



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Nefrologia

Transplante Renal: Avaliação do dador vivo aparentado na Doença Renal Poliquística Autossómica Dominante

Inês Farinha Quinteiro

Orientado por:

Doutora Sara Gonçalves

Abril'2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a disponibilidade e dedicação inigualável da Doutora Sara Gonçalves. Obrigada por me ter permitido desafiar-me pessoalmente na realização deste trabalho, sempre a par do seu apoio inalcançável. Sem a sua orientação este trabalho não teria sido possível.

De seguida, deixo um agradecimento especial à minha família, em especial aos meus pais e irmã, pelo exemplo de entrega e por serem sempre o meu pilar.

Por último, agradeço aos meus companheiros desta viagem, os meus amigos. Obrigada pela motivação, pela partilha e pela companhia em todos os momentos.

Resumo

Introdução: A Doença Renal Poliquística Autossómica Dominante (DRPAD) é a etiologia da doença renal em 7 a 10% dos doentes dependentes de técnicas substitutivas da função renal (TSFR), apresentando-se o transplante renal como a TSFR que confere maior sobrevida aos doentes. Na DRPAD o estabelecimento de critérios claros para a inclusão ou exclusão de indivíduos geneticamente relacionados como potenciais dadores é dificultado pela heterogeneidade fenotípica da doença. As metodologias de sequenciação de alto débito de nova geração (*Next generation sequencing* – NGS) facilitam o diagnóstico genético, auxiliando na avaliação do potencial dador aparentado de doentes com DRPAD.

Objetivos: Desenvolvimento de um algoritmo para a avaliação do dador vivo aparentado na DRPAD que permita a exclusão de doença nestes indivíduos.

Métodos: Revisão bibliográfica através da pesquisa de artigos publicados em motores de busca tais como o *PubMed*; Investigação sobre quais os recursos disponíveis em Portugal para avaliação das alterações genéticas na DRPAD.

Resultados: Da revisão da literatura assume-se a ecografia como exame de primeira linha para a avaliação do dador vivo aparentado na DRPAD. Em indivíduos cujos resultados ecográficos não permitam a exclusão de doença devem ser realizados estudos genéticos no recetor e no dador utilizando técnicas de NGS selecionadas de acordo com o fenótipo da doença quística e ainda ponderada a realização de ressonância magnética. Foram desenvolvidos três fluxogramas para avaliação do dador vivo aparentado na DRPAD, com fenótipo típico e atípico.

Conclusões: O algoritmo construído poderá constituir um instrumento facilitador e unificador da tomada de decisão na avaliação do dador vivo aparentado na DRPAD, beneficiando não só o potencial dador e recetor, mas também o clínico.

Palavras-chave: Doença Renal Poliquística Autossómica Dominante (DRPAD); Dador vivo; Transplante Renal; Diagnóstico Genético.

O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

Abstract

Introduction: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is responsible for 7 to 10% of patients on renal function replacement techniques. Kidney Transplantation is the technique that provides patients with the longest survival. The establishment of clear criteria for the evaluation of living related donors for ADPKD patients is hampered by the phenotypic heterogeneity of this disease. New-generation high-throughput sequencing (NGS) methodologies facilitate genetic diagnosis and thus the assessment of the potential donor.

Objectives: Development of an algorithm for the evaluation of a living related donor for ADPKD patients, that allows the exclusion of the disease in these individuals.

Methods: Bibliographic review through the search of articles published in search engines such as PubMed; Research on genetic diagnostic tests for ADPKD available in Portugal through contact with reference laboratories;

Results: Based on the bibliographic review, ultrasound is the gold standard for the evaluation of the living related donor in ADPKD. In individuals whose ultrasound results cannot exclude the disease, genetic studies using NGS techniques should be performed in the recipient and the donor. The NGS techniques should be chosen according to the cystic disease phenotype. Magnetic resonance imaging should also be considered. Three flowcharts were developed to aid in the evaluation of the living related donor in ADPKD, with typical and atypical phenotype.

Conclusions: The developed algorithm presents itself as a safe tool to aid decision-making in the evaluation of a living related donor in ADPKD, allowing to overcome diagnostic challenges of the disease and benefiting not only the potential donor and recipient, but also the clinician.

Keywords: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD); Genetic Diagnosis; Kidney Donor; Kidney Transplantation;

The Final Work is the sole responsibility of its author, with FMUL not being responsible for the contents presented therein.

Índice

Resumo	3
Abstract.....	4
Lista de Tabelas, Figuras e Fluxogramas	6
Lista de Abreviaturas	7
Introdução.....	9
Objetivos	14
Metodologia.....	14
Resultados.....	16
Avaliação do Dador Vivo com História Familiar de DRPAD	16
Características genéticas da DRPAD.....	17
Mutações nos genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i>	17
Mutações noutros genes	19
Diagnóstico de DRPAD.....	20
Diagnóstico Imagiológico.....	20
Diagnóstico Genético na DRPAD.....	24
Testes Moleculares utilizados na DRPAD.....	26
Testes Moleculares disponíveis em Portugal.....	33
Proposta de abordagem no diagnóstico molecular do dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo típico	37
Proposta de abordagem inicial ao dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo atípico	41
Interpretação de resultados e avaliação do dador	42
Aconselhamento Genético.....	46
Limitações	46
Conclusão	47
Referências Bibliográficas.....	48
Anexos.....	53

Lista de Tabelas, Figuras e Fluxogramas

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Score PROPKD (*Predicting Renal Outcomes in Polycystic Kidney Disease*) e Genetic Score

Tabela 2 - Classificação da DRPAD baseada em características imagiológicas segundo a *Classificação Mayo Clinic*

Tabela 3 - *Unified Diagnostic Criteria* - Critérios ecográficos de diagnóstico e exclusão de DRPAD

Tabela 4 - Quadro comparativo entre técnicas de NGS baseadas em hibridização e LR-PCR

Tabela 5 - Testes genéticos disponíveis em Portugal na DRPAD em laboratórios nacionais de referência

Tabela 6 - Estudos genéticos analisados no diagnóstico molecular da DRPAD

Tabela 7 - Probabilidade de causalidade de acordo com o tipo de mutação.

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferenças técnicas entre NGS baseada em hibridização e LR-PCR

Lista de Fluxogramas

Fluxograma 1: Abordagem inicial ao dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo típico

Fluxograma 2: Abordagem inicial ao dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo atípico

Fluxograma 3: Abordagem ao dador vivo aparentado na DRPAD consoante a mutação identificada no recetor

Lista de Abreviaturas

ACMG/AMP - *American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology*

Angio-TC - Angiotomografia computadorizada

CNVs – Variações do número de cópias

DHPAD – Doença Hepática Poliquística Autossômica Dominante

DRC– Doença Renal Crônica

DRCT – Doença Renal Crônica Terminal

DRPAD – Doença Renal Poliquística Autossômica Dominante

DRPAR - Doença Renal Poliquística Automóssima Recessiva

GC - Guanina-citosina

HLA - Antígeno leucocitário humano

HTA – Hipertensão Arterial

ht-VRT - Volume total renal ajustado à altura

KDIGO - *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

LR-PCR - *Long Range Polymerase Chain Reaction*

MHC - Complexo Major de histocompatibilidade

MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NGS – *Next Generation Sequency*

NGS HGI - Painel de NGS baseado em hibridização de genes de interesse

NGS LR-PCR - Painel de NGS baseado em LR-PCR

pb – Pares de bases

PC1 – Policistina 1

PC2 – Policistina 2

PROPKD - *Predicting Renal Outcomes in Polycystic Kidney Disease*

RM – Ressonância Magnética

TC – Tomografia Computadorizada

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TSFR – Técnicas Substitutivas da Função Renal

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

VUS – Variante de Significado Indeterminado

WES – *Whole Exome Sequency*

WGS - *Whole Genome Sequency*

Introdução

A DRPAD é uma doença multissistémica caracterizada pelo crescimento de múltiplos quistos, particularmente a nível renal, levando à progressão para doença renal crónica (DRC) com necessidade de início de terapêutica substitutiva da função renal (TSFR) por volta da sexta ou sétima década de vida.

No que diz respeito à epidemiologia, a literatura é pouco homogénea, o que pode ser devido à expressividade variável da doença. Estudos epidemiológicos recentes revelaram uma prevalência de 3 a 5 casos por cada 10 000 pessoas (Bergmann et al., 2018). No entanto, um estudo realizado através da sequenciação do genoma completo, evidenciou uma prevalência de mutações associadas à DRPAD mais elevada do que seria expectável, na ordem dos 9,3 por 10 000 casos (Lanktree et al., 2018). Haverá, portanto, uma proporção considerável de doentes sem diagnóstico (Reiterová & Tesař, 2022). A prevalência parece ser igual em ambos os sexos mas a doença tende a ser menos grave em indivíduos do sexo feminino, que apresentam menor incidência de doença renal crónica terminal (DRT) e menor taxa de crescimento quístico (Bae et al., 2019; Harris et al., 2002).

A formação dos quistos inicia-se in útero, sendo o seu diagnóstico, por norma, apenas realizado na idade adulta (Grantham, 2008). Os quistos surgem numa minoria dos nefrónios, cerca de 1%, e caracterizam-se inicialmente por protusões focais no epitélio renal cujo crescimento depende da proliferação celular anormal, da secreção de fluido e da produção de matriz extra-celular. Embora possa afetar todo o parênquima renal, estes quistos têm frequentemente origem na região distal do nefrónio e no tubo coletor (Bergmann et al., 2018; Reiterová & Tesař, 2022).

As mutações nos genes *PKD1* e *PKD2*, que codificam a policistina-1 (PC1) e a policistina-2 (PC2) são responsáveis por 75-80% e 10-15% dos casos de doença, respetivamente (Schönauer et al., 2020). No entanto, numa minoria dos doentes as mutações causais localizam-se noutros genes.

As policistinas estão localizadas predominantemente, mas não exclusivamente, nos cílios primários, estruturas constituintes da membrana apical das células tubulares renais com protusão para o lúmen do nefrónio. Acredita-se que estes organelos tenham um papel na mecanotransdução, mediando a transmissão de sinais entre o exterior e o interior da célula. Por esta razão, a DRPAD é considerada uma ciliopatia (Bergmann et al., 2018; Harris et al., 2002). A função da PC1 é ainda hoje controversa assumindo-se que, além de recetor e coativador de transcrição genética, atua como molécula de adesão entre as células. Já a PC2 é um canal de cálcio permeável não seletivo, encontrando-se presente ao nível dos cílios, retículo endoplasmático e membrana celular (Chebib & Torres, 2016; Ong et al., 2015).

A compressão mecânica que os quistos exercem sobre os nefrónios circundantes resulta na apoptose das células epiteliais renais, na formação quística noutros nefrónios, num estado inflamatório subjacente, no *remodelling* vascular e na fibrose intersticial (Bergmann et al., 2018). Estas alterações resultam numa hiperfiltração glomerular compensatória que se torna deletéria e insuficiente, condicionado a perda progressiva da função renal (Oh et al., 2021).

A maioria dos doentes com DRPAD são portadores de uma mutação num dos alelos dos genes *PKD1* ou *PKD2*, sendo necessário um segundo evento mutagénico para que se inicie a cistogénese, ou seja, um fenómeno de inativação somática que conduza à perda de heterozigotia do alelo *wild-type* – *two hit hypothesis* (Bergmann et al., 2018; Grantham, 2008). Por isso, apesar do padrão de transmissão ser autossómico dominante, a DRPAD comporta-se como recessiva a nível celular (Chebib & Torres, 2016). Sabe-se atualmente que o desenvolvimento da doença depende da redução da concentração de policistina abaixo do limiar crítico de 20 a 30% (Lanktree et al., 2021).

No que diz respeito às alterações da função renal, a redução da capacidade de concentração de urina e a redução da excreção de amónia são um sinal precoce da doença, ocorrendo em cerca de 60% das crianças com DRPAD (Bergmann et al., 2018; Harris et al., 2002).

A hipertensão é outra manifestação precoce, ocorrendo em 40% dos doentes em idade pediátrica, sendo a idade média de diagnóstico aos 30 anos, antecedendo em 50 a 70% dos indivíduos a redução da taxa de filtração glomerular (TFG) (Bergmann et al., 2018; Reiterová & Tesař, 2022).

Na maioria das séries os indivíduos evoluem para DRC dependente de TSFR entre os 56 e os 78 anos, sendo que 50% dos doentes está dependente destas técnicas aos 60 anos. A perda progressiva da TFG está associada a um aumento exponencial no volume total renal ajustado à altura (ht-VRT) (Bergmann et al., 2018).

A dor abdominal, hematúria por rotura de quisto, nefrolitíase e infeção do trato urinário são também manifestações frequentes da DRPAD (Bergmann et al., 2018). O carcinoma de células renais ocorre com uma frequência idêntica à da população em geral, mas é biologicamente distinto e apresenta uma idade de início mais precoce (Harris et al., 2002).

A DRPAD é considerada uma doença multissistémica, visto que as policistinas são expressas em múltiplos tecidos. De facto, a formação de quistos ocorre também em múltiplas localizações extra-renais, nomeadamente ao nível do fígado (> 90%), pâncreas (10%), vesículas seminais (40%) e membrana aracnoideia (8%). Surgem também com maior frequência do que na população em geral os aneurismas intracranianos e aórticos, os defeitos valvulares, os divertículos cólicos e as hérnias (Cornec-Le Gall et al., 2019; Reiterová & Tesař, 2022).

Utilizando a Ressonância Magnética (RM) identificam-se quistos hepáticos em mais de 90% dos doentes entre os 35 e os 46 anos, e a sua prevalência aumenta com a idade (Kanaan et al., 2014). São, por norma, assintomáticos e não cursam com alterações da função hepática, estando por isso indicado o rastreio imagiológico de modo a identificar a presença e extensão das lesões (Harris et al., 2002; A. B. Chapman et al., 2015; Rangan et al., 2016). Os aneurismas intracranianos têm uma prevalência estimada de 9 a 12% nos doentes com DRPAD, sendo este risco 4 vezes superior ao da população em geral. (Cornec-Le Gall et al., 2019).

No que diz respeito ao prognóstico, o curso da DRPAD é muito variável, podendo alguns doentes necessitar de TSFR aos 40 anos de idade e outros nunca requerer técnicas de substituição de função renal. Torna-se assim relevante identificar os doentes com

doença rapidamente progressiva (Cornec-Le Gall et al., 2019; Gall et al., 2016). A avaliação do risco de progressão da doença pode ser realizada através *do score* PROPKD (*Predicting Renal Outcomes in Polycystic Kidney Disease*), do score genético ou da Classificação *Mayo Clinic* (Soroka et al., 2018), abordados de seguida.

O *score* PROPKD prediz o prognóstico de acordo com as variáveis nomeadas na *tabela 1*. Em indivíduos com idade inferior a 35 anos ou com dados clínicos em falta o *score* PROPKD não é válido, utilizando-se apenas o score genético (Gall et al., 2016).

A classificação *Mayo Clinic*, define dois grandes grupos de doentes tendo em consideração o padrão imagiológico: Classe 1 com padrão imagiológico típico de DRPAD (90% dos doentes) e classe 2 com padrão imagiológicamente atípico (Soroka et al., 2018). A *tabela 2* resume as principais características de cada classe. Esta classificação baseia-se no aumento do volume renal relativo, mensurável pelo ht-VRT, para determinar a taxa de progressão para doença renal crónica terminal (DRCT), sendo que o ht-VRT aumenta num padrão exponencial, numa taxa constante para um mesmo indivíduo (Higashihara et al., 2019). Um ht-VRT elevado ao diagnóstico é preditor de um rápido declínio da TFG, sendo este mais sensível que os marcadores clássicos de função renal (Bae et al., 2019; Cornec-Le Gall et al., 2019). O método preferencial para a medição da ht-VRT é a RM ou a Tomografia Computorizada (TC) ainda que possam ser usadas outras modalidades como a ecografia (Chapman et al., 2015).

Com os avanços recentes no conhecimento fisiopatológico da DRPAD, sobretudo a nível molecular, têm sido desenvolvidos fármacos promissores, de entre os quais o *Tovalptan*. O *Tovalptan* é um antagonista seletivo do recetor V2 da vasopressina que diminui a progressão do desenvolvimento de quistos renais, assim como a taxa de aumento do volume renal, o declínio da TFG e a necessidade de TSFR (Chebib et al., 2018; Tanaka et al., 2017).

PROPKD score		Genetic Score	
Fator	Pts	Fator	Pts
Sexo masculino	1	Mutação em <i>PKD2</i>	1
Hipertensão antes dos 35 anos	2	Mutação não truncante em <i>PKD1</i>	2
Primeiro evento urológico antes dos 35 anos	2	Mutação truncante em <i>PKD1</i>	3
Mutação em <i>PKD2</i>	0	Homem com mutação truncante em <i>PKD1</i>	4
Mutação não truncante em <i>PKD1</i>	2		
Mutação truncante em <i>PKD1</i>	4		

Tabela 1: Score PROPKD (*Predicting Renal Outcomes in Polycystic Kidney Disease*) e Genetic Score;

Adaptado de Soroka et al., 2018; Evento urológico é definido por hematúria macroscópica ou dor nos flancos, Categorias de risco: baixo (0-3 pontos), intermédio (4-6 pontos) e alto risco (7-9 pontos), correspondendo a uma idade de instalação de DRC com necessidade de TSFR aos 70,6; 56,9 e 49 anos, respetivamente (Gall et al., 2016); Pts – Pontos

Classificação da DRPAD baseada em características imagiológicas segundo a Classificação <i>Mayo Clinic</i>	
Classe 1: DRPAD típica (IA, IB, IC, ID, IE)	Distribuição bilateral e difusa, com substituição do parênquima renal por quistos; Todos os quistos contribuem de forma semelhante para o aumento do ht-VRT; Subdividida de A a E com base no ht-VRT e a idade, estimando diferentes taxas de declínio da TFG e consequentemente o prognóstico. O prognóstico das diferentes subclasses pode ser calculado através da ferramenta online: http://www.mayo.edu/research/documents/pkd-center-adpkd-classification/doc-20094754 .
Classe 2: DRPAD atípica	
A: Unilateral	Envolvimento quístico difuso de um rim com aumento do ht-VRT; Rim contralateral normal e presença de 0 a 2 quistos
A: Segmentar	Doença quística que envolve apenas um polo de um ou de ambos os rins, poupando o restante parênquima
A: Assimétrica	Aumento renal unilateral acentuado por envolvimento quístico difuso de um rim; Rim contralateral com envolvimento segmentar ligeiro ou minimamente difuso (quistos > 2, mas <10 e representando um volume renal <30% do ht-VRT)
A: Loopsided	Quistos renais com distribuição bilateral. Substituição ligeira do parênquima renal por quistos atípicos, sendo que menos de 5 quistos representam mais do que 50% do ht-VRT.
B: Apresentação bilateral com atrofia unilateral adquirida	Aumento renal unilateral por envolvimento quístico difuso com atrofia contralateral adquirida.
B: Apresentação bilateral com atrofia renal bilateral	Função renal diminuída (creatinina sérica $\geq 1,5$ mg/dL) sem aumento significativo do tamanho renal, definido por um comprimento médio <14,5 cm e substituição do tecido renal por quistos e atrofia do parênquima.

Tabela 2 - Classificação da DRPAD baseada em características imagiológicas segundo a Classificação *Mayo Clinic* Adaptado de Soroka et al., 2018; DRPAD – Doença Renal Poliquística Autossómica Dominante; ht-VRT - Volume Renal Total ajustado à altura; VRT- Volume Renal Total;

Objetivos

Objetivo geral: Desenvolvimento de um algoritmo para a avaliação do dador vivo aparentado na DRPAD, que permita a exclusão da doença nestes indivíduos.

Para alcançar este objetivo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1- Revisão da literatura referente ao diagnóstico genético e imagiológico da DRPAD bem como à avaliação do dador vivo renal na DRPAD
- 2- Avaliação dos principais métodos de diagnóstico genético e imagiológico disponíveis na realidade portuguesa.
- 3- Criação de um algoritmo para exclusão de DRPAD em potenciais dadores vivos aparentados.

Metodologia

Foi desenvolvido um instrumento para a avaliação do dador vivo aparentado na DRPAD, de aplicação clínica, com base nas seguintes metodologias:

- 1- Revisão bibliográfica através da pesquisa de artigos publicados em motores de busca tais como o *PubMed* e ainda bases de dados genéticas tais como a *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Mutation Database* [PKDB – <https://pkdb.mayo.edu/>].

As palavras-chave utilizadas foram: “*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD)*”; “*Kidney Donor Evaluation*”; “*ADPKD*” e “*Kidney Donation*”; “*ADPKD*” e “*Genetic Diagnosis*”. Foram incluídos *systematic reviews, scientific reports, review articles, research articles, original articles, guidelines e author manuscripts*, tendo estes sido selecionados pela análise dos seus *abstracts*.

- 2- Adicionalmente, foram ainda selecionados todos os artigos originais que compararam diferentes métodos de diagnóstico genético na DRPAD, tendo sido analisados seis artigos, publicados entre 2016 e 2022, estando agrupados os dados dos mesmos na *tabela 4*. Os critérios de exclusão para a seleção dos artigos foram: artigos prévios a 2016, dada a limitada utilização de técnicas NGS prévia a esta data, e ausência de dados disponíveis que permitissem calcular a taxa de deteção de mutações para as diferentes técnicas, impossibilitando um estudo comparativo.

3- Foi ainda investigado quais os testes genéticos para DRPAD disponíveis em Portugal e qual o seu custo aproximado, através do contacto direto com os laboratórios que realizam testes diagnósticos baseados em NGS e da consulta dos *e-sites* respetivos.

Resultados

Avaliação do Dador Vivo com História Familiar de DRPAD

Cerca de 50% dos indivíduos com DRPAD evoluem para DRCT, encontrando-se dependentes de TSFR (Oh et al., 2021). O Transplante Renal constitui a terapêutica substitutiva da função renal que confere maior sobrevida aos doentes. A doação em vida permite ultrapassar limitações impostas pelo reduzido *pool* de órgãos disponível, devendo, no entanto, ser garantida a máxima segurança para o dador. Existem várias *guidelines* de orientação clínica para a avaliação do dador renal vivo, verificando-se pequenas discrepâncias entre diversas sociedades e mesmo entre os vários centros de transplante. De modo a uniformizar o conteúdo e ir ao encontro do que é praticado atualmente no nosso país, as recomendações apresentadas têm por base as *guidelines* da *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*. A tabela que consta no *Anexo 2* sumariza os principais parâmetros a avaliar no potencial dador vivo assim como os critérios de elegibilidade. As motivações do dador devem também ser clarificadas, averiguando se o seu ato é voluntário e altruísta, não estando submetido a pressões afetivas, e se está ciente dos riscos da intervenção.

Avaliações dentro dos parâmetros da normalidade permitem à partida considerar o indivíduo saudável e apto para o transplante.

Esta avaliação torna-se mais complexa quando são estudados dadores vivos aparentados de indivíduos com doenças genéticas, dado que estes podem vir a ser afetados pela mesma doença do recetor (Claisse et al., 2020). Na DRPAD, a marcada variabilidade intra e interfamiliar, nomeadamente no que se refere à idade de início e à taxa de progressão da doença dificulta o estabelecimento de critérios claros para a inclusão ou exclusão destes indivíduos como potenciais dadores (Bergmann et al., 2018).

Nos próximos capítulos abordar-se-ão as características genéticas e particularidades diagnósticas que tornam a exclusão de doença nestes dadores tão desafiante e que refletem a relevância da construção de um algoritmo de auxílio na avaliação do dador vivo aparentado na DRPAD.

Características genéticas da DRPAD

A DRPAD, sendo uma doença monogénica, distingue-se pela heterogeneidade genética alélica e não alélica (Bergmann et al., 2018). Tendo um padrão de hereditariedade autossómica dominante, há 50% de probabilidade de um descendente herdar o gene mutado e desenvolver a doença, tendo esta penetrância completa e expressividade variável (Grantham, 2008).

A redução dos níveis de policistinas, conduzindo ao fenótipo de DRPAD, pode ser devida às seguintes mutações:

- mutações germinais e/ou somáticas no gene *PKD1* ou *PKD2*;
- mutações noutros genes que não os *PKD1* ou *PKD2* mas que conduzem secundariamente à alteração da biossíntese das policistinas, nomeadamente: *DNAJB11*, *GANAB*, *SEC63*, *SEC61B*, *PRKCSH*, *ALG8* e *ALG9* (Lanktree et al., 2021).

Mutações nos genes *PKD1* e *PKD2*

Como já referido, mutações nos genes *PKD1* e *PKD2* são responsáveis pela maioria dos casos, sendo que 75-80% correspondem a variantes patogénicas no *PKD1* e 10-15% no *PKD2* (Schönauer et al., 2020). Alguns estudos documentaram uma prevalência superior de mutações no gene *PKD2*, rondando os 36% (A. B. Chapman et al., 2015).

O gene *PKD1*, localizado no cromossoma 6, é de difícil sequenciação. Além de ser um gene bastante longo, contendo 46 exões, os primeiros 33 estão duplicados em 6 pseudogenes com uma sequência de DNA idêntica em 98% ao gene *PKD1*.

Adicionalmente o gene *PKD1* contém um elevado teor em guanina-citosina (GC) sobretudo nos exões 1, 42 e 43 (Mallawaarachchi et al., 2016). Estas características tornam o gene *PKD1* quatro a cinco vezes mais propenso a mutações do que o gene *PKD2* (Pei et al., 2009) e resultam num elevado número de falsos positivos e negativos aquando da sua sequenciação (Cordido et al., 2017; Lanktree et al., 2021).

As mutações podem ser encontradas ao longo de ambos os genes, não tendo sido identificado nenhum *hot spot* mutacional. Muitas das mutações tendem a ser exclusivas

de cada família, estimando-se que apenas 30% das mutações detetadas tenham sido anteriormente descritas (Ali et al., 2019). No banco de dados de mutações da DRPAD (<https://pkdb.mayo.edu/variants>) desenvolvido pela *Mayo Clínic*, podem ser consultadas as mutações já documentadas.

A variabilidade fenotípica da doença renal é parcialmente explicada genotipicamente. As mutações patogénicas responsáveis pela DRPAD podem ser subdivididas classicamente em 3 grupos tendo por base a sua implicação prognóstica: 1) mutações truncantes de *PKD1* incluindo mutações *frameshift*, *splicing* e *nonsense*; 2) mutações não truncantes de *PKD1* (*missense*, *inframe deletion/insertion*) e 3) mutações no *PKD2* (Cordido et al., 2017). Mutações no gene *PKD1* estão associados a um maior ht-VRT, a um maior número de quistos e a uma TFG mais reduzida, com uma idade média de evolução para DRCT mais precoce que os doentes com mutação no *PKD2* (Harris et al., 2002). De facto, a idade média de evolução para DRCT é de 56 anos para mutações truncantes no *PKD1*, discrepante em 20 anos das mutações de *PKD2*, estas com uma idade média de 78 anos para a DRCT. Em mutações não truncantes de *PKD1* encontramos um fenótipo intermédio, com evolução para DRCT pelos 68 anos (Bergmann et al., 2018).

Informações sobre o número e grau de parentesco dos familiares afetados, a sua idade de diagnóstico e a de progressão para DRCT, se aplicável, poderão ser úteis para deduzir qual o gene mutado, caso a mutação não tenha sido ainda identificada. A presença de pelo menos um familiar com diagnóstico de DRCT até aos 55 anos é preditivo de mutação no *PKD1*, com um VPP de 100% e sensibilidade de 72%. Já a existência de pelo menos um familiar com diagnóstico de DRCT depois dos 70 anos é preditivo de mutação no *PKD2*, com um VPP de 100% e sensibilidade de 74% (Barua & Pei, 2010).

Embora a maioria dos doentes com DRPAD tenha um familiar afetado, cerca de 15% a 28% não apresentam história familiar. Nestes casos o teste genético deve ser solicitado e o diagnóstico diferencial inclui entidades, genéticas e não genéticas, que cursam com doença poliquística (Bergmann, 2018; Lanktree et al., 2021). No Anexo 1 constam os principais diagnósticos diferenciais a ter em consideração na DRPAD.

Possíveis explicações para a ausência de história familiar incluem uma mutação de novo, em 5% do total de casos de DRPAD (Bergmann et al., 2018), mutações hipomórficas, ausência de registos clínicos de familiares, incapacidade de diagnóstico por doença ligeira ou mosaicismo somático ou germinativo (Oh et al., 2021).

Mutações noutros genes

Não raramente surgem casos de doença renal poliquística imagiologicamente atípica, doença de início precoce e de elevada gravidade ou doença *de novo*.

Doentes com DRPAD típica apresentam rins globalmente aumentados de tamanho com uma distribuição simétrica de quistos. Já os padrões imagiologicamente atípicos apresentam uma distribuição quística unilateral, segmentar, assimétrica, ou quistos renais sem aumento do volume renal, mesmo em fases avançadas da doença (Lanktree et al., 2021). Estes fenótipos atípicos podem ser causados por mutações noutros genes que não o *PKD1* e *PKD2* e constituem a causa de até 10% dos casos de doença renal quística (Lanktree et al., 2019). Os genes mais frequentemente envolvidos nestes casos são os seguintes:

- Gene *GANAB*: Mutações heterozigóticas neste gene são responsáveis por cerca de 0,3% do total de casos de DRPAD. A maioria dos indivíduos apresenta doença hepática poliquística autossómica dominante, acompanhada de doença renal poliquística de menor gravidade, geralmente sem alterações da função renal (Cordido et al., 2017; Cornec-Le Gall et al., 2019; Harris et al., 2002).
- Gene *DNAJB11*: Mutações neste gene têm por norma um fenótipo atípico com quistos renais bilaterais de reduzidas dimensões, podendo apresentar quistos hepáticos (Harris et al., 2002). Estes indivíduos desenvolvem DRCT tardiamente.
- Genes associados à Doença Renal Tubulo-intersticial Autossómica Dominante (DRTAD), sendo os mais comuns o *HNF1B*, *UMOD*, *MUC1*, *REN* e *SEC61A* (Bergmann et al., 2018; Lanktree et al., 2021). Estes doentes apresentam uma doença renal com atingimento maioritariamente tubulo-intersticial, apresentando por vezes pequenos quistos bilaterais mas sem aumento das dimensões renais.

- Deleção contígua *PKD1* e *TSC2*: responsável por Doença Renal Poliquística com diagnóstico na infância, associada a Esclerose Tuberosa. Esta associação é explicada por uma deleção de genes contíguos (Harris et al., 2002; Lanktree et al., 2021).

Diagnóstico de DRPAD

O diagnóstico definitivo de DRPAD é imagiológico e/ou genético, sendo estabelecido se: documentada história familiar de DRPAD em familiar de primeiro grau associada a critérios imagiológicos de DRPAD (ecográficos ou por ressonância magnética) ou se identificada mutação causadora descrita como patogénica ou potencialmente patogénica. Caso a mutação identificada seja caracterizada como de significado indeterminado não podem ser assumidos diagnósticos clínicos, sendo necessária uma investigação posterior para avaliar a patogenicidade da mesma (Harris et al., 2002).

Diagnóstico Imagiológico

Ecografia Renal

A suspeita de DRPAD deve surgir em doentes com manifestações clínicas da doença, com história familiar de DRPAD e exames de imagem compatíveis com o diagnóstico. De forma geral, em indivíduos com 50% de risco de desenvolver DRPAD (i.e. filhos ou irmãos de doente com DRPAD), o diagnóstico pré-sintomático é feito por ecografia convencional. A presença de múltiplos quistos em rins aumentados de volume, assim como a presença de quistos noutros órgãos visualizáveis pela ecografia, como o fígado e ocasionalmente o pâncreas, são bastantes sugestivos do diagnóstico (Cordido et al., 2017). Atualmente, os critérios de diagnóstico e de exclusão mais utilizados foram propostos por Pei et al., em 2009, e são denominados *Unified Diagnostic Criteria*, encontrando-se expostos na *tabela 3*.

Confirmação do Diagnóstico			
Idade; nº de quistos	<i>PKD1</i>	<i>PKD2</i>	Genótipo desconhecido
15-29; Total de quistos ≥ 3;	VPP: 100%, SEN: 94.3%	VPP: 100%, SEN: 69.5%	VPP: 100%, SEN: 81%
30-39; Total de quistos ≥ 3;	VPP: 100%, SEN: 96.6%	VPP: 100%, SEN: 94.9%	VPP: 100%, SEN: 95.5%
40-59; ≥ 2 quistos por rim;	VPP: 100%, SEN: 92.6%	VPP: 100%, SEN: 88.8%	VPP: 100%, SEN: 90%
Exclusão de doença			
Idade; nº de quistos	<i>PKD1</i>	<i>PKD2</i>	Genótipo desconhecido
15-29; 0 quistos	VPN: 99.1%; ESP: 97.6%	VPN: 83.5%; ESP: 96.6%	VPN: 90.8%; ESP: 97.1%
30-39; 0 quistos	VPN: 100%; ESP: 96%	VPN: 96.8%; ESP: 93.8%	VPN: 98.3%; ESP: 94.8%
40-59; 0 quistos	VPN: 100%; ESP: 93.9%	VPN: 100%; ESP: 93.7%	VPN: 100%; ESP: 93.9%

Tabela 3: *Unified Diagnostic Criteria* - Critérios ecográficos de diagnóstico e exclusão de DRPAD; Adaptado de (Pei et al., 2009); ESP- Especificidade; SEN – Sensibilidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo;

Os critérios ecográficos de diagnóstico e exclusão de DRPAD, como explícito na *tabela 3*, são dependentes da mutação familiar (*PKD1*, *PKD2* ou desconhecida) e da idade, dado que o desenvolvimento dos quistos depende destes fatores (Pei et al., 2009).

No que diz respeito à idade, o envelhecimento está associado à formação de quistos simples esporádicos, com uma prevalência de 11,5% dos 50 aos 69 anos e de 22,1% acima dos 70 anos. Estes quistos simples são bilaterais em 4% e 9%, respetivamente, para os intervalos etários referidos (Harris et al., 2002). Assim, é necessária a presença de um maior número de quistos para a confirmação do diagnóstico de DRPAD em idades mais avançadas.

Idades superiores a 60 anos não foram incluídas no estudo de Pei et al., sendo que previamente era utilizado o critério de 4 quistos em cada rim para o diagnóstico da doença em indivíduos nesta faixa etária (VPP: 100% e valor preditivo negativo (VPN): 100%) (Institute et al., 1994).

Relativamente à influência da mutação familiar no diagnóstico, como já anteriormente descrito, mutações no *PKD2* estão associadas a um fenótipo menos grave, com menor prevalência de hipertensão arterial, idade mais avançada aquando do diagnóstico inicial e evolução para DRCT mais tardiamente. Mutações no *PKD2* estão ainda associadas a um menor número de quistos e menor ht-VRT face aos indivíduos com mutação no

PKD1, independentemente da idade (Bergmann et al., 2018; Harris et al., 2002). Em resultado, os critérios de diagnóstico e exclusão de DRPAD são distintos consoante a mutação causadora de doença, pois, caso tal não fosse tido em consideração aumentaríamos a taxa de falsos negativos em doentes jovens sem mutação no gene *PKD1* (Pei & Watnick, 2010).

Em caso de história familiar negativa, os exames imagiológicos são insuficientes já que os critérios atuais foram desenvolvidos com base no estudo de indivíduos cujo risco de DRPAD é de 50% (Cornec-Le Gall et al., 2019). Outro dos desafios envolve o diagnóstico de doentes com padrões quísticos atípicos que não satisfazem os critérios de DRPAD, devido à escassez de literatura na abordagem destes doentes (Mallawaarachchi et al., 2021). Em ambos os casos, o diagnóstico genético é útil.

Os critérios para exclusão de doença têm um papel central na avaliação do indivíduo aparentado como potencial dador. A utilidade da ecografia tende a aumentar com a idade, com um VPN de 100% entre os 30 e os 39 anos na ausência de quistos e entre os 40 e 59 anos se 2 ou menos quistos, caso a mutação esteja confinada ao gene *PKD1*. Já em indivíduos mais jovens, entre os 15 e os 29 anos, o VPN é de 99,1% na ausência de quistos, o que poderá não ser aceitável para a exclusão da doença num dador, sobretudo se disponíveis outros meios complementares de diagnóstico. Não obstante, a ecografia é um excelente método imagiológico para a exclusão da doença em indivíduos com esta mutação (Pei & Watnick, 2010).

O mesmo não acontece na avaliação de dadores com mutação no gene *PKD2* ou cujo genótipo familiar seja desconhecido, especialmente entre os 15 e os 39 anos. Um potencial dador com 50% de risco de DRPAD sem documentação de quistos ecograficamente, com idade entre 15 e 30 anos, sem mutação identificada, tem uma probabilidade de DRPAD de 9,2%. Esta probabilidade desce para 1,7% entre os 30 e os 39 anos. Entre os 40 e os 59 anos, se a mutação for confinada a *PKD2* ou se o genótipo for desconhecido, é possível excluir a doença na presença de um ou menos quistos com um VPN de 100%. Sendo assim, a ecografia só é útil para exclusão de doença em doentes com idade superior a 30 anos que apresentem mutação no gene *PKD1* ou acima de 40

anos se apresentarem mutação do *PKD2* ou se a mutação for desconhecida. (J. R. Chapman et al., 2017; Colbert et al., 2020).

Conclui-se desta forma que a ecografia deve ser o primeiro exame a solicitar na marcha diagnóstica para a exclusão de DRPAD, uma vez que, além de amplamente utilizada na avaliação de dador vivo, tem um baixo custo e um elevado VPN para exclusão de DRPAD, excetuando em idades jovens.

Nos indivíduos cujos resultados ecográficos possam ser equívocos ou que não permitam a exclusão da doença podem ser usadas outras modalidades de imagem, como a RM e a TC, ou pode ser realizado um teste genético de modo a obter um diagnóstico molecular. À data atual não existem estudos comparativos entre RM, TC e testes genéticos, pelo que todos serão descritos, assim como as suas vantagens e desvantagens.

Ressonância Magnética

Quanto aos exames de imagem, a RM provou superioridade no diagnóstico e exclusão de DRPAD em comparação com a ecografia, permitindo ainda, em caso de diagnóstico de DRPAD, calcular o ht-VRT, e assim acrescentar informação prognóstica (Cordido et al., 2017). A RM permite a distinção entre indivíduos com doença e sem doença, através da presença de mais de 10 quistos renais. Este critério aplica-se a indivíduos com risco de 50% de DRPAD entre os 16-40 anos dado que por norma indivíduos com DRPAD nesta faixa etária apresentam mais de 20 quistos por RM. No entanto, o *cut-off* estabelecido para exclusão de doença em potenciais dadores é de 5 quistos (com um VPN de 100% e sensibilidade de 98.3%) em detrimento dos 10 para a população geral em risco (Pei et al., 2015). No entanto, estes resultados baseiam-se num estudo de apenas 110 indivíduos com risco de 50% de DRPAD, não havendo até há data replicação destes resultados. Além disto, este estudo inclui apenas indivíduos entre os 16 e 40 anos, pelo que poderá ser abusivo extrapolar estes dados para indivíduos com idade superior a 40 anos nos quais não tenha sido possível excluir a doença por métodos ecográficos.

Adicionalmente, a RM, em comparação com outros exames de imagem, é mais dispendiosa, menos disponível e no geral mais morosa na obtenção dos resultados.

Tomografia Computorizada

A TC podia ser uma alternativa custo-efetiva já que a angiotomografia computadorizada (angio-TC) faz parte dos exames complementares solicitados para a avaliação do dador renal vivo. A TC permite ainda calcular o ht-VRT, embora alguns centros definam a RM como método preferencial (Soroka et al., 2018). No entanto, a TC não apresenta ainda critérios de diagnóstico e exclusão de DRPAD estabelecidos pelo que os seus resultados não devem ser extrapolados a partir dos critérios utilizados para a RMN ou para a ecografia (Pei et al., 2015). Assim, consideramos que a inclusão deste exame num algoritmo de exclusão de DRPAD não é aceitável.

Diagnóstico Genético na DRPAD

Atualmente as indicações formais para a realização de testes genéticos na DRPAD incluem: 1) diagnóstico definitivo em doentes jovens, em que a exclusão seja necessária e não seja possível através de métodos imagiológicos; 2) diagnóstico em indivíduos com história familiar negativa para DRPAD; 3) doença renal imagiologicamente atípica; 4) aconselhamento e planeamento familiar, nomeadamente para a realização de diagnósticos genéticos pré-implantatórios; 5) diagnóstico em casos de discordância entre a gravidade clínica e exames de imagem; 6) discrepância intrafamiliar marcada; 7) suspeita de mosaicismo somático; 8) formas sindrómicas de doença renal poliquística; 9) obtenção de informação prognóstica em indivíduos selecionados que possam beneficiar de novas terapêuticas.

Destas indicações excluem-se indivíduos com história familiar positiva e doença com padrão típico e ainda o rastreio genético de crianças assintomáticas (Lanktree et al., 2019; Mantovani et al., 2020; Ong et al., 2015; Tchan et al., 2015).

Quanto ao estudo molecular, este pode ser solicitado logo após a realização de ecografia, nos casos em que restem dúvidas acerca da existência ou não de DRPAD, ou

após a realização de RM que também se revele inconclusiva. Por exemplo, num potencial dador com idade inferior a 40 anos e que apresente entre 5 a 10 quistos na RM não é possível confirmar ou excluir imagiologicamente o diagnóstico de DRPAD, sendo o diagnóstico molecular relevante (*Guidelines for Living Donor Kidney Transplantation United Kingdom Guidelines*, 2018; Pei et al., 2015; Soroka et al., 2018).

Os testes moleculares, apesar de cada vez mais utilizados na prática clínica, são exames morosos e que podem não estabelecer o diagnóstico em até um terço dos casos na DRPAD (Colbert et al., 2020; Pei et al., 2015). No entanto, os custos associados à sequenciação têm vindo a diminuir, tornando o teste genético um exame de primeira linha no diagnóstico de muitas doenças nefrológicas hereditárias.

Para que possam ser retiradas elações acerca da elegibilidade de um indivíduo aparentado como dador é necessário, em primeira instância, o estudo genético do recetor com DRPAD. Só depois de identificada a mutação responsável pela doença no recetor, é que o estudo prossegue para a exclusão de doença no dador, através da pesquisa da mesma mutação por sequenciação direta por Sanger.

No caso da DRPAD, um teste genético que revele uma mutação patogénica num dos genes associados à doença permite excluir o indivíduo como potencial dador e deve conduzir à referenciação do doente para consulta de nefrologia.

Destaca-se ainda que um dador de rim é por norma um indivíduo saudável que necessita por isso, segundo a lei portuguesa, de ser avaliado numa consulta especializada de Genética para aconselhamento e requisição do teste genético, o que pode aumentar o tempo até à obtenção de resultados. Um estudo conduzido por Elliott et al., 2021, testou um algoritmo otimizado para o diagnóstico de indivíduos com suspeita de DRPAD, em que é dada ao nefrologista mais autonomia na requisição de exames genéticos. Deste modo obteve-se uma diminuição do intervalo de tempo desde a referenciação até à obtenção de resultados de 365 para 184 dias. No entanto, estes dados devem ser extrapolados com alguma cautela dado que dependem em grande parte dos recursos e da organização do sistema de saúde de cada país.

Dada a dificuldade de sequenciação, particularmente do gene *PKD1*, mas também de *PKD2*, várias abordagens têm sido propostas para o diagnóstico molecular da DRPAD, não estando ainda bem delimitada qual a melhor conduta no tipo e na ordem de requisição dos testes genéticos tanto para o diagnóstico, como para a avaliação de potenciais dadores aparentados de doentes com DRPAD.

Testes Moleculares utilizados na DRPAD

As técnicas utilizadas no diagnóstico molecular da DRPAD incluem: a sequenciação por Sanger; técnicas de *next-generation-sequencing* (NGS), nomeadamente o *whole genome sequency* (WGS), *whole exome sequency* (WES) e a NGS para painéis enriquecidos para genes associados à DRPAD; e a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) para identificação de grandes rearranjos do gene *PKD1*.

Os próximos capítulos irão sumarizar cada uma das técnicas e a sua aplicabilidade no diagnóstico desta doença. Com esse objetivo, foram assim analisados artigos originais que compararam diferentes métodos de diagnóstico genético na DRPAD, entre o ano 2016 e 2022, detalhados na *tabela 6*. Estes estudos utilizaram diferentes abordagens, refletindo uma vasta heterogeneidade no tipo de testes genéticos utilizados por cada autor, a sua sequência de utilização, bem como nas características fenotípicas dos participantes. As diferentes taxas de deteção de mutação são assim influenciadas por estes fatores (Kim et al., 2021)

1. Sequenciação por Sanger e DRPAD

A sequenciação por Sanger é usada para identificar variações de um único nucleótido e inserções/deleções de 5 a 10 pares de bases (pb), sendo por isso o *gold-standard* para o diagnóstico molecular quando uma mutação de um único gene, com poucos exões, é responsável pela doença. Esta técnica possibilita também uma melhor análise de regiões altamente repetitivas, homólogas, ricas em GC, que comumente são dificilmente abordadas por NGS (Groopman et al., 2018).

Tradicionalmente, a amplificação *por Long Range* Polymerase Chain Reaction (LR-PCR) seguida de sequenciação por Sanger é o *gold-standard* para o diagnóstico de DRPAD, atingindo uma taxa de diagnósticos de 90% em alguns estudos e entre 40-60% em laboratórios comerciais de referência (Mallawaarachchi et al., 2016). A amplificação por LR-PCR permite uma correta sequenciação do *PKD1*, evitando os seus pseudo-genes através de *primers* específicos para o gene funcional. No entanto, é um método muito laborioso quando utilizado para sequenciar integralmente genes de elevado tamanho. Para ultrapassar esta limitação, seguidamente à amplificação por LR-PCR pode ser também utilizado um método de NGS ao invés de Sanger, embora a sequenciação por Sanger seja mais sensível e específica (Ali et al., 2019; Mallawaarachchi et al., 2021). Por outro lado, a sequenciação Sanger é particularmente útil para avaliar a presença de uma mutação específica em indivíduos em que a mutação responsável pela doença na família já tenha sido previamente identificada. Neste caso a obtenção de resultados é substancialmente mais rápida, dado que a análise se limita apenas à mutação em questão. Esta técnica também poderá ser utilizada para confirmar a presença de mutações identificadas por NGS ou para pesquisa de mutações em algumas regiões genómicas de pequeno tamanho que apresentem baixa cobertura por estas técnicas (Groopman et al., 2018; Mochizuki et al., 2019).

Assim, entre os estudos analisados na DRPAD todos utilizavam a técnica de Sanger para a confirmação de mutações identificadas por técnicas de NGS. A dificuldade na sequenciação do exão 1 levou Mochizuki et al., 2019 a incluir a sequenciação por Sanger deste exão como parte do seu fluxograma diagnóstico, sendo no entanto utilizada apenas se não houvesse deteção de mutação através de técnicas de NGS baseadas em hibridização e LR-PCR. Apenas foi utilizada em 15 de um total de 111 doentes, sendo que este método apenas permitiu detetar uma mutação num indivíduo. A utilidade diagnóstica desta técnica foi assim apenas de 0,9% para o total de doentes, o que provavelmente não justifica a realização da mesma no diagnóstico da DRPAD, por rotina, dado ser um método particularmente laborioso. Adicionalmente, e decorrente da sua dificuldade técnica, a sequenciação completa por Sanger dos exões de *PKD1* e *PKD2* não está disponível nos laboratórios de referência em Portugal.

2. Técnicas de *Next Generation Sequency* (NGS) e DRPAD

As técnicas de NGS permitem sequenciar múltiplas regiões genéticas em paralelo, sendo mais rápidas e com um custo inferior. Apresentam-se assim como uma alternativa muito vantajosa às técnicas convencionais (Ali et al., 2019). Em geral, as técnicas NGS podem dividir-se em dois grupos: *whole genome sequency* (WGS), que permite a sequenciação de todo o genoma, e *targeted DNA sequency*, que sequencia uma parte do genoma, obtida após etapa de enriquecimento. Nas técnicas de *targeted DNA sequency*, incluem-se: o *whole exome sequencing* (WES) e os painéis enriquecidos para genes de interesse. Enquanto para o WES existe um enriquecimento para os exões de todos os genes codificantes, os painéis enriquecidos para genes de interesse são enriquecidos apenas para os exões de genes associados à doença em estudo.

Quanto ao método de enriquecimento, este poderá ser realizado por LR-PCR ou por métodos de hibridização, como será detalhado posteriormente.

2.1. *Whole Genome Sequency* (WGS) e DRPAD

A técnica de WGS permite a sequenciação de todo o genoma, produzindo elevadas quantidades de dados que são submetidas a uma extensa análise bioinformática. A obtenção de dados de sequenciação tão extensos de uma única amostra leva a uma menor cobertura de sequenciação comparativamente a técnicas NGS para painéis enriquecidos, sendo que os últimos permitem uma melhor distinção entre genes e pseudogenes, o que é fundamental na DRPAD (Zacchia et al., 2021). Devido à sua complexidade de interpretação e de análise bioinformática, as técnicas de WGS são ainda pouco utilizadas na prática clínica (Knoers et al., 2022). Um estudo conduzido por Mallawaarachchi et al., 2021 evidenciou possíveis benefícios da WGS na DRPAD. Neste estudo, apesar de ter sido sequenciado todo o genoma apenas foram analisados 12 genes de interesse para DRPAD. A taxa de deteção de mutações (patogénicas, potencialmente patogénicas ou VUS) foi de 81% para os casos de fenótipo típico de DRPAD. Já no teste de validação, em que se compararam resultados obtidos através de WGS, com técnicas *gold standard*, como LR-PCR, sequenciação por Sanger e MLPA, a

taxa de detecção foi de 100%, excetuando dois casos de mosaïcismo somático. Este estudo evidenciou assim que este método poderá ser igualmente eficiente.

2.2. Targeted DNA Sequency e DRPAD

No que diz respeito à *targeted DNA sequency* esta permite sequenciar zonas de interesse do genoma, podendo estas corresponder a todo o exoma (WES) ou apenas a painéis definidos de genes de interesse.

Independentemente de ser analisado todo o exoma ou apenas um número limitado de genes é necessário um processo de enriquecimento das regiões genómicas de interesse antes da sua sequenciação. Este enriquecimento pode ser obtido através de duas técnicas: hibridização (também denominada “de captura”) ou LR-PCR. A *tabela 4* e a *figura 1* pretendem representar as principais diferenças entre as técnicas. Depois da etapa de enriquecimento é realizada a sequenciação por NGS.

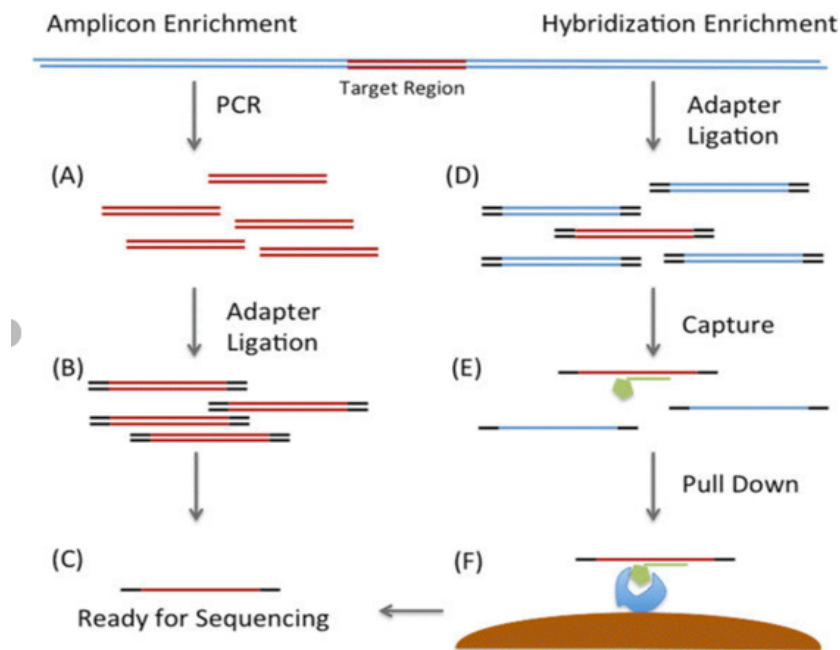


Figura 1: Diferenças técnicas entre NGS baseadas em LR-PCR (Amplicon Enrichment) e Hibridização; NGS baseado em LR-PCR: as regiões do DNA são amplificadas utilizando *primers* específicos (pequenas sequências de bases que complementam com as regiões de interesse). Posteriormente irão ligar-se a adaptadores e ser sequenciadas; NGS baseado em hibridização: O DNA é fragmentado em pequenas porções, sendo depois ligado a adaptadores e posteriormente submetidos a captura magnética usando sondas de DNA complementar. Adaptado de Wiley et al.: Use of next-generation DNA sequencing to analyze genetic variants in rheumatic disease. *Arthritis Research & Therapy* 2014 6:490; NGS – *Next Generation Sequency*; LR-PCR - Long Range Polymerase Chain Reaction

	NGS baseada em LR-PCR	NGS baseada em hibridização
Captura de regiões ricas em GC	Alta	Baixa
Taxa de falsos positivos	Baixa	Alta
Captura <i>off-target</i>	Mínima	Sim
<i>Allelic dropout/bias</i>	Sim	Não
Deteção de CNVs	Difícil	Possível
Método laborioso	Alto	Baixo
Conteúdo genético	Genes pequenos <50pb	Genes de maiores dimensões >50pb
Custo	Mais elevado	Mais baixo

Tabla 4: Quadro comparativo entre técnicas de NGS baseadas em hibridização e LR-PCR; Adaptado de Lanktree et al., 2019; CNVs – Variações do número de cópias; GC – Guanina-Citosina; LR-PCR - *Long Range Polymerase Chain Reaction*; NGS - *Next Generation Sequency*; pb- pares de bases;

As técnicas de LR-PCR constituem uma abordagem otimizada para a sequenciação de fragmentos ricos em GC, tais como os exões 1 e 42 do gene *PKD1* e para evitar a sequenciação de pseudo-genes. No entanto o *fenómeno de drop out* poderá ocorrer quando um alelo é preferencialmente amplificado por PCR, e não o outro alelo mutado, devido a falhas de hibridização por mutações localizadas na sequência dos *primers*.

A hibridização direcionada para os genes de interesse, que denominaremos de Painel NGS HGI, é uma abordagem mais custo-efetiva e tem maior utilidade na deteção de rearranjos moleculares, relativamente à NGS baseada em LR-PCR. No entanto, apesar de estudos recentes terem conseguido melhorar a profundidade de leitura nas regiões ricas em GC, as taxas de falsos negativos continuam a ser superiores face a técnicas de LR-PCR (Lanktree et al., 2019).

2.2.1. *Whole Exome Sequency (WES) e DRPAD*

A sequenciação por WES é caracterizada pela capacidade de gerar uma grande quantidade de informação genética num curto espaço de tempo, sendo bastante comum a sua utilização na prática clínica. O exoma corresponde a apenas 2% de todo o genoma, mas as mutações ou variantes funcionais situam-se nestas regiões codificantes em cerca de 85% dos casos, o que torna a WES custo-efetiva na identificação de mutações responsáveis por doença. No entanto, esta metodologia raramente é descrita

na literatura como uma abordagem para a sequenciação dos genes responsáveis pela DRPAD. Um estudo conduzido por Ali et al. Em 2019 evidenciou uma taxa de detecção de apenas 50% para mutações no gene *PKD1*, principalmente devido à reduzida sensibilidade (7,41%) na sequenciação dos exões 1 a 32. Tal como já referido, a existência de pseudogenes com homologia muito elevada dificulta a captura específica destes exões de *PKD1*, sendo as regiões ricas em GC também de difícil sequenciação. Não obstante, a sensibilidade para detecção de mutações nos exões 33 a 46 foi de 100%. Ainda assim, as limitações referidas tornam o WES pouco aconselhado no diagnóstico da DRPAD.

Acresce ainda que a sequenciação não seletiva da WES pode levantar a problemática da identificação de mutações acidentais, que não têm qualquer relação com a indicação primária para teste.

2.2.2. Painéis de NGS

Através de painéis de NGS são analisados apenas os genes que possam ser responsáveis pela doença, ao invés de todo o genoma ou exoma. Os painéis de genes podem ser obtidos através de WES – painéis de NGS baseados em WES, em que é sequenciado todo o exoma mas só são analisados os genes de interesse – ou através de painéis de enriquecimento para genes de interesse, por hibridação (Painel NGS HGI como anteriormente referido) ou LR-PCR. Nos painéis de NGS baseados em WES as limitações técnicas são as mesmas descritas para o WES mas uma das principais vantagens prende-se com a possibilidade de poderem ser adicionados novos genes ao painel, à medida que o conhecimento da doença se vai aprimorando, sem a necessidade de uma nova sequenciação (Mallawaarachchi et al., 2021).

Através de painéis de enriquecimento para genes de interesse, como a captura é limitada para um número relativamente reduzido de genes alvo, obtem-se uma maior cobertura de sequenciação face a outras técnicas (Zacchia et al., 2021). Em geral os painéis são pré-definidos pelo laboratório existindo diferentes painéis para a DRPAD que podem ser escolhidos consoante o fenótipo do doente e a sua história familiar. Como já descrito, mutações no *PKD1* e *PKD2* são responsável pela DRPAD em cerca de 90% dos

casos (Lanktree et al., 2019), sendo que esta percentagem poderá chegar aos 98% se o fenótipo for típico (Mallawaarachchi et al., 2021). Segundo o mesmo estudo, em casos de fenótipo atípico, mutações nos genes *PKD1* e *PKD2* correspondem a 56% dos casos, sendo que as restantes mutações foram identificadas nos genes *PKHD1*; *HNF1B*; *GANAB*; *DNAJB11*; *PRKCSH* e *TSC2*. Ainda assim, um estudo conduzido por Wang et al. em 2019 demonstrou que padrões quísticos bilaterais podem estar também associados a mutações em genes tais como o *HNF1B* e ainda mutações bialélicas no gene *PKHD1*, em que a doença renal poliquística autossómica recessiva (DRPAR) mimetiza a DRPAD (Mantovani et al., 2020). Daqui surge uma possível vantagem em analisar não só os genes *PKD1* e *PKD2* mas também os outros genes referidos, mesmo em fenótipos típicos (Wang et al., 2019).

Procurámos comparar as diferenças da utilização de painéis NGS HGI para a DRPAD e painéis de NGS baseado em LR-PCR (Painel NGS LR-PCR).

Na revisão da literatura realizada, não encontramos nenhum estudo comparativo entre as duas técnicas, quando utilizadas na abordagem inicial à DRPAD. Kinoshita et al., 2016 e Mochizuki et al., 2019 realizaram dois estudos distintos em que sequenciaram os genes *PKD1* e *PKD2* em indivíduos com fenótipo típico. Kinoshita et al., 2016 realizou a sequenciação através de um painel NGS LR-PCR obtendo uma taxa de deteção 89,1%. Já Mochizuki et al., 2019 utilizando um painel de NGS HGI alcançou apenas 79,2%, apontando para uma melhor performance da LR-PCR.

No entanto, e dada a maior morosidade da LR-PCR estas técnicas poderão ser realizadas sequencialmente, de modo a complementar resultados. De facto, no estudo realizado por Mochizuki et al., 2019, caso não fosse encontrada uma mutação nos genes *PKD1* e *PKD2* por método de hibridização, realizar-se-ia uma LR-PCR para os mesmos genes. Esta abordagem permitiu aumentar a taxa de deteção de 79.2% para 86.4%, semelhante à taxa de deteção através de LR-PCR isoladamente.

3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

O método de MLPA permite a deteção de pequenas e grandes variações do número de cópias (*CNVs*), identificando alterações cromossómicas, translocações ou outros desequilíbrios de grandes regiões genómicas, tendo maior sensibilidade em comparação

com a cariotipagem. O MLPA permite a pesquisa de alterações no número de cópias em regiões genómicas específicas e previamente associadas a doenças genéticas. Cerca de 4% das mutações responsáveis pela DRPAD são causadas por grandes rearranjos. Este facto tem implicação diagnóstica já que a sequenciação por Sanger e outros métodos de NGS não conseguem identificar estas alterações genéticas (Lanktree et al., 2019). Como documentado na tabela 6 a taxa de diagnóstico da MLPA varia entre 4 e 5% na maioria dos estudos, pelo que poderá ser útil nos casos em que não é encontrada uma mutação através de outras técnicas.

Testes Moleculares disponíveis em Portugal

De forma a adaptar a realidade internacional à prática clínica portuguesa contactaram-se dois dos principais laboratórios de referência responsáveis pelos testes genéticos em Portugal - *GenoMed*[®] e *Unilabs*[®]. Os testes disponíveis encontram-se detalhados na *tabela 5*.

Um dos laboratórios contactados realiza apenas painéis baseados em WES. Como já referido a WES não é a técnica preferencial na DRPAD, pelo que seria provável a necessidade de reavaliação por painéis de enriquecimento nos casos negativos, aumentando os custos e o tempo associados. No segundo laboratório contactado é possível requisitar painéis NGS HGI, complementados por NGS LR-PCR para o gene *PKD1*, o que é apoiado pela evidência científica disponível tal como previamente mencionado. Apenas foi possível obter os preços protocolados com o serviço nacional de saúde de uma das empresas, apurando-se que a realização de Painel NGS HGI com NGS LR-PCR para *PKD1* tem um custo de aproximadamente seiscentos euros, independentemente de serem analisados por NGS HGI 1, 3 ou 5 genes diferentes. As técnicas de MLPA têm um custo de aproximadamente duzentos euros, já o NGS LR-PCR para *PKD1* isoladamente custa aproximadamente quatrocentos e trinta euros. Por fim, o painel NGS alargado baseado em WES para 72 genes tem um valor de aproximadamente setecentos euros.

Painéis NGS baseados em WES	Preço
Painel de NGS baseado em WES - 6 genes (<i>PKD1, PKD2, PKHD1, DNAJB11, GANAB, DZIP1L</i>)	≈600€
Painel NGS alargado baseado em WES - 32 genes (<i>PKD1, PKD2, PKHD1, DNAJB11, GANAB, DZIP1L; ABCC8, ALG8, BICC1, BLK, COL4A1, GCK, HNF1B, HNF4A, INS, INVS, KCNJ11, KLF11, LRP5, NEUROD1, NOTCH2, NPHP3, OFD1, PAX4, PDX1, PRKCSH, SEC61B, SEC63, TSC1, TSC2, UMOD, VHL</i>)	≈600€
Painel NGS alargado baseado em WES - 72 genes (<i>AHI1, ALG8, ALG9, ANKS6, ARL13B, ARL6, ATP6VOA4, B9D1, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS9, BICC1, C5ORF42, CC2D2A, CCDC28B, CEP164, CEP290, CEP41, COL4A1, DGUOK, DNAJB11, DZIP1L, GANAB, GLA, GLIS2, GLIS3, HNF1B, INPP5E, INVS, IQCB1, KIF7, LRP5, MKS1, MUC1, NEK8, NOTCH2, NPHP1, NPHP3, NPHP4, OFD1, PKD1, PKD2, PKHD1, PRKCSH, REN, RPGRIP1L, SDCCAG8, SEC61A1, SEC61B, SEC63, TCTN1, TCTN3, TMEM138, TMEM216, TMEM231, TMEM237, TMEM67, TRIM32, TSC1, TSC2, TTC21B, TTC8, UMOD, VHL, WDPCP, WDR19, XPNPEP3, ZNF423</i>)	≈700€
Painel NGS LR-PCR e /ou Painel NGS HGI	
Painel NGS HGI de 3 genes + NGS LR-PCR do <i>PKD1</i> (<i>PKD1, PKD2, DNAJB11, GANAB</i>)	≈600€
Painel NGS HGI de 5 genes + NGS LR-PCR do <i>PKD1</i> (<i>PKD1, PKD2, PKHD1, DNAJB11, GANAB, DZIP1L</i>)	
NGS HGI do <i>PKD2</i> + NGS LR-PCR do <i>PKD1</i>	
NGS LR-PCR do <i>PKD1</i>	≈430€
MLPA (deleções/duplicações nos genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i>)	≈200€
Exoma Completo	≈1000€

Tabela 5: Testes genéticos disponíveis em Portugal na DRPAD através de laboratórios nacionais de referência. NGS – Next Generation Sequency; WES- Whole Exome Sequency; LR-PCR – Long Range Polymerase Chain Reaction; Painel NGS HGI - painéis de NGS baseados em hibridização de genes de interesse; MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Estudo	Nº de indivíduos (famílias)	Fenótipo	Métodos Utilizados	Taxa de detecção
Kinoshita et al., 2016	101 (101)	DRPAD típica	1. NGS LR-PCR para <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> ; Se mutação não encontrada: 2. MLPA Confirmação: Sanger	NGS LR-PCR : 89,1% (90/101)** NGS LR-PCR + MLPA: 93,1% (94/101)**;
Bullich et al., 2018	101 (ND)	DRPAD típica	1. NGS HGI - painel de 140 genes Confirmação: Sanger e MLPA	NGS HGI: 88.1% (89/101)*
Mochizuki et al., 2019)	111 (ND)	DRPAD típica	1. NGS HGI para <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> Se mutação não encontrada realiza-se sequencialmente: 2. NGS LR-PCR para <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> 3. Sanger para exão 1 de <i>PKD1</i> 4. MLPA para <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> Confirmação: Sanger	NGS HGI + NGS LR-PCR: 86.4% (96/111)** NGS HGI: 79.2% (76/96) NGS LR-PCR: 57.1%**** (20/35) Sanger (<i>PKD1</i> , Exão 1): 6% (1/15); Utilidade diagnóstica: 0,9% MLPA: 35.7% (5/14); Utilidade diagnóstica: 4.5% NGS HGI ± NGS LR-PCR ± Sanger (<i>PKD1</i> , Exão 1): 87.3% (97/111) NGS HGI ± NGS LR-PCR ± MLPA: 90,9% (101/111) NGS HGI ± NGS LR-PCR ± Sanger (<i>PKD1</i> , exão 1) ± MLPA: 91,9% (102/111)
Mantovani et al., 2020)	212 (ND)	†	1. NGS LR-PCR para <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> Se mutação não encontrada realiza-se sequencialmente: 2. MLPA 3. NGS LR-PCR para painel de genes alargados (<i>GANAB</i> , <i>DNAJB11</i> , <i>LRP5</i> ,	Coorte de validação: 100% Coorte de confirmação + diagnóstico: NGS LR-PCR para <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> ± MLPA ± NGS LR-PCR Painel Alargado: 63.9% (122/191)*; 77,5% (148/191)** MLPA: utilidade diagnóstica: 5,2% (10/191)

			<i>PMM2, PRKCSH, SEC63, SEC61B, ALG8, PKHD1, DZIP1L, HNF1B, UMOD, INF2, REN</i> Confirmação: Sanger	Painel alargado: Taxa de deteção: 21,4% (6/28), utilidade diagnóstica: 3,14%
Mallawaarachchi et al., 2021	144 (ND)	DRPAD típica: 48% DRPAD atípica: 52%	1. WGS - análise por painel virtual apenas para <i>PKD1; PKD2; GANAB; HNF1B; TSC1; TSC2; OFD1; UMOD; PKHD1; DNAJB11, DZIP1L, SEC63</i> Confirmação: LR-PCR, Sanger, MLPA	Coorte de validação: 100% Coorte de diagnóstico: 70% (111/144)** Se fenotípico típico: 81%; (56/69) Se atípico: 60% (45/75)
Kim et al., 2021	26 (26)	DRPAD de padrão ND	1. NGS HGI - painel de 10 genes (<i>PKD1, PKD2, PKHD1, TSC1, TSC2, VHL, HNF1B, NPHP1, NPHP3, NPHP4</i>) + MLPA Confirmados: LR-PCR + Sanger	NGS HGI + MLPA: 73.1% (19/26)**
Wang et al., 2019)	47 (47)	Doença quística bilateral: 44 Doença quística unilateral: 3	1. NGS HGI - painel de 63 genes associados a ciliopatias Se não encontrada mutação: 2. MLPA e/ou WES Confirmação: Sanger	NGS HGI ± MLPA ± WES: 89,4%*** Doença quística bilateral: bilateral: 41/44 Doença quística unilateral: 1/3

Tabela 6 – Estudos genéticos analisados no diagnóstico molecular da DRPAD

*Incluídas mutações (provavelmente) patogénicas;

**Incluídas mutações (provavelmente) patogénicas + VUS;

***Todas as mutações encontradas incluídas;

****Ressalva-se que este grupo é constituído por mutações previamente refratárias a hibridização e por indivíduos em que esta técnica não pode ser desenvolvida.

†Este estudo foi realizado com 212 doentes, separados em 3 coortes. Coorte de validação (21): mutação previamente conhecida; Coorte de confirmação (36): indivíduos com diagnóstico de DRPAD; Coorte de diagnóstico(155): indivíduos em risco de DRPAD;

ND – não definido; NGS - *Next Generation Sequency*; MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; NGS HGI – Painel NGS baseados em hibridização de genes de interesse; NGS LR-PCR - painéis de NGS baseado em LR-PCR; WES- *Whole Exome Sequency*; WGS – *Whole Genome Sequency*;

Proposta de abordagem no diagnóstico molecular do dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo típico

Tendo em consideração todas as questões já descritas, definir um algoritmo ideal para o diagnóstico genético de DRPAD constitui ainda um desafio. O *fluxograma 1* propõe uma possível abordagem, que consideramos ser a mais adequada.

Num indivíduo com risco de DRPAD, em que seja necessária a exclusão de doença de modo a ser considerado um potencial dador, a avaliação inicia-se com uma ecografia renal ao dador. Caso tenha mais de 40 anos e possua um ou nenhum quisto renal, a doença é excluída, podendo este indivíduo ser considerado como potencial dador, já que a ecografia apresenta um VPN de 100% nestes casos. Caso o indivíduo possua menos de 40 anos e 3 ou mais quistos unilaterais/bilaterais ou mais de 40 anos e 2 ou mais quistos em cada rim é realizado o diagnóstico de DRPAD e, por isso, exclui-se o indivíduo como potencial dador. Caso tenha mais de 40 anos e possua quistos renais, sem satisfazer o diagnóstico de DRPAD ou caso tenha menos de 40 anos e menos de 3 quistos renais, deve ser realizado o teste genético devido à impossibilidade de exclusão de doença através das características ecográficas nestes indivíduos.

O teste genético apresenta-se como um instrumento útil no diagnóstico/exclusão de doença nestes doentes, permitindo equacionar decisões terapêuticas com um maior grau de confiança. O estudo genético deve ser realizado inicialmente no recetor, caso este ainda não tenha sido realizado previamente, de modo a identificar a possível mutação responsável pela doença na família. Assumindo um padrão típico de DRPAD, a abordagem inicial centra-se na pesquisa de mutação através de um painel NGS HGI para *PKD2*, *GANAB*, *DNAJB11*, *DZIP1L*, *PKHD1* e NGS LR-PCR para *PKD1*. A escolha deste restrito painel de genes em doentes com DRPAD típica baseou-se na premissa de que até 98% das mutações são expectáveis de ocorrer nos genes *PKD1* e *PKD2*, (Mallawaarachchi et al., 2021), tendo ainda em consideração que tanto o gene *GANAB* como *DNAJB11* podem ser responsáveis por este fenótipo. Este painel de genes engloba também os genes *PKHD1* e *DZIP1L* responsáveis, na maioria dos casos, por um padrão recessivo de doença. Apesar de a sua análise ser pouco útil em indivíduos com história

familiar de doença quística com padrão AD, ou seja, a afectar várias gerações, a requisição destes dois genes torna-se particularmente útil em indivíduos com doença *de novo* ou em que não estejam disponíveis registos familiares. A inclusão dos genes *GANAB*, *DNAJB11*, *DZIP1L* e *PKHD1* parece custo-efetiva já que, sem aumentar o custo da análise relativamente aos outros painéis NGS, permite averiguar, numa fase inicial, os principais genes responsáveis por uma manifestação típica de DRPAD

Caso esta pesquisa seja negativa poderá realizar-se a análise do número de CNVs de *PKD1* e *PKD2* por MLPA de modo a diagnosticar possíveis deleções/inserções não detetadas por NGS.

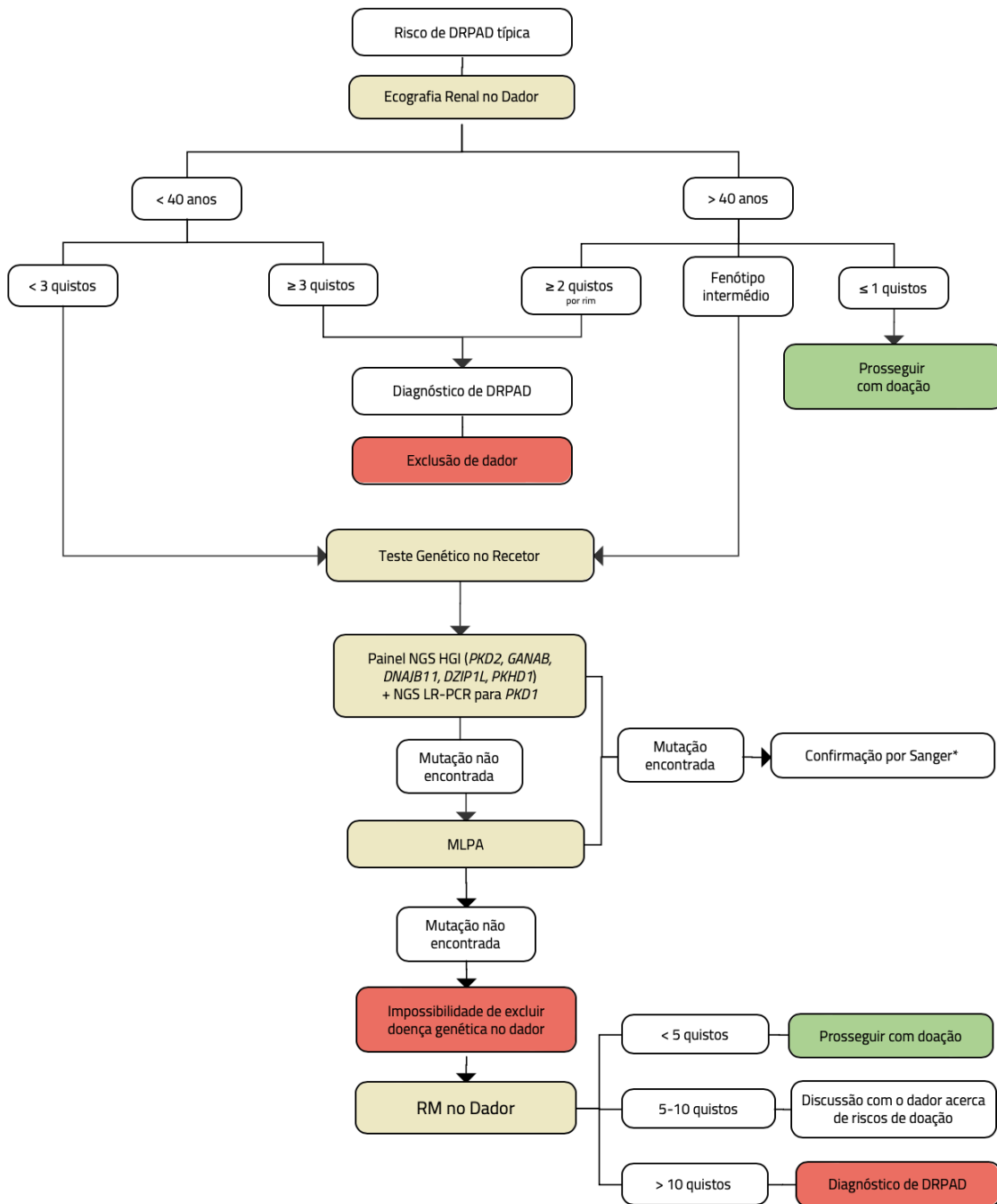
Acreditamos que esta abordagem poderá permitir uma taxa de deteção de mutações de 91,9%, semelhante à encontrada por Mochizuki et al. que utiliza as mesmas técnicas mas de uma forma sequencial, nomeadamente: a requisição inicial de um painel NGS HGI para os genes *PKD1*, *PKD2*, *GANAB*, *DNAJB11*, *DZIP1L*, *PKHD1* seguida de um painel NGS *LR-PCR* para sequenciação de *PKD1* e/ou *PKD2* no caso da mutação não ser identificada inicialmente, e posteriormente MLPA (Mochizuki et al., 2019).

Se for detetada uma mutação no recetor esta deverá ser confirmada por Sanger, dada a complexidade dos genes *PKD1* e *PKD2*, e posteriormente pesquisada também por sequenciação Sanger no dador.

Caso não seja encontrada qualquer mutação no recetor, torna-se impossível excluir doença genética no dador através dos estudos genéticos.

Nestes casos, pode ser útil complementar o estudo do dador com a realização de RMN. De facto, a RMN permite a distinção entre indivíduos com doença e sem doença, através da presença de mais de 10 quistos renais em indivíduos com risco de 50% de DRPAD entre os 16-40 anos, sendo o *cut-off* para exclusão de doença em potenciais dadores de 5 quistos (com um VPN de 100% e sensibilidade de 98.3%) em detrimento dos 10 para a população geral em risco (Pei et al., 2015). Posto isto, em potenciais dadores aparentados de um recetor com DRPAD em que não se tenha conseguido identificar a mutação causal, se apresentarem menos de 5 quistos na RM, poderão ser considerados potenciais dadores. Caso se detetem mais de 10 quistos é feito o diagnóstico de DRPAD e por isso são excluídos como potenciais dadores. Caso estejamos perante um fenótipo

intermédio, com a identificação de 5 a 10 quistos continuaremos sem ter certezas quanto à presença de DRPAD, devendo ser discutidos os riscos da doação com o dador. A RM apresenta-se assim neste algoritmo como complementar ao estudo ecográfico e genético, em indivíduos em que o estudo molecular foi negativo. Esta escolha fundamenta-se no facto de os critérios diagnósticos por RM serem menos substanciados que os genéticos, já que se baseiam, como já descrito, num único estudo, com um número reduzido de doentes. Adicionalmente, a RM, poderá ser igualmente dispendiosa. Posto isto, não consideramos prudente a exclusão da RM deste algoritmo mas o seu uso torna-se circunscrito para casos em que o estudo molecular foi negativo ou em que o significado da mutação não permite retirar conclusões acerca da elegibilidade de um individuo como potencial dador.



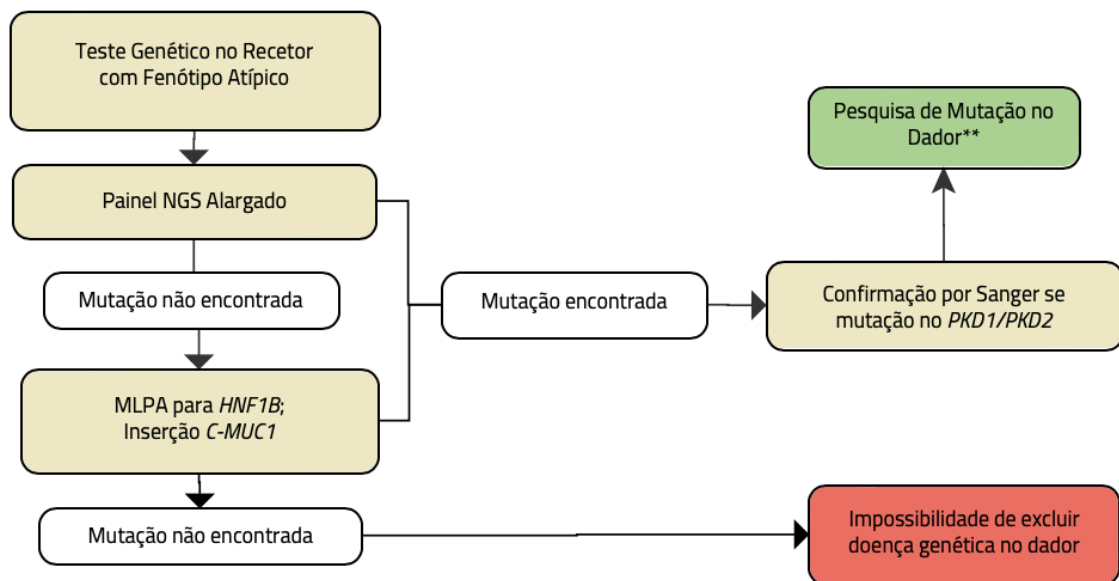
Fluxograma 1: Abordagem inicial ao dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo típico

*A confirmação por Sanger deve ser realizada se a mutação identificada em *PKD1* e/ou *PKD2*;

**Consultar Fluxograma 3; DRPAD – Doença Renal Poliúística Autossómica Dominante; NGS – Next Generation Sequency; LR-PCR – Long Range Polymerase Chain Reaction; MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; Painel NGS HGI - painéis de NGS baseados em hibridização de genes de interesse; NGS LR-PCR- NGS baseado em LR-PCR; RM – Ressonância Magnética;

Proposta de abordagem inicial ao dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo atípico

Assumindo um padrão atípico de DRPAD, a abordagem inicial centra-se na pesquisa de mutação através de um painel NGS baseado em WES, com um número mais alargado de genes, e que na realidade portuguesa inclui 32 ou 72 genes responsáveis por doença renal poliquística e doenças relacionadas. A escolha deste amplo painel de genes em doente com DRPAD atípica justifica-se dada a maior heterogeneidade génica deste fenótipo. Caso a mutação não seja identificada poderá proceder-se a técnicas de MLPA para os genes *HNF1B* e *MUC1*, no caso de doentes com padrão típico de doença renal túbulo-intersticial autossómica dominante. A requisição da análise de outros genes deve ser discutida caso a caso, dependendo do fenótipo do doente.



Fluxograma 2: Abordagem inicial ao dador vivo aparentado na DRPAD com fenótipo atípico; Os painéis alargados de genes na DRPAD disponíveis em Portugal constam na *tabela 6*, onde poderão ser consultados os genes a analisar; **Consultar Fluxograma 3; NGS – Next Generation Sequency; MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; WES – Whole Exome Sequency; NGS LR-PCR – NGS baseado em LR-PCR; NGS HGI - NGS baseado em hibridização de genes de interesse;

Interpretação de resultados e avaliação do dador

Após identificada uma mutação no doente com DRPAD é fulcral compreender se a mutação foi previamente identificada ou se nunca foi descrita – *novel mutation* – e classificá-la quanto à sua patogenicidade. Este último passo no diagnóstico genético do recetor permitirá equacionar qual a abordagem subsequente para o dador aparentado.

Segundo a *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP)* as mutações podem ser classificadas em 5 classes quanto à sua patogenicidade em mutações benignas, provavelmente benignas, de significado indeterminado (VUS), provavelmente patogénicas ou patogénicas (Richards et al., 2015). Cada uma destas nomenclaturas está associada a uma probabilidade de causalidade, ou seja, a probabilidade de essa mutação poder causar doença, como ilustrada na *tabela 7*. A consideração acerca da patogenicidade de uma mutação deve ser universal e independente do fenótipo do doente (Richards et al., 2015).

Classificação	Probabilidade de causalidade
Patogénica	>95%
Provavelmente patogénica	>90%
VUS	10 a 90%
Provavelmente benigna	<10 %
Benigna	<5%

Tabela 7: Probabilidade de causalidade de acordo com o tipo de mutação.

*A probabilidade de causalidade de uma variante provavelmente patogénica varia entre autores, sendo que segundo a ACMG/AMP corresponde a valores superiores a 90%. Adaptado de Towbin et al., 2019; VUS – Variante de Significado Indeterminado

Variante Patogénica ou Provavelmente Patogénica

Caso a variante identificada no recetor tiver sido classificada como patogénica ou provavelmente patogénica, deve ser realizada a sequenciação direta por Sanger para essa mutação no dador. Caso essa mutação seja encontrada no dador, é feito o

diagnóstico de DRPAD, sendo o indivíduo excluído como dador. Caso a mutação não seja identificada exclui-se doença e o indivíduo poderá ser proposto como potencial dador.

Variante Benigna ou Provavelmente Benigna

Caso a variante identificada no recetor tiver sido classificada como benigna ou provavelmente benigna, significa que não conseguimos identificar a mutação patogénica que está na origem da DRPAD naquela família e, portanto, não podemos prosseguir com estudos genéticos adicionais no dador. Outros métodos para a exclusão de DRPAD devem ser equacionados, nomeadamente a RM, já que possui critérios de exclusão bem definidos.

Variante de Significado Indeterminado (VUS)

Mutações classificadas como benignas, potencialmente benignas, patogénicas e potencialmente patogénicas permitem um maior grau de certeza na tomada de decisões clínicas, o que não acontece com as VUS.

Caso a mutação detetada no recetor seja uma VUS, estes resultados devem ser interpretados com cautela (Harris et al., 2002). Apesar de vários estudos sugerirem que a maioria das VUS são posteriormente reclassificadas como benignas (Tsai et al., 2018), esta conduta comporta riscos de *missjudgment* superiores àqueles que qualquer centro de transplante estará disposto a correr. Nestes casos, torna-se necessária a sua reclassificação na tentativa de retirar elações acerca da sua patogenicidade.

Para a reclassificação de uma mutação podem ser utilizados diferentes métodos tais como consultas periódicas de plataformas de bases de dados de mutações descritas na DRPAD, reavaliação em programas de predição de patogenicidade *in silico* e testes de segregação familiar da mutação.

Bases de dados como a *gnomAD* (<https://www.gnomad.broadinstitute.org>), permitem a comparação com o genoma de indivíduos saudáveis e averiguar qual a frequência da mutação na população em geral. *Disease databases* são bases de dados que contêm mutações previamente descritas associados à respetiva doença, assim como à patogenicidade da mutação. Entre as mais conhecidas destaca-se a *ClinVar*

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) e a OMIM (<https://www.omim.org>), e no contexto da DRPAD a *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Mutation Database (PKDB- <https://pkdb.mayo.edu/>)*. Dado o seu fácil acesso e a sua ampla utilização por clínicas em todo o mundo estas plataformas são uma ferramenta útil. No entanto, a informação contida nestas bases de dados não deve ser taxativa caso não haja robustez de dados suficiente. O mesmo se aplica a dados retirados da literatura. A comunicação entre diversos centros de referência poderá também ser útil na partilha de informação sobre VUS.

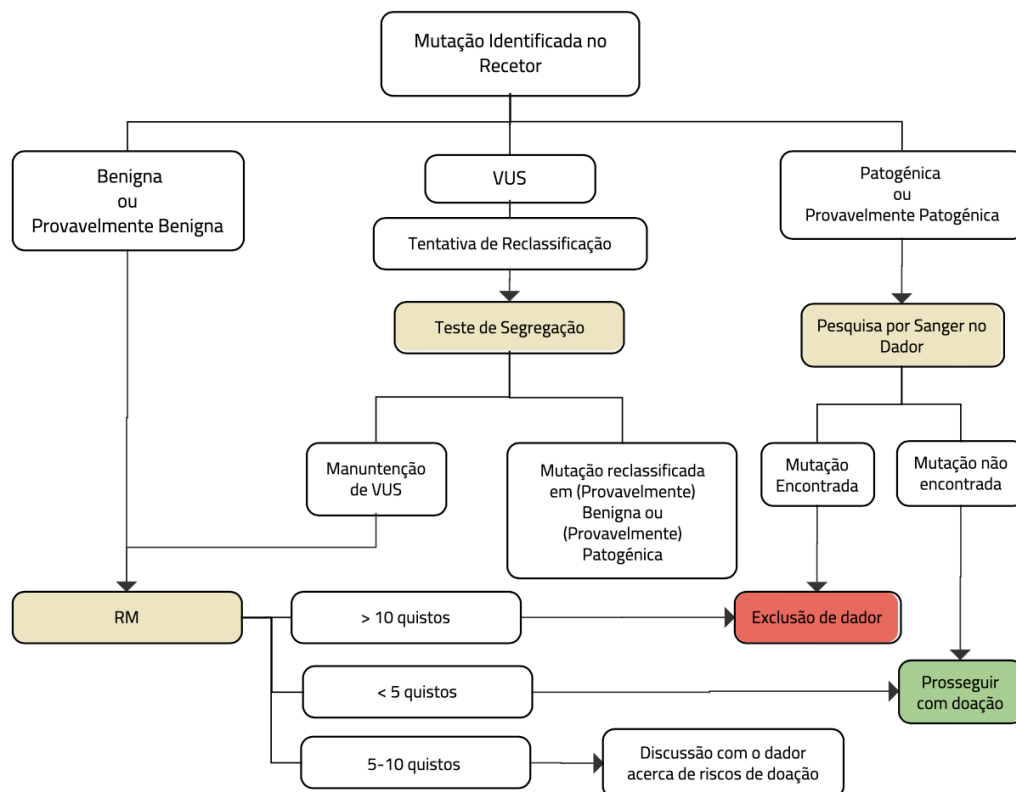
Em casos em que determinada mutação não foi descrita, o que constitui cerca de 70% das mutações de DRPAD (Ali et al., 2019), programas de predição de patogenicidade *in silico* permitem prever se uma mutação *missense* leva a alterações funcionais ou estruturais da proteína ou ainda se afeta o *splicing*. É recomendada uma abordagem através de diferentes algoritmos de predição, já que estes se revelaram complementares, dado que avaliam parâmetros diferentes, nomeadamente conservação de um aminoácido/nucleótido, a localização na sequência da proteína e a consequência bioquímica desta mutação. Exemplos destes programas são o *PolyPhen* (<http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e o *MutationTaster* (<https://www.mutationtaster.org>). Dado serem apenas predições não é aconselhado que se tomem decisões clínicas tendo por base unicamente esta informação (Richards et al., 2015).

Podem ainda ser usados testes de análise da segregação da mutação na família, que ao analisar genotipicamente e fenotipicamente indivíduos de uma família tentam inferir acerca da probabilidade de causalidade dessa mutação, ou seja, se essa mutação poderá ser responsável por causar doença nos indivíduos da família afetados. Várias abordagens estatísticas podem ser usadas por geneticistas de modo a calcular o *likelihood ratio for causality*, que permitirá classificar uma mutação de acordo com as cinco categorias estabelecidas pela ACMG/AMP. Quanto mais indivíduos incluídos, maior a probabilidade de classificação de uma variante (Tsai et al., 2018). Todas estas características permitem classificar as variantes segundo a ACMG/AMP como apresentado no anexo 3.

Caso a mutação seja reclassificada como patogénica, potencialmente patogénica, benigna ou potencialmente benigna deve ser seguido o fluxograma tendo em conta a

nova reclassificação. Caso a mutação permaneça uma variante de significado indeterminado não deverão ser tomadas decisões clínicas com base nesta informação genética e, portanto, a abordagem será semelhante à mutação benigna ou provavelmente benigna, com realização posterior de RM, como descrito acima.

O *fluxograma 3* pretende sistematizar esta informação, apresentando a abordagem ao dador vivo aparentado consoante a mutação identificada no recetor.



Fluxograma 3: Abordagem ao dador vivo aparentado na DRPAD consoante a mutação identificada no recetor. Na tentativa de reclassificação de uma VUS devem ser tentadas outras abordagens. Estas incluem consulta periódica de bases de dados como *gnomAD* (<https://www.gnomad.broadinstitute.org>), *disease databases* [ex: *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>); *PKDB* (<https://pkdb.mayo.edu/>)] e a utilização de programas de predição de patogenicidade *in silico* [ex: *PolyPhen* (<http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); *MutationTaster* (<https://www.mutationtaster.org/>)]; RM – Ressonância Magnética; VUS – Variante de significado indeterminado

Aconselhamento Genético

O aconselhamento genético pré e pós teste é essencial, e tem como objetivo no pré-teste esclarecer os potenciais resultados do teste genético, nomeadamente a probabilidade de identificar a mutação causal, a possibilidade de ser identificada uma mutação de significado indeterminado, que poderá não alterar a abordagem terapêutica, a possível identificação de mutações acidentais noutros genes, sobretudo se usadas técnicas como WGS, WES ou painéis alargados, e as suas possíveis implicações. Na consulta pós-teste é importante não só clarificar o prognóstico e possíveis abordagens terapêuticas como a discussão da necessidade de rastreios familiares (Knoers et al., 2022).

Os geneticistas têm um papel central na abordagem e aconselhamento destes indivíduos, encarregando-se da prescrição de testes em indivíduos assintomáticos, ou seja, nos potenciais dadores vivos aparentados.

Limitações

Apesar de ser expectável que este algoritmo facilite a avaliação de dadores vivos aparentados na DRPAD na grande maioria dos casos, este apresenta limitações. Os estudos imagiológicos que sustentam todo o algoritmo, apesar de devidamente validados, incluíram apenas indivíduos cuja probabilidade de desenvolver DRPAD é de 50%. Uma probabilidade pré-teste de 50% é apenas obtida caso os indivíduos aparentados avaliados sejam familiares em primeiro grau do recetor (Pais-filhos e irmãos), o que poderá não se aplicar (i.e. primos, tios, etc). Considera-se, no entanto, que esta condição não deve ser interpretada como limitante na avaliação de doentes aparentados que não sejam familiares em primeiro grau.

Dada a inclusão relativamente recente de testes genéticos na prática clínica há ainda discrepância nos resultados obtidos consoante o laboratório, sobretudo em genes de sequenciação difícil como o *PKD1*. Desta forma, devem ser requisitados testes genéticos a laboratórios nacionais de referência, de modo a minimizar este risco. Adicionalmente, e como verificámos nos estudos analisados, as técnicas de sequenciação utilizadas podem influenciar o VPN e assim a probabilidade de excluir com certeza doença.

Conclusão

Atualmente, o transplante renal constitui a terapêutica substitutiva da função renal que mais beneficia doentes com doença renal crónica terminal, sendo previsível que a avaliação de dadores vivos seja cada vez mais frequente na prática clínica. Neste trabalho procurou realizar-se uma extensa pesquisa bibliográfica com vista à realização de um algoritmo que permitisse auxiliar os clínicos na avaliação de dadores vivos aparentados na DRPAD, a doença genética renal mais frequente.

Esta análise permitiu evidenciar a variabilidade fenotípica e genotípica desta doença. Estas características tornam particularmente desafiante a elaboração de um algoritmo que permita a exclusão de doença em potenciais dadores vivos aparentados.

Tendo em consideração a robustez dos dados recolhidos na literatura, este algoritmo apresenta-se como um instrumento que consideramos seguro no auxílio da tomada de decisão. Esta abordagem beneficia não só o potencial dador e recetor do transplante renal, como o clínico, dado que a complexidade genética desta questão poderá ser um obstáculo na avaliação dos mesmos. Por fim, aconselha-se que este fluxograma seja testado na prática clínica de modo a averiguar a sua utilidade no encaminhamento destes doentes.

Referências Bibliográficas

- Ali, H., Al-Mulla, F., Hussain, N., Naim, M., Asbeutah, A. M., AlSahow, A., Abu-Farha, M., Abubaker, J., Al Madhoun, A., Ahmad, S., & Harris, P. C. (2019). PKD1 Duplicated regions limit clinical Utility of Whole Exome Sequencing for Genetic Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40761-w>
- Atmıř, B., Karabay-Bayazit, A., Melek, E., Biřgin, A., & Anarat, A. (2019). Renal features of bardet biedl syndrome: A single center experience. *Turkish Journal of Pediatrics*, *61*(2), 186–192. <https://doi.org/10.24953/turkjpel.2019.02.006>
- Bae, K. T., Zhou, W., Shen, C., Landsittel, D. P., Wu, Z., Tao, C., Chapman, A. B., Torres, V. E., Yu, A. S. L., Mrug, M., Bennett, W. M., & Harris, P. C. (2019). Growth pattern of kidney cyst number and volume in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *14*(6), 823–833. <https://doi.org/10.2215/CJN.10360818>
- Barua, M., & Pei, Y. (2010). Diagnosis of autosomal-dominant polycystic kidney disease: An integrated approach. *Seminars in Nephrology*, *30*(4), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.06.002>
- Bergmann, C. (2018). Genetics of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease and Its Differential Diagnoses. Em *Frontiers in Pediatrics* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00221>
- Bergmann, C., Woodford, L., Harris, P., Horie, S., Peters, D., & Torres, V. (2018). Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*.
- Bullich, G., Domingo-Gallego, A., Vargas, I., Ruiz, P., Lorente-Grandoso, L., Furlano, M., Fraga, G., Madrid, Á., Ariceta, G., Borregán, M., Piñero-Fernández, J. A., Rodríguez-Peña, L., Ballesta-Martínez, M. J., Llano-Rivas, I., Meñica, M. A., Ballarín, J., Torrents, D., Torra, R., & Ars, E. (2018). A kidney-disease gene panel allows a comprehensive genetic diagnosis of cystic and glomerular inherited kidney diseases. *Kidney International*, *94*(2), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.02.027>
- Chapman, A. B., Devuyst, O., Eckardt, K. U., Gansevoort, R. T., Harris, T., Horie, S., Kasiske, B. L., Odland, D., Pei, Y., Perrone, R. D., Pirson, Y., Schrier, R. W., Torra, R., Torres, V. E., Watnick, T., Wheeler, D. C., Ahn, C., Alam, A., Aussilhou, B., ... Winston, K. Y. (2015). Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): Executive summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International*, *88*(1), 17–27. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.59>
- Chapman, J. R., Baan, C. C., Bromberg, J. S., Geissler, E. K., Pomfret, E. A., Tullius, S. G., Anegon, I., Berenguer, M., Brennan, D. C., Chong, A. S., Emond, J. C., Kwan, C. L., Kazunari, M., Helio, T., Silva, T., Hughes, G., Francom, S., Bradley, J. A., Brent, L., ... Zorn, E. (2017). Transplantation® International Liver Transplantation Society Editor-in-Chief Executive Editors Managing Editor Editorial Coordinator Editor's Advisory Council Associate Editors Social Media Editor Editorial Assistants Editorial Fellows TP_V101N5_EB Transplantation® International Liver Transplantation Society Official Journal of The Transplantation Society &. Em *Transplantation* (Vol. 101). www.transplantjournal.com
- Chebib, F. T., Perrone, R. D., Chapman, A. B., Dahl, N. K., Harris, P. C., Mrug, M., Mustafa, R. A., Rastogi, A., Watnick, T., Yu, A. S. L., & Torres, V. E. (2018). A practical guide for

- treatment of rapidly progressive ADPKD with tolvaptan. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(10), 2458–2470. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018060590>
- Chebib, F. T., & Torres, V. E. (2016). Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *American Journal of Kidney Diseases*, 67(5), 792–810. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.07.037>
- Claisse, G., Gaillard, F., & Mariat, C. (2020). Living kidney donor evaluation. Em *Transplantation* (pp. 2487–2496). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003242>
- Colbert, G. B., Elrkkal, M. E., Gaur, L., & Lerma, E. V. (2020). Update and review of adult polycystic kidney disease. *Disease-a-Month*, 66(5). <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.100887>
- Cordido, A., Besada-Cerecedo, L., & García-González, M. A. (2017). The genetic and cellular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease-A primer for clinicians. Em *Frontiers in Pediatrics* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00279>
- Cornec-Le Gall, E., Alam, A., & Perrone, R. D. (2019). Autosomal dominant polycystic kidney disease. Em *The Lancet* (Vol. 393, Número 10174, pp. 919–935). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32782-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32782-X)
- Elliott, M. D., James, L. C., Simms, E. L., Sharma, P., Girard, L. P., Cheema, K., Elliott, M. J., Lauzon, J. L., & Chun, J. (2021). Mainstreaming Genetic Testing for Adult Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Canadian Journal of Kidney Health and Disease*, 8. <https://doi.org/10.1177/205435812111055001>
- Gall, E. C. Le, Audrézet, M. P., Rousseau, A., Hourmant, M., Renaudineau, E., Charasse, C., Morin, M. P., Moal, M. C., Dantal, J., Wehbe, B., Perrichot, R., Frouget, T., Vigneau, C., Potier, J., Jousset, P., Guillodo, M. P., Siohan, P., Terki, N., Sawadogo, T., ... Le Meur, Y. (2016). The PROPKD score: A new algorithm to predict renal survival in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(3), 942–951. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010016>
- Gaur, P., Gedroyc, W., & Hill, P. (2019). *ADPKD-what the radiologist should know*.
- Grantham, J. J. (2008). *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*. www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/child_tbl.htm
- Groopman, E. E., Rasouly, H. M., & Gharavi, A. G. (2018). Genomic medicine for kidney disease. Em *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 14, Número 2, pp. 83–104). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.167>
- Guidelines for Living Donor Kidney Transplantation United Kingdom Guidelines*. (2018). www.bts.org.uk
- Harris, P. C., Torres, V. ; E., Adam, M. P., Everman, D. B., & Mirzaa, G. M. (2002). *Polycystic Kidney Disease, Autosomal Dominant*.
- Higashihara, E., Yamamoto, K., Kaname, S., Okegawa, T., Tanbo, M., Yamaguchi, T., Shigemori, K., Miyazaki, I., Yokoyama, K., & Nutahara, K. (2019). Age- and height-adjusted total kidney volume growth rate in autosomal dominant polycystic kidney diseases. *Clinical and Experimental Nephrology*, 23(1), 100–111. <https://doi.org/10.1007/s10157-018-1617-8>
- Institute, M., Children, R., Ravine FRACP, H. D., Sheffield FRACP, L., Danks, D. M., of Radiology, D., G Walker, N. R., Kincaid-Smith, P., & Melbourne Hospital, R. (1994). Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. Em *Lancet* (Vol. 343).

- Kanaan, N., Devuyt, O., & Pirson, Y. (2014). Renal transplantation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Em Nature Reviews Nephrology* (Vol. 10, Número 8, pp. 455–465). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.104>
- Kim, H., Kim, H. H., Chang, C. L., Song, S. H., & Kim, N. (2021). Novel PKD1 Mutations in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Laboratory medicine*, 52(2), 174–180. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmaa047>
- Kinoshita, M., Higashihara, E., Kawano, H., Higashiyama, R., Koga, D., Fukui, T., Gondo, N., Oka, T., Kawahara, K., Rigo, K., Hague, T., Katsuragi, K., Sudo, K., Takeshi, M., Horie, S., & Nutahara, K. (2016). Technical evaluation: Identification of pathogenic mutations in *pkd1* and *pkd2* in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease by next-generation sequencing and use of a comprehensive new classification system. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166288>
- Knoers, N., Antignac, C., Bergmann, C., Dahan, K., Giglio, S., Heidet, L., Lipska-Ziętkiewicz, B. S., Noris, M., Remuzzi, G., Vargas-Poussou, R., & Schaefer, F. (2022). Genetic testing in the diagnosis of chronic kidney disease: Recommendations for clinical practice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 37(2), 239–254. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab218>
- Lanktree, M. B., Haghghi, A., Di Bari, I., Song, X., & Pei, Y. (2021). Insights into autosomal dominant polycystic kidney disease from genetic studies. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 16(5), 790–799. <https://doi.org/10.2215/CJN.02320220>
- Lanktree, M. B., Haghghi, A., Guiard, E., Iliuta, I. A., Song, X., Harris, P. C., Paterson, A. D., & Pei, Y. (2018). Prevalence estimates of polycystic kidney and liver disease by population sequencing. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(10), 2593–2600. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018050493>
- Lanktree, M. B., Iliuta, I. A., Haghghi, A., Song, X., & Pei, Y. (2019). Evolving role of genetic testing for the clinical management of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Em Nephrology Dialysis Transplantation* (Vol. 34, Número 9, pp. 1453–1460). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy261>
- Mallawaarachchi, A. C., Hort, Y., Cowley, M. J., McCabe, M. J., Minoche, A., Dinger, M. E., Shine, J., & Furlong, T. J. (2016). Whole-genome sequencing overcomes pseudogene homology to diagnose autosomal dominant polycystic kidney disease. *European Journal of Human Genetics*, 24(11), 1584–1590. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.48>
- Mallawaarachchi, A. C., Lundie, B., Hort, Y., Schonrock, N., Senum, S. R., Gayevskiy, V., Minoche, A. E., Hollway, G., Ohnesorg, T., Hinchcliffe, M., Patel, C., Tchan, M., Mallett, A., Dinger, M. E., Rangan, G., Cowley, M. J., Harris, P. C., Burnett, L., Shine, J., & Furlong, T. J. (2021). Genomic diagnostics in polycystic kidney disease: an assessment of real-world use of whole-genome sequencing. *European Journal of Human Genetics*, 29(5), 760–770. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-00796-4>
- Mantovani, V., Bin, S., Graziano, C., Capelli, I., Minardi, R., Aiello, V., Ambrosini, E., Cristalli, C. P., Mattiaccio, A., Pariali, M., De Fanti, S., Faletra, F., Grosso, E., Cantone, R., Mancini, E., Mencarelli, F., Pasini, A., Wischmeijer, A., Sciascia, N., ... La Manna, G. (2020). Gene Panel Analysis in a Large Cohort of Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Allows the Identification of 80 Potentially Causative Novel Variants and the Characterization of a Complex Genetic Architecture in a Subset of Families. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00464>

- Mochizuki, T., Teraoka, A., Akagawa, H., Makabe, S., Akihisa, T., Sato, M., Kataoka, H., Mitobe, M., Furukawa, T., Tsuchiya, K., & Nitta, K. (2019). Mutation analyses by next-generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification in Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clinical and Experimental Nephrology*, 23(8), 1022–1030. <https://doi.org/10.1007/s10157-019-01736-3>
- Oh, Y. K., Park, H. C., Ryu, H., Kim, Y. C., & Oh, K. H. (2021). Clinical and genetic characteristics of Korean autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Em Korean Journal of Internal Medicine* (Vol. 36, Número 4, pp. 767–779). Korean Association of Internal Medicine. <https://doi.org/10.3904/kjim.2021.176>
- Ong, A. C. M., Devuyst, O., Knebelmann, B., & Walz, G. (2015). Updates in renal medicine 2 Autosomal dominant polycystic kidney disease: the changing face of clinical management. *Em www.thelancet.com* (Vol. 385). www.thelancet.com
- Pei, Y., Hwang, Y. H., Conklin, J., Sundsbak, J. L., Heyer, C. M., Chan, W., Wang, K., He, N., Rattansingh, A., Atri, M., Harris, P. C., & Haider, M. A. (2015). Imaging-based diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(3), 746–753. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014030297>
- Pei, Y., Obaji, J., Dupuis, A., Paterson, A. D., Magistroni, R., Dicks, E., Parfrey, P., Cramer, B., Coto, E., Torra, R., San Millan, J. L., Gibson, R., Breuning, M., Peters, D., & Ravine, D. (2009). Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(1), 205–212. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050507>
- Pei, Y., & Watnick, T. (2010). Diagnosis and Screening of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Em Advances in Chronic Kidney Disease* (Vol. 17, Número 2, pp. 140–152). <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2009.12.001>
- Rangan, G. K., Alexander, S. I., Campbell, K. L., Dexter, M. A. J., Lee, V. W., Lopez-Vargas, P., Mai, J., Mallett, A., Patel, C., Patel, M., Tchan, M. C., Tong, A., Tunnicliffe, D. J., Vladica, P., & Savage, J. (2016). KHA-CARI guideline recommendations for the diagnosis and management of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrology*, 21(8), 705–716. <https://doi.org/10.1111/nep.12658>
- Reiterová, J., & Tesař, V. (2022). Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: From Pathophysiology of Cystogenesis to Advances in the Treatment. *Em International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23063317>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Santoni, M., Piva, F., Cimadamore, A., Giulietti, M., Battelli, N., Montironi, R., Cosmai, L., & Porta, C. (2020). Exploring the spectrum of kidney ciliopathies. *Em Diagnostics* (Vol. 10, Número 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10121099>
- Schönauer, R., Baatz, S., Nemitz-Kliemchen, M., Frank, V., Petzold, F., Sewerin, S., Popp, B., Münch, J., Neuber, S., Bergmann, C., & Halbritter, J. (2020). Matching clinical and genetic diagnoses in autosomal dominant polycystic kidney disease reveals novel phenocopies and potential candidate genes. *Genetics in Medicine*, 22, 1374–1383. <https://doi.org/10.1038/s41436>

- Simms, R. J., Travis, D. L., Durkie, M., Wilson, G., Dalton, A., & Ong, A. C. M. (2015). Genetic testing in the assessment of living related kidney donors at risk of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Transplantation*, *99*(5), 1023–1029. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000466>
- Soroka, S., Alam, A., Bevilacqua, M., Girard, L. P., Komenda, P., Loertscher, R., McFarlane, P., Pandeya, S., Tam, P., & Bichet, D. G. (2018). Updated Canadian Expert Consensus on Assessing Risk of Disease Progression and Pharmacological Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Canadian Journal of Kidney Health and Disease*, *5*. <https://doi.org/10.1177/2054358118801589>
- Tanaka, A., Hiramatsu, E., Watanabe, Y., Ito, C., Shinjo, H., Otsuka, Y., & Takeda, A. (sem data). *The efficacy of long-term treatment with Tolvaptan to prolong the time until dialysis initiation in patients with chronic kidney disease and heart failure: Effect of Tolvaptan in patients with CKD and HF*. <https://doi.org/10.1111/tap.12789>
- Tchan, M., Savige, J., Patel, C., Mallett, A., Tong, A., Tunnicliffe, D. J., & Rangan, G. K. (2015). KHA-CARI Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Guideline: Genetic Testing for Diagnosis. *Em Seminars in Nephrology* (Vol. 35, Número 6, pp. 545-549.e2). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2015.10.007>
- Tsai, G. J., Michael, J., Rañola, O., Smith, C., Garrett, L. T., Bergquist, T., Casadei, S., Bowen, D. J., & Shirts, B. H. (2018). Outcomes of 92 patient-driven family studies for reclassification of variants of uncertain significance. *Genetics in Medicine*, *21*, 1435–1442. <https://doi.org/10.1038/s41436>
- Wang, T., Li, Q., Shang, S., Geng, G., Xie, Y., Cai, G., & Chen, X. (2019). Identifying gene mutations of Chinese patients with polycystic kidney disease through targeted next-generation sequencing technology. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *7*(6). <https://doi.org/10.1002/mgg3.720>
- Zacchia, M., Blanco, F. D. V., Trepiccione, F., Blasio, G., Torella, A., Melluso, A., Capolongo, G., Pollastro, R. M., Piluso, G., Di Iorio, V., Simonelli, F., Viggiano, D., Perna, A., Nigro, V., & Capasso, G. (2021). Nephroplex: a kidney-focused NGS panel highlights the challenges of PKD1 sequencing and identifies a founder BBS4 mutation. *Journal of Nephrology*, *34*(6), 1855–1874. <https://doi.org/10.1007/s40620-021-01048-4>

Anexos

Anexo 1 – Diagnóstico Diferencial de DRPAD

Doença	Epidemiologia	Padrão de Hereditariedade /Mutação	Quadro Clínico	Referências
DRPAR	1:20 000	AR <i>PKHD1</i>	Oligohidrâmnios e hipoplasia pulmonar in útero; Fibrose hepática congênita, doença de Caroli; No início da vida: rins quísticos aumentados e ecogénicos, tornando-se menores ao longo do tempo. Quistos raramente excedem 1-2cm.	(Harris et al., 2002; Pei & Watnick, 2010)
DRPAR	1: 3 000 000	AR <i>DZP1L</i>	Rins aumentados com pequenos e numerosos quistos, hiperecogénicos e sem diferenciação cortico-medular	(Lanktree et al., 2021)
DRPAD associado ao DNAJB11	1:12 312	AD <i>DNAJB11</i>	Quistos hepáticos presentes em alguns casos; Pequenos quistos renais bilaterais, sem aumento ht-VRT. Em indivíduos mais velhos, rins fibróticos e pode ocorrer DRC [3]	(Harris et al., 2002; Lanktree et al., 2021)
Doença hepática poliquística	NA	AD <i>GANAB</i> <i>ALG8; LRP5</i> <i>PRKCSH; SEC63;</i> <i>SEC61B; ALG9</i>	Fenótipo com quistos hepáticos predominantemente associados a pequeno número de quistos renais; <i>GANAB: Overlap</i> entre DRPAD e DHPAD <i>ALG9: semelhante a fenótipo de DRTAD, com rins diminuídos e função renal diminuída</i>	(Harris et al., 2002; Pei & Watnick, 2010)
Síndrome de von Hippel-Lindau	1:50 000	AD Mutação do gene supressor tumoral <i>VHL</i>	Desenvolvimento de numerosos tumores benignos; hemangioblastoma da retina/SNC; quistos pancreáticos; feocromocitoma, cistoadenoma do epidídimo Carcinoma de células renais, por norma bilateral com formação concomitante de quistos renais	(Barua & Pei, 2010; Gaur et al., 2019)
Esclerose Tuberosa	1:10 000	AD Mutação <i>TSC1</i> e <i>TSC2</i> ; Deleção contígua de <i>PKD1/TSC2</i>	Lesões cutâneas, hamartomas da retina, convulsões; angiomiolipomas renais; Doença poliquística da infância com evolução para DRC nas duas primeiras décadas de vida Ecograficamente lesões hiperecoicas no córtex renal	(Barua & Pei, 2010; Gaur et al., 2019)

Doença Renal Tubulo-intersticial Autossômica Dominante	Variável consoante o subtipo	AD <i>UMOD, MUC1, REN1, SEC61, HNF1B, DNAJB11</i>	Quistos renais pequenos em rins pequenos ou de dimensões normais, com fibrose tubulo intersticial e evolução para DRC com necessidade de TSFR.	(Harris et al., 2002; Lanktree et al., 2021)
Nefronoftise	1: 100 000	AR <i>NPHP1 (20%), AHI1, ATXN10, CEP41, GLIS2, IFT122, IFT43, IFT140, IQCB1, NEK8, NPHP3, NPHP4, SDCCAG8, TMEM138, TMEM216, TMEM67, TTC21B, WDR19, XPNPEP3</i>	Ciliopatia: Defeitos na retina, fibrose hepática, anomalias esqueléticas, distúrbios do desenvolvimento do sistema nervoso; Alterações na concentração de urina, polidipsia e poliúria, DRC com necessidade de TSFR durante a infância/adolescência; Rins de tamanho normal com aumento da ecogenicidade, associado em alguns casos a quistos renais. Biópsia: <i>tubular basement lesions</i> e fibrose intersticial	(Santoni et al., 2020)
Síndrome de Bardet-Biedl	1:125 000	AR <i>BBS1 (50%), BBS10 (20%)</i>	Ciliopatia: Degeneração da retina, ataxia, hipotonia, malformações faciais e cardíacas, polidactilia, oligospermia e infertilidade, dificuldades na aprendizagem Evolução para DRC com necessidade de TSFR; Alterações estruturais do sistema urinário; Ecografia: Quistos quísticos, hiperecogénicos e com hipoplasia renal.	(Atmiş et al., 2019)
Síndrome orofacialdigital	Muito raro	Ligada ao X Dominante; Mutações no <i>OFD1</i>	Letal para embriões do sexo masculino, fenda palatina, língua bífida, hipertelorismo, crista nasal alargada, sindactilia, malformações do sistema nervoso central	Pei & Watnick, 2010)
Quistos renais simples	Comum, aumenta a incidência com a idade Raro se < 30 anos;		Função Renal normal Rins de normais dimensões. Quistos podem ser unilaterais, mas com o envelhecimento podem tornar-se bilaterais.	(Gaur et al., 2019; Simms et al., 2015)

Doença Renal Quística Adquirida	Comum Doentes com DRCT por norma em diálise. Sem história prévia de doença quística		Rins de pequenas dimensões; parênquima com sinais de atrofia e proliferação de múltiplos quistos de pequenas dimensões. Devem ser despistadas possíveis complicações como hemorragia ou desenvolvimento de neoplasia.	(Gaur et al., 2019)
Carcinoma de células Renais	Ocorre em pacientes com DRPAD, mas com a mesma incidência que na população geral.		Quistos de paredes espessadas irregulares e com separações internas são características de suspeição. Devem ser reavaliados através de nova ecografia posteriormente ou por RM que distingue lesões benignas de malignas. Caso há ganho de realce após a administração de gadolínio deve ser realizada biópsia já que a maioria dos quistos benignos complexos não captam contraste. A escala de Bosniak auxilia nesta distinção.	(Gaur et al., 2019)

Anexo 2: Avaliação Standard do Dador Renal Vivo

Parâmetros a avaliar	MCDTS	
Função Renal - TFG - Albuminúria (Rácio albumina-creatinina; confirmação por taxa de excreção de albumina) - Hematúria	Ureia e creatinina séricas Urina II com sedimento urinário e urocultura Renograma (confirmação da TFG e simetria)	Elegíveis: TFG > 90mL/min por 1.73 m ² Albuminúria < 30mg/d Hematúria: equacionar se causa reversível Contraindicações: TFG < 60 mL/min por 1.73m ² Albuminúria>100mg/d
Despiste de Doenças Infeciosas	HIV, HBV, HCV, CMV, EBV, Treponema pallidum , enzimologia hepática e caso indicado para Mycobacterium tuberculosis, Strongyloides, Trypanosoma cruzi, vírus do Nilo Ocidental, Histoplasmosose e/ou Coccidiomicose.	Abordagem individualizada.
Fatores de risco Cardiovasculares	Hemograma completo; glicémia, perfil lipídico (colesterol total, LDL-C, HDL-C e triglicérideos); função tiroideia; cálculo do IMC	Elegíveis: IMC>30 kg/m ² ; dislipidemia; pré-diabetes ou DM tipo 2: decisão deve ser individualizada Contraindicações: DM tipo 1
Despiste HTA	Medição da PA em duas ocasiões; MAPA, se necessário.	Elegíveis: Valores de PA normais, consoante as normas de cada país ou se história de HTA, PA controlada com até dois fármacos anti-hipertensores e sem evidência de lesão de órgão-alvo.
Despiste da uricémia e alterações do metabolismo fosfo-cálcio	Metabolismo fosfo-cálcico e ácido úrico?	Abordagem individualizada
Despiste de cálculos Renais	Exames de imagem (como a TC)	Se história/ presença de cálculos renais decisão deve ter em conta risco de recorrência
Rastreios oncológicos	Rastreio para cancro do colo do útero, mama, colo-retal e próstata, quando aplicável.	Contraindicações: Cancro ativo
Testes de compatibilidade	Genotipagem ABO em duas ocasiões; Tipagem do HLA para o MHC Classe I (A, B, C) e Classe II (DP, DQ, DR); avaliação no recetor de anticorpos anti-HLA específicos contra o dador;	
Gravidez	Teste de gravidez	
Avaliação Pré-Operatória	Avaliação de riscos perioperatórios comuns a outras cirurgias não cardíacas, tais como risco cardíaco, pulmonar, hemorrágico e relacionado com a anestesia	Radiografia de Tórax; ECG ;Ecocardiograma, prova de esforço/cintigrafia cardíaca se fatores de risco Provas de Função respiratória se fatores de risco nomeadamente fumador
Avaliação Cirúrgica Renal do Dador	Angio TC renal bilateral	

Angio TC – Angiotomografia Computorizada; CMV - Citomegalovírus DM – Diabetes Mellitus; EBV - Vírus Epstein-Barr; ECG – Eletrocardiograma; HLA - antígeno leucocitário humano; HBV – Vírus da Hepatite B; HCV - Vírus da Hepatite C; HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana; HTA – Hipertensão Arterial; IMC – índice de massa corporal; MAPA – Monitorização ambulatória da pressão arterial; PA – Pressão arterial; TFG – Taxa de Filtração Glomerular;

Anexo 3 – Classificação de variantes segundo a ACMG/AMP

Table 3 Criteria for classifying pathogenic variants

Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>) • Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene • Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact • Use caution in the presence of multiple transcripts
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G>C or G>T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case–control studies, is >5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case–control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

LOF, loss of function; OR, odds ratio.

Table 4 Criteria for classifying benign variants

Evidence of benign impact	Category
Stand-alone	BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
Strong	<p>BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see Table 6)</p> <p>BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age</p> <p>BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing</p> <p>BS4 Lack of segregation in affected members of a family</p> <p>Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.</p>
Supporting	<p>BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease</p> <p>BP2 Observed in <i>trans</i> with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant in any inheritance pattern</p> <p>BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function</p> <p>BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease</p> <p>BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p> <p>BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved</p>

Table 5 Rules for combining criteria to classify sequence variants

Pathogenic	<p>(i) 1 Very strong (PVS1) AND</p> <p>(a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) OR</p> <p>(b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5)</p> <p>(ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) OR</p> <p>(iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND</p> <p>(a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)</p>
Likely pathogenic	<p>(i) 1 Very strong (PVS1) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)</p>
Benign	<p>(i) 1 Stand-alone (BA1) OR</p> <p>(ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)</p>
Likely benign	<p>(i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR</p> <p>(ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)</p>
Uncertain significance	<p>(i) Other criteria shown above are not met OR</p> <p>(ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory</p>