameshift*, *missense*, *nonsense*, *splicing*, inserção, deleção), confirmando a heterogeneidade genética subjacente a estas patologias, reflexo também da diversidade de genes analisados.

Um caso particularmente relevante foi o da doente PDS-NGS3, que apresentou um genótipo não descrito na literatura e associado a dois genes com modos de herança distintos, ou seja, a presença de duas variantes patogénicas: uma variante em homocigotia no gene *LHCGR* (autossómico recessivo) e uma variante em hemizigotia no *AR* (recessivo ligado ao cromossoma X). Ambas as alterações, isoladamente, seriam suficientes para explicar o fenótipo clínico apresentado. A concomitância destas alterações refletiu não só a complexidade genética envolvida, mas também a relevância de uma abordagem multi-génica, que permitiu a sua identificação.

A NGS possibilitou também a avaliação de risco em familiares dos doentes. No caso da doente 7, o padrão de hereditariedade, recessivo ligado ao cromossoma X, motivou o estudo familiar em contexto de consulta de genética médica, conduzindo à identificação da variante na mãe, não afetada, bem como a ausência da alteração familiar na tia materna. Também para a doente 6, cuja variante identificada no gene *NR5A1* está igualmente descrita em indivíduos 46,XX com menopausa precoce (PMID: 34095474), foi sugerido o estudo familiar, com vista à vigilância clínica preventiva dos seus familiares.

Considerando os resultados globais relativos a CAH, para além das alterações graves associadas de zero a ~3% de atividade enzimática identificada nas formas clássicas (CAH-PS e -SV), evidenciou-se que 30% dos doentes com CAH-NC possuem, num dos seus alelos, alterações graves, pelo que, quando pretenderem ter descendência, o respetivo casal (sendo essencial a genotipagem do gene *CYP21A2* no outro elemento do casal) poderá ter um risco de 25% de ter, em cada gravidez, descendentes afetados com as formas mais graves da doença. Nestes casos, com a contribuição da genética médica, poderá ser disponibilizado atempadamente ao casal o respetivo aconselhamento genético, assim como o diagnóstico pré-natal para identificação do sexo cromossómico e eventual genotipagem do feto para as alterações parentais. No caso do mesmo ser 46,XX e afetado para CAH-PS ou CAH-SV, a terapêutica endocrinológica, desde a idade embrionária adequada, é essencial para evitar a virilização dos seus órgãos genitais externos.

_Conclusões

A NGS constitui uma metodologia de primeira linha no contexto do diagnóstico molecular da diversidade das PDS, permitindo a análise simultânea de múltiplos genes, com aumento da taxa de deteção de variantes patogénicas, incluindo em genes não estudados por rotina numa primeira abordagem gene-a-gene. Permite, inclusivamente, a identificação de genótipos mais complexos, em que diversas alterações podem contribuir para o fenótipo, proporcionando, de forma célere, o estudo de doenças hereditárias digénicas e oligogénicas.

Comparativamente à análise sequencial gene-a-gene, a NGS oferece resultados mais rápidos e a custos inferiores, aumentando a probabilidade de se identificar a causa genética destas doenças e, conseqüentemente, estabelecer ou confirmar o diagnóstico clínico. Tal facto é determinante para reduzir o período de indefinição do diagnóstico a que estes doentes e famílias frequentemente são sujeitos, possibilitando a sua orientação clínica relativa a tratamento, opções reprodutivas e aconselhamento genético. Assim, a integração da NGS na prática clínica representa um avanço significativo na abordagem das patologias do desenvolvimento sexual, com impacto direto na gestão clínica dos doentes e seu aconselhamento, bem como na avaliação do risco familiar.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a todos os colaboradores do DGH do INSA, aos diversos médicos de outras instituições de saúde, assim como aos próprios doentes, que de forma direta ou indireta, contribuíram ao longo das últimas décadas, para implementar e desenvolver os estudos moleculares no âmbito das doenças raras em causa. Um agradecimento especial ao Doutor João Lavinha pelo desencadear dos estudos em causa, interesse científico, apoio e motivação contínuos.

Referências bibliográficas:

- (1) Kyriakou A, Lucas-Herald A, McGowan R, et al. Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management. *Adv Genomics Genet.* 2015;2025(5):165-77. <https://doi.org/10.2147/AGG.S53226>
- (2) Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, et al. ; LWPES Consensus Group; ESPE Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* 2006 Jul;91(7):554-63. Epub 2006 Apr 19. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.098319>
- (3) Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2002 Mar;8(3):286-98. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.3.286>
- (4) Navarro-Costa P, Pereira L, Alves C, et al. Characterizing partial AZFc deletions of the Y chromosome with amplicon-specific sequence markers. *BMC Genomics.* 2007 Sep 28;8:342. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-342>
- (5) Friães A, Rêgo AT, Aragüés JM, et al. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab.* 2006 May;88(1):58-65. Epub 2006 Jan 20. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.11.015>

Genómica funcional – a investigação do RNA mensageiro e da proteína dele resultante no âmbito da missão do Departamento de Genética Humana do INSA

Functional genomics – the investigation of messenger RNA and its resulting protein within the scope of the Department of Human Genetics's mission at INSA

Peter Jordan, Luísa Romão

peter.jordan@insa.min-saude.pt ; luisa.romao@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Os avanços dos últimos 50 anos na área da Genética Molecular permitiram um diagnóstico de doenças genéticas cada vez mais rápido e eficaz; no entanto, revelaram também que nem sempre pode a patogenicidade de variantes genéticas ser concluída somente pela análise da sequência do DNA. As consequências funcionais de uma variante genética são analisadas pela genómica funcional que inclui a análise do respetivo RNA mensageiro (mRNA). Neste artigo é descrito como o Departamento de Genética Humana do INSA desenvolveu linhas de investigação em genómica funcional, nomeadamente sobre o papel da degradação específica de mRNAs nas hemoglobinopatias, e sobre alterações no *splicing* do RNA pré-mensageiro associadas ao desenvolvimento do cancro.

A atividade destas linhas de investigação foi publicada em mais de 100 artigos em revistas científicas internacionais, e trouxe, ao longo destes anos, várias mais-valias para o DGH e as missões do INSA, incluindo *know-how* técnico, equipamentos inovadores, e resolução de problemas técnico-científicos no apoio à prestação de serviços diferenciados. Atualmente, a inovação tecnológica está a gerar cada vez maior capacidade de sequenciar genomas e leva a novas descobertas sobre a organização do genoma e o seu funcionamento. A genómica funcional continua a ser essencial para validar muitas destas descobertas ou as previsões computacionais do efeito de variantes genéticas.

_Abstract

Advances in molecular genetics over the last 50 years have enabled increasingly rapid and effective diagnosis of genetic diseases; however, they have also revealed that the pathogenicity of genetic variants cannot always be determined by DNA sequence analysis alone. The functional consequences of a genetic variant are analyzed through functional genomics, which includes analysis of its messenger RNA (mRNA).

Here we describe two lines of functional genomics research developed at Department of Human Genetics (DGH) of INSA, namely the role of specific mRNA degradation in hemoglobinopathies, and alterations in pre-messenger RNA splicing associated with cancer development.

The results from these research lines have been published in over 100 articles in international scientific journals and, over the years, has provided added value to the DGH and INSA's missions, including technical

know-how, innovative equipment, and the resolution of technical and scientific problems to support the provision of differentiated services. Currently, technological innovation is generating ever-increasing genome sequencing capacity and leading to new discoveries about genome organization and function. Functional genomics remains essential for validating many of these discoveries or the computational predictions of the effect of genetic variants.

_Introdução e enquadramento histórico da genómica funcional

Regressemos a 1975, o ano da fundação do Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). A nível mundial, a área da genética humana encontra-se ainda fortemente sustentada na citogenética, ou seja, num nível microscópico da análise de alterações genéticas que causam doença. A nível molecular, são analisadas apenas variações no padrão de fragmentos de DNA gerados por digestão com enzimas de restrição. No entanto, já estão em curso diversos esforços na comunidade para isolar e obter a sequência de genes individuais associados a doenças e, entre outros, são publicados a sequência do gene da beta-globina em 1980 (1), do primeiro oncogene, *HRAS*, em 1982 (2), ou dos genes supressores de tumores *APC* em 1991 (3) e *MSH2* em 1993 (4). Cresceu, assim, de forma decisiva a era da genética molecular, a qual o DGH também abraçou, reunindo investigadores e técnicos para desenvolver esta competência técnica pioneira em Portugal.

A necessidade de identificar e sequenciar genes na área biomédica culminou, em 1990, na implementação ambiciosa do projeto internacional de sequenciar todo o genoma humano. Como fruto deste esforço, incluindo muita inovação tecnológica em sequenciação genómica, grande parte da sequência do genoma humano ficou disponível em bases de dados públicas até 2004 (5). Enquanto o projeto de sequenciação do genoma ainda estava a ser concluído, as sequências, entretanto obtidas, foram sendo disponibilizadas publicamente, e o DGH também as utilizou para diagnosticar e investigar doenças genéticas; porém, no laboratório tornou-se evidente uma importante limitação: nem sempre era possível estabelecer, apenas com base na leitura da sequência de DNA, o carácter patogénico de alterações encontradas nos genes dos doentes. Nasceu, assim, a genómica funcional, ou seja, a análise dos produtos dos genes, nomeadamente o RNA mensageiro (mRNA) e a proteína por este codificado, para poder validar o impacto funcional das alterações genéticas observadas em amostras de doentes.

Com base neste quadro, o DGH investiu, já durante a década dos anos 90, em desenvolver a investigação em genómica funcional. Foram criadas linhas de investigação para estudar o papel do mRNA e da proteína na patogenicidade de doenças genéticas, incluindo por exemplo, as hemoglobinopatias e o cancro.

_Objetivo

Neste artigo são descritos linhas de investigação em genómica funcional que o Departamento de Genética Humana do INSA desenvolveu, nomeadamente sobre o papel da degradação específica de mRNAs nas hemoglobinopatias, e sobre alterações no *splicing* do RNA pré-mensageiro associadas ao desenvolvimento do cancro.

_A investigação em genómica funcional desenvolvida nas hemoglobinopatias

Ainda durante os anos 80, o DGH iniciou a progressiva transição das suas atividades da análise bioquímica e citoge-

nética para a biologia molecular, transição esta fomentada pelo investigador João Lavinha. Neste contexto, começou por investigar a base molecular das hemoglobinopatias na população Portuguesa. As hemoglobinopatias estão entre as doenças genéticas mais comuns no mundo e são prevalentes na costa do Mediterrâneo, sudeste Asiático, África e sul da China. Hemoglobinopatias são doenças hereditárias causadas por mutações nos genes das globinas que resultam na síntese anormal, ou ineficiente, da hemoglobina (Hb). Esta é responsável pelo transporte de oxigénio nos glóbulos vermelhos, sendo composta por cadeias alfa- e beta-globina. Um dos primeiros estudos das hemoglobinopatias no DGH foi o de uma família açoriana com doença da Hb H, na qual há uma produção deficiente de cadeias alfa-globina, resultando num excesso de cadeias beta-globina que agregam em tetrâmeros instáveis e levam à destruição prematura dos glóbulos vermelhos. Os primeiros estudos que se realizaram no DNA da doente com Hb H sugeriram que a base molecular da doença Hb H nesta família seria diferente daquelas descritas anteriormente (6). Com o objetivo de melhor compreender a base molecular deste caso atípico de Hb H, a investigadora Luísa Romão foi, no início de 1990, para o Howard Hughes Medical Institute, School of Medicine, University of Pennsylvania (Philadelphia, USA), para o laboratório do Prof. Steve Liebhaber, onde lhe foi possível demonstrar que este caso era devido à deleção de sequências reguladoras localizadas a montante dos genes da alfa-globina, levando ao silenciamento do gene apesar de este não ter sofrido nenhuma mutação (7).

Em 1992, Luísa Romão regressou ao INSA, onde alargou esta investigação às consequências funcionais de mutações *nonsense* nos genes da beta-globina associadas à beta-talassémia. Este projeto contou com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e permitiu concluir que as mutações *nonsense* podem afetar a estabilidade do mRNA dos correspondentes genes e, deste modo, induzir a sua degradação prematura (8). Estava assim implementada, no DGH, a era dos estudos funcionais e a criação de uma nova linha de investigação dedicada ao estudo do metabolismo do mRNA e doenças associadas.

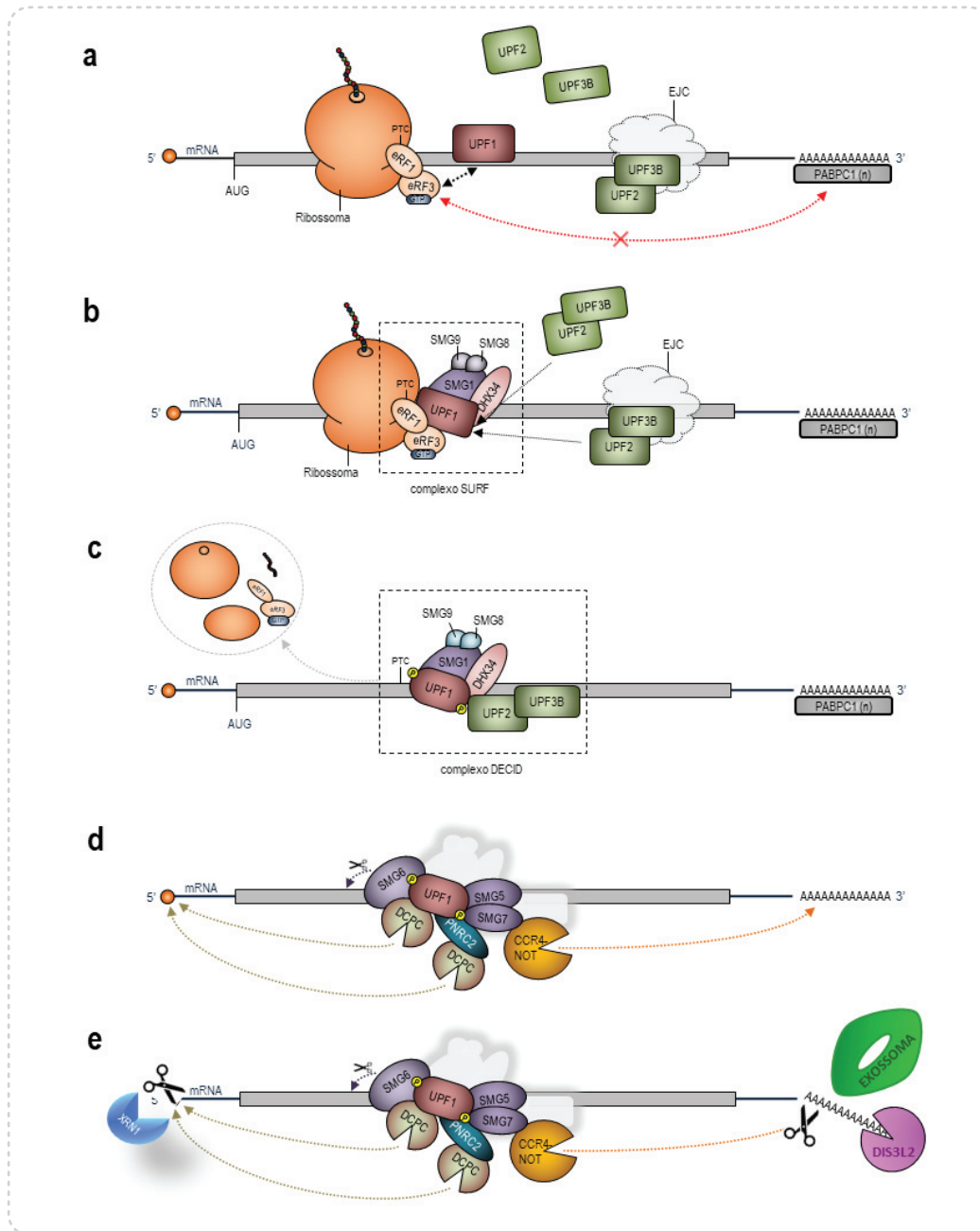
O metabolismo do mRNA engloba uma série de processos pós-transcricionais —processamento (inclui o *capping*, *splicing* e poliadenilação), transporte, tradução e degradação — que determinam o destino funcional de cada mRNA. Sabe-se hoje que os vários passos envolvidos no metabolismo do mRNA são altamente regulados na célula, o que permite maior controlo espaço-temporal da expressão génica. Para além disso, existem mecanismos de controlo de qualidade que asseguram a fidelidade da expressão génica, pois rapidamente detetam e degradam mRNAs aberrantes, incapazes de codificarem proteínas funcionais. Um dos interesses da investigadora Luísa Romão tem sido o estudo destes mecanismos de controlo de qualidade, nomeadamente o mecanismo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD; [figura 1](#)). O NMD permite à célula eliminar, seletiva e rapidamente, mRNAs derivados de genes portadores de mutações *nonsense* (que sinalizam o fim prematuro da tradução deste mRNA em proteína) e, desta forma, permite à célula prevenir a síntese e acumulação das respetivas proteínas truncadas potencialmente tóxicas.

Um dos resultados recentemente obtidos no estudo do NMD, pelo grupo da investigadora, com a colaboração do grupo do investigador Peter Jordan, mostrou que uma das enzimas envolvidas neste processo – a ribonuclease DIS3L2 ([figura 1](#)) – é também necessária para sustentar a proliferação e invasão das células de cancro colorretal ([9](#)). Este trabalho exemplifica como a identificação e caracterização dos mecanismos envolvidos no metabolismo do mRNA em associação com determinada doença genética, ou em processos de tumorigénese, permitem avançar no esclarecimento da etiopatofisiologia dessas doenças. Por outro lado, possibilitam o estabelecimento de novos biomarcadores com potencial aplicabilidade no rastreio, diagnóstico, prognóstico e/ou terapia deste tipo de doenças que, em muitos casos, são um problema de Saúde Pública.

Tal como acima referido, o metabolismo do mRNA também inclui a tradução da informação genética em proteína. Sabe-se hoje que, em condições de stress celular, como aquele que ocorre em células de cancro, este mecanismo

geral é inibido; no entanto, alguns mRNAs são traduzidos por meios alternativos, permitindo a sobrevivência das células. Estes processos ocorrem em mRNAs com características específicas, como *internal ribosome entry sites* (IRESs) ou *upstream open reading frames* (uORFs), elementos reguladores que mais de metade dos mRNAs humanos apresentam. A descoberta de alterações genéticas que criam ou interrompem estes elementos como causa de doença humana, ilustra a sua importante função na regulação da expressão génica. Neste contexto, é também objetivo da investigadora Luísa Romão estudar a função destes elementos em mecanismos de doença genética, ou em processos de tumorigénese. Um dos exemplos estudados é o do mRNA que codifica para a proteína humana oncogénica mTOR ([10](#)), que é sintetizada através dum IRES, para manter o seu nível de expressão em condições de stress celular, o que pode promover o desenvolvimento de diversas formas de cancro.

Figura 1: Representação simplificada do modelo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD).



- (a) Quando o ribossoma encontra um códon nonsense localizado a montante do último complexo proteico EJC depositado no mRNA, é estimulada a interação das proteínas UPF1 e eRF3 que induz a terminação prematura da síntese proteica.
- (b) Após essa interação, o complexo SURF é formado por várias proteínas (eRF1, eRF3, SMG1, SMG8, SMG9, DHX34 e UPF1).
- (c) Em seguida, UPF1 interage com UPF2-UPF3B, forma o complexo DECID e induz a dissociação das subunidades ribossomais.
- (d) O UPF1 desencadeia depois a degradação do mRNA, recrutando endonucleases (SMG6), desadenilases (CCR4-NOT), e o complexo de *decapping* (DCPC).
- (e) Finalmente, o mRNA é degradado pelas exoribonucleases DIS3L2 ou o complexo Exossoma para evitar que mRNAs portadores de mutações *nonsense* possam gerar proteínas disfuncionais e potencialmente tóxicas para a célula. Figura adaptada de ⁽¹¹⁾

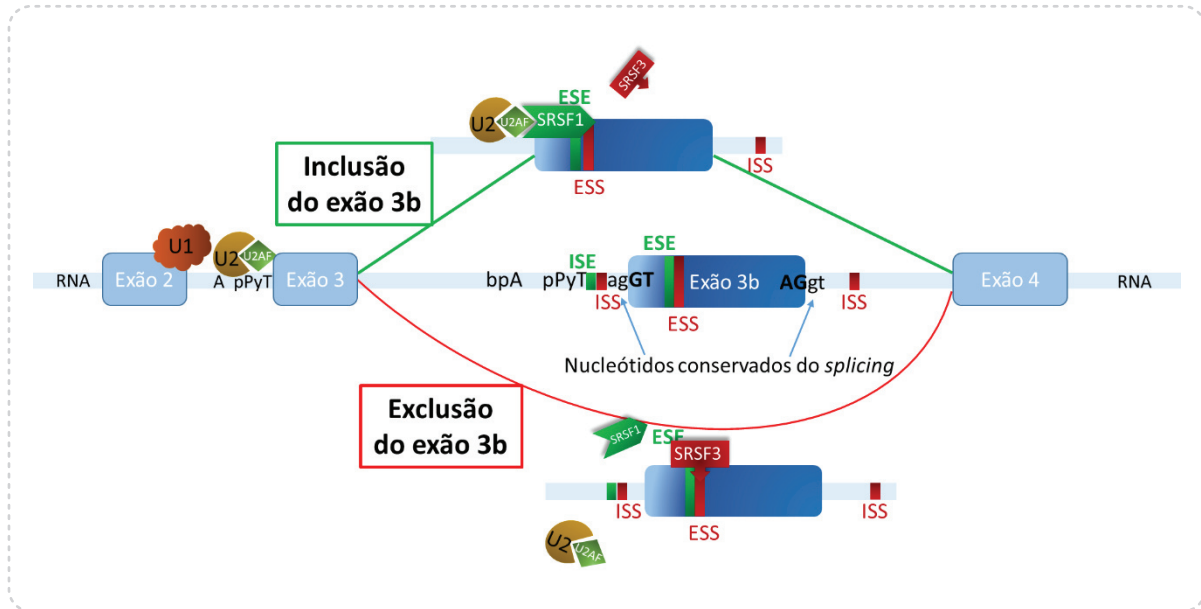
_A investigação em genómica funcional desenvolvida na área do cancro

O DGH foi pioneiro em lançar um estudo sobre a genética do cancro hereditário em Portugal, para identificar famílias afetadas pelo cancro familiar do cólon. O objetivo principal foi de poder oferecer um teste genético pré-sintomático a familiares e, assim, identificar indivíduos com risco aumentado de desenvolver cancro. O primeiro estudo multicêntrico, financiado em 1995 pelo programa PRAXIS XXI da JNICT/FCT, envolveu gastroenterologistas de vários hospitais nacionais que identificaram doentes com suspeita de história familiar e enviaram amostras de sangue para o estudo genético. A pesquisa de mutações focou inicialmente os genes *APC*, *MSH2* e *MLH1*, já identificados na literatura como causas de cancro hereditário. Eis que se tornou realidade no DGH a limitação metodológica referida acima: a dificuldade em determinar se algumas das alterações de sequência encontradas tinham de facto um carácter patogénico, nomeadamente quando a alteração encontrada no gene tinha o potencial para afetar o correto processamento do respetivo mRNA. Em princípio era simples: bastava verificar por análise dos respetivos mRNAs, se estes apresentavam um tamanho anormal; inesperadamente, porém, indivíduos saudáveis, que serviram de controlo experimental, também apresentavam padrões de mRNAs com diversos tamanhos (12). A análise molecular destas formas de mRNA revelou que a informação codificante de um gene poderia ser reunida de forma modular, como combinar peças individuais de *Legó*®. Este processo deve-se à estrutura dos genes humanos conterem a informação do código genético dividida em blocos (exões), interrompidos por sequências não-codificantes (intrões). Ambos são primeiro copiados do gene para formar o pré-mRNA, o qual de seguida, e ainda no núcleo da célula, sofre um processamento para juntar as regiões codificantes, designado por *splicing*. A observação experimental de que um gene poderá dar origem a diversos tamanhos de mRNA, culminou numa nova área de investigação, chamada *splicing* alternativo, ou seja, a capacidade inata dos nossos genes de gerar mais do que um mRNA em condições fisiológicas. Quais as funções, numa

célula normal, destas diversas isoformas de mRNA (designados como variantes de *splicing*)? Poderia este processo explicar porque é que os genes dos organismos multicelulares, ao contrário das bactérias, se apresentam subdivididos em regiões codificantes e não-codificantes?

A linha de investigação criada no DGH pelo investigador Peter Jordan tem revelado, ao longo dos últimos anos, duas consequências distintas devido ao *splicing* alternativo, que permitam uma maior flexibilidade de regulação do genoma de organismos multicelulares. Primeiro, há variantes de *splicing* que apresentam uma estabilidade diferente e são rapidamente degradadas, provocando rapidamente uma redução efetiva do produto funcional do gene. Trata-se de outra camada na regulação complexa dos nossos genes e os seus níveis de atividade. Segundo, há variantes que geram isoformas da proteína, codificadas pelo mesmo gene, mas estas agora diferem na sua atividade, regulação ou localização subcelular, por causa da inclusão ou omissão de uma parte da sequência codificante. O caso mais estudado no DGH, é a variante RAC1B que se encontra sobre-expressa num subtipo genético de tumores do cólon, nomeadamente os que apresentam uma mutação no oncogene BRAF (13). Este subtipo representa cerca de 15% de todos os casos de cancro do cólon esporádico. O trabalho desenvolvido no DGH identificou primeiro que a região do mRNA que determina qual é a variante produzida, está localizada diretamente na sequência destinada a ser incluída na variante RAC1B. De seguida, a equipa identificou qual a sequência de nucleótidos envolvida e pelo menos duas proteínas reguladoras de *splicing* que reconhecem estas sequências no núcleo da célula (14). A figura 2 resume os resultados desta investigação e ilustra as regras moleculares que regulam o processo do *splicing* alternativo em células humanas. Este conhecimento permitiu ainda investigar quando, e como, estas proteínas reguladoras do *splicing* são ativadas na célula cancerígena: foi concluído que a célula tumoral do cólon aumenta a expressão destas variantes pró-tumorais em resposta a estímulos inflamatórios provindos do microambiente celular que rodeia o tumor (15,16).

Figura 2: Regulação molecular do *splicing* alternativo do pre-mRNA do gene RAC1.



A regulação do *splicing* alternativo do exão 3b depende de fatores de *splicing*. Estes ligam-se a elementos curtos de sequência no RNA que intensificam (SE) ou silenciam (SS) o *splicing* e podem estar presentes no exão (ESE, ESS) ou nas regiões intrónicas adjacentes (ISE, ISS). No caso do RAC1B, um destes ESEs é reconhecido pelo fator de *splicing* SRSF1 que promove (parte superior do esquema) a junção produtiva do spliceossoma junto ao exão alternativo. Caso predomine o fator de *splicing* SRSF3 nas células, este irá ligar-se ao elemento silenciador (ESS) do exão 3b e inibir a formação do spliceossoma neste exão (parte inferior), resultando na sua exclusão do mRNA maduro e a ligação direta do exão 3 ao exão 4. A competição entre os fatores antagonistas SRSF1 ou SRSF3 depende dos seus níveis relativos de expressão na célula, ou da sua quantidade localizada no núcleo da célula, regulável por modificações transitientes e reversíveis destes fatores proteicos, como a fosforilação, em resposta a sinais exteriores que a célula recebe (p.ex., estímulos inflamatórios). Abreviaturas: U1 = partícula pequena de ribonucleoproteína nuclear (snRNP) U1, U2 = snRNP U2, U2AF = fatores auxiliares de snRNP U2, pPyT = trato de polipirimidina, bpA = adenina de conexão com a extremidade do intrão liberto, ESS/ISS = silenciador de *splicing* exónico/intrónico, ESE/IES = intensificador de *splicing* exónico/intrónico, SR = proteína da família SR.

Os resultados mais relevantes destes estudos serviram dois propósitos principais: por um lado, o aumento geral do conhecimento científico, pois os trabalhos foram internacionalmente citados como exemplos de alterações no processo do *splicing* alternativo que podem promover o desenvolvimento tumoral. Por outro lado, o *know-how* adquirido, permitiu desenhar experiências em células humanas, cultivadas em laboratório, para investigar a patogenicidade de uma dúzia de mutações de significado incerto que foram encontradas em famílias com síndrome de cancro hereditário. Com base nesta investigação, foram classificadas como patogénicas alterações encontradas nos genes *MLH1* (17) e *APC* (18). Os estudos permitiram ainda identificar e disseminar pela comunidade científica, através de publicações científicas, limitações técnicas nas metodologias utilizadas na prestação de serviços de rotina, e sugerir potenciais melhorias (12,19).

_Conclusões e perspectivas futuras

A atividade de investigação destes dois grupos resultou em 130 artigos publicados em revistas internacionais, e trouxe, ao longo destes anos, várias mais-valias para o DGH e as missões do INSA: (1) *know-how* de ponta em técnicas de biologia molecular e celular, (2) equipamentos inovadores, (3) pensamento crítico e capacidade de resolução de problemas técnico-científicos, (4) desenvolvimento de testes funcionais para ajudar a prestação de serviços diferenciados a determinar a patogenicidade de algumas alterações genéticas observadas em doentes.

A inovação tecnológica na análise de sequências nucleotídicas que ocorreu nos últimos 10 anos, levou à criação de uma unidade laboratorial de apoio especializado, com pessoal dedicado e capacidade de gerar grandes quantidades

de dados de sequenciação do DNA ou RNA em pouco tempo. A maior capacidade de sequenciar revelou novas descobertas sobre a organização do genoma e sobre o seu funcionamento. No entanto, será sempre necessário validar muitas das previsões computacionais através da genómica funcional e do desenvolvimento de ensaios funcionais com células em cultura ou organismos modelo. Fruto também das atividades de investigação, o DGH estará apto e preparado para enfrentar os novos desafios na área da Genética Humana.

Agradecimentos:

A todos os alunos e colaboradores dos referidos grupos de investigação que contribuíram para o progresso e sucesso dos trabalhos de investigação desenvolvidos. No total, foram concluídas 24 teses de Doutoramento e 35 dissertações de Mestrado desde 1990.

Referências bibliográficas:

- (1) Lawn RM, Efstratiadis A, O'Connell C, et al. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. *Cell*. 1980 Oct;21(3):647-51. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90428-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90428-6)
- (2) Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, et al. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature*. 1982 Dec 23;300(5894):762-5. <https://doi.org/10.1038/300762a0>
- (3) Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug 9;66(3):589-600. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90021-0)
- (4) Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):1027-38. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90546-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90546-3)
- (5) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
- (6) Romão L, Olim G, Martins MC, et al. Unusual molecular basis of Hb H disease in the Azores Islands, Portugal. *Hemoglobin*. 1990;14(6):607-16. <https://doi.org/10.3109/03630269009046969>
- (7) Romao L, Osorio-Almeida L, Higgs DR, et al. Alpha-thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha-globin structural genes. *Blood*. 1991 Sep 15;78(6):1589-95. <https://doi.org/10.1182/blood.V78.6.1589.1589>
- (8) Romão L, Inácio A, Santos S, et al. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2895-901. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.8.2895>
- (9) García-Moreno JF, Lacerda R, da Costa PJ, et al. DIS3L2 knockdown impairs key oncogenic properties of colorectal cancer cells via the mTOR signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2023 Jun 20;80(7):185. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04833-5>
- (10) Marques-Ramos A, Candeias MM, Menezes J, et al. Cap-independent translation ensures mTOR expression and function upon protein synthesis inhibition. *RNA*. 2017 Nov;23(11):1712-28. Epub 2017 Aug 18. <https://doi.org/10.1261/rna.063040.117>
- (11) Nogueira G, Fernandes R, García-Moreno JF, et al. Nonsense-mediated RNA decay and its bipolar function in cancer. *Mol Cancer*. 2021 Apr 29;20(1):72. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01364-0>
- (12) Clarke LA, Jordan P, Boavida MG. Cell type specificity in alternative splicing of the human mismatch repair gene hMSH2. *Eur J Hum Genet*. 2000 May;8(5):347-52. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200472>
- (13) Matos P, Oliveira C, Velho S, et al. B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology*. 2008 Sep;135(3):899-906. Epub 2008 May 22. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.052>
- (14) Gonçalves V, Matos P, Jordan P. Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and Wnt pathways. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 1;18(19):3696-707. Epub 2009 Jul 13. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp317>
- (15) Gonçalves V, Pereira JFS, Jordan P. Signaling Pathways Driving Aberrant Splicing in Cancer Cells. *Genes (Basel)*. 2017 Dec 29;9(1):9. <https://doi.org/10.3390/genes9010009>
- (16) Pereira JFS, Bessa C, Matos P, et al. Pro-Inflammatory Cytokines Trigger the Overexpression of Tumour-Related Splice Variant RAC1B in Polarized Colorectal Cells. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 9;14(6):1393. <https://doi.org/10.3390/cancers14061393>
- (17) Clarke LA, Veiga I, Isidro G, et al. Pathological exon skipping in an HNPCC proband with MLH1 splice acceptor site mutation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Dec;29(4):367-70. [https://doi.org/10.1002/1098-2264\(2000\)9999:9999::AID-GCC1051>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1098-2264(2000)9999:9999::AID-GCC1051>3.0.CO;2-V)
- (18) Gonçalves V, Theisen P, Antunes O, et al. A missense mutation in the APC tumor suppressor gene disrupts an ASF/SF2 splicing enhancer motif and causes pathogenic skipping of exon 14. *Mutat Res*. 2009 Mar 9;662(1-2):33-6. Epub 2008 Dec 6. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.12.001>
- (19) Clarke LA, Rebelo CS, Gonçalves J, et al. PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol*. 2001 Oct;54(5):351-3. <https://doi.org/10.1136/mp.54.5.351>

Análise genómica no Serviço Nacional de Saúde: modelo colaborativo INSA–ULSSM para implementação da análise de variantes patogénicas no exoma

Genomic analysis in the National Health Service: an INSA–ULSSM collaborative model for implementing the analysis of pathogenic variants in the exome

José Ferrão¹, Catarina Macedo², Lara Neto², Joana Mendonça¹, Sara Rangel¹, Hugo Martiniano³, Marta Soares², Sónia Custódio², Maria Rosário Santos², Ana Cristina Sousa², Ana Berta Sousa², Luís Vieira¹

luis.vieira@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Serviço de Genética. Departamento de Pediatria, Unidade Local de Saúde de Santa Maria, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Investigação. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Resumo

A sequenciação do exoma é, hoje em dia, um teste de primeira linha para um espectro alargado de doenças genéticas. No entanto, a natureza multidisciplinar deste teste requer o envolvimento de técnicos especializados em sequenciação, bioinformáticos, especialistas de genética laboratorial clínica e médicos geneticistas, que raramente se encontram numa mesma instituição de saúde. Neste sentido, desenvolveu-se um modelo de colaboração entre o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e a Unidade Local de Saúde de Santa Maria (ULSSM), com o objetivo de implementar um fluxo de trabalho completo para a análise rápida das variantes patogénicas no exoma.

A validação deste modelo envolveu a sequenciação e análise do exoma completo de 6 casos de doença genética, cujas alterações patogénicas tinham sido previamente determinadas por laboratórios externos acreditados.

Os resultados agora obtidos, sem conhecimento prévio dos anteriores, mostraram uma concordância total. Este modelo incorpora uma análise bioinformática totalmente automatizada e um algoritmo de seleção rápida das variantes priorizadas, o que aumenta a eficiência do processo de análise de dados e reduz o tempo de resposta.

A junção da capacidade de sequenciação massiva e bioinformática do INSA aos recursos especializados de interpretação e validação clínica de variantes da ULSSM, constitui um protótipo para uma integração ampla da sequenciação do exoma no Serviço Nacional de Saúde.

Abstract

Exome sequencing is currently a first-line test for a broad spectrum of genetic diseases. However, the multidisciplinary nature of this test requires the involvement of specialized sequencing technicians, bioinformaticians, clinical laboratory genetics specialists, and medical geneticists, who are rarely found in the same healthcare institution. To this end, a collaborative model was developed between the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge (INSA) and the Local Health Unit of Santa Maria (ULSSM), aiming to implement a complete workflow for the rapid analysis of pathogenic variants in the exome.

Validation of this model involved the sequencing and analysis of the whole exome of six cases of genetic disease, whose pathogenic alterations had been previously determined by accredited external laboratories.

The results obtained now, without prior knowledge of the previous results, showed complete agreement. This model incorporates fully automated bioinformatic analysis and a rapid selection algorithm for prioritized variants, which increase the efficiency of the data analysis process and reduce turnaround time.

The combination of INSA's massive sequencing and bioinformatics capabilities with specialized resources for interpretation and clinical validation of variants by ULSSM constitutes a prototype for broad integration of exome sequencing into the National Health Service.

Introdução

Durante as últimas duas décadas e meia, os métodos moleculares utilizados para o diagnóstico de patologias de base genética sofreram uma evolução muito significativa. Isto deveu-se ao desenvolvimento de tecnologias que possibilitaram transitar da análise de genes individuais para uma análise genómica global. A sequenciação do exoma é uma das principais aplicações da tecnologia de sequenciação de nova geração, e é atualmente utilizada como teste genético de primeira linha em condições clínicas muito diversas (1-3).

O exoma é formado pelo conjunto de genes que contêm informação para a produção de proteínas. Apesar da sequência completa do exoma humano constituir somente 1-2% da sequência genómica total, estima-se que contenha cerca de 85% das variantes genéticas associadas a doença. No entanto, atualmente, mais de 50% dos casos de suspeita de doença Mendeliana carecem de um diagnóstico molecular mesmo após a sequenciação do exoma. Alguns dos fatores

que contribuem para este insucesso parcial incluem limitações técnicas e metodológicas, compreensão incompleta da patogenicidade das variantes, ausência de associações genótipo-fenótipo, e a existência de interações complexas entre genes e ambiente (4).

A taxa de sucesso da sequenciação do exoma depende também do grau de otimização das várias etapas do fluxo de trabalho, nomeadamente dos procedimentos laboratoriais, das análises de dados (bioinformática) e da interpretação das variantes genéticas no contexto clínico. Além disso, o tempo de resposta é um aspeto de grande relevância no contexto assistencial, pelo que a automatização de algumas tarefas de elevada complexidade, como as relativas à análise bioinformática, é fundamental para encurtar o tempo necessário para um diagnóstico.

_Objetivo

Neste artigo descrevemos um modelo de trabalho colaborativo para a sequenciação, análise e interpretação de dados do exoma completo, e a sua validação através do estudo de 6 casos distintos de doença genética.

_Material e métodos

Neste trabalho foram incluídos 6 casos clínicos (HSM1-6) com etiologias genéticas distintas, acompanhados no Serviço de Genética da Unidade Local de Saúde de Santa Maria (ULSSM), para os quais tinham sido anteriormente determinadas as respetivas variantes causais por laboratórios externos acreditados. Para cada caso clínico foi definido um conjunto de termos da *Human Phenotype Ontology* (HPO), por um clínico sénior, especialista em Genética Médica, e independente ao estudo.

As tarefas de preparação de bibliotecas de exoma, sequenciação e bioinformática, foram realizadas na Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). As bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando um *kit* da *Twist Bioscience* e sequenciadas no sistema *NextSeq 2000*

(*Illumina*). A análise de dados foi automatizada e estruturada em análise primária (qualidade dos dados), secundária (chamada de variantes) e terciária (anotação e priorização de variantes), conforme representado na **figura 1**. A chamada de variantes foi efetuada usando o DRAGEN (*Illumina*) e a priorização foi efetuada utilizando o *Exomiser* (5), com inclusão dos termos HPO para cada caso clínico. Os ficheiros das diferentes etapas da análise bioinformática foram carregados no portal *INSA_genetics*, de acesso restrito aos autores deste estudo.

A interpretação e validação das variantes foi efetuada pela equipa do Serviço de Genética da ULSSM. Para tal, foi utilizada uma *checklist* metodológica estruturada para filtrar a lista de variantes priorizadas pelo *Exomiser*, tendo por base a qualidade de genótipo, o *gene combined score*, os valores dos preditores de patogenicidade das variantes, e o modo de hereditariedade. Finalmente, procedeu-se à curadoria clínica para correlacionar os fenótipos previamente associados às variantes identificadas com o fenótipo clínico dos 6 doentes.

Na **figura 2** ilustram-se as várias etapas do fluxo de trabalho e alguns dos principais parâmetros laboratoriais, métricas de qualidade dos dados, e critérios de interpretação de variantes e clínicos, que foram analisados por ambas as equipas em cada etapa.

Figura 1: Representação esquemática da *pipeline* de análise bioinformática automatizada, desde a obtenção das leituras de sequenciação até à disponibilização dos resultados no portal *INSA_genetics*.

Os programas utilizados e tipos de ficheiros principais estão indicados à direita.

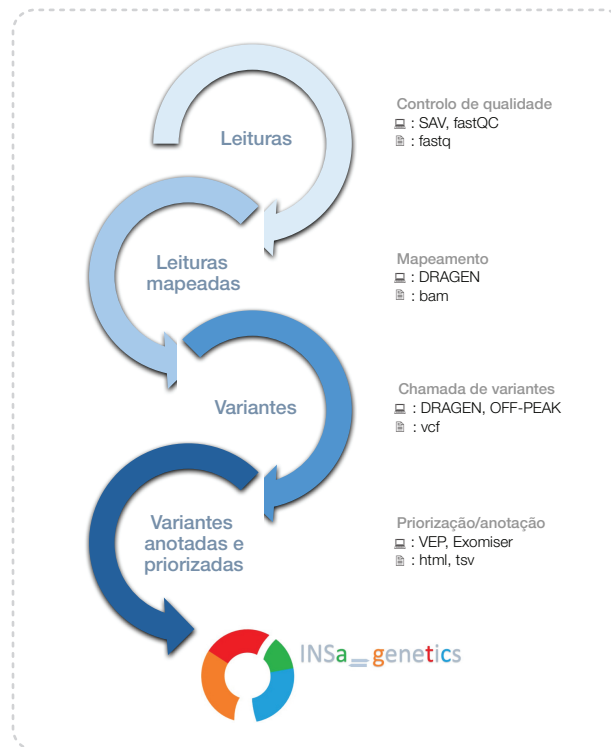


Figura 2: Diagrama representativo das etapas do modelo de trabalho colaborativo para a sequenciação e análise do exoma.

Nas respetivas etapas estão identificados alguns dos principais parâmetros laboratoriais, métricas de qualidade dos dados e critérios de interpretação de variantes e clínicos, cuja avaliação é relevante para garantir o sucesso final do diagnóstico.



Resultados

O tempo de duração do fluxo de trabalho foi inferior a 4 dias desde o início da etapa de preparação das bibliotecas, até à disponibilização de todos os resultados da análise bioinformática no portal *INSA_genetics*. As várias fases da análise de dados foram totalmente automatizadas, desde a geração dos ficheiros de leituras (*fastq*) até à obtenção das variantes priorizadas e anotadas, o que permitiu completar este processo num período de tempo inferior a 24 horas para todas as amostras em simultâneo. A **tabela 1** sumariza algumas das métricas de qualidade e de chamada de variantes obtidas nas 6 amostras.

O *Exomiser* priorizou uma média de 1482 variantes por caso clínico (intervalo: 1372-1821). A aplicação da *checklist* metodológica estruturada permitiu obter uma lista constituída por apenas 1 variante em 4 casos, 3 variantes num caso e 4 variantes noutra caso. Nos casos HSM1 e HSM2 foi identificada uma variante, em heterozigotia, com significado clínico incerto, associada a um gene com modo de hereditariedade autossómica dominante (AD). Nos casos HSM3 e HSM5, foi identificada uma variante, em heterozigotia, classificada como patogénica, num gene com modo de hereditariedade AD. No caso HSM6, foi identificada uma variante, em heterozigotia, com significado clínico incerto, associada a um

gene com modo de hereditariedade ligada ao X dominante. No caso HSM4, assumiu-se a possibilidade de um fenótipo composto, reportando-se uma variante, em heterozigotia, com significado clínico incerto, associada a um modo de hereditariedade AD e duas variantes em heterozigotia, no mesmo gene, com hereditariedade autossómica recessiva (AR), uma com significado clínico incerto e outra patogénica.

Estes resultados tiveram uma correspondência de 100% com o que havia sido reportado previamente pelos laboratórios externos acreditados. Em quatro casos, a variante identificada correspondeu àquela priorizada em primeiro lugar pelo *Exomiser*. Num quinto caso, a variante reportada encontrava-se priorizada na posição 2. No caso com fenótipo composto, a variante associada a hereditariedade AD foi priorizada em primeiro lugar, enquanto as variantes com modo de hereditariedade AR apenas surgiram na posição 27.

Tabela 1: Descrição das principais métricas de qualidade e de chamada de variantes nos 6 casos estudados.

	HSM1	HSM2	HSM3	HSM4	HSM5	HSM6
Número inicial de leituras (milhões)	132,9	95,7	98,7	119,6	106,3	98,5
Leituras mapeadas (%)	99,2	99,1	99,2	99,1	99,2	99,2
Enriquecimento de sequências-alvo (X)	35	33	33	33	34	34
Cobertura média nas regiões-alvo dos autossomas (X)	174	125	128	154	137	127
Número de leituras para a chamada de variantes (milhões)	93	69,6	69,7	83,5	76,4	70,5
Rácio transições/transversões (Ti/Tv)	2,5	2,6	2,6	2,6	2,5	2,6
Rácio variantes heterozigotia/homozigotia (Het/Hom)	1,6	2,1	1,6	1,7	1,7	1,6
Total de variantes do tipo SNV e indel	47842	54280	47329	47263	48129	47225
Total de variantes estruturais - DRAGEN	289	324	282	288	267	249
Total de variantes do tipo CNV - OFF-PEAK	109	213	104	111	124	95

SNV - single nucleotide variant ; CNV - copy number variant

_Discussão

O modelo de trabalho colaborativo para a sequenciação do exoma envolveu 3 etapas principais, que incluíram (i) a preparação de bibliotecas e sequenciação, (ii) o tratamento dos dados desde os ficheiros primários até à disponibilização dos resultados no portal *INSA_genetics*, e (iii) a interpretação clínico-patológica das variantes priorizadas. As primeiras duas etapas foram concluídas em apenas 4 dias, incluindo um período inferior a 24 horas para a obtenção de todos os ficheiros de resultados. A rapidez desta última etapa deveu-se à automatização completa da *pipeline* bioinformática, que usou os recursos de *hardware* e *software* do sequenciador para produzir os resultados da análise secundária, os quais foram automaticamente transferidos para um servidor local que completou a análise terciária e disponibilizou todos os ficheiros de resultados num portal dedicado.

No entanto, o tempo necessário para a interpretação e validação clínica dos resultados pode ser variável em função das variantes encontradas, da complexidade fenotípica e do grau de (in)certeza do diagnóstico clínico. Neste sentido, implementámos um algoritmo de seleção de variantes causais, após a priorização, com o objetivo de reduzir significativamente o número de variantes candidatas. Com base na correlação entre os fenótipos clínicos e as variantes filtradas, foi possível identificar as variantes causais nos 6 casos clínicos e demonstrar uma concordância total com os resultados obtidos previamente por laboratórios externos acreditados.

Contudo, apesar dos resultados promissores, é importante destacar que o *Exomiser* deve ser considerado como ferramenta complementar à análise clínica especializada, sendo indispensável a integração com dados fenotípicos detalhados, a revisão de bases de dados clínicas e da literatura científica, e a consulta da evidência funcional disponível.

Os casos incluídos neste estudo apresentam um viés de seleção, uma vez que a maioria (5/6) se enquadra numa categoria fenotípica, a das síndromes complexas (6), que na literatura está associada a um elevado rendimento diagnóstico, e beneficiou de uma caracterização clínica detalhada por um

especialista sénior em Genética Médica. Esta circunstância não é representativa da potencial população prescritora, habitualmente menos familiarizada com a utilização de termos HPO e com menor experiência na fenotipagem de síndromes complexas. Assim, perspetivamos alargar este modelo de trabalho a uma maior variedade de indicações clínicas e a um maior número de casos, fenotipados por diferentes clínicos.

_Conclusões

Este modelo colaborativo inédito entre o INSA e o Serviço de Genética da ULSSM constitui um marco na integração da sequenciação de exomas no Serviço Nacional de Saúde, aliando capacidade de sequenciação massiva e análise bioinformática e genómica aos recursos especializados de interpretação e validação clínica de variantes.

Representa, assim, um primeiro passo decisivo para tornar os diagnósticos genéticos mais rápidos, integrativos e multidisciplinares, em linha com os princípios da medicina de precisão e com a Estratégia Nacional para a Medicina Genómica.

Referências bibliográficas:

- (1) Artech-López A, Gómez Rodríguez MJ, Sánchez Calvin MT, et al. Towards a Change in the Diagnostic Algorithm of Autism Spectrum Disorders: Evidence Supporting Whole Exome Sequencing as a First-Tier Test. *Genes (Basel)*. 2021 Apr 12;12(4):560. <https://doi.org/10.3390/genes12040560>
- (2) Boonsimma P, Ittiwut C, Kamolvisit W, et al. Exome sequencing as first-tier genetic testing in infantile-onset pharmacoresistant epilepsy: diagnostic yield and treatment impact. *Eur J Hum Genet*. 2023 Feb;31(2):179-87. Epub 2022 Oct 5. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01202-x>
- (3) Xiang L, Deng A, Zhou J, et al. Diagnostic yield of trio exome sequencing as a first-tier test for identifying genetic causes of pregnancy loss. *J Hum Genet*. 2025 Jul 24. (Epub ahead of print) <https://doi.org/10.1038/s10038-025-01373-7>
- (4) Wojcik MH, Reuter CM, Marwaha S, et al. ; Genomics Research to Elucidate the Genetics of Rare Diseases (GREGoR) Consortium. Beyond the exome: What's next in diagnostic testing for Mendelian conditions. *Am J Hum Genet*. 2023 Aug 3;110(8):1229-48. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.06.009>
- (5) Smedley D, Jacobsen JO, Jäger M, et al. Next-generation diagnostics and disease-gene discovery with the Exomiser. *Nat Protoc*. 2015 Dec;10(12):2004-15. Epub 2015 Nov 12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.124>
- (6) Andersen PF, Ek J, Karstensen HG, et al. Diagnostic yield of whole exome sequencing in a cohort of 825 patients. *Eur J Med Genet*. 2025 Sep 2;78:105043. (Epub ahead of print) <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2025.105043>

Doenças genómicas no Departamento de Genética Humana do INSA: da resolução de mapa físico à medicina genómica personalizada

Genomic diseases at the Department of Human Genetics of INSA: from physical map resolution to personalized genomic medicine

Dezso David¹, Barbara Marques², Joana Fino¹, Andreas Gal³

dezso.david@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Citogenética. Departamento de Genética Humana, Instituto nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Professor Emérito, Instituto de Genética Humana do Centro Médico Universitário de Hamburgo-Eppendorf, Hamburgo, Alemanha

_Resumo

As doenças genómicas (DGs), resultantes de variantes estruturais (SVs) ou genómicas, apresentam diagnóstico clínico complexo. Podem ser simples ou complexas, equilibradas ou desequilibradas, associadas a doenças conhecidas ou a patologias ainda não descritas, constituindo recurso essencial para a anotação do genoma humano. A sua caracterização no DGH INSA acompanhou a evolução tecnológica, do mapa físico do genoma e arrays genómicos à sequenciação genómica (SG), culminando na medicina genómica de precisão (MGP).

A caracterização de SVs permitiu identificar genes afetados como: *ARHGEF6*, *TGFβ2*, *GLI2*, *TRPS1*, *PGK1*, *OAF*, *NECTIN1*, *FOXC1*, *ANKS1B*, *WDR26*, *YIPF5* e *CAMK2B*. Os mecanismos patogénicos mais comuns foram a disrupção génica e o efeito de posição.

A SG permitiu identificar, o espectro completo de variantes genómicas e genéticas, sendo a interpretação da patogenicidade o principal desafio. A implementação da MGP numa coorte de 28 casos simples e 13 complexos, integrando dados genómicos, expressão diferencial, análise de vias, correlação fenótipo-genótipo e fenotipagem reversa, permitiu o diagnóstico de mais de 80% dos casos, maioritariamente DGs, incluindo patologias ainda não descritas e mecanismos patogénicos adicionais. Esta abordagem poderá ser aplicada a todas as doenças raras e contribui para encurtar a odisseia do diagnóstico e para a melhoria dos cuidados de saúde dos doentes.

_Abstract

Genomic disorders (GDs) arise from structural variants (SVs) or genomic variants, detectable or not by cytogenomic analysis, and pose significant clinical diagnostic challenges. They can be simple or complex, balanced or unbalanced, associated with OMIM diseases or previously undescribed pathologies, and constitute an essential resource for human genome annotation. Their characterization at the DGH has evolved with technological advances, from the physical genome map and genomic array painting to genome sequencing (GS), culminating in Precision Genomic Medicine (PGM).

Characterization of SVs identified the following genes as affected: ARHGEF6, TGFβ2, GLI2, TRPS1, PGK1, OAF, FOXC1, NECTIN1, ANKS1B, WDR26, YIPF5, SPATC1L and CAMK2B. Gene disruption and position effect were the most frequent pathogenic mechanisms.

The GS enabled nucleotide-resolution detection of the full spectrum of genomic and genetic variants, with interpretation of pathogenicity remaining the main challenge. Implementation of PGM in a cohort of 28 simple and 13 complex cases, integrating genomic data, differential expression, pathway analysis, phenotype-genotype correlation, and reverse phenotyping, allowed diagnosis in >80% of cases, mostly GDs, including previously undescribed conditions and additional pathogenic mechanisms. Short-insert GS captured all pathogenetically relevant breakpoints and variants. This approach could be extended to all rare diseases and contributes to improving patient care.

_Introdução

As doenças genómicas (DGs) raras resultam de variantes cromossómicas estruturais (CSVs) ou de variações no número de cópias (CNVs), detetáveis ou não através de análise citogenómica. Estas variantes podem ser simples, com dois pontos de quebra, ou complexas, com múltiplos pontos de quebra, podendo apresentar-se de forma equilibrada ou desequilibrada. Frequentemente, estão associadas a doenças mendelianas e a síndromes clínicas descritas na base de dados OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), ou a condições ainda não descritas. O diagnóstico, sobretudo nos casos de CSV complexas ou de variantes potencialmente relacionadas com doenças até agora caracterizadas, continua a ser um desafio quando baseado apenas na avaliação clínica.

As variantes estruturais (SVs), nomeadamente as translocações recíprocas equilibradas, constituem recursos valiosos para a identificação de elementos genómicos patogénicos e dos fenótipos associados, contribuindo de forma significativa para a anotação do genoma humano mórbido, incluindo regiões codificantes e não codificantes. Durante décadas, a

cariotipagem convencional foi a abordagem de referência para deteção de CSVs e respetivos pontos de quebra, embora com resolução limitada (>5 Mb).

Antes da conclusão do Projeto Genoma Humano e do desenvolvimento das tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS), a caracterização das CSVs baseava-se principalmente na hibridação fluorescente *in situ* (FISH), com sondas de dimensão variável. (1) Após o desenvolvimento dos *microarrays* cromossómicos, em amplicões genómicos de derivados e *microarray painting*. (2)

Na ausência de resolução nucleotídica dos pontos de quebra e de perfis genómicos abrangentes capazes de integrar CNVs, variantes de nucleotídeo único (SNVs) e pequenas inserções/deleções (indels), a interpretação clínica das SVs é limitada. A introdução de diferentes bibliotecas de sequenciação genómica (SG) - incluindo de insertos longos (li), pares *mate-pair* (mp) e insertos curtos (si) - possibilitou a deteção em larga escala de variantes estruturais com resolução nucleotídica, abrindo caminho ao desenvolvimento da medicina genómica personalizada (MGP). (3-5)

_Objetivo

Este trabalho descreve a evolução da investigação em doenças genómicas (DGs) no Departamento de Genética Humana do INSA, antes e após a disponibilização da sequência completa do genoma humano e da sequenciação genómica (SG). Esta linha de investigação teve como objetivo contribuir para a anotação do genoma mórbido, através da identificação de elementos genómicos patogénicos, culminando na abordagem atual de medicina genómica de precisão baseada em SG, que encurta a odisseia do diagnóstico e contribui para a melhoria dos cuidados de saúde de indivíduos com DGs e das respetivas famílias.

_Material e métodos

Para a implementação da MGP foi estudada uma coorte composta por 41 probandos e respetivos familiares com diagnóstico clínico de DGs, caracterizados predominantemente por alterações do neurodesenvolvimento e anomalias congénitas, com ou sem dismorfismos craniofaciais. Estas condições estavam associadas a variantes estruturais simples (n=28) ou complexas (n=13).

A análise genómica incluiu três tipos de bibliotecas de sequenciação - *li*, *mp* e *si* - complementadas com a sequenciação de mRNA e lncRNA obtidos a partir de sangue periférico. Os métodos utilizados seguiram protocolos padronizados, de acordo com as instruções dos fabricantes. A informação detalhada sobre as metodologias encontra-se resumida na [tabela 1](#) e descrita nas publicações referenciadas.

_Resultados e discussão

A investigação desenvolvida acompanhou os avanços tecnológicos, evoluindo da identificação de genes candidatos através de abordagem baseada no mapeamento físico para as estratégias assentes na SG e na medicina personalizada.

Investigação de genes candidatos baseada no mapeamento físico

Na era do mapa físico genómico, os pontos de quebra nos cromossomas envolvidos em rearranjos associados a doença foram mapeados por FISH, recorrendo a cromossomas artificiais e a amplicões de PCR de longo alcance, específicos para cada marcador STS (*Sequence Tagged Sites*) ([figura 1A](#)). A identificação com resolução nucleotídica foi realizada por sequenciação de Sanger ([tabela 1](#)). Com esta abordagem foi possível identificar os seguintes genes:

– *ARHGEF6* (OMIM *300267) – Identificado como interrompido no IVS 10 pelo ponto de quebra em Xq26, sendo responsável pela perturbação do desenvolvimento intelectual ligada ao X tipo 46 (XLID46; OMIM #300436). (6)

– *TGFβ2* (OMIM *190220) – Identificado como provavelmente sujeito a um efeito de posição no ponto de quebra em 1q41, resultante da translocação familiar t(1;7)(q41;p21) associada à Anomalia de Peter familiar. Por seu turno, o gene interrompido pelo ponto de quebra em 7p21 foi o *HDAC9* (OMIM *606543), atualmente associado à síndrome aurículo-condilar autossómica dominante (AD), tipo 4 (ARCND4, OMIM #620457). (1)

– *GLI2* (OMIM *165230) – Num feto com ectrodactilia, foi identificada uma translocação t(2;11)(q14.2;q14.2)dn, com o ponto de quebra na região intergénica entre *INHBB* (OMIM *147390) e *GLI2*. Este último está associado à síndrome AD Culler-Jones (CJS, OMIM #615849), caracterizada, entre outros por polidactilia pós-axial dos pés, e à HPE9 (OMIM #610829). O mecanismo proposto foi um efeito de posição sobre *GLI2*, com impacto na regulação espaço-temporal. (7)

Posteriormente, a separação dos cromossomas derivados por citometria de fluxo, seguida da amplificação dos mesmos e do mapeamento dos pontos de quebra através de pintura de *microarrays* cromossómicos, facilitou o mapeamento destes CSVs (figura 1B e tabela 1).

Esta abordagem permitiu identificar os seguintes genes afetados (tabela 1):

– *TRPS1* (OMIM *604386) – Primeiro caso descrito de síndrome trico-rino-falângica, tipo I (TRPSI, OMIM #1903501) associada a t(8;13)(q23.3;q21.31)fam. Propôs-se como mecanismo patogénico a relocação de um elemento regulador em *cis* proveniente da região do cromossoma 13 para a região 5' do *TRPS1*, conduzindo à sua sobre-expressão. A gravidade e expansão fenotípica no doente índice permanecem por esclarecer. (2)

– *PGK1* (OMIM *311800) – Foram necessárias análises moleculares e funcionais detalhadas para demonstrar que o fenótipo anteriormente atribuído à t(3;14)(q26.33;q12) e à disrupção do *NUBPL* (OMIM *613621) se devia, na realidade, a uma nova SNV no gene *PGK1* (ENST00000373316.5: c.358G>A, p.E120K), causadora de deficiência de *PGK1* (OMIM #300653). Este caso evidencia as dificuldades do diagnóstico clínico de uma forma grave da deficiência e a complexidade em distinguir as manifestações diretamente associadas à deficiência de *PGK1* daquelas resultantes da evolução clínica da doença. (8)

– *OAF* (OMIM *621070) e *NECTIN1* (OMIM *600644) – Foi identificada uma translocação equilibrada t(11;18)(q23.3;q11.2)dn, num indivíduo com anomalias oculares e défice neurológico (disgenesia queratolenticular e *ectopia lentis*). O ponto de quebra em 11q23.3 resulta numa redução da expressão deste regulador transcricional *OAF*. Já a *NECTIN1* ligada a defeitos oculares congénitos e localizada 500 kb a montante deste ponto de quebra, apresenta níveis de expressão aumentada. (9)

– *FOXC1* (OMIM *601090) – O cromossoma 6 em anel [r(6)], que resulta numa microdeleção de 1880 kb em 6p25.3, está associado a disgenesia do segmento anterior e outras anomalias. O fenótipo observado é principalmente atribuível a haploinsuficiência de *FOXC1*. (10)

Tabela 1: ⬇️ Variantes estruturais associadas a doenças genómicas descritas nos últimos 25 anos.

Case	Metodologias	Patologia	Gene(s) candidatos / efeito	Ref.
Baseada em mapeamento físico				
t(X;21)(q26;p11)dn	FISH, Sequenciação Sanger	XLID46 (OMIM #300436)	<i>ARHGEF6</i> – disrupção do gene	(6)
t(1;7)(q41;p21)fam	Citogenética, FISH	Anomalia de Peter	<i>TGFβ2</i> – efeito de posição	(1)
t(2;11)(q14.2;q14.2)dn	Citogenética, FISH	Ectrodactilia	<i>GLI2</i> – efeito de posição	(7)
t(8;13)(q23.3;q21.31)fam	Isolamento de der, Pintura de array	TRPS1 (OMIM #190350)	<i>TPRS1</i> – efeito de posição	(2)
t(3;14)(q26.33;q12)fam	Isolamento de der, Pintura de array, WES, Estudo funcional	Deficiência de PGK1 (OMIM #300653)	<i>PGK1</i> c.358G>A, p.E120K	(8)
t(11;18)(q23.3;q11.2)dn	FISH, Isolamento de der, Estudos de expressão em humanos e murganhos, TADs	Anomalias oculares e défice neurológico	<i>OAF</i> – disrupção; <i>NECTIN1</i> – efeito de posição	(9)
r(6)(p24q25)	CMA	ASGD3 (OMIM #601631)	<i>FOXC1</i> – deleção	(10)
Baseada na SG e na MGP				
t(12;17)(q23.1;q21.33)dn ^a	liGS, Sequenciação Sanger	Síndrome de haploinsuficiência do <i>ANKS1B</i>	<i>ANKS1B</i> – disrupção do gene	(11)
t(1;3)(q24.11;p25.3)dn ^a	liGS, Sequenciação Sanger	SKDEAS (OMIM #617616)	<i>WDR26</i> – disrupção do gene	
t(16;17)(q24;q21.3)dn ^a	liGS, Sequenciação Sanger	KBGS (OMIM #148050)	<i>ANKRD11</i> – disrupção do gene	
t(2;19)(p13;q13.1)dn ^a	liGS, Sequenciação Sanger	Assintomático	NA	
MGP – SVs, CNVs, SNVs, indels, expansões de repetições e genoma mitocondrial				
t(17;19)(p13;p13.3)	liGS, Sequenciação Sanger, Array CGH, WES	SIHIWES (OMIM #617159)	<i>CHD4</i> – c.4442delG, p.(G1481Vfs*21)	(12)
t(5;9)(q31.3;p13)	liGS, siGS; Sequenciação Sanger	Infertilidade	<i>YIPF5</i> – efeito de posição	(13)
t(4;21)(p14;q21.3)	liGS, SIGS, Sequenciação Sanger	Infertilidade	<i>SPATC1L</i> – efeito de posição	
t(7;22)(p13;q13.1)dn	mpGS, Sequenciação Sanger	Infertilidade; MRD54 (OMIM #617799) ^b	<i>CAMK2B</i> – disrupção do gene	
11 CSVs simples, 5 inversões simples, 1 cromossoma supranumerário	siGS, liGS, RNA-Seq, Análise fenotípica comparativa e reversa	Alterações do neurodesenvolvimento e Anomalias congénitas	trans-heterozigidade ^c variantes genéticas	(14) ^d

^a Variantes identificadas no decurso de diagnóstico pré-natal convencional;

^b A infertilidade é atribuível à translocação, enquanto a perturbação do desenvolvimento intelectual resulta da disrupção de *CAMK2B*;

^c Corresponde a uma trans-heterozigotia fenotípica digénica, decorrente da disrupção de *ODAD2* em associação com uma SNV em *CFTR*;

^d Manuscrito em processo de revisão

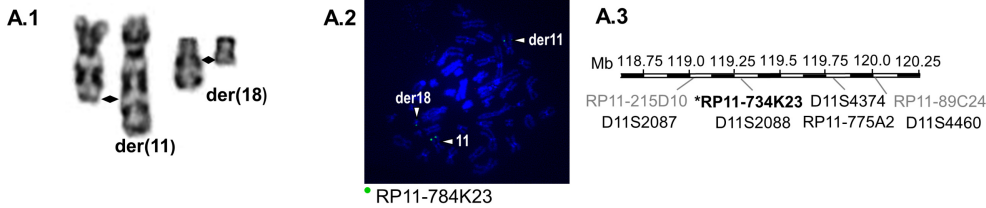
WES - Sequenciação do exoma completo; CMA - Análise de microarray cromossómico; dn - *de novo*; fam - familiar; FISH - Hibridação *in situ* Fluorescente;

Array CGH - Hibridação Genómica Comparativa por Array; der - cromossoma derivado; liGS - sequenciação genómica de insertos longos;

siGS - sequenciação genómica de insertos curtos; mpGS - sequenciação *made-pair*; CNV - Variação do número de cópias; RNA seq - sequenciação de RNA; NA - não aplicável.

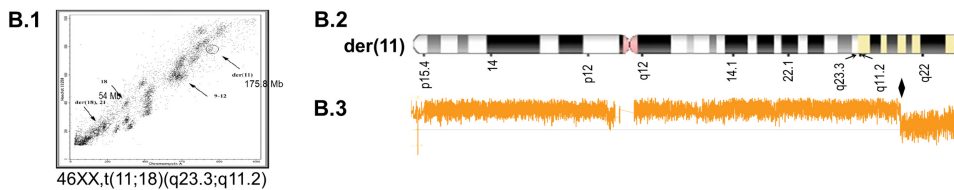
Figura 1: Identificação dos pontos de quebra por diferentes abordagens.

A. Mapeamento por FISH com base no mapa físico genómico



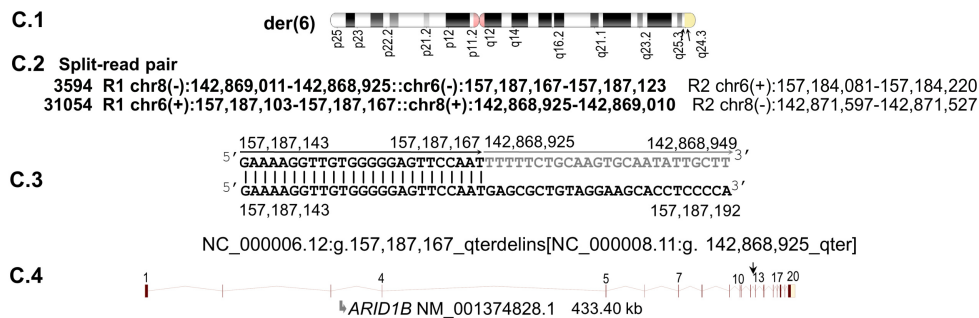
A) Mapeamento por FISH com base no mapa físico genómico.
A.1) Cariótipo parcial da t(11;18)(q23.3;q11.2)dn.
A.2) Mapeamento do ponto de quebra no cromossoma 11 por FISH utilizando o clone RP11-784K23.
A.3) Esquema do mapa físico da região com marcadores STS e clones BAC utilizados em FISH.

B. Mapeamento por isolamento dos derivados e microarrays



B) Mapeamento por isolamento de derivados e microarrays.
B.1) Cromossomas derivados isolados por citometria de fluxo. As setas indicam os grupos de cromossomas e os derivados, separados principalmente de acordo com os tamanhos dos mesmos.
B.2) Ideograma do cromossoma der(11), com os pontos de quebra indicados por setas.
B.3) Identificação dos pontos de quebra (losango) com amplicon genómico do der(11) de 175,8 Mb, utilizado como sonda para chromosome painting.

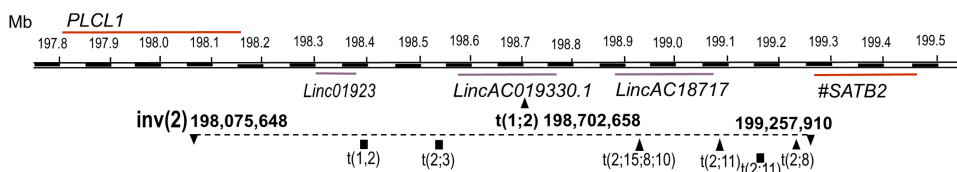
C. Identificação do ponto de quebra por sequenciação genómica – Disrupção génica



C) Sequenciação genómica.
C.1) Ideograma do der(6).
C.2) Pares de leitura que definem o ponto de quebra ao nível da sequencia genómica, com a sequencia de junção em negrito, enquanto a posição do ponto de quebra está indicada por dois-pontos duplos (::).
C.3) Localização do ponto de quebra ao nível nucleotídico e designação de acordo com o sistema ISCN 2020.
C.4) Disrupção do ARID1B no intrão 12.

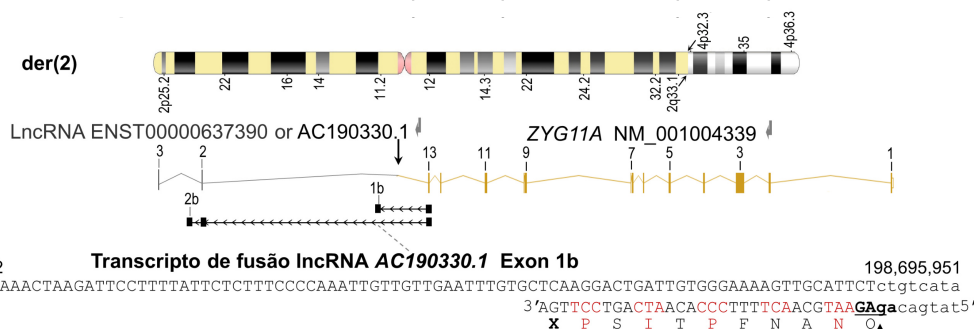
Figura 2: Exemplos de mecanismos patogénicos.

A. Efeito de posição cromossómica sobre o SATB2



A) Efeito de posição cromossómica em SATB2. Mapa físico da região com genes codificantes e não codificantes, pontos de quebra da t(1;2) e da inv(2) identificados neste estudo e os previamente publicados.

B. Transcrito quimérico entre o ZYG11A (exão 13) e AC190330.1 (exão 1b)



B) Transcritos quiméricos entre o exão 13 de ZYG11A e o exão 1b de lncRNA AC190330.1, presumivelmente não funcionais.

Medicina genómica personalizada baseada em sequenciação genómica

Com as metodologias de SG que aplicamos, o número médio de CSVs e CNVs por caso, nas bibliotecas lIGS, mpGS e siGS, foi de 371389 e 1632, respetivamente, num total de 1851 CSVs e 17732 CNVs entre todos os indivíduos analisados; enquanto o número médio de SNVs e indels nas bibliotecas siGS e mpGS foi de 4162 milhões e 3808 milhões, respetivamente. Devido sobretudo à anotação ainda insuficiente do genoma humano mórbido, à sobreposição fenotípica de variantes genómicas e genéticas distintas que co-segregam no mesmo indivíduo e a potenciais efeitos cumulativos, a principal dificuldade atual não se encontra na identificação destas variantes, mas sim na interpretação da sua patogenicidade e relevância clínica.

A abordagem desenvolvida integrou dados genómicos e de expressão génica diferencial, análise de vias KEGG de interações moleculares, fenotipagem abrangente - incluindo a comparação sistemática dos fenótipos clínicos -, bem como dados genómicos convergentes e a correlação fenótipo-genótipo, culminando na confirmação através de fenotipagem reversa.

Dos 28 probandos analisados, 19 foram diagnosticados com doenças descritas na OMIM e cinco apresentaram patologias humanas ainda não descritas. Dois terços dos casos diagnosticados correspondem a DGs, enquanto os restantes foram atribuídos a variantes genéticas do tipo SNV e indels ou a outros mecanismos.

Os mecanismos patogénicos identificados (**figura 1C, 2A e 2B**) incluem: i) disrupção génica causada por pontos de quebra; ii) efeitos de posição, incluindo o causado por uma inversão críptica; iii) transcritos quiméricos ou de fusão presumivelmente não funcionais; iv) trans-heterozigotia digénica composta por diferentes tipos de variantes; e v) efeito de posição associado a inativação não aleatória, com expansão da inativação para a região autossómica. **(11,14)**

Entre os casos complexos, cinco foram reclassificados, tendo inicialmente sido considerados citogeneticamente simples; os restantes foram confirmados como complexos. Estes casos apresentaram, na sua maioria, desequilíbrios genómicos, envolvendo múltiplos tipos de variantes cromossómicas, diferentes pontos de quebra e genes afetados. Dada a sua complexidade e os potenciais efeitos cumulativos, a correlação fenótipo-genótipo revelou-se particularmente desafiante.

_Conclusões

Os objetivos deste trabalho consistiram em identificar genes candidatos associados a doenças e os respetivos mecanismos patogénicos, contribuindo simultaneamente para a anotação do genoma humano mórbido e para a otimização dos cuidados de saúde de indivíduos com DG e dos seus familiares.

Através da abordagem de MGP, implementámos a identificação do espectro completo de variantes estruturais e pequenas variantes genéticas, subjacentes aos fenótipos observados, elucidámos os seus mecanismos moleculares e avaliámos a utilidade diagnóstica de uma abordagem integrativa, incluindo RNA-Seq.

Os resultados demonstram que a abordagem de MGP proporciona uma taxa de diagnóstico elevada das DGs (acima de 80%), reduz a "odisseia diagnóstica" e contribui para a anotação funcional das regiões codificantes e não codificantes do genoma mórbido. Para além disso, a estratégia implementada é aplicável a outros grupos de patologias, nomeadamente doenças raras não diagnosticadas.

Agradecimentos:

Agradecemos a todos os participantes destes estudos; aos membros do Grupo de Investigação em Doenças Genómicas do DGH do INSA pelo contributo na execução dos trabalhos; aos grupos responsáveis pela produção das bibliotecas e aquisição dos dados de sequenciação; aos nossos colaboradores nacionais e internacionais; à FCT e ao INSA, pelo financiamento da investigação.

Referências bibliográficas:

- (1) David D, Cardoso J, Marques B, et al. Molecular characterization of a familial translocation implicates disruption of HDAC9 and possible position effect on TGFBeta2 in the pathogenesis of Peters' anomaly. *Genomics*. 2003 May; 81(5):489-503. [http://doi.org/10.1016/s0888-7543\(03\)00046-6](http://doi.org/10.1016/s0888-7543(03)00046-6)
- (2) David D, Marques B, Ferreira C, et al. Co-segregation of trichorhinophalangeal syndrome with a t(8;13)(q23.3;q21.31) familial translocation that appears to increase TRPS1 gene expression. *Hum Genet*. 2013 Nov; 132(11):1287-99. <http://doi.org/10.1007/s00439-013-1333-0>
- (3) Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, et al. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. *Am J Hum Genet*. 2011 Apr 08; 88(4):469-81. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.03.013>
- (4) Dong Z, Qian J, Law TSM, et al. Mate-pair genome sequencing reveals structural variants for idiopathic male infertility. *Hum Genet*. 2023 Mar;142(3):363-77. <http://doi.org/10.1007/s00439-022-02510-4>
- (5) Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008 Nov 6; 456(7218):53-59. <http://doi.org/10.1038/nature07517>
- (6) Kutsche K, Yntema H, Brandt A, et al. Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet*. 2000 Oct; 26(2):247-50. <http://doi.org/10.1038/80002>
- (7) David D, Marques B, Ferreira C, et al. Characterization of two ectrodactyly-associated translocation breakpoints separated by 2.5 Mb on chromosome 2q14.1-q14.2. *Eur J Hum Genet*. 2009 Aug; 17(8):1024-33. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2009.2>
- (8) David D, Almeida LS, Maggi M, et al. Clinical severity of PGK1 deficiency due to a novel p.E120K substitution is exacerbated by co-inheritance of a subclinical translocation t(3;14)(q26.33;q12), disrupting NUBPL Gene. *JIMD Rep*. 2015 Mar 27; 23:55-65. http://doi.org/10.1007/8904_2015_427
- (9) David D, Anand D, Araújo C, et al. Identification of OAF and PVRL1 as candidate genes for an ocular anomaly characterized by Peters anomaly type 2 and ectopia lentis. *Exp Eye Res*. 2018 Mar; 168:161-70. <http://doi.org/10.1016/j.exer.2017.12.012>
- (10) Corona-Rivera JR, Corona-Rivera A, Zepeda-Romero LC, et al. Ring chromosome 6 in a child with anterior segment dysgenesis and review of its overlap with other FOXC1 deletion phenotypes. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2019 Sep; 59(5):174-78. <http://doi.org/10.1111/cga>
- (11) David D, Freixo JP, Fino J, et al. Comprehensive clinically oriented workflow for nucleotide level resolution and interpretation in prenatal diagnosis of de novo apparently balanced chromosomal translocations in their genomic landscape. *Hum Genet*. 2020 Apr; 139(4):531-43. <http://doi.org/10.1007/s00439-020-02121-x>
- (12) Da Silva JD, Oliva-Teles N, Tkachenko N, et al. Novel frameshift CHD4 variant leading to Sifrim-Hitz-Weiss syndrome in a proband with a subclinical familial t(17;19) and a large dup(2)(q14.3q21.1). *Biomedicines*. 2022 Dec 21; 11(1):12. <http://doi.org/10.3390/biomedicines11010012>
- (13) David D, Fino J, Oliveira R, et al. Balanced chromosomal rearrangements implicate YIPF5 and SPATC1L in non-obstructive oligoasthenozoospermia and oligozoospermia and of a derivative chromosome 22 in recurrent miscarriage. *Gene*. 2023 Dec 15; 887:147737. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147737>
- (14) David D, Fino J, Rodrigues M, et al. A personalized genomic medicine approach to rare genomic disorders associated with simple chromosomal structural variants. *HGG Adv*. In press 2025

Biomonitorização humana e genotoxicidade ambiental: quatro décadas de investigação translacional sobre interação gene-ambiente e seu impacto em saúde pública

Human biomonitoring and environmental genotoxicity: four decades of translational research on gene-environment interplay and its public health impact

Henriqueta Louro, Célia Ventura, Nádia Vital, Ana Tavares, Maria João Silva

m.joao.silva@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A exposição a agentes químicos, físicos e biológicos é ubiqüitária e pode ter impacto na saúde humana. A biomonitorização humana (BMH) tem assumido um crescente papel de relevo na avaliação da exposição humana a esses xenobióticos, na medida em que permite quantificar a exposição interna aos agentes em estudo, bem como avaliar precocemente os seus efeitos. Desde a sua formação no Departamento de Genética Humana que o grupo de investigação em Toxicologia Genética tem conduzido estudos de BMH, maioritariamente em ambiente ocupacional. Os diversos estudos, revisitados neste trabalho, têm fornecido suporte para a recomendação de medidas de mitigação, dado que têm permitido identificar precocemente efeitos genotóxicos associados à exposição, efeitos esses que se poderão traduzir em doença, a longo prazo. Contudo, considerando a sua logística complexa, morosidade e custos, a investigação paralela recorrendo a modelos experimentais *in vitro* ou *in vivo* tem sido crucial para a caracterização da genotoxicidade de químicos e para elucidar os mecanismos associados, para além de alicerçar o desenvolvimento de novos biomarcadores de efeito, baseados em abordagens mecanísticas e com recurso a tecnologias mais avançadas. Globalmente, a investigação nesta área tem progredido no sentido de uma crescente capacidade preventiva e preditiva, indissociável das prioridades da Genética Humana, encontrando tradução em regulamentação e no apoio a novas políticas de saúde e ambiente, com ganhos em saúde pública.

_Abstract

Exposure to chemical, physical, and biological agents is ubiquitous and can impact human health. Human biomonitoring (HBM) has assumed an increasingly important role in assessing human exposure to those xenobiotics, as it allows for the quantification of internal exposure to the agents under study and the assessment of their early effects. Since its formation in the Department of Human Genetics, the Genetic Toxicology research group has conducted HBM studies, primarily in occupational settings. The various studies, reviewed in this work, have supported the recommendation of mitigation measures, as they have allowed for the early identification of genotoxic effects associated with exposure, which may translate into long-term disease. However, given its complex logistics, time-consuming nature, and cost, parallel research using *in vitro* or *in vivo* experimental models has been crucial for characterizing the genotoxicity of chemicals and elucidating the associated mechanisms, in addition to supporting the development of new biomarkers of effect, based on mechanistic approaches and utilizing more advanced technologies. Globally, research in this area has progressed towards a growing preventive and

predictive capacity, inseparable from the priorities of Human Genetics, finding translation into regulation and support for new health and environmental policies, with gains in public health.

_Introdução

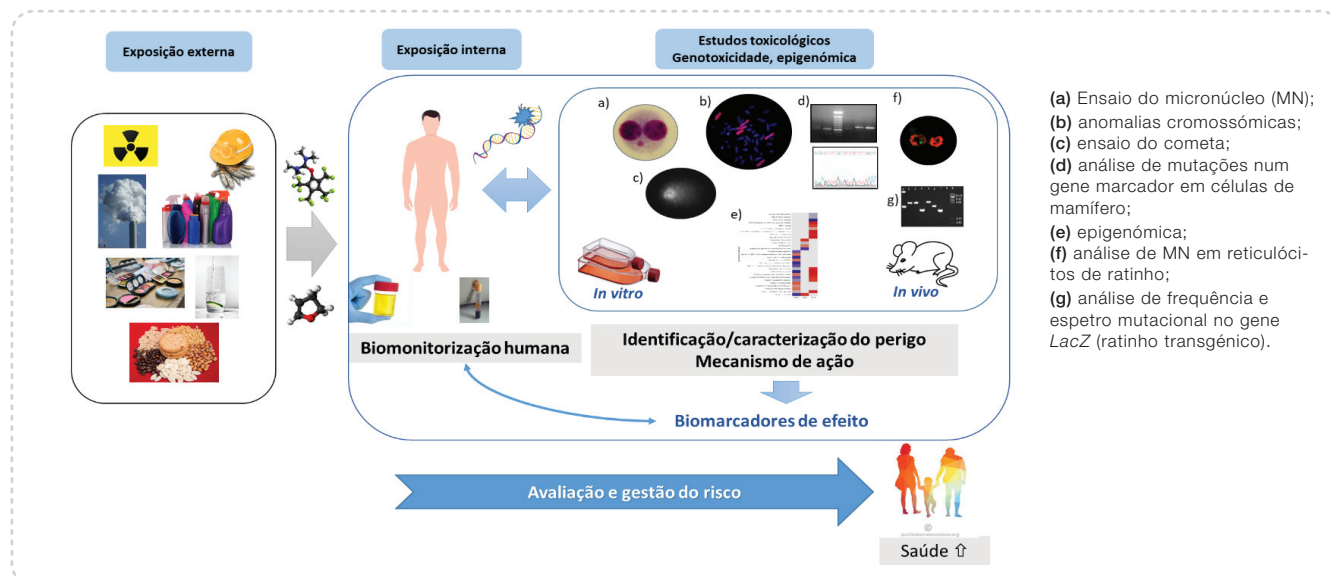
Em Portugal, tal como em toda a Europa, a saúde da população é influenciada por determinantes ambientais, de entre os quais se destacam a poluição atmosférica, os produtos químicos, o ruído e as mudanças climáticas (1). A exposição a produtos químicos provenientes do ambiente, ou veiculados pelos alimentos e pelos variados produtos de consumo que utilizamos (por ex. medicamentos, têxteis, artigos de higiene ou limpeza) poderá ter um impacto negativo na saúde, desde efeitos agudos, tais como intoxicações e problemas respiratórios agudos, até efeitos a longo prazo, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças crónicas. Convém ainda salientar o impacto crescente de alguns poluentes emergentes, tais como os materiais à escala nano, ou nanomateriais (NMs), e os micro/nanoplásticos que, pelo seu tamanho diminuto aliado a uma geral insolubilidade e persistência no ambiente e no organismo dos seres vivos, constituem uma preocupação para a saúde humana (2). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças do foro cardiovascular, respiratório e oncológico (especialmente cancro do pulmão, fígado e bexiga) são as principais doenças com causas predominantemente relacionadas com o ambiente; 23% do total de mortes, a nível mundial, são atribuíveis a causas ambientais (3). Essa morbidade e mortalidade afeta mais fortemente as pessoas ou grupos vulneráveis, incluindo crianças, idosos, doentes crónicos e grupos socialmente mais desfavorecidos.

Visando controlar e minimizar o impacto da exposição a substâncias químicas na saúde humana, importa seguir dois tipos de abordagem complementares: a monitorização da exposição humana às substâncias químicas e a monitorização dessas substâncias em matrizes ambientais e nos alimentos. É inegável que a abordagem mais direta e fidedigna para identificar e quantificar a exposição humana a químicos, quaisquer que sejam as fontes e vias de exposição, é através da utilização da biomonitorização humana (BMH). Trata-se de uma abordagem que permite a caracterização da exposição de cada indivíduo a um ou vários compostos químicos através da medição desse(s) composto(s) ou dos seus metabolitos em amostras biológicas, bem como a deteção de efeitos biológicos precoces que precedem o aparecimento de doença (biomarcadores de exposição e de efeito) (4). A estimativa da exposição a um químico, conjuntamente com a caracterização e quantificação da sua perigosidade com recurso a estudos de toxicidade, contribui para a avaliação de risco dessa substância. Essa avaliação tem por objetivo a compreensão e estimativa da natureza, magnitude e probabilidade de ocorrer um potencial efeito adverso, para a saúde ou para o ambiente, decorrente da exposição ao químico e é realizada, essencialmente, pelas entidades regulamentares, ao nível Nacional e Internacional.

Os efeitos lesivos do genoma, ou efeitos genotóxicos, estão entre os mais relevantes para a caracterização da perigosidade dos químicos, pois são considerados como determinantes de

processos cancerígenos. Para a identificação da genotoxicidade utilizam-se, desejavelmente, ensaios em sistemas experimentais *in vitro*, complementados com estudos *in vivo*, apenas quando essenciais para esclarecer os achados *in vitro*. Não existe um único ensaio de genotoxicidade ou mutagénese que dê resposta aos eventos-chave de iniciação do processo cancerígeno, isto é, a indução de mutações no DNA e/ou de anomalias no número ou estrutura dos cromossomas que constituem o genoma das células somáticas. Como tal, a estratégia em geral utilizada para esse fim consiste no uso de uma bateria de ensaios complementares (5,6). Para além da caracterização da genotoxicidade, os modelos experimentais permitem a elucidação dos mecanismos subjacentes e permitem a medição de outros parâmetros complementares, tais como citotoxicidade e stress oxidativo. O reconhecimento de que outros efeitos, que não apenas os efeitos genotóxicos, contribuem para o efeito cancerígeno de certas substâncias, conjuntamente com a inovação tecnológica no campo da sequenciação de nova geração, tem conduzido ao desenvolvimento de estudos baseados em abordagens mais abrangentes e de alto rendimento, as chamadas “ómicas”, entre as quais se salientam a transcritómica e a epigenómica. Por sua vez, estas novas abordagens metodológicas (NAMs, do inglês *New Approach Methodologies*) desenvolvidas em sistemas experimentais *in vitro* poderão vir a ser usadas como futuros biomarcadores de efeito em estudos de BMH (figura 1).

Figura 1: ⬇️ Integração dos estudos de Biomonitorização Humana com os estudos de genotoxicidade e epigenómica *in vitro* e *in vivo*.



_Objetivo

Neste artigo pretende dar-se uma visão global sobre a investigação levada a cabo no Departamento de Genética Humana (DGH) sobre a interação gene-ambiente e seus potenciais efeitos na saúde humana, incluindo os estudos de biomonitorização humana e a investigação realizada em modelos celulares e em modelos animais. Com esta revisão pretende-se ainda fazer uma reflexão sobre a relevância desta área da Genética relativamente à tradução dos dados e conhecimento produzidos para a proteção da saúde humana e, conseqüentemente, em ganhos em saúde pública.

_Quatro décadas de investigação em Toxicologia Genética no DGH

O DGH foi pioneiro na investigação em Toxicologia Genética no INSA. Os primeiros passos foram dados com a implementação de um biomarcador de efeito, a análise de trocas de cromátídeos irmãos (SCE) em linfócitos sanguíneos humanos (7), com vista à sua integração em estudos de saúde ocupacional. Em paralelo, iniciaram-se os estudos de mutagenese e de genotoxicidade recorrendo a modelos experimentais, de que é exemplo o ensaio do micronúcleo (MN) em células de mamífero (8) e, posteriormente, os modelos de ratinhos transgênicos para estudos *in vivo* de mutagenese e de reparação do DNA (9,10). Desde então a investigação realizada pelo Grupo de Toxicologia Genética tem contribuído para a caracterização do potencial genotóxico e carcinogénico de vários xenobióticos, entre eles, a radiação ionizante, os nanomateriais, as toxinas naturais e os bisfenóis, para a identificação de efeitos biológicos precoces em indivíduos a eles expostos e também para o desenvolvimento de biomarcadores baseados em tecnologias mais avançadas.

_Estudos de biomonitorização humana

Sintetizam-se, na **tabela 1**, os principais estudos de BMH realizados ao longo das quatro décadas de existência da Toxicologia Genética, bem como o seu impacto, em termos de proteção da saúde humana. O denominador comum da intervenção do Grupo nesses estudos tem sido a caracterização de biomarcadores precoces de efeito

genotóxico. Os resultados da análise desses biomarcadores, ao refletirem instabilidade genética observável precocemente em células somáticas, contribui para o estabelecimento de uma relação entre exposição e o potencial risco de desenvolvimento de malignidades, a longo prazo. Ao serem integrados nos estudos de BMH, a informação que fornecem contribui para a implementação de intervenções mais eficazes, preventivas ou mitigadoras do risco. Em alguns dos estudos realizados analisaram-se também biomarcadores de suscetibilidade genética, recorrendo-se à identificação de polimorfismos em genes críticos para a metabolização de xenobióticos ou para a reparação do DNA, com o intuito de identificar genótipos mais suscetíveis aos químicos em estudo e, por conseguinte, proteger grupos em maior risco de vir a desenvolver doença.

O estudo pioneiro de BMH focou-se em trabalhadores expostos a um solvente orgânico utilizado na indústria de plástico reforçado, o estireno, substância essa que, curiosamente, foi recentemente reavaliada pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro como provavelmente carcinogénica para o homem (grupo 2A; 11). De entre outros estudos de BMH salienta-se, pela sua relevância e impacto na comunidade visada e no ambiente, a participação no Projeto MinUrar – Minas de Urânio e seus Resíduos: efeitos na saúde da população, coordenado pelo Departamento de Epidemiologia do INSA. Na sua globalidade, os resultados da análise de anomalias cromossómicas estáveis em linfócitos foram sugestivos de uma associação entre alguma instabilidade genética observada nas células dos indivíduos do grupo exposto (residentes da área de influência da exploração do urânio) e a exposição prolongada a baixas doses de radiação e metais pesados (**tabela 1**). Os resultados foram também sugestivos da existência de uma resposta adaptativa à radiação ionizante nesse mesmo grupo da população. Com base na globalidade dos resultados do estudo foram emanadas recomendações para seguimento clínico e epidemiológico da população afetada, bem como para a realização de uma requalificação ambiental (12), recomendações essas que foram posteriormente concretizadas.

Tabela 1: Síntese dos estudos de biomonitorização humana mais relevantes.

Designação do estudo Período	População estudada n (grupo exposto) n (grupo controlo)	Agente(s)	Biomarcadores		Principais conclusões	Impacto em saúde pública [Publicações]
			Biomarcadores de exposição	Biomarcadores de efeito ou suscetibilidade		
Estudo dos efeitos citogenotóxicos da exposição ocupacional ao estireno 1985-1989	35 (trabalhadores de indústrias de fibra de vidro/plástico reforçado) 34 (administrativos)	Estireno e outros solventes orgânicos	Sem dados	Análise de SCE em células sanguíneas	Apenas o subgrupo de não fumadores expostos apresentou um aumento significativo da frequência média de SCE em comparação com os controlos não fumadores sugerindo que estes trabalhadores poderão ter um risco acrescido de doença.	Recomendações aos trabalhadores e empregadores para utilização adequada de equipamentos de proteção individual; Recomendação de melhorias no sistema de ventilação. [1]
Exposição de profissionais de saúde a fármacos anti-tumorais: avaliação de efeitos genotóxicos e da mutagenese urinária 1991-1993	11 (pessoal de saúde envolvido na preparação de citostáticos numa unidade hospitalar) 11 (pessoal administrativo)	Mistura de fármacos citostáticos	Mutagenese urinária (teste de reversão de mutação em bacteriais como indicador de exposição a agentes mutagénicos)	Análise de SCE, HFC e de aberrações cromossómicas em células sanguíneas Mutagenese urinária	Mutagenese urinária - positiva no grupo de trabalhadores expostos a citostáticos; negativa no grupo de controlo; SCE e aberrações cromossómicas - frequência média significativamente mais elevada no grupo exposto comparativamente ao de controlo. Os resultados indicam exposição ocupacional a químicos mutagénicos e instabilidade cromossómica detectável nas células sanguíneas dos trabalhadores.	Recomendações aos trabalhadores e empregadores para utilização adequada de equipamentos de proteção individual; Recomendação para instalação de um equipamento de ventilação forçada (hotte) para preparação dos fármacos citostáticos - seguida pela Unidade hospitalar. [2]
Efeitos genotóxicos decorrentes da exposição ocupacional ao ruído e vibração de corpo inteiro 1991-1999	59 (técnicos de aeronáutica, pilotos de helicóptero, pilotos de aviões militares e mandriladores mecânicos) 44 (administrativos, militares, profissionais de saúde)	Ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro, exceto no caso de mandriladores mecânicos (efeito localizado com frequências mais elevadas); pilotos militares - efeito adicional de forças gravitacionais.	Características do ruído e da vibração nas superfícies de contacto com o corpo humano	Análise de SCE e HFC em células sanguíneas	Aumento significativo de SCE e HFC em técnicos de aeronáutica, pilotos de helicóptero e pilotos de aviões militares com exposição crónica a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro relativamente ao grupo de controlo. Efeito também verificado em ratinhos expostos a ruído e vibração em condições controladas. Não se verificaram diferenças na frequência média de SCE entre o grupo de mandriladores mecânicos e o controlo.	Contribuição para o conhecimento e reconhecimento da doença vibroacústica (DVA) como uma doença profissional. Como resultado dos esforços de uma equipa multidisciplinar com sede em Portugal, essa doença foi definida como uma patologia induzida pelo ruído e caracterizada pelo crescimento anormal de colagénio na ausência de processos inflamatórios. [2; (7)]
Efeitos genotóxicos decorrentes da exposição ao ruído e vibração de corpo inteiro em pilotos de aviação comercial 2000-2001	34 (pilotos de aviação comercial) 28 (administrativos, profissionais de saúde)	Ruído, vibração, radiação cósmica e gases de emissão	Características do ruído, da vibração e da radiação	Análise de SCE, HFC e de aberrações cromossómicas em células sanguíneas	Aumento significativo da frequência média de SCE no grupo de pilotos comparativamente ao de controlo; Sem diferenças significativas na frequência média de aberrações cromossómicas entre grupos exposto e controlo.	Contribuição para a proteção dos pilotos e pessoal de cabine; recomendação de acompanhamento médico. [2; (16)]*
Efeitos genotóxicos da exposição humana a gases de emissão de veículos automóveis em portageiros 1998-2000	18 (portageiros) 18 (administrativos da mesma empresa)	Gases de emissão de veículos automóveis	Ácido trans, trans-mucónico (AM) na urina (metabolito do benzeno); mutagenese urinária	Análise de SCE, HFC e de aberrações cromossómicas em células sanguíneas	Concentração de AM superior no grupo de portageiros relativamente ao controlo. Mutagenese urinária - negativa; SCE, HFC, aberrações cromossómicas - sem diferenças significativas entre grupos exposto e controlo. O estudo sugeriu que os portageiros estudados, embora expostos, não apresentavam efeitos biológicos precoces de molde a requerer proteção adicional.	Recomendou-se o encerramento das janelas das cabines sempre que possível para evitar a poluição do ar interior com os gases de emissão. [2; (17)]
MinUrar - Minas de Urânio e seus Resíduos — Efeitos na saúde da população: efeitos genotóxicos e suscetibilidade genética 2002-2008	32 (residentes na área de influência das minas de exploração de urânio, e suas escombrelas) 62 (33 residentes em freguesias da mesma área geográfica sem minas e 29 residentes numa área geográfica com baixo fundo radioativo)	Metais pesados e radiação alfa e gama	Pb, Cu e Zn no no sangue; rádio-núclidos (Polónio-210) no cabelo	Análise de aberrações cromossómicas estáveis (translocações); ensaio challenge (translocações induzidas pela irradiação <i>in vitro</i>); Análise de polimorfismos em genes de reparação do DNA (susceptibilidade)	Aumento da frequência de translocações nos indivíduos do grupo exposto comparativamente aos 2 grupos de controlo, embora sem significado estatístico. Diferença significativa entre o grupo exposto e os grupos de controlo na frequência de translocações induzidas pela irradiação do sangue <i>in vitro</i> , sugerindo a existência de uma resposta adaptativa no grupo exposto. Alguns polimorfismos em genes de reparação de quebras no DNA afetam os níveis de aberrações cromossómicas radioinduzidas.	Implementação de um Programa de vigilância para os mineiros e seus familiares. Requalificação ambiental das minas e escombrelas abandonadas da Urgeira. [(12,18)]
Exposição ocupacional ao fumo de tabaco ambiental: um estudo em restaurantes na cidade de Lisboa 2010-2016	29 (trabalhadores de restauração expostos ao fumo de tabaco ambiental/fumo passivo) 33 (trabalhadores não expostos ao fumo de tabaco ambiental)	fumo do tabaco	Cotínina urinária	Análise de SCE, ensaio do cometa, análise de micronúcleos em linfócitos e em células bucais, e ensaio challenge (baseado no ensaio do cometa após tratamento do sangue <i>ex vivo</i> com agente alquilante); Análise de polimorfismos em genes de metabolização	Não se detetou uma associação clara entre a exposição ocupacional ao fumo ambiental do tabaco e a indução de efeitos genotóxicos. Os resultados do ensaio challenge sugeriram uma resposta adaptativa no grupo exposto ao fumo passivo (apresentam menor frequência de lesões do DNA após o estímulo <i>ex vivo</i> com um agente alquilante do que o grupo exposto). Não se identificaram efeitos moduladores dos polimorfismos genéticos estudados.	Apoio da decisão da proibição total de fumar em espaços públicos, particularmente, em espaços de restauração. [1; (19)]
Estudo de biomonitorização ocupacional relativo ao crómio e a outras substâncias químicas nocivas no quadro do Projeto Europeu HBM4EU 2019-2021	191 (trabalhadores da indústria metalúrgica e aeronáutica) 93 (administrativos das mesmas empresas; voluntários externos às empresas)	crómio hexavalente, níquel e outros metais pesados	crómio hexavalente, Ni, etc. em urina, sangue e condensado do ar exalado	Análise de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico; ensaio do cometa em leucócitos	Aumento significativo do nível de lesões no DNA (ensaio cometa) e de micronúcleos (alterações cromossómicas) no grupo exposto comparativamente ao grupo de controlo (voluntários fora das empresas estudadas). Grupo de controlo formado por pessoal administrativo dentro das empresas também apresentou níveis significativos de instabilidade genética.	Apoio à necessidade de reavaliar o limite de exposição ocupacional a crómio hexavalente em prática. Recomendação para aplicação de medidas de proteção, particularmente aos trabalhadores em maior risco (envolvidos na soldadura e de galvanoplastia) e de mitigação. [2; (20)]
Exposição ocupacional a compostos químicos durante a reciclagem de resíduos elétricos e eletrónicos no quadro dos projetos HBM4EU e PARC 2021-presente	95 (trabalhadores da indústria de reciclagem e gestão de resíduos) 50 (Voluntários externos às empresas)	mistura complexa de metais pesados (Pb, Li, etc.) e compostos orgânicos (bisfenóis, substâncias perfluoroalquiladas (PFAS), bifenis policlorados (PCBs), etc.	Metais, PFAS, bisfenóis, PCBs, etc. em amostras de sangue, urina e cabelo.	Análise de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e em células da mucosa bucal	Aumento da frequência média de micronúcleos em linfócitos do grupo exposto comparativamente ao grupo de controlo. Estudo alargado a um maior número de trabalhadores (ainda em curso).	Recomendação para aplicação de medidas de proteção aos trabalhadores e de mitigação. [(21)]

(1) Relatório apresentado às indústrias participantes; (2) Relatório apresentado ao serviço de medicina ocupacional com pedido de informação aos participantes.

*Trabalho vencedor do Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública (*ex-aequo*) e do Prémio de Investigação sobre Ambiente e Saúde Aloísio Coelho no âmbito dos Prémios Científicos do I Centenário do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, 2001.

HBM4EU - Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana; HFC - células com alta frequência de SCE; PARC - Parceria para Avaliação dos Riscos de Químicos; SCE - trocas entre cromátídeos irmãos.

A participação recente na Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana (HBM4EU, <https://www.hbm4eu.eu/>) e na Parceria Europeia para a Avaliação dos Riscos de Químicos (PARC, <https://www.eu-parc.eu/>) abriu a oportunidade de participação em estudos de BMH ocupacional multicêntricos, visando a exposição ao crómio hexavalente em várias atividades industriais e a exposição a misturas de substâncias químicas perigosas, incluindo metais pesados e compostos orgânicos, em indústrias de gestão de resíduos de aparelhos elétricos e eletrónicos, nos quais o Grupo tem tido um papel de relevo na análise de biomarcadores de efeito.

_Investigação em genotoxicidade e reparação do DNA em modelos *in vitro* ou *in vivo*

Os estudos de mutagénese e de genotoxicidade em modelos experimentais usando estirpes bacterianas e, principalmente, células de mamífero, tais como o teste de mutação no gene *hprt* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) em células V79 e o ensaio do MN em variadas linhas celulares humanas (8,13), têm constituído ferramentas importantes para investigar as propriedades genotóxicas e mutagénicas de agentes físicos, químicos e suas misturas, bem como para elucidar os seus mecanismos de ação. Os estudos de mutagénese *in vivo*, com recurso a modelos murinos transgénicos e, principalmente, a criação no INSA de um modelo único de ratinho transgénico com inativação de um gene de reparação do DNA, permitiram avançar a investigação em mecanismos de reparação do DNA e o seu papel na formação de mutações somáticas e germinais após exposição a agentes químicos (9,10).

Na **tabela 2**, são indicados os principais projetos nestas áreas bem como os ensaios utilizados, incluindo NAMs. O trabalho mais recentemente desenvolvido pelo Grupo tem-se focado nos ensaios considerados mais relevantes para decisões em saúde pública, por revelarem efeitos em dois acontecimentos fundamentais na carcinogénese: mutações génicas e perda total/parcial de cromossomas. Nesse sentido, existem linhas orientadoras para utilizar estes ensaios anteriormente à colocação no mercado de novas substâncias químicas, tais como as orientações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE). Relativamente às

abordagens inovadoras, como a análise epigenética, apesar de não existirem ainda linhas de orientação, muitos destes dados são considerados na avaliação global da evidência, conforme o mecanismo subjacente.

De entre as temáticas investigadas, salientam-se os estudos na área da nanotoxicologia, iniciados em 2010, na medida em que surgiram em resposta a uma preocupação emergente sobre a segurança dos NMs - cuja produção e aplicação tem sofrido um crescimento exponencial - para a saúde humana (**tabela 2**). Esta linha de investigação tem prosseguido até ao presente, com a utilização de abordagens experimentais integradas para testagem e avaliação, tendo em vista a garantia de que os NM usados, por exemplo, na tecnologia alimentar - Projeto INGESTnano - são seguros e de que a potencial exposição ocupacional a esses NMs não constitui um risco para a saúde dos trabalhadores - Projeto ToxApp4nanoCELFI (**tabela 2**). Qualquer destes estudos tem uma forte componente translacional, tendo em vista a integração da informação gerada para a avaliação do risco associado à exposição a esses materiais, como apoio à sua regulamentação, por forma a assegurar o progresso seguro e sustentável das nanotecnologias e da nanomedicina.

_Abordagens inovadoras na investigação em genotoxicidade e no desenvolvimento de novos biomarcadores

Considerando a evolução da ciência nestas últimas décadas, são atualmente privilegiadas abordagens alternativas *in vitro* com maior aproximação aos sistemas vivos, tais como o uso de modelos celulares complexos, ou a inclusão de processos fisiológicos, como seja a digestão (simulada *in vitro*), na testagem da genotoxicidade de substâncias ingeridas (14,15). Também os estudos toxicogenómicos têm adquirido cada vez maior protagonismo, seguindo os recentes avanços tecnológicos. Tem-se ainda assistido a um progressivo interesse no papel da epigenética - modificações no genoma que causam alterações na expressão dos genes - na resposta biológica à exposição a agentes ambientais. Entre essas alterações estão, por exemplo, as modificações nas histonas, na metilação do DNA e na expressão de microRNAs (miRNAs).

Tabela 2: Síntese dos principais estudos realizados com recurso a ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Projetos / agente(s) em estudo (publicações/representativa(s))	Teste do cometa (lesão DNA)		Teste do micronúcleo (alterações cromossómicas)		Testes de mutagenese (mutações génicas)		Testes de mutagenese para avaliação da reparação do DNA	Teste de Carcinogénese <i>in vitro</i> (iniciação/ promoção)	Avaliação de efeitos epigenéticos
	Em linhas celulares de mamífero	<i>In vivo</i>	Em linfócitos humanos ou em linhas celulares de mamífero	Em medula óssea ou em reticulócitos sanguíneos <i>in vivo</i>	Mutações no gene <i>Hprt</i> ou no gene <i>Tk</i> de células de mamífero	Mutações no gene <i>lacZ</i> num modelo transgénico <i>in vivo</i>			
Estabelecimento de uma curva de dosimetria biológica com base na frequência de micronúcleos em células binucleadas / radiação ionizante [16]			Linfócitos humanos				Mutações no gene <i>lacZ</i> num knock-out (<i>Parp</i>) <i>in vivo</i> ou ensaio do cometa <i>in vitro</i>	Transformação celular em células Bias-42	Metilação do DNA ou expressão diferencial de miRNA
Atividade citotóxica, mutagénica e clastogénica de fármacos anti-tumorais derivados da platina / cisplatina e oxaliplatina [22, 43]				Em eritrócitos imaturos de medula óssea	Análise da frequência e espectro de mutações em <i>Hprt</i>	Análise da frequência e espectro de mutações			
Caracterização dos efeitos mutagénicos da deficiência em <i>PARP</i> * em ratinhos transgénicos / agentes alquilantes [10]			Linfócitos humanos	Em eritrócitos sanguíneos		Análise da frequência de mutações	Análise da frequência e espectro de mutações		
Avaliação do potencial cancerígeno de micotoxinas / toxinas naturais (cianotoxinas) [23]	Células hepáticas e renais	Leucócitos de ratinho	Células hepáticas e renais	Em eritrócitos imaturos de medula óssea					
Avaliação do risco de um ambiente estuarino contaminado: análise do potencial genotóxico e alterações na reparação do DNA / mistura complexa (metais e compostos orgânicos) [24, 25]	Células hepáticas	Leucócitos de ratinho	Células hepáticas	Em eritrócitos sanguíneos		Análise da frequência de mutações	Ensaio cometa em células hepáticas <i>in vitro</i>		
Investigação dos efeitos tóxicos de micotoxinas e suas misturas: potencial efeito cito e genotóxico / toxinas naturais (micotoxinas) [26, 27]	Células hepáticas, renais e intestinais								
Avaliação da segurança de nanomateriais (NMs) através da caracterização dos seus efeitos genotóxicos / NMs de sílica, dióxido de titânio e nanotubos de carbono [28]		Fígado e baco de ratinho	Linfócitos humanos	Em eritrócitos sanguíneos		Análise da frequência de mutações			
Uma abordagem europeia concertada para a testagem regulatória de nanomateriais / NMs de prata e magnésio [29, 30]	Células brônquicas e pulmonares		Células brônquicas e pulmonares		Análise da frequência de mutações em <i>Tk</i>				
Exposição ocupacional a nanomateriais fibrosos: uma abordagem <i>in vitro</i> dos seus efeitos genéticos e epigenéticos / nanotubos de carbono e nanocelulose [16]	Co-cultura de células pulmonares com macrófagos		Co-cultura de células pulmonares com macrófagos						micrRNAs em células pulmonares
Mecanismos celulares e moleculares de toxicidade de nanomateriais ingeridos / NMs dióxido de titânio (Projeto INGESTmano) [31]	Células intestinais		Células intestinais						Metilação do DNA em células intestinais
Uma abordagem de toxicologia preditiva para caracterização dos efeitos respiratórios de fibras de nanocelulose (Projeto ToxAppNanocELFI) [14]	Células pulmonares e co-cultura com macrófagos		Células pulmonares e co-cultura com macrófagos						microRNAs e metilação do DNA em células pulmonares
Perfil toxicológico de nanomateriais de celulose ingeridos em células gastrointestinais / nanoceluloses [15]	Células intestinais		Células intestinais		Análise da frequência de mutações em <i>Hprt</i>				Metilação do DNA em células intestinais
Avaliação da toxicidade de bisfenóis: impacto na saúde humana/compostos alternativos ao bisfenol A [32]	Células hepáticas, 2D e 3D		Linfócitos e células hepáticas, 2D e 3D						
Avaliação da toxicidade de micotoxinas: impacto na saúde humana / toxinas da <i>Alternaria</i> e eniatinas [22]			Células hepáticas						Fígado, <i>in vivo</i>

**PARP* – gene poli-ADP ribose polimerase ; *Tk* - gene timidina cinase; NMs – nanomateriais

Nota – Todos os estudos referidos incluíram ensaios de citotoxicidade para definir a gama de concentrações ou doses a testar; a maioria dos estudos incluiu a análise de parâmetros adicionais, tais como a indução de stress oxidativo ou, no caso dos nanomateriais, estudos de internalização celular.

Com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciação de nova geração, a epigenética evoluiu para a epigenómica que compreende o estudo das modificações epigenéticas em todo o genoma. O Grupo tem investigado os efeitos epigenómicos de vários NMs através da análise de miRNAs e da metilação de todo o genoma (33), sendo esta investigação de extrema importância para explorar os genes alvo desses NMs e, assim, avançar na compreensão do seu modo de ação molecular que poderá explicar os seus efeitos nocivos na saúde. É expectável que estas novas abordagens experimentais constituam também a base para o desenvolvimento de novos biomarcadores de efeito biológico precoce mais sensíveis e específicos, na medida em que são suportados por conhecimento de índole mecânica.

Conclusões

Enquanto a Genética Humana se dedica, de uma forma geral, a compreender e analisar alterações patológicas ou variações nos genes ou cromossomas, a Toxicologia Genética foca-se na investigação sobre a forma como fatores ambientais podem induzir ou contribuir para essas alterações genéticas ou epigenéticas e, por consequência, gerar instabilidade genómica. Essa instabilidade pode ser determinante para o desenvolvimento de cancro, doenças hereditárias ou envelhecimento prematuro, condições com forte impacto na saúde e qualidade de vida da população e que, portanto, importa prevenir. Os resultados dos estudos revisitados neste artigo têm fornecido conhecimento relevante para a avaliação da perigosidade e do risco de químicos que, por sua vez, são utilizados em quadros regulamentares respeitantes à garantia da segurança dos químicos. Recorrendo a abordagens integradoras e inovadoras, os achados da investigação nesta área da genética têm progredido no sentido de uma crescente capacidade preventiva e preditiva, indissociáveis das prioridades da Genética Humana, visando a proteção da saúde humana.

Agradecimentos:

À Doutora Guida Boavida, pelo lançamento desta linha de investigação no DGH e pela visão da sua importância no contexto da Genética Humana. A todos os colegas que, enquanto estudantes ou colaboradores, contribuíram para o desenvolvimento da investigação em Toxicologia Genética no DGH, bem como aos colegas de outros Departamentos do INSA e de outras instituições que colaboraram (ou coordenaram) nos trabalhos aqui descritos e contribuíram para o seu sucesso.

Referências bibliográficas:

- (1) Agência Portuguesa do Ambiente. Estratégia Nacional para o Ar (ENAR) 2020 - Emissões Atmosféricas e Qualidade do Ar Ambiente: Enquadramento e Diagnóstico. Lisboa: APA, 2015. https://apambiente.pt/sites/default/files/_Ar_Ruido/Ar/PoluicaoAr/ENAR_02_Diagnostico_20150528_VF_Portal.pdf
- (2) World Health Organization. Addressing the impact of nanotechnology on health [online]. [consult. 2025/10/5] https://www.who.int/europe/health-topics/health-impact-assessment/addressing-the-impact-of-nanotechnology-on-health#tab=tab_1
- (3) World Health Organization. WHO global strategy on health, environment and climate change: the transformation needed to improve lives and wellbeing sustainably through healthy environments. Geneva: WHO, 2020. <https://iris.who.int/handle/10665/331959>
- (4) Louro H, Heinälä M, Bessems J, et al. Human biomonitoring in health risk assessment in Europe: Current practices and recommendations for the future. *Int J Hyg Environ Health*. 2019 Jun;222(5):727-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.05.009>
- (5) Groff K, Evans SJ, Doak SH, et al. In vitro and integrated in vivo strategies to reduce animal use in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2021 Nov 29;36(6):389-400. <https://doi.org/10.1093/mutage/geab035>
- (6) Andreoli C, Dusinska M, Bossa C, et al. Regulatory practices on the genotoxicity testing of nanomaterials and outlook for the future. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2025 Nov;162:105881. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105881>
- (7) Silva MJ, Carothers A, Branco NC, et al. Sister chromatid exchange analysis in workers exposed to noise and vibration. *Mutat Res*. 1996 Jul 10;369(1-2):113-21. [https://doi.org/10.1016/s0165-1218\(96\)90055-5](https://doi.org/10.1016/s0165-1218(96)90055-5)
- (8) Silva MJ, Carothers A, Dias A, et al. Dose dependence of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutat Res*. 1994 Aug;322(2):117-28. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(94\)00019-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(94)00019-0)
- (9) Louro H, Silva MJ, Boavida MG. Mutagenic activity of cisplatin in the lacZ plasmid-based transgenic mouse model. *Environ Mol Mutagen*. 2002;40(4):283-91. <https://doi.org/10.1002/em.10118>
- (10) Louro H, Pinheiro I, Costa P, et al. Mutagenic effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency in transgenic mice. *Mutat Res*. 2008 Apr 2;640(1-2):82-8. Epub 2007 Dec 23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.12.003>
- (11) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Styrene, Styrene-7,8-oxide, and Quinoline. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551039>
- (12) Silva MJ, Monteiro-Gil O, Sousa AC, et al. Minas de urânio e seus resíduos: efeitos na saúde da população – Estudo dos efeitos genotóxicos. In: Projeto MinUrar. Relatório Científico II. Lisboa: INSA, 2007. p. 27-60. <http://hdl.handle.net/10400.18/6994>
- (13) Silva MJ, Costa P, Dias A, et al. Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environ Mol Mutagen*. 2005 Aug;46(2):104-15. <https://doi.org/10.1002/em.20138>

- (14) Ventura C, Pinto F, Lourenço AF, et al. Assessing the Genotoxicity of Cellulose Nanomaterials in a Co-Culture of Human Lung Epithelial Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *Bioengineering (Basel)*. 2023 Aug 21;10(8):986. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10080986>
- (15) Vital N, Cardoso M, Kranendonk M, et al. Evaluation of the cyto- and genotoxicity of two types of cellulose nanomaterials using human intestinal cells and in vitro digestion simulation. *Arch Toxicol*. 2025 Feb;99(2):575-96. Epub 2024 Dec 24. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03911-2>
- (16) Silva MJ, Dias A, Barreta A, et al. Efeito genotóxico da exposição prolongada a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde*. 2001;24:36-67. <http://hdl.handle.net/10400.18/1016>
- (17) Boavida MG, Proença MJ, Barreta A, et al. Analysis of genotoxic effects of vehicle exhaust emissions in toll collectors. *Annales de Génétique*. 2001;44(suppl 1):S138. [https://doi.org/10.1016/S0003-3995\(01\)01067-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3995(01)01067-X)
- (18) Gil F, Louro H, Dias A, et al. Influence of hOGG1 genotype on the frequencies of stable and unstable chromosome aberrations in radiation-exposed individuals. *Eur J Cancer*. 2008;6(9):199. [https://doi.org/10.1016/S1359-6349\(08\)71882-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6349(08)71882-2)
- (19) Vital N, Antunes S, Louro H, et al. Environmental Tobacco Smoke in Occupational Settings: Effect and Susceptibility Biomarkers in Workers From Lisbon Restaurants and Bars. *Front Public Health*. 2021 Jun 4;9:674142. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.674142>
- (20) Tavares A, Aimonen K, Ndaw S, et al. On Behalf Of The Hbm Eu Chromates Study Team. HBM4EU Chromates Study-Genotoxicity and Oxidative Stress Biomarkers in Workers Exposed to Hexavalent Chromium. *Toxics*. 2022 Aug 18;10(8):483. <https://doi.org/10.3390/toxics10080483>
- (21) Aimonen K, Silva MJ, Tavares A, et al. Genotoxicity in peripheral blood leukocytes and reticulocytes of e-waste management workers. *Toxicology Letters* 2023 Sep;384(Suppl 1):S64. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(23\)00425-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(23)00425-3)
- (22) Louro H, Vettorazzi A, López de Cerain A, et al. Hazard characterization of Alternaria toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health. *Arch Toxicol*. 2024 Feb;98(2):425-69. Epub 2023 Dec 26. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>
- (23) Dias E, Louro H, Pinto M, et al. Genotoxicity of microcystin-LR in in vitro and in vivo experimental models. *Biomed Res Int*. 2014;2014:949521. <https://doi.org/10.1155/2014/949521>
- (24) Pinto M, Costa PM, Louro H, et al. Human hepatoma cells exposed to estuarine sediment contaminant extracts permitted the differentiation between cytotoxic and pro-mutagenic fractions. *Environ Pollut*. 2014 Feb;185:141-8. Epub 2013 Nov 24. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.034>
- (25) Pinto MF, Louro H, Costa PM, et al. Exploring the potential interference of estuarine sediment contaminants with the DNA repair capacity of human hepatoma cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2015;78(9):559-70. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1006712>
- (26) Costa JG, Saraiva N, Guerreiro PS, et al. Ochratoxin A-induced cytotoxicity, genotoxicity and reactive oxygen species in kidney cells: An integrative approach of complementary endpoints. *Food Chem Toxicol*. 2016 Jan;87:65-76. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.018>
- (27) Pinhão M, Tavares AM, Loureiro S, et al. Combined cytotoxic and genotoxic effects of ochratoxin A and fumonisin B1 in human kidney and liver cell models. *Toxicol In Vitro*. 2020 Oct;68:104949. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104949>
- (28) Tavares AM, Louro H, Antunes S, et al. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro*. 2014 Feb;28(1):60-9. Epub 2013 Jun 27. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.009>
- (29) Louro H, Pinhão M, Santos J, et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physico-chemical properties. *Toxicol Lett*. 2016 Nov 16;262:123-34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.016>
- (30) Gábelová A, El Yamani N, Alonso TI, et al. Fibrous shape underlies the mutagenic and carcinogenic potential of nanosilver while surface chemistry affects the biosafety of iron oxide nanoparticles. *Mutagenesis*. 2017 Jan;32(1):193-202. Epub 2016 Sep 22. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew045>
- (31) Vieira A, Vital N, Rolo D, et al. Investigation of the genotoxicity of digested titanium dioxide nanomaterials in human intestinal cells. *Food Chem Toxicol*. 2022 Mar;161:112841. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112841>
- (32) Mhaouty-Kodja S, Zalko D, Tait S, et al. A critical review to identify data gaps and improve risk assessment of bisphenol A alternatives for human health. *Crit Rev Toxicol*. 2024 Nov;54(10):696-753. <https://doi.org/10.1080/10408444.2024.2388712>
- (33) Ventura C, Vieira L, Silva C, et al. Functional effects of differentially expressed microRNAs in A549 cells exposed to MWCNT-7 or crocidolite. *Toxicol Lett*. 2020 Aug 1;328:7-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.04.002>



ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Quadrimestral

_ ISSN: 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

_ Numeração: 2ª série

Volume 14, número especial 17
2025_Doenças genéticas

_ Diretor

Fernando de **Almeida**, Presidente do Conselho Diretivo do INSA

_ Editores

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia
Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

_ Conselho Editorial Científico

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia
Cristina **Furtado**, Departamento de Doenças Infecciosas
Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental
Maria João **Silva**, Departamento de Genética Humana
Paulo **Dario**, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de
Doenças Não Transmissíveis
Rita **Batista**, Departamento de Alimentação e Nutrição
Luísa **Romão**, Conselho Científico do INSA

_ Coordenação editorial Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

_ Composição e paginação Rodrigo **Jorge**

(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2025.

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.
Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamento 8/99 de 9 de junho artº 12º nº1 a).

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz, 1649-016 **Lisboa, Portugal**

Tel.: (+351) 217 519 200

E-mail: info@insa.min-saude.pt

www.insa.pt