

Instituto Nacional de Saúde
www.insa.pt

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA)

**Departamento de Genética Humana
Do Diagnóstico à Investigação**

M. Rosário Rodrigues
m.rosario.rodrigues@insa.min-saude.pt

Instituto Nacional de Saúde | 1899 | www.insa.pt

Instituto Ricardo Jorge – 3 Unidades Operativas

- em Lisboa, Sede
- **Centro do Porto** (Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira)
- **Centro de Águas de Moura** (Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac).

Organizado, em termos técnico-científicos, em seis grandes departamentos

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA)

- Organismo Público
- Tutela do Ministério da Saúde.
- Fundado em **1899**, então como **Instituto Central de Higiene**, "com a competência técnica e profissional do exercício de saúde sanitária"

(1858–1939)

Tripla missão (desenvolve):

- Laboratório do Estado no Setor da Saúde
- Laboratório Nacional de Referência
- Observatório Nacional de Saúde

<http://www.insa.min-saude.pt/category/institucional/o-instituto/#sthash.dDLV7zd.dpuf>

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA)

- * Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN)
- * Departamento de Doenças Infecciosas (DDI)
- * **Departamento de Epidemiologia (DEP)**
- * **Departamento de Genética Humana (DGH)**
- * Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS)
- * Departamento de Saúde Ambiental (DAS)

<https://www.insa.min-saude.pt/category/institucional/organizacao/>

Quem foi Ricardo Jorge?

Ricardo de Almeida Jorge (Porto, 1858-Lisboa, 1939) foi um médico, investigador, higienista, professor de Medicina, escritor e pioneiro em Portugal das modernas técnicas e conceitos de saúde pública, exercendo diversos cargos na administração da saúde e conseguindo uma importante influência política.

Consagrou-se em **1899** ao atuar epidemiologicamente sobre a **peste bubónica** que nesse ano assolou a cidade do Porto, (Câmara Pestana, confirmou bacteriologicamente esta peste).

As medidas sanitárias e de higiene pública que desenvolveu, desencadearam a fúria popular, implicou a sua transferência para Lisboa. Aqui após vários cargos, em 1903, foi incumbido de organizar e dirigir o **Instituto Central de Higiene**, que passaria a ter o seu nome a **partir de 1929** e é hoje o **Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)**.

Departamento de Genética Humana

Sede: Lisboa

O Centro de Genética Humana foi fundado em 1975 como laboratório de citogenética, expandindo-se posteriormente para outras áreas da **investigação e do diagnóstico de doenças genéticas**.

CSPGF: Porto

Departamento de Genética Humana

- O DGH desenvolve atividades de Diagnóstico, Investigação e Desenvolvimento, Prestação de Serviços Diferenciados, Referência, Difusão da Cultura Científica, Formação e Observatório de Saúde em:

Estudo de Doenças Genéticas (incluindo Dças Raras), Genómica Funcional e Genotoxicidade Ambiental
- Os seus principais objetivos são:**
 - ✓ Desenvolver projetos de I&D em Genética Humana;
 - ✓ Prestar serviços de diagnóstico laboratorial de doenças genéticas (**testes genéticos**);
 - ✓ Colaborar com as universidades na formação profissional e formação pré- e pós-graduada bem como na difusão de cultura e conhecimento.

Quantas pessoas presentes nesta sala já fizeram um teste genético?

- Nenhuma
- Menos de metade
- Mais de metade
- Todas

10

Departamento de Genética Humana

Recursos humanos por carreira

Carreira	Porcentagem
Boateiros, estagiários e voluntários	30%
Investigação Científica	8%
Médica Hospitalar	4%
Técnica Superior de Saúde=Técnica superior	25%
Auxiliar	7%
Administrativa	6%
Técnico de diagnóstico e terapêutica	20%
Enfermagem	2%

Dados não atualizados

Testes genéticos ao longo da vida

Diagnóstico pré-natal: Citogenética, Genética molecular, Bioquímica genética

Rastreio Neonatal: Rastreio Neonatal de todos os recém-nascidos em Portugal

Diagnóstico clínico ao longo do desenvolvimento: Fibrose Quística, Hemoglobinopatias, Trombose e Hemostase

Envelhecimento: Hipertensão, Cancro

Identificação de portadores e de casais com risco acrescido / Aconselhamento Genético: Infertilidade masculina, Patologias do desenvolvimento sexual

Diagnóstico pré-sintomático: Hemocromatose Hereditária, Polineuropatia Amiloidótica Familiar, Cancro colorretal, Cancro da mama

Departamento de Genética Humana em Números

Rastreio Neonatal de todos os recém-nascidos em Portugal

Realização de ~6.000 testes genéticos (citogenética, genética molecular e genética bioquímica) / ano

3 estágios formação avançada (Internato complementar de Genética Médica ou Hematologia, Técnico Superior de Saúde, ...) / ano

5 doutoramentos / ano e vários Mestrados

Tem em curso 30 projetos de I&D / ano

Sequenciação e genotipagem de cerca de 37.000 amostras / ano

Em média publica 40 artigos em revistas internacionais e 10 em revistas nacionais anualmente

Oferta de estudo genéticos para mais de 200 doenças raras

Departamento de Genética Humana


Unidade de Citogenética (UCI)

Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética Bioquímica (URN)

Centro Gonçalves Ferreira
Porto
1979(2)
2004 (25)

DIAGNÓSTICO PRECOCE
PROGRAMA NACIONAL
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DOUTOR RICARDO JORGE
CENTRO DE SAÚDE PÚBLICA DR. GONÇALVES FERREIRA

Departamento de Genética Humana
Chega uma amostra com um pedido de Estudo Genético ... e agora?



...Agora! Será encaminhado para a unidade correspondente

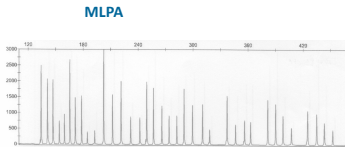
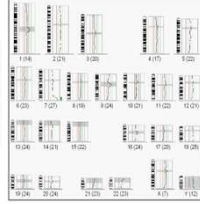
Vai depender:

- ✓ da amostra
- ✓ da história clínica
- ✓ da prévia orientação para um diagnóstico
- ✓ se caso index ou estudo familiar
- ✓ Ou mesmo se um estudo alargado por falta de prévia suspeita de diagnóstico

Unidade de Citogenética (UCI)


Alterações Cromossómicas: Citogenética Molecular

Hibridação Genómica Comparativa (CGH)

Unidade de Citogenética (UCI)

- Estudos cromossómicos na população e no feto (Diagnóstico Pré-Natal de Anomalias Cromossómicas);
- Estudos cromossómicos neoplasias (tumores sólidos e doenças hematológicas malignas);
- Análise molecular rápida de aneuploidias → permite uma tomada de decisão terapêutica mais precoce;
- Estudos citogenética molecular que contribuem para uma caracterização mais precisa em rearranjos complexos e subtis

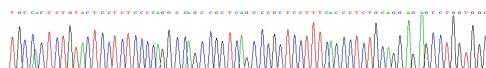


Unidade de Genética Molecular (UMO)

Realizar testes genéticos de base molecular em diferentes doenças genéticas,
 Encontrar alterações moleculares para o diagnóstico de várias doenças: Variados genes, (Ex: Fibrose Quística, Hemoglobinopatias, Hemofilia, Cancro, Infertilidade, etc.

Período: pré-natal, pós-natal

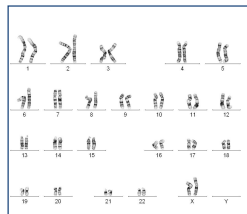
Testes: de apoio ao diagnóstico clínico, preditivos, de rastreio populacional



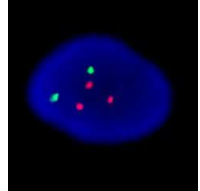
Unidade de Citogenética (UCI)

Alterações Cromossómicas: Citogenética convencional e/ou Citogenética Molecular

Citogenética Clássica Cariotipo



Hibridação in situ (microscopia fluorescência) (FISH)

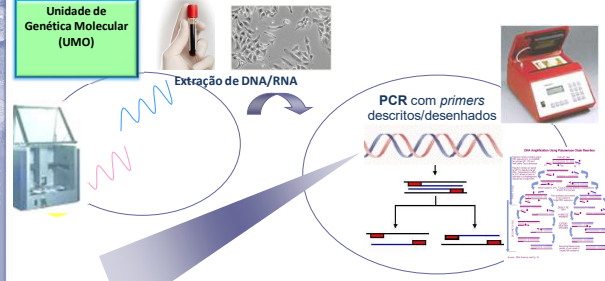


Célula com 3 cromossomas 21

Unidade de Genética Molecular (UMO)

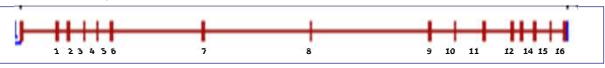
Extração de DNA/RNA

PCR com primers descritos/desenhados



Amplificação Exões e regiões flangeadoras

Gene MSH2



Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI)

Da Sequenciação de Sanger à sequenciação de nova geração (NGS)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 18, No. 18, pp. 5497-5501, December 18, 2007

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
DNA polymerase/nucleotide sequence/heteroduplex #3174
 F. SANGER, S. NICKLEN, AND A. R. COULSON
National Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 2QJ, England
 Contributed by F. Sanger, October 5, 1977

LETTERS
 Wheeler DA (2008) Nature 452: 872

The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing
David A. Wheeler¹, Matthew Strassman², Michael Egholm³, Yeming Ding⁴, Le Chen⁵, Amy McEwen⁶, David Ho⁷, Ujjwal Kapadia⁸, Chirag Behera⁹, Aron Green¹⁰, David Wang¹¹, Yueshen Wang¹², Glenn Tompa¹³, Jonathan Turner¹⁴, James E. Voigt¹⁵, Yong Chen¹⁶, Jeffrey Wang¹⁷, Paul A. McEwen¹⁸, Lorenza Novaretti¹⁹, Sang Chul Cho²⁰, David M. Abney²¹, Marcel Margulies²², George M. Weinstock²³, Richard A. Gibbs²⁴, & Jonathan A. Eisenberg¹

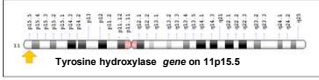
Genoma de James D. Watson, co-autor do modelo de dupla hélice da estrutura do DNA e prémio nobel da fisiologia ou medicina em 1962

- Sequenciado em 2 meses com uma cobertura média de 7.4x, utilizando o Genome Sequencer FLX (454 Life Sciences)
- Comparação com a sequência de referência revelou a presença de 3.3 milhões de SNPs
- 2005 NGS (seq 2ª geração)
- 2021 Genoma Humano

Metzker ML (2010) Nature Reviews Genetics 11: 31

25

- Dopa-responsive dystonia (DRD) is a rare movement disorder associated with defective dopamine synthesis. This impairment, if due to a primary deficiency, may have at least four genes at its origin. Differential diagnosis is made through detailed clinical assessment, analysis of cerebrospinal fluid (CSF) neurotransmitter metabolite patterns and molecular investigation to confirm the diagnosis.¹
- Among DRDs is tyrosine hydroxylase deficiency (THD), a rare autosomal recessive and treatable neurometabolic disorder. Worldwide, less than 100 cases have been reported.²
- Tyrosine hydroxylase [TH, encoded by *TH* gene (OMIM 191290)], converts L-tyrosine to L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa).^{3,4}



28

DOPA-RESPONSIVE DYSTONIA: A FUNCTIONAL SPLICING STUDY IN THE FIRST CONFIRMED CASE OF TYROSINE HYDROXYLASE DEFICIENCY IN PORTUGAL

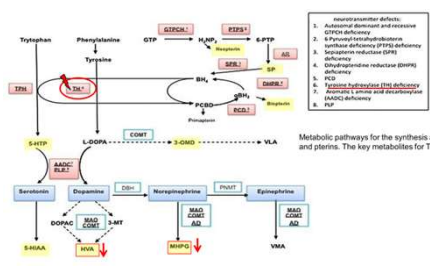
Rodrigues MR^{1,2,3}, Marecos C⁴, Duarte ST⁴, Theisen P¹, Artuch R⁵, Romão L^{1,3}, Gonçalves V^{1,3}, Gonçalves J^{1,6} and David S^{1,7}

¹ Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa.
² Faculdade Clínica - Lab. Biogenética Genética/Farmacogenética Especial, Hosp. D. Estefânia, Unidade Local de Saúde São José, Lisboa.
³ Serviço Neuropediátrico, Hospital D. Estefânia, CNIC, Lisboa.
⁴ Department of Clinical Biochemistry, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, and CERER de Enfermetats Rares (CERER), Barcelona, Spain.
⁵ Center for Toxicogenomics and Human Health, Nova Medical School, Lisbon, Portugal.
⁶ Instituto de Investigação do Medicamento (IMed ULisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

SSIEM, REPÚBLICA PORTUGUESA, SNS SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE, BICLISI, CENTRO HOSPITALAR DE LISBOA CENTRAL, MED

M Rosário Rodrigues

The Biochemical diagnosis in the THD is made through the study of the CSF and yours biochemical markers.



Metabolic pathways for the synthesis and catabolism of monoamines and pterins. The key metabolites for THD and respective enzyme are marked as red.

29

DOPA-RESPONSIVE DYSTONIA: THE FIRST CONFIRMED CASE OF TYROSINE HYDROXYLASE DEFICIENCY IN PORTUGAL

M Rosário Rodrigues

Case report and laboratorial investigation

Case report: 32-month-old girl, the first child of non-consanguineous parents, born at term and normal delivery. She was admitted at 6 months of age with sudden onset of episodes of global dystonia. On physical exam she presented global hypotonia with poor movements and lack of cervical control, tremors, hyperreflexia in the lower limbs and developmental delay. Without signs of parkinsonism or dysautonomia. Normal brain MRI.

Low dose L-Dopa was introduced during admission.

30

Case report and laboratorial investigation

- CSF study showed accented reduced HVA, MHPG and HVA/5-HIAA ratio, with normal serotonergic pathway. The other metabolites including sepiapterin were normal (Table 1).

(note: for proper data interpretation, it is important to collect the CSF sample after a strict protocol)

Metabolites	Patient	Reference range (nM)
HVA	70	(478-895)
3-OMD	104	(20-162)
MHPG	7.5	(30-124)
5-HIAA	312	(231-618)
5-HTP	17.2	(2.7-26)
HVA/5-HIAA ratio	0.2	(1.3-3.1)
Neopterin	13	(9-34)
Biopterin	53 and 34	(12-44)
Sepiapterin	Not detectable	0
SMTHF	112	(68-154)

Abbreviations: HVA = Homovanillic acid; 3-OMD = 3-Orthomethyl Dopac; MHPG = Methyl-3-hydroxyphenylethylamine; 5-HIAA = 5-Hydroxyindoleacetic acid; 5-HTP = 5-Hydroxytryptophan; SMTHF = 5-Methyltetrahydrofolate.

Molecular Genetic Studies

- In silico analysis of the 43-bp deletion in the TH gene.

pre-mRNA

Case report and laboratorial investigation

HPLC chromatograms of the CSF neurotransmitters profile. The index case shows a pattern suggestive of THD.

Metabolites	Patient	Reference range (nM)
HVA	70	(478-895)
3-OMD	104	(20-162)
MHPG	7.5	(30-124)
5-HIAA	312	(231-618)
5-HTP	17.2	(2.7-26)
HVA/5-HIAA ratio	0.2	(1.3-3.1)
Neopterin	13	(9-34)
Biopterin	53 and 34	(12-44)
Sepiapterin	Not detectable	0
SMTHF	112	(68-154)

Molecular Genetic Studies

- Genetic testing of the proband's healthy parents revealed that both are carriers of a TH variants, c.698G>A (paternal in origin) and 43-bp deletion (maternal in origin).

Molecular Genetic Studies

- A first molecular genetic analysis revealed a single heterozygous pathogenic variant in the TH gene, c.698G>A, p.(Arg233His).
- The MLPA for studying gene copy number variations (CNVs) associated with disease, was normal. (Kit from MRcHolland)
- Exome sequencing (NGS) was later performed and an additional previously undescribed 43-bp deletion was identified, TH: c.1071-1_1112del.

Complementary Genetic Studies and Research

- Since the TH gene is mainly expressed in the brain and adrenal medulla, we are currently evaluating the functional consequences of the novel deletion using a splicing minigene reporter assay (ongoing).

Departamento de Genética Humana História

- Realizou o **primeiro diagnóstico pré-natal citogenético em Portugal**
- Foi o **primeiro** laboratório em Portugal a **introduzir testes moleculares** para algumas doenças genéticas tais como as Hemoglobinopatias, a Fibrose Quística ou diversas patologias do desenvolvimento sexual (incluindo a infertilidade masculina).
- O DGH destaca-se ainda pelo seu **caráter inovador** - disponibilização de **novas tecnologias para o diagnóstico de doenças genéticas** (sequenciação convencional e de nova geração (NGS), dHPLC, arrays, MALDI TOFF – proteómica, FISH, MLPA, LC-MS/MS, etc.
- Atualmente realiza quase **100.000 testes genéticos por ano**, incluindo o rastreio de todos os recém-nascidos em Portugal
- Foi o **primeiro** laboratório em Portugal a **obter acreditação para diversos testes genéticos** no âmbito da norma internacional NP EN ISO 15189.

IFAC
INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO
ISO 15189
Exame 02/2019

Departamento de Genética Humana
OBRIGADA!

Departamento de Genética Humana

- Unidade de Citogenética (UCI)
- Unidade de Genética Molecular (UMG)
- Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI)
- Unidade de Rastreio Pré-natal, Metabolismo e Genética (URMG)
- Unidade de Investigação e Desenvolvimento (UID)
- Unidade de Apoio Técnico e Gestão (UAG)

Talvez um futuro para ti!
 Clica no link!

Aprende e divulga!

YouTube : GenAnimatEd_ A Genética Animada