



Observações

— Boletim Epidemiológico

editorial_

Observar as Doenças Raras em Portugal

Rare Diseases in Portugal

Na União Europeia (UE) uma doença é considerada rara quando a prevalência observada é inferior a 1 caso em cada 2000 pessoas. No entanto, todos os indivíduos com doenças raras compreendem no seu conjunto cerca de 30 milhões de cidadãos, ou seja, 6% a 8% da população da UE. Sabe-se hoje que existem mais de 6000 doenças raras, sendo que 80% destas doenças são de origem genética, e muitas vezes crónicas, podendo pôr em risco a própria vida.

As doenças raras são caracterizadas por uma grande diversidade de sintomas e sinais que variam não só de doença para doença, mas também entre doentes que sofrem de uma mesma patologia. A maioria destas doenças é grave e, por vezes, altamente incapacitante, enquanto outras não são impeditivas do normal desenvolvimento intelectual e apresentam evolução benigna e até funcional, se diagnosticadas e tratadas atempadamente. Assim, o diagnóstico precoce e o início de tratamento com base na evidência são fatores importantes para reduzir o impacto de uma doença rara na vida adulta. O atraso no diagnóstico pode significar que se desperdiçou a oportunidade de uma intervenção atempada, assim como um diagnóstico correto poderá determinar a existência de uma doença rara subjacente quando os sintomas apresentados são relativamente comuns. Em 2004, num levantamento efetuado para oito doenças raras, 25% dos doentes inquiridos revelaram existir uma diferença de 5 a 30 anos entre a manifestação dos primeiros sintomas e o diagnóstico.

Em Portugal a verdadeira dimensão do problema não é conhecida, dada a inexistência de um registo único adequado a estas doenças, bem como o reduzido número e a extensão dos estudos epidemiológicos realizados até à data. No entanto, a publicação da Estratégia Integrada para as Doenças Raras 2015-2020 ⁽¹⁾ poderá vir a melhorar o conhecimento das doenças raras no país. Esta estratégia assenta numa cooperação interministerial, intersectorial e interinstitucional que faz uso dos recursos médicos, sociais, científicos e tecnológicos, com foco nos seguintes aspetos: 1. A coordenação dos cuidados de saúde; 2. O acesso ao diagnóstico precoce; 3. O acesso ao tratamento; 4. A investigação (científica) e 5. A inclusão social e a cidadania.

As doenças raras não afetam apenas os indivíduos doentes, mas também têm um grande impacto nas famílias, amigos, cuidadores e na sociedade em geral. A propósito das dificuldades sentidas por estas famílias, as associações de doentes portadores de doença rara, tais como a RARÍSSIMAS – Associação Nacional de Deficiências Mentais e Raras (www.rarissimas.pt), tornaram-se pilares imprescindíveis na nossa sociedade, no que ao apoio a esta população diz respeito. A Raríssimas tem como objetivos estratégicos entre outros, promover a divulgação, informação e sensibilização pública sobre as Doenças Raras a nível nacional e internacional; promover a gestão integrada do doente com Doença Rara; desenvolver e participar em projetos de investigação transnacional e básica, no âmbito das Doenças Raras, e estabelecer parcerias nacionais e internacionais. Mas o seu âmbito de atuação é muito mais abrangente, devendo-lhe todos nós, a existência de o único Centro de Recursos Integrado para Doenças Raras do mundo, a tão já conhecida Casa dos Marcos

(<http://casadosmarcos.rarissimas.pt>), que congrega as valências sociais, de saúde, investigação, formação, entre outros, e que suscitou internacionalmente uma curiosidade política, que resultou em inúmeras visitas institucionais e diplomáticas, a mais conhecida, da rainha de Espanha, *Letizia de Ortiz*. Muito recentemente, a RARÍSSIMAS estabeleceu um protocolo de cooperação com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), cujo objeto global visou o estabelecimento das bases de cooperação científica e pedagógica com vista à otimização dos recursos entre as duas instituições.

Nos últimos anos, o Departamento de Genética Humana (DGH) do INSA (www.insa.pt) tem investido de forma constante na disponibilização de novos testes genéticos de apoio clínico. O DGH disponibiliza atualmente o diagnóstico genético para mais de 400 doenças raras e assume-se como o maior Departamento de Genética Humana, público e nacional, para o diagnóstico laboratorial de patologias genéticas. No âmbito da sua política de desenvolvimento e qualidade, e tendo sido o primeiro laboratório no país a obter acreditação pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) considerando a norma internacional NP EN ISO 15189 (2) para testes genéticos, prossegue de forma continuada a acreditação de outros testes, assegurando assim uma oferta de serviços de apoio à clínica de elevada qualidade e de acordo com critérios internacionais. É no DGH que se encontra sediado o braço laboratorial do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (3) que teve início em 1979 com o objetivo de diagnosticar, nas primeiras semanas de vida, algumas doenças que, uma vez identificadas, permitem o tratamento precoce e evitam a ocorrência de atraso mental, doença grave irreversível ou a morte da criança.

Este Departamento promove ainda a investigação e desenvolvimento através de atividade colaborativa com a comunidade científica, académica e a indústria, tendo em curso para cima de uma dezena de projetos relacionados com doenças raras. Entre estes, destacam-se os relacionados com as doenças hereditárias do metabolismo, onde é patente a participação como centro afiliado, ou com acordo de colaboração, com os quatro Centros de Referência Nacional para as Doenças

Hereditárias do Metabolismo, recentemente designados pelo Ministério da Saúde (4).

Os trabalhos apresentados neste número do *Boletim Epidemiológico Observações* são representativos da investigação realizada ao longo de vários anos no INSA e estão relacionados, na maioria dos casos, com uma ou mais doenças raras estudadas atualmente no DGH.

Glória Isidro

Coordenadora do Departamento de Genética Humana
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Paula Brito e Costa

Presidente da Direção da RARÍSSIMAS
Associação Nacional de Deficiências Mentais e Raras

Referências bibliográficas:

- (1) Ministérios da Saúde, da Educação e Ciência e da Solidariedade, Emprego e Segurança Social. Despacho n.º 2129-B/2015, 26 de fevereiro. DR 2ª Série, nº 41(2º supl.):5190-(8)-(10). Aprova a Estratégia Integrada para as Doenças Raras 2015-2020. <https://dre.pt/application/file/66622142>
- (2) NP EN ISO 15189:2014. Laboratórios clínicos: requisitos particulares da qualidade e competência (ISO 15189:2012). 2ª ed. Lisboa: IPQ, 2014
- (3) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce [em linha]. www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/DiagnosticoPrecoce/Paginas/diagnosticoprecoce.aspx
- (4) Ministério da Saúde. Portaria n.º 194/2014, 30 de setembro. DR 1ª Série, nº 188: 5103-08. Estabelece o conceito, o processo de identificação, aprovação e reconhecimento dos Centros de Referência Nacionais para a prestação de cuidados de saúde, designadamente para diagnóstico e tratamento de doenças raras. <https://dre.pt/application/file/57695207>

neste número_

_ Editorial

- Observar as Doenças Raras em Portugal** p 01
Rare Diseases in Portugal
Glória Isidro, Paula Brito e Costa

_ Artigos Breves

Programas e Registos

- 1_ As doenças raras na Europa: o enquadramento português** p 04
Rare diseases in Europe: the Portuguese framework
Verónica Gómez, Patrícia Rama, Ausenda Machado, Paula Braz, Cristina Furtado, Dezo David, Natércia Miranda, Glória Isidro
- 2_ Vigilância de síndromes com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas: dados do Registo Nacional de Anomalias Congénitas para os anos 2000 a 2013** p 08
Surveillance of syndromes with congenital anomalies affecting multiple systems: data from Portuguese National Registry between 2000 and 2013
Paula Braz, Ausenda Machado, Carlos Matias Dias

Doenças metabólicas

- 3_ Rastreio neonatal dos défices do ciclo da ureia em Portugal** p 12
Newborn screening for urea cycle disorders in Portugal
Hugo Rocha, Carmen Sousa, Helena Fonseca, Ana Marcão, Lurdes Lopes, Ivone Carvalho, Laura Vilarinho
- 4_ Doenças lisossomais de sobrecarga em Portugal: 10 anos de experiência em estudos moleculares no INSA (2006-2016)** p 16
Lysosomal storage diseases in Portugal: 10 years of experience in molecular studies at National Health Institute (2006-2016)
Maria Francisca Coutinho, Ana Joana Duarte, Liliana Matos, Juliana Inês Santos, Olga Amaral, Sandra Alves
- 5_ Rastreio neonatal da homocistinúria clássica revela uma elevada frequência da deficiência em MAT I/III na Península Ibérica** p 21
Newborn Screening for homocystinuria revealed a high frequency of MAT I/III deficiency in Iberian Peninsula
Ana Marcão, Maria L. Couce, Célia Nogueira, Helena Fonseca, Filipa Ferreira, José M. Fraga, M. Dolores Bóveda, Laura Vilarinho
- 6_ Doenças mitocondriais: síndrome da depleção do mtDNA** p 25
Mitochondrial disorders: mitochondrial DNA depletion syndrome
Célia Nogueira, Laura Vilarinho
- 7_ Dor abdominal aguda como apresentação de porfirias** p 29
Acute abdominal pain: think porphyria
Filipa Ferreira, Laura Vilarinho

Doenças oncológicas

- 8_ Estudo mutacional em tumor de Wilms por sequenciação de nova geração** p 34
Mutational study in Wilms' tumour using next-generation sequencing
Catarina Silva, Dina Carpinteiro, Luis Vieira
- 9_ Diagnóstico molecular de cancros hereditários por sequenciação de nova geração: cancro da mama e cancro colorretal** p 38
Molecular diagnosis of hereditary cancers using next-generation sequencing: breast cancer and colorectal cancer
Patrícia Theisen, Catarina Silva, Iris Pereira Caetano, Pedro Rodrigues, Glória Isidro, Luis Vieira, João Gonçalves

Outras doenças genéticas

- 10_ A paramiloidose em Portugal: reflexão sobre o paradigma da transplantação hepática motivada por um caso clínico** p 41
Paramiloidosis in Portugal: reflection on the hepatic transplantation paradigm motivated by an actual case
Pedro Castro Lacerda, Luciana Moreira, Rui Vitorino, Paulo Pinho Costa
- 11_ Anemia de Fanconi em Portugal: estudo retrospectivo de 34 anos de investigação no INSA (1980-2014)** p 44
Fanconi Anemia in Portugal: retrospective study of 34 years of investigation at Portuguese National health institute (1980-2014)
Ana Paula Ambrósio, Maria do Céu Silva, José Manuel Furtado, Neuza Silva, Catarina Ventura, Mónica Viegas, Hildeberto Correia
- 12_ Base molecular da hemocromatose hereditária não-clássica em Portugal** p 48
Molecular basis of the non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal
Ricardo Faria, Bruno Silva, Catarina Silva, Pedro Loureiro, Ana Queiroz, Jorge Esteves, Diana Mendes, Rita Fleming, Luís Vieira, João Gonçalves, João Lavinha, Paula Faustino
- 13_ Estudo de dislipidemias familiares monogénicas raras** p 52
Study of rare familial monogenic dyslipidemias
Ana Catarina Alves, Sílvia Sequeira, Oana Moldovan, Goreti Lobarinhas, Helena Mansilha, Sequeira Duarte, Ana Gaspar, António Guerra, Mafalda Bourbon

As doenças raras na Europa: o enquadramento português

Rare Diseases in Europe: the Portuguese framework

Verónica Gómez¹, Patrícia Rama², Ausenda Machado¹, Paula Braz¹, Cristina Furtado³, Dezso David², Natércia Miranda⁴, Glória Isidro¹

gloria.isidro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia; (2) Departamento de Genética Humana; (3) Departamento de Doenças Infecciosas; (4) Departamento Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

_Resumo

A EUCERD *Joint Action* (EJA) para as Doenças Raras (DR) integrou cinco domínios: planos nacionais e estratégias, nomenclatura internacional para DR, serviços sociais especializados, qualidade dos cuidados/centros de referência e integração de iniciativas em DR. O objetivo deste artigo é descrever o enquadramento português nas DR. Em novembro de 2014 foi realizado um *workshop* em Portugal com oito países participantes. Foi descrita a situação europeia para as DR e comparada com a realidade portuguesa. Estiveram presentes: autoridades europeias, parceiros da EJA, especialistas, investigadores, profissionais de saúde e associações de doentes. Realizou-se uma análise qualitativa dos conteúdos das apresentações, posteriormente atualizada através de análise documental. No domínio dos planos e estratégias foi aprovada a Estratégia Integrada para as Doenças Raras 2015-2020 que assenta numa cooperação interministerial, intersectorial e interinstitucional. Em relação à nomenclatura, foi discutida e proposta a utilização do *Orphan number*. Foram descritas várias iniciativas no âmbito das DR e observados exemplos de boas práticas na área dos serviços sociais especializados. Recentemente, Portugal reconheceu oficialmente vários Centros de Referência Nacionais, onde se incluem alguns para as DR. Em conclusão, Portugal tem vindo a desenvolver diversas atividades no domínio das DR sendo necessário continuar com a integração das mesmas.

_Abstract

The EUCERD *Joint Action* (EJA) for Rare Diseases (RD) consists of five domains: national plans and strategies, international RD nomenclatures, specialized social services, quality of care/centres of expertise and integration of RD initiatives. This article intends to provide the Portuguese situation on RD. In November 2014, a workshop was held in Portugal and included participants from eight different countries. The European state-of-art in every domain was counterbalanced with the Portuguese reality. European authorities, EJA's partners, experts, researchers, health care professionals and patients' representatives were present. A qualitative data analysis of the presentations' contents was performed and updated documental analysis. Concerning plans and strategies, a National Integrated Strategy 2015-2020, based on an inter-ministerial/sectoral/institutional cooperation, using medical, social, scientific and technological resources, for RD was approved. Regarding nomenclature, health professionals use different coding systems. A proposal for the ORPHA number system to be adopted in disease nomenclature was discussed. Among specialized social services, good practices examples were described and RD initiatives were observed. Finally, just recently, Portugal recognized officially national Reference Centres which include some for RD. In conclusion, regarding the different domains of RD, Portugal has been developing several activities and its integration needs to continue.

_Introdução

O Comité Europeu de Peritos para as Doenças Raras (EUCERD) (1) foi estabelecido para auxiliar a Comissão Europeia (CE) no domínio das Doenças Raras (DR). Entre 2012-2015, decorreu a EUCERD *Joint Action – Working for Rare Diseases* (EJA) (2), com a finalidade de apoiar a EUCERD no mandato atribuído pela CE, na formulação e implementação de atividades comunitárias no âmbito das DR, na promoção da partilha de experiências relevantes, políticas e práticas entre os Estados-Membros (EM).

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) foi responsável pela avaliação da EJA. Um dos seus compromissos foi a organização de um *workshop* cujos principais objetivos foram: atualização de conhecimentos em instrumentos de avaliação e monitorização de projetos europeus, divulgação das atividades da EJA e o enquadramento da posição portuguesa no domínio das Doenças Raras nas cinco áreas-chave: 1) Planos nacionais/estratégias; 2) Nomenclatura internacional; 3) Serviços sociais especializados 4) Qualidade dos cuidados/Centros de Referência e 5) Outras iniciativas em DR (figura 1).

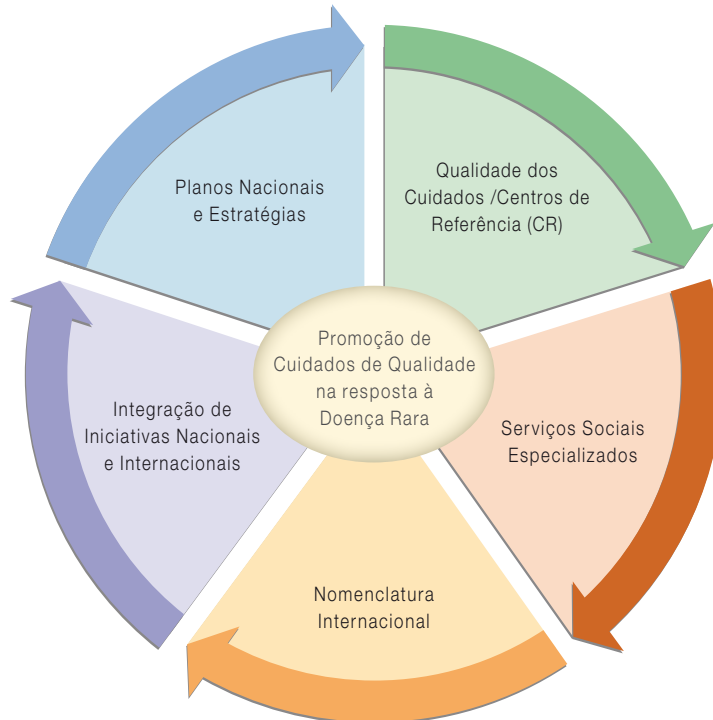
_Objetivo

Este artigo tem com finalidade descrever o enquadramento português nas DR.

_Métodos

Estudo observacional descritivo, com base na avaliação qualitativa dos conteúdos nas cinco áreas-chave apresentadas no *workshop* internacional, realizado em novembro de 2014 em Portugal, que contou com a participação de oito países. Foi descrita a situação europeia para as DR e comparada à realidade portuguesa. Numa 2ª fase, os dados foram atualizados por análise documental da legislação nacional.

Figura 1: As cinco áreas-chave para a promoção de cuidados de qualidade na resposta à doença rara.



Resultados

Os resultados apresentados comparam, para cada domínio, a realidade europeia com a portuguesa.

1. Planos Nacionais e Estratégias

Em 2013, a União Europeia (EU) recomendou a elaboração e implementação de planos nacionais para as DR⁽³⁾, sendo que em 2014, dezoito países europeus tinham adotado estes Planos Nacionais/Estratégias, encontrando-se sete países em fase de desenvolvimento dos mesmos.

Em Portugal, o Plano Nacional para as Doenças Raras foi publicado pela Direção-Geral da Saúde (DGS) em 2008⁽⁴⁾. Em 2015 foi aprovada a Estratégia Integrada para as Doenças Raras 2015-2020⁽⁵⁾, que tem como objetivo garantir uma abordagem interministerial, intersectorial e interinstitucional, reunindo contribuições, competências e recursos de todos os sectores relevantes.

2. Nomenclatura internacional

A UE recomenda um sistema de informação de saúde codificado e rastreável, com base na Classificação Internacional de Doenças (CID)⁽⁶⁾, respeitando os procedimentos nacionais. A nomenclatura específica para as DR, o Código Órfão, foi desenvolvido pela *Orphanet*⁽⁷⁾ que, em colaboração com a Organização Mundial da Saúde (OMS), se encontra a incorporar todas as DR no CID-11.

Em Portugal, são usados diferentes sistemas de codificação, tendo sido proposto que o Código Órfão seja utilizado no Serviço Nacional de Saúde. A equipa nacional da *Orphanet* tem mantido disponíveis traduções atualizadas dos conteúdos do *website* internacional.

3. Serviços Sociais especializados

A nível europeu foram identificadas diferentes tipologias de serviços, como programas de terapia ocupacional, serviços de cuidados continuados e alojamento adaptado. A identificação e o mapeamento destes serviços, bem como a publicação de

artigos breves_ n. 1

estudos de caso e de diretrizes, encontram-se em permanente atualização. A EUCERD produziu recomendações⁽⁸⁾ para a área social que, juntamente, com a implementação dos Planos Nacionais se espera que contribuam para a melhoria dos sistemas de cuidados dos Estados-Membros.

Em Portugal, existem serviços de apoio social tanto no sector público como no privado, sendo que algumas respostas sociais são coordenadas por associações de doentes e seus familiares, com apoio estatal. Existem, também, duas alianças de associações de DR, a FEDRA-Federação das Doenças Raras de Portugal (www.fedra.pt) e a APADR-Aliança Portuguesa de Associações das Doenças Raras (www.aliancadoencasraras.org/). Em 2013 foi inaugurado o primeiro Centro de Recursos em Doenças Raras, a “Casa dos Marcos” (<http://casadosmarcos.rarissimas.pt>) que possui um modelo assistencial pioneiro em Portugal e na Europa, integrando valências sociais e de saúde num único edifício, totalmente acessível a pessoas com deficiência.

4. Qualidade dos Cuidados /Centros de Referência (CR)

A Recomendação do Conselho para as DR, propõe o desenvolvimento de CR e de Rede de Referência Europeia (RRE). Mais recentemente, através da Directiva para os Cuidados de Saúde Transfronteiriços⁽⁹⁾, foram propostas medidas de organização de cuidados de saúde para doentes com DR na Europa. A EUCERD desenvolveu recomendações⁽¹⁰⁾ nas seguintes temáticas: Missão e Âmbito dos CR, Critérios para o Estabelecimento de CR, Processo de Estabelecimento e Avaliação dos CR Nacionais e Dimensão Europeia dos CR.

Em Portugal, a Portaria n.º 194/2014⁽¹¹⁾, veio estabelecer o conceito, o processo de identificação, aprovação e reconhecimento dos Centros de Referência Nacionais; o Despacho n.º 2999/2015⁽¹²⁾, veio definir as áreas de intervenção prioritárias em que devem ser reconhecidos CR e o Despacho n.º 3653/2016⁽¹³⁾ estabelece os CR, para diversas patologias, incluindo DR.

5. Outras iniciativas em DR

A DG-SANCO e o Joint Research Centre estão a desenvolver uma Plataforma Europeia para o Registo das DR, importante

instrumento para a vigilância epidemiológica. Relativamente às RRE, a Decisão de Execução da Comissão⁽¹⁴⁾, define critérios para a criação e avaliação de RRE e dos seus membros, bem como facilita o intercâmbio de informações e experiências sobre a criação e avaliação das mesmas. A UE aprovou a Diretiva 2011/24/UE⁽⁹⁾ relativa ao exercício dos direitos dos doentes em matéria de cuidados de saúde transfronteiriços. Atualmente, os testes de diagnóstico genético disponíveis, cobrem 685 genes e cerca de 793 doenças registadas na *Orphanet* e estão disponíveis, internacionalmente, através dos sectores público e privado. A raridade destas patologias, o elevado custo da realização destes testes bem como o reduzido número de doentes, justifica que só alguns países realizem a totalidade dos testes genéticos existentes.

Portugal é membro do movimento para a implementação da Diretiva 2011/24/EU pelo que, quando um teste específico não esteja disponível em Portugal, será possível realizá-lo no exterior. De entre outras iniciativas portuguesas destaca-se a criação do Cartão da Pessoa com Doença Rara⁽¹⁵⁾ que reúne informação clínica adequada e relevante sobre a DR do portador desde 2012. Considerando o registo das DR, o Registo Nacional Português está em desenvolvimento.

_Conclusões

Em relação aos vários aspetos relacionados com as doenças raras, Portugal tem vindo a desenvolver diversas atividades neste domínio, sendo necessário continuar esta integração. A meta é que, de forma progressiva, seja garantido que a pessoa com doença rara tenha melhor acesso e qualidade nos cuidados de saúde e sociais, no sentido de se conseguir uma mudança consistente nas condições complexas destes indivíduos e das suas famílias.

Referências bibliográficas:

- (1) European Commission. Commission of Expert Group on Rare Diseases [em linha]. [consult. 4/2016]. http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/expert_group/index_en.htm
- (2) European Commission. EUCERD Joint Action – Working for Rare Diseases [em linha]. [consult. 4/2016]. www.eucerd.eu/?page_id=54.
- (3) Council of the European Union. Council Recommendation of 8 June 2009 on an action in the field of rare diseases (2009/C 151/02). JO 3.7.2009: C 151/7-10. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2009:151:0007:0010:EN:PDF>.
- (4) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para Doenças Raras. Lisboa: DGS, 2008. www.dgs.pt/areas-em-destaque/plano-nacional-de-saude/programas-nacionais/programa-nacional-para-doencas-raras-pdf.aspx

artigos breves_ n. 1

- (5) Ministérios da Saúde, da Educação e Ciência e da Solidariedade, Emprego e Segurança Social. Despacho n.º 2129-B/2015, 26 de fevereiro. DR 2ª Série, nº 41(2º supl.):5190-(8)-(10). Aprova a Estratégia Integrada para as Doenças Raras 2015-2020. <https://dre.pt/application/file/66622142>
- (6) Organização Mundial de Saúde ; trad. Centro Colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português. Classificação Estatística Internacional de Doenças e de Problemas Relacionados à Saúde (CID-10). 10ª revisão. São Paulo: Universidade de São Paulo,1999-2003 (3 vols.). Versão port.: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)
- (7) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (coord.). Orphanet- O portal para as doenças raras e os medicamentos órfãos. [em linha]. [consult./4/2016]. www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php
- (8) European Union Committee of Expert Group on Rare Diseases. Guiding principles for specialised social services. Bruxelas: EUCERD, 2013.
- (9) Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. Directiva 2011/24/UE, 9 de março de 2011. JO 4.4.2011: L 88/45-65. Relativa ao exercício dos direitos dos doentes em matéria de cuidados de saúde transfronteiriços. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:088:0045:0065:pt:PDF>
- (10) EUCERD Recommendations on Rare Disease European Reference Networks (RD ERNS). Bruxelas: EUCERD, 2013. www.eucerd.eu/?post_type=document&p=2207
- (11) Ministério da Saúde. Portaria n.º 194/2014, 30 de setembro. DR 1ª Série, nº 188: 5103-08. Estabelece o conceito, o processo de identificação, aprovação e reconhecimento dos Centros de Referência Nacionais para a prestação de cuidados de saúde, designadamente para diagnóstico e tratamento de doenças raras. <https://dre.pt/application/file/57695207>
- (12) Ministério da Saúde. Despacho n.º 2999/2015, 5 de março de 2015. DR, 2ª Série 24-03-2015, nº 58:7253-54. Altera a designação de uma das áreas de intervenção prioritária em que devem ser reconhecidos Centros de Referência em 2015. <https://dre.pt/application/file/66818363>
- (13) Saúde - Gabinete do Ministro. Despacho n.º 3653/2016, de 7 de março, DRE, 2ª Série, nº 50:8724. Reconhece os Centros de Referência para as áreas da Cardiologia de Intervenção Estrutural; Cardiopatias Congénitas; Doenças Hereditárias do Metabolismo; Epilepsia Refratária; Oncologia de Adultos - Cancro do Esófago; Oncologia de Adultos - Cancro do Testículo; Oncologia de Adultos - Sarcomas das Partes Moles e Ósseos; Oncologia de Adultos - Cancro do Reto; Oncologia de Adultos - Cancro Hepatobilio-Pancreático; Oncologia Pediátrica; Transplantação Renal Pediátrica; Transplante de Coração e Transplante Rim – Adulto. <https://dre.pt/application/file/73847777>
- (14) Comissão Europeia. Decisão de Execução da Comissão de 10 de março de 2014 (2014/287/UE). JO 17.5.2014: L 147/79-87. Define critérios para a criação e avaliação de redes europeias de referência e dos seus membros, bem como para facilitar o intercâmbio de informações e experiências sobre a criação e avaliação das referidas redes. http://ec.europa.eu/health/ern/docs/ern_implementingdecision_20140310_pt.pdf
- (15) Direção-Geral da Saúde. Norma n.º 008/2014, de 21 de julho (atualiz. 22/03/2016). Cartão da Pessoa com Doença Rara (CPDR). www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0082014-de-21072014.aspx

Vigilância de síndromes com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas: dados do Registo Nacional de Anomalias Congénitas para os anos 2000 a 2013

Surveillance of syndromes with congenital anomalies affecting multiple systems: data from Portuguese National Registry between 2000 and 2013

Paula Braz, Ausenda Machado, Carlos Matias Dias

paula.braz@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, INSA.

_Resumo

O Registo Nacional de Anomalias Congénitas (RENAC) recebe notificações da ocorrência de anomalias congénitas diagnosticadas até ao final do 1º mês de vida, algumas das quais são raras. Foi realizado um estudo observacional, transversal, com a finalidade de descrever a epidemiologia dos registos de anomalias congénitas que constituem uma síndrome genética rara, utilizando os dados do RENAC entre 2000-2013. Observou-se uma prevalência de 1,17 casos/10 000 nascimentos de indivíduos com síndrome genética rara com anomalias que afetam múltiplos sistemas. Estas patologias representam um pequeno grupo do universo das doenças raras. No total das síndromes estudadas (n=171), a maior frequência observou-se no grupo de síndromes que afetam predominantemente o aspeto da face (50,9%) e, neste grupo, destacam-se a Sequência de Pierre Robin (26,3%) e a Síndrome de Goldenhar (11,7%). No grupo de outras síndromes genéticas, a Síndrome de DiGeorge foi diagnosticada em 12,3% dos casos. Dada a inexistência de um registo nacional de doenças raras, os dados do RENAC podem contribuir para avaliar a prevalência de algumas destas doenças. Contudo para uma melhor vigilância de algumas doenças raras, o prazo de registo será alargado até ao ano de idade de modo a permitir que situações mais complexas possam ser identificadas e registadas.

_Abstract

The Portuguese National Registry of Congenital Anomalies (RENAC) receives notification of the occurrence of congenital anomalies detected at the end of the 1st month of life and some of them are rare. An observational, descriptive, cross-sectional study using data from RENAC between 2000-2013 was conducted with the purpose of describing the epidemiology of cases with rare genetic syndromes affecting multiple systems. There was a prevalence of 1.17 cases/10 000 births of individuals with rare genetic syndromes with congenital malformation affecting multiple systems, a small group of syndromes in the rare diseases field. Considering all genetic syndromes notified (n=171), 50.9% of cases were observed in the sub-group of congenital malformation syndromes predominantly affecting facial appearance. Within this subgroup Pierre Robin Sequence was diagnosed in 26.3 % of cases and the Goldenhar syndrome in 11.7%. In another sub-group, DiGeorge syndrome was diagnosed in 12.3% of cases. Given that at the moment there is no national rare diseases registry, RENAC data are useful for assessing the prevalence of some rare diseases. To improve rare diseases' surveillance, notification to RENAC will be extended until the end of the 1st year of life in order to allow more complex situations to be identified and registered.

_Introdução

Uma doença rara é uma patologia que afeta um pequeno número de pessoas quando comparado com a população geral. Na Europa, uma doença é considerada rara quando afeta 1 indivíduo em 2000 pessoas (1). Cerca de 80% das doenças raras têm origem genética, podendo envolver um ou vários genes, ou origem cromossómica (1,2).

O Registo Nacional de Anomalias Congénitas (RENAC) é um registo nosológico de base populacional que recebe notificações da ocorrência de anomalias congénitas detetadas na fase pré-natal e até aos 28 dias de vida do recém-nascido, no Continente e Regiões Autónomas (3). Muitas das anomalias, isoladas ou associadas em síndromes, notificadas ao RENAC, inserem-se na categoria de doenças raras e a sua classificação está distribuída pelos vários capítulos da 10ª revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) (4), em que um dos capítulos inclui um subgrupo que engloba as síndromes com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas.

Em Portugal não existe legislação que obrigue à notificação dos indivíduos portadores de anomalias congénitas ou de doença rara, pelo que o RENAC tem procurado obter informação que permita fazer uma avaliação o mais rigorosa possível da situação portuguesa no campo das anomalias congénitas.

_Objetivo

Este estudo teve como finalidade descrever em Portugal para o período de 2000-2013, os casos de portadores de uma síndrome genética rara com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas, notificados ao RENAC.

Material e métodos

Realizou-se um estudo epidemiológico observacional, descritivo, transversal, tendo como base de análise as notificações ao RENAC de nascimentos com algumas das síndromes genéticas raras com anomalias congénitas afetando múltiplos sistemas, no período de 2000 a 2013. A recolha de informação foi realizada com o apoio de um questionário recebido periodicamente pelo Registo Central por via informática, através da internet, ou em suporte em papel. Utilizando a CID-10 foi considerado neste estudo o grupo “Q87 - Outras síndromes com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas” que inclui os subgrupos: “Síndromes afetando predominantemente o aspeto da face” (Q87.0), “Síndromes associadas predominantemente com baixa estatura” (Q87.1), “Síndromes afetando predominantemente os membros” (Q87.2), “Síndromes congénitas associadas a excesso de crescimento” e “Síndrome de Marfan” (Q87.3 e Q87.4) e “Outras síndromes especificadas não classificadas em outro local” (Q87.5 onde se incluiu a Síndrome de DiGeorge D82.1).

A taxa de prevalência foi calculada considerando o número de nascimentos com pelo menos uma síndrome de entre os grupos em estudo, ocorridos em cada 10000 nascimentos, durante os anos em estudo.

A frequência de casos com síndromes foi calculada considerando o número total de anomalias notificadas no período em estudo.

Resultados

No período compreendido entre 2000 e 2013 foram enviadas ao RENAC 171 notificações de nascimentos com síndromes genéticas raras, os quais incluíam anomalias congénitas que afetavam múltiplos órgãos e sistemas, o que corresponde a uma prevalência de 1,17 casos por 10000 nascimentos, distribuídos de acordo com os subgrupos da CID-10 e apresentados na [tabela 1](#).

Tabela 1: Distribuição das frequências das notificações de síndromes com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas, de acordo com a CID-10, recebidas pelo RENAC entre 2000 e 2013.

Síndromes com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas (Q87)		
Síndromes afetando predominantemente o aspeto da face	n	%
Síndrome de Apert (Q87.01)		4,1
Síndrome de Fraser (Q87.02)		2,3
Síndrome de Goldenhar (Q87.04)		11,7
Síndrome de Moebius (Q87.06)		1,2
Sequência de Pierre Robin (Q87.08)		26,3
Síndrome de Treacher-Collins (Q87.0A)		3
Síndrome de Pena-Shokeir (Q87.0E)		2,3
Total	87	50,9
Síndromes associados predominantemente a baixa estatura	n	%
Síndrome de Cornelia de Lange (Q87.12)		1,7
Síndrome de Noonan (Q87.14)		3,5
Síndrome de Prader-Willi (Q87.15)		2,9
Síndrome de Russel-Silver (Q87.17)		0,6
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (Q87.19)		1,2
Total	17	9,9
Síndromes afetando predominantemente os membros	n	%
Síndrome de Holt-Oram (Q87.20)		1,2
Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber (Q87.21)		2,9
Síndrome de unha-rótula (Q87.22)		0,6
Síndrome de Rubinstein-Tayby (Q87.23)		0,6
Sirenomelia (Q87.24)		4,1
Síndrome de TAR (Q87.25)		1,7
Associação de VATER/VACTERL (Q87.26)		6,4
Total	30	17,5
Síndromes congénitas associadas a excesso de crescimento	n	%
Síndrome de Beckwith-Wiedemann (Q87.30)		3,5
Síndrome de Sotos (Q87.31)		1,2
Síndrome de Marfan (Q87.4)		0,6
Total	9	5,3
Outras síndromes especificadas não classificadas em outro local	n	%
Síndrome de Alport (Q87.80)		0,6
Síndrome de Zellweger (Q87.83)		2,9
Síndrome de Williams (Q87.84)		0,6
Síndrome de DiGeorge (D82.1)		12,3
Total	28	16,4

Este grupo de patologias representa 1,1% de todas as anomalias congénitas registadas no RENAC durante o período em estudo. Nestas observou-se que 50,9% das síndromes notificadas estavam incluídas no grupo de “Síndromes que afetam predominantemente o aspeto da face”, evidenciando-se, neste grupo, a Sequencia de Pierre Robin (26,3%) e a Síndrome de Goldenhar (11,7%). No grupo de “Outras síndromes genéticas especificadas não classificadas em outro local”, a Síndrome de DiGeorge foi diagnosticada em 12,3% dos casos reportados ao RENAC.

Neste grupo de síndromes genéticas raras enviados ao RENAC, 95,5% dos nascimentos foram simples, tendo 83,6% das gestações terminado no nascimento de uma criança viva. Em 12,9% das gestações os progenitores optaram pela interrupção médica da gravidez devido à deteção pré-natal de anomalias graves no feto. A primeira anomalia foi detetada ao nascer em 53,2% dos casos, em 7,6% dos recém-nascidos o diagnóstico de patologia surgiu durante a primeira semana de vida e em 2,9% este diagnóstico aconteceu durante o primeiro mês de vida (tabela 2).

Avaliada a presença de consanguinidade nos progenitores, observou-se que 76,6% dos casais não tinha qualquer grau de parentesco.

_Discussão

A variedade fenotípica de muitas das síndromes genéticas incluídas no grupo em estudo e a ausência de exames complementares específicos podem constituir motivos que dificultem o diagnóstico destas síndromes na fase pré-natal, ou durante o primeiro mês de vida, período máximo de registo de casos na metodologia utilizada pelo RENAC (3). A possibilidade de se poder confirmar a suspeita de Síndrome de Noonan através da presença da mutação PTPN 11 e a Síndrome de DiGeorge pela presença da microdeleção do cromossoma 22q11.2, pode facilitar um diagnóstico precoce a tempo de permitir o registo no RENAC, isto é até ao final do período neo-natal. A Síndrome de Goldenhar, devido ao conjunto conhecido de anomalias congénitas presentes nesta doença rara, sobretudo a dismorfia facial característica, também permite um diagnóstico mais precoce.

Tabela 2: Distribuição das frequências das notificações de síndromes com anomalias congénitas que afetam múltiplos sistemas, de acordo com o tipo de nascimento, resultado da gestação, identificação da 1ª anomalia, sobrevivência para além de uma semana e consanguinidade dos pais, recebidas pelo RENAC entre 2000 e 2013.

Tipo de nascimento	n	%
Simplex	161	95,5
Duplo	9	4,0
Tripló	1	0,2
Total	171	100
Resultado da gestação	n	%
Nado-vivo	143	83,4
Interrupção de gravidez	22	12,9
Feto-morto	4	2,3
Aborto espontâneo	2	1,2
Total	171	100
Identificação da 1ª anomalias congénitas	n	%
Diagnóstico pré-natal	59	34,5
Ao nascer	91	53,2
Até 1 semana de vida	13	7,6
Entre 1 e 4 semanas de vida	5	2,9
Na autópsia	3	1,8
Total	171	100
Sobrevivência para além de 1 semana	n	%
Sim	132	77,2
Não	27	15,8
Desconhecido	12	7,0
Total	171	100
Consanguinidade dos pais	n	%
Sim	8	4,7
Não	131	76,6
Desconhecido	32	18,7
Total	171	100

Comparando os dados do RENAC com os do registo europeu de anomalias congénitas - EUROCAT - para idêntico período de tempo, verifica-se em Portugal uma menor prevalência deste grupo de síndromes genéticas, diferença que pode ser explicada pelo facto de o registo de anomalias congénitas ser efetuado até ao final do primeiro ano de vida na maioria dos países europeus (4).

Assim, na ausência de um registo nacional de doenças raras, os dados do RENAC podem contribuir para a estimativa da prevalência e estudo destas patologias a nível nacional. O alargamento, em preparação, do registo das anomalias congénitas pelo RENAC até ao ano de idade, permitirá uma harmonização dos dados ao nível europeu e ainda que situações mais complexas possam ser diagnosticadas e registadas.

Agradecimentos:

A todos os médicos que nos serviços hospitalares do Continente e Regiões Autónomas participaram no Registo Nacional de Anomalias Congénitas com as notificações dos casos por si diagnosticados ao longo dos anos 2000 a 2013.

Referências bibliográficas:

- (1) European Organisation for Rare Diseases. Rare Diseases: understanding this Public Health Priority. Paris: EURORDIS, 2015.
www.eurordis.org/IMG/pdf/princeps_document-EN.pdf
- (2) Orphanet. 2014 Activity report, May 2015 (V1.3) [Em linha]. [consult. 19/4/2016].
www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/ActivityReport2014.pdf
- (3) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Registo Nacional de Anomalias Congénitas [Em linha]. [consult. 19/4/2016].
www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/Epidemiologia/Unidades/UnInstrObser/Paginas/RENAC.aspx
- (4) Organização Mundial de Saúde ; trad. Centro Colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português. Classificação Estatística Internacional de Doenças e de Problemas Relacionados à Saúde (CID-10). 10ª revisão. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999-2003 (3 vols.). Versão port.: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)
- (5) EUROCAT-European surveillance of congenital anomalies. [Em linha]. [consult. 19/4/2016].
www.eurocat-network.eu/

Rastreio neonatal dos défices do ciclo da ureia em Portugal

Newborn screening for urea cycle disorders in Portugal

Hugo Rocha, Carmen Sousa, Helena Fonseca, Ana Marcão, Lurdes Lopes, Ivone Carvalho, Laura Vilarinho

hugo.rocha@insa.min-saude.pt

Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

_Resumo

Os défices do ciclo da ureia são um grupo de doenças hereditárias do metabolismo caracterizadas fundamentalmente por uma acumulação de amónia. Clinicamente o espectro é muito alargado, com formas de apresentação no período neonatal até situações mais moderadas de apresentação tardia em adultos. O tratamento é fundamentalmente de base nutricional e traduz-se numa redução significativa da mortalidade e morbidade. Com a introdução da espectrometria de massa nos laboratórios de rastreio neonatal em meados dos anos 90, passou a ser possível quantificar alguns intermediários do ciclo, o que associado à existência de um intervalo livre e um tratamento eficaz, permitiu o rastreio de algumas das doenças deste grupo. Em 2004 iniciou-se em Portugal o rastreio dos défices do ciclo da ureia, tendo-se rastreado até ao presente, 988 687 recém-nascidos e identificado 19 casos positivos. Recentes desenvolvimentos técnicos vieram possibilitar a quantificação de novos marcadores, mais concretamente do ácido orótico, o que abre a possibilidade de rastrear o défice em ornitina transcarbamilase, o défice do ciclo da ureia mais frequente. Os autores apresentam a situação atual do rastreio dos défices do ciclo da ureia e as perspetivas em virtude dos novos desenvolvimentos técnicos.

_Abstract

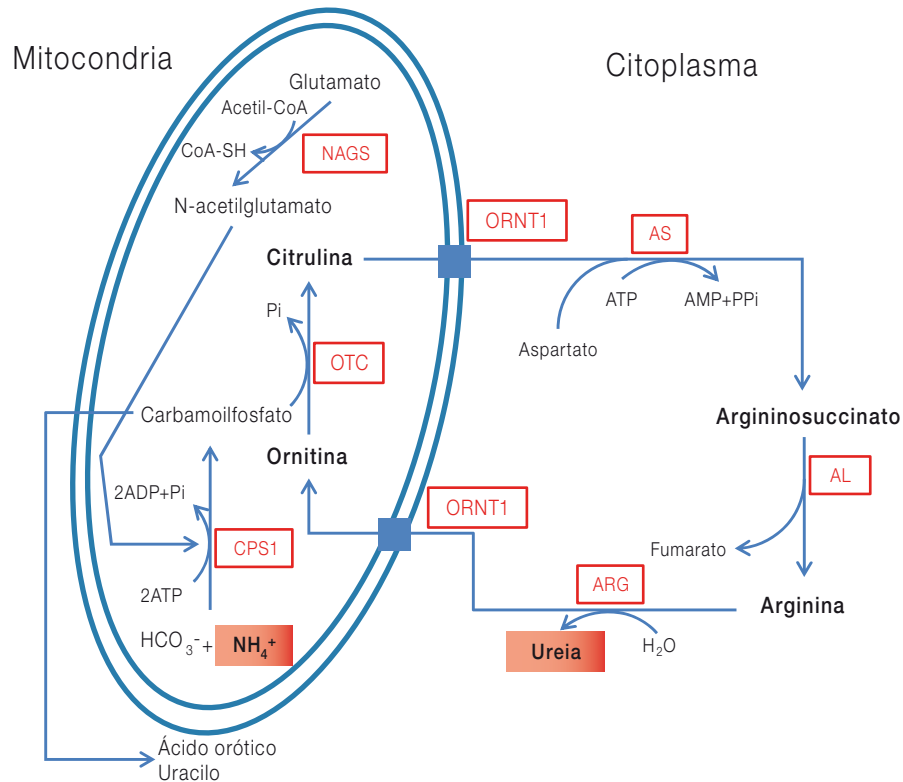
Urea cycle disorders (UCDs) are a group of inborn errors of metabolism characterized by ammonia accumulation. The clinical spectrum is very heterogeneous and ranges from neonatal presentations to almost asymptomatic adults. Treatment is mainly based on a protein-restricted diet and results in a significant decrease of mortality and morbidity. The introduction of tandem mass spectrometry-based techniques in newborn screening laboratories in the middle 90's has allowed to detect and quantify several intermediates of the cycle, and this, alongside with the existence of a symptom-free interval after birth and effective treatment, allowed to screen for some UCDs. Since 2004, the Portuguese newborn screening program for UCDs has analyzed 988 687 newborns and 19 positive cases were detected. Recent technical developments allow quantifying other UCDs markers on Guthrie cards, more precisely orotic acid which opens the possibility to screen for ornithine transcarbamylase deficiency, the most common UCD. The authors will review the current status of the newborn screening for UCDs and present future perspectives.

_Introdução e objetivo

O catabolismo dos aminoácidos e em menor quantidade as bactérias intestinais, produzem amónia, que por sua vez pode ser reutilizada na síntese de *novo* de aminoácidos assim como de outros produtos nitrogenados. A sua acumulação, quer seja devida a um excesso de produção quer a uma deficiente excreção, conduz a uma situação clinicamente relevante que é a hiperamonemia. A acumulação de amónia a nível cerebral é tóxica, possuindo o organismo humano dois mecanismos principais de desintoxicação: uma passa pela conversão da amónia em glutamina e o segundo, mais relevante, é a sua conversão em ureia, molécula não tóxica, através do ciclo da ureia. Este ciclo é uma via metabólica que ocorre entre a mitocôndria e o citoplasma e é composto por um conjunto de quatro reações enzimáticas. A amónia é inicialmente metabolizada na mitocôndria, por ação da carbamoilfosfato sintetase 1, em carbamoilfosfato que por sua vez entra no ciclo por ação da enzima ornitina transcarbamilase. Em cada ciclo, dois átomos de azoto dão origem a uma molécula de ureia (figura 1).

Disfunções do ciclo da ureia devidas a défices congénitos das enzimas que catalisam as várias reações do ciclo, do transportador mitocondrial da citrulina/ornitina, da NAGS ou da CPS1, conduzem às hiperamonemias primárias (1). No entanto, a amónia pode também acumular-se devido a outras causas, como inibições das atividades enzimáticas do ciclo devido a compostos tóxicos, défices de substratos do ciclo (devidos a algumas acidúrias orgânicas, défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos ou terapia com valproato de sódio) e ainda insuficiências hepáticas graves, sendo designadas de hiperamonemias secundárias (1).

Figura 1: Esquema representativo do ciclo da ureia.



NAGS – N-acetilglutamato sintetase; CPS1 – carbamoilfosfato sintetase 1; AS – argininosuccinato sintetase; AL – argininosuccinato liase; ARG – arginase; OTC–ornitina transcarbamilase; ORNT1 – transportador mitocondrial da ornitina/citrulina.

Estão descritos sete défices primários do ciclo da ureia (tabela 1), sendo que todos apresentam um modo de transmissão autossómico recessivo, com exceção do défice em OTC, que é ligado ao cromossoma X (1).

As formas clássicas, com exceção das da Argininemia, incluem uma apresentação aguda no período neonatal com sonolência, letargia, vômitos, convulsões e rápida progressão para coma (1). A Argininemia tem classicamente uma apresentação entre o segundo e quarto ano de idade, estando no entanto, descritas formas raras de apresentação neonatal, nomeadamente na população portuguesa (2). Uma vez que são doenças de intoxicação, a existência de um período

pós-natal assintomático, de duração variável, designado de intervalo livre, é uma característica deste grupo de patologias. As formas menos graves tendem a ter uma apresentação mais tardia e geralmente estão associadas a défices enzimáticos menos graves (3).

Tabela 1: Défices primários do ciclo da ureia.

Défice do ciclo da ureia	#MIM	Gene
Défice em N-acetilglutamato sintetase (NAGS)	237310	NAGS
Défice em carbamoil-fosfato sintetase I (CPS I)	237300	CPS1
Défice em ornitina transcarbamilase (OTC)	311250	OTC
Défice em argininosuccinato sintetase (Citrulinemia tipo I; CIT I)	215700	ASS1
Défice em argininosuccinato liase (Acidúria argininosuccinica; ASL)	207900	ASL
Défice em arginase (Argininemia; ARG)	207800	ARG1
Défice em ORNT1 (Hiperornitinemias-Hiperamonemias-Homocitrulinúrias; HHH)	238970	ORNT1

O tratamento deste grupo de patologias é fundamentalmente de base nutricional, com uma limitação do aporte proteico e uma restrição do catabolismo com a estimulação do anabolismo (1). Por vezes, o tratamento contempla a suplementação com os intermediários do ciclo que eventualmente estejam deficitários (ex. arginina e citrulina) e ainda a utilização de fármacos desintoxicantes como por exemplo o benzoato de sódio ou fenilbutirato de sódio. Em algumas situações, o transplante hepático é considerado o tratamento de eleição (4).

Perante uma suspeita clínica de um défice do ciclo da ureia, o diagnóstico é feito recorrendo ao doseamento de marcadores bioquímicos (tabela 2), determinação da atividade enzimática residual e estudos moleculares.

É reconhecido que uma deteção e tratamento precoces, durante o período neonatal, são fundamentais para prevenir a progressão dos sintomas neste grupo de patologias (5, 6). Com a introdução da espectrometria de massa em *tandem* (ms/ms) nos laboratórios de rastreio neonatal, passou a ser possível o doseamento, em sangue colhido em papel nos primeiros dias de vida, de vários intermediários do ciclo da ureia (7). Esta possibilidade, associada à existência de um intervalo livre e de terapia eficaz, fez com que algumas patologias deste grupo fossem sendo progressivamente incluídas em diferentes programas de rastreio neonatal (8).

Os autores apresentam os resultados do rastreio neonatal dos défices do ciclo da ureia em Portugal.

_Material e métodos

As amostras de recém-nascidos portugueses foram colhidas entre o 3º e 6º dia para cartões de Guthrie, com papel de filtro Whatman 903, no âmbito do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce.

Dois MS/MS, um API2000 e um API QTRAP 4500 (ABSciex) são utilizados no nosso laboratório para efetuar a análise dos recém-nascidos, de acordo com o método anteriormente publicado (9). Esta abordagem possibilita o doseamento da citrulina, arginina, ornitina e ácido argininosuccínico, que permitem o rastreio neonatal da Citrulinemia tipo I, da Argininemia e da Acidúria argininosuccínica (7, 10).

_Resultados

O rastreio sistemático alargado a estas patologias teve o seu início em Portugal em 2004, tendo-se desde então rastreados 988.687 recém-nascidos e identificado 19 casos positivos. Foram identificados dez casos de Citrulinemia tipo I, quatro casos de Acidúria argininosuccínica e cinco casos de Argininemia, com as prevalências ao nascimento de 1: 98 869, 1: 247 172 e 1: 197 737, respetivamente.

_Discussão e conclusão

De entre os défices do ciclo da ureia rastreados o mais prevalente ao nascimento é a Citrulinemia tipo I, sendo a Acidúria argininosuccínica e Argininemia mais raras. O sucesso do rastreio destas patologias tem sido considerável, no entanto o rastreio dos défices do ciclo da ureia ainda apresenta alguns desafios.

Tabela 2: ⚡ Marcadores bioquímicos de diagnóstico dos défices do ciclo da ureia.

Doença	Citrulina	Ácido argininosuccínico	Arginina	Ornitina	Ácido orótico
NAGS	N - ↓	ND	N - ↓	N	N-↓
CPS I	N - ↓	ND	N - ↓	N	N-↓
OTC	N - ↓	ND	N - ↓	N	N-↑↑↑
CIT I	↑↑↑	ND	N - ↓	N	N-↑↑
ASL	↑	↑↑↑	↓	N	N-↑
ARG	↑	ND	↑↑↑	N	N-↑
HHH	N	ND	N	↑↑	N-↑

N - Normal; ND - Não detetável

A doença do ciclo da ureia mais frequente e uma das mais graves, é o défice em OTC, que é recorrentemente apontado com sendo uma das patologias com potencial para ser incorporado no painel de doenças a rastrear. No entanto, a inexistência de um marcador suficientemente sensível e específico vem adiando a sua inclusão (5).

O défice em OTC apresenta um modo de transmissão ligado ao cromossoma X e apresenta uma grande variabilidade clínica, mesmo nos doentes do sexo feminino, podendo apresentar-se como uma forma neonatal grave ou como uma forma de apresentação mais tardia, normalmente de menor gravidade (5). A deficiência em OTC resulta numa diminuição da citrulina, no entanto esta não é suficientemente específica e sensível para poder ser utilizada como marcador primário de rastreio (11).

Foi recentemente publicada a possibilidade de quantificação do ácido orótico em sangue em papel, por MS/MS, com prova de segundo nível (12, 13). O ácido orótico aumenta nos défices do ciclo da ureia em consequência de um aumento do carbamoilfosfato, que é redirecionado para a via de biossíntese das pirimidinas (14). A combinação de valores baixos de citrulina, com o aumento do ácido orótico, poderá ser utilizada como marcador no rastreio desta patologia.

Estes desenvolvimentos apontam para a possibilidade do rastreio neonatal sistemático do défice em OTC e nesse sentido será brevemente implementado, no âmbito do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, o doseamento do ácido orótico em cartão de Guthrie, de forma a avaliar a possibilidade de rastreio desta patologia na população portuguesa.

Agradecimentos:

Parte deste trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto "Atualização tecnológica do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce" (Operação NORTE-07-0162-FEDER-000142), financiado pelo programa ON2-QREN.

Referências bibliográficas:

- (1) Haberle J, Rubio V. Hyperammonemias and related disorders. In: Blau N, Duran M, Gibson KM, et al. (eds). Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic diseases. New York: Springer, 2014, p. 47-62.
- (2) Gomes Martins E, Santos Silva E, Vilarinho S, et al. Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia. *J Inher Metab Dis*. 2010;33(suppl 3):S503-6. Epub 2011 jan 13.
- (3) Sanjurjo P, Rubio V. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del ciclo de la urea. In: Sanjurjo P, Baldellou A. (eds). Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditárias. 4ª ed. Madrid: Ergon, 2014.
- (4) Silva ES, Cardoso ML, Vilarinho L, et al. Liver transplantation prevents progressive neurological impairment in argininemia. *JIMD Rep*. 2013;11:25-30. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755545/
- (5) Brusilow SW, Horwich AL. Urea cycle enzymes. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, et al. (eds). The online metabolic and molecular bases on inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2006.
- (6) Walker V. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11(9):823-35.
- (7) Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem*. 2001;47(11):1945-55. www.clinchem.org/content/47/11/1945.long
- (8) Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result. *J Inher Metab Dis*. 2012;35(4):603-11.
- (9) Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003;49(11):1797-817. www.clinchem.org/content/49/11/1797.long
- (10) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis*. 2010;33(suppl 3):S133-8.
- (11) Cavicchi C, Malvagia S, la Marca G, et al. Hypocitrullinemia in expanded newborn screening by LC-MS/MS is not a reliable marker for ornithine transcarbamylase deficiency. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;49(5):1292-5.
- (12) Held PK, Haynes CA, De Jesús VR, et al. Development of an assay to simultaneously measure orotic acid, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chim Acta*. 2014;436:149-54. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835024/
- (13) Janzen N, Terhardt M, Sander S, et al. Towards newborn screening for ornithine transcarbamylase deficiency: fast non-chromatographic orotic acid quantification from dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2014;430:28-32. Epub 2013 Dec 25.
- (14) Salerno C, Crifó C. Diagnostic value of urinary orotic acid levels: applicable separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;781(1-2):57-71.

Doenças lisossomais de sobrecarga em Portugal: 10 anos de experiência em estudos moleculares no INSA (2006-2016)

Lysosomal storage diseases in Portugal: 10 years of experience in molecular studies at National Health Institute (2006-2016)

Maria Francisca Coutinho, Ana Joana Duarte, Liliana Matos, Juliana Inês Santos, Olga Amaral, Sandra Alves

sandra.alves@insa.min-saude.pt

Grupo de Investigação em Doenças Lisossomais de Sobrecarga. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

_Resumo

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLS) são um grupo de mais de 50 doenças hereditárias do metabolismo, sendo a maioria causada por defeitos em enzimas lisossomais específicas. A característica distintiva das DLS é a acumulação lisossomal do(s) substrato(s) não degradado(s), bem como a acumulação de outro material secundariamente à disfunção lisossomal. A apresentação clínica destas patologias é bastante heterogénea, variando desde formas pré-natais, até apresentações infantis ou na idade adulta, sendo frequente a presença de atraso psicomotor e neurodegeneração progressiva. Neste artigo são apresentados os resultados de vários estudos de caracterização molecular efetuados ao longo da última década (2006-2016) em doentes portugueses com as seguintes DLS: Mucopolissacaridose II, Mucopolissacaridose IIIA, Mucopolissacaridose IIIB, Mucopolissacaridose IIIC, Sialidose, Galactosialidose, Gangliosidose GM1, Mucolipidose II alfa/beta, Mucolipidose III alfa/beta, Mucolipidose III gama e Doença de Unverricht-Lundborg. De um modo geral, estes trabalhos permitiram conhecer as variações genéticas associadas a estas DLS, analisar a sua distribuição na população portuguesa e compreender o seu papel na forma de apresentação clínica destas patologias.

_Abstract

Lysosomal Storage Diseases (LSDs) are a group of more than 50 inherited metabolic diseases which in the majority of cases, result from a defective function of specific lysosomal enzymes. The classical hallmark of LSDs is the lysosomal accumulation of unhydrolyzed substrate(s) as well as storage of other material secondary to lysosomal dysfunction. LSD clinical presentation has considerable heterogeneity, ranging from prenatal forms to later onset infantile or adult presentations, often with psycho-motor delay and progressive neurodegeneration. In this paper we present the results of several molecular studies performed over the last decade (2006-2016) in Portuguese patients with the following LSDs: Mucopolysaccharidosis II, Mucopolysaccharidosis IIIA, Mucopolysaccharidosis IIIB, Mucopolysaccharidosis IIIC, Sialidosis, Galactosialidosis, GM1 Gangliosidosis, Mucolipidosis II alpha/beta, Mucolipidosis III alpha/beta, Mucolipidosis III gamma and Unverricht-Lundborg disease. Globally these studies have provided valuable data regarding the underlying genetic causes of these LSDs and the frequency of their causative mutations the Portuguese population, further contributing to a better understanding of their role in the clinical presentation of the symptoms.

_Introdução

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLS) constituem um grupo de doenças hereditárias do metabolismo. Estas patologias raras caracterizam-se por uma acumulação intralisossomal de substratos não degradados e de produtos do catabolismo, podendo dever-se a defeitos genéticos que alterem hidrolases lisossomais, proteínas ativadoras ou ainda proteínas da membrana do lisossoma. Atualmente estão descritas mais de 50 DLS, sendo a grande maioria autossómicas recessivas. Há ainda a considerar as chamadas doenças “*lysosome-related*”, onde surge disfunção lisossomal com etiologia diversa. Na população portuguesa a prevalência conjunta das DLS está estimada em cerca de 1/4000 recém-nascidos⁽¹⁾.

As DLS apresentam uma grande variedade de sintomas clínicos que vão desde a presença de doença neurológica grave, a casos menos graves ou até assintomáticos. Os sintomas surgem geralmente nos primeiros meses/anos de vida e os sinais mais frequentes são alterações neurológicas, ósseas, cardiovasculares, cutâneas, oculares, hematológicas, organomeia e dismorfia facial⁽²⁾.

Embora para a maioria das DLS, não exista um tratamento totalmente eficaz, nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidas várias terapêuticas de substituição enzimática e de redução do substrato (gráfico 1), estando neste momento disponíveis no mercado soluções que possibilitam o tratamento de oito doenças⁽²⁾.

As DLS são normalmente monogénicas mas, para a maioria dos casos, estão descritas várias mutações no mesmo gene. As mutações mais comuns são *missense*, *nonsense*, *splicing*,

artigos breves_ n. 4

deleções parciais e inserções. Algumas das mutações provocam a inativação da enzima em causa enquanto outras alteram a função da proteína mutada.

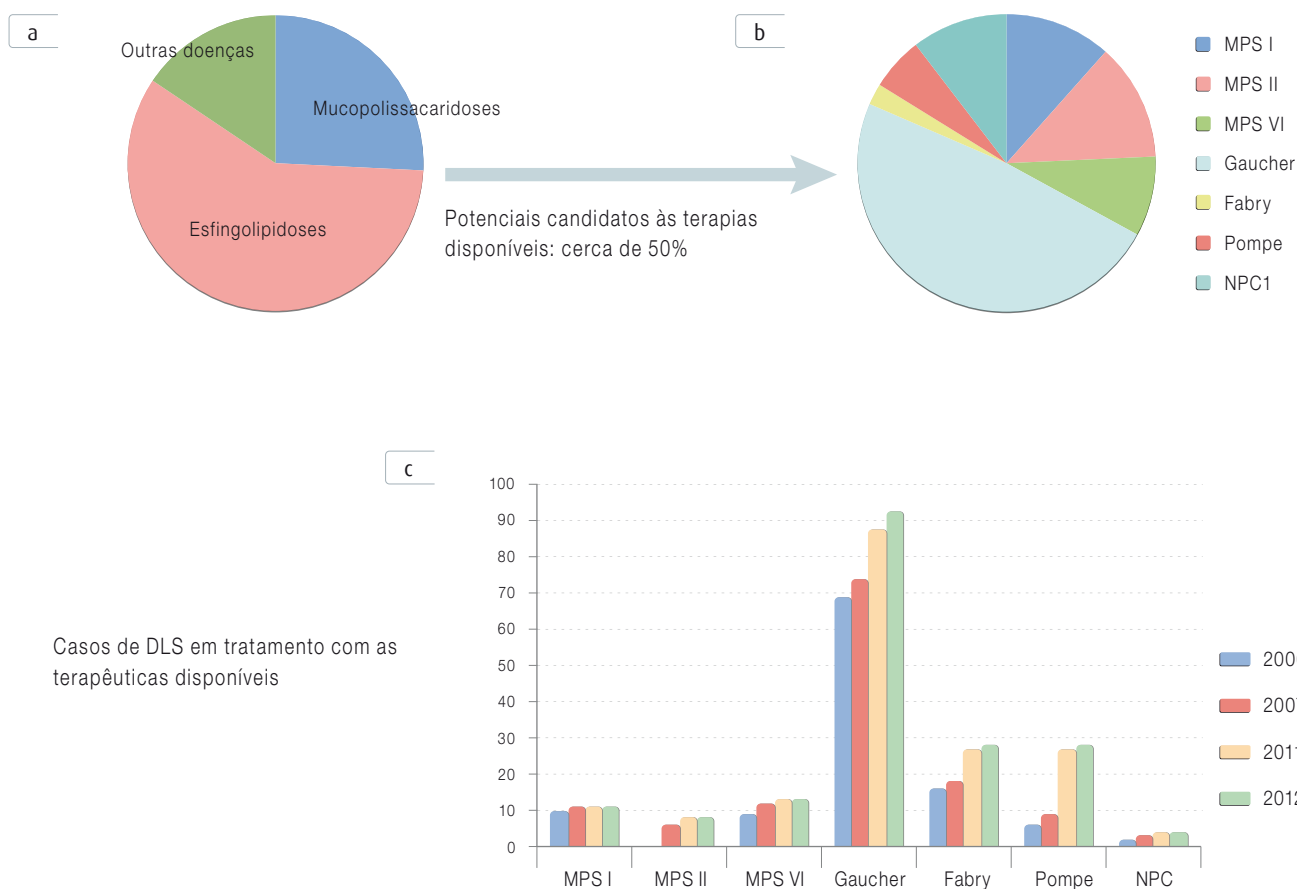
_Objetivo

Neste artigo são apresentados resultados de vários estudos de caracterização molecular realizados ao longo da última década (2006-2016). Neste período foram desenvolvidos métodos de biologia molecular com a finalidade de detetar as variações genéticas ao nível de diversos genes associados a DLS que ainda não tinham sido analisados em Portugal.

_Material e métodos

Foram analisados 64 doentes portugueses divididos por 11 patologias (Mucopolissacaridoses tipo II, IIIA, IIIB e IIIC; Galactosialidose; Sialidose; Gangliosidose GM1; Mucolipidoses tipo II alfa/beta, tipo III alfa/beta e tipo III gama e Doença de Unverricht-Lundborg). Nestes doentes as mutações foram identificadas através de uma estratégia analítica que englobou o estudo do gDNA e do cDNA.

Gráfico 1 (a-c): ⬇ Grupos principais de DLS e patologias com terapias disponíveis.



Adaptado de *The prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal*⁽¹⁾ (n=353) e dos relatórios técnicos sobre o Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais, 2007, 2011 e 2012⁽³⁻⁵⁾ (ao longo do tempo o número dos doentes em tratamento varia, aumentando com a disponibilização de novas terapias – n=185 em 2012).
MPS: Mucopolissacaridose; NPC1: Doença de Niemann-Pick tipo C1.

artigos breves_ n. 4

Na maioria dos casos estudou-se também o impacto das mutações encontradas ao nível do RNA através de PCR quantitativo em tempo real e procurou-se, sempre que possível, analisar a correlação genótipo-fenótipo.

No sentido de esclarecer se a presença de duas mutações frequentes em doentes com duas DLS (Mucopolidose tipo II alfa/beta, causada por mutações no gene *GNPTAB* e Mucopolissacaridose tipo IIIB, causada por mutações no gene *NAGLU*) se deve a um efeito fundador ou se, pelo contrário, resulta de eventos mutacionais independentes, foram efetuados estudos haplotípicos utilizando polimorfismos intragénicos e marcadores polimórficos do tipo microssatélite localizados na proximidade desses genes.

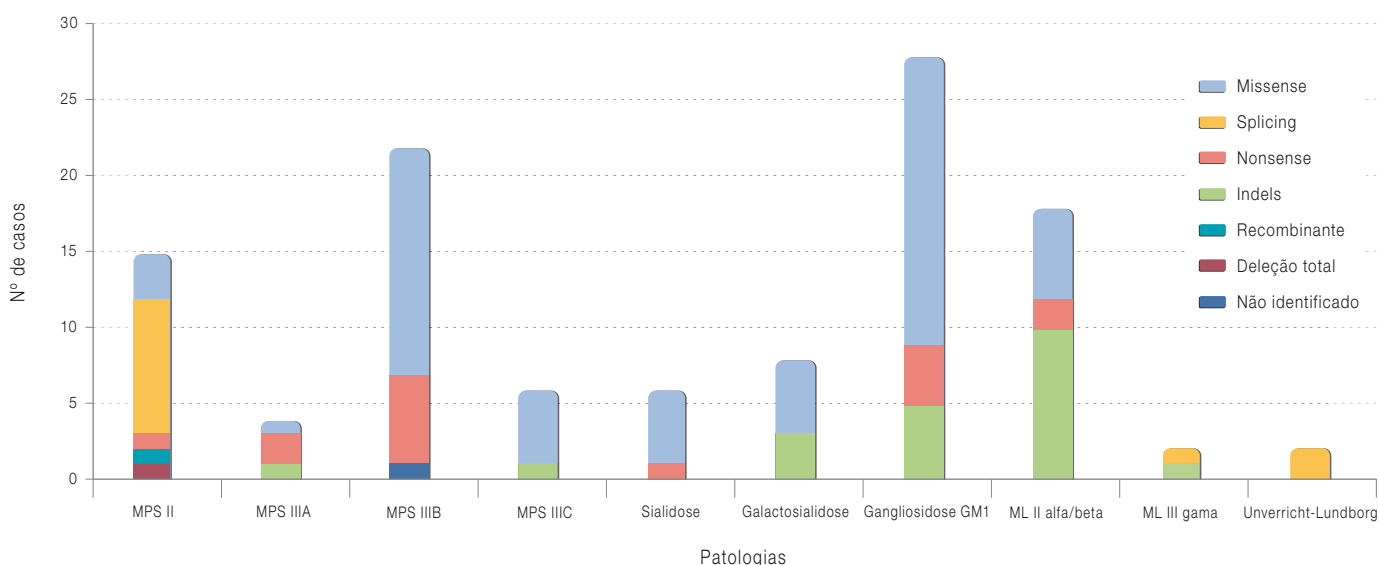
Resultados

Foi possível identificar as lesões moleculares causais em todos os doentes analisados. No gráfico 2 é apresentada a distribuição relativa dessas mutações, de acordo com o tipo de lesão/defeito molecular encontrada por patologia.

Para a maioria dos doentes, a avaliação do potencial patogénico de cada uma das mutações foi bastante coerente, tendo-se observado uma forte correlação entre o fenótipo clínico observado e o tipo de lesão molecular previamente identificada.

Na maioria dos casos as mutações encontradas são únicas ou muito raras, mas foram também encontradas duas mutações frequentes nos doentes portugueses. No gene *GNPTAB* a deleção c.3503_3504delTC está presente em aproximadamente 50% dos alelos mutados⁽⁶⁾ e no gene *NAGLU* a mutação p.R234C representa cerca de 30% dos alelos mutados portugueses⁽⁷⁾. A análise de três SNPs intragénicos e 2 microssatélites que flanqueiam o gene *GNPTAB* num total de 44 doentes e 16 portadores da deleção, provenientes de diferentes regiões geográficas, levou à identificação de um haplótipo comum em todos os cromossomas com a deleção c.3503_3504delTC. Relativamente à mutação p.R234C, que é igualmente o alelo mutado mais comum em doentes espanhóis (33%), a análise de um polimorfismo intragénico e de dois microssatélites que flanqueiam o gene *NAGLU* em doentes

Gráfico 2: Distribuição de tipo de mutações por patologia.



Compilação de dados publicados em diferentes artigos, organizados por patologias ou grupo de patologias: Mucopolissacaridose II (16 casos; 15 mutações, 6 das quais novas)⁽⁹⁾; Mucopolissacaridose IIIA (2 casos; 3 mutações distintas, todas previamente descritas)⁽¹⁴⁾; Mucopolissacaridose IIIB (11 casos; 9 mutações, 5 das quais novas)⁽⁷⁾; Mucopolissacaridose IIIC (3 casos; 2 mutações, ambas novas)⁽¹⁵⁾; Sialidose, Galactosialidose e Gangliosidose GM1 (3 casos de sialidose, 4 de galactosialidose e 14 de gangliosidose GM1, em que foram identificadas, respetivamente 4, 4 e 6 mutações diferentes, sendo todas as mutações de sialidose novas, bem como 3 das mutações associadas a galactosialidose)⁽¹⁶⁾; Mucopolidoses II alfa/beta, Mucopolidose III alfa/beta e Mucopolidose III gama (10 casos, 5 mutações no gene *GNPTAB*, 3 das quais novas e 2 mutações novas no *GNPTG*)⁽⁶⁾; Unverricht-Lundborg (1 caso, no qual foi identificada uma nova mutação em homocigotia)⁽⁴⁾.

MPS: Mucopolissacaridose; ML: Mucopolidose.

portugueses e espanhóis permitiu a identificação de um haplótipo comum no qual a mutação p.R234C terá surgido.

_Discussão

De uma forma geral, estes estudos permitiram: (a) identificar o espectro mutacional em doentes portugueses com estas patologias; (b) analisar a distribuição dessas mutações na nossa população; (c) melhorar o aconselhamento genético nas famílias afetadas facultando o diagnóstico pré-natal e a identificação de portadores e (d) estabelecer correlações entre o genótipo molecular e a apresentação fenotípica da doença. Apesar de grande parte das mutações reportadas ser privada ou rara⁽⁸⁻¹⁰⁾, também foram encontradas algumas mutações frequentes. Por exemplo, a deleção c.3503_3504delTC, identificada no gene *GNPTAB*, em quase todos os casos de Mucopolidose II⁽⁶⁾ e a mutação p.R234C, detetada no gene *NAGLU*, em vários casos de Mucopolissacaridose IIIB⁽⁷⁾. No sentido de esclarecer se a frequência observada se devia a um efeito fundador realizaram-se estudos haplotípicos. No caso da c.3503_3504delTC, também frequente em outras populações, foi possível analisar doentes e portadores de diferentes regiões geográficas e concluir que esta mutação é relativamente antiga e foi originada por uma lesão molecular fundadora com origem peri-mediterrânica⁽¹¹⁾. No caso da mutação p.R234C, também frequente nos doentes MPS IIIB espanhóis, realizou-se uma análise dos doentes portugueses e espanhóis, cujo resultado demonstrou uma origem comum para esta mutação na Península Ibérica⁽⁶⁾.

Este tipo de observação não é, aliás, inédito no que se refere às DLS. De facto, já foram reportados casos semelhantes para outras DLS, nomeadamente na doença de Gaucher⁽¹²⁾, em NPC1⁽¹³⁾, na variante B1 de Gangliosidose GM2⁽¹⁴⁾, em MPS I⁽¹⁵⁾ e até em Leucodistrofia Metacromática⁽¹⁶⁾, nas quais o perfil das mutações identificadas indica a existência de movimentos populacionais que terão permitido a dispersão de algumas mutações a partir de uma origem comum, sendo que também na maioria destes casos, a Península Ibérica surge como origem de várias mutações causais de DLS.

_Conclusão

Os estudos de caracterização molecular efetuados permitiram obter dados sobre as causas moleculares destas DLSs na população portuguesa contribuindo também, para um melhor conhecimento a nível mundial das bases moleculares destas doenças. Por outro lado, estes estudos são extremamente importantes na medida em que a análise mutacional permite a realização de um diagnóstico pré-natal molecular, a identificação de portadores nos restantes membros do núcleo familiar, nomeadamente em famílias onde ocorra consanguinidade, e um diagnóstico mais preciso aos familiares de doentes recentemente diagnosticados, melhorando consideravelmente o aconselhamento genético.

Agradecimentos:

Estudos parcialmente financiados pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, Ministério da Saúde (P.I. nº 99/2007 e nº 100/2007) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PIC/IC/83252/2007 e PIC/IC/82822/2007).

Referências bibliográficas:

- (1) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(2):87-92. www.nature.com/ejhg/journal/v12/n2/full/5201044a.html
- (2) Coutinho MF, Alves S. From rare to common and back again: 60 years of lysosomal dysfunction. *Mol Genet Metab.* 2016;117(2):53-65. Epub 2015 Aug 18.
- (3) Centro Nacional Coordenador do Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais. Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais: relatório 2007. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2008.
- (4) Grupo de Trabalho Coordenador do Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais. Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais: relatório 2011. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1803>
- (5) Grupo de Trabalho Coordenador do Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais. Diagnóstico e Tratamento de Doenças Lisossomais: relatório 2012. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2214>
- (6) 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 Inher Metab Dis.* 2006;29(6):743-54.
- (7) Pinto E, Freitas J, Duarte AJ, et al. Unverricht-Lundborg disease: homozygosity for a new splicing mutation in the cystatin B gene. *Epilepsy Res.* 2012;99(1-2):187-90. Epub 2011 Dec 10.
- (8) Duarte AJ, Ribeiro D, Chaves J, et al. Characterization of a rare Unverricht-Lundborg disease mutation. *Mol Genet Metab Rep.* 2015;4:68-71. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750610/

artigos breves_ n. 4

- (9) Encarnação M, Lacerda L, Costa R, et al. Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolidosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet.* 2009;76(1):76-84.
- (10) 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;73(3):251-6.
- (11) Coutinho MF, Encarnação M, Gomes R, et al. Origin and spread of a common deletion causing mucopolidosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity. *Clin Genet.* 2011;80(3):273-80. Epub 2010 Sep 29.
- (12) Diaz GA, Gelb BD, Risch N, et al. Gaucher disease: the origins of the Ashkenazi Jewish N370S and 84GG acid beta-glucosidase mutations. *Am J Hum Genet.* 2000;66(6):1821-32. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1378046/
- (13) Ribeiro I, Marcão A, Amaral O, et al. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet.* 2001;109(1):24-32.
- (14) dos Santos MR, Tanaka A, Sá Miranda MC, et al. GM2-gangliosidosis B1 variant: analysis of beta-hexosaminidase alpha gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am J Hum Genet.* 1991;49(4):886-90. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683169/
- (15) Ribeiro D. Study of W402X mutation: frequency of the lysosomal a-L-iduronidase variant in the Portuguese population and function analysis. *Dissertação de mestrado, Universidade do Minho, 2012.* <http://hdl.handle.net/1822/24478>
- (16) Lugowska A, Amaral O, Berger J, et al. Mutations c.459+1G>A and p.P426L in the ARSA gene: prevalence in metachromatic leukodystrophy patients from European countries. *Mol Genet Metab.* 2005;86(3):353-9.
- (17) Mangas M. Caracterização Molecular das Mucopolissacaridoses tipo IIIA e IIIB em Portugal. *Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2006.*
- (18) Coutinho MF, Lacerda L, Prata MJ, et al. Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis IIIC: two novel mutations in the HGSNAT gene. *Clin Genet.* 2008;74(2):194-5.
- (19) Coutinho MF, Lacerda L, Macedo-Ribeiro S, et al. Lysosomal multienzymatic complex-related diseases: a genetic study among Portuguese patients. *Clin Genet.* 2012;81:379-93.

Rastreio neonatal da homocistinúria clássica revela uma elevada frequência da deficiência em MAT I/III na Península Ibérica

Newborn screening for homocystinuria revealed a high frequency of MAT I/III deficiency in Iberian Peninsula

Ana Marcão¹, María L. Couce², Célia Nogueira¹, Helena Fonseca¹, Filipa Ferreira¹, José M. Fraga², M. Dolores Bóveda², Laura Vilarinho¹

ana.marcao@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

(2) Unidade de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Metabólicas Congénitas. Departamento de Pediatria, Hospital Clínico Universitário de Santiago de Compostela; CIBER-Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras.

_Resumo

A homocistinúria devida à deficiência da enzima cistationina β -sintetase ou "homocistinúria clássica" é uma doença metabólica rara (1/344 000 RN), de transmissão autossómica recessiva e caracterizada por elevada heterogeneidade clínica, que frequentemente contribui para o diagnóstico tardio. Existe tratamento efetivo, se instituído antes de se instalarem sintomas irreversíveis, pelo que tem sido incluída num número considerável de programas de rastreio neonatal. O rastreio baseia-se na determinação dos níveis plasmáticos de metionina, por espectrometria de massa em *tandem* (*ms/ms*), mas conduz à identificação de muitos casos falsos-positivos, portadores de uma condição com significado clínico não completamente esclarecido, a deficiência em metionina adenosiltransferase (MAT I/III). Ambas as condições são rastreadas na Galiza e em Portugal desde 2000 e 2004, respetivamente. Desde então, foram identificados três doentes com homocistinúria clássica e 44 doentes com deficiência em MAT I/III. Uma forma dominante, e aparentemente benigna, desta última condição, associada à mutação p.R264H, parece ser muito frequente na Península Ibérica. A implementação de um teste de segunda linha, consistindo na determinação da homocisteína total, permitiria reduzir consideravelmente o número de RN identificados com deficiência em MAT I/III e melhorar a especificidade e valor positivo preditivo do rastreio da homocistinúria clássica.

_Abstract

*Homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency or "classical homocystinuria" is a rare autosomal recessive condition characterized by high clinical heterogeneity, which contributes to frequent late clinical diagnosis. Treatment is effective if started before irreversible clinical symptoms, which led to its inclusion in a number of newborn screening programs, based on the analysis of methionine levels by tandem mass spectrometry (*ms/ms*). Nevertheless, false-positive results can be frequently obtained and lead to the unwanted identification of methionine adenosyl transferase (MAT I/III) deficiency, a condition with clinical significance not completely elucidated. Both these metabolic disorders are screened in Galicia and Portugal since the introduction of the *ms/ms* technology, in 2000 and 2004, respectively, resulting in the identification of three patients with classical homocystinuria and 44 patients with MAT I/III deficiency. A dominant form of MAT I/III deficiency, associated with mutation p.R264H, seems to be very frequent in the Iberian Peninsula and usually is associated with a clinically benign course. The implementation of a second-tier test for homocysteine determination in dried blood spots would considerably reduce the number of MAT I/III-deficient patients identified and improve the specificity and positive predictive value for classical homocystinuria screening.*

_Introdução

A Homocistinúria Clássica (CBS, MIM 236200) é uma doença genética, de transmissão autossómica recessiva, mundialmente rara (1/344 000) ⁽¹⁾, e devida à deficiência na enzima cistationina β -sintetase (CBS, EC 4.2.1.22). Esta enzima, que atua no ciclo da metionina, é maioritariamente expressa no fígado e no pâncreas e é ativa sob a forma de um homotetrâmero. Bioquimicamente, esta deficiência resulta na elevação da metionina e homocisteína no plasma e da homocistina na urina. Clinicamente multissistémica, destaca-se a miopia, subluxação do cristalino, atraso mental, alterações esqueléticas (síndrome de Marfan) e eventos tromboembólicos.

O tratamento, baseado numa dieta restrita em metionina e suplementada com betaína, vitamina B12 e ácido fólico, é eficaz se iniciado precocemente, mas o diagnóstico é frequentemente tardio devido à inespecificidade dos sintomas. Aproximadamente metade dos doentes apresenta uma forma da doença que responde à piridoxina ⁽¹⁾. A CBS é codificada pelo gene *CBS*, e estão descritas mais de 170 mutações patológicas (<http://cbs.lfl.cuni.cz>), sendo a maioria esporádica. Verifica-se a existência de correlação genótipo-fenótipo, com associação das variantes genéticas conducentes a menor atividade enzimática, às formas clínicas mais graves ⁽²⁾.

A adaptação da espectrometria de massa em *tandem* (*ms/ms*) ao rastreio neonatal permite, desde o final dos anos 90, o rastreio neonatal desta patologia, baseado na elevação da concentração da metionina plasmática. No ciclo da metionina existe ainda outra enzima, a metionina adenosiltransferase (MAT I/III, EC 2.5.1.6) cuja deficiência origina também a elevação da concentração da metionina plasmática desde os primeiros

dias de vida, podendo em alguns casos verificar-se um ligeiro aumento dos níveis de homocisteína no plasma. A deficiência nesta enzima, codificada pelo gene *MAT1A*, está associada a uma condição de significado clínico não esclarecido (Def. MAT I/III, MIM 250850), o que levanta algumas questões relativamente à sua inclusão nos programas de rastreio neonatal (2). Apesar de habitualmente transmitida de forma autossómica recessiva, está descrita em várias populações uma mutação frequente (p.R264H), associada à sua transmissão autossómica dominante (3-4). A introdução da tecnologia de *ms/ms* no rastreio neonatal, na Galiza em 2000 e em Portugal em 2004, permitiu a identificação de 44 recém-nascidos (RN) com MAT I/III e 3 RN com deficiência de CBS, revelando na Península Ibérica, por um lado, uma baixa prevalência desta patologia, e por outro, uma elevada frequência da Def. MAT I/III, associada à mutação p.R264H.

_Objetivo

Caracterizar os casos de deficiência em MAT I/III e de CBS identificados em recém-nascidos na Península Ibérica, com base no rastreio neonatal da Galiza e de Portugal.

_Material e métodos

Este estudo incluiu 850 000 RN portugueses (2004-2014) e 374 000 RN da Galiza (2000-2014). As amostras de sangue em papel de filtro foram colhidas maioritariamente entre o 3º e o 6º dia de vida. A determinação da concentração plasmática de metionina foi efetuada por *ms/ms* (5). Após confirmação da persistência da hipermetioninemia numa segunda amostra, os RN foram encaminhados para um centro de tratamento especializado para avaliação clínica e colheita de amostras de sangue e urina para efetuar cromatografia de aminoácidos e doseamento de homocisteína total/ homocistina. Os estudos genéticos foram efetuados por sequenciação direta de fragmentos amplificados por PCR, a partir de ADN genómico extraído de sangue. Todos os exões dos genes *CBS* e *MAT1A*, e respetivas regiões intrónicas flanqueadoras, foram sequenciados por procedimentos *standard*.

_Resultados e Discussão

Foram identificados 47 RN com hipermetioninemia persistente (tabelas 1 e 2), dos quais 33 em Portugal. Destes, dois são doentes com deficiência de CBS (1/425 000) e 31 são portadores de Def. MAT I/III (1/27 400). Na Galiza foram identificados 13 casos de deficiência em MAT I/III (1/28 736) e um com deficiência de CBS (1/374 000). Apenas em dois doentes portugueses com deficiência de MAT I/III (30 e 31) não foi identificada a mutação p.R264H. Todos os RN mantinham na confirmação valores de metionina que permitiram manter dietas livres, apropriadas à idade e com ingestão proteica normal. Com exceção de um doente, que aos 2 anos de idade apresentava alterações de mielinização, de significado clínico e etiologia desconhecidos, todos os RN apresentam crescimento, desenvolvimento e avaliação neurológica normais. Todos os familiares estudados (pais, tios, irmãos e avós), e portadores da mutação p.R264H, estão clinicamente bem, exceto um pai, falecido muito novo com um enfarte do miocárdio e dois avós, falecidos com doença vascular severa, sem fatores de risco identificados (6). No doente 30, que não tem origem Ibérica, foram identificadas em heterozigotia composta duas mutações novas: p.L137V (c.409T>G) e p.S247N (c.740G>A). Ambas as mutações afetam aminoácidos conservados, não estão descritas no dbSNP nem no Exome Variant Database, e de acordo com quatro programas bioinformáticos diferentes (Condel, SIFT, MutationTaster e PolyPhen) são patogénicas. A mutação p.L355R, identificada em homozigotia no doente 31, foi recentemente publicada num primo do doente que vive em Espanha (7).

Os três doentes com deficiência em CBS, identificados neste estudo, apresentavam valores moderadamente aumentados de metionina no rastreio, mas muito elevados, de metionina e homocisteína, na confirmação (tabela 2). Todos fazem tratamento dietético incluindo restrição em metionina, e suplementação com betaína, vitamina B12 e ácido fólico. Apesar de nenhum ser respondedor à piridoxina, mantêm-se assintomáticos.

Tabela 1: Caracterização dos doentes com deficiência em MAT I/III.

Doentes	Local de rastreio	Género	Idade atual (meses/anos)	Rastreio neonatal		Confirmação (plasma)			Análise molecular
				Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Homocisteína total (μM) ²	Gene <i>MAT1A</i>
1-29	Portugal	11 M 18 F	3m-9a	3-7	52-124 ^a	12-30 ^b	80-254	8-26 ^c	p.R264H/N
30	Portugal	F	5a	7	67	30	85	5	p.L137V/p.S247N
31	Portugal	F	4a	3	72	19	465	n.d.	p.L355R/p.L355R
32-44	Galiza	7 M 6 F	5m-8a	2-6	45-147	35-128	91-392 ^d	8-23 ^e	p.R264H/N

¹ Normal: 4-44 μM ; ² Normal: 2-14 μM ; ^a O doente 9 tem um valor de 309 μM ; ^b A confirmação do doente 11 foi efetuada com 63 dias de idade; ^c Não determinado em 4 casos; ^d O doente 32 tem um valor de 573 μM ; ^e Não determinado em 3 casos; M: masculino; F: Feminino.

Tabela 2: Caracterização dos doentes com Homocistinúria clássica.

Doentes	Local de rastreio	Género	Idade atual (anos)	Rastreio neonatal		Confirmação (plasma)			Análise molecular	Referência
				Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Homocisteína total (μM) ²	Gene <i>CBS</i>	
45	Portugal	F	9	5	130	22	744	130	p.V178GfsX23/ p.K523fsX18	(8, 9)
46	Portugal	M	2	6	130	14	293	149	p.L338P/ p.L338P	(10)
47	Galiza	F	9	3	59	29	1086	148	p.T257M/ p.T257M	(11)

¹ Normal: 4-44 μM ; ² Normal: 2-14 μM ; M: masculino; F: Feminino.

Conclusão

O rastreio neonatal da deficiência de CBS faz parte de muitos programas de rastreio, uma vez que o início precoce do tratamento é inquestionavelmente benéfico para o doente. No entanto, a realização deste rastreio baseado apenas na determinação da metionina plasmática, gera alguma controvérsia devido à baixa especificidade e sensibilidade (12). Nem em Portugal, nem na Galiza foram até à data identificados casos falsos negativos, mas foi identificado um número considerável de casos com uma forma aparentemente benigna de Def. MAT I/III, desconhecida na Península Ibérica antes do rastreio neonatal por *ms/ms*.

Em Portugal o rastreio da deficiência de CBS iniciou-se em 2004, tendo até à data sido identificados dois doentes (1:425 000 RN). Esta baixa prevalência ao nascimento e a iden-

tificação de um elevado número de indivíduos com uma condição aparentemente benigna, colocam em questão a manutenção deste rastreio no painel nacional de doenças rastreadas. A determinação da homocisteína total nas amostras de rastreio, como segundo teste a realizar nas amostras com metionina aumentada, permitirá melhorar significativamente a especificidade e sensibilidade deste rastreio, e deverá ser brevemente implementada no rastreio neonatal.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a colaboração dos médicos que seguem os doentes identificados, nos centros de tratamento de doenças metabólicas (Centro Hospitalar do Porto, Centro Hospitalar S. João, Centro Hospitalar de Coimbra e Centro Hospitalar Lisboa Norte). Parte do trabalho realizado na Galiza foi financiado pelo projeto *European network and Registry for Homocystinurias and Methylation Defects* – EHOD (N_2012_12_02).

Artigo adaptado de: Marcão A, Couce ML, Nogueira C, et al. Newborn Screening for Homocystinuria Revealed a High Frequency of MAT I/III Deficiency in Iberian Peninsula. *JIMD Rep.* 2015;20:113-20. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4375120/

Referências bibliográficas:

- (1) Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. 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. 2007-56.
- (2) Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011;157C(1):3-32.
- (3) Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, et al. Dominant inheritance of isolated hypermethioninemia is associated with a mutation in the human methionine adenosyltransferase 1A gene. *Am J Hum Genet.* 1997;60(3):540-6. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712529/
- (4) Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, et al. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet.* 2000;66(2):347-55. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1288087/
- (5) Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res.* 1995;38(3):324-31.
- (6) Martins E, Marcao A, Bandeira A et al (2012) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in Portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of Douro High Lands. *JIMD Rep* 6:107-12.
- (7) Couce ML, Bóveda MD, García-Jiménez C, et al. Clinical and metabolic findings in patients with methionine adenosyltransferase I/III deficiency detected by newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2013;110(3):218-21.
- (8) Cozar M, Urreiziti R, Vilarinho L, et al. Identification and functional analyses of CBS alleles in Spanish and Argentinian homocystinuric patients. *Hum Mutat.* 2011;32(7):835-42.
- (9) Castro R, Heil SG, Rivera I, et al. Molecular genetic analysis of the cystathionine beta-synthase gene in Portuguese homocystinuria patients: three novel mutations. *Clin Genet.* 2001;60(2):161-3.
- (10) Urreiziti R, Balcells S, Rodés M, et al. Spectrum of CBS mutations in 16 homocystinuric patients from the Iberian Peninsula: high prevalence of T191M and absence of I278T or G307S. *Hum Mutat.* 2003;22(1):103.
- (11) Sebastio G, Sperandeo MP, Panico M, et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet.* 1995;56(6):1324-33. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1801112/
- (12) Gan-Schreier H, Kebbewar M, Fang-Hoffmann J, et al. Newborn population screening for classic homocystinúria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. *J Pediatr.* 2010;156(3):427-32. Epub 2009 Nov 14.

Doenças mitocondriais: síndrome da depleção do mtDNA

Mitochondrial disorders: mitochondrial DNA depletion syndrome

Célia Nogueira, Laura Vilarinho

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

_Resumo

As citopatias mitocondriais constituem um importante grupo de doenças metabólicas de expressão clínica heterogénea, para as quais não existe uma terapia eficaz. A maioria destas doenças é causada por uma disfunção ao nível da fosforilação oxidativa (OXPHOS), originando consequentemente uma deficiente produção de energia. O correto funcionamento da OXPHOS resulta de uma interação coordenada entre o genoma nuclear e mitocondrial. Assim, as doenças mitocondriais podem ser causadas por defeitos moleculares no genoma mitocondrial, no nuclear, ou em ambos, originando as doenças da comunicação intergenómica, que resultam na perda ou na instabilidade do DNA mitocondrial (mtDNA), e podem causar quer deleções múltiplas, quer depleção do genoma mitocondrial. A síndrome da depleção do mtDNA constitui um grupo de doenças raras, autossómicas recessivas, que se manifestam maioritariamente após o nascimento, causando a morte de muitos doentes durante a infância ou início da adolescência devido a uma redução acentuada do número de cópias do mtDNA. Trata-se de uma síndrome fenotipicamente heterogénea, apresentando-se sob três apresentações clínicas: hepatocerebral, miopática e encefalomiopática. A caracterização molecular destes doentes é importante não só para permitir a realização de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal adequados, mas também para melhorar a compreensão da fisiopatologia da doença e as opções terapêuticas.

_Abstract

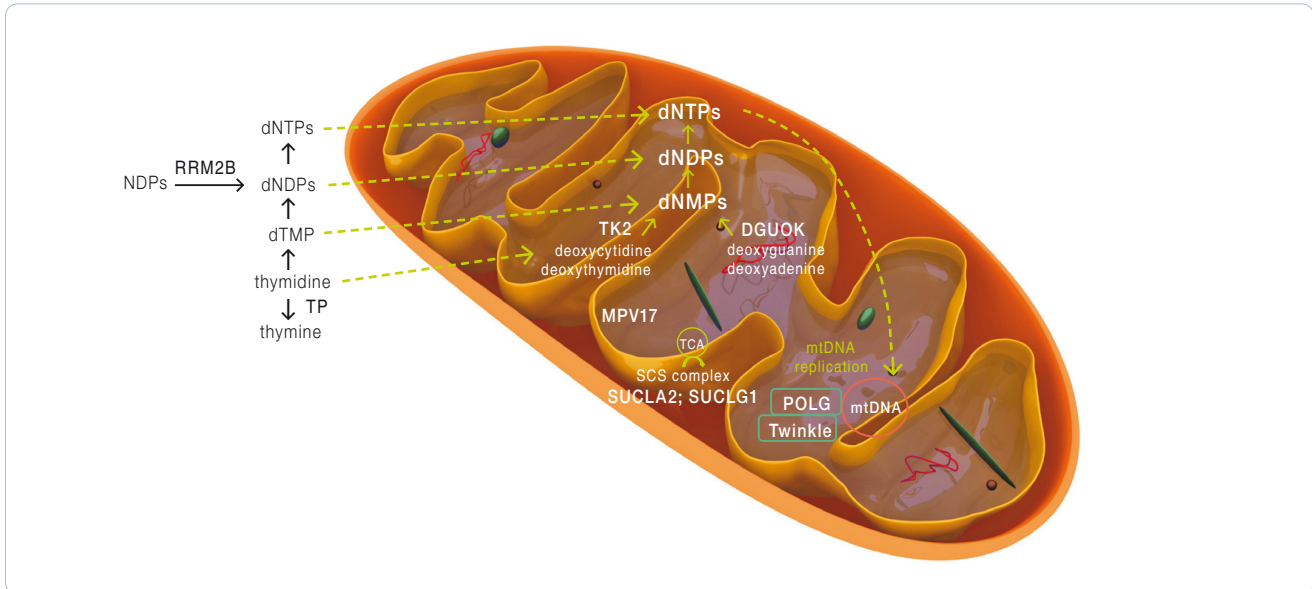
Mitochondrial dysfunction accounts for an important and heterogeneous group of inherited metabolic disorders with hitherto no effective therapeutic options. Most of the known mitochondrial disorders are caused primarily by a dysfunctional oxidative phosphorylation and consequently a deficient energy production. This system depends on the coordinated expression of both nuclear and mitochondrial genomes. Thus, mitochondrial diseases can be caused by genetic defects in either the mitochondrial or the nuclear genome, or in the cross-talk between both. This impaired cross-talk gives rise to so-called nuclear-mitochondrial intergenomic communication disorders, which result in loss or instability of the mitochondrial genome and, in turn, impaired maintenance of qualitative and quantitative mtDNA integrity. The mitochondrial DNA depletion syndrome (MDS) is a clinically heterogeneous group of disorders with an autosomal recessive pattern of transmission that have onset in infancy or early childhood and are characterized by a reduced number of copies of mtDNA in affected tissues and organs. The MDS can be divided into three clinical presentations: hepatocerebral, myopathic and encephalomyopathic. Identifying the causative genes is important not only to allow adequate antenatal options, family planning and prenatal diagnosis, but also to improve understanding of the disease pathophysiology and, therefore, improve therapeutic options.

_Introdução

Nos últimos 30 anos, um largo espectro de doenças multissistémicas associadas a disfunções da mitocôndria, globalmente designadas de citopatias mitocondriais apresentam uma incidência de 1/5000 indivíduos e podem afetar qualquer órgão ou tecido do organismo (1,2). Estas doenças são uma causa comum de mortalidade e/ou morbilidade crónica, não estando disponível, salvo raras exceções, nenhuma terapia eficaz. As doenças mitocondriais podem ser causadas por defeitos moleculares no genoma mitocondrial, no nuclear, ou em ambos, originando doenças da comunicação intergenómica. Estas doenças resultam da perda ou instabilidade do DNA mitocondrial (mtDNA), e podem ser devidas quer a deleções múltiplas, quer a depleção do genoma mitocondrial, tendo sido descritos nos últimos anos um vasto número de genes associados a estas patologias (3).

A síndrome da depleção do mtDNA (MDS) caracteriza-se por uma redução acentuada do número de cópias do mtDNA em relação às do DNA nuclear (nDNA), associada muitas vezes a um défice múltiplo dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Este grupo de doenças raras e devastadoras manifesta-se após o nascimento, causando a morte prematura de muitos doentes durante a infância ou início da adolescência (4). Esta síndrome é transmitida de modo autossómico recessivo e pode apresentar-se sob três formas: hepatocerebral, miopática e encefalomiopática (5,6). O seu mecanismo fisiopatológico encontra-se resumido na figura 1 e está fundamentalmente relacionado com a manutenção dos níveis livres de nucleótidos mitocondriais, que assume um papel crucial na replicação e integridade do mtDNA. As enzimas envolvidas neste processo constituem a maior fonte de precursores de mtDNA nos tecidos de baixo poder de renovação, tais como fígado, cérebro e músculo.

Figura 1: Representação esquemática da mitocôndria e dos genes envolvidos na síndrome da depleção do DNA mitocondrial.



Na mitocôndria podem-se identificar genes envolvidos na replicação do mtDNA (*POLG* e *C10orf2* - Twinkle), genes que afetam o metabolismo da pool de nucleótidos mitocondrial (*DGUOK*, *TK2*, *MPV17* e *RRM2B*), e genes envolvidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (*SUCLA2* e *SUCLG1*) e que consequentemente afetam a fosforilação oxidativa. Imagem de Nogueira *et al*, 2014 (4).

Assim, alterações nos genes *DGUOK*, *TK2*, *MPV17*, *RRM2B*, *POLG*, *C10orf2*, *SUCLA2* e *SUCLG1* podem causar uma redução acentuada do número de cópias do mtDNA nos tecidos afetados, confirmando o diagnóstico clínico desta síndrome (7).

_Objetivo

Efetuar breve descrição das principais apresentações clínicas desta síndrome, assim como das abordagens de diagnóstico e respetivas considerações terapêuticas.

_Síndrome da depleção do mtDNA: manifestações clínicas

i) Forma hepatocerebral: A forma hepatocerebral é a apresentação mais comum de MDS (6). O aparecimento ocorre na infância e os sintomas iniciais incluem vômitos persistentes, atraso de crescimento, hipotonia e hipoglicemia. As mitocôndrias hepáticas apresentam normalmente, uma deficiência combinada dos complexos da CRM codificados pelo mtDNA. A falência multiorgânica ocorre normalmente no primeiro ano de vida. Uma apresentação peculiar da forma hepatocerebral

é a síndrome de *Alpers-Huttenlocher*, de aparecimento precoce e fatal, caracterizado por falência hepática, convulsões, evoluindo para epilepsia parcial contínua e deterioração neurológica global. A disfunção hepática é normalmente progressiva e evolui de esteatose microvesicular com proliferação dos ductos biliares para cirrose e falência hepática crónica. O uso de valproato de sódio como terapia para a epilepsia pode precipitar a falência hepática aguda. Os genes *DGUOK* e *MPV17* são os que apresentam maior número de mutações descritas associadas à forma hepatocerebral. No entanto mutações nos genes *POLG*, *C10orf2*, *TK2* e *SUCLG1* podem também estar associadas a esta forma de apresentação clínica (6, 8-12).

ii) Forma miopática: Na forma miopática de MDS, o aparecimento de sintomas ocorre no primeiro ano de vida, com dificuldades alimentares, atraso de crescimento, hipotonia e fraqueza muscular. A creatina cínase está frequentemente aumentada, sendo um marcador importante para o diagnóstico, uma vez que não é muito comum em doentes com outras miopatias mitocondriais (13). Os doentes morrem maioritariamente nos primeiros anos de vida devido a insuficiência pul-

monar e infeções, mas existem casos que sobreviveram até à adolescência (14). Estas manifestações clínicas e bioquímicas são acompanhadas de sinais morfológicos típicos de miopatia mitocondrial tal como a presença de fibras citocromo c oxidase negativas. A proliferação de mitocôndrias sob a forma de fibras, *ragged red fibers*, não é uma característica primária consistente mas, no entanto, pode aparecer mais tarde no decurso da doença. Defeitos bioquímicos em todos os complexos da CRM codificados pelo mtDNA estão normalmente presentes nas mitocôndrias do tecido muscular.

Mutações nos genes *TK2*, *POLG*, *RRM2B* e *DGUOK* encontram-se associadas a esta forma, sendo o gene *TK2* o que apresenta maior número de mutações descritas (6,8,10,13).

iii) **Forma encefalomiopática:** Na forma encefalomiopática o aparecimento dos sintomas ocorre na infância, e manifestam-se através de hipotonia muscular, atraso psicomotor grave, deterioração neurológica progressiva, surdez, perda de movimentos voluntários, oftalmoplegia externa, convulsões generalizadas e variável disfunção tubular renal. Verifica-se um aumento do lactato sanguíneo e, na ressonância magnética cerebral, podem-se observar lesões nos gânglios basais sugestivas de síndrome de Leigh (3). Mutações nos genes *RRM2B*, *SUCLA2* e *SUCLG1* estão associadas a esta forma clínica (6,12,15).

_Síndrome da depleção do mtDNA: abordagens de diagnóstico

O estudo das doenças mitocondriais foi implementado em Portugal pelo nosso grupo no ano de 1993 e até à data foram investigados mais de 2500 doentes bioquímica, enzimática e/ou clinicamente suspeitos de Citopatia Mitocondrial. Cerca de 50 destes doentes apresentaram depleção do mtDNA, dos quais 50% revelaram mutações nos genes nucleares associados a MDS.

A análise por *southern-blot* ou por PCR quantitativo em tempo real são dois dos métodos que detetam simultaneamente a depleção do mtDNA. Independentemente da tecnologia aplicada utiliza-se um gene nuclear de referência específico para a análise (*RNA18S*) sendo muito importante o uso de controlos da mesma idade e do mesmo tecido, dada a natureza dinâmica da qualidade e quantidade do mtDNA (16).

Considera-se como valor limiar para o diagnóstico de depleção do mtDNA uma redução do número de cópias de mtDNA superior a 65% em relação aos indivíduos controlo, podendo esta redução atingir os 80-90%, nos casos mais graves.

Os dados bioquímicos, tais como défices combinados dos complexos enzimáticos da CRM, aumento do lactato e piruvato, quer no plasma, no líquido cefalorraquidiano ou na urina, alteração do perfil de ácidos orgânicos, aumento da alanina no perfil dos aminoácidos plasmáticos, assim como os dados de ressonância/tomografia cerebral são indicadores importantes para o diagnóstico destas patologias.

_Síndrome da depleção do mtDNA: considerações terapêuticas

As citopatias mitocondriais não têm de momento qualquer terapia eficaz disponível (17), à exceção dos défices primários de ubiquinona. (Q10) que são muito raros. O tratamento efetuado é meramente paliativo usando-se vitaminas, cofatores e substratos respiratórios que se revelaram pouco eficazes. No entanto, verifica-se que há uma estratégia diferente para cada caso. Por exemplo, o transplante hepático pode ser benéfico para doentes com hepatopatia causada por mutações nos genes *DGUOK*, *MPV17* e *POLG* desde que não tenham desenvolvido sintomas neurológicos (18).

_Considerações finais

A síndrome da depleção do mtDNA tem surgido cada vez mais como uma das principais causas de um amplo espectro de patologias multissistémicas de início maioritariamente após o nascimento. A caracterização molecular destes doentes é importante não só para permitir a realização de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal adequados, nos casos em que forem identificados mutações no nDNA, mas também para melhorar a compreensão da fisiopatologia da doença.

Os avanços recentes na tecnologia de sequenciação de nova geração irão permitir esclarecer a etiologia molecular de doentes suspeitos de patologia mitocondrial, possibilitando a identificação de mutações causais em novos genes, por vezes não diretamente relacionados com patologias mitocondriais (19-21).

Referências bibliográficas:

- (1) Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet.* 2012;13(12):878-90. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959762/
- (2) Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, et al. The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1659(2-3):115-20. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272804002713
- (3) Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene.* 2005;354:162-8. Review.
- (4) Nogueira C, Almeida LS, Nesti C, et al. Syndromes associated with mitochondrial DNA depletion. *Ital J Pediatr.* 2014;40:34. <http://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1824-7288-40-34>
- (5) Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(7):429-37.
- (6) El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics.* 2013;10(2):186-98. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3625391/
- (7) Nogueira C, Carozzo R, Vilarinho L, et al. Infantile-onset disorders of mitochondrial replication and protein synthesis. *J Child Neurol.* 2011;26(7):866-75.
- (8) Copeland WC. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012;47(1):64-74. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3244805/
- (9) Nogueira C, de Souza CF, Husny A, et al. MPV17: fatal hepatocerebral presentation in a Brazilian infant. *Mol Genet Metab.* 2012;107(4):764.
- (10) Horvath R, Hudson G, Ferrari G, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain.* 2006;129(Pt 7):1674-84. <http://brain.oxfordjournals.org/content/129/7/1674.long>
- (11) Hakonen AH, Isohanni P, Paetau A, et al. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain.* 2007;130(Pt 11):3032-40. <http://brain.oxfordjournals.org/content/130/11/3032.long>
- (12) Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, et al. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet.* 2007;81(2):383-7. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707612038
- (13) Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene.* 2005;354:162-8. Review.
- (14) Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, et al. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol.* 2006;63(8):1122-6. <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=791965>
- (15) Nogueira C, Meschini MC, Nesti C, et al. A novel SUCLA2 mutation in a Portuguese child associated with "mild" methylmalonic aciduria. *J Child Neurol.* 2015;30(2):228-32. Epub 2014 Mar 20.
- (16) DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658(1-2):80-8.
- (17) Pfeffer G, Horvath R, Klopstock T, et al. New treatments for mitochondrial disease--no time to drop our standards. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(8):474-81.
- (18) Dimmock DP, Zhang Q, Dionisi-Vici C, et al. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Hum Mutat.* 2008;29(2):330-1.
- (19) Vasta V, Ng SB, Turner EH, et al. Next generation sequence analysis for mitochondrial disorders. *Genome Med.* 2009;1(10):100. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784303/
- (20) Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(118):118ra10. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3523805/
- (21) Haack TB, Haberberger B, Frisch EM, et al. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet.* 2012;49(4):277-83.

Dor abdominal aguda como apresentação de porfirias

Acute abdominal pain: think porphyria

Filipa Ferreira¹, Laura Vilarinho^{1,2}

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética; (2) Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética Humana, INSA

_Resumo

As porfirias são um grupo de oito doenças metabólicas raras, em resultado de uma deficiência enzimática em cada uma das oito enzimas envolvidas na biossíntese do grupo heme. São doenças maioritariamente hereditárias, mas podem também ser adquiridas aquando da exposição a certos fatores ambientais e/ou patológicos. Estes fatores externos, denominados de porfirinogénicos também têm um papel preponderante no diagnóstico das porfirias, uma vez que mimetizam os sintomas clínicos de um ataque agudo de porfiria, contribuindo para subestimar esta doença, levando a um atraso no diagnóstico e diminuído o sucesso do prognóstico. Os ataques agudos de porfiria, nomeadamente na porfiria aguda intermitente, porfiria variegata, coproporfiria hereditária, e deficiência da desidratase do ácido delta-aminolevulínico, apesar de serem doenças multissistémicas, têm em comum como apresentação clínica, a dor abdominal aguda. A pesquisa de porfobilinogénio (PBG) na urina, através da realização do teste de Hoesch, é uma forma rápida e fácil de excluir a suspeita clínica de porfiria. Pretendemos com este trabalho, alertar para a necessidade de um diagnóstico laboratorial atempado, que pela sua simplicidade poderá descartar ou confirmar se a dor abdominal aguda, tão frequente nas urgências hospitalares, será ou não uma manifestação clínica de um ataque agudo de porfiria. Este estudo contribuirá não só para aumentar o nosso conhecimento acerca destas doenças, como também permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade das porfirias, o qual ainda permanece pouco conhecido.

_Abstract

Hereditary porphyria is a group of eight metabolic disorders resulting from a variable catalytic defect of eight enzymes involved in the heme biosynthesis pathway. They are rare and mostly inherited diseases, but in some circumstances, the metabolic disturbance may be acquired. Many different environmental factors or pathological conditions often play a key role in triggering the clinical exacerbation (acute porphyric attack) of these diseases that may often mimic many other more common acute medical and neuropsychiatric conditions and whose delayed diagnosis and treatment may be fatal. Acute attacks of porphyria, namely acute intermittent porphyria, variegate porphyria, hereditary coproporphyrinuria and the porphyria associated with deficiency of the enzyme δ -aminolaevulinic acid (ALA) dehydratase, although multisystem diseases with a variety of clinical features, have in common the abdominal pain. In order to obtain an accurate diagnosis of acute porphyria, the knowledge and the use of appropriate diagnostic tools are mandatory. Urine quick test for porphobilinogen (PBG) – Hoesch test, is a quick and easy way to test for porphyria. The aim of this paper is to alert for the necessity of screening for the acute attacks of porphyria, in presence of an unexplained severe abdominal pain, providing some recommendations for the diagnostic steps of acute porphyries. Finally, the more we know about these diseases the more we can contribute to the understanding of porphyric neuropathy pathogenesis.

_Introdução

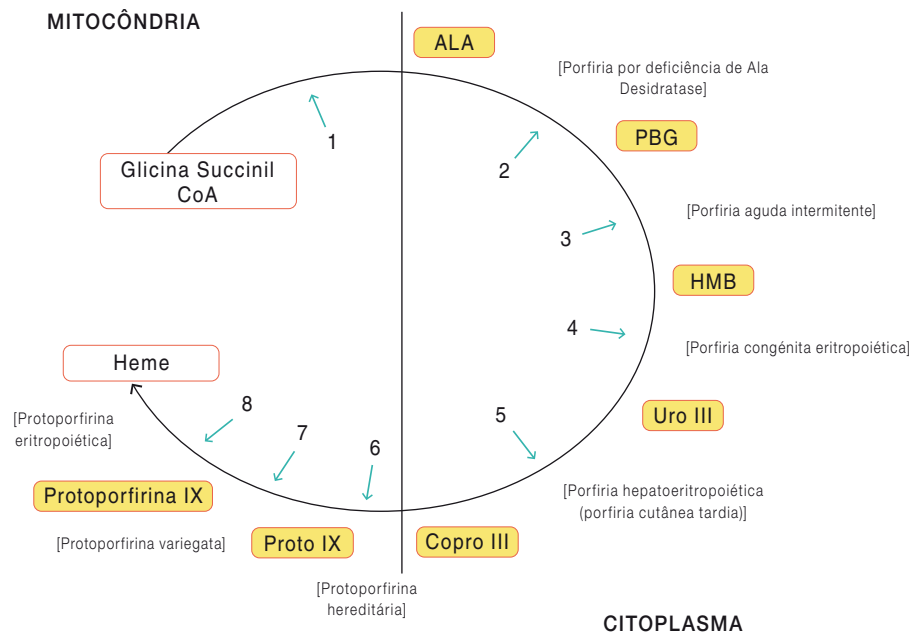
As porfirias hereditárias constituem um grupo de oito doenças metabólicas, caracterizadas por sintomas neuroviscerais agudos, lesões cutâneas ou ambos. Cada porfiria é o resultado de uma alteração numa das oito enzimas envolvidas na biossíntese do grupo heme (figura 1), resultando na acumulação e excreção de ácido 5-delta aminolevulínico (ALA), de porfobilinogénio (PBG) e de porfirinas, precursores específicos do grupo heme.

As porfirias agudas têm como apresentação clínica, ataques agudos, consistindo regra geral, em fortes dores abdominais, náuseas, vômitos, obstipação, alguma confusão mental e convulsões, podendo, se não diagnosticadas atempadamente, limitar a sobrevivência do indivíduo afetado. As porfirias cutâneas apresentam-se clinicamente com um quadro doloroso de fotossensibilidade ou fragilidade cutânea. As porfirias geralmente manifestam-se na infância apresentando fotossensibilidade cutânea grave, hemólise crónica ou sintomas neurológicos crónicos com ou sem fotossensibilidade associada.

Para além da causa primária de predisposição genética de certos doentes (mutações nos genes que codificam as respetivas proteínas da biossíntese do grupo heme, causando perda catalítica), existem também fatores externos, porfirinogénicos, capazes de induzir crises agudas de porfiria. Deve-se ter em consideração que envenenamentos por chumbo ou solventes orgânicos podem originar um quadro clínico muito semelhante a uma porfiria hepática aguda.

De penetrância incompleta, as porfirias têm uma prevalência sintomática de 1 a 2/100 000 (1). A porfiria aguda intermitente (PAI), sendo a mais comum, tem uma prevalência na Europa de 1/75 000, excluído a Suécia (com uma prevalência de 1/1000),

Figura 1: Via metabólica da biossíntese do grupo heme.



Os números representam as diferentes enzimas envolvidas no processo.

[Entre parêntesis] - tipo de porfíria associada com a deficiência de cada uma das oito enzimas.

ALA= ácido δ -aminolevulínico; PBG, porfobilinogénio; HMB, Hidroximetilbiliano; URO III, Uroporfirinogénio III; Copro III, Coproporfirinogénio III; Proto IX, Protoporfirinogénio IX; 1, ALA sintetase; 2, ALA Desidratase; 3, PBG Desaminase; 4, Uroporfirinogénio Sintetase; 5, Uroporfirinogénio Descarboxilase; 6, Coproporfirinogénio Oxidase; 7, Protoporfirinogénio Oxidase; 8, Ferroquelatase.

Adaptado de Puy *et al.*, 2010 (2)

devido ao efeito fundador. A porfíria variegata tem metade da prevalência da PAI, na maioria dos países europeus, sendo no entanto mais frequente na África do Sul, também devido ao efeito fundador. Apesar de a PAI ser uma doença multissistémica, com uma grande variedade de sintomas clínicos, a dor abdominal aguda é a apresentação mais frequente (2). Em Portugal, desconhece-se a sua prevalência. De sintomatologia difusa e não específica, provavelmente esta doença está subestimada. As outras porfírias, a porfíria variegata, porfíria hereditária e a porfíria associada a uma deficiência da enzima desidratase do ácido δ -aminolevulínico, são ainda menos frequentes e menos graves que a PAI, no entanto, todas têm em comum as crises agudas neuroviscerais (tabela 1).

A primeira descrição oficial de um caso de porfíria aguda como uma síndrome foi feita pelo Dr. B.J. Stokvis no ano de 1889. Em 1937, o médico sueco Jan Gösta Waldenström publicou os seus trabalhos sobre a porfíria aguda intermitente de modo

tão completo que a doença tornou-se conhecida até há pouco tempo como "porfíria sueca" ou "porfíria de Waldenström".

Classificação das porfírias

As porfírias são classificadas de acordo com o local onde ocorre a acumulação dos precursores do grupo heme. Assim, se a acumulação destes precursores ocorrer no fígado são denominadas de porfírias hepáticas (agudas), por outro lado, quando estes, se acumulam na medula óssea, são denominadas de porfírias eritropoiéticas (não agudas) (tabela 1).

As porfírias hepáticas são o subgrupo mais comum das porfírias e caracterizam-se pela ocorrência de ataques neuroviscerais (3,4) agudos que se manifestam maioritariamente por uma dor abdominal intensa (em 85-95% casos), sintomas neurológicos (fraqueza muscular, perda sensorial, convulsões) e sintomas psicológicos (alterações de comportamento, irritabilidade, ansiedade, alucinações auditivas ou visuais e confusão mental).

Tabela 1: ↓ Classificação das porfirias de acordo com a apresentação clínica e órgão afetado.

Tipo de Porfirias	Aguda	Hepática	Cutânea	Eritropoiética
Porfiria por deficiência da ALA desidratase	✓	✓		
Porfiria Aguda Intermitente (PAI)	✓	✓		
Coproporfiria Hereditária (CPH)	✓	✓	✓	
Porfiria Variegata (PV)	✓	✓	✓	
Porfiria Cutânea Tardia (PCT) (Hereditária ou Adquirida)		✓	✓	
Porfiria Congénita Eritropoiética (PCE)			✓	✓
Protoporfiria Eritropoiética (PPE)			✓	✓

Os ataques são, na maioria das vezes, desencadeados por fatores exógenos (ex: uma intervenção cirúrgica, certos fármacos porfirinogénicos, consumo excessivo de álcool, infeções agudas, e condições de *stress*), e/ou fatores endógenos (ex: hormonais), podendo ou não, ser acompanhados de manifestações cutâneas. Estes ataques agudos, apesar de pouco frequentes, devido à baixa penetrância são no entanto difíceis de diagnosticar devido à inespecificidade da sintomatologia/clínica. Ocorrem em todas as formas de porfiria aguda e apesar das lesões cutâneas nunca se manifestarem nas porfirias agudas intermitentes, são as únicas manifestações clínicas em alguns doentes com porfiria variegata (em 60%), e raramente (5%) nos doentes com coproporfiria hereditária (3). A PAI é uma doença autossómica dominante, que se caracteriza por uma deficiência na enzima hidroximetilbilano sintetase (HMB), também denominada de Porfobilinogénio desaminase (PBGD, figura 1). Cerca de 10 a 20% dos portadores do gene mutado (*HMBS*) apresentam sintomas, mas a grande maioria poderão ser assintomáticos, durante toda a sua vida, caso não sejam expostos a fatores desencadeantes (porfirinogénicos). Geralmente, os ataques agudos são extremamente raros antes da puberdade ou depois da menopausa, tendo um pico de frequência entre a terceira e a quarta década de vida.

A expressão da doença será mais frequente em mulheres (5,6).

Diagnóstico de um ataque agudo de porfirias

Verificou-se que em algumas formas de porfiria, nomeadamente na mais comum, PAI, devido à acumulação e excreção de grandes quantidades do pigmento porfobilinogénio (PBG), a urina destes doentes, apresenta um tom vermelho-arroxeadado que escurece em contacto com a luz. A maioria dos ataques agudos inicia-se com dores abdominais muito fortes, no entanto, náuseas, vômitos e diarreia são também comuns. Outros sintomas como a taquicardia, a sudorese e a hipertensão, estão geralmente também presentes (7). O exame físico, apesar de não revelar nenhuma anomalia aparente, urge a necessidade de intervenção e internamento destes doentes, devido ao facto de durante estes ataques, os doentes apresentarem uma forte desidratação, com graves alterações eletrolíticas. A hiponatremia, na maioria dos casos presente, é provavelmente devido a um desequilíbrio hormonal (uma vez que a segregação de hormona antidiurética diminui em cerca de 40% nos doentes que sofrem estes ataques), levando, nos casos mais graves, a convulsões. Em determinadas situações, o facto de haver na urina, a excreção em excesso de PBG, que conduz a uma pigmentação vermelha ou cereja escura da urina, conduzirá certamente a uma suspeita clínica forte de que se está em presença de um ataque agudo de porfiria.

De salientar, que em 20-30% dos casos, em que estas crises ocorrem, os doentes apresentam sintomas neurológicos, depressão, ansiedade, desorientação, alucinações, o que dificulta um diagnóstico de porfiria aguda.

Do que foi referido, é importante salientar a necessidade de perante uma suspeita clínica, proceder em fase aguda aos testes de primeira linha, nomeadamente ao teste de Hoesch que permite de uma forma qualitativa detetar na urina a presença de porfobilinogénio. Um diagnóstico atempado é de extrema importância, pois permitirá ao doente um tratamento específico, aumentando a taxa de sobrevivência, o sucesso do prognóstico e diminuindo inclusive as possibilidades de sequelas do ataque agudo.

O estudo familiar também é fundamental pois irá identificar portadores assintomáticos, que permitirão o aconselhamento prévio relativamente à exposição a agentes porfirinogénicos, diminuindo assim a probabilidade de um ataque agudo e de todas as suas consequências.

Conclusão

É crucial que os serviços de urgência médica estejam sensibilizados para o facto de que as recorrentes dores abdominais (episódios tão frequentes nas urgências hospitalares) ou mesmo doentes com uma certa confusão mental inexplicável possam estar a ter um ataque de porfíria aguda. Só a respetiva sensibilização para o rastreio desta doença, permitir-nos-á estimar a sua prevalência em Portugal.

Referências bibliográficas:

- (1) Badminton MN, Elder GH. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria. *J Inher Metab Dis.* 2005;28(3):277-86.
- (2) Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrrias. *Lancet.* 2010;375(9718):924-37. Review
- (3) Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann Intern Med.* 2005;142(6):439-50.
- (4) Moore MR, McColl KEL, Rimington C, et al. The acute porphyrias. In: Moore MR, et al.(eds). *Disorders of porphyrin metabolism.* New York, London: Plenum Press; 1987, pp 72-117.
- (5) Bylesjö I, Wikberg A, Andersson C. Clinical aspects of acute intermittent porphyria in northern Sweden: a population-based study. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(5):612-8.
- (6) Andersson C, Innala E, Bäckström T. Acute intermittent porphyria in women: clinical expression, use and experience of exogenous sex hormones. A population-based study in northern Sweden. *J Intern Med.* 2003;254(2):176-83.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2796.2003.01172.x/full>
- (7) Hift RJ, Meissner PN. An analysis of 112 acute porphyric attacks in Cape Town, South Africa: Evidence that acute intermittent porphyria and variegate porphyria differ in susceptibility and severity. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(1):48-60.
<http://journals.lww.com/md-journal/pages/articleviewer.aspx?year=2005&issue=01000&article=00005&type=abstract>
- (8) Ventura P, Cappellini MD, Biolcati G, et al.; Gruppo Italiano Porfíria (GriP). A challenging diagnosis for potential fatal diseases: recommendations for diagnosing acute porphyrias. *Eur J Intern Med.* 2014;25(6):497-505.

Estudo mutacional em tumor de Wilms por sequenciação de nova geração

Mutational study in Wilms' tumour using next-generation sequencing

Catarina Silva, Dina Carpinteiro, Luís Vieira

luis.vieira@insa.min-saude.pt

Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, INSA.

_Resumo

O Tumor de Wilms (TW) é o tumor renal mais comum da infância, com uma incidência de 1 em ~10000 crianças. Esta patologia é de etiologia genética complexa e diversificada. No entanto, cerca de um terço dos doentes apresenta mutações somáticas associadas aos genes *WT1*, *CTNNB1*, *TP53* e/ou *AMER1*. Assim, foi desenvolvido um painel de amplificações destes 4 genes para a identificação de mutações num grupo de doentes portugueses com TW, através de uma metodologia baseada na sequenciação de nova geração. As bibliotecas de DNA foram preparadas a partir de amostras de sangue periférico e tumor de 36 doentes com TW e sequenciadas no MiSeq. Foram identificadas alterações somáticas em 7 dos 36 (19,4%) doentes estudados. Conclui-se que a sequenciação de um painel de genes é um método rápido para a deteção de mutações somáticas quando desenhado com cuidado de forma a serem evitados problemas de perda de cobertura.

_Abstract

Wilms' tumor (WT) is the most common renal tumor of childhood affecting 1 in ~10,000 children. This tumor has a complex and diverse genetic etiology. About one third of the patients show somatic mutations in WT1, CTNNB1, TP53 and/or AMER1 genes. A new amplicon-based next-generation sequencing methodology was developed for the identification of mutations in those 4 genes in a cohort of Portuguese WT patients. DNA libraries were prepared from paired peripheral blood/tumor samples of 36 patients and sequenced on a MiSeq instrument. Somatic alterations were detected in 7 of 36 (19,4%) patients. It can be concluded that gene panel sequencing is a fast methodology for the detection of somatic mutations. However, care must be taken in the gene panel design in order to avoid low coverage targets.

_Introdução

O Tumor de Wilms (TW) é um tumor que tem origem nas células embrionárias envolvidas no desenvolvimento renal (restos nefrogénicos) e que permanecem após o nascimento (1). Sendo uma patologia rara, o TW é o tipo de cancro renal mais comum nas crianças afetando, nas populações ocidentais, 1 em ~10000 crianças, com diagnóstico por volta dos 3-4 anos de idade (2,3). A maioria dos casos tem apresentação unilateral e esporádica, havendo cerca de 5% de casos com manifestação bilateral (1,4). A maioria das mutações é de origem so-

mática estando sobretudo associada aos genes *WT1* (cr. 11), *CTNNB1* (cr. 3), *TP53* (cr. 17) e *AMER1* (cr. X), também conhecido como *WTX* (1,5). As mutações podem ocorrer singularmente ou em mais do que um gene no mesmo doente, de que é exemplo a associação das mutações do gene *CTNNB1* com as mutações em *WT1* (6). Neste trabalho, apresentam-se os resultados da aplicação da tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) a um painel de genes de TW. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

_Objetivo

Este trabalho descreve a utilização da tecnologia de NGS aplicada à deteção de mutações somáticas em TW.

_Material e métodos

1) Desenho do painel de genes: Recorrendo ao *software Design Studio* (Illumina) foi criado um painel personalizado para os exões e zonas flanqueantes intrão/exão dos genes *WT1* (exões 2 a 11), *CTNNB1* (exão 4), *TP53* (exões 2 a 10) e *AMER1* (exões 1 e 2), num total de sequência cumulativa de 12306 bases. O painel foi composto por 83 amplicões de ~250 pb de tamanho, perfazendo um total de 20750 bases sequenciadas por amostra.

2) Preparação de bibliotecas de DNA: Neste estudo foram incluídas amostras de tumor e sangue periférico de 36 doentes Portugueses com TW, diagnosticados no Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil (Lisboa, n=30), Hospital Dona Estefânia (n=5) e Hospital de Santa Maria (n=1), entre 1988 e 2001. Após extração de DNA genómico, as bibliotecas foram preparadas usando o *kit TruSeq Custom Amplicon* (TSCA, Illumina), tendo-se introduzido um passo adicional para a avaliação qualitativa dos produtos indexados. As bibliotecas foram sequenciadas em duas corridas no MiSeq (Illumina) no modo de leitura *paired-end reads* de 250 pb.

3) Análise e tratamento de dados: A análise da qualidade global das corridas de sequenciação foi efetuada usando o *software Sequencing Analysis Viewer* (Illumina). As métricas de qualidade de cada amostra foram avaliadas recorrendo ao programa *FastQC*. A análise secundária das amostras foi realizada através do *MiSeq Reporter Software v.2.5.1*. As variantes somáticas foram filtradas tendo por base uma cobertura mínima superior a 30x, uma frequência do alelo mutado superior a 15% e a ausência na respetiva amostra de DNA de sangue periférico. As variantes foram visualizadas no *Integrative Genomics Viewer* (7) e a sua anotação foi efetuada usando bases de dados de variantes comuns. A previsão da patogenicidade foi efetuada utilizando o *MutationTaster2* (8) para as variantes constitucionais não anotadas.

4) Sequenciação de Sanger: As variantes somáticas identificadas por NGS foram comparadas com os resultados obtidos por sequenciação de Sanger para as respetivas amostras. Adicionalmente, no caso dos genes *WT1* (exões 7-10) e *CTNNB1* (exão 4), os resultados das amostras que não revelaram variantes somáticas por NGS foram comparados com os resultados previamente obtidos por sequenciação de Sanger.

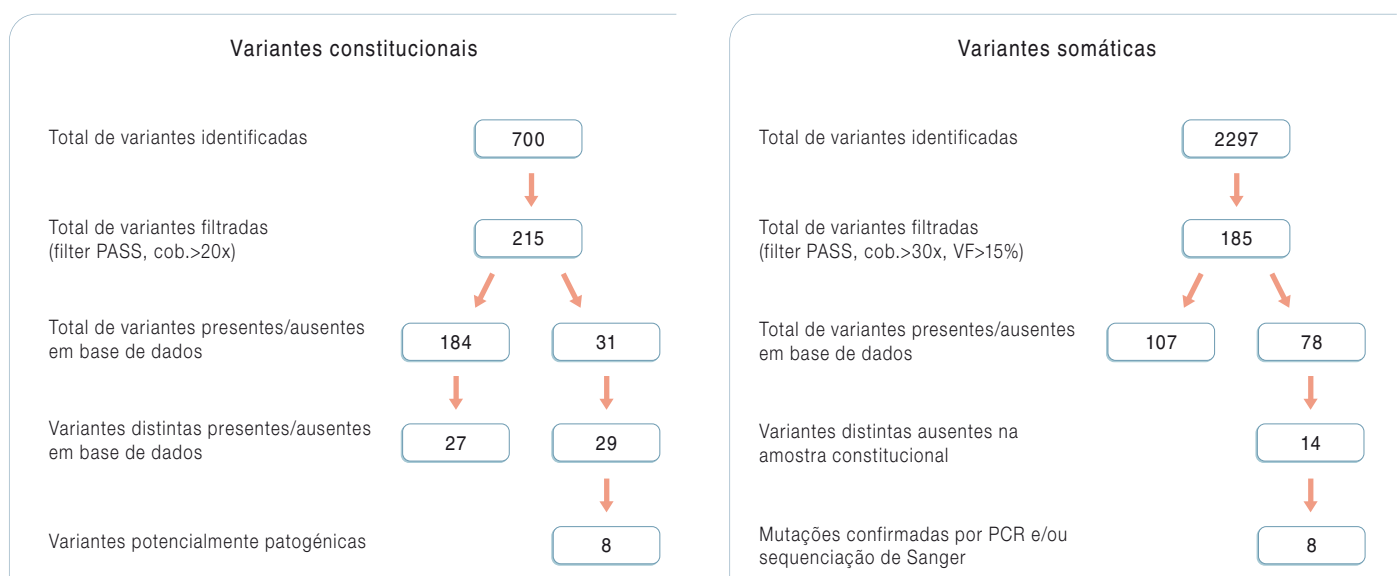
_Resultados

As duas corridas de sequenciação produziram, respetivamente, um total de 200 Mb (% \geq Q30 de 86,9%) e de 300 Mb (% \geq Q30 de 86,6%) de sequência.

A partir de um total de 700 variantes inicialmente identificadas nas amostras de sangue periférico, foram selecionadas 27 variantes distintas presentes em bases de dados (10 em *AMER1*, 9 em *TP53* e 8 em *WT1*), e 29 variantes distintas não descritas (18 em *AMER1*, 5 em *TP53*, 5 em *WT1* e 1 em *CTNNB1*), das quais 8 foram associadas a patogenicidade por darem origem a novos aminoácidos ou locais de *splicing* (figura 1). No entanto, o seu real efeito patogénico permanece desconhecido.

De um total de 2297 variantes identificadas nas amostras de tumor, foram filtradas 14 variantes distintas em 10 doentes. As variantes incluíram 9 alterações *missense*, 3 mutações *frameshift* e 1 deleção, distribuídas pelos genes *AMER1* (5 variantes), *CTNNB1* (4 variantes), *WT1* (3 variantes) e *TP53* (1 variante). Adicionalmente, foi detetada uma deleção completa do gene *AMER1* num doente do sexo masculino, refletida pela ausência de *reads* deste gene na amostra tumoral.

Figura 1: Representação esquemática dos passos principais do algoritmo utilizado para determinação das variantes constitucionais e somáticas.



Cob., cobertura; VF, variant frequency.

Tabela 1: ↓ Resumo das alterações somáticas encontradas em sete doentes com tumor de Wilms.

Doente	Genes em estudo		
	WT1 (cr. 11)	CTNNB1 (cr. 3)	AMER1 (cr. X)
WT6			Frameshift
WT16		Deleção_H36	
WT17		Missense_S45Y	
WT20		Missense_S45P	
WT24			Deleção génica
WT25	Frameshift		
WT36	Frameshift	Missense_S45F	

As 7 mutações confirmadas por sequenciação de Sanger e a deleção do gene *AMER1* encontram-se descritas na [tabela 1](#).

A análise do número médio de *reads* para cada um dos 83 amplicões sequenciados, no total de amostras, revelou uma elevada desproporção entre amplicões (intervalo: 0,01-874,97), sendo que 8 amplicões (9,6%), todos correspondentes ao gene *WT1*, apresentaram um número médio de *reads* inferior a 20. Em particular, a ausência total de *reads* do exão 7 do gene *WT1* em 2 doentes, não permitiu detetar a presença de mutações somáticas previamente identificadas pela metodologia de Sanger.

Discussão

Neste estudo foi possível confirmar a existência de 8 alterações somáticas nos genes *WT1*, *CTNNB1* e *AMER1*, em 7 doentes com TW, utilizando a tecnologia de NGS. Com esta abordagem foi possível reduzir significativamente o tempo de pesquisa de mutações comparativamente à abordagem tradicional (sequenciação de Sanger), uma vez que todos os genes estudados foram sequenciados em paralelo.

No entanto, mais de 50% dos casos clínicos de TW não tinham até recentemente um diagnóstico molecular, o que tem levado à realização de estudos de sequenciação do exoma tumoral com o objetivo de identificar novos genes associados com esta pato-

tologia (9). Contudo, a análise dos dados obtidos ainda é um processo delicado e moroso, que requer uma devida *expertise* por forma a obterem-se os resultados desejados. Esta necessária experiência é ainda mais importante no caso das alterações somáticas, uma vez que a presença destas em níveis proporcionalmente baixos, relativamente aos respetivos alelos normais, pode conduzir à seleção de variantes não reais (falsos positivos).

No presente estudo, não foi possível evidenciar por sequenciação de Sanger 6 das 9 variantes *missense* selecionadas após aplicação do algoritmo de análise, cuja frequência do alelo mutante variou entre 18,5% e 24,5%. Estes resultados poderão dever-se à baixa cobertura (entre 45x e 54x) das respetivas posições nucleotídicas, que potenciaram a seleção de falsos positivos ou que sobrestimaram a frequência do alelo variante, levando a que não fosse detetado na sequenciação capilar (limite de deteção de ~15%).

Adicionalmente, a ausência/reduzido número médio de *reads* de alguns amplicões, observado no presente estudo, impediu a deteção de 2 mutações somáticas previamente identificadas no gene *WT1*. Assim, é importante assegurar que o desenho dos painéis de genes oferece uma cobertura homogénea dos vários amplicões e que, no caso de mutações somáticas, a profundidade de sequenciação seja mais elevada (>1000x), de forma a permitir uma distinção inequívoca entre variantes reais e com baixa representação (como nas situações de heterogeneidade tumoral) e variantes falsos positivos.

Conclusões

A tecnologia de NGS associada ao uso de um painel de genes demonstrou ser uma ferramenta eficaz na deteção de variantes somáticas em doentes com TW, permitindo a identificação de vários tipos de mutações. A experiência agora adquirida permitirá alargar este painel a novos genes recentemente identificados em TW, possibilitando, num futuro próximo, estudar indivíduos com TW para os quais falta uma caracterização molecular.

Agradecimentos:

Os autores agradecem à Guida Boavida, aos médicos dos hospitais mencionados e às restantes pessoas envolvidas nos estudos de TW efetuados no INSA desde 1988, em particular à Sónia Matos e à Ana Jerónimo pela amplificação e sequenciação do exão 4 do gene *CTNNB1*, e dos exões 7 a 10 do gene *WT1*, respetivamente.

Referências bibliográficas:

- (1) Al-Hussain T, Ali A, Akhtar M. Wilms tumor: an update. *Adv Anat Pathol*. 2014;21(3):166-73. Review.
- (2) Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):111-21.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4332715/
- (3) Mahamdallie SS, Hanks S, Karlin KL, et al. Mutations in the transcriptional repressor REST predispose to Wilms tumor. *Nat Genet*. 2015;47(12):1471-4.
- (4) Hanks S, Perdeaux ER, Seal S, et al. Germline mutations in the PAF1 complex gene *CTR9* predispose to Wilms tumour. *Nat Commun*. 2014;5:4398.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143912/
- (5) Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in *WT1*, *WTX*, and *CTNNB1* account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(6):461-70. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4332772/
- (6) Maiti S, Alam R, Amos CI, et al. Frequent association of beta-catenin and *WT1* mutations in Wilms tumors. *Cancer Res*. 2000;60(22):6288-92.
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/22/6288.long>
- (7) Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):178-92. Epub 2012 Apr 19.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603213/
- (8) Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361-2.
- (9) Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al. Recurrent somatic mutation in *DROSHA* induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun*. 2014;5:4039.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4062040/

Diagnóstico molecular de cancros hereditários por sequenciação de nova geração: cancro da mama e cancro colorretal

Molecular diagnosis of hereditary cancers using next-generation sequencing: breast cancer and colorectal cancer

Patrícia Theisen¹, Catarina Silva², Iris Pereira Caetano¹, Pedro Rodrigues¹, Glória Isidro¹, Luís Vieira², João Gonçalves¹

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genética Molecular; (2) Unidade de Tecnologia e Inovação, Departamento de Genética Humana, INSA.

_Resumo

O cancro da mama e o cancro colorretal constituem duas das principais causas de morte a nível mundial. Entre 5 a 10% destes casos estão associados a variantes germinais/hereditárias em genes de suscetibilidade para cancro. O objetivo deste trabalho consistiu em validar a utilização da sequenciação de nova geração (NGS) para identificar variantes previamente detetadas pelo método de Sanger em diversos genes de suscetibilidade para cancro da mama e colorretal. Foram sequenciadas por NGS 64 amostras de DNA de utentes com suspeita clínica de predisposição hereditária para cancro da mama ou colorretal, utilizando o painel de sequenciação *TruSight Cancer* e a plataforma *MiSeq* (Illumina). Estas amostras tinham sido previamente sequenciadas pelo método de Sanger para os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *APC*, *MUTYH*, *MLH1*, *MSH2* e *STK11*. A análise bioinformática dos resultados foi realizada com os softwares *MiSeq Reporter*, *VariantStudio*, *Isaac Enrichment* (Illumina) e *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute). A NGS demonstrou elevada sensibilidade e especificidade analíticas para a deteção de variantes de sequência em 8 genes de suscetibilidade para cancro colorretal e da mama, uma vez que permitiu identificar a totalidade das 412 variantes (93 únicas, incluindo 27 variantes patogénicas) previamente detetadas pelo método de Sanger. A utilização de painéis de sequenciação de genes de predisposição para cancro por NGS vem possibilitar um diagnóstico molecular mais abrangente, rápido e custo-eficiente, relativamente às metodologias convencionais.

_Abstract

Breast and colorectal cancers are two major causes of cancer-related deaths worldwide. 5-10% of these cases are associated with germline/hereditary variants in cancer susceptibility genes. The aim of this work was to validate a next-generation sequencing (NGS) cancer susceptibility gene panel for the identification of variants previously detected by Sanger sequencing in several breast and colorectal cancer susceptibility genes. DNA samples from 64 patients with a suspected inherited predisposition to breast or colorectal cancers were sequenced on a MiSeq using the TruSight Cancer Sequencing Panel (Illumina). These samples had been previously sequenced by the Sanger method for the BRCA1, BRCA2, TP53, APC, MUTYH, MLH1, MSH2 and STK11 genes. Bioinformatic analysis of NGS data included the MiSeq Reporter, VariantStudio, Isaac Enrichment (Illumina) and Integrative Genomics Viewer (Broad Institute) tools. High analytical sensitivity and specificity was obtained with NGS for the detection of sequence variants in 8 highly penetrant breast and colorectal cancer susceptibility genes, since it successfully identified all 412 sequence variants (93 unique variants, including 27 disease causing variants) previously detected by Sanger sequencing. Clinically useful NGS gene panels for cancer susceptibility will thus provide a more comprehensive and cost-effective molecular diagnosis approach, with a shorter turnaround time when compared to standard methodologies.

_Introdução

O cancro da mama (CM) e o cancro colorretal (CCR) são responsáveis por uma elevada mortalidade associada ao cancro. Cerca de 5 a 10% destes casos são hereditários e estão associados a alterações germinais de elevada penetrância em genes de suscetibilidade para cancro. A identificação da causa genética subjacente aos cancros hereditários permite não só identificar os indivíduos com risco aumentado de desenvolver cancro como também oferecer uma medicina personalizada, mais eficaz na redução da incidência de cancro assim como da sua morbilidade e mortalidade.

Reconhecem-se, atualmente, cerca de 2 dezenas de genes de suscetibilidade para CM (1). Alterações germinais nos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm elevada penetrância e são responsáveis por cerca de metade dos casos de CM hereditários (CMH). São também conhecidas alterações raras de elevada penetrância noutros genes, entre os quais se destacam *TP53*, *STK11*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2* e *PTEN*. Recentemente foram também identificadas variantes germinais com penetrância moderada nos genes *BARD1*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51C* e *RAD51D*, entre outros.

Relativamente ao cancro colorretal hereditário (CCRH), estão identificadas diversas síndromes resultantes de alterações em vários genes, entre os quais se destacam *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *EPCAM* (síndrome de Lynch), *APC* (polipose adenomatosa familiar), *MUTYH* (polipose associada ao gene *MUTYH*) e *STK11* (síndrome de Peutz-Jeghers) (2).

O diagnóstico molecular de formas hereditárias de CM e CCR pelos métodos convencionais envolve, assim, a análise sequencial de múltiplos genes, tornando-se morosa e dispendiosa. A tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) veio possibilitar a pesquisa simultânea de alterações em múltiplos genes (painéis de genes), permitindo um diagnóstico molecu-

lar mais rápido, eficaz e com custo inferior ao da sequenciação pelo método de Sanger (3).

_Objetivo

Validação da NGS para identificação de variantes previamente detetadas pelo método de Sanger em genes de suscetibilidade para CM e CCR.

_Material e métodos

Foram analisados 64 indivíduos com suspeita clínica de CMH ou CCRH, aos quais tinha sido previamente solicitado consentimento informado. O DNA genómico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico utilizando o *kit Wizard DNA Extraction* (Promega) ou a plataforma robotizada *MagNA Pure LC* (Roche).

A análise molecular convencional incluiu a amplificação por PCR de todos os exões codificantes e sequências intrónicas flanqueantes dos genes *APC*, *MUTYH*, *MLH1*, *MSH2*, *STK11*, *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, seguida de sequenciação bidirecional pelo método de Sanger utilizando o *kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1* e a plataforma de sequenciação ABI 3130xL (Applied Biosystems).

Para a análise por NGS, as bibliotecas de sequências-alvo foram preparadas a partir de DNA genómico pelo método de captura por hibridação, num protocolo que integrou o *TruSight Cancer Sequencing Panel* (que possibilita a análise de 94 genes que conferem predisposição para cancro) com o *kit TruSight Rapid Capture* (Illumina), e a sequenciação numa plataforma MiSeq com leituras *paired-end* de 150 bp. A análise bioinformática incluiu os *softwares MiSeq Reporter*, *VariantStudio*, *Isaac Enrichment* (Illumina) e *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute).

As variantes detetadas foram classificadas em função do seu significado clínico com recurso às bases de dados BIC, HGMD, LOVD, UMD e ClinVar.

_Resultados

Foram identificadas por NGS um total de 413 variantes de sequência nos genes analisados, correspondendo a 94 variantes únicas pontuais (substituição de um nucleótido ou pequenas inserções/deleções), das quais 27 são patogénicas (tabela 1).

Todas estas tinham sido previamente identificadas por sequenciação de Sanger, com a exceção de uma alteração no gene *STK11* (c.375-49G>A). Esta variante intrónica foi considerada um resultado falso positivo, resultando possivelmente de uma baixa cobertura por NGS (17 em 23 leituras na posição c.375-49 apresentaram a alteração G>A).

Adicionalmente, não foi possível detetar por NGS dois grandes rearranjos genómicos, patogénicos previamente identificados em duas amostras pela técnica de MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (deleção do exão 5 do gene *MSH2*) e por PCR específica para a mutação fundadora portuguesa no gene *BRCA2* (c.156_157insAlu).

Das 93 variantes únicas pontuais detetadas por NGS e confirmadas pelo método de Sanger, 80 corresponderam a alterações de um nucleótido e 13 a pequenas inserções/deleções (tabela 2).

Tabela 1: Classificação das 93 variantes únicas pontuais identificadas em genes de suscetibilidade para CM e CCR relativamente ao seu significado clínico.

Variantes	BRCA1	BRCA2	TP53	APC	MUTYH	MLH1	MSH2	STK11
SNP	12	16	2	4	2	3	5	1
BV	0	0	0	3	0	2	2	0
VUS	4	7	0	1	1	0	0	1
PV	2	4	1	5	4	6	5	0
Total*	137	160	5	43	22	21	21	3

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*): polimorfismo de nucleótido único; BV (*Benign Variant*): variante benigna; VUS (*Variant of Unknown/Uncertain Significance*): variante de significado clínico desconhecido/incerto; PV (*Pathogenic Variant*): variante patogénica.
* Somatório do número de vezes que as diferentes variantes únicas foram detetadas.

Tabela 2: Classificação das 93 variantes únicas pontuais identificadas em genes de suscetibilidade para CM e CCR relativamente ao tipo de alteração.

Variantes	BRCA1	BRCA2	TP53	APC	MUTYH	MLH1	MSH2	STK11
Pontuais (1 nt)	16	26	2	11	6	8	9	2
Indels	2	1	1	2	1	3	3	0
Total	18	27	3	13	7	11	12	2

nt - nucleótido; Indels - inserções/deleções.

O número de amostras analisadas por NGS implicou a realização de três ensaios independentes, cujos valores de cobertura vertical média por amostra variaram entre 35X e 362X com valores de qualidade (Q30) sempre superiores a 94%.

_Discussão

A análise por NGS demonstrou elevada sensibilidade, especificidade e repetibilidade analíticas para a deteção de variantes de sequência em 8 genes de suscetibilidade para CM e CCR, uma vez que permitiu identificar a totalidade das 412 variantes previamente detetadas pelo método de Sanger.

A limitação atual da deteção por NGS de grandes rearranjos genómicos é bem conhecida, sendo ultrapassada através da utilização de metodologias e técnicas complementares adequadas tais como, PCR específica para grandes rearranjos conhecidos ou MLPA para identificação de grandes deleções/inserções.

O aumento do número de genes analisados por NGS deverá resultar num incremento do número de variantes identificadas, sendo provavelmente desconhecido o significado clínico para muitas delas. Neste contexto, a interpretação dos resultados deverá ser cuidadosamente ponderada e, sempre que necessário, complementada com a realização de estudos *in silico* e com investigação adicional, que integre diversos estudos funcionais.

A aplicação da NGS no diagnóstico molecular permite uma resposta mais rápida e eficiente quando comparada com as metodologias convencionais. Contudo, todas as alterações identificadas por NGS e classificadas como variantes de significado clínico desconhecido, patogénicas e presumivelmente patogénicas, deverão ser confirmadas por sequenciação de Sanger. Os grandes rearranjos genómicos deverão continuar a ser pesquisados na rotina por metodologias complementares.

_Conclusões

Os ensaios de validação realizados comprovam a eficiência da NGS na deteção de alterações pontuais em 8 genes de elevada penetrância para CM e CCR. Neste contexto, a disponibi-

lização da sequenciação por NGS de painéis de genes de predisposição para estes dois tipos de cancro irá possibilitar um diagnóstico molecular mais abrangente, rápido e com custos reduzidos relativamente à sequenciação de Sanger. Complementarmente, tanto os utentes afetados como os seus familiares, com o devido aconselhamento genético e sob vigilância clínica especializada, beneficiarão destas novas tecnologias que têm um elevado impacto na saúde pública.

Dado que o painel de NGS em causa possibilita a análise simultânea até 94 genes associados a predisposição para cancro, evidencia-se o grande potencial de aplicação desta metodologia a outros tipos de cancros hereditários.

Referências bibliográficas:

- (1) Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int.* 2013;2013:747318. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3618918/
- (2) Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer.* 2008;7(1):27-39. Epub 2007 Nov 13.
- (3) LaDuca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genet Med.* 2014;16(11):830-7. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4225457/

A paramiloidose em Portugal: reflexão sobre o paradigma da transplantação hepática motivada por um caso clínico

Paramiloidosis in Portugal: reflection on the hepatic transplantation paradigm motivated by an actual case

Pedro Castro Lacerda¹, Luciana Moreira¹, Rui Vitorino², Paulo Pinho Costa¹

paulo.costa@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética, INSA, Porto.

(2) Unidade de Investigação em Química Orgânica (Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares). Departamento de Química, Universidade de Aveiro.

_Resumo

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar de tipo português (PAF) ou ATTR V30M é uma doença hereditária cuja prevalência em Portugal é elevada, sendo diagnosticados cerca de 60 novos casos todos os anos. Uma doente com PAF submeteu-se a um segundo transplante hepático de um dador cadavérico depois de se ter constatado que o primeiro dador era portador de TTR V30M. Com este artigo breve pretende-se realizar uma reflexão sobre o interesse, a prática e o enquadramento legal que condicionam a realização de testes genéticos preditivos em dadores de fígado na transplantação de doentes com paramiloidose. A determinação da presença (ou não) de proteína mutada no soro do segundo dador foi realizada por espectrometria de massa precedida de imunoprecipitação da proteína transtirretina. A realização de testes genéticos que permitam determinar a condição de portador de TTR V30M em dadores de fígado, deveria ser considerada no quadro das políticas de transplante em Portugal.

_Abstract

Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Portuguese type (FAP), ATTR V30M, is a hereditary disease with high prevalence in Portugal, where 60 new cases are diagnosed each year. An FAP patient underwent a second liver transplantation from a cadaveric donor to treat her condition, after it was discovered that the first donor was a TTR V30M carrier. The purpose of this brief report is to contribute to a reflection on the interest, the procedures and the legal framework that steers the use of predictive genetic tests of liver donors in the transplantation of FAP patients. The presence or absence of the mutated protein in the donor serum was established by immunoprecipitation of TTR followed by mass spectrometry analysis. The implementation of predictive TTR V30M genetic tests, directed at liver donors in the transplantation of FAP patients, should be considered in the framework of the Portuguese transplant policies.

_Introdução

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar de tipo português (PAF) ou ATTRV30M é uma doença hereditária, de transmissão autossómica dominante, provocada pela substituição

de uma valina por uma metionina na posição 30 do gene da transtirretina (1). É caracterizada por uma polineuropatia sensitivo-motora, com distúrbios autonómicos, progressiva, de apresentação no adulto e que afeta múltiplos órgãos. São diagnosticados cerca de 60 novos casos todos os anos em Portugal.

O transplante de fígado é a principal opção terapêutica pois virtualmente elimina a TTR V30M em circulação, uma vez que a proteína é produzida, quase inteiramente, pelo fígado (2).

_Caso clínico

Uma doente com Paramiloidose (Polineuropatia Amiloidótica Familiar de tipo português (PAF) ou ATTRV30M), submeteu-se, para fins terapêuticos, a um transplante hepático de dador cadavérico. Após o transplante o seu quadro neurológico continuou a deteriorar-se para além do esperado (3), pelo que surgiu a suspeita de que o dador fosse, ele também, portador de TTR V30M, a mutação causal da doença.

A suspeita confirmou-se tendo então sido proposta, e realizada, retransplantação do fígado. Alguns dias após esta segunda intervenção e com o objetivo de garantir à doente e ao centro de transplantação que, desta vez, o fígado provinha de um dador "saudável", o soro proveniente do segundo dador cadavérico foi-nos enviado para análise. Não foi detetada a proteína mutada (TTRV30M) no soro do segundo dador (4).

_Objetivos

Este breve artigo tem dois propósitos: apresentar um ensaio laboratorial que permite, num curto espaço de tempo, determinar a condição de portador de TTRV30M de um dador quando os

resultados de testes genéticos preditivos não estão disponíveis, e fazer uma breve reflexão crítica sobre o transplante hepático em Portugal no contexto da paramiloidose; sobre os procedimentos que precedem o transplante propriamente dito e sobre aspetos do enquadramento legal que o regulamenta.

_Método e resultado

A ausência de TTR MET30 no soro do segundo dador cadavérico foi estabelecida por espectrometria de massa precedida de imunoprecipitação da TTR (5).

_Considerações

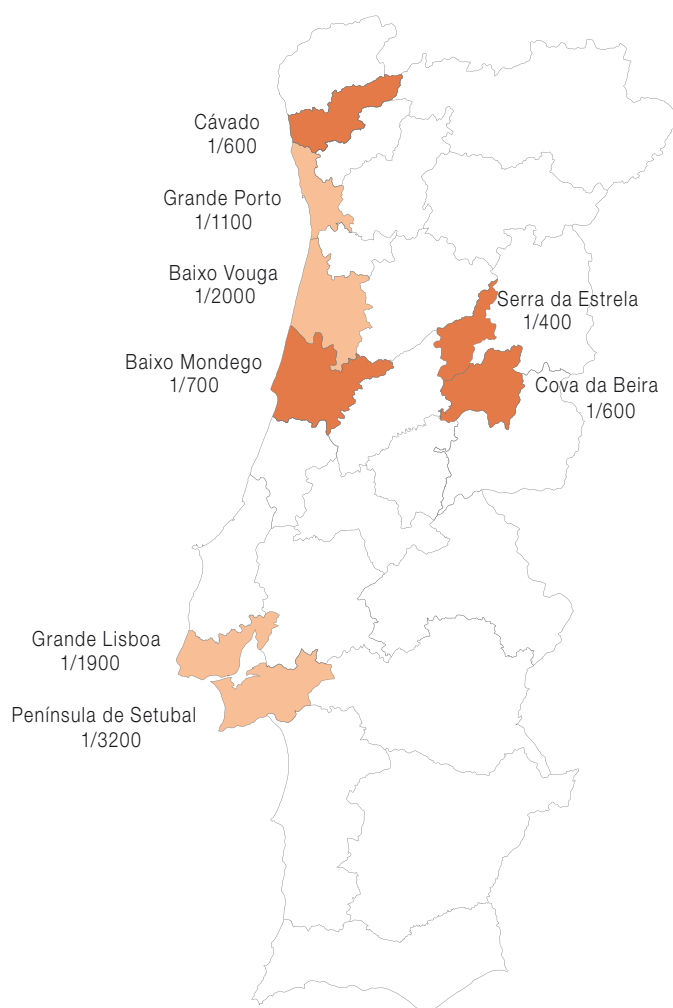
A transplantação hepática é ainda a principal opção terapêutica na paramiloidose, tendo por objetivo eliminar a produção de TTRV30M circulante. Por altura do transplante hepático, normalmente 12 horas depois da colheita do fígado, a única informação disponível nos centros de histocompatibilidade sobre o dador diz respeito a doenças infecciosas e neoplasias malignas.

A lei portuguesa (Lei n.º 12/93, de 22 de abril) (6) assume que qualquer cidadão é um potencial dador de órgãos *post mortem*, a não ser que declare expressamente o contrário. A prevalência da PAF em Portugal é elevada (cerca de 1/500 em algumas regiões, figura 1) (7). O risco de transplantar um fígado TTRV30M positivo num doente paramiloidótico é ainda assim baixo. No entanto, num país que já transplantou mais de mil doentes, este indesejável acontecimento acabaria por acontecer.

A paramiloidose é uma doença de manifestação tardia, e os testes genéticos preditivos eventualmente realizados não estão disponíveis, por imperativo legal. No entanto, seria possível implementar ensaios laboratoriais que permitam, num curto espaço de tempo, determinar a condição de portador de TTRV30M de um dador.

As implicações da realização destes testes num dador cadavérico aconselhariam a ter em consideração tanto o enquadramento legal aplicável como a dimensão ética do problema. Em particular os possíveis malefícios e benefícios de comunicar

Figura 1: ↓ Prevalência da paramiloidose nas regiões mais afetadas de Portugal, estimada a partir dos testes genéticos realizados no INSA entre 1989 e 2008.



Testes genéticos realizados no Centro de Estudos de Paramiloidose do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, Porto), no âmbito do rastreio realizado no norte de Portugal (6).

(ou não) a condição genética do dador à família, na ausência de consentimento, teriam de ser ponderados.

A possibilidade de realizar testes genéticos a dadores, em situações análogas, teria possivelmente de ser considerada aquando da reavaliação das políticas de transplante.

Referências bibliográficas:

- (1) Costa PP, Figueira AS, Bravo FR. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(9):4499-503. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC336143/
- (2) Benson MD. Liver transplantation and transthyretin amyloidosis. Muscle Nerve. 2013;47(2):157-62. Epub 2012 Nov 21.
- (3) Adams D, Samuel D, Goulon-Goeau C, et al. The course and prognostic factors of familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. Brain. 2000;123 (Pt 7):1495-504. <http://brain.oxfordjournals.org/content/123/7/1495.long>
- (4) Lacerda PC, Moreira L, Vitorino R, et al. Use of MALDI-TOF Mass spectrometry to assay the transthyretin V30M mutation in serum from a liver transplant donor: a case report. Transplantation. 2015;99(5):e33-4.
- (5) Beirão JM, Moreira LV, Lacerda PC, et al. Inability of mutant transthyretin V30M to cross the blood-eye barrier. Transplantation. 2012;94(8):e54-6.
- (6) Assembleia da República. Lei n.º 12/1993, de 22 de abril. DR 1ª Série, nº 94:1961-63. Colheita e transplante de órgãos e tecidos de origem humana. <https://dre.pt/application/file/692738>
- (7) Alves IL, Altland K, Almeida MR, et al. Screening and biochemical characterization of transthyretin variants in the Portuguese population. Hum Mutat. 1997;9(3):226-33.

Anemia de Fanconi em Portugal: estudo retrospectivo de 34 anos de investigação no INSA (1980-2014)

Fanconi anemia in Portugal: retrospective study of 34 years of investigation at National Health Institute (1980-2014)

Ana Paula Ambrósio, Maria do Céu Silva, José Manuel Furtado, Neuza Silva, Catarina Ventura, Mónica Viegas, Hildeberto Correia

hildeberto.correia@insa.min-saude.pt

Unidade de Citogenética, Departamento de Genética Humana, INSA.

_Resumo

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença recessiva rara, com uma frequência estimada de 4 a 7 por 1 000 000 de nascimentos. Caracteriza-se por malformações congénitas, falência medular e hipersensibilidade a agentes clastogénicos de DNA. Devido à grande complexidade desta patologia a primeira abordagem de diagnóstico, consiste na análise da instabilidade cromossómica, após cultura celular com estimulação com agentes clastogénicos diepoxibutano (DEB) ou mitomicina C (MMC). Realizou-se um estudo retrospectivo de 34 anos (1980-2014) em 243 amostras com suspeita de AF e de 25 amostras de familiares de doentes de AF, num total de 268 amostras. Nas 243 amostras suspeitas de Anemia de Fanconi, foram identificadas 37 com AF. A idade média ao diagnóstico foi de 7 anos, existindo um ligeiro predomínio da incidência no sexo feminino (59%). Uma amostra foi classificada como AF(-/+). Nos familiares de doentes com AF foram identificados 2 casos positivos, o que perfaz 39 amostras de AF positivas. Em quatro das amostras AF negativas, observaram-se cariotipos anormais. Estes resultados não permitem estimar uma frequência de doentes de AF em Portugal, uma vez que não englobam indivíduos de todas as regiões portuguesas, mas permitem uma estimativa da frequência espectável.

_Abstract

Fanconi anemia (FA) is a rare recessive disease with an estimated frequency from 4 to 7 per 1 000 000 live births. It is characterized by congenital malformations, bone marrow failure and hypersensitivity to DNA clastogenic agents. Due to the great complexity of the pathology the first diagnostic approach is the analysis of chromosomal instability in cultured cells after stimulation with the clastogenic agents diepoxybutane (DEB) or mitomycin C (MMC). We performed a retrospective study of 34 years (1980-2014) in 243 samples suspected of FA and 25 samples from relatives of FA patients, totalizing 268 samples. In 243 suspected samples 37 were confirmed to be FA. The average age at diagnosis was 7 years, with a slight predominant incidence in females (59%). One sample was classified as FA (-/+). Among the patients' relatives, 2 positive FA cases were identified totaling 39 positive samples. In four negative samples of suspected FA, abnormal karyotypes were observed. Since these samples are not representative of individuals from all Portuguese regions, the data only allow estimating the frequency of FA in Portugal.

_Introdução

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença rara, com uma frequência estimada de 4 a 7 por 1 000 000 de nascimentos, podendo este valor aumentar em grupos étnicos com consanguinidade (1,2).

É uma doença genética autossómica recessiva, que poderá ter transmissão ligada ao cromossoma X (#227650) (3). Doentes com AF podem apresentar malformações congénitas, falência da medula óssea, hipersensibilidade a agentes clastogénicos de DNA, fragilidade cromossómica e uma maior suscetibilidade para doenças oncológicas. Entre 60 a 70% dos indivíduos afetados apresentam malformações congénitas entre as quais: baixa estatura, pigmentação anormal da pele (manchas *café-au-lait*), atraso de desenvolvimento, malformações do esqueleto, olhos, sistema urinário, cardíaco, gastrointestinal e nervoso central (3). A maioria destes doentes apresentam ainda uma falência medular progressiva que se caracteriza por pancitopenia e uma grande incidência de doenças hemato-oncológicas (10-30%) e de doenças oncológicas não hematológicas (25 a 30%), como os tumores sólidos da cabeça, pescoço, pele, entre outros (3).

A AF é uma patologia com uma grande heterogeneidade genética, que envolve vários genes de reparação de DNA e de estabilidade cromossómica (3). Até à presente data, já foram identificados 19 genes associados a AF, contudo, devido aos critérios de seleção, apenas 15 estão classificados como genes causadores de doença, nomeadamente, [FANCA; FANCB; FANCC; BRCA2 (FANCD1) FANCD2; FANCE; FANCF; FANCG (XRCC9); FANCI; BRIP1 (FANCI); FANCL; PALB2 (FANCN); SLX4 (FANCP); FANCCQ (ERCC4); FANCT] (4). Os genes

RAD51C (*FANCO*), *FANCR* e *FANCS* são considerados “AF-like”, uma vez que induzem síndromes de fragilidade cromossómica e malformações idênticas às observadas nos doentes de AF, mas não apresentam falência medular (4). O *FANCM* não é considerado um gene causador de AF, pois ainda não existem estudos suficientes que demonstrem esta associação (4). Aproximadamente 85% dos indivíduos afetados apresentam mutações nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* e as restantes encontram-se distribuídas pelos outros 12 genes (3,5,9). Contudo existem doentes de AF que não apresentam mutações nos 15 genes identificados, o que sugere que existem mais genes envolvidos por identificar (3,5).

Devido à grande complexidade desta patologia a primeira abordagem de diagnóstico, consiste na deteção de aberrações cromossómicas (quebras, rearranjos estruturais, radiais, anéis) em células de sangue periférico em cultura em resposta a um agente clastogénico como o diepoxibutano (DEB) ou mitomicina C (MMC).

_Objetivo

Apresentação dos resultados obtidos dos estudos de instabilidade cromossómica induzida por DEB e MMC realizados entre 1980-2014 na Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

_Métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo de 34 anos (1980-2014) de 243 amostras enviadas à unidade de citogenética com suspeita de AF e de 25 amostras de familiares de doentes de AF. Num total de 268 amostras, foram analisadas 260 de sangue periférico, 3 de biópsia de pele, 3 de líquido amniótico, 1 de sangue do cordão e 1 de sangue medular.

As amostras foram processadas segundo o protocolo estabelecido para a análise cromossómica de doenças associadas a fraturas, incluindo cultura celular com estimulação por MMC e/ou DEB, para cada produto biológico, seguida de análise microscópica para estudo da determinação da instabilidade

cromossómica induzida pelo DEB e/ou MMC, de acordo com o protocolo estabelecido pelo *International Fanconi Anemia Registry* (IFAR).

_Resultados

Nas 243 amostras analisadas no período entre 1980 e 2014 foram identificados 37 casos (15,2%) de AF (gráfico 1).

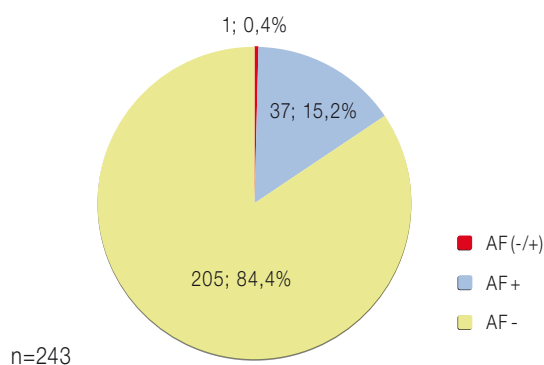
Uma das amostras foi classificada como AF (-/+), uma vez que o estudo não evidenciou um número de quebras cromossómicas suficientes para ser catalogado como doente de AF, podendo tratar-se de um mosaico, situação que este teste não permite identificar (9).

A idade média ao diagnóstico foi de 7 anos, existindo um ligeiro predomínio da incidência no sexo feminino, com 59%.

Nos estudos citogenéticos dos familiares com AF foram identificados mais 2 casos positivos, o que perfaz 39 amostras de AF positivas (14,6%), numa população total de 268.

Em quatro das amostras AF negativas analisadas foram observados cariotipos anormais (tabela 1).

Gráfico 1: Número de doentes identificados de Anemia de Fanconi, entre 1980 e 2014.



AF-/+ : não apresenta número de quebras cromossómicas suficientes para ser considerado doente de AF; AF+ : doente de AF; AF- : não doente de AF.

Tabela 1: ↓ Informação clínica *versus* dados bibliográficos nas 4 amostras de suspeita de Anemia de Fanconi com cariótipo anormal.

Caso nº	Informação clínica	Sobreposição c/ fenótipo AF	AF	Cariótipo	Fenótipo vs cariótipo (dados bibliográficos)
I	<input type="checkbox"/> Agenésia bilateral do rádio	+	-	mos47,XY,+7[3]/46,XY[47]	Baixa estatura ⁽⁶⁾
	<input type="checkbox"/> Proeminência das bossas frontais	-			Clinodactilia ⁽⁶⁾
	<input type="checkbox"/> Dismorfia das mãos	+			Assimetria corporal ⁽⁶⁾
	<input type="checkbox"/> Sem alterações do SP	-			Facies triangular ⁽⁶⁾
II	<input type="checkbox"/> Atraso de Desenvolvimento psico-motor	+	-	46,XY,dup(2)(p23.1p24.3).ish dup(2)(wcp2+)	Atraso desenvolvimento psico-motor ⁽⁷⁾
	<input type="checkbox"/> Peso e altura <P5 desde os 6 meses	+			Microcefalia ⁽⁷⁾
	<input type="checkbox"/> Implantação baixa do polegar	+			Testa proeminente ⁽⁷⁾
	<input type="checkbox"/> Outras pequenas dismorfias	+			Dismorfias faciais ⁽⁷⁾
III	<input type="checkbox"/> Malformações dos membros superiores	+	-	47,XX,+mar[2]/46,xx[28]	
IV	<input type="checkbox"/> Trombocitopénia ligeira + macrocitose	+	-	46,X,i(X)(p10)[11]/46,XX[39]	Pancitopénia com marcada trombocitopénia ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Hb fetal ↑	+			Doenças hematológicas ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Focomelia	+			Apneia ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> LCA (Amaurose congénita de Leber)	-			Hipotonia ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Má evolução ponderal	+			Atraso de crescimento ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Baixa estatura	+			

_Conclusões

Este estudo evidência que a maioria dos indivíduos com suspeita de AF são negativos. Este facto deve-se à sobreposição do fenótipo dos doentes de AF com o de outras síndromes, das quais é exemplo Dubowitz, Seckel, Holt-Oram, Baller-Gerold, trombocitopenia - ausência de rádio, síndromes de quebras de Nijmegen, associação VACTERL e/ou disqueratose congénita, e ainda, à presença de anomalias cromossómicas, que poderão induzir um fenótipo semelhante ao de um doente de AF. Também a existência de doentes de AF assintomáticos e a sobreposição fenotípica com outras síndromes, contribuem para um subdiagnóstico desta patologia.

Contudo, ao longo de 34 anos, foram identificados, 39 novos casos de AF oriundos maioritariamente da região de Lisboa e Vale do Tejo, casos pontuais da Região Autónoma dos Açores, região centro e dos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP). Dois destes novos casos foram identificados em familiares diretos dos casos índice, assintomáticos até à

data do diagnóstico, o que demonstra que o estudo citogenético é relevante, não só para a identificação dos doentes de AF, mas também para os seus familiares diretos. Por este motivo sugere-se que seja realizado o estudo familiar dos indivíduos AF positivos e um aconselhamento genético adequado.

Foram analisadas amostras, de indivíduos com um fenótipo sugestivo de AF, mas cujo estudo citogenético de quebras cromossómicas revelou não serem doentes de AF. No entanto, estes estudos permitiram pela análise cromossómica por citogenética convencional identificar um cariótipo anormal (tabela 1). Por este motivo e como forma de despiste primário, sugere-se a realização de cariótipo constitucional, em simultâneo com a pesquisa de quebras cromossómicas induzidas pelos agentes clastogénicos MMC e DEB.

Estes resultados não permitem estimar uma frequência de doentes de AF em Portugal, uma vez que não englobam indivíduos de todas as regiões portuguesas e por outro lado, estão incluídos dois indivíduos de origem PALOP. Se não considerar-

mos estas duas amostras provenientes dos PALOP e estimando uma população de 10 milhões de habitantes em Portugal, a frequência será muito baixa, com um valor aproximado de ≈ 4 indivíduos por milhão de habitantes. Este valor não se encontra longe do estimado para os países europeus que é de 4 a 7 por 1 000 000 de nascimentos, de acordo com Gulbis *et al.* em 2010 (1). A diferença observada entre estes valores poderá estar relacionada com o facto de o nosso estudo não englobar amostras provenientes de todas as regiões de Portugal.

Referências bibliográficas:

- (1) Gulbis B, Eleftheriou A, Angastiniotis M, et al. Epidemiology of rare anaemias in Europe. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:375-96.
- (2) Castella M, Pujol R, Callén E, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet.* 2011;48(4):242-50.
- (3) Alter BP, Kupfer G. Fanconi Anemia. In: Pagon RA, Adam MP, Adinger HH, et al. (eds). *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993-2016. Last Revision: February 7, 2013, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/
- (4) Bogliolo M, Surrallés J. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;33:32-40.
- (5) Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):800-6. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3644630/
- (6) Font-Montgomery E, Stone KM, Weaver DD, et al. Clinical outcome and follow-up of the first reported case of Russell-Silver syndrome with the unique combination of maternal uniparental heterodisomy 7 and mosaic trisomy 7. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005;73(8):577-82.
- (7) Aviram-Goldring A, Fritz B, Bartsch C, et al. Molecular cytogenetic studies in three patients with partial trisomy 2p, including CGH from paraffin-embedded tissue. *Am J Med Genet.* 2000;91(1):74-82.
- (8) Gray SL, de Chadarévian JP, Anderson CE, et al. Improvement of pancytopenia and thrombocytopenia with decreasing mosaicism for isochromosome Xp. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(5):650-2.
- (9) Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009;668(1-2):4-10. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2742943/

Base molecular da hemocromatose hereditária não-clássica em Portugal

Molecular basis of the non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal

Ricardo Faria¹, Bruno Silva¹, Catarina Silva¹, Pedro Loureiro¹, Ana Queiroz², Jorge Esteves³, Diana Mendes⁴, Rita Fleming⁵, Luís Vieira¹, João Gonçalves¹, João Lavinha^{1,6}, Paula Faustino^{1,7}

paula.faustino@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, INSA. (2) Serviço de Pediatria, Hospital Garcia de Orta, Almada. (3) Serviço de Gastrenterologia, Hospital de Santo António dos Capuchos, Centro Hospitalar Lisboa Central, Lisboa. (4) Serviço de Medicina Transfusional, Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa.

(5) Serviço de Imuno-Hemoterapia, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa. (6) BiolSI, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

(7) Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

_Resumo

A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossómica recessiva caracterizada pela absorção excessiva de ferro a nível intestinal e sua acumulação em órgãos vitais, podendo originar cardiomiopatia, cirrose e carcinoma hepatocelular. O correspondente diagnóstico molecular é obtido pela associação com genótipos específicos no gene *HFE* (homozigotia para p.Cys282Tyr ou heterozigotia composta p.Cys282Tyr/p.His63Asp). Contudo, nos países do sul da Europa, cerca de um terço dos doentes com diagnóstico clínico de HH não apresenta os referidos genótipos. Para identificar a base molecular da HH não-clássica em Portugal usaram-se metodologias de pesquisa geral de variantes genéticas (SSCP e dHPLC), *Next-Generation Sequencing* (NGS) e sequenciação de Sanger, cobrindo seis genes relacionados com o metabolismo do ferro em 303 doentes. Identificaram-se 69 variantes diferentes e de vários tipos, por ex. *missense*, *nonsense*, de *splicing*, que perturbam a transcrição do gene ou a regulação da tradução do mRNA. Seguidamente, realizaram-se estudos *in silico* e *in vitro* para esclarecer o significado etiológico de algumas das novas variantes. Concluiu-se que a base molecular desta patologia é bastante heterogénea e que a NGS é uma ferramenta adequada para efetuar a análise simultânea dos vários genes num grande número de amostras. Contudo, o estabelecimento da relevância clínica de algumas variantes requer a realização de estudos funcionais.

_Abstract

Hereditary Hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder characterized by excessive intestinal iron absorption and deposition in vital organs leading to cardiac failure, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Molecular diagnosis of common HH is made by the presence of specific genotypes in HFE gene (p.Cys282Tyr homozygosity or p.Cys282Tyr/p.His63Asp compound heterozygosity). However, in Southern European countries up to one third of the patients with a clinical diagnosis of HH do not have these genotypes. In order to identify the molecular basis of the non-classical HH in Portugal, we used genetic screening methods for the detection of unknown mutations (SSCP and dHPLC), Next-Generation Sequencing (NGS) and/or Sanger sequencing in six HH-related genes in 303 patients. Sixty-nine different variants were identified, including missense, nonsense and splicing variants, and variants that impair gene transcription or mRNA translation regulation. In silico and in vitro studies were performed to know the likely etiologic significance of some of the novel variants found. We can conclude that

the molecular basis of the non-classical HH in Portuguese population is largely heterogeneous. NGS revealed to be an appropriate tool for fast analysis of the HH-related genes in a large number of samples. However, establishing the clinical relevance of some novel variants requires further functional studies.

_Introdução

A Hemocromatose Hereditária (HH) clássica (HH-tipo 1; OMIM#235200) é uma doença genética autossómica recessiva, comum em Caucásianos, caracterizada por absorção aumentada de ferro a nível intestinal e consequente acumulação em vários órgãos, podendo originar cirrose hepática, carcinoma hepatocelular, cardiomiopatias, etc. É uma patologia de manifestação tardia cujo gene associado é o *HFE* (*High Fe*). No norte da Europa, a grande maioria dos doentes com HH tem a variante *HFE:c.845G>A,p.Cys282Tyr* em homozigotia. Uma segunda variante neste gene, a *c.187C>G,p.His63Asp*, tem também sido implicada no desenvolvimento da doença quando em heterozigotia composta com a anterior (1). Pelo contrário, nos países do sul da Europa cerca de um terço dos doentes com HH não apresenta os genótipos acima referidos (1,2). Nestes casos poderão estar envolvidos outros genes relacionados com o metabolismo do ferro e, então, estaremos em presença de uma doença rara, a HH não-clássica, que se classifica em vários tipos (revisto em (3)).

A HH-tipo 2, também chamada de Hemocromatose Juvenil (HJ), é a forma mais grave da doença. Nesta, a sobrecarga em ferro instala-se a um ritmo mais acelerado e os indivíduos apresentam cardiomiopatia e problemas endócrinos ainda em

jovens. A HJ deve-se a alterações no gene da Hemojuvelina (*HJV*; HH-tipo 2a; OMIM#602390) ou da Hepsidina (*HAMP*; HH-tipo 2b; OMIM#613313). Por outro lado, na HH-tipo 3 (OMIM#604250) o gene envolvido é o do Receptor 2 da Transferrina (*TFR2*). Neste caso são observados sintomas clínicos semelhantes aos da HH-tipo 1 mas, por vezes, de manifestação mais precoce. Por último, a HH-tipo 4 (OMIM#606069) é causada por alterações no gene da ferroportina (*SLC40A1*), sendo por isso também designada de Doença da Ferroportina, e ao inverso das anteriores apresenta transmissão autossómica dominante.

_Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se identificar a base molecular da HH não-clássica na população portuguesa, bem como avaliar a metodologia de genética molecular mais adequada para o seu diagnóstico.

_Materiais e métodos

Foram estudados 303 doentes selecionados pelos clínicos segundo os critérios: persistência de parâmetros aumentados do status do ferro (ferritina sérica >400 µg/L e saturação da transferrina >50 %), ausência de fatores de risco ambiental (alcoolismo e hepatite) e ausência dos genótipos de risco em *HFE*.

Numa primeira fase os métodos utilizados para a pesquisa geral de alterações genéticas foram o *Single-Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP) e a *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* (dHPLC) (4). Numa segunda fase usou-se a *Next-Generation Sequencing* (NGS). Para tal, foi desenhado um painel com 97 amplicões, cobrindo as regiões codificantes, as junções exão/intrão e as regiões transcritas não traduzidas de seis genes relacionados com o metabolismo do ferro (*HFE*, *TFR2*, *HJV*, *HAMP*, *SLC40A1* e *FTL*, o gene da cadeia leve da ferritina) perfazendo uma sequência cumulativa de 12115 pb. As bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando o *kit TruSeq Custom Amplicon* (Illumina), sequenciadas no *MiSeq* (Illumina) e as sequências foram comparadas com o genoma humano de

referência hg19 no *software* MiSeqReporter. A sequenciação de Sanger foi realizada usando o *kit BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing* e o sequenciador 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems).

_Resultados

Em 215 doentes, com fenótipo clínico e bioquímico compatível com HH e que cumpriam os critérios acima mencionados, realizou-se uma pesquisa geral de alterações nos genes *HFE*, *TFR2*, *HJV* e *HAMP*, pelos métodos de SSCP ou dHPLC. Estas foram posteriormente identificadas por sequenciação de Sanger (4). Numa segunda fase analisaram-se mais 88 doentes pela metodologia de NGS (nos genes *HFE*, *TFR2*, *HJV*, *HAMP*, *SLC40A1* e *FTL*). As variantes novas (não descritas nas bases de dados públicas) ou muito raras foram validadas por sequenciação de Sanger.

No total dos 303 doentes analisados identificaram-se 69 variantes genéticas diferentes, algumas delas novas: 29 *missense*, 8 sinónimas, 5 localizadas em regiões de *splicing*, 1 que origina um codão de stop prematuro, 1 que origina um codão de iniciação da tradução prematuro, 2 localizadas num elemento de resposta ao ferro (*Iron-Responsive Element*) e 23 aparentemente neutras.

Na **tabela 1** apresentam-se as principais variantes identificadas nos genes *HFE*, *TFR2*, *HJV* e *HAMP*, as respetivas frequências alélicas e significado clínico [obtido por consulta das bases de dados e pelos estudos *in silico* e *in vitro* efetuados (4,5)]. Para além dessas, de entre as alterações detetadas nos genes *SLC40A1* e *FTL* são de referir duas variantes patogénicas com transmissão autossómica dominante: *SLC40A1:c.238G>A,p.Gly80Ser*, responsável pelo fenótipo de HH-tipo 4 onde ocorre uma sobrecarga intracelular de ferro (sobretudo nos macrófagos) e *FTL:c.-167C>A*, responsável pela síndrome de hiperferritinémia hereditária com cataratas congénitas (OMIM#600886).

Tabela 1: ⚡ Variantes detetadas em genes relacionados com o metabolismo do ferro em doentes portugueses com fenótipo compatível com Hemocromatose Hereditária não-clássica.

Gene	Identificação da variante	Localização genómica (hg19)	Alteração de nucleótido	Tipo de variante	Frequência alélica (%)	Significado clínico da variante (Ensembl; ClinVar; PubMed)
HFE	rs149342416	6:g.26087458	c.18G>C	Missense; p.(Arg6Ser)	0,17	Desconhecido
	rs765114087	6:g.26090901	c.137T>C	Missense; p.(Leu46Trp)	0,17	Provavelmente patogénico (4)
	rs1799945	6:g.26090951	c.187C>G	Missense; p.(His63Asp)	19,32	Possivelmente patogénico/Fator de risco
	rs1800730	6:g.26090957	c.193A>T	Missense; p.(Ser65Cys)	1,01	Possivelmente patogénico/Fator de risco
	rs2071303	6:g.26091108	c.340+4T>C	Altera região dadora de <i>splicing</i>	0,17	Provavelmente benigno
	rs200706856	6:g.26091358	c.385G>A	Missense; p.(Asp129Asn)	0,17	Provavelmente patogénico (4)
	rs780563614	6:g.26091387	c.414C>T	Sinónima; p.(Tyr138=)	0,17	Provavelmente benigno (4)
	sem nº de ID	6:g.26091387	c.414C>G	Nonsense; p.(Tyr138*)	0,17	Patogénico (4)
	sem nº de ID	6:g.26092757	c.689A>T	Missense; p.(Tyr230Phe)	0,17	Provavelmente benigno (4)
	rs758663135	6:g.26092757	c.689A>G	Missense; p.(Tyr230Cyst)	0,17	Provavelmente patogénico*
	rs140080192	6:g.26092897	c.829G>A	Missense; p.(Glu277Lys)	0,17	Patogénico (5)
	rs1800562	6:g.26092913	c.845G>A	Missense; p.(Cys282Tyr)	2,82	Patogénico
rs143175221	6:g.26092952	c.884T>C	Missense; p.(Val295Ala)	0,17	Patogénico (5)	
TFR2	rs376955913	7:g.100640856	c.303C>T	Sinónima; p.(Tyr101=)	0,17	Provavelmente benigno
	rs148902192	7:g.100640678	c.473+8T>A	Altera região dadora de <i>splicing</i>	0,17	Provavelmente benigno
	rs34242818	7:g.100633241	c.714C>G	Missense; p.(Ile238Met)	0,34	Benigno
	rs151198873	7:g.100633010	c.840C>G	Missense; p.(Phe280Leu)	0,17	Provavelmente benigno
	sem nº de ID	7:g.100229569	c.967-1G>C	Altera região aceitadora de <i>splicing</i>	0,34	Patogénico*
	rs41303501	7:g.100629279	c.1364G>A	Missense; p.(Arg455Gln)	0,17	Não esclarecido; fator de risco
	rs80338885	7:g.100628294	c.1403G>A	Missense; p.(Arg468His)	0,17	Patogénico
	rs139178017	7:g.100628224	c.1473G>A	Sinónima; p.(Glu491=)	0,17	Patogénico (9)
	rs62625319	7:g.100627570	c.1767+7C>T	Altera região dadora de <i>splicing</i>	0,17	Provavelmente benigno
	rs2075674	7:g.100627408	c.1851C>T	Sinónima; p.(Arg617=)	0,34	Provavelmente benigno
	sem nº de ID	7:g.100218637	c.2249T>C	Missense; p.(Leu750Pro)	0,34	Patogénico*
	rs41295942	7:g.100621008	c.2255G>A	Missense; p.(Arg752His)	3,23	Benigno (10)
sem nº de ID	7:g.100218556	c.2330C>T	Missense; p.(Ala777Val)	0,34	Patogénico*	
HJV	rs56025621	1:g.146019740	c.98-6C>G	Altera região aceitadora de <i>splicing</i>	0,34	Desconhecido
	sem nº de ID	1:g.145415755	c.371C>T	Missense; p.(Pro124Leu)	0,17	Estudos funcionais em curso
	sem nº de ID	1:g.145415769	c.385T>C	Sinónima; p.(Asn129 =)	0,17	Provavelmente benigno
HAMP	sem nº de ID	19:g.35773456	c.-25G>A	Cria codão de iniciação da tradução	0,66	Patogénico (4,7,8)
	rs10489469	19:g.35284999	c.212G>A	Missense; p.(Gly71Asp)	0,17	Fator de risco

* Resultado proveniente de estudos *in silico* e de associação genótipo/fenótipo.

_Discussão

A análise dos resultados revelou que a base molecular da HH-não clássica na população portuguesa é bastante heterogénea, envolvendo vários genes assim como vários tipos de mutações. Observa-se um predomínio de variantes nos genes *HFE* e *TFR2*, associadas à HH com fenótipo de aparecimento tardio e sintomas semelhantes à HH-tipo 1 (tabela 1). No grupo de doentes analisados as variantes com maior frequência alélica encontram-se no gene *HFE*: p.His63Asp=19,32% e p.Cys282Tyr=2,82%. Contudo estas frequências não diferem significativamente das descritas para a população portuguesa em geral [p.His63Asp=15-20% e p.Cys282Tyr=0,9-5,8%, dependendo da região do país (6)]. A terceira variante mais frequente é a p.Ser65Cys com frequência alélica de 1,01%. Não existindo dados sobre a frequência desta variante na população portuguesa consultou-se o *1000 Genomes Project - Iberian population in Spain*, onde a frequência do alelo T é de 1%, muito semelhante ao aqui encontrado. As restantes variantes detetadas neste gene apresentam frequências muito baixas, na ordem de 0,17%. Quanto às variantes patogénicas, ou possivelmente patogénicas, detetadas no gene *TFR2*, não foi observada nenhuma predominância mas sim diversas variantes raras com frequências na ordem de 0,34%.

A hepcidina é uma hormona sintetizada no fígado e é o principal regulador (de ação negativa) da absorção intestinal do ferro. De entre as variantes detetadas no seu gene destaca-se a HAMP:c.-25G>A (frequência = 0,66%). Esta já foi detetada em segregação em quatro famílias portuguesas naturais de diferentes regiões do país (4, 7, 8), este estudo). A variante origina um codão de iniciação da tradução prematuro, alteração da grelha de leitura, expressão muito baixa de hepcidina (7,8) e, conseqüentemente, sobrecarga de ferro na fase juvenil (HH- tipo 2b). Assim, esta parece ser a principal causa da HJ na nossa população (tabela 1).

_Conclusão

Nos doentes portugueses com fenótipo compatível com HH-não clássica foi detetada uma grande variedade de alterações moleculares cuja prevalência é, em geral, muito baixa. Isto indica que para o diagnóstico molecular desta patologia deverá ser utilizada uma metodologia de pesquisa/identificação geral de alterações genéticas como a NGS, que se revelou de execução rápida e de elevada sensibilidade e especificidade. No entanto, a conclusão sobre a relevância clínica das novas variantes encontradas é complexa e requer frequentemente a realização de estudos funcionais.

Referências bibliográficas:

- (1) Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996;13(4):399-408.
- (2) Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test.* 2000;4(2):183-98.
- (3) Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(7):1347-59.
- (4) Mendes AI, Ferro A, Martins R, et al. Non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal: novel mutations identified in iron metabolism-related genes. *Ann Hematol.* 2009;88(3):229-34. Epub 2008 Sep 2.
- (5) Silva B, Martins R, Proença D, et al. The functional significance of E277K and V295A HFE mutations. *Br J Haematol.* 2012;158(3):399-408.
- (6) Cardoso CS, Oliveira P, Porto G, et al. Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(11):843-8. www.nature.com/ejhg/journal/v9/n11/abs/5200723a.html
- (7) Porto G, Roetto A, Daraio F, et al. A Portuguese patient homozygous for the -25G>A mutation of the HAMP promoter shows evidence of steady-state transcription but fails to up-regulate hepcidin levels by iron. *Blood.* 2005;106(8):2922-3. www.bloodjournal.org/content/106/8/2922.long?sso-checked=true
- (8) Matthes T, Aguilar-Martinez P, Pizzi-Bosman L, et al. Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5'-UTR of the HAMP gene. *Blood.* 2004;104(7):2181-3. www.bloodjournal.org/content/104/7/2181.long
- (9) Del-Castillo-Rueda A, Moreno-Carralero MI, Cuadrado-Grande N, et al. Mutations in the HFE, TFR2, and SLC40A1 genes in patients with hemochromatosis. *Gene.* 2012;508(1):15-20.
- (10) Radio FC, Majore S, Binni F, et al. TFR2-related hereditary hemochromatosis as a frequent cause of primary iron overload in patients from Central-Southern Italy. *Blood Cells Mol Dis.* 2014;52(2-3):83-7. Epub 2013 Sep 20.

Estudo de dislipidemias familiares monogénicas raras

Study of rare familial monogenic dyslipidemias

Ana Catarina Alves^{1,2}, Sílvia Sequeira³, Oana Moldovan⁴, Goreti Lobarinhas⁵, Helena Mansilha⁶, Sequeira Duarte⁷, Ana Gaspar⁸, António Guerra^{9,10}, Mafalda Bourbon^{1,2}

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação Cardiovascular. Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas, INSA. (2) BioISI-Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. (3) Unidade de Doenças Metabólicas. Hospital de Dona Estefânia. (4) Serviço de Genética Médica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria; Centro Académico de Medicina de Lisboa. (5) Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria Maior. (6) Serviço de Pediatria/Nutrição Pediátrica. Departamento da Infância e Adolescência. Centro Materno-Infantil do Norte, Centro Hospitalar do Porto. (7) Serviço Endocrinologia, Hospital Egas Moniz. (8) Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria. (9) Serviço de Pediatria, Centro Hospitalar de São João. (10) Centro de Investigação em Tecnologias e Serviços de Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto.

_Resumo

A dislipidemia é um distúrbio do perfil lipídico, seja por elevação ou diminuição de partículas lipídicas. O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão dos casos com dislipidemia rara em estudo no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, apresentando os dados clínicos e moleculares mais relevantes. O perfil lipídico foi determinado para cada caso índice e familiares e o estudo molecular dos genes envolvidos foi realizado por amplificação por PCR e sequenciação de Sanger. Foram estudados, ou está em curso o estudo, de 14 casos índice com os seguintes diagnósticos clínicos: Deficiência familiar em lipoproteína lípase (3), Lipodistrofia familiar parcial de Dunningan Tipo 2 (1), Deficiência em lípase ácida lisossomal (3), Abeta/hipobetalipoproteinemia (2), Deficiência em HDL (1), Hipertrigliceridemia autossómica recessiva (3), Sitosterolemia (1). O fenótipo clínico de cada caso índice é variável dependendo de cada condição. Foi encontrada a causa genética da doença em 8/14 doentes, estando os restantes ainda em estudo. Doentes com as várias dislipidemias raras apresentadas têm um risco acrescido de ter outras doenças graves como pancreatite, doença cardiovascular ou complicações neurológicas e devem, por esta razão, ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições.

_Abstract

Dyslipidemia is a disorder of lipid metabolism, characterized by either an increase or decrease in lipid particles. The aim of this study is to review all cases with rare dyslipidemia, studied in the National Health Institute of Portugal, presenting the most relevant clinical and molecular data. Lipid profile was determined for each index case and relatives, and molecular analysis of the genes involved was performed by PCR amplification and Sanger sequencing. This study includes 14 index cases, with the following clinical diagnoses: Familial lipoprotein lipase deficiency (3), Familial partial lipodystrophy, Dunningan Type 2 (1), Lysosomal acid lipase deficiency (3), Abeta / hypobetalipoproteinemia (2), HDL deficiency (1), Autosomal recessive hypertriglyceridemia (3), Sitosterolaemia (1). The clinical phenotype of each index case varies depending on each condition. It was possible to find the genetic cause of the disease in 8/14 patients, and the remaining are still under study. Patients with the rare dyslipidemias presented have an increased risk of having other serious disorders such as pancreatitis, cardiovascular disease or neurological complications and should, therefore, be identified as early as possible in order to minimize or prevent the adverse effects of these conditions.

_Introdução

A dislipidemia é um distúrbio do perfil lipídico, seja por elevação ou diminuição de partículas lipídicas, usualmente associadas aos triglicéridos (TGs), colesterol LDL (C-LDL) ou colesterol HDL (C-HDL) (1-3). Uma dislipidemia, para ser considerada rara, deve estar presente em menos de 1 em 2 000 pessoas, embora algumas doenças raras tenham frequentemente uma prevalência mais baixa, estimada em menos de 1 em 100 000 indivíduos (www.orpha.net/).

O Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem na sua missão estudar os determinantes biológicos associados a doenças não transmissíveis. Nesse contexto, o estudo dos determinantes associados à dislipidemia é uma das áreas de referência deste departamento, desenvolvendo investigação e prestação de serviços nesta área. Atualmente, encontram-se em curso 2 estudos nesta área: 1) o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (FH), o qual não será abordado neste artigo uma vez que a FH é considerada uma doença comum (4); 2) o Estudo de Dislipidemias Familiares Monogénicas Raras ou Poligénicas. No âmbito deste último estudo têm sido referenciados ao INSA vários casos índice e familiares com diagnóstico clínico de diferentes dislipidemias monogénicas raras ou outras patologias em que a dislipidemia é o fator clínico que desperta para a necessidade de um diagnóstico genético (tabela 1). A maioria das hiperdislipidemias e a deficiência em HDL conferem um risco cardiovascular aumentado enquanto as hipodislipidemias, como a abeta ou hipobetalipoproteinemia, podem apresentar diferentes manifestações desde má progressão ponderal a manifestações neurológicas (3,5-20).

Salientamos a existência de várias outras doenças raras acompanhadas por hiperlipidemias ou hipolipidemias como, por exemplo, a glicogenose do tipo 1, a doença de Niemann Pick tipos A e B e a síndrome de Smith Lemli Opitz. Estas doenças não são aqui abordadas por terem manifestações clínicas sugestivas e terem diagnósticos bioquímicos ou enzimáticos específicos (21–23).

_Objetivo

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão dos casos em estudo no INSA, apresentando os dados clínicos e moleculares mais relevantes.

_Material e métodos

No âmbito deste estudo foi determinado o perfil lipídico de cada caso índice e familiares, incluindo marcadores de rotina (colesterol total (CT), LDL, HDL, TGs, ApoA1, Lp(a), ApoB) e outros em investigação no nosso departamento (sdLDL, ApoA2, ApoC2, ApoC3 e ApoE). Os valores de referência recomendados pelas sociedades científicas para o perfil lipídico são: CT <200 mg/dL; LDL <130 mg/dL; HDL >40 mg/dL e TGs normal <150 mg/dL; ApoA1 >120 mg/dL; Lp(a) <50 mg/dL; ApoB <90 mg/dL (24). No que se refere aos marcadores em investigação os valores de referência recomendados pelo fabricante (Randox, Crumlin, UK) são: ApoA2 entre 25,1 e 34,5 mg/dL; ApoC2 entre 1,6 e 4,2 mg/dL; ApoC3 entre 5,5 e 9,5 mg/dL, ApoE entre 2,7 e 4,5 mg/dL e sdLDL < 35mg/dL (www.randox.com).

O estudo molecular foi realizado por amplificação de todos os exões e junções exão/intrão de cada gene indicado na tabela 1, por PCR e sequenciação pelo método de Sanger.

_Resultados

Foram estudados, ou estão em curso, os 14 casos índice com os seguintes diagnósticos clínicos: FLLD (3 casos), FPLD2 (1), LALD (3), ABL/FHBL (2), HDLD (1), ARHTG (3), STL (1).

O fenótipo clínico de cada caso índice é variável dependendo de cada condição, conforme resumido na tabela 2.

Em todos os 3 casos recebidos com diagnóstico clínico de FLLD foi encontrada uma alteração patogénica nos genes LPL (p.((Gly215Glu);(Ser286Gly))), (p.((Gly215Glu);(Gly215Glu))) e APOC2 (p.((Tyr37Asp);(Tyr37Asp))) tendo sido identificados 3 doentes e 6 portadores. O estudo molecular do caso índice com suspeita de FPLD2 também foi bem sucedido levando à identificação de uma mutação já descrita (p.(Arg482Trp)) no caso índice e 5 familiares. Foram identificados 3 casos índice e um familiar com LALD sendo que estes casos foram referenciados como casos índice ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) mas um estudo subsequente identificou a mutação mais comum no gene LIPA associada a LALD (p.((Ser275_Gln298del);(Ser275_Gln298del))). Foram recebidos para estudo 2 casos com suspeita de ABL/FHBL em que num foi possível encontrar a mutação causadora da doença, uma mutação stop no gene APOB (p. ((Trp1237*);(Trp1237*))) (25). O segundo caso com diagnóstico de ABL/FHBL, encontra-se em estudo neste momento de forma a identificar a causa genética do seu fenótipo, uma vez que o estudo molecular foi negativo para os genes APOB, MTP, SARB1B e PCSK9. Foram recebidos também 3 casos com suspeita de ARHTG em que os estudos moleculares dos genes LPL, APOC2, LMF1 e GPD1 foram negativos sendo que todos os casos ainda se encontram em estudo. O único caso recebido até à data com deficiência em HDL encontra-se ainda em estudo, bem como o caso com suspeita de STL (tabela 2).

_Discussão

Doentes com as várias dislipidemias raras apresentadas têm um risco acrescido de ter outras doenças graves como pancreatite, doença cardiovascular ou complicações neurológicas e devem, por esta razão, ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições. A identificação genética da causa da patologia, em qualquer dos casos apresentados, permitiu uma melhor e mais personalizada abordagem terapêutica com melhoria do prognóstico do doente, assim como também, um aconselhamento genético adequado, com identificação de outros familiares em risco.

Tabela 1: ⬇ Dislipidemias familiares monogénicas raras: fenótipo, genes e prevalência.

Patologia Genética	Fenótipo	Genes/ Hereditariedade	Prevalência
Deficiência familiar em lipoproteína lípase (FLLD) (OMIM-238600)	Hiperquilomicronemia e hipertrigliceridemia severas (TGs>1000 mg/dL)	<i>LPL</i> (lipoproteína lípase); <i>APOC2</i> (apolipoproteína C2) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000
Lipodistrofia familiar parcial de Dunningan Tipo 2 (FPLD2) (OMIM-151660)	Hipertrofia muscular dos membros inferiores, lipodistrofia do tronco com deposição de gordura na cara e em volta do pescoço, hiperlipidemia (valores elevados de C-LDL e TG)	<i>LMNA</i> (lâmina A/C) Hereditariedade – autossómica dominante	1/150 000
Deficiência em lípase ácida lisossomal (LALD) (OMIM-613497)	Hiperlipidemia (valores elevados de C-LDL, baixos valores de C-HDL) e esteatose microvesicular. Fenocópia da FH	<i>LIPA</i> (lípase lisossomal ácida) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/90 000 a 1/170 000
Hipertrigliceridemia autossómica recessiva (ARHTG) (OMIM-614480) (OMIM-611761) (OMIM-615947)	Níveis elevados de triglicéridos (>500 mg/dL) e baixos níveis de colesterol HDL	<i>GPIHBP1</i> (Glycosylphosphatidylinositol Anchored High Density Lipoprotein Binding Protein 1); <i>LMF1</i> (fator de maturação de lípase 1); <i>GPD1</i> (Glicerol-3-fosfato-desidrogenase 1) Hereditariedade – autossómica recessiva	Não conhecida
Abetalipoproteinemia (ABL) (OMIM-200100)/ hipobetalipoproteinemia (FHBL) (OMIM-615558)	Colesterol total, LDL e triglicéridos abaixo do percentil 5	<i>APOB</i> (apolipoproteína B) <i>MTP</i> (proteína de transferência microssomal); <i>ANGPTL3</i> (Angiopietin-Like 3); <i>SAR1B</i> (Secretion Associated, Ras Related GTPase 1B) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000
Sitosterolemia (STL) (OMIM-210250)	Elevação de fitoesteróis e sitoesteróis, bem como valores elevados de C-LDL	<i>ABCG5/8</i> (transportadores ABCG5/8) Hereditariedade – autossómica recessiva	100 casos em todo o mundo
Deficiência em colesterol HDL (HDL) (OMIM-604091)	Colesterol HDL abaixo do percentil 5	<i>APOA1</i> (apolipoproteína A1); <i>ABCA1</i> (<i>ATP binding cassette A1</i>) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000
Hipercolesterolemia autossómica recessiva (ARH) (OMIM-603813)	Hipercolesterolemia (valores elevados de C-LDL)	<i>LDLRAP1</i> (Proteína adaptadora do receptor das LDL) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000

Sendo a dislipidemia uma das áreas laboratoriais de referência do INSA e na procura da melhoria constante, encontra-se em curso a implementação de um painel de 26 genes associados a dislipidemia a serem estudados com recurso a sequenciação de nova geração (NGS). Este novo painel irá permitir uma resposta mais rápida e com uma sensibilidade e especificidade mais elevadas, a qualquer pedido de diagnóstico molecular na área da dislipidemia (26, 27). Es-

peramos brevemente com este painel conseguir identificar a mutação causadora da doença nos casos ainda em estudo e em todos os futuros casos que nos possam ser referenciados para diagnóstico; caso não seja possível por esta metodologia chegar a um resultado, deverá ser equacionado o estudo do exoma, como estudo exploratório, para identificação da causa genética da doença apresentada, bem como estudos funcionais para a comprovação da mesma.

Tabela 2: ↓ Características clínicas dos casos índice em estudo.

ID	Idade	CT	LDL	HDL	TG	Lp(a)	ApoA1	ApoB	ApoA2	ApoC2	ApoC3	ApoE	sdLDL	Tratamento	Diagnóstico clínico	Diagnóstico molecular
I	13	148,00	13,00	19,00	923,00	21,00	98,00	58,00	25,5	0,11	33,57	17,66	10,26	Não	FLLP	Gene APOC2: p.[(Tyr37Asp);(Tyr37Asp)]
II	14	139,00	*	8,00	1156,00	8,00	75,00	30,00	14,9	3,15	12,92	5,95	10,92	Não	FLLP	Gene LPL: p.[(Gly215Glu);(Ser286Gly)]
III	34	114,00	19,00	12,00	686,00	8,00	77,00	42,00	24,7	3,11	8,46	2,53	15,12	Estatinas/fibratos	FLLP	Gene LPL: p.[(Gly215Glu);(Gly215Glu)]
IV	45	141	74	47	165	2	158	61	38,7	4,23	10,94	3,66	19,44	Estatina	FLPD2	Gene LMNA: p.(Arg482Trp)
V	17	189	122	57	67	18,8	158	104	36,00	0,82	5,47	5,00	28,74	Estatina	LALD	Gene LIPA: p.[Ser275_Gln298del];[Ser275_Gln298del]
VI	28	181	135	36	98	3,6	112	115	32,10	2,20	5,54	4,53	42,82	Estatina	LALD	Gene LIPA: p.[Ser275_Gln298del];[Ser275_Gln298del]
VII	22	217	163	47	85	65,1	116	125	37,20	3,87	5,84	8,11	36,43	Estatina	LALD	Gene LIPA: p.[Ser275_Gln298del];[Ser275_Gln298del]
VIII	16	22	*	24	6	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	ABL/FHBL	Gene APOB: p.[(Trp1237*); (Trp1237*)]
IX	14	24	<0,10	22	5	9,0	49,0	10,0	11,7	0,05	0,34	2,44	2,50	Não	ABL/FHBL	Em estudo
X	42	73	46	3	158	<8,3	10	91	**	**	**	**	**	Não	HDL	Em estudo
XI	11	147	41	17	736	39	93	64	21,2	7,12	9,97	4,64	19,69	Estatinas/fibratos	ARHTG	Em estudo
XII	3	116,00	23,00	21,00	536,00	8,00	139,00	45,00	29,2	11,79	19,98	6,42	18,03	Não	ARHTG	Em estudo
XIII	1	205	92	42	599	<8,3	163,0	111	**	**	**	**	**	Fibratos	ARHTG	Em estudo
XIV	4	329	265	32	89	78,6	99,0	208,0	17,60	3,94	4,73	4,87	51,64	Estatinas	STL	Em estudo

Idade (anos); IMC – índice de massa corporal (Kg/m²); CT – colesterol total (mg/dL); LDL – lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); HDL – lipoproteína de alta densidade (mg/dL); TG – triglicéridos (mg/dL); Lp(a) – lipoproteína (a) (mg/dL); ApoA1 – apolipoproteína A1 (mg/dL); ApoB – apolipoproteína B (mg/dL); ApoA2 – apolipoprotein A2 (mg/dL); ApoC2 – apolipoproteína C2 (mg/dL); ApoC3 – apolipoproteína C3 (mg/dL); ApoE – apolipoproteína E (mg/dL); sdLDL – lipoproteína de baixa densidade pequenas e densas; * Impossível determinar por motivos técnicos; ** Não determinado.

_Conclusão

Segundo o Plano Nacional de Saúde Infantil e Juvenil (28), é recomendado que todas as crianças antes dos 10 anos de idade realizem a caracterização do seu perfil lipídico. Uma vez que, em todos os casos apresentados, a dislipidemia apresenta-se desde a infância, se a circular normativa fosse cumprida, estas crianças seriam identificadas em idade precoce, aumentando a possibilidade de prevenir as doenças graves associadas a cada uma das condições referidas. A identificação da etiologia de cada dislipidemia é importante para a implementação da correta abordagem terapêutica uma vez que a mesma depende da via metabólica afetada. A utilização dos novos biomarcadores bioquímicos diferenciados determinados no INSA permitirá uma melhor estratificação do diagnóstico molecular contribuindo para uma medicina mais personalizada. Para a maioria das condições referidas já há terapêutica farmacológica; noutros casos estão em curso ensaios clínicos como, por exemplo, visando aumentar o HDL, utilização de enzimas deficientes ou a leptina no caso de algumas lipodistrofias (29, 30). Todos estes avanços no conhecimento científico referentes ao um melhor diagnóstico e/ou novas terapêuticas irão melhorar o prognóstico do doente.

Referências bibliográficas:

- (1) Bourbon M, Rato Q. Lipoproteínas, genética e aterosclerose. *RFML*. 2006;11(2):67-73.
- (2) Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):109-21.
- (3) Johansen CT, Hegele RA. Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(4):247-53.
- (4) Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Mutational analysis of a cohort with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia: considerations for genetic diagnosis improvement. *Genet Med*. 2016;18(4):316-24. Epub 2015 May 28.
- (5) Gotoda T, Yamada N, Kawamura M, et al. Heterogeneous mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial lipoprotein lipase deficiency. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1856-64. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295753/
- (6) Maily F, Palmén J, Müller DP, et al. Familial lipoprotein lipase (LPL) deficiency: a catalogue of LPL gene mutations identified in 20 patients from the UK, Sweden, and Italy. *Hum Mutat*. 1997;10(6):465-473.
- (7) Brunzell JD. Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. (eds). *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. [consult. 29/1/2015] www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/
- (8) Gilbert B, Rouis M, Griglio S, et al. Lipoprotein lipase (LPL) deficiency: a new patient homozygote for the preponderant mutation Gly188Glu in the human LPL gene and review of reported mutations: 75 % are clustered in exons 5 and 6. *Ann génétique*. 2001;44(1):25-32.
- (9) Emi M, Hata A, Robertson M, et al. Lipoprotein lipase deficiency resulting from a nonsense mutation in exon 3 of the lipoprotein lipase gene. *Am J Hum Genet*. 1990;47(1):107-11. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683742/pdf/ajhg00091-0111.pdf
- (10) Vantyghem MC, Pigny P, Maurage CA, et al. Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5337-46.
- (11) Vantyghem MC, Balavoine AS, Douillard C, et al. How to diagnose a lipodystrophy syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012;73(3):170-89.
- (12) Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, et al. Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis*. 2014;235(1):21-30.
- (13) Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ*. 2007;176(8):1113-20.
- (14) Welty FK. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(3):161-68.
- (15) Assmann G, Smootz E. High density lipoprotein infusion and partial plasma exchange in Tangier disease. *Eur J Clin Invest*. 1978;8(3):131-35.
- (16) Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest*. 1974;53(4):1033-43. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC333088/
- (17) Genest J, Libby P, Gotto AMJ (eds). *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 2005.
- (18) Scott SA, Liu B, Nazarenko I, et al. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E85J mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology*. 2013;58(3):958-65. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690149/
- (19) Soutar AK, Naoumova RP. Autosomal recessive hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med*. 2004;4(3):241-8.
- (20) Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272(2):185-96. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940136/
- (21) Joshi M, Eagan J, Desai NK, et al. A compound heterozygous mutation in GPD1 causes hepatomegaly, steatohepatitis, and hypertriglyceridemia. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(10):1229-32. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4169545/
- (22) Schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(2):237-47. Epub 2014 Oct 16.
- (23) Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Crick PJ, et al. Sterols and oxysterols in plasma from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016. pii: S0960-0760(16)30064-4. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076016300644
- (24) European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al.; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011;32(14):1769-818. http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/32/14/1769.long
- (25) Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, et al. Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinaemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet*. 2008;74(3):267-73.
- (26) Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res*. 2014;55(4):765-72. www.jlr.org/content/55/4/765.long
- (27) Futema M, Plagnol V, Li K, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *J Med Genet*. 2014;51(8):537-44.
- (28) Direção-Geral da Saúde. Norma nº 010/2013, de 31 de maio. Plano Nacional de Saúde Infantil e Juvenil. www.dgs.pt/directrices-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0102013-de-31052013.aspx
- (29) Brinton EA, Kher U, Shah S, et al. Effects of anacetrapib on plasma lipids in specific patient subgroups in the DEFINE (Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib) trial. *J Clin Lipidol*. 9(1):65-71.
- (30) Burton BK, Balwani M, Feillet F, et al. A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;373(11):1010-20.

ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Quadrimestral

_ ISSN: 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

_ Numeração: 2ª série

Volume 5, número especial 7 2016
Doenças Raras

_ 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
Luciana Costa, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis
Jorge Machado, Departamento de Doenças Infecciosas
Manuela Caniça, Conselho Científico do INSA
Manuela Cano, Departamento de Saúde Ambiental
Peter Jordan, Departamento de Genética Humana
Silvia Viegas, Departamento de Alimentação e Nutrição

_ Coordenação técnica *Elvira Silvestre*, Biblioteca da Saúde

_ Composição e paginação *Francisco Tellechea*, Biblioteca da Saúde
(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2016.

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

Fax: (+351) 217 529 400

E-mail: info@insa.min-saude.pt

www.insa.pt