

## **Contribuições do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para o controlo das Doenças Raras**

*Contributions of the Human Genetics Department of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge for the control of Rare Diseases*

Glória Isidro, Hildeberto Correia, João Lavinha, João Gonçalves, Luís Vieira, Laura Vilarinho

gloria.isidro@insa.min-saude.pt

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

### **\_Resumo**

As doenças raras são caracterizadas por uma grande diversidade de sinais e sintomas que variam não só de doença para doença, mas também entre doentes que sofrem de uma mesma patologia. As doenças raras afetam não apenas os indivíduos doentes, mas também têm grande impacto nas famílias, amigos, cuidadores e na sociedade em geral. 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. As doenças raras são um problema de saúde pública reconhecido pela Comissão Europeia e pela Organização Mundial da Saúde <sup>(1)(2)</sup>. O atraso no diagnóstico pode significar que se desperdiçou a oportunidade de uma intervenção atempada enquanto um diagnóstico correto poderá revelar a existência de uma doença rara subjacente não suspeitada. Neste trabalho pretende-se dar a conhecer as contribuições efetivas a nível nacional do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, I.P.), para o Serviço Nacional de Saúde (SNS) na investigação, diagnóstico, prevenção e controlo das doenças raras, realizadas no Departamento de Genética Humana (DGH) desde 1975.

### **\_Abstract**

Rare diseases are characterized by a wide range of signs and symptoms that vary not only from disease to disease but also among patients suffering from the same clinical condition. Rare diseases not only affect sick individuals, but also have a major impact on families, friends, caretakers and society. Early diagnosis and evidence-based initiation of treatment are important factors in reducing the impact of a rare disease on adulthood. Rare diseases are a public health issue recognized by the European Commission and by the World Health Organization <sup>(1)(2)</sup>. A delay in diagnosis may represent that an opportunity was missed for a timely intervention whereas a correct diagnosis may reveal the existence of a rare unsuspected underlying disease. The aim of this work is to present the effective contributions of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge to the National Health System in the context of research, diagnosis, prevention and control of rare diseases, which have been performed since 1975 in the Human Genetics Department.

### **\_Introdução**

As doenças raras são numerosas, de natureza heterogénea e geograficamente diferentes. Estas doenças são raramente evitáveis ou curáveis, a maioria tem uma evolução crónica e muitas resultam em morte prematura. Apesar da sua heterogeneidade, os doentes raros partilham pontos comuns relacionados com a raridade da doença, o que exige uma abordagem abrangente de saúde pública. Os desafios decorrentes da baixa prevalência, falta de conhecimento e escassez de especialização clínica e laboratorial, bem como a sua natureza crónica, degenerativa e com risco de vida, levaram as doenças raras a emergir como uma prioridade de saúde pública na Europa <sup>(3)</sup>.

Na Europa, uma doença é considerada rara quando afeta menos do que uma em 2000 pessoas. No total os doentes raros perfazem cerca de 30 milhões de cidadãos da União Europeia, ou seja, 6% a 8% da população em que 50% destes são crianças.

Das mais de 6000 doenças raras, 80% são de origem genética sendo caracterizadas por uma grande diversidade de fenótipos e gravidade variável. Dada a sua natureza incapacitante, têm também forte impacto na família (por exemplo, a nível social, económico, reprodutor) e na sociedade exigindo apoios em múltiplas áreas (ensino, saúde, formação profissional, transportes, etc.). Um dos problemas do doente raro é a ausência de um diagnóstico ou um diagnóstico incorreto da sua doença, sendo que o diagnóstico e o tratamento precoces são fatores determinantes na redução do impacto da doença na vida adulta.

Em Portugal, a situação das doenças raras não é completamente conhecida dada a inexistência de um registo único

adequado a estas doenças, bem como o reduzido número e extensão dos estudos epidemiológicos realizados até à data.

Desde 1975 que o DGH do INSA, I.P., tem contribuído de forma efetiva em matéria de controlo das doenças raras no SNS através da investigação, formação, e de um investimento constante e progressivo na disponibilização de novos testes genéticos de apoio à clínica. Neste Departamento são realizados atualmente testes genéticos para mais de 500 doenças raras (Figura 1), assumindo-se como o maior Laboratório de Genética Humana do sector público nacional para o diagnóstico laboratorial de patologias genéticas. No âmbito da sua política de desenvolvimento e qualidade, é acreditado desde 2014 pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) no âmbito da norma NP EN ISO 15189 (4) para vários testes genéticos, assegurando assim uma oferta de elevada qualidade e de acordo com critérios e recomendações internacionais. O DGH é o laboratório de referência em Portugal da *International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma* (SIOPEN) e do rastreio neonatal metabólico (através do Programa Nacional do Rastreio Neonatal - PNRN). Ainda no âmbito da qualidade, tem colaborado no desenvolvimento de legislação específica para o licenciamento de laboratórios que executam testes de genética médica em Portugal (5) de acordo com as melhores práticas, bem como na elaboração de orientações internacionais (6).

O objetivo primordial do diagnóstico é o tratamento específico e atempado, quando possível, e o aconselhamento genético do paciente e da família (Figura 2). Como exemplo, temos o PNRN cujo principal objetivo é o de rastrear e diagnosticar, nas primeiras semanas de vida, as patologias que fazem parte do painel das 26 doenças que, uma vez identificadas, permitem o tratamento precoce e evitam a ocorrência de atraso mental, de doença grave irreversível ou a morte da criança. Junto do DGH funcionam a Comissão Técnica Nacional e a Comissão Executiva do PNRN, a Comissão Coordenadora do Tratamento das Doenças Lisossomais de Sobrecarga e o Registo Português de Paramiloidose.

No campo das doenças raras é também importante consciencializar o público em geral, os profissionais de saúde e os tomadores de decisão sobre estas doenças e o seu impacto

social, além das consequências diretas na saúde dos próprios indivíduos afetados.

O doente raro, mas também os profissionais de saúde, enfrentam diversos problemas éticos estando estes geralmente relacionados com a disponibilidade de um diagnóstico clínico,

Figura 1: ⬇ Testes genéticos em doenças raras.

Disponibilização de testes genéticos de:
Citogenética, incluindo citogenética molecular
Genética molecular
Genética bioquímica
Para >500 doenças raras, exemplos
■ Cancro hereditário (mama/ovário e colorretal)
■ Cancro raro (neuroblastoma)
■ Cromossomopatias
■ Doenças do desenvolvimento sexual
■ Doenças hemorrágicas hereditárias
■ Doenças hereditárias do metabolismo
– Doenças mitocondriais
– Doenças Lisossomais de Sobrecarga
– Doenças peroxissomais
– Aminoacidopatias
– Acidúrias orgânicas
– Doenças da $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos
– Doenças dos neurotransmissores
– Doenças do metabolismo da creatina
– Doenças do ciclo da carnitina
– Defeitos congénitas da glicosilação
– Galactosemias
– Glicogenoses hepáticas e musculares
– Doenças do metabolismo do colesterol
– Ceroide Lipofuscinoses
– Porfirias
■ Fibrose quística
■ Hemoglobinopatias
■ Hemocromatose hereditária
■ Infertilidade masculina
■ Fatores genéticos de risco trombótico
■ Malignidade hematológica
■ Polineuropatia Amiloidótica Familiar
■ Trombofilias hereditárias

a abordagem desigual nos cuidados de saúde, os serviços sociais inadequadamente preparados, bem como a indisponibilidade de terapia e de medicamentos órfãos (7).

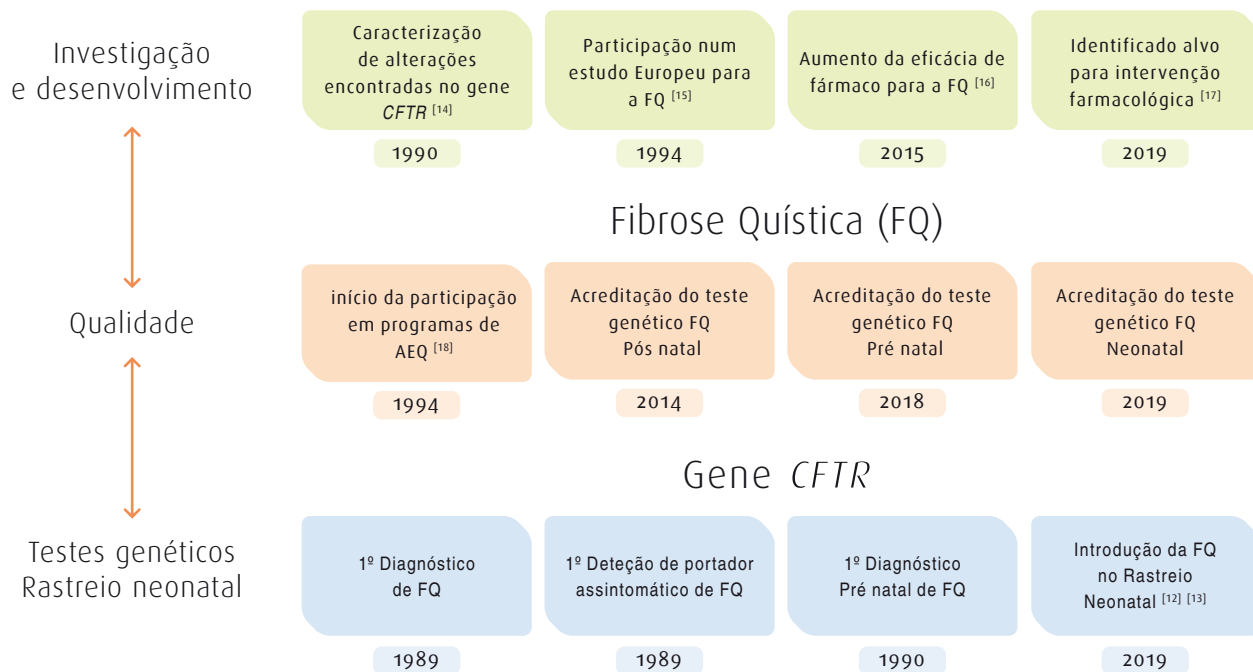
Figura 2: ↓ O DGH Interliga a hipótese de diagnóstico clínico inicial com a investigação e desenvolvimento (implementação de tecnologia e/ou caracterização estrutural e funcional de novas variantes genéticas) e com a disponibilização do teste genético para confirmação do diagnóstico.



## \_Métodos

O DGH aplica metodologias de epidemiologia, genética médica, citogenética/citogenética molecular, genética bioquímica, genética molecular e celular, quer em diagnóstico pré-natal, neonatal e pós-natal. Estas metodologias são utilizadas de forma integrada por pessoal técnico e científico especializado, trabalhando geralmente em equipas multidisciplinares. De forma a estudar anomalias cromossómicas constitucionais são utilizadas diferentes abordagens como por exemplo citogenética convencional, *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH), *Multicolor-Fluorescent In Situ Hybridization* (M-FISH), e *microarrays*, os quais também permitem detetar perdas de heterozigotia. Os métodos da genética molecular humana são aplicáveis ao diagnóstico de diferentes doenças raras e à investigação das mesmas, incluindo patologias com componente genética de suscetibilidade ou predisposição. Neste âmbito, as técnicas de sequenciação e genotipagem de DNA são amplamente utilizadas, sendo o DGH dotado de equipamento de ponta contando com dois equipamentos automatizados de capilares para sequenciação de Sanger e três plataformas de sequenciação de nova geração. Ao longo dos anos, as atividades de investigação e desenvolvimento realizadas no DGH registaram uma evolução significativa, com natural reflexo na vertente de prestação de serviços especializados e na caraterização funcional de variantes da sequência de DNA com significado clínico desconhecido (Figura 3). São exemplos disto a recente implementação do teste de rastreio pré-natal não invasivo de aneuploidias no SNS e a aplicação da sequenciação na identificação das alterações cromossómicas e genómicas estruturais (8).

Figura 3: Exemplo de uma abordagem multidisciplinar a uma doença rara, a Fibrose Quística.



## \_Resultados

De 1975 a 2007 a atividade do DGH realizou-se exclusivamente no INSA em Lisboa. Em 2007, em consequência da fusão do Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães (IGMJM) com o INSA, as atividades de genética médica, genética molecular, genética bioquímica, citogenética, rastreio neonatal, e investigação foram integradas no DGH. Desde 2013, das atividades que vieram do IGMJM, apenas o rastreio neonatal, os testes de genética bioquímica associados ao mesmo e a investigação permaneceram no DGH. Todos os anos são executados no DGH mais de 6000 testes genéticos de citogenética (incluindo a citogenética molecular), genética molecular e genética bioquímica, visando o diagnóstico de indivíduos com doença genética e a prevenção (primária) da ocorrência de novos casos de doença, através da (i) identificação de portadores assintomáticos, (ii) da identificação de casais com risco acrescido de terem descendência afetada (Figuras 4, 5, 6) e (iii) do diagnóstico pré-natal (Figura 7). Por outro lado, no que diz respeito ao PNRN (que sucedeu, em 2019, ao Programa Nacional de Diagnóstico Precoce - PNDP), são processadas cerca

de 86000 amostras/ano, que correspondem a todos os recém-nascidos em Portugal.

No que diz respeito à execução de atividades de investigação e desenvolvimento de natureza epidemiológica, etiopatogénica e clínica, o DGH publica anualmente mais de três dezenas de artigos em revistas internacionais indexadas e oito em revistas nacionais. Sendo a captação de financiamento para o desenvolvimento destas atividades um aspeto essencial, e dos cerca de vinte e cinco projetos/ano do DGH, destaca-se a participação em dois projetos internacionais direcionados às doenças raras, o “EUCERD Joint Action: working for rare diseases” (2015) e o “European Joint Program for Rare Diseases” (em curso) e três projetos nacionais, o “Desvendar - DEScobrir, VENcer as Doenças rARas” financiado pelo Norte2020, o “Defeitos genéticos das doenças mitocondriais: abordagem por sequenciação de nova geração” financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e desenvolvido em colaboração com três grandes Centros Hospitalares do nosso país e o “Citogenética de próxima geração irrompe nos cuidados de saúde e contribui para a anotação do genoma humano”, financiado também pela FCT

e que contou com a cooperação da *Harvard Medical School*. Nestes projetos, a abordagem da sequenciação genómica na identificação das alterações cromossómicas e genómicas estruturais permitiu identificar a base genómica/molecular das patologias em cerca de 50% dos doentes investigados e pôr fim à “odisseia do diagnóstico” por que passam estes doentes com doença rara e seus familiares e cuidadores.

Desde há vários anos, salienta-se ainda a capacidade demonstrada na caracterização de variantes classificadas com significado clínico desconhecido. Por exemplo, foi possível classificar uma variante encontrada numa família de Polipose Adenomatosa Familiar como patogénica através de estudos complementares efetuados no DGH (9).

No DGH, a formação e sensibilização para as doenças raras tem sido efetuada através da capacitação de novos profissionais de saúde (médicos e técnicos de laboratório) e investigadores, sendo dada formação complementar especializada a

cerca de 4 estagiários por ano. Por outro lado, o apoio científico, técnico e logístico demonstrado às associações de doentes constituem também um contributo de suporte ao doente raro e seus familiares. Até à data foram assinados protocolos com a APOFEN - Associação Portuguesa de Fenilcetonúria e outras Doenças Hereditárias do Metabolismo (DHM) proteico e com a associação Raríssimas, e têm sido desenvolvidos esforços para apoiar a nova organização agregadora das associações de doenças raras.

Registam-se ainda como resultados a reflexão bioética nas vertentes assistencial e de investigação, nomeadamente através dos pareceres da Comissão de Ética para a Saúde, participação em várias outras Comissões de Ética Nacionais e a publicação do livro “Biobancos e investigação genética: orientações éticas” (10).

Na **tabela 1** resumem-se as atividades e os resultados do DGH em matéria de controlo das doenças raras no SNS.

**Tabela 1:** Resumo das atividades do controlo das doenças raras no SNS e respetivos resultados do DGH.

Atividades	Resultados do DGH
Prevenção (secundária) das complicações da doença nos indivíduos afetados, através do rastreio neonatal (o chamado “teste do pezinho”) e do diagnóstico precoce – Programa Nacional do Rastreio Neonatal	– Rastreio de todos os recém nascidos em Portugal
Realização de testes genéticos visando o diagnóstico clínico (incluindo o diagnóstico pré-sintomático), nas populações pediátrica e adulta	– Realização de aproximadamente 6000 testes genéticos/ano
Execução de atividades de investigação e desenvolvimento de natureza epidemiológica, etiopatogénica e clínica.	– Cerca de 25 projetos de I&D/ano, a maioria em doenças raras – Publicação média anual de 35 artigos em revistas internacionais e 8 em revistas nacionais
Capacitação de novos profissionais de saúde (médicos e técnicos de laboratório) e investigadores.	– Aproximadamente 4 estágios/ano
Colaboração no processo de licenciamento de laboratórios para a execução de testes de genética médica de acordo com as melhores práticas.	– Portaria 167/2014 - Licenciamento de laboratórios de genética médica – Elaboração do Manual de Boas Práticas para Laboratórios de Genética Médica
Reflexão bioética nas vertentes assistencial e de investigação, nomeadamente através dos pareceres da Comissão de Ética para a Saúde	– Participação em várias comissões de ética nacionais – Publicação “Biobancos e investigação genética: orientações éticas”
Apoio científico, técnico e logístico às associações de doentes.	– Protocolo assinado com APOFEN -Associação Portuguesa de Fenilcetonúria e outras DHM proteico – Protocolo assinado com as Raríssimas – Apoiar a nova organização agregadora das associações de doenças raras

Figura 4: Número de testes de genética molecular realizados no DGH nos últimos 10 anos com vista ao diagnóstico de indivíduos com doença genética e a prevenção (primária) da ocorrência de novos casos de doença, através da identificação de (i) indivíduos afetados (caso índice) e (ii) portadores assintomáticos.

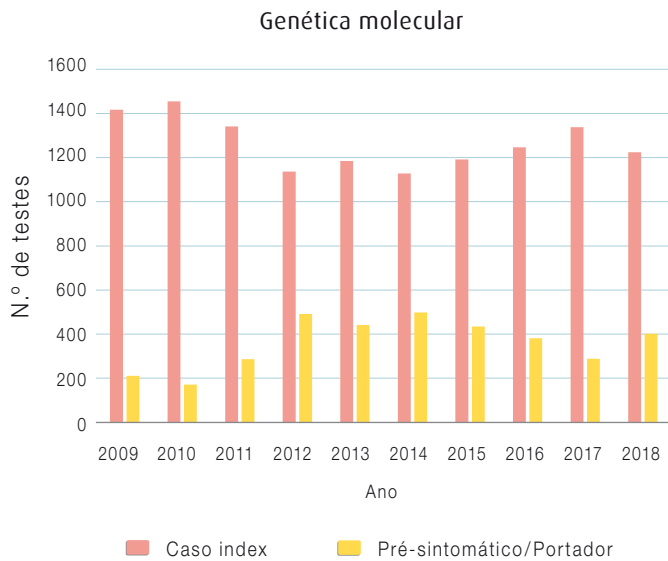


Figura 5: Número de testes de citogenética e citogenética molecular, realizados no DGH nos últimos 10 anos com vista ao diagnóstico de indivíduos no período pós-natal.

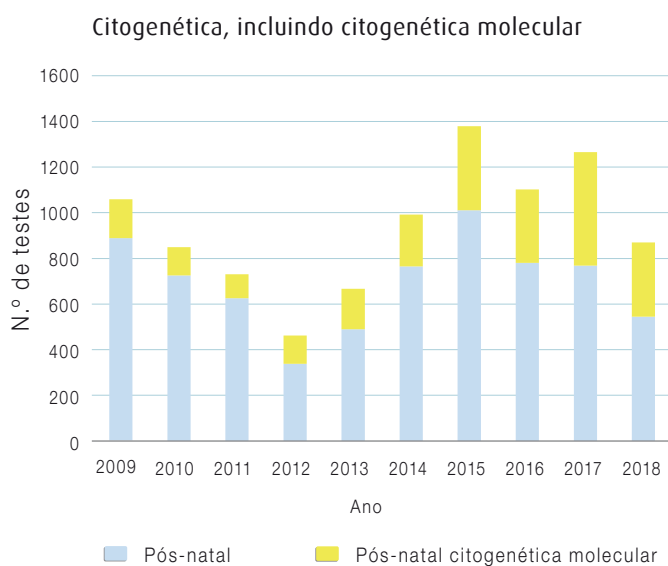


Figura 6: Número de testes de genética bioquímica realizados no DGH nos últimos 6 anos com vista ao diagnóstico de indivíduos com doença genética, à identificação de casais com risco acrescido de terem descendência afetada e à monitorização de terapêutica.

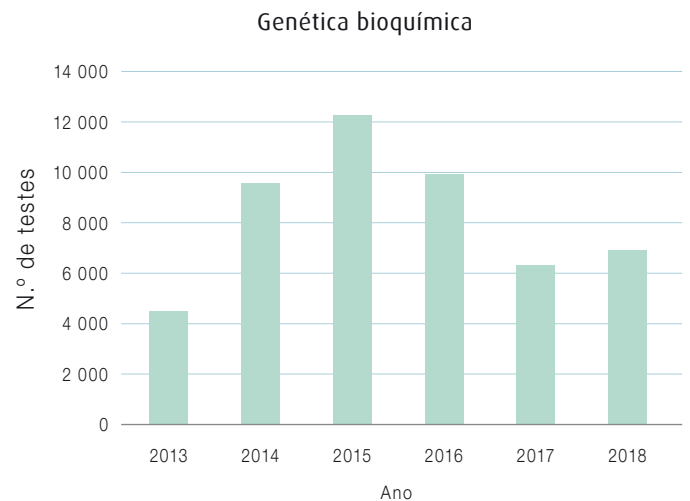
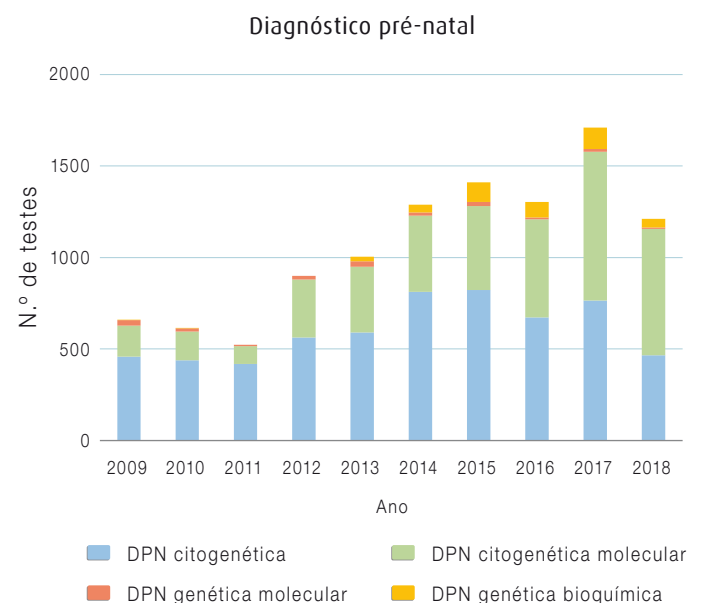


Figura 7: Número de testes de DPN realizados no DGH nos últimos 10 anos. Os DPN de genética molecular e genética bioquímica representam apenas 2-9% de todos os DPNs realizados. A partir de 2015, verifica-se um aumento do DPN de citogenética molecular em detrimento dos testes de citogenética convencional.



## \_Conclusões e perspectivas futuras

Enquanto parte integrante do INSA, IP, que se constitui como o laboratório do Estado no setor da saúde, laboratório nacional de referência e observatório nacional de saúde, o DGH aborda a doença rara de uma forma multidisciplinar (Figura 3). A sua história e desenvolvimento ao longo de quase 45 anos integram amplas e diversificadas áreas de investigação. Embora a investigação em genética humana tenha sofrido muitas mudanças no que é comumente chamado de "era pós-genómica", a sua missão principal, no que diz respeito à investigação, diagnóstico e prevenção das doenças raras no SNS não mudou, sendo o nosso objetivo prestar serviços cada vez mais diferenciados e realizar investigação científica com o mais alto padrão de excelência e relevância.

Os resultados dos testes genéticos, conjugados com o aconselhamento genético, contribuem diretamente para a prevenção da doença rara no contexto familiar e da saúde pública (populacional). Considera-se atualmente que a sequenciação do genoma humano nas suas diferentes abordagens dará um forte contributo para a identificação do defeito genético associado a diversas doenças genéticas humanas, ainda sem diagnóstico etiológico. A medicina genómica (abordagem genómica) permitirá melhorar significativamente os cuidados personalizados da genética médica. No entanto, e apesar do progresso na investigação relacionada com as doenças genéticas, em que cerca de 20% dos genes codificadores de proteínas foram positivamente associados a um ou mais fenótipos de doença até ao momento, destaca-se o enorme trabalho de investigação que ainda necessita de ser efetuado (11).

As DHM, um importante grupo das doenças raras, têm sido um foco constante de atenção relevante do DGH há mais de 40 anos e para as quais já existem no nosso país Centros de Referência para o Tratamento (Despacho n.º 3653/2016). No entanto, as doenças raras continuam a representar um grande desafio para a investigação, destacando-se por um lado o aumento da necessidade de cooperação e partilha de conhecimento e, por outro lado, a canalização de esforços em direção a mais centros de referência dedicados para desenvolver e oferecer capacitações multidisciplinares. Serão estes os desafios que teremos de enfrentar num futuro próximo?

**Agradecimento:** agradece-se às colegas Conceição Silva e Paula Pacheco a revisão da Figura 3 do artigo e ao ServiceDesk - Tecnologias de Sistemas de Informação pela extração dos dados informáticos.

**Colaboração com Unidades de Investigação:** G. Isidro – Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB); J. Lavinha – *Biosystems and Integrative Sciences Institute* (BioISI); J. Gonçalves e L. Vieira – *Centre for Toxicogenomics and Human Health* (ToxOmics).

## Referências bibliográficas:

- (1) [https://ec.europa.eu/health/non\\_communicable\\_diseases/rare\\_diseases\\_pt](https://ec.europa.eu/health/non_communicable_diseases/rare_diseases_pt) (Acedido em Novembro de 2019)
- (2) [https://www.who.int/medicines/areas/priority\\_medicines/BP6\\_19Rare.pdf](https://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_19Rare.pdf) (Acedido em Novembro de 2019)
- (3) Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, Murphy D, Le Cam Y, Rath A. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet* (2019) doi:10.1038/s41431-019-0508-0
- (4) [http://www.ipac.pt/pesquisa/ficha\\_15189.asp?ID=E0015](http://www.ipac.pt/pesquisa/ficha_15189.asp?ID=E0015)
- (5) Portaria n.º 167/2014 de 21 de agosto. Diário da República, 1.ª série – N.º 160 – 21 de agosto de 2014
- (6) Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, Rack K, Hastings R. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet*. 2019 Jan; 27(1):1-16. doi: 10.1038/s41431-018-0244-x. Epub 2018 Oct 1
- (7) Dusanka Krajnovic. Ethical and Social Aspects on Rare Diseases. *FILOZOFIJA I DRUŠTVO XXIII* (4), 2012. DOI: 10.2298/FID1204032K
- (8) David D, Anand D, Araújo C, Gloss B, Fino J, Dinger M, Lindahl P, Pöyhönen M, Hannele L, Lavinha J. Identification of OAF and PVRL1 as candidate genes for an ocular anomaly characterized by Peters anomaly type 2 and ectopia lentis. *Exp Eye Res* 168:161-170, 2018; doi: 10.1016/j.exer.2017.12.012.
- (9) Gonçalves V, Theisen P, Antunes O, Medeira A, Ramos JS, Jordan P, Isidro G. A missense mutation in the APC tumor suppressor gene disrupts an ASF/SF2 splicing enhancer motif and causes pathogenic skipping of exon 14. *Mutat Res*. 2009 Mar 9; 662(1-2):33-6. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.12.001. Epub 2008 Dec 6.
- (10) Célia Ventura. *Biobancos e Investigação Genética: Orientações Éticas*. Editora: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. Nov-2011. <http://hdl.handle.net/10400.18/1264>
- (11) Posey, J.E. Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet J Rare Dis* 14, 153 (2019) doi:10.1186/s13023-019-1127-0.
- (12) Diário da República, 2.ª série PARTE C, Despacho n.º 7276/2019. Aprova o Programa Nacional do Rastreamento Neonatal (PNRN) e determina a sua implementação pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P..
- (13) Marcão A, Barreto C, Pereira L, Guedes Vaz L, Cavaco J, Casimiro A, Félix M, Reis Silva T, Barbosa T, Freitas C, Nunes S, Felício V, Lopes L, Amaral M and Vilarinho L. Cystic Fibrosis Newborn Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies. 2018 Int. J. Neonatal Screen. 2018, 4, 22; doi:10.3390/ijns4030022.
- (14) Duarte A, Barreto C, Marques-Pinto L, Tavares MC, Amil J, Pinto M, Chieira ML, Castedo S, Lavinha J. Cystic fibrosis in the Portuguese population: haplotype distribution and molecular pathology. *Hum Genet*. 1990;85:404-5.
- (15) The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population Variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat*. 1994; 4(3):167-77.
- (16) Loureiro CA, Matos AM, Dias-Alves Â, Pereira JF, Uliyakina I, Barros P, Amaral MD, Matos P. A molecular switch in the scaffold NHERF1 enables misfolded CFTR to evade the peripheral quality control checkpoint. *Sci Signal*. 2015 May 19; 8(377):ra48. doi: 10.1126/scisignal.aaa1580.
- (17) Matos AM, Pinto FR, Barros P, Amaral MD, Pepperkok R, Matos P. Inhibition of calpain 1 restores plasma membrane stability to pharmacologically rescued Phe508del-CFTR variant. *J Biol Chem*. 2019 Sep 6; 294(36):13396-13410. doi: 10.1074/jbc.RA119.008738. Epub 2019 Jul 19.
- (18) The European Concerted Action on Cystic Fibrosis. A quality control study of CFTR mutation screening in 40 different European laboratories. *European Journal of Human Genetics*. 1995; 3(4):234-45