

Luísa Lobato

A Nefropatia na Polineuropatia Amiloidótica Familiar de Tipo Português (TTR V30M)



Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto
Porto, 2004

Luísa Maria Correia Lopes Lobato

**A Nefropatia na
Polineuropatia Amiloidótica Familiar de
Tipo Português (TTR V30M)**

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

Porto, 2004

Tese elaborada de acordo com o Decreto-Lei nº 216/92, de 13 de Outubro de 1992, e ao abrigo do Regulamento do Doutoramento pela Universidade do Porto, DR, II Série, nº 94, de 22 de Abril de 1993, com as alterações introduzidas pela Resolução nº 19/SC/SG/95 – DR, II Série, nº 169, de 24 de Julho de 1995 e Deliberação nº 1867/2003 – DR, II Série, nº 286, de 12 de Dezembro de 2003. A tese de doutoramento cumpre a normativa de 18 de Junho de 2003 do Conselho Científico do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

Luísa Maria Correia Lopes Lobato

**A Nefropatia na
Polineuropatia Amiloidótica Familiar de
Tipo Português (TTR V30M)**

Dissertação de candidatura ao grau de
Doutor em Ciências Médicas apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

ORIENTADOR

Professor Doutor Jorge Sequeiros

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

CO-ORIENTADORA

Professora Doutora Alda Sousa

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

Nesta dissertação foram utilizados resultados contidos nos seguintes trabalhos, pessoais ou de colaboração, já publicados ou em vias de publicação:

Artigos originais em revistas internacionais

Lobato L, Beirão I, Guimarães SM, Droz D, Guimarães S, Grünfeld JP, Noël LH. Distribution and characterization of renal amyloid deposits in FAP type I. American Journal of Kidney Diseases 31(6):940-946, 1998.

Beirão I, Lobato L, Guimarães SM, Cardoso P, Costa PM, Coelho T, Rocha G, Guimarães S. Early destructive spondyloarthropathy from combined beta2-microglobulin and transthyretin Met30 amyloidosis in a dialysed patient. Nephrology Dialysis Transplantation 13(12):3223-3225, 1998.

Beirão I, Lobato L, Riedstra S, Costa PM, Pimentel S, Guimarães S. Ineffectiveness of dialysis in transthyretin (TTR) clearance in familial amyloid polyneuropathy Type I, in spite of lower stability of the TTR Met30 variant. Clinical Nephrology 51(1):45-49, 1999.

Carvalho MJ, Lobato L, Ventura A, Beirão I, Rocha G, Seca R, Miranda HP, Silvestre F, Pereira MC, Guimarães S. Remission of proteinuria following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy TTR met30. Transplantation Proceedings 32(8):2664-2666, 2000.

Lobato L, Beirão I, Silva M, Bravo F, Silvestre F, Guimarães S, Sousa A, Noël LH, Sequeiros J. Familial ATTR amyloidosis: microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy. Nephrology Dialysis Transplantation 18(3):532-538, 2003.

Lobato L, Ventura A, Beirão I, Miranda HP, Seca R, Henriques AC, Teixeira M, Sarmento AM, Pereira MC. End-stage renal disease in familial amyloidosis ATTR Val30Met: a definitive indication for combined liver-kidney transplantation. Transplantation Proceedings 35(3):1126-1120, 2003.

Lobato L, Beirão I, Silva M, Fonseca I, Queirós J, Rocha G, Sarmento AM, Sousa A, Sequeiros J. End-stage renal disease and dialysis in hereditary amyloidosis TTR V30M: presentation, survival and prognostic factors. Amyloid (em publicação).

Lobato L, Beirão B, Silva M, Costa PP, Guimarães S, Sequeiros J, Sousa A. Nephropathy is a common but overlooked finding in hereditary amyloidosis TTR Val30Met (submetido ao American Journal of Medical Genetics).

Artigo de revisão

Lobato L. Portuguese-type amyloidosis (transthyretin amyloidosis, ATTR V30M). *Journal of Nephrology* 16(3):438-442, 2003.

Actas de simpósios internacionais

Lobato L, Teixeira F, Sousa A, Sequeiros J: Genetic Study of Late-Onset in Hereditary Amyloid Neuropathy (HAN) - Type I (Portuguese, Andrade). In: Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds). *Amyloid and Amyloidosis*, Plenum Press, New York, pp.441-446, 1988.

Sousa A, Coelho T, Lobato L, Sequeiros J: Anticipation of age-of-onset in familial amyloidotic polyneuropathy (Portuguese type). In: Natvig J, Forre O, Husby G (eds). *Amyloid and Amyloidosis*, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp.694-697, 1991.

Lobato L, Guimarães SM, Beirão I, Silva M, Coelho T, Barros J, Guimarães S, Sequeiros J, Sousa A. Epidemiology of renal disease in the main focus of familial amyloid polyneuropathy in Portugal. In: Kyle R and Gertz M (eds). *Amyloid and Amyloidosis*, Parthenon Publ., pp.270-272, 1999.

Sousa A, Coelho T, Barros J, Ferreira C, Lobato L, Sequeiros J: Familial amyloid polyneuropathy-type I (FAP-Met30) in Portugal: phenotypic variability and deviations from Mendelian inheritance. In: Kyle R and Gertz M (eds): *Amyloid and Amyloidosis*, Parthenon Publ., pp.276-278, 1999.

Sousa A, Coelho T, Lobato L, Sequeiros J: Anticipation of age-at-onset in Portuguese patients with familial amyloid polyneuropathy-type I (FAP-MET30). In: Kyle R and Gertz M (eds): *Amyloid and Amyloidosis*, Parthenon Publ., pp.209-211, 1999.

Lobato L, Beirão I, Silva M, Sequeiros J, Sousa A: How to counsel carriers of transthyretin Val30Met mutation and end-stage renal disease in the family? In: Bély M and Apáthy A (eds). *Amyloid and Amyloidosis*, David Apathy Publ., Hungary, pp.310-312, 2001.

Ramallo M, Beirão I, Lobato L, Silva M, Guimarães S Intercurrent diseases in familial amyloid polyneuropathy TTR V30M (FAP-I). In: Bély M and Apáthy A (eds) *Amyloid and Amyloidosis*, David Apathy Publ., Hungary, pp.313, 2001.

Beirão I, Lobato L, Ramallo M, Silva M, Guimarães S. Characterization of anemia in familial amyloid polyneuropathy TTR V30M (FAP-I). In: Bély M and Apáthy A (eds) *Amyloid and Amyloidosis*, David Apathy Publ., Hungary, pp.301-303, 2001.

Trabalho realizado nas seguintes instituições

Serviço de Nefrologia e
Unidade Clínica de Paramiloidose
Hospital Geral de Santo António, Porto

Service de Nephrologie
Hôpital Necker, Paris

Centro de Estudos de Paramiloidose
Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, Porto

Aos nossos doentes e às suas famílias

Agradecimentos

O estudo da doença renal na polineuropatia amiloidótica familiar (PAF) desenvolveu-se em diferentes instituições, incorporando o trabalho e as sugestões de muitas pessoas.

Ao Hospital Geral de Santo António devo a matriz técnica e humana onde alicercei o trabalho de investigação clínica. No Serviço de Nefrologia encontrei um património de rigor, responsabilidade, tolerância e liberdade. E, muito respeito pelos doentes. Devolhe, em grande parte, o atrevimento na procura de desafios e a confiança para os superar.

O Professor Doutor Jorge Sequeiros sensibilizou-me para genética clínica e expôs-me às amiloidoses. Estimulou este trabalho e o esforço de o divulgar em artigos científicos. Integrou a investigação nefrológica nos objectivos da UnIGENE do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto. Esteve sempre presente nesta caminhada, em dezanove anos de confiança e amizade.

As análises e críticas da Professora Doutora Alda Sousa deram-me entusiasmos, certezas e perplexidades. Foi uma excelente companheira de discussão, em dezoito anos de trabalho, conciliando as minhas convicções clínicas com a exigência de ciências mais exactas. Animou-me no estudo epidemiológico, mesmo quando este me pareceu infundável. Contarei sempre com o seu rigor e com as suas ideias.

O Professor Doutor Jean-Pierre Grünfeld, da Faculdade de Medicina Necker da Universidade René Descartes, especialista de referência em nefropatias hereditárias, aceitou que lhe apresentasse as árvores familiares, acreditou na solidez do trabalho e ajudou-me a encontrar rumos para o prosseguir.

Foi o Professor Grünfeld que me conduziu à Dra. Laure-Hélène Noël, patologista no Serviço de Nefrologia do Hôpital Necker. A qualidade do trabalho da Dra. Laure-Hélène em metodologias e técnicas histopatológicas foi determinante naquela época e útil até hoje. O acolhimento cordial no seu laboratório foi dando lugar à amizade. O meu francês escrito não dispensou as suas correcções.

A Professora Doutora Paula Coutinho, neurologista e membro da comissão de acompanhamento, deu-me sugestões importantes para focalizar esta dissertação, tornan-

do-a mais concisa. Ao mesmo tempo, permitiu-me que abalasse a sua convicção sobre o papel das infecções na etiopatogenia da doença renal crónica da PAF.

O Professor Doutor António Oliveira Torres, patologista e membro da comissão de acompanhamento, incentivou a minha procura de autonomia no trabalho histopatológico em amiloidoses.

Quando cheguei ao Serviço de Nefrologia, já tinha convivido com a Dra. Eva Xavier nas reuniões gerais de paramiloidose lideradas pelo Professor Corino de Andrade. Convidou-me, pouco depois, a transitar da consulta de genética para a sua consulta de nefrologia. Esteve presente e mobilizadora no início deste projecto. Manteve um interesse vigilante na progressão do estudo, mesmo depois da sua saída da Direcção de Serviço e do Hospital, em 1994.

O Dr. Serafim Guimarães, director entre 1994 e 2001, defendeu a criação e desenvolvimento de linhas de investigação clínica e incentivou empenhadamente a diferenciação académica dos seus médicos mais jovens. Por outro lado, deu visibilidade institucional ao nosso trabalho, assumindo a amiloidose familiar como uma área estratégica do Serviço de Nefrologia.

O Dr. António Morais Sarmiento acompanhou-me, com sensibilidade e atenção, em ocasiões de desânimo e em momentos de contentamento. Bom ouvinte e óptimo conversador, o “chefe” apoiou-me sempre, mesmo quando brincava com as minhas preferências clínicas.

Durante muitos anos a Dra. Manuela Silva observou doentes com PAF, respondendo a pedidos ocasionais da Professora Paula Coutinho e de outros neurologistas. Quando propusemos o estudo epidemiológico, ofereceu-se para assumir uma consulta regular de nefrologia. Tem sido uma companhia sólida, sempre presente, incorporando pragmatismo e sensatez no nosso trabalho colectivo.

Tive a sorte de contar com a cumplicidade da Idalina Beirão, praticamente desde a sua entrada para o Serviço de Nefrologia, em 1993. Com sensibilidade e gosto por doenças hereditárias, acompanhou-me na clínica, no apoio aos doentes e em aventuras e desventuras de biópsias. Acreditou, tanto como eu, na demonstração e caracterização da nefropatia.

A enfermeira Rosa Azevedo, do Serviço de Nefrologia, foi fundamental na implementação do nosso modelo de assistência. À sua experiência técnica e sentido prático, aliou sabedoria nas relações com os doentes e as famílias. Sentimo-la sempre solidária nas inovações e disponível para todos os desafios.

A dificuldade em lidar com a desnutrição fez-me convencer a Isabel Fonseca, nutricionista do Serviço de Nefrologia, a juntar-se a nós. Muitos doentes ganharam peso e nós ganhamos uma colaboradora excelente. Numa mistura de profissionalismo, sonhos e afectos, desenvolveu-se uma nova frente de estudo e assistência aos doentes.

A referência de doentes da consulta de neurologia da Unidade Clínica de Paramiloidose foi feita principalmente pela Teresa Coelho, com quem também trabalhei no estudo da variação da idade de início, no registo familiar e na definição de critérios para transplante hepático.

O Dr. Adelino Resende Barbosa, fisiatra e clínico que há mais tempo lida com esta doença, revolucionou a recuperação funcional dos insuficientes renais crónicos, sempre com humor e uma eficácia admirável.

A Dra. Fernanda Bravo, técnica superior de química clínica, ligada ao grupo pioneiro que em 1978 identificou a pré-albumina, teve em mim mais uma *dependente*. Deu uma contribuição importante no estudo da nefropatia, revelou peripécias das primeiras colheitas de sangue para investigação sistematizada da doença e recordou outras histórias de tempos idos.

O Departamento de Transplante de Órgãos do Hospital Geral de Santo António foi receptivo e colaborou em alguns trabalhos.

O Doutor Pedro Pinho Costa recebeu-me afavelmente no Centro de Estudos de Paramiloidose (CEP), em 1986, e integrou-me num grupo de experientes médicos, bioquímicos e geneticistas. Disponibilizou-me o acesso ao arquivo histórico. Mais tarde, discutiu comigo ideias e hipóteses sobre a epidemiologia da doença renal.

Ao Paulo Pinho Costa, director do CEP, devo a cedência de um gabinete de trabalho e a disponibilidade do laboratório. Apoiou o estudo imunohistoquímico e ensinou-me técnicas fotográficas de microscopia. Facilitou sempre o trabalho, com serenidade e confiança.

A Laurinda Teixeira, oficialmente secretária do CEP, foi a minha colaboradora mais multifacetada e polivalente. Conhecedora de meio mundo, empatizando facilmente com o outro meio, profundamente crente na ideia de que não há impossíveis, foi uma desbloqueadora de barreiras e mobilizadora de vontades. Contribuiu, como poucos, para este projecto.

Com a Isabel Friães, secretária do CEP, iniciei a organização logística do estudo da microalbuminúria. Tornou-se uma ajuda inestimável e delicada na selecção dos processos, com base nas histórias familiares, e na comunicação com os doentes. Continua solidária com as digressões epidemiológicas.

A Helena Pereira, secretária do CEP, informatizou os meus sessenta desenhos de árvores familiares dos insuficientes renais crónicos em diálise com as informações do fenótipo. Redesenhou tudo, com paciência e gosto.

A técnica Teresa Barandela, do CEP, empenhou-se nesta e noutras amiloidoses, no rim e noutros tecidos. Durante dez anos, de trabalhos e diálogos, foi apurando cortes cada vez mais certos e colorações histológicas no ponto.

O Paul Moreira, técnico de laboratório no CEP, realizou todas as análises de pesquisa da mutação TTR V30M nos insuficientes renais.

Ao Symon Riedstra, bioquímico da Universidade Católica e colaborador do CEP, ouvi expôr e discutir teorias, metodologias, ética, e até clínica. Pondo tudo permanentemente em causa, entre camaradagem e guloseimas, ajudou-me a apurar alguns conceitos.

A Lúcia Friães, auxiliar do CEP, esteve presente na rota das análises e em muitas amabilidades.

A D. Elisa Coelho e a D. Gracinda Gomes, auxiliares do hospital, empenharam-se na ajuda ao trabalho clínico.

O Senhor Domingos Rodrigues, zelador do arquivo clínico histórico do hospital, sondou e recolheu os mais improváveis processos, registos de urgência, análises, cartas e relatórios.

O Centro de Estudos e Apoio à Paramiloidose da Santa Casa da Misericórdia da Póvoa de Varzim tem sido um protagonista no caminho para a qualidade assistencial na

PAF. Os seus profissionais foram interlocutores permanentes e eficazes, promovendo um apoio de excelência aos doentes em diálise. Agradeço a todos que lá trabalham. Dessa lista extensa, destaco o enfermeiro Francisco Figueira, a assistente de serviço social Dra. Natália Oliveira, e os meus colegas Drs. António Miranda, Vítor Cruz, Jorge Carrapatoso e Edgar Guerreiro.

Em Vila do Conde beneficiei da colaboração, da memória e do humor do Dr. António Caldeira Gomes, director do Centro de Hemodiálise.

O Dr. Vítor Soares, do Centro de Saúde de Barcelos, diligente e bom conhecedor do meio, contribuiu para que muitas das fratrias dos insuficientes renais crónicos se tornassem informativas.

No Centro de Saúde de Braga, nos primeiros anos de estudo, tive a colaboração do Dr. Hernâni Teixeira.

Os doentes do Centro de Saúde da Covilhã foram referidos pelo Dr. António Santos Silva.

Nos primeiros tempos, contactei regularmente com a Professora Doutora Maria João Saraiva, o que me fez interessar pela genética das amiloidoses.

Guardo muito boas recordações dos debates clínicos com o Dr. Mário Jorge Carvalho, internista do Hospital de São João e antigo colaborador do CEP. Os tempos e as instituições foram mudando, mas há laços que não esquecem.

Ao Professor Doutor Manuel Pestana, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, agradeço a apreciação do manuscrito, as sugestões valiosas e a estima.

A competência e o carinho da Teresa Mendonça, minha médica e amiga, ajudaram-me a recuperar a saúde de que precisava para as revisões de artigos e para a redacção final da tese.

A Comissão de Fomento em Investigação Aplicada em Cuidados de Saúde, do Ministério da Saúde, subsidiou os projectos 42/95 e 257/97 que estiveram na base de alguns resultados incluídos neste trabalho.

O “Prémio Roche 2001/2002” da Sociedade Portuguesa de Nefrologia permitiu pagar as despesas de publicação dos artigos originais e a aquisição de bibliografia.

ÍNDICE

Prefácio	16
I Introdução	19
1. Definição de amiloidose	20
2. História antiga	20
3. História antiga da amiloidose hereditária	23
4. História moderna	24
5. Nomenclatura	25
6. Amiloidogénese	27
7. Amiloidoses hereditárias	31
8. Amiloidoses por transtirretina	32
9. Mutações da transtirretina	35
10. Amiloidose associada à mutação TTR V30M	38
11. O rim nas amiloidoses	49
12. Amiloidoses hereditárias com nefropatia	55
13. Descrição clássica do envolvimento renal na polineuropatia amiloidótica familiar de tipo português (TTR V30M)	64
14. Objectivos do estudo	68
15. Plano geral da investigação	69
16. Bibliografia	70
II Distribuição e caracterização dos depósitos renais de amiloide	89
Familiar amyloid polyneuropathy type I (Portuguese): distribution and characterization of renal amyloid deposits – artigo 1	92
III Epidemiologia da doença renal	99
Nephropathy is a common but overlooked finding in hereditary amyloidosis TTR Val30Met – artigo 2	102

IV Detecção precoce da nefropatia	117
Familial ATTR amyloidosis: microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy – artigo 3	120
V Tratamento da doença renal crónica	127
End-stage renal disease and dialysis in hereditary amyloidosis TTR V30M: presentation, survival and prognostic factors – artigo 4	130
End-stage renal disease in familial amyloidosis ATTR Val30Met: a definitive indication to combined liver-kidney transplantation – artigo 5	141
Remission of proteinuria following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy TTR Met30 – artigo 6	146
VI Discussão global	149
1. O padrão estrutural do rim	150
2. Mecanismos que podem intervir na distribuição dos depósitos	151
3. Redefinição da nefropatia	155
4. Intervenção terapêutica na doença renal crónica	167
5. Envolvimento da nefropatia no aconselhamento genético	174
6. Bibliografia	176
VII Conclusões	185
VIII Sugestões para investigação futura	191
IX Resumos	193
X Apêndice	201

Prefácio

Numa entrevista de candidatura a uma vaga de monitora de citogenética, em 1985, o Professor Doutor Jorge Sequeiros apresentou-me propostas de estudo das famílias com *paramiloidose* de início tardio. Estávamos certamente longe de imaginar a representação dessa casualidade no meu futuro.

Ocupei-me desse trabalho no último ano da licenciatura e no início do internato geral. O realismo das descrições clínicas, encontrado na revisão dos processos mais antigos do Centro de Estudos de Paramiloidose, despertou a minha curiosidade e interesse pela doença. Os registos individuais, complementados por árvores genealógicas, iniciaram-se nos anos trinta. Na tentativa de descrever a “doença dos pezinhos”, uma entidade clínica nova, os neurologistas detalhavam e pormenorizavam quase tudo. As expressões da pobreza e da dureza de costumes das populações impressionaram-me. As cartas de doentes, fotografias, recortes de jornais ou correspondência entre médicos, causavam-me deslumbramento e inquietações. A necessidade de colher dados concretos, e cumprir prazos, vencia com dificuldade o desejo de divagar pelos variados papéis amarelados pelo tempo.

Pude, por outro lado, aligeirar as pesquisas bibliográficas. Os processos, neste caso, foram substitutos excelentes dos livros de texto, revelando-me a semiologia e a história natural da doença. Permitiram-me, mais tarde, acompanhar muitas gerações de médicos e doentes.

Apresentei o meu primeiro trabalho no Vth International Symposium on Amyloidosis (Hakone, Japão, 1987), integrada numa delegação portuguesa, liderada pelo Professor Corino de Andrade. No fim dos anos oitenta, continuava ligada à *paramiloidose* nas consultas de aconselhamento genético. Os apelidos da gente do mar integravam-se progressivamente no meu trabalho. Olhando agora para essa época, creio ter vivido momentos de transição; convivi ainda com os clínicos, bioquímicos e geneticistas *fundadores* e estive presente no advento das primeiras propostas e tentativas de tratamento etiológico.

Após um ano de internato da especialidade, principiei a consulta de nefrologia vocacionada para a paramiloidose. Nesta doença, como na maioria das patologias nefrológicas, temos de promover relações duradouras com doentes crónicos e suas famílias. A fragilidade transforma quem adoece, levando a erguer barreiras ou a deixar cair confidências. Estes doentes, brandos ou déspotas, lutadores ou fatalistas, carinhosos ou corrosivos, mudaram a minha percepção da vida e contribuíram para o meu amadurecimento.

A raridade de manifestações renais na polineuropatia amiloidótica familiar do tipo português foi transmitida na literatura ao longo de décadas. Senti-me intrigada, desde cedo, pela aparente inexpressividade da doença renal nesta forma de amiloidose. Nos processos de famílias com início tardio notei descrições ocasionais de edemas, hipertensão arterial e proteinúria. Idealizei um estudo para demonstração (ou negação) de nefropatia na PAF, de longa duração, respeitando o primado da assistência clínica sobre a investigação em *stricto sensu*. Formular hipóteses, pesquisar e conhecer as famílias, ordenar experiências e treinar histologia seriam um projecto profissional. Por outro lado, a tradução do trabalho em tese de doutoramento contribuiria para aperfeiçoar objectivos, apurar metodologias e documentar tudo com mais rigor.

A presente dissertação de doutoramento apresenta, em artigos científicos, os estudos que delineamos para pesquisa e caracterização da doença renal associada à amiloidose hereditária por uma variante da transtirretina, em que a metionina substitui a valina na posição 30 da molécula (TTR V30M). A preceder este conjunto de artigos, como introdução, apresentamos um trabalho sistemático de revisão de amiloidoses, a definição de objectivos e o plano geral de investigação. A dissertação completa-se com a discussão global, conclusões e sugestões para o futuro. Apresentam-se, em forma de apêndice, algumas árvores familiares.

I - INTRODUÇÃO

1. Definição de amiloidose

A amilóide é uma substância de natureza proteica que se deposita no espaço extracelular de vários tecidos. O termo amiloidose é atribuído à doença que resulta da presença destes depósitos.

A amiloidogénese envolve precursores proteicos específicos [1]. Estes, quando produzidos em quantidade excessiva, ou quando sofrem substituições específicas de aminoácidos, ou quando sujeitos a alterações de clivagem proteolítica, podem gerar proteínas ou fragmentos peptídicos que se agregam e depositam [1]. Estas moléculas proteicas agregam-se numa estrutura ordenada formando fibrilas que medem 75 a 100 Å em corte transversal, com um comprimento indeterminado e configuração β -pregueada na difracção por raios X [2]. Esta estrutura tem a propriedade cristalina de birrefringência, resultando na sua afinidade selectiva para alguns corantes histoquímicos como o vermelho do Congo.

Os vários tipos de amiloidose são definidos pela proteína básica que constitui as fibrilas. O envolvimento fibrilar pode atingir vários órgãos ou ser localizado. As formas sistémicas podem estar associadas a inflamação ou infecções crónicas, a doenças dos plasmócitos, a doenças hereditárias ou a diálise crónica. A deposição localizada está subjacente à patogénia da doença de Alzheimer, das encefalopatias espongiformes, e da diabetes tipo 2 [3].

A apresentação clínica e a evolução deste tipo de doenças dependem dos órgãos atingidos, podendo ser estabelecidos alguns padrões conforme a proteína precursora. Embora a etiologia e patologia de cada tipo de amiloidose seja uma doença diferente, a sua progressão causa geralmente lesões orgânicas funcionais semelhantes. A terapêutica e prognóstico diferem conforme o precursor proteico [3].

2. História antiga

A amiloidose é conhecida como entidade nosológica há quase quatro séculos. A sua descrição inicial assentou na patologia macroscópica e a progressão do saber na biologia molecular.

A revisão da história antiga da amiloidose teve como fonte bibliográfica as descrições detalhadas por Benson, Cohen e Kyle [1, 4, 5 e 6].

As primeiras descrições de autópsia que podem corresponder a amiloidose foram feitas no século XVII. Em 1639, Nicholaus Fontanus apresentou num doente com abscesso

hepático e epistaxis, um baço grande, em esponja, duro como uma pedra e preenchido por uma substância esbranquiçada. Bartholin, em 1657, fez também a descrição de um baço com aspecto semelhante, duríssimo, que mal se conseguia cortar. Os estudos de autópsia de Bonet (1620-1689), Malpighi (1628-1694) e Morgagni (1682-1770) continuaram a ser compatíveis com achados de amiloidoses do baço e fígado. Portal, em 1789, documentou uma substância semelhante a toucinho (lardiforme) no fígado de um doente idoso e seguidamente numa criança com tuberculose; notou que este fígado endurecia com o calor como a albumina, e atribuiu o aspecto macroscópico dos órgãos a uma obstrução *albuminosa*. Rokitansky, em 1842, mostrou no fígado de doentes com tuberculose, sífilis e intoxicação pelo mercúrio uma substância cérea, lardiforme, gelatinosa, de consistência firme e acinzentada; julgou tratar-se de um tipo de fígado esteatósico. No entanto, Budd (1845) analisou um órgão com o mesmo tipo de alterações e verificou que essa substância infiltrada consistia em albumina, só correspondendo a gordura numa pequena quantidade. Budd demonstrou ainda o mesmo tipo de infiltração nos rins de dois doentes, ambos com antecedentes de tuberculose. Esta degenerescência, pelo aspecto macroscópico, foi designada por cérea. Algum tempo depois, Gairdner, em 1854, chamou a atenção para o envolvimento parenquimatoso múltiplo, com demonstração da substância lardiforme simultaneamente no fígado, baço e rins.

O termo “amilóide” foi criado em 1838 por um botânico alemão, Schleiden, para descrever um normal constituinte amiláceo das plantas (vindo do latim *amylum* e do grego *amylon*). O mesmo termo foi utilizado por Virchow, em 1854, na descrição da reacção particular dos *corpora amylacea* do sistema nervoso com a iodina, estando convencido que os *corpora amylacea* poderiam ser idênticos ao amido. Virchow corou a substância lardiforme com o iodo, tendo obtido uma coloração azul; usando ácido sulfúrico no material tratado com iodo obteve a cor violeta. Virchow atribuiu esta reacção à presença de celulose, comunicando o seu trabalho à Academia das Ciências Francesas - à substância lardiforme atribuiu a designação de amilóide. A actividade do teste da iodina nos glomérulos e artérias aferentes renais foi verificada por Virchow. O envolvimento intestinal pela substância foi usado para explicar o marasmo da fase final dos doentes. Meckel (1856) decidiu aplicar o teste do iodo-ácido sulfúrico a diferentes órgãos (fígado, baço, rins, artérias, intestinos), contribuindo também para a descrição de doença na sua forma generalizada; escolheu o termo de colesterina para a substância. Enquanto que Virchow acreditava que a coloração dos órgãos infiltrados por amilóide se devia a isquemia por obstrução vascu-

lar de um produto celulósico, Meckel considerava que a colesterina não resultava da degenerescência celulósica nem se assemelhava a amido. Friedreich e Kekule, em 1859, demonstraram a ausência de componentes glucídicos na amilóide e confirmaram a presença de proteínas, tentando desacreditar o conceito de Virchow. Um caso de doença lardiforme do rim associada a abscesso do ovário foi interpretada por Dickinson, em 1869, como uma precipitação de fibrina do sangue, dado o seu conteúdo de nitrogéneo.

A *Royal Society of London* designou uma comissão para atribuir a nomenclatura definitiva da substância no fim do século XIX. O termo “lardiforme” foi adoptado: reflectia a ausência de celulose e a escolha de um termo já usado, sendo assim facilmente compreendido. Não é clara a razão pela qual prevaleceu o termo amiloidose na medicina. Talvez a manutenção do teste do iodo-ácido sulfúrico como técnica de diagnóstico, relacionada com o patologista Virchow, tivesse ajudado a perpetuar o termo até à actualidade.

Os casos descritos tinham habitualmente relação com doenças infecciosas. Wilks (1856) foi provavelmente o primeiro a reconhecer a amiloidose primária. Referenciou um homem com edemas, albuminúria, coração hipertrofiado, rins e baço lardiformes sem antecedentes de sífilis, tuberculose ou osteomielite. Wilks, dez anos depois, apresentou mais 5 casos de doença lardiforme sem patologia predisponente; segundo ele, o envolvimento orgânico pela substância não era por degenerescência, mas sim por preenchimento com algo que levava à destruição dos elementos normais. Wilks fez notar que os “cilindros céreos” descritos nos tubos renais há já muito tempo, não tinham qualquer relação com o “rim céreo” típico da amiloidose. Em 1872, Adams e Dowse associaram a amiloidose a um caso de mieloma múltiplo, mas só em 1904, com Askanazy-Konigsberg, esta descrição se consolidou. Foi Magnus-Levy (1931) quem relacionou a amiloidose do mieloma múltiplo à formação da proteína de Bence-Jones, prenunciou que a amilóide se poderia isolar como substância pura, e que contribuiu para estabelecer a sua relação com outras proteínas. Apitz, em 1940, associou a produção excessiva de plasmócitos medulares a casos de “amiloidose primária”.

A utilização de corantes de anilina (metil-violeta, violeta de cristal) para o reconhecimento de amilóide foi descrita independentemente (1875) por Cornil em Paris, Heschl em Viena, e Jürgens em Berlim, e rejeitada por Virchow durante 10 anos.

Ehrlich aplicou o termo metacromasia (mudança de cor) para definir essas colorações, que se tornaram superiores às de iodina-ácido sulfúrico. A coloração metil-violeta,

permitiu o reconhecimento da natureza extra-celular dos depósitos de amiloide. Estas colorações metacromáticas foram substituídas pelo vermelho do Congo, introduzido por Benhold em 1922, sem dúvida um acontecimento de grande importância na história da amiloidose. Uma placa de amiloide corada pelo vermelho do Congo, localizada no cérebro de um indivíduo idoso, adquiriu birrefringência verde (verde maçã) ao exame microscópico de luz polarizada, facto observado por Divry e Florkin em 1927. Estes autores atribuíram este fenómeno à estrutura cristalina da amiloide. A coloração pelo vermelho do Congo com microscopia de luz polarizada mantém-se ainda como o teste histológico mais simples para o diagnóstico de amiloidose.

3. História antiga da amiloidose hereditária

Ao longo dos anos tornou-se evidente que a amiloidose podia ocorrer com padrão familiar. A descrição de famílias com polineuropatia amiloidótica data de 1929 e 1938, mas a designação inicial atribuída foi a de amiloidose primária [7, 8], por oposição à secundária desenvolvida em associação com as doenças inflamatórias crónicas, infecciosas ou reumáticas.

Ostertag [9, 10] observou e relatou (1932) uma família com inequívoca amiloidose renal hereditária: uma mulher, 3 dos seus filhos e um neto foram afectados por nefropatia crónica, hipertensão arterial e esplenomegalia; albuminúria, hematúria e edema foram os sinais mais precoces da doença; a amiloidose visceral foi extensa, e a morte ocorreu cerca de 10 anos após o seu início. Maxwell and Kimbell [11], em 1936, descreveram 3 irmãos falecidos na quinta década de vida com amiloidose visceral, envolvendo especialmente o rim; a apresentação clínica constava de edemas, proteinúria e hepato-esplenomegalia; alguns elementos da família apresentaram urticária.

Corino de Andrade, em 1939, observou uma mulher de 37 anos da Póvoa de Varzim com neuropatia periférica, perturbações gastrointestinais e de esfíncteres; iniciou então o estudo sistemático de outros casos semelhantes. A doença atingia muitos membros de uma família, e a sua evolução era conhecida ao longo de gerações na área onde foi considerada endémica. Quando Andrade publicou, em 1952, o seu estudo de famílias portuguesas com polineuropatia e mostrou a deposição de amiloide nos nervos periféricos e noutros órgãos, a amiloidose hereditária passou a ser amplamente reconhecida [12]. A leitura deste artigo mantém-se imprescindível para o conhecimento da então apelidada amiloidose generalizada atípica ou paramiloidose (da nomenclatura alemã, termo aplicado também por Ostertag).

Andersson, em 1965, observou um homem de origem sueca, com neuropatia periférica e hipotensão ortostática, tendo um primo também com neuropatia e opacidades do vítreo; mais tarde descreveu 16 casos adicionais [13] e em 1976 [14] publicou os achados clínicos de 60 doentes, com amiloidose e neuropatia periférica em familiares originários do norte da Suécia. O mesmo quadro clínico foi reconhecido no Japão por Araki, em 1968, em doentes com origem em Kumamoto e Nagano [15, 16].

A febre Mediterrânica familiar, uma outra forma de amiloidose hereditária, foi descrita pela primeira vez por Siegal em 1945, sob a designação de peritonite paroxística benigna [17]. A doença atingia particularmente os judeus sefarditas e arménios, podendo haver desenvolvimento sistémico de amiloidose com deposição renal proeminente.

Muckle e Wells em 1962 descreveram uma outra síndrome, que associava a presença de urticária, surdez e artralguas, em 9 de 18 elementos, numa família da Grã-Bretanha [18].

4. História moderna

A pesquisa e caracterização da amilóide baseou-se durante muitos anos no estudo por microscopia de luz, com óptica de polarização. Cohen e Calkins, em 1959 [2], mostraram por microscopia electrónica que, em cortes ultra-finos, os tecidos com amilóide revelavam presença de fibrilas, indeterminadas no comprimento e, invariavelmente, com 75 a 100 Å de largura. Estas fibrilas foram isoladas de tecidos amiloidóticos, sendo demonstrados os diferentes potenciais de agregação das proteínas precursoras e a sua estrutura β -pregueada [19].

A descoberta das diferentes formas bioquímicas de amiloidose começou em 1971, com Benditt [20], que isolou a sequência da proteína AA relacionada com doenças inflamatórias. Glenner, em 1971, evidenciou a natureza da proteína AL como sendo constituída por imunoglobulinas [21] e Sletten, em 1976, mostrou que a amilóide do carcinoma medular da tiróide era composta por procalcitonina [22]. A amiloidose das neuropatias amiloidóticas familiares foi identificada como pré-albumina (agora com o nome de transtirretina) por Costa em 1978 [23]. As primeiras mutações pontuais associadas à amiloidose por transtirretina foram descritas em 1983 e 1984 [24, 25, 26]. A partir de 1983 sucederam-se as descobertas dos precursores proteicos que representam formas de amiloidose sistémica ou localizada (tabela 1). Em 2001, foi identificada a última molécula associada a amiloidose no tumor epitelial calcificante odontogénico (tumor de Pinborg), no entanto ainda sem proteína reconhecida para a classificar [27, 28].

5. Nomenclatura

As bases de nomenclatura das amiloidoses têm sido adaptadas à evolução da bioquímica, biofísica e biologia molecular. A última revisão de nomenclatura foi proposta em 2001, no IXth International Symposium on Amyloidosis em Budapeste, e estabelecida pela *Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis* em 2002 [28]. A tabela 1 descreve a classificação das amiloidoses.

Tabela 1. Classificação das amiloidoses: proteínas das fibrilas amilóides e seus precursores

PROTEÍNA AMILÓIDE	PRECURSOR	DOENÇA OU TECIDOS ENVOLVIDOS
AL	Cadeias leves de imunoglobulinas	Primária ou associada a mieloma; multiorgânica
AH	Cadeias pesadas de imunoglobulinas	Primária ou associada a mieloma; multiorgânica
ATTR	Transtirretina	Familiar, sistêmica senil; nervo periférico, cardíaco, renal, ocular
A β 2M	β 2-microglobulina	Insuficiência renal crônica, hemodiálise; multiorgânica
AA	(Apo)AA sérico	Secundária, reactiva, familiar; multiorgânica
ApoAI	Apolipoproteína AI	Familiar; renal, cardíaco
ApoAII	Apolipoproteína AII	Familiar; renal, cardíaco
AGel	Gelsolina	Familiar; nervo periférico, córnea
ALys	Lisozima	Familiar; renal
AFib	Cadeia A α do fibrinogénio	Familiar; renal
ACys	Cistatina C	Familiar; sistema nervoso central
ABri	ABriPP	Familiar; sistema nervoso central
A β	Precursor proteico da A β (A β PP)	Doença de Alzheimer, senil
AprP	Proteína do prião	Encefalopatias espongiformes
Acalc	(Pro)calcitonina	Tumores da tiróide
AIAPP	Polipeptídeo amilóide das ilhotas	Ilhotas de Langerhans; diabetes mellitus, insulinomas
AANF	Factor natriurético atrial	Cardíaca atrial
APro	Prolactina	Pituitária, prolactinomas
Alns	Insulina	Iatrogénica
AMed	Lactaderina	Aórtica senil
Aker	Querato-epitelina	Familiar; córnea
ALac	Lactoferrina	Familiar; córnea

Adaptado de: Westmark P, Benson MD, Buxbaum JN, Chen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters C, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD. Amyloid fibril protein nomenclature – 2002. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 2002; 9:197-200

A nomenclatura actual assenta na natureza do principal componente da fibrila proteica que é designado por proteína A, seguido por uma forma abreviada do nome da proteína “mãe”. Ao prefixo A (amilóide) segue-se pois um sufixo específico de cada proteína. A amiloidose derivada da transtirretina (TTR), por exemplo, é designada por ATTR. Esta regra implica que uma proteína amilóide só pode ser incluída na nomenclatura quando a sua natureza bioquímica é conhecida com absoluta certeza.

Existem ainda regras para a nomenclatura das variantes da proteína fibrilar conforme as diferentes mutações do gene para a proteína; estas são nomeadas pela localização do resíduo do aminoácido, sendo precedidas pela abreviatura do aminoácido normal e seguidas da abreviatura da variante. Na abreviatura do aminoácido é usado um código de uma letra. Como exemplo temos as proteínas ATTR V30M e a ATTR L111M.

O termo amiloidose é até agora reservado a agregados proteicos extracelulares. Os agregados intracelulares, mesmo tendo as características habituais das proteínas amilóides, são excluídos [28]. A amiloidose é a deposição extracelular, *in vivo*, duma proteína na sua forma fibrilar. As propriedades ópticas características das fibrilas amilóides coradas pelo vermelho do Congo resultam da ligação particular do corante às folhas β -pregueadas. Desta organização molecular do corante advém uma deflexão da luz polarizada, com extinção do componente vermelho do espectro luminoso, conduzindo à birrefringência verde maçã. Estas são as características da amilóide, em que assentam os pressupostos da comissão de nomenclatura.

No entanto, há evidência de que alguma agregação em fibrilas se pode iniciar em meio intracelular [29, 30]. Existem agregados proteicos intracelulares, patológicos, que podem actuar pelos mesmos mecanismos que os materiais congófilos, mas são vermelho do Congo negativos. Algumas das doenças em que esses agregados intracelulares estão presentes são a doença de Parkinson, a coreia de Huntington, a doença de Machado-Joseph e a esclerose lateral amiotrófica [28]. Tratam-se de doenças que pertencem a um conjunto mais vasto, o dos agregados proteicos. Assim, a nomenclatura poderá ter de ser alargada para todo o campo das proteínas com capacidade de agregação, no qual as amiloidoses constituirão apenas um sub-grupo [28].

6. Amiloidogénese

6.1 Dinâmica do processo

A essência bioquímica da amiloidose assenta na capacidade das proteínas precursoras para adquirirem mais do que uma conformação [31]. A forma fibrilar das proteínas amiloidogénicas pode ser entendida como uma estrutura dominada por pontes de hidrogénio entre o grupo amido e o carbonil da cadeia principal, em vez de interações específicas de cadeias laterais [32]. A conversão da estrutura da proteína nativa numa estrutura secundária, com pregueamento β anti-paralelo (isto é, no qual os terminais N e C estão orientados em direcções opostas) é um processo patológico, próximo do fisiológico [33].

A fibrilogénese pode ser entendida como uma reacção em duas etapas, a primeira das quais conduz a um estado nativo da proteína, e a segunda a um estado fibrilar. Existe um intermediário conformacional da proteína que se pode fundir progressivamente. Este polipeptídeo pode adquirir um estado alternativo e estável de torção, predispondo à agregação [34].

Certas proteínas têm a propriedade de assumir conformação patológica, facto que se pode tornar mais evidente com o envelhecimento (como a TTR normal nos doentes com amiloidose senil) [35] ou com concentrações persistentemente altas no soro (β 2-microglobulina na amiloidose da diálise) [36]. Outros mecanismos que favorecem a conformação patológica são a substituição de um único aminoácido numa proteína (na amiloidose hereditária) [37] e a remodelação proteolítica da proteína precursora (tal como a proteína precursora da β -amilóide na doença de Alzheimer) [38]. Estes mecanismos podem agir independentemente ou em associação.

Para além do potencial amiloidogénico intrínseco da proteína patogénica, outros factores podem actuar de modo sinérgico na deposição de amilóide. A proteína precursora pode atingir uma concentração local propensa à formação de fibrilas, processo esse que pode ser amplificado por factores de ambiente local e por interacção com a matriz extracelular [39].

6.2 A polimerização dependente da nucleação

Os processos de agregação fisiológica, como a cristalização de proteínas, seguem um mecanismo dependente de nucleação. Este mesmo tipo de mecanismo pode conduzir a

transição estrutural de proteínas amiloidogénicas e à formação de fibrilas. O processo de nucleação é caracterizado por três fases: uma primeira fase lenta, uma segunda fase de crescimento e a final na qual os monómeros estão em equilíbrio com o agregado [40]. A agregação dependente da nucleação não acontece enquanto a concentração da proteína for inferior a um valor crítico. Na presença de concentrações proteicas mais elevadas observa-se uma fase de espera precedendo a agregação, no decurso da qual os núcleos são formados; qualquer adição de proteína na fase de espera induz agregação imediata [40].

6.3 A instabilidade

A conformação da proteína mutante é termodinamicamente menos estável do que a da proteína normal. Nos casos de amiloidose familiar, a substituição de um único aminoácido transforma uma proteína normal numa outra amiloidogénica. A TTR, uma proteína homotetramérica com uma estrutura secundária em folheamento β , é um dos exemplos em que isto sucede [35]. A redução da estabilidade, no caso da TTR, torna o tetrâmero mais facilmente dissociável em monómeros sendo estes os principais constituintes das fibrilas [35]. Curiosamente, algumas das suas mutações não estão associadas a amiloidose, enquanto que outras parecem impedir a formação dos depósitos [41].

A instabilidade é necessária, mas não suficiente, para produzir o potencial amiloidogénico de uma proteína. As proteínas e as suas variantes amiloidogénicas são sintetizadas e secretadas como proteínas nativas, sendo o sistema de controle intracelular incapaz de reconhecer e remover as variantes [42]. Fora da célula, as variantes amiloidogénicas atingem um estado de equilíbrio entre as formas completa e parcialmente fibrilar, com grande flutuação de concentração destas duas formas [42]. Quaisquer factores que perturbem a estrutura tridimensional das moléculas, tais como um pH baixo, oxidação, elevação da temperatura, iões metálicos e osmóis, podem alterar aquele equilíbrio [43]. Os outros componentes dos depósitos de amiloide, tal como os glicosaminoglicanos e o componente sérico amiloide P (*serum amyloid P*, SAP), ao serem integrados num polipeptídeo solúvel, podem convertê-lo numa fibrila mais estável.

A medula renal representa um bom exemplo de actuação desses factores. Na sua zona interna as altas concentrações de ureia têm efeitos termodinâmicos no estado de equilíbrio de cadeias leves, reduzindo o tempo necessário para a formação do núcleo proteico em torno do qual surge formação acelerada de fibrilas [44]. O pH pode influenciar o processamento das cadeias leves para formação de agregados fibrilares amilóides ou de agregados

amorfos (característicos da doença dos depósitos leves), com implicações para a patologia renal [45].

6.4 A proteólise

O papel da proteólise na amiloidose ainda não está completamente esclarecido. A determinação do momento exacto daquele processo, antes ou depois da formação de fibrilas, terá um impacto importante, não só na compreensão do mecanismo da fibrilogénese, mas também para conceber estratégias terapêuticas [43]. Não parece haver relação directa entre a proteólise e o carácter localizado ou generalizado de uma amiloidose. Sabemos, no entanto, que os depósitos podem ser constituídos pelas proteínas de forma completa, pela proteína completa e seus fragmentos, ou apenas pelos fragmentos do precursor proteico [43].

Nas amiloidoses por lisozima e por $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2$ -M) encontram-se depósitos da proteína na sua forma completa, sem fragmento proteolítico detectável [40]. Noutras formas, como na amiloidose por transtirretina, as proteínas isoladas nas fibrilas são uma mescla de proteínas completas e de fragmentos obtidos por proteólise. Os fragmentos de proteólise N-terminal de transtirretina são detectáveis em pequenas quantidade, quer no plasma, quer isolados a partir das fibrilas [40]. Na amiloidose senil os depósitos contêm pelo menos 50% de transtirretina truncada, facto que também se observa na amiloidose hereditária por aquela proteína [40].

No caso da doença de Alzheimer, os peptídeos amiloidogénicos foram considerados durante muito tempo o resultado de metabolismo patológico. Posteriormente, verificou-se que a formação dos fragmentos $A\beta$ a partir do precursor $A\beta$ PP (ver tabela 1) resulta de um processo fisiológico, pois as formas solúveis de peptídeo $A\beta 1-40$ e $A\beta 1-42$ foram encontradas no líquido céfalo-raquidiano de indivíduos sãos [46]. Se considerarmos que os peptídeos $A\beta 1-40$ e $A\beta 1-42$, formados naturalmente por proteólise, são os precursores solúveis das fibrilas, então podemos concluir que a maioria das subunidades proteicas dos depósitos correspondem na realidade aos precursores completos [40].

Os precursores da amiloidose renal hereditária por cadeia α do fibrinogénio, uma grande proteína, contêm um polipeptídeo correspondente aos resíduos 500 a 580 da cadeia α [47, 48]. O fragmento amiloidogénico deriva da parte solúvel às proteases, sendo também provável que nesta amiloidose a proteólise do precursor preceda a fibrilogénese. No entanto, não foi encontrado até agora nenhum precursor proteico livre [40]. Outra grande

proteína, a gelsolina, um peptídeo de 71 aminoácidos, está presente nos depósitos de amilóide. Este peptídeo é formado por um fragmento interno do precursor que poderá ser amiloidogénico ao sofrer uma modificação por proteólise, relacionada com a presença de uma mutação no gene codificador da gelsolina [49]. Na amiloidose AA, o principal constituinte dos depósitos é um fragmento N-terminal de 76 aminoácidos da proteína SAA, esta formada por 104 aminoácidos [50].

6.5 Componentes não fibrilares associados

O componente sérico amilóide P, a apolipoproteína E, elementos da membrana basal e matriz extra-celular foram identificados na constituição dos depósitos de amilóide, para além das proteínas fibrilares [43].

O SAP é uma glicoproteína da família das pentraxinas que se fixa às fibrilas de amilóide numa ligação dependente de cálcio [51]. O SAP torna as fibrilas resistentes à proteólise e protege-as da degradação [52]. Um outro papel foi sugerido para o SAP, quer na nucleação da proteína AA, quer na de outro tipo de fibrilas [53]. A ligação específica deste componente aos depósitos constitui a base da técnica de imagem cintilográfica da amiloidose com SAP radiomarcado, que permite obter imagens da localização, progressão e regressão dos depósitos da substância amilóide [54, 55].

Os depósitos na doença de Alzheimer, nas doenças de priões, nas neuropatias hereditárias e nas ilhotas de Langerhans estão associados à presença de glicosaminoglicanos altamente sulfatados, em particular à forma membranar dos heparano-sulfato proteoglicanos (HSPG). Estes parecem intervir aumentando o conteúdo β -pregueado de proteínas amiloidogénicas [56], localizando-se com os elementos constitutivos da matriz extra-celular. O perlecan é o HSPG predominante na membrana basal e associado aos depósitos da amilóide [57]. Outras moléculas componentes da membrana basal como a laminina, a fibronectina, o colagénio IV e a entactina podem ter um papel na fibrilogénese, facilitando as fases iniciais da nucleação fibrilar [39]. A apolipoproteína E está associada *in vivo* aos depósitos de amilóide, tanto nas formas cerebrais como nas formas generalizadas. Estudos epidemiológicos mostraram um risco aumentado de doença de Alzheimer nas pessoas de origem caucasiana portadoras do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E [58].

Ordenar os acontecimentos na fibrilogénese permitirá o reconhecimento dos processos envolvidos, intra e extra-celulares, os que se dão a nível plasmático e nos órgãos alvo,

os que contribuem para a formação de fibrilas e os que estabilizam as fibrilas já formadas. Todo o trabalho neste sentido representará um investimento útil para a concepção de terapêuticas curativas ou preventivas.

7. Amiloidoses hereditárias

Pode suspeitar-se de amiloidose de um órgão ou sistema pela história clínica e exame físico. Sempre que se está na presença de cardiomiopatia, nefropatia, polineuropatia periférica (incluindo canal cárpico), má absorção, macroglossia ou hepato-esplenomegalia inexplicáveis, deve colocar-se a hipótese de amiloidose sistémica ou localizada. Nas amiloidoses hereditárias a ligação entre a expressão fenotípica, a epidemiologia e a genética tem um papel fundamental no seu diagnóstico e classificação. Inicialmente, a nomenclatura deste tipo de amiloidoses fundamentava-se no tipo de órgão ou sistema mais afectado. Assim, a divisão em amiloidoses nefropáticas, neuropáticas, cardiomiopáticas, hemorrágicas cerebrais e cutâneas era a vulgarmente usada [1]. A terminologia actual obedece à nomenclatura apresentada na tabela 1.

Nas amiloidoses autossómicas recessivas o tipo de amiloidose encontrada é AA; a apresentação clínica pode ser precoce e o envolvimento multiorgânico. A febre Mediterrânica familiar (FMF) e a síndrome da hiperglobulinemia D com febre periódica são seus exemplos [59, 60].

As amiloidoses hereditárias autossómicas dominantes constituem um grupo de doenças geralmente de início tardio e envolvimento sistémico. As fibrilas podem ter origem em diferentes precursores, tais como a TTR, apolipoproteína, fibrinogénio, lisozima, gelsolina e cistatina C [1]. As amiloidoses por TTR são as mais frequentes de entre as amiloidoses hereditárias generalizadas [1]. Na sua maioria, envolvem os nervos periféricos, sendo comum a sua descrição como neuropáticas.

A neuropatia amiloidótica tipo I (português ou de Andrade) associa-se à mutação da TTR V30M, e a tipo II (Indiana/ suíça/ alemã ou de Rukavina) à TTR I84S [61]. Curiosamente, a família descrita por Van Allen como neuropatia amiloidótica familiar tipo III [escocesa/ Iwoa] é devida a uma mutação da apolipoproteína AI e não da TTR [62, 63]. A amiloidose descrita inicialmente como neuropatia amiloidótica tipo IV (finlandesa) associa-se à gelsolina [64].

A cardiomiopatia familiar por amiloidose está também associada a mutações da TTR [65] e das apolipoproteínas AI e AII [66, 67]

As mutações na cadeia A α do fibrinogénio [68], das apolipoproteínas AI e AII e da lisozima associam-se a nefropatia [69, 67, 70]. As amiloidoses com envolvimento dos vasos cerebrais e meníngeos associam-se à cistatina C (tipo islandês) ou à proteína β (tipo holandês) [71, 72].

De seguida, iremos descrever as amiloidoses hereditárias por TTR, em particular a caracterizada por uma substituição de metionina por valina na posição 30 da molécula e as amiloidoses hereditárias com envolvimento renal. Na exposição, usaremos a abreviatura PAF quando nos referirmos à polineuropatia amiloidótica familiar de tipo português, ou seja, a associada à mutação da TTR V30M.

8. Amiloidoses por transtirretina

8.1 A proteína precursora

A TTR é uma proteína plasmática originalmente apelidada de pré-albumina, pois migra adiante da albumina na electroforese de proteínas. O nome de TTR reflecte as suas propriedades como transportadora da tiroxina (T4) e proteína de ligação do retinol (*retinol binding protein*, RBP) [73]. A TTR é a principal proteína transportadora de T4 no líquido céfalo-raquidiano. O fígado sintetiza 90% da TTR, sendo o órgão responsável pela produção do precursor proteico dos depósitos amilóides nos nervos periféricos, vasos, coração e rim. O epitélio pigmentar da retina [74] e os plexos coróideos no cérebro [75] são responsáveis por parte da síntese extra-hepática de TTR, o que explica a deposição de amilóide no vítreo e nas leptomeninges. A hipófise e o pâncreas são outros locais de síntese de TTR.

A proteína é sintetizada sob a forma de uma cadeia polipeptídica com 127 aminoácidos. A sua estrutura foi reconhecida em 1974 [76]. No plasma, a proteína circula como um tetrâmero composto por 4 monómeros cuja massa total é de 59.980 dalton [77]; 2 monómeros estão ligados de modo não covalente formando um dímero estável; dois dímeros associam-se para formar um tetrâmero, com pregueado duplo e simétrico. No tetrâmero existem dois locais de ligação para a tiroxina e quatro para a RBP saturada de retinol. No entanto, a ligação de uma molécula da RBP de um lado do tetrâmero impede a ligação de uma segunda molécula do mesmo lado, pelo que só duas moléculas da RBP se podem ligar

ao tetrâmero. A TTR, ao transportar a RBP, possibilita o transporte de vitamina A evitando a perda desta pequena molécula através do rim. Quando o retinol deixa o complexo, a RBP dissocia-se da TTR e é filtrada pelo rim [1].

A concentração plasmática normal de TTR situa-se entre 20 e 40 mg/dl, podendo baixar no decurso de uma resposta inflamatória aguda ou crónica, e em estados de má nutrição [78]. Aparentemente, os factores que diminuem a produção de TTR são os mesmos que aumentam a proteína SAA e a proteína C reactiva na inflamação aguda. Os níveis plasmáticos de TTR estão significativamente diminuídos nos doentes portugueses com PAF, mas o nível da RBP e o transporte de vitamina A são normais [23]. Os níveis plasmáticos de TTR não estão diminuídos nos portadores assintomáticos da mutação da TTR V30M, sendo semelhantes aos níveis de um grupo de não portadores [79]. A semi-vida da TTR não ultrapassa as 15 horas. No ratinho “knock out” em que o gene da TTR foi eliminado (*null mice*), as consequências fisiológicas da ausência da proteína parecem ser irrelevantes, embora se observe uma concentração plasmática muito baixa de retinol e de T4, sem hipotireoidismo [80]. Os portadores de diferentes mutações da TTR são eutiróides, não apresentando sintomas associados a deficiência de retinol, mesmo quando a mutação altera a afinidade para T4 ou RBP [81].

O gene da TTR humana está localizado no cromossoma 18 (18q11.2-q12.1) [82]. A maioria dos doentes com amiloidose por TTR são heterozigotos, tendo um alelo normal e outro alelo mutante. A probabilidade de expressão dos dois alelos é teoricamente semelhante, mas muitos estudos mostram que o produto do gene normal no plasma é superior ao do mutante [83]. O gene humano estende-se por 7 kb, possuindo 4 exões [84], com 200 nucleotídeos cada um. O exão 1 codifica um peptídeo sinal de 20 resíduos e os 3 primeiros aminoácidos da proteína; o exão 2 codifica os resíduos 4 a 47; o exão 3 os resíduos 48 a 92; e o exão 4 os resíduos 93 a 127. Já foram identificadas um grande número de variantes da TTR, todas envolvendo mutações de um único aminoácido. Por sua vez, as mutações resultam da substituição de um único nucleotídeo na região codificante, excepto uma que deriva da deleção de um codão. As substituições localizam-se entre o resíduo do aminoácido 10 até ao resíduo 122; não há mutações conhecidas no exão 1 [1]. Não descreveremos exaustivamente as mutações da TTR, dando relevo apenas às que se enquadrarem neste trabalho.

8.2 O diagnóstico molecular

As amiloidoses por TTR são um exemplo de como a biologia molecular pode ter uma aplicação prática no diagnóstico, aconselhamento genético e tratamento de doenças hereditárias. O facto da TTR migrar à frente da albumina na electroforese convencional permitiu o despiste e a detecção de mutações no soro. Pode aplicar-se metodologia dimensional, na qual a banda de migração mais rápida da TTR da primeira dimensão é sujeita a focagem isoeléctrica híbrida em gradientes de pH [85]. A detecção de variantes amiloidogénicas de TTR no soro de doentes com PAF também é possível por imunoensaio, utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-TTR [86]. O despiste de mutantes para a TTR no soro também pode ser realizado com ionização por *electrospray* de espectrometria de massa após imunoprecipitação com anticorpos policlonais anti-TTR [87].

O facto da proteína ser composta por 4 exões e fundamentalmente codificada por 3, facilita a análise genética. Quando a mutação não é conhecida, ou quando se espera uma nova mutação, os exões podem ser sequenciados após PCR (*polymerase chain reaction*). A análise pode ser feita por SSCP (*single strand conformation polymorphism*) seguida de sequenciação, o que se torna particularmente útil no despiste de mutações em grande número de amostras. O brometo de cianogénio para clivagem das TTR plasmáticas que possuem mais uma metionina, como resíduo substituído, tem sido usado no diagnóstico da mutação TTR V30M. A tecnologia de PCR com análise por RFLP (*restriction fragments of long polymorphism*) é a que mais vulgarmente se utiliza no diagnóstico genético de famílias com PAF [81].

8.3 Técnicas de imagem

A existência de métodos quantitativos para avaliar a extensão dos depósitos de amilóide é desejável, pois ajuda a um diagnóstico mais precoce, e pode determinar a resposta a um tratamento de modo não invasivo. A cintigrafia com aprotinina (uma protease anti-serina) marcada com tecnésio-99m pode evidenciar depósitos de amilóide em diferentes tecidos, com excepção do rim e fígado [88]. Nestes dois órgãos não é possível diferenciar os depósitos patológicos de captação dos produtos de excreção fisiológica. A aprotinina também se liga à amilóide por transtirretina [89], mas este tipo de cintigrafia não foi até agora usada em doentes com PAF.

Nas amiloidoses por TTR, a cintigrafia quantitativa pode ser realizada com SAP marcado com iodo-123 [90]. Esta técnica não é específica para TTR, não está generalizada, nem é facilmente disponível.

8.4 Patogenia e lesão tecidular

A patogenia das amiloidoses por TTR não está completamente esclarecida. A conformação β da proteína, a sua estabilidade estrutural e resistência à proteólise desempenham papéis fundamentais na formação das fibrilas. Tanto a TTR normal, como a que sofreu modificações na sua sequência, podem formar amilóide. As mutações da TTR criam instabilidade no tetrâmero ou monómero, permitindo que a molécula tenha um intermediário amiloidogénico. Outros factores têm obrigatoriamente de desempenhar um papel na amiloidose transtirretínica, pois o quadro clínico da doença tem variações nos indivíduos portadores da mesma variante da proteína [91]. A diversidade da distribuição orgânica dos depósitos mantém-se um problema não resolvido. A deposição de amilóide no fígado é rara, apesar deste órgão ser o principal responsável pela produção de TTR.

O material fibrilar em grandes quantidades pode alterar a arquitectura tecidular e causar disfunção de órgão, mas nem sempre existe relação directa entre a quantidade de depósitos e a expressão clínica. Outro mecanismo de perturbação funcional pode ocorrer através da interacção das fibrilas de amilóide com receptores locais, tais como os receptores dos produtos finais de glicolização avançada (*receptors for advanced glycation end products*, RAGE). A interacção das fibrilas de TTR com os RAGE pode contribuir para o *stress* oxidativo e toxicidade celular na PAF [92].

9. Mutações da transtirretina

9.1 Distribuição geográfica

A maioria das variantes patogénicas da TTR são raras, embora algumas sejam relativamente comuns em certas populações. Estão descritas mais de oitenta mutações, mas nem todas são patogénicas [35, 81]. A mutação TTR V30M é a mais comum, pode ser encontrada um pouco por todo o mundo, embora tenha o seu maior foco em Portugal. Adiante será pormenorizada a epidemiologia desta mutação.

Embora existam descrições de famílias com as mesma mutação, a maior parte destas encontram-se isoladas em diferentes regiões. No entanto, existem mutações patogénicas comuns como V122I, a T60A e a L58H. A V122I, com origem em África, foi encontrada em 3.9% da população afro-americana e em 5% da população de algumas áreas do oeste africano [93]; cerca de 13.000 afro-americanos foram descritos como homozigotos para esta mutação. A V122I aumenta o risco para amiloidose cardíaca de início tardio. A variante T60A [94] tem origem na Irlanda, Inglaterra e Alemanha. Envolve americanos e australianos de origem irlandesa, causa amiloidose de início tardio com envolvimento neuropático e cardíaco. A mutação L58H, encontrada inicialmente em várias famílias de Maryland, foi também descrita noutros pontos dos Estados Unidos e na Alemanha; a doença inicia-se pelos 40 anos, com neuropatia sensitiva e evolução com cardiomiopatia.

Algumas das mutações encontradas são consideradas não patogénicas, tais como a G6S, encontrada na população caucasiana, e a Y90N também encontrada em Portugal. A variante T119M igualmente não patogénica, foi encontrada em Portugal, Estados Unidos e Suécia. Na população portuguesa foram descritos heterozigotos compostos TTR V30M/T119M. Curiosamente, parece haver um efeito protector da segunda mutação no gene da TTR sobre o desenvolvimento de doença [95].

9.2 Mutações amiloidogénicas em Portugal

A mutação V30M foi a única detectada em Portugal durante vários anos. A mutação S52P (em que a serina é substituída pela prolina na posição 52) foi detectada em três irmãos com neuropatia periférica (observação e comunicação pessoal). A idade de início dos sintomas foi entre a terceira e quarta décadas; um dos doentes apresentava disautonomia grave, cardiomiopatia com aumento da espessura do septo ventricular da parede do ventrículo esquerdo, insuficiência renal crónica e proteinúria vestigial [96].

Outra das mutações descritas foi a S50R (em que a arginina substitui a serina na posição 50) num doente com neuropatia amilóide e disfunção autonómica com início aos 45 anos de idade; neste doente nunca foi detectada proteinúria ou insuficiência renal (observação pessoal).

A mutação TTR V28M foi identificada num doente com neuropatia periférica de início aos 60 anos; a avaliação não mostrou doença clínica renal [97]. Num doente português de 44 anos com alterações da condução cardíaca e cardiomiopatia foi detectada a mutação

TTR S23N (em que a serina foi substituída pela asparagina na posição 23); neste doente não foi descrita nefropatia [98].

9.3 Mutações com doença renal

As amiloidoses sistémicas são raras nas casuísticas de biópsias renais [99]. As mutações amiloidogénicas da transtirretina expressam-se habitualmente por neuropatia, cardiomiopatia ou opacidades vítreas. O rim raramente está envolvido neste tipo de amiloidoses. As mutações da TTR que de modo inequívoco têm envolvimento renal, sob a forma de proteinúria ou insuficiência renal crónica, são a G47E, a S52P e a S77Y.

A mutação G47E (em que a glicina é substituída pelo ácido glutâmico na posição 89) foi descrita numa família italiana [100] e num doente de origem inglesa [101]. As manifestações clínicas predominantes foram nefropatia, cardiomiopatia e neuropatia. A doença iniciou-se entre os 28 e os 52 anos, sendo rápida a evolução para insuficiência cardíaca congestiva e disfunção autonómica. Na família italiana, foram documentados 5 casos (3 homens e 2 mulheres); as 2 mulheres e 1 dos homens apresentaram envolvimento renal. O tempo que mediou desde o início sintomático até à insuficiência renal crónica terminal (IRCT), isto é a altura em que a vida não pôde ser mais sustentada sem métodos de depuração extra-corporal ou transplantação renal, foi de sete anos. A doença comportou-se de modo agressivo, com deterioração rápida e morte em menos de 8 anos, em todos os casos. Houve documentação de deposição renal de amiloide.

A clínica da variante S52P foi descrita pela primeira vez no Reino Unido. A doença manifestou-se por polineuropatia periférica e autonómica, cardiomiopatia e amiloidose renal [102, 103]. O envolvimento do rim traduziu-se por insuficiência renal crónica e proteinúria não superior a 0.3 g/l; a nível histopatológico a deposição de amiloide predominou nos vasos de médio calibre e nas membranas basais dos tubos distais, sendo escassa a nível glomerular [96].

A amiloidose associada à variante S77Y (em que a serina é substituída pela tirosina na posição 77) foi originalmente descrita numa família de origem alemã [104, 105]. A clínica traduziu-se por neuropatia dos membros inferiores e diarreia, com início pelos 50 anos. A cardiomiopatia pode também integrar a doença. A insuficiência renal tem sido considerada a principal causa de morte; não há descrição de histopatologia renal.

10. Amiloidose associada à mutação TTR V30M

A descrição da doença associada a esta mutação da TTR está perpetuada na publicação basilar “*A peculiar form of peripheral neuropathy – familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves*” [12]. O estudo anatomopatológico então realizado permitiu identificar a doença como uma amiloidose, apelidada de atípica por assentar no envolvimento do sistema nervoso periférico, não habitual nas outras formas.

As observações de Corino de Andrade mantêm toda a actualidade. O que nos separa da descrição neurológica primordial resulta particularmente das capacidades progressivas da bioquímica e da biologia molecular. O seu desenvolvimento permitiu esclarecer os modos de transmissão, alguns contornos epidemiológicos e os desvios à clássica monotonia clínica.

As descobertas até agora realizadas não foram suficientes na explicação da variabilidade fenotípica. Assim, quando Corino de Andrade apresentou à comunidade científica a sua descoberta, deixou uma inquietude perante a doença. Nunca se esgotarão as possibilidades de progresso no seu entendimento.

10.1 Distribuição geográfica

A distribuição da mutação TTR V30M é mundial. Tendo o maior foco em Portugal, foi encontrada na Suécia [106], Japão [107], Brasil [108], Inglaterra [109], Maiorca [110], França [111], Itália [112], Grécia [113], Turquia [114], Chipre [115], Estados Unidos [116], Finlândia [117] e Argentina [118]. Embora em grande número de casos seja possível provar a ascendência portuguesa ou sueca, nem sempre a ligação é clara com os dois maiores focos a seguir ao português, o japonês e o sueco.

No Japão, a doença foi descrita em 1968 por Araki [15] numa família de Arao, no distrito de Kumamoto e posteriormente em Ogawa [119], locais aonde ainda se encontram a maioria das famílias. Posteriormente, a mutação foi encontrada noutras áreas do país, fora dos chamados focos endémicos [120].

Enquanto que o maior número de doentes e famílias é encontrado em Portugal, o alelo V30M parece ter uma elevada prevalência em comunidades isoladas no norte da Suécia, aonde 3 a 5% da população terá heterozigotia para a mutação, embora a penetrância da

doença seja baixa [121]. Tanto na Suécia [122] como em Portugal (observação pessoal), foram encontrados homozigotos para a mutação. Na Suécia as áreas de maior concentração de doentes e famílias são a cidade de Skellefteå e o vale do rio de Skellefteå, a cidade de Piteå e o vale do seu rio [123]. Não há ligações conhecidas entre as famílias destas duas cidades.

A mutação da transtirretina V30M tem uma elevada prevalência e distribuição por vários países, mas há evidência de que existiram vários acontecimentos mutacionais. No Japão, a mutação foi associada a três diferentes haplótipos, sendo um deles o que foi encontrado nos doentes portugueses e suecos [124]. Se no Japão a existência de vários haplótipos sugere múltiplos acontecimentos mutacionais separados, o efeito de um fundador, ou seja, a expansão do gene a partir de um foco comum, parece ser compatível com a população portuguesa, sueca e parte da japonesa [1].

Em Portugal, o registo dos doentes com polineuropatia amiloidótica familiar tem sido realizado, desde 1939, no Centro de Estudos de Paramiloidose (CEP) sob a responsabilidade dos médicos do Hospital Geral de Santo António (HGSA) e do secretariado do CEP. Maria Ramos, secretária do CEP até há alguns anos atrás, e Teresa Vasconcelos, colaboradora do CEP, foram elementos fundamentais na recolha de dados e passagem dessas genealogias ao papel.

Ao longo destes anos, os neurologistas do hospital mantiveram o arquivo familiar e a renovação das árvores genealógicas. Nos últimos 12 anos, também os nefrologistas do HGSA contribuíram para a inscrição de novas famílias e actualização das já conhecidas. Um registo informático de doentes e seus familiares, confidencial e separado do clínico, foi criado em 1988 por Alda Sousa, do Departamento de Estudos de Populações do ICBAS. Este representou um investimento indispensável para a análise epidemiológica da PAF, e ponto de partida fundamental para parte do trabalho desenvolvido nesta tese.

A distribuição geográfica das famílias e dos doentes tem como base a sua origem, ou seja, o concelho de nascimento do antepassado mais remoto descrito como afectado ou identificado como transmissor; quando a doença não se conhece nas gerações anteriores, a origem é atribuída ao concelho de nascimento do próprio, ou de ambos os progenitores, se coincidente. Assim, a origem familiar não coincide necessariamente com o local de residência do doente.

Os primeiros 64 doentes observados por Corino de Andrade pertenciam a 25 famílias não relacionadas, e 54 eram provenientes da Póvoa de Varzim e de localidades vizinhas, habitualmente no litoral próximo do Porto. Na Póvoa de Varzim e em Vila do Conde a prevalência da doença foi calculada em 151×10^{-5} , e a frequência de portadores do gene mutante em 186×10^{-5} [125].

A importância dos concelhos da Póvoa de Varzim e de Vila do Conde como origem familiar é bem expressa no facto de, até 1992, 424 dos 1224 doentes registados (35%) pertencerem a 140 famílias desta área (Póvoa de Varzim com 99 famílias e 330 doentes, Vila do Conde com 41 famílias e 94 doentes). No mesmo ano, no norte do país, os concelhos de Barcelos (52 famílias e 165 doentes) e Braga (29 famílias e 94 doentes) eram aqueles que se seguiam como áreas de maior incidência [126]. Figueira da Foz (34 famílias, 84 doentes), Porto (26 famílias, 59 doentes), Esposende (26 famílias, 77 doentes), Covilhã (20 famílias, 42 doentes) e Matosinhos (10 famílias, 19 doentes) são outros dos concelhos da área de influência da consulta do HGSA ou do CEP, tradicionalmente referidos e com árvores genealógicas registadas.

Os dados de 1992 [125] mantêm actualidade quanto à importância relativa dos concelhos de origem, mas o número total de doentes aumentou progressivamente desde então, em cerca de 50 novos diagnósticos por ano. Reconheceram-se novas famílias, isto é, sem ligação às anteriormente conhecidas. Ao mesmo tempo que novos doentes foram registados, surgiram novos concelhos de origem fora dos locais de maior incidência, tanto no norte do país, como nas Beiras e na Estremadura. A migração de população para a área de Lisboa, particularmente aquela com origem nas Beiras, fez crescer o número de doentes no sul do País. Até Dezembro de 2003 foram observados no CEP 2030 doentes, correspondendo a 583 famílias (tanto quanto se sabe) não relacionadas entre si [126].

10.2 Clínica

Idade de início

A polineuropatia amiloidótica familiar inicia-se na vida adulta e apresenta variação intrafamiliar na idade dos primeiros sintomas.

A idade de início em Portugal é precoce, em média aos 33.5 ± 9.5 anos (31.9 ± 9.6 anos nos homens e 35.6 ± 9.0 anos nas mulheres), tendo uma amplitude dos 17 aos 78 anos [125]. Nos locais de descrição inicial da doença, tais como a Póvoa, Vila do Conde e Espo-

sende, em que a penetrância é completa, o início dos sintomas é quase sempre precoce. A idade de início pode ser mais tardia, após os 50 anos, ou a doença pode nunca se manifestar, conhecendo-se indivíduos portadores da mutação com idade muito avançada (até cerca de 90 anos) [91]. As formas de começo tardio surgem sobretudo fora dos locais de elevada prevalência da doença [127].

A associação entre casos de expressão tardia e portadores assintomáticos foi demonstrada na população portuguesa [128, 129]. Nestas famílias, em que há portadores idosos e assintomáticos, a penetrância é incompleta, e o diagnóstico do primeiro doente pode ser difícil. O doente sem antecedentes familiares, com quadro clínico em idade mais avançada, surge como caso isolado não sendo o diagnóstico de PAF colocado na abordagem inicial. O teste genético possibilitou não só um reconhecimento destes doentes, mas também o estabelecimento de desvios ao clássico quadro clínico neuropático.

Na Suécia, o início da doença é mais tardio, em média aos 56.7 ± 13.2 anos, não tendo sido encontradas diferenças na média de idade de início entre homens e mulheres [125]. Enquanto que em Portugal 81% dos doentes desenvolve sintomas antes dos 40 anos de idade, na Suécia só 13% dos doentes apresenta manifestações clínicas antes daquela idade.

Nos doentes japoneses, os primeiros sintomas iniciam-se habitualmente entre os 20 e os 45 anos [130], mas fora de Ogawa e Arao a doença pode principiar mais tarde, em média aos 62.7 ± 6.6 anos [120].

O estudo de um par de gémeos monozigotos, com origem em Maiorca, mostrou discordância para idade de início da PAF. Embora sujeitos ao mesmo ambiente, um desenvolveu sintomas aos 38 anos de idade e o outro aos 50 anos [131]. Em ambos a doença cursou com proteinúria e insuficiência renal.

Nos doentes portugueses, há influência do progenitor transmissor na idade de apresentação. O início mais precoce associou-se à transmissão materna e o mais tardio à paterna. Considerando o sexo do progenitor e do próprio doente existe evidência de que os filhos das mães afectadas são os que adoecem mais cedo, enquanto que as filhas dos pais afectados mais tarde [125].

Em algumas famílias portuguesas foi demonstrado um efeito de antecipação na idade de início, podendo o gene passar mais do que uma geração sem expressão clínica. Em certas famílias com três gerações de doentes, constatou-se um efeito cumulativo de antecipação [125].

Diferenças entre sexos

A doença é autossómica dominante, pelo que é de esperar que o número de homens e mulheres afectados seja semelhante. No estudo de Corino de Andrade verificou-se uma nítida preponderância do sexo masculino (42 homens, 22 mulheres), facto corroborado por Ribeiro do Rosário (14 homens, 5 mulheres) na observação de doentes de outras áreas geográficas (tais como Unhais da Serra e Santarém) [132]. A razão homem:mulher é de 1.3:1 [125]. As mulheres adoecem mais tarde, facto que sugere que poderão existir maior número de mulheres assintomáticas.

Manifestações clínicas

A neuropatia periférica e autonómica constitui a principal expressão clínica desta doença. Associa-se a diferentes graus de envolvimento visceral por deposição sistémica de amiloide.

A doença é progressiva, incapacitante e fatal ao fim de cerca de 11 anos. Foi descrita como tendo um curso uniforme e invariável, excepto em alguns casos raros. A descrição de Corino de Andrade [12], mantém-se a principal referência de revisão da neuropatia. Ribeiro do Rosário [132] reforçou a descrição das manifestações clínicas e laboratoriais atribuídas à doença. Paula Coutinho e colaboradores [133], em 1980, alargaram o nosso conhecimento sobre a evolução da neuropatia após a revisão de 483 casos de PAF. Ao longo destes anos, a avaliação neurofisiológica permitiu uma maior precisão no diagnóstico dos territórios envolvidos e segurança no diagnóstico em fases mais precoces. Atendendo às limitações do estudo neurofisiológico para apreciar alguns dos aspectos da doença, foi proposta uma escala quantitativa e de simples aplicação para estadiamento, em que parâmetros avaliados são a perda de peso, a neuropatia sensitiva, autonómica e motora [134]. O esforço para o estadiamento objectivo da doença, com correlação de dados electromiográficos e de disfunção autonómica, manteve-se com o estudo de Ducla-Soares [135].

A investigação de outros territórios prosseguiu, nomeadamente do coração, olho, rim, sistema nervoso autónomo, endócrino e da função vesico-esfincteriana, estabelecendo-se diferenças entre a mutação V30M e outras mutações da TTR.

O reconhecimento da evolução natural da doença continua a ser a base essencial para identificação e tratamento das complicações, bem como para avalizar ensaios terapêuticos. A análise destes ensaios não se poderá cingir à evolução da neuropatia, devendo envolver os principais órgãos afectados.

Neuropatia sensitiva e motora

O início da doença é geralmente insidioso, embora em alguns casos pareça ser súbito. O doente relaciona por vezes o início com um acontecimento relevante na sua vida, tal como a morte de um familiar ou um traumatismo accidental. A doença pode apresentar-se como um sintoma isolado ou por várias queixas simultâneas de intensidade variável.

Alterações da sensibilidade, como disestesias e hipostesia nas extremidades distais dos membros inferiores, são geralmente os sintomas mais frequentes e precoces, só posteriormente se instalando a perda de sensibilidade [12]. As dores nas pernas e pés são difusas e agravam-se com a marcha prolongada. A perturbação da sensibilidade térmica inicia-se geralmente no hálux. A hipostesia acentua-se em extensão, sendo depois atingidas a sensibilidade dolorosa e táctil. Em fases mais avançadas existe atingimento das sensibilidades profundas. As perturbações dolorosas, da sensibilidade superficial e profunda têm uma progressão ascendente, das extremidades distais dos membros para as proximais. Podem surgir queimaduras e ferimentos indolores. Nas áreas de anestesia térmica e algica surge diminuição da sudorese.

As perturbações motoras surgem geralmente depois da neuropatia sensitiva, embora alguns doentes refiram fadiga excessiva nos músculos das pernas desde o início [12]. As alterações motoras começam pelos músculos extensores do pé. O quadro assume as características das paralisias periféricas, com abolição dos reflexos tendinosos e atrofia muscular. Nem sempre o grau de parésia e atrofia são harmónicos. Nos membros inferiores, a associação das perturbações da sensibilidade com as da motilidade imprime à marcha um carácter de *steppage* (marcha escarvante) [132].

As alterações referidas aos membros inferiores surgem mais tarde nos membros superiores conferindo a neuropatia em forma de luva e peúga. Alguns doentes apresentam de início disestesias, fraqueza muscular e atrofia nas extremidades distais dos membros superiores, uni ou bilateralmente. Estas queixas podem manter-se isoladas durante anos, sobrepondo-se clinicamente a síndrome do canal cárpico.

As lesões tróficas mais frequentes são as úlceras perfurantes plantares. Estas surgem nas áreas de alteração da sensibilidade, embora não pareça haver relação directa entre a gravidade da lesão sensitiva e a frequência dos problemas tróficos. Os traumatismos frequentes, a atrofia muscular e as infecções cutâneas favorecem a osteólise e perda dos metatársicos e falanges.

Neuropatia autonómica

A disfunção do sistema nervoso autónomo pode ser observada antes da neuropatia sensitiva e motora. Os gânglios autonómicos apresentam deposição maciça de amiloide [136]. Os depósitos mais exuberantes foram encontrados nos gânglios espinais e raízes posteriores, e os menos exuberantes nas raízes anteriores nos nervos motores. O exame histopatológico das fibras mielinizadas revela uma diminuição significativa nas pequenas fibras em relação às grandes fibras mielinizadas [137]. A depleção de catecolaminas foi associada à neuropatia autonómica da amiloidose. Enquanto que o sistema nervoso autónomo e periférico é muito susceptível à infiltração por amiloide, o sistema nervoso central não parece ser afectado, excepto na parede de pequenas artérias [136].

As alterações clínicas mais comuns da polineuropatia autonómica são as cardiovasculares, do tracto gastrointestinal, oculares, glandulares, vesicais e sexuais.

Alterações cardiovasculares

A infiltração do sistema de condução cardíaco por amiloide complica-se com o desenvolvimento de disritmias, síncope e morte súbita. As alterações mais frequentes nos doentes portugueses são as perturbações do ritmo, havendo só 12,5% de doentes com electrocardiografia dinâmica normal (estudo com Holter de 24 horas). As alterações mais comuns são a baixa voltagem, QS de V1 a V3 e as alterações da condução. O bloqueio auriculo-ventricular de primeiro grau foi descrito como a perturbação de ritmo cardíaco mais frequente; foi estabelecida relação entre a gravidade das alterações de condução e o tempo de evolução de doença; a insuficiência cardíaca não foi considerada habitual [138]. Nos doentes em que só é detectada neuropatia sensitiva, raramente se encontram alterações graves do ritmo cardíaco [139].

As alterações ecocardiográficas foram descritas num estudo que envolveu 110 doentes portugueses [139]. Os autores relacionaram as manifestações mais precoces com a evolução da doença neurológica. Nesse trabalho foi observado um padrão granular brilhante nas paredes ventriculares, no pericárdio, nas válvulas e na raiz da aorta da maioria dos doentes; o relaxamento do ventrículo esquerdo mostrou estar alterado precocemente, e o aumento da espessura da parede ventricular só foi observado em fases mais adiantadas; as alterações diastólicas do tipo restritivo só foram encontradas em 3 doentes e a dilatação da aurícula esquerda em 4.

A hipotensão ortostática, outra característica comum, pode condicionar grande incapacidade para o doente e mesmo levar a perdas transitórias de consciência. Um excelente marcador da neuropatia autonômica é a redução da taxa de variação da frequência cardíaca. Aquando da realização de manobras de Valsalva ou inspiração profunda podem observar-se perturbações das respostas simpática e parasimpática. O mecanismo que está subjacente à desregulação autonômica cardíaca parece ser a disfunção dos receptores simpáticos. Os doentes têm as extremidades frias, o que sugere alterações na vasodilatação periférica.

Alterações gastrointestinais

As alterações da função gastrointestinal são geralmente atribuídas à neuropatia autonômica, constituindo por vezes manifestações iniciais da doença. Sucedem-se geralmente obstipação, alternância entre diarreia e obstipação, e mais tarde diarreia. Nas fases tardias surge diarreia contínua e incontinência fecal. Náuseas matinais, vômitos pós-prandiais e disfagia podem levar a uma ingestão alimentar progressivamente menor. A má absorção dos alimentos pode relacionar-se com um tempo de retenção intestinal prolongado, com hiperproliferação bacteriana no delgado e alterações na reabsorção dos ácidos biliares. Surge retenção gástrica marcada, com refluxo gastroesofágico geralmente pouco sintomático [140].

Alterações glandulares

As alterações glandulares são particularmente notadas a nível das glândulas salivares e lacrimais com diminuição da produção de saliva e lágrimas, boca seca e xerofthalmia.

Em consequência da deposição de substância amilóide no estroma, nervos e vasos pancreáticos (sem envolvimento das ilhotas de Langerhans) [141], surge alteração da tolerância à glicose, embora com níveis de glicemia normais em jejum. Após administração de uma dose de sobrecarga de glicose verifica-se uma resposta anormal da glicemia, do glucagão e da insulina, com hipoglicemia transitória e hiperinsulinemia [142].

Alterações vesicais

Os sintomas de disfunção da bexiga surgem no curso da doença, podendo constituir a forma de apresentação clínica em 12% dos casos [143]. Na maioria dos doentes surge dimi-

nuição ou mesmo perda da percepção de plenitude vesical, incapacidade de manter uma contração muscular completa e volumes crescentes de urina residual. Verifica-se um aumento da pressão intra-vesical ao mesmo tempo que aumenta da capacidade da bexiga [144]. O esvaziamento vesical passa a ser conseguido com a ajuda dos músculos abdominais. Com o aumento da capacidade vesical surgem lesões do detrusor e refluxo vesico-ureteral. A necessidade de cateterização vesical permanente e da incontinência urinária, presentes nas formas avançadas de doença, limitam a vida social. Estas alterações predis põem os doentes a cistites e pielonefrites, por vezes polimicrobianas, com recorrências e reinfecções frequentes.

Alterações sexuais

A disfunção erétil é uma manifestação praticamente constante, precoce e inaugura a doença em cerca de um terço dos casos [145]. A diminuição de volume de ejaculado é gradual e posterior ao início dos sintomas, progredindo até à anejaculação. No estudo conduzido por Corino de Andrade foi descrita atrofia dos tubos seminíferos com azoospermia. Os caracteres sexuais secundários não se alteram em qualquer dos sexos.

Manifestações oculares

Nos doentes portugueses as manifestações mais comuns são a xeroftalmia e as perturbações vasculares da conjuntiva. As alterações pupilares, o glaucoma e as opacidades do vítreo são também frequentes [146]. Em muitos doentes observam-se anisocoria e pupilas de contorno irregular. Nos doentes suecos as opacidades do vítreo por deposição de amilóide são mais frequentes do que nos portugueses [147]. Em doentes portugueses as opacidades do vítreo já foram encontradas como manifestação inicial de doença. Em casos de autópsia, foi descrita deposição precoce de amilóide na conjuntiva e na retina, e deposição tardia no corpo vítreo e no canal de Schlemm [148]. No nervo óptico os depósitos surgem precocemente. Não foi demonstrada correlação entre a intensidade dos depósitos e a duração da doença.

Anemia

A anemia nos doentes portugueses é normocítica e normocrômica, com evidência de ferropenia em alguns casos e sem défices relevantes de vitamina B12 ou ácido fólico. Os doseamentos séricos de eritropoietina em doentes anémicos e sem insuficiência renal evi-

denciaram níveis inapropriadamente baixos da hormona. A administração de eritropoietina recombinante humana em doses baixas é eficaz no tratamento da anemia [149]. A neuropatia autonómica poderá contribuir para a sua instalação [150].

Emagrecimento

A perda de peso pode ser uma manifestação inicial da doença. No fim do primeiro ano de sintomas, 87% dos doentes perderam, em média, 10% do seu peso prévio. Em estádios mais avançados, a perda de peso pode chegar a 25% [151]. O emagrecimento não mostrou correlação com a idade de início, sintomas de início (nomeadamente a diarreia), nem com tempo de evolução da neuropatia motora.

Manifestações cutâneas

As manifestações mais frequentes são a xerose, o eczema seborreico, as queimaduras, o acne, as úlceras perfurantes e as onicomicoses [152].

10.3 Tratamento

O tratamento desta doença inclui medidas que podem prolongar a vida como a colocação de *pacemakers*, a diálise e o tratamento das infecções. A fisioterapia é útil na manutenção das capacidades motoras e na diminuição das complicações que facilitam o aparecimento de úlceras de pressão. As ajudas técnicas, como as talas de apoio posterior e ortóteses de sustentação e alinhamento articular, facilitam a mobilidade do doente afectada pela perda precoce da marcha autónoma.

A loperamida tem sido tradicionalmente utilizada para o tratamento da diarreia, e a metoclopramida para a estimular o esvaziamento gástrico. A colostomia representa uma opção para os doentes com diarreia profusa e limitativa da sua vida social.

O uso de meias de compressão e de fluodrocortisona pode ser útil no tratamento da hipotensão ortostática. A L-treo-3,4-diidroxifenilserina (L-DOPS) é um aminoácido não natural sem efeito pressor directo que serve como substrato da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (dopa descarboxilase) para formar noradrenalina. A L-DOPS pode ser utilizada como precursor da noradrenalina nos estados deficitários como na PAF. O uso deste fármaco foi ensaiado nesta patologia para tratamento da hipotensão ortostática sintomática, tendo-se mostrado seguro e vantajoso [153]. O fármaco não se encontra

disponível, porém, para uso alargado para além dos ensaios terapêuticos iniciais. A vitrectomia pode restabelecer a visão quando surgem opacidades do vítreo, embora por vezes só temporariamente. A plasmaferese e a imunoadsorção de transtirretina foram realizadas em pequenos grupos de doentes, sem evidência definitiva de vantagens a longo prazo [154, 155].

O transplante hepático é o único tratamento que até hoje foi considerado específico. Este conduz ao rápido desaparecimento da variante da transtirretina no plasma [156] com diminuição da carga de amiloide visceral, facto demonstrado pela cintigrafia quantitativa com SAP radiomarcado [157].

Desde 1990 e até 2003, foram referidos ao registo internacional de transplantação de amiloidoses por transtirretina (www.fapwtr.org) 718 doentes, na maioria portadores da mutação TTR V30M.

No registo, a sobrevivência dos doentes com a variante V30M após o primeiro e quinto anos de transplante foi de, respectivamente, 83% e 76%. Os factores que influenciaram favoravelmente a sobrevivência do doente cinco anos após o transplante hepático foram a duração da doença inferior a 7 anos, o índice de massa corporal modificado (peso em Kg/altura² em metros, a multiplicar pela albumina sérica em g/l) superior a 700 e a variante da transtirretina V30M. Neste mesmo registo, 70% das mortes foram atribuídas a causas cardíacas e sepsis. Não houve evidência de melhoria das alterações neurológicas após a transplantação.

A progressão da doença após o transplante não mostrou resultados coincidentes. Na avaliação de 25 doentes seguidos durante mais de 2 anos após o transplante hepático não foi encontrado envolvimento motor nos doentes com neuropatia sensitiva pura pré-transplante, mas também não se constatou melhoria de função motora nos já afectados [158]. No mesmo estudo, em 7 de 15 doentes transplantados com biópsia de nervo pré e pós-transplante a taxa de axónios mielinizados perdidos foi superior à observada num grupo de doentes não transplantados. Contrariamente, outro trabalho demonstrou regeneração das fibras mielinizadas num doente submetido a transplantação hepática [159]. Em Portugal, a avaliação clínica e neurofisiológica de 35 doentes portadores da variante TTR V30M e submetidos a transplante hepático demonstrou estabilização ou progressão lenta da doença [160].

Após o transplante hepático poderão surgir opacidades vítreas relacionadas com síntese *de novo* da variante da TTR pelo epitélio pigmentar da retina, e progressão de cardiomiopatia causada pela deposição de TTR normal [161, 162, 163].

A transplantação hepática limita o acesso atempado ao tratamento, pois o número de doentes em Portugal com indicação para o procedimento excede a oferta de órgãos.

Outras alternativas à transplantação têm sido delineadas *in vitro*. A estabilidade da conformação da transtirretina amiloidogénica com sulfito e alcalinização foi descrita como uma possibilidade para atrasar o início da doença [164] e o tratamento com 4'-iodo-4'-deoxidoxorrubicina (I-DOX) ou com tetraciclina permitiu a fragmentação de fibrilas de TTR [165].

O aconselhamento genético, a identificação dos portadores da mutação da TTR, os diagnósticos genéticos pré-natal e pré-implantação com posterior fertilização *in vitro* representam opções para os indivíduos em risco ou casais envolvidos [166, 167].

11. O rim nas amiloidoses

As amiloidoses familiares neuropáticas não foram classicamente associadas a doença renal glomerular. Detalhar-se-ão as manifestações clínicas e anatomopatológicas renais das amiloidoses. Depois, descreveremos as características das amiloidoses hereditárias nefropáticas. O seu conhecimento é essencial para se apreciarem as diferenças estabelecidas em relação à PAF.

11.1 Frequência do atingimento renal nas amiloidoses

A amiloidose representa 2,5 a 2,8% da histopatologia renal [168], mas em adultos não diabéticos com síndrome nefrótica pode ser encontrada em cerca de 12% das biópsias renais [169]. A frequência da infiltração renal depende do tipo de amiloidose, sendo de 90% na amiloidose AA [170] e de cerca de 50% na AL [171]. Nas amiloidoses hereditárias, o envolvimento do rim tem sido descrito com mais detalhe na FMF; a infiltração renal por amiloide atingia 90% dos judeus sefarditas afectados, antes da terapêutica com colchicina [172].

As outras amiloidoses familiares nefropáticas são raras e a gravidade de doença renal depende do tipo de mutação encontrada na proteína precursora. A investigação de 350 doentes com amiloidose sistémica e com o diagnóstico de AL sugerido pela clínica, pelos exames laboratoriais e pela ausência de história familiar mostrou que 34 (9,7%) destes casos correspondiam a amiloidoses por fibrinogénio, TTR, lisozima ou apolipoproteína

AI. As manifestações clínicas renais estavam presentes em 21 dos 34 doentes. As mutações da TTR, detectadas em 13 desses doentes, não cursaram com doença renal, excepto a mutação G47E [111].

11.2 Manifestações clínicas

As manifestações renais são semelhantes nos vários tipos de amiloidose. O diagnóstico baseia-se nas características sistémicas de cada doença. A infiltração do rim por depósitos de amiloide não implica expressão clínica e, em grande parte dos casos, o diagnóstico faz-se quando já está presente proteinúria superior a 3 g/dia.

Provavelmente, a amiloidose em que melhor se consegue traçar o curso é a FMF, na qual os estudos anatomopatológicos renais permitiram concluir que existe uma fase sem evidência clínica da doença, visto que a proteinúria só é detectável a partir de 300 mg/dia. As manifestações renais começam por proteinúria habitualmente não selectiva, intermitente e assintomática, e progridem até à síndrome nefrótica e uremia. A duração desta progressão pode ir de cinco a vinte anos [173].

As outras amiloidoses apresentam também um curso com proteinúria intermitente, de grau variável. A função renal está geralmente preservada de início, embora tenham sido descritos casos de insuficiência renal precoce. A proteinúria aumenta com o tempo de evolução, podendo atingir grande intensidade, conduzindo a complicações trombóticas e desnutrição. Na amiloidose AL, a expressão clínica da infiltração renal já está presente num terço dos doentes na apresentação da patologia [171]. Uma vez instalada, a síndrome nefrótica tende a persistir, embora estejam descritos casos de remissão da proteinúria com persistência dos depósitos de amiloide no rim. Já foi documentada a remissão da síndrome nefrótica e insuficiência renal aguda na amiloidose AL após transplantação autóloga de células estaminais [174].

O tempo de evolução para a insuficiência renal crónica não é homogêneo, depende do tipo de amiloidose e é habitualmente mais rápido na amiloidose AL. A deterioração progressiva da função renal na maioria das doenças glomerulares é acompanhada de diminuição ou mesmo desaparecimento da proteinúria, mas nas amiloidoses a síndrome nefrótica tende a persistir mesmo em casos de insuficiência renal avançada [175]. Uma das consequências da proteinúria nefrótica é a hipoalbuminemia profunda, que resulta numa diminuição da pressão oncótica intravascular e edema. O edema requer terapêutica diurética

que agrava a contracção de volume, a hipotensão e a redução do aporte sanguíneo ao rim, predispondo à elevação da creatinina. A embolização renal bilateral por cateterismo já foi usada para tratamento da síndrome nefrótica na amiloidose, quando a terapêutica medicamentosa com captopril, furosemida e indometacina foi ineficaz [176]. A evolução para a insuficiência renal crónica terminal em algumas amiloidoses pode cursar sem proteinúria nefrótica [103, 177]. O sedimento urinário é geralmente normal, embora a hematúria microscópica possa estar presente em 5 a 10% dos casos [175].

A frequência de hipertensão arterial é variável, estando presente em 20 a 35% [178] dos doentes, e predominando na amiloidose AA. A hipotensão ortostática é comum e aparece durante a evolução da doença, seja por disfunção autonómica, infiltração cardiovascular, insuficiência supra-renal ou hipovolemia associada à síndrome nefrótica. Na presença de hipotensão ortostática associada a insuficiência renal, sobretudo quando existem antecedentes de hipertensão arterial, a possibilidade de amiloidose deve ser colocada.

Um dos estudos que investigou a nefropatia por amiloidose não AL foi realizado na Turquia [179]. Uma análise retrospectiva, feita por questionário a onze unidades nefrológicas, englobando 287 doentes turcos com amiloidose secundária por FMF e doenças inflamatórias crónicas (AA), demonstrou que a manifestação mais frequente da amiloidose é o edema seguido da proteinúria. As médias das tensões arteriais sistólica e diastólica eram normais, mas em 12% dos doentes foi registada hipertensão arterial; 38% dos doentes necessitaram de terapêutica de substituição de função renal, embora os autores admitam ter introduzido um viés, pois a referência foi feita exclusivamente por nefrologistas.

11.3 Expressões clínicas atípicas

Manifestações mais raras podem resultar da deposição de amiloide em locais específicos no parênquima renal. O atingimento tubular pode ser responsável por acidose tubular renal e diabetes insípida nefrogénica. A deposição nos tubos proximais pode apresentar-se como uma síndrome de Fanconi, típica da amiloidose AL. Em três de nove doentes com amiloidose AA e proteinúria escassa ou ausente foi observado um padrão de deposição predominantemente vascular, com ausência de lesões glomerulares; a insuficiência renal foi a apresentação em sete [177]. Vários são os estudos, nomeadamente nas formas hereditárias, que reforçam a possibilidade de depósitos vasculares e intersticiais, sem expressão clínica [180, 181].

11.4 Ecografia renal

Classicamente considera-se que a amiloidose se acompanha de aumento do tamanho dos rins, mas este achado, presente em cerca de 20% dos casos, depende do estágio clínico em que o doente é observado. Os estudos existentes relatam um número pequeno de doentes, enquanto que os que analisam um número maior apreciam a amiloidose num conjunto de doenças glomerulares. A descrição dos exames ecográficos em sete casos com amiloidose [182] mostrou que nos casos de estádios mais avançados, com presença de esclerose glomerular, os dados ultrasonográficos não se distinguem dos padrões observados noutras doenças glomerulares. Um outro trabalho, que comparou o aumento difuso da ecogenicidade do parênquima renal com o aumento focal [183] em diversas patologias, concluiu que a amiloidose era uma das doenças que se associava a aumento difuso, enquanto que o aumento focal estava presente na pielonefrite crónica.

11.5 Complicações da nefropatia

As principais complicações da doença renal por amiloidose são a trombose da veia renal, a insuficiência renal aguda e a desnutrição grave.

A trombose das veias renais é relatada com uma grande amplitude de frequência, desde 4 a 40% [175], reflectindo provavelmente as diferentes metodologias de diagnóstico. A desidratação e a hipoalbuminemia contribuem para esta situação, que se complica com rápida deterioração da função renal [184].

A insuficiência renal aguda na amiloidose, seja por nefrotóxicos, cirurgia, ou trombose da veia renal, tem um prognóstico mau em termos de recuperação, mesmo na presença de uma função renal anterior normal [185].

11.6 Anatomia patológica renal

Aspecto macroscópico

Os rins nas amiloidoses apresentam habitualmente uma superfície regular, lisa, com aspecto pálido e por vezes aumentado de volume. A distinção entre córtex e medula pode ser difícil. Em pelo menos 10% dos casos os rins já apresentam uma superfície irregular e estão diminuídos de tamanho. A atrofia renal, que afecta mais a zona cortical, é atribuída a

alterações isquêmicas eventualmente motivadas por depósitos de amilóide nas artérias renais [186].

Microscopia óptica

A amilóide pode depositar-se em qualquer local do parênquima renal, mas o envolvimento glomerular e vascular é o mais típico [175, 187].

Os depósitos, para além da positividade para o vermelho do Congo, são levemente eosinofílicos, não coram pelo ácido periódico de Schiff nem pela metamina prata.

No glomérulo, os depósitos iniciam-se no mesângio e, não estando as células mesangiais aumentadas em número, parecem deslocadas para as margens por massas eosinofílicas. O envolvimento glomerular moderado tem habitualmente uma distribuição segmentar, por vezes estando limitado ao pólo vascular, facto que sugere que os depósitos podem começar na sua vizinhança. Com a deposição mais extensa surgem verdadeiros nódulos que empurram para a periferia as células endoteliais e mesangiais. Na fase inicial as paredes periféricas das artérias capilares glomerulares estão poupadas; posteriormente, os depósitos ocupam a membrana basal em posição extra-membranosa ou sub-endotelial. Numa fase tardia surgem massas irregulares, com aspecto de espículas que alargam a membrana basal. Estas espículas diferenciam-se das da glomerulopatia membranosa porque têm uma distribuição muito menos uniforme. Já foi documentada a presença de crescentes celulares, mas surgiram geralmente em doentes com artrite reumatóide [175]. O glomérulo pode ficar obsolescente e, ao contrário da maioria das doenças glomerulares, mantem-se aumentado de tamanho; neste estado, o glomérulo pode perder as características histoquímicas da amilóide [188].

Em regra, os vasos de todo o calibre podem estar envolvidos em toda a sua espessura e, mais raramente, em toda a sua circunferência. A adventícia tende a ser envolvida mesmo em fases precoces, a íntima pode estar poupada e o *lumen* preservado; posteriormente os vasos podem ficar obstruídos por amilóide. Ocasionalmente só as pequenas arteríolas são a única estrutura renal envolvida.

As membranas basais tubulares podem conter depósitos que envolvem os tubos distais e as ansas de Henle. Os depósitos são sobretudo observados na vertente externa da membrana basal. Na sequência destas lesões surge atrofia tubular. Os depósitos podem surgir também nos *vasa recta* e tecido intersticial, neste caso com envolvimento preferencial medular.

A imunohistoquímica ou a imunofluorescência renal pode ser realizada para caracterizar, com grande segurança, a proteína precursora da amiloide (AL, AA, TTR, fibrinogénio, gelsolina) [175]. O uso de anticorpos monoclonais aumenta a fiabilidade da identificação.

Microscopia electrónica

As alterações ultraestruturais confirmam os dados da microscopia óptica. Os depósitos estão restritos ao mesângio quando presentes em pequena quantidade. Nesta região, as fibrilas apresentam-se independentes e com uma distribuição em feixes ao acaso. Na região subepitelial a distribuição é quase paralela, semelhando espículas que na microscopia óptica assumem uma distribuição membranosa. Outra característica dos depósitos é a formação de agregados compactos quando estão adjacentes aos perfis celulares, e dispersos quando estão à distância. Quando os podócitos entram em contacto com as fibrilas surge evidência de fusão dos processos podocitários, condensação dos seus microfilamentos e zonas de destacamento da lâmina rara externa, levando ao desnudamento focal da membrana basal [188]. Num estudo ultraestrutural de dez doentes com amiloidose sistémica, foram observados depósitos parietais focais e destacamento dos podócitos nos nove doentes que tinham proteinúria marcada [189]. Não é clara a existência de correlação entre a gravidade das lesões da membrana basal e a gravidade da proteinúria.

11.7 Tratamento da insuficiência renal terminal

A morbilidade e a mortalidade dos doentes com amiloidose em diálise são superiores às dos outros doentes nas mesmas circunstâncias. Um estudo de 48 doentes com amiloidose em programa regular de hemodiálise demonstrou haver uma diminuição da sobrevivência quando a evolução para a insuficiência renal crónica terminal foi inferior a 3 meses (os doentes viveram em média mais quatro meses após o início da terapêutica). A sobrevivência actuarial nos doentes com amiloidose após um ano de hemodiálise foi de 72,6%, após dois de 62% e no final do sexto ano de 44% [190]. Os autores deste estudo encontraram um aumento da morbilidade por patologia gastrointestinal (hemorragias e diarreia) e por problemas de acesso vascular para diálise. A ausência de separação entre os vários tipos de amiloidose torna a análise mais difícil, pois as séries em que foram incluídos muitos doentes com amiloidose AA, nomeadamente com FMF, apresentam melhores resulta-

dos. As sobrevivências após iniciar diálise podem ir de 8.2 até 31.4 meses na amiloidose AL [191, 192]. Nas séries de doentes com amiloidose AL o envolvimento cardíaco é a principal causa de morte no primeiro ano de tratamento dialítico. A hipotensão intradialítica e ortostática foram consideradas possíveis explicações para o aumento da frequência da trombose de acessos vasculares [192].

A diálise peritoneal pode ser utilizada, embora a experiência seja restrita [193]. Numa experiência cumulativa de 37 doentes com amiloidose AL em diálise, 10 realizaram diálise peritoneal sem complicações acrescidas [191]. Pode, no entanto surgir agravamento da desnutrição por perda de proteínas no efluente peritoneal.

Os doentes com amiloidose após transplante renal têm uma morbilidade aumentada e uma menor sobrevivência do enxerto comparativamente aos outros doentes. As séries apresentadas são geralmente de amiloidose AA associada a FMF ou a doenças reumáticas. A mortalidade é elevada nos primeiros três meses, com sobrevida de 55% aos cinco anos na amiloidose AA, e com diminuição da sobrevivência nos doentes com mais de 45 anos [194]. A maioria dos doentes morre com enxerto funcionante, sendo a infecção a principal causa de morte [195]. A recidiva da amiloidose no enxerto surge em 10 a 20% dos casos, estabelecendo-se lentamente, em média cinco anos após o transplante; a disfunção do enxerto por recidiva é rara [195]. Na FMF a recidiva no enxerto renal é evitável com o uso de colchicina após o transplante [196]. Na amiloidose AL a transplantação renal é raramente efectuada, colocando-se problemas devidos à necessidade de efectuar transplante cardíaco combinado.

12. Amiloidoses hereditárias com nefropatia

Nas amiloidoses familiares em que a nefropatia predomina (amiloidoses familiares nefropáticas, AFN), o modo de transmissão é autossómico dominante. A maioria dos doentes com AFN são heterozigotos para mutações nos genes que codificam a lisozima, a apolipoproteína AI ou a cadeia A α do fibrinogénio, derivando as fibrilas de amiloide da respectiva variante da proteína. Estas variantes podem resultar da troca de um só nucleotídeo, de uma deleção ou de uma inserção no gene que codifica a proteína precursora [1].

Recentemente, as AFN foram associadas a variantes da apolipoproteína AII [197, 67]; em algumas famílias a proteína em causa ainda não foi identificada. Na presença da mes-

ma variante, tanto a penetrância como o fenótipo têm variações inter e intra-familiares.

A maioria dos doentes com este tipo de amiloidoses têm origem na Europa. A idade com que se apresentam pode ir desde a segunda década de vida até idade muito avançada, embora geralmente as manifestações se iniciem a meio da idade adulta. A tabela 2 resume as amiloidoses renais nefropáticas autossómicas dominantes e aquelas que, sendo neuropáticas, podem cursar com doença renal (transtirretina e gelsolina). As amiloidoses por febres periódicas com potencial envolvimento renal serão também referidas.

Tabela 2. Amiloidoses de transmissão autossómica dominante, com doença renal por deposição de uma proteína mutante

PROTEÍNA PRECURSORA	MUTAÇÃO	ORIGEM GEOGRÁFICA
Cadeia A α do fibrinogénio	M554L	Perú, México
	G526V	Norte Europa
	4 904delG	Estados Unidos
	4897delT	França
Apolipoproteína AI	G26R	Norte Europa
	L60R	Inglaterra
	W50R	Judeus asquenaze
	Delecção 70-72	Inglaterra
Apolipoproteína AII	Stop 78G	Estados Unidos/ Europa
	Stop 78S	Estados Unidos/ Europa
	Stop 78R	Estados Unidos/ Europa
Lisozima	I52T	Inglaterra
	N67H	Inglaterra
	W64R	França
Transtirretina	G47E	Inglaterra
	S52P	Inglaterra, Portugal
	S77T	Alemanha
Gelsolina	D187N	Europa, Estados Unidos

12.1 Frequência

Não há dados sistemáticos acerca da frequência das AFN, embora até há pouco tempo tenham sido consideradas raras. Na literatura não estão descritas mais de trinta famílias, mas esta patologia não é habitualmente considerada no diagnóstico diferencial das doen-

ças renais. A ausência frequente de história familiar, por penetrância variável, contribui para a falha no diagnóstico. A introdução de estudos sistemáticos do ácido desoxirribonucleico (ADN) aumentou o número detectado de doentes com amiloidose hereditária por lisozima, apolipoproteína AI e cadeia A α do fibrinogénio. O estudo genético de casos incorrectamente classificados como AL associou à variante G526V (em que o ácido glutâmico é substituído pela valina) da cadeia A α do fibrinogénio cerca de metade das amiloidoses hereditárias nefropáticas [101].

12.2 Morbilidade e mortalidade

Embora cada AFN tenha o seu curso, a história natural é lenta e progressiva, com insuficiência renal crónica ou insuficiência de algum outro órgão, mesmo sem sintomas. O prognóstico é geralmente melhor do que o da amiloidose AA ou AL, embora possa surgir falência orgânica e morte. Em contraste com a AL e a ATTR V30M, a hipotensão ortostática é rara, pois o envolvimento autonómico e a cardiomiopatia são pouco frequentes.

12.3 Cadeia A α do fibrinogénio

O fibrinogénio é uma proteína plasmática de 340 kDa, envolvido na fase final da coagulação do sangue, desempenhando um papel importante na agregação plaquetária. A molécula é constituída por dois dímeros idênticos, cada um contendo um polipeptídeo A α - B β e γ , produtos de genes situados no cromossoma 4 [198]. O fígado parece ser o local verdadeiramente importante para síntese do fibrinogénio [199]. Às AFN associam-se quatro mutações do fibrinogénio.

Mutação R554L

Esta foi a primeira mutação a ser descrita, em que uma arginina é substituída por uma leucina no resíduo 554 (Arg554Leu). A doença foi descoberta numa família de origem peruana e mexicana [68] com amiloidose renal. As manifestações foram proteinúria e insuficiência renal crónica, com idade de apresentação entre os 24 e os 36 anos. O probando realizou transplante renal, com recidiva da amiloidose e falência do enxerto renal oito anos depois. Esta família parece assemelhar-se à que Ostertag descreveu em 1932.

Mutação G526V

A segunda mutação do fibrinogénio associada a amiloidose é aquela em que o ácido glutâmico é substituído por uma valina (Glu526Val). Descoberta em duas famílias de origem irlandesa [200], foi posteriormente descrita em famílias de origem polaca e canadiana [201]. A doença apresenta-se entre a quinta e a sétima décadas de vida. As manifestações são síndrome nefrótica, hipertensão arterial e anemia, havendo evolução para a insuficiência renal crónica terminal em cinco a dez anos. A amiloidose pode envolver o baço e raramente o fígado, com organomegalia e insuficiência hepática. O transplante hepático e renal em simultâneo foi realizado como tratamento num doente com insuficiência hepática grave e recidiva da amiloidose num primeiro enxerto renal [202]. Não estão descritas neuropatia, coagulopatia, nem cardiomiopatia.

Mutação 4 904delG

Foi descrita numa família americana com amiloidose renal, em que o probando teve como manifestações proteinúria seguida de insuficiência renal. O quadro clínico iniciou-se entre a quarta e a quinta décadas. A análise de DNA permitiu verificar uma deleção de um nucleotídeo na terceira base do codão 524 da cadeia α do fibrinogénio [203].

Mutação 4 897delT

Esta amiloidose foi descrita numa família de origem francesa, e apresentou-se sob a forma de síndrome nefrótica, aos 32 anos no probando e aos 12 anos no filho. A recidiva da amiloidose no enxerto renal foi extremamente precoce, ao fim de um e dois anos de transplantação. O estudo genético revelou tratar-se da deleção de um só nucleotídeo no gene da cadeia α [204].

12.4 Apolipoproteína AI

A apolipoproteína AI (Apo AI) é um polipeptídeo de 243 aminoácidos e constitui no ser humano a apolipoproteína *major* das lipoproteínas de alta densidade (HDL). A Apo AI é um co-factor da lecitina colesterol acetil-transferase, que cataliza a transformação do colesterol em ester de colesterol. A síntese de Apo AI ocorre no fígado e no intestino, embo-

ra as gónadas, os rins e as supra-renais sejam locais de síntese menos importante. O gene que codifica a Apo AI está localizado no cromossoma 11 [205]. Tal como a TTR, a Apo AI normal foi associada a depósitos de amiloide nos grandes vasos [206]. Estão descritas mais de trinta mutações no gene, a maioria das quais predispõe a doença coronária. As variantes relacionadas com amiloidose renal são quatro (três substituições e uma deleção).

Mutação G26R

Esta mutação, em que uma glicina é substituída pela arginina na posição 26 (Gly26Arg), foi descrita por Van Allen numa família de Iowa, com origem inglesa, escocesa e irlandesa [62]. A doença apresentou-se como uma polineuropatia periférica associada a proteinúria, insuficiência renal crónica, e incidência elevada de úlcera gástrica. Na biópsia renal, verificaram-se depósitos glomerulares de amiloide extensos.

Seguiram-se descrições de outras famílias, a maioria das quais com origem no norte da Europa [1]. A idade de início da doença oscilou entre os 20 e os 44 anos. Numa das famílias houve registo de 5 doentes, em 3 gerações, que desenvolveram insuficiência renal crónica. A presença de organomegalias (fígado e baço) com função do órgão preservada pode fazer parte do quadro clínico.

Mutação L60R

Esta doença foi descrita em famílias inglesas, nas quais se verificou a substituição de uma leucina por uma arginina na posição 60 (Leu60Arg). Na família inicialmente descrita [207], 8 doentes em 4 gerações, apresentaram amiloidose renal extensa que se traduziu por hipertensão arterial, proteinúria e insuficiência renal crónica; no probando, associaram-se esplenomegalia e trombocitopenia; o envolvimento cardíaco também foi descrito.

Mutação W50R

A substituição do triptofano por arginina na posição 50 (Trp50Arg) foi descrita em famílias judias (asquenaze). O envolvimento renal manifestou-se por hematúria microscópica, proteinúria e insuficiência renal crónica [208]. Um dos doentes relatados realizou transplante renal tendo morte precoce por infecção. Podem associar-se organomegalias e insuficiência hepática.

Delecção 70-72

Esta forma de amiloidose foi descrita numa família de origem inglesa [209] na qual se verificou a perda dos resíduos de aminoácidos 70, 71 e 72. A doença renal traduziu-se por hipertensão arterial, proteinúria e insuficiência renal crónica na terceira década de vida. Foram também documentadas organomegalias e escotoma central.

12.5 Apolipoproteína AII

A apolipoproteína AII (Apo AII) é um dos componentes principais das HDL plasmáticas sendo produzida no fígado e no intestino delgado. A identificação de famílias com amiloidose relacionada com variantes da Apo AII foi recente, entre 2001 e 2003 [67, 210, 211]. As mutações foram identificadas em famílias americanas, encontrando-se em todas uma substituição do codão *stop*: Stop78Gly, Stop78Ser e Stop78Arg. A manifestação predominante desta forma é a nefropatia por amiloidose, que surge entre a segunda e a quinta décadas. Não surge envolvimento hepático ou esplénico extensos nem cardiomiopatia, excepto na mutação Apo AII Stop78Arg.

12.6 Lisozima

A lisozima é um polipeptídeo que actua como enzima bacteriolítico [212] e que está presente em vários tecidos e secreções. O gene da lisozima está situado no cromossoma 12. As três variações genéticas conhecidas da lisozima foram associadas a amiloidose não neuropática [70].

Mutação I56T

A substituição da isoleucina por treonina na posição 56 (Ile56Thr) foi descrita numa família de origem inglesa [213]. As manifestações clínicas, com início entre a terceira e sexta décadas, foram a proteinúria, a insuficiência renal crónica, petéquias e organomegalias, com preservação da função hepática.

Mutação N67H

Esta mutação, em que a asparagina é substituída pela histidina na posição 67 (Asp67His), foi descrita também numa família inglesa [214, 215]. A idade de início situou-

se entre a terceira e a quinta décadas. Para além de proteinúria, insuficiência renal, olhos secos, hemorragias e perfurações do tracto gastrointestinal, foram também descritas hepatomegalia com hemorragia hepática e esplenomegalia.

Mutação W64R

A substituição do triptofano por arginina na posição 64 (Trp64Arg) foi descrita numa família francesa com história de síndrome *sicca* precoce e nefropatia com evolução para a insuficiência renal avançada, entre a quinta e sétima décadas de vida [216].

12.7 Gelsolina

A gelsolina é uma proteína que se liga ao cálcio e que fragmenta os filamentos de actina. O seu gene está localizado no cromossoma 9. As primeiras manifestações desta forma de amiloidose são as alterações distróficas da córnea, o espessamento da pele da nuca e dorso, e a neuropatia craniana com paralisia facial [217]. A maioria das famílias descritas é de origem finlandesa. Estão descritas duas mutações sendo a mais comum a substituição do ácido aspártico por asparagina na posição 187 da molécula (D187N), e a mais rara a substituição do mesmo por tirosina (D187Y). A AGel D187N pode apresentar-se sob a forma de proteinúria moderada e, no caso de homozigotia, pode surgir evolução para a insuficiência renal crónica terminal por deposição de fragmentos da proteína mutante no rim [218].

12.8 Febres periódicas

As febres periódicas hereditárias são doenças auto-inflamatórias caracterizadas por episódios recorrentes de febre e inflamação localizada que afecta o abdómen, o tórax, o sistema musculo-esquelético e a pele. Estes períodos de inflamação são separados por intervalos livres de sintomas. Alguns doentes desenvolvem amiloidose AA. Quatro destas doenças são nefropáticas, 3 são transmitidas de modo autossómico dominante e uma de modo autossómico recessivo. As proteínas implicadas nestas 4 doenças estão envolvidas no controle inflamatório, provavelmente regulando a apoptose em grupo de leucócitos associados nos estádios precoces da cascata inflamatória. As mutações nestas proteínas podem favorecer uma amplificação anormal da reacção inflamatória. A proteína de fase aguda amilóide A sérica, quando aumenta na reacção inflamatória, deposita-se nos

tecidos. O envolvimento renal manifesta-se por proteinúria nefrótica e insuficiência renal crónica.

A síndrome da febre periódica foi associada a mutações no gene da superfamília 1A do receptor do factor de necrose tumoral (*tumor necrosis factor receptor superfamily 1A*) que codifica o receptor 1 do factor de necrose tumoral (TNFR1). A sinalização extracelular para a apoptose e degradação do ADN nuclear pode ser feita através do receptor do factor de necrose tumoral que activa proteases celulares. No sistema imune, este processo é activado para eliminar os linfócitos auto-reactivos. Os autores [219], que em 1999 descreveram estas mutações, propuseram o nome de síndrome periódica associada ao receptor do factor de necrose tumoral (*TNFR associated periodic syndrome* ou TRAPS) para estas doenças. O TRAPS é uma doença de transmissão autossómica dominante e a sua localização é no cromossoma 12p13. Até agora foram identificadas 22 mutações responsáveis por TRAPS [220].

Os doentes afectados por TRAPS apresentam febre elevada com arrepios, dores abdominais com náuseas e vómitos, mialgias do tronco e membros, pseudocelulite e edema peri-orbitário unilateral [221]. A origem familiar é geralmente Europeia. Os ataques podem durar de uma semana a um mês, eventualmente mais, e não há melhoria clínica com o uso de colchicina. A idade de início da doença pode ir desde o primeiro ano de vida até à quinta década e a amiloidose desenvolve-se em cerca de 20% dos casos [222].

A síndrome de Muckle-Wells (SMW) e a síndrome familiar autoinflamatória pelo frio (*familial cold autoinflammatory syndrome* ou FCAS) são doenças raras encontradas geralmente no norte da Europa. Os primeiros sinais ocorrem geralmente na infância, associando febre, artrite, mialgias, urticária e conjuntivite; na SMW surge surdez neurosensorial progressiva e na FCAS a manifestação mais típica é a existência de pele fria associada a sintomas gerais, crises inflamatórias e urticária [223]. A SMW e a FCAS estão ambas localizadas na região cromossómica 1q44, tendo sido encontradas mutações no gene *CIAS1*, que se expressa nos leucócitos periféricos e codifica a proteína criopirina [224]. A amiloidose surge em cerca de 25% dos doentes. Em Portugal foi identificada uma família com SMW em que a falta de resposta à terapêutica com colchicina foi reconhecida [225].

O tratamento com corticosteróides em baixa dose, clorambucil, anti-histamínicos, dapsona, azatioprina, micofenolato de mofetil e infliximab também se revelaram sem

sucesso; doses elevadas de corticosteróides e talidomida foram descritos como sendo parcialmente eficazes num caso. Dois doentes foram submetidos a ensaios terapêuticos com o antagonista do receptor da interleucina-1 anakinra, havendo melhoria dos sintomas inflamatórios e diminuição das concentrações plasmáticas da proteína sérica amiloide A [226].

A FMF é uma doença de transmissão autossómica recessiva que afecta principalmente as populações com origem na bacia Mediterrânica. Ocorre em turcos, arménios, árabes e judeus sefarditas. No entanto, têm sido descritos casos esporádicos em judeus asquenaze, italianos, polacos e alemães [227]. Foram diagnosticados em França dois casos de origem portuguesa [Dodé C, comunicação pessoal]. A FMF é caracterizada por episódios recorrentes de febre, peritonite, pleurite, artrite e eritemas semelhando erisipela. O ataque típico dura de um a 4 dias. Os primeiros sintomas surgem entre a infância e a adolescência em 80% dos casos, e só em 5% surgem depois dos 30 anos.

A amiloidose renal com progressão para a insuficiência renal crónica terminal é a complicação mais grave da FMF [228]. A amiloidose pode também envolver o tracto gastrointestinal, o fígado, o baço e, em fases mais avançadas, o coração, o pulmão e a tiróide. A amiloidose renal é mais frequente nos turcos, com expressão clínica em cerca de 60% dos doentes. No fenótipo I da FMF, a amiloidose surge anos depois de diversos ataques inflamatórios, enquanto que no fenótipo II a amiloidose precede os ataques inflamatórios, ou é a única manifestação da doença.

Antes da introdução de métodos substitutivos de função renal, a insuficiência renal crónica terminal era responsável por 72% das mortes por FMF nos judeus sefarditas. O tratamento com colchicina, usado como anti-inflamatório, foi introduzido em 1972 [229]. Actualmente, dado que o diagnóstico e a terapêutica com colchicina são precoces, a frequência de amiloidose diminuiu e a proteinúria passou a ser detectada em apenas cerca de 2% dos doentes. A manutenção de terapêutica com colchicina após transplante renal é necessária para evitar a recidiva da amiloidose no enxerto. Estima-se que a frequência do gene da FMF seja muito elevada em certas etnias, tendo sido calculada nos arménios e judeus não asquenaze em cerca de um para cada 7 indivíduos. O gene da FMF foi localizado no cromossoma 16, na região 16p13 [230], e o seu produto identificado como uma proteína, a mareostrina (derivada do nome *mare nostrum*, o Mediterrâneo) ou pirina, que pertence à família dos factores nucleares implicados na inflamação. Foram identificadas cerca de quinze mutações do gene, sendo mais comum a M694V.

13. Descrição clássica do envolvimento renal na polineuropatia amiloidótica familiar de tipo português (TTR V30M)

Na literatura, a descrição da nefropatia na PAF foi enquadrada geralmente na apreciação clínica global da doença.

No artigo publicado por Corino de Andrade [12], as queixas e as manifestações orgânicas foram minuciosamente detalhadas. Não foram, no entanto, referidos edemas ou hipertensão arterial, não foi descrita a função renal ou avaliada sistematicamente a proteinúria. Nos exames histopatológicos dos 2 casos de autópsia, os rins e os nervos periféricos foram os locais de deposição mais importante de amiloide (ambos classificados com + + + + + numa escala de + a + + + + +); os depósitos foram encontrados nos glomérulos, nas paredes dos vasos, nas membranas basais das cápsulas de Bowman, nos tubos e no tecido intersticial. Na página 415 [12] podemos ler como comentário à histopatologia: “...as in typical generalized amyloidosis, the kidney is always severely affected ...In both cases there is a considerable nephrotic element.”

Ribeiro do Rosário em 1961, na revisão de 19 casos de PAF [132], avaliou a ureia sérica, o sedimento urinário e a proteinúria em 12 doentes. Em todos a função renal e o sedimento urinário eram normais, em 3 a proteinúria estava ausente, em 7 era vestigial e num foi quantificada em 1,5 g/dia. O autor comentou que para uma apreciação correcta da capacidade funcional do rim, seriam necessárias provas laboratoriais mais rigorosas do que as que foram utilizadas.

Rune Andersson, em 1976 [14], publicou a revisão de 60 casos de PAF com origem na Suécia. Nos exames de 9 casos de autópsia evidenciou depósitos renais variáveis em gravidade e localização; 7 apresentavam depósitos nas paredes dos vasos do córtex e neste grupo 4 tinham também lesões glomerulares, classificadas como pronunciadas em 2 casos; em 2 doentes foram encontrados sinais considerados típicos de pielonefrite crónica. Tensão arterial sistólica superior a 140 mmHg ou tensão diastólica superior a 90 mmHg em decúbito dorsal foram detectadas em 14 dos 60 doentes. O autor encontrou elevação da creatinina sérica em 5 dos 26 doentes em que esta avaliação foi realizada, e proteinúria em 14 dos 28 doentes examinados, sendo num deles nefrótica. O que o autor considerou insuficiência renal grave, por deposição de amiloide ou pielonefrite crónica,

surgiu raramente, mas observou que a uremia contribuiu para a morte em 4 dos 27 falecidos.

Eva Xavier e Domingos Azevedo, em 1976, publicaram no Boletim do Hospital Geral de Santo António [231] o primeiro estudo vocacionado para a clínica nefrológica. Os autores encontraram proteinúria superior a 1 g/dia em 3 dos 33 doentes examinados, leucocitúria em cerca de metade, e depuração da creatinina inferior a 40 ml/min em cerca de 15%. As idades dos doentes à data da observação estavam compreendidas entre os 24 e os 48 anos, e tinham um tempo de evolução sintomática entre 1 e 13 anos. Proteinúria superior a 1 g/dia foi encontrada em doentes com evolução da neuropatia inferior a 5 anos. Não encontraram relação entre a diminuição da filtração glomerular, o tempo de evolução da doença e a presença de infecção urinária. Foi realçada a dissociação marcada entre a presença das lesões anatómicas e a ausência ou a benignidade das manifestações clínicas renais. Nas conclusões, os autores afirmaram a ausência de síndrome nefrótica, proteinúria significativa ou insuficiência renal descompensada na PAF, qualquer que fosse o tempo de evolução da neuropatia.

Falcão de Freitas, no mesmo Boletim do Hospital Geral de Santo António de 1976 [232], fez uma revisão clínica da PAF tendo por base o estudo e a assistência a mais de 300 doentes. As alterações renais foram consideradas escassas, limitando-se a sinais de infecção urinária em relação com as perturbações vesicais. A albuminúria, em muito pequenas quantidades, foi encontrada em fases tardias de doença, nunca se constatando albuminúria maciça nem insuficiência renal. Este autor salientou também que a ausência de nefropatia retirava a linearidade entre a deposição de amilóide e as síndromes clínicas renais.

Lars Steen e colaboradores, em 1982, realizaram o segundo estudo da literatura dirigido especificamente para a nefropatia na PAF [233]. A capacidade de concentração urinária, a proteinúria e a filtração glomerular estimada por métodos radioisotópicos foram avaliadas respectivamente em 21, 24 e 19 doentes, todos com origem na Suécia. Os doentes tinham idades compreendidas entre os 28 e 78 anos (média 58), a neuropatia apresentava uma evolução média de 7 anos e metade estavam medicados com penicilamina. Os autores documentaram diminuição da capacidade de concentração urinária em 76% dos

doentes, proteinúria superior a 0.2 g/dia em 54% (com nível nefrótico em 2 casos) e diminuição da filtração glomerular em 63%; a creatinina sérica foi considerada elevada num doente. A albumina constituiu a principal proteína urinária, tendo sido excluída a existência de cadeias leves e imunoglobulinas monoclonais na urina. Na discussão do trabalho foi sugerida a atribuição da doença renal aos depósitos glomerulares de amiloide.

Morie Gertz e colaboradores, em 1992 [234], num estudo que incluiu 29 doentes com amiloidose familiar, todos com mutações da TTR (12 com a TTR V30M), descreveu um doente com insuficiência renal. No conjunto dos casos a proteinúria foi, em média, de 0,1 g/dia; dois apresentavam proteinúria nefrótica. A mutação da TTR presente nos doentes que tinham nefropatia não foi especificada.

Na apresentação da amiloidose familiar constante do capítulo “*Secondary Glomerular Diseases*” no livro “*The Kidney*”, em 1996, há referência de que até àquela data o envolvimento glomerular nas amiloidoses neuropáticas tipo I e tipo II não tinha sido relatado [235].

Na análise da disfunção autonómica da PAF, feita por Yukio Ando e Ole Suhr em 1998 [236], foi focada a importância dos diagnósticos de disfunção vesical e de retenção urinária pelo seu contributo para desenvolvimento de insuficiência renal.

À luz dos conhecimentos descritos, poderíamos afirmar que, na PAF, a doença renal glomerular era rara nos doentes portugueses, a proteinúria nefrótica não teria sido encontrada e a insuficiência renal grave foi documentada apenas num doente. No entanto, o estudo de Eva Xavier não é concordante em absoluto com a descrição de Falcão de Freitas. No primeiro, a presença de proteinúria não mostrou relação com o tempo de evolução da doença e as alterações de função renal não foram relacionadas com infecções urinárias. No segundo, a albuminúria só surgiu em fases avançadas de neuropatia e as alterações renais foram relacionadas com infecções urinárias.

Os doentes suecos pareciam ter um comportamento diferente, apresentando albuminúria e diminuição da filtração glomerular, sendo a uremia uma das causas de morte. Os estudos suecos não se podem, no entanto, comparar com os portugueses, pois para além da idade de início da doença neurológica ser francamente mais tardia, o uso de penicilamina

poderia por si só condicionar a proteinúria [237]. Embora no trabalho sueco seja proposta uma associação entre a amiloidose glomerular e a proteinúria, os estudos portugueses refutaram esta hipótese.

A observação dos doentes com PAF pelos nefrologistas reflectiu, durante vários anos, a avaliação de uma população de doentes seleccionada. Os critérios de selecção, que estavam implícitos, assentavam geralmente na presença das infecções urinárias de difícil tratamento. Surgiu melhoria assistencial, mas manteve-se a apreciação de um número restrito de doentes.

Em 1989, a biópsia renal de um doente com PAF, síndrome nefrótica e insuficiência renal crónica evidenciou a deposição maciça de substância amilóide a nível glomerular e vascular; a progressão para IRCT foi rápida. Alguns meses depois, observámos 2 outros doentes que tiveram o mesmo tipo de apresentação clínica e evolução. Nestes doentes, os sintomas de PAF surgiram entre a quinta e sexta décadas de vida. Curiosamente, o esclarecimento das histórias familiares destes 3 casos, com base nos registos já existentes e outros que procurámos, demonstrou que os seus progenitores foram descritos como saudáveis ou que alguns dos irmãos afectados apresentavam também nefropatia.

Com o decorrer dos meses sucederam-se as observações de doentes com proteinúria de grau variável. Passámos a avaliar todos os doentes que frequentavam as consultas de neurologia, de modo a minimizar a selecção dos doentes. Sistemáticamente, após as consultas, as histórias familiares passaram a ser revistas e estudadas. Em alguns dos doentes com insuficiência renal crónica constatámos a mesma situação: penetrância incompleta da doença na família e nefropatia noutros elementos.

O trabalho que iremos expor, foi uma consequência natural da clínica, tal como passou a ser concebida a partir de 1990.

14. Objectivos do estudo

Após a revisão bibliográfica, verificamos que a negação de nefropatia associada à PAF teve por base o estudo de um pequeno número de doentes ou observações sem o apoio de exames analíticos. A ausência de relação entre manifestações renais e a deposição extensa de amiloide foi assumida. A possibilidade da doença renal ocorrer em padrão familiar não foi explorada.

No presente estudo, propusemo-nos demonstrar ou refutar a presença de doença renal associada à deposição de amiloide na PAF – doença monogénica que se exprime como uma amiloidose generalizada. Ao escolhermos este tema de investigação, procurámos contribuir para a caracterização da epidemiologia, da clínica e das propostas de tratamento das amiloidoses hereditárias.

No final do trabalho procurámos discutir se os conhecimentos adquiridos serão susceptíveis de vir a ser integrados no aconselhamento genético.

Objectivos específicos

Objectivos principais do trabalho de investigação:

1. Conhecer a frequência da deposição de amiloide renal na PAF; estudar a distribuição dos depósitos renais de amiloide na PAF e caracterizá-los; esclarecer se existe alguma relação entre o padrão histopatológico e a expressão clínica renal (artigo 1);
2. Definir a epidemiologia da nefropatia, conhecer a sua frequência e a proporção de doentes que evoluem para a IRCT; identificar factores de risco para o desenvolvimento de doença renal (artigo 2);
3. Estudar a possibilidade de agregação familiar da nefropatia (artigo 2);
4. Identificar marcadores de doença renal em fase pré-clínica (artigo 3);
5. Conhecer a expressão fenotípica da nefropatia e definir a sua história natural (artigos 2, 3 e 4);
6. Estabelecer opções terapêuticas na doença renal crónica (artigos 4, 5 e 6); conhecer as complicações da doença na presença de IRCT e a sua evolução após diálise (artigo 4); definir critérios de selecção para transplantação renal (artigos 4 e 5); avaliar os benefícios e complicações da transplantação hepática e renal em simultâneo (artigo 5).

15. Plano geral da investigação

A metodologia utilizada para concretizar a investigação será exposta em cada artigo. Na realização do estudo, articulámos métodos de investigação anatomopatológica, epidemiológica e clínica. Procurando integrar os objectivos a que nos propusemos definimos o seguinte plano de trabalho:

1. Avaliação dos depósitos renais de amilóide e sua distribuição caracterizando a proteína precursora nos tecidos por métodos imunohistoquímicos utilizando anticorpos monoclonais anti-TTR;
2. Definição de três áreas de estudo epidemiológico: Póvoa de Varzim/Vila do Conde, Barcelos e Braga; levantamento e registo de todas as famílias com PAF originárias daquelas áreas; avaliação das características clínicas, incluindo idade de início de neuropatia, manifestações clínicas e tempo de evolução sintomática dos doentes cujas famílias tiveram origem nas áreas mencionadas;
3. Colheita e actualização da história familiar, revisão dos registos clínicos dos familiares dos doentes em estudo e comprovação por análise de ADN leucocitário da mutação TTR V30M em todos os doentes;
4. Selecção das famílias portuguesas com pelo menos um doente insuficiente renal crónico terminal, avaliação de todos os familiares doentes;
5. Observação regular de portadores assintomáticos da mutação; escolha de um indicador analítico de lesão glomerular;
6. Avaliação da função renal através da determinação das concentrações séricas de creatinina e ureia, da depuração da creatinina e por métodos radioisotópicos;
7. Determinação da excreção urinária de albumina e proteínas;
8. Estudo prospectivo da morbilidade e mortalidade após diálise;
9. Com base nos resultados anteriores, aplicar métodos de tratamento nos doentes com proteinúria ou em hemodiálise regular.

16. Bibliografia

1. Benson MD. Amyloidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease, Eight Edition. McGraw Hill Book, New York, 2001:pp5345-5378
2. Cohen AS, Calkins E. Electron microscopical observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 1959; 183:1202-1203
3. Grateau G, Delpech M. In: Grateau G, Benson MD, Delpech M (eds). Les Amyloses. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 2000:pp13-48
4. Cohen AS. The constitution and genesis of amyloid. *Int Rev of Exp Pathol* 1966;4:159-243
5. Cohen AS. Histoire de l'amylose. In: Grateau G, Benson MD, Delpech M (eds). Les Amyloses. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 2000:pp 1-10
6. Kyle RA. Amyloidosis: the last three centuries. In: Bely M and Apáthy A (eds). Amyloid and Amyloidosis. David Apathy Publ, Hungary, 2001:pp 10-13
7. Debruyne RS, Ster RO. A case of the progressive hypertrophic polyneuritis of Djerine and Sottas with pathological examination. *Brain* 1929;52:84-89
8. Navasquez S, Treble HA. A case of generalized amyloid disease with involvement of the nerves. *Brain* 1968;61:116-120
9. Ostertag B. Demonstration einer eigenartigen familiaeren Paramyloidose. *Zbl Path* 1932;56:253-256
10. Ostertag B. Familiäre Amyloid-erkrankung. *Z Mensch Vererb Konstitutionsl* 1950;30:105-115
11. Maxwell ES, Kimbell I. Familial amyloidosis with case reports. *Med Bull Vet Admin* 1936;12: 365-369
12. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy: familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 1952;75:408-427
13. Andersson R. Hereditary amyloidosis with polyneuropathy. *Acta Med Scand* 1970; 188: 85-94
14. Andersson R. Familial amyloidosis with polyneuropathy: a clinical study based on patients living in Northern Sweden. *Acta Med Scand* 1976;Suppl 590:1-64
15. Araki S, Mawatari S, Ohta M, Nakajima A, Kuroiwa Y. Polyneuritic amyloidosis in a Japanese family. *Arch Neurol* 1968;18:593-602
16. Araki S, Kurahara T, Tawara S, Kuribayashi T. Familial amyloidotic polyneuropathy in Japanese. In: Glenner GG, Costa PP, Freitas AF (eds). Amyloid and Amyloidosis. Excerpta Medica, Amsterdam, 1980:pp67-77

17. Siegal S. Benign paroxysmal peritonitis. *Ann Intern Med* 1945;23:1-21
18. Muckle TJ, Wells M. Urticaria, deafness and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *Q J Med* 1962;31:235-248
19. Eanes ED, Glenner GG. X-ray diffraction studies in amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 1968;16:673-677
20. Benditt EP, Erikson N, Hermodson MA, Ericsson LH. The major proteins of human and monkey amyloid substance: common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett* 1971;19:169-173
21. Glenner GG, Terry W, Harada M, Isersky C, Page D. Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analysis. *Science* 1971;1150-1151
22. Sletten K, Westmark P, Natvig JB. Characterization of amyloid fibrils from medullary carcinoma of the thyroid. *J Exp Med* 1976;143:993-998
23. Costa PP, Figueira AS, Bravo FR. Amyloid fibril related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:4499-4503
24. Tawara S, Nakazato M, Kangawa K. Identification of prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese Type). *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116:880-888
25. Saraiva MJ, Costa PP, Birken S, Goodman DS. Presence of an abnormal transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Trans Assoc Am Physicians* 1983;96:261-270
26. Saraiva MJ, Costa PP, Birken S, Goodman DS. Family studies of the genetic abnormality in transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1984;435:86-100
27. Charles ML, Hrnica R, Williams RH, Weiss DT, Solomon A. A novel amyloid protein in a calcifying epithelial odontogenic (Pinborg) tumor. In: Bely M and Apáthy A (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. David Apathy Publ, Hungary, 2001:pp422-423
28. Westmark P, Benson MD, Buxbaum JN, Chen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters C, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD. Amyloid fibril protein nomenclature – 2002. *Amyloid* 2002;9:197-200
29. Shihama T and Cohen AS. Intracellular formation of amyloid fibrils. *Am J Pathol* 1975;81:101-102
30. Westmark P, Eizirik DL, Pipeleers DG, Hellerström C, Andersson A. Rapid deposition of amyloid in human islets transplanted into nude mice. *Diabetologia* 1995;38:543-549
31. Perutz MF. Amyloid fibrils: mutations make enzyme polymerise. *Nature* 1997;385:773-775

32. Dobson CM. Getting out of shape. *Nature* 2002;418:729-730
33. Dobson CM, Karplus M. The fundamentals of protein folding: bringing together and experiment. *Curr Opin Struct Biol* 1999;9:92-101
34. Schultz CP. Illuminating folding intermediates. *Nat Struct Biol* 2000;7:7-10
35. Saraiva MJ. Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS Lett* 2001;498:201-203
36. Verdone G, Corazza A, Viglino P, Pettirossi F, Giorgetti S, Mangione P, Andreola S, Bellotti V, Esposito G. The solution structure of human beta-2 microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition. *Protein Sci* 2002;11:487-499
37. Buxbaum JN, Tagoe CE. The genetics of the amyloidosis. *Annu Rev Med* 2000;51:543-569
38. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of the Alzheimer disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353-356
39. McLaurin J, Yang D, Yip CM, Fraser PE. Modulating factors in amyloid beta fibril formation. *J Struct Biol* 2000;130:259-270
40. Orpiszewski J, Benson MD. Fibrillogenèse. In: Grateau G, Benson MD, Delpech M (eds) *Les Amyloses*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 2000;pp63-107
41. Almeida MR, Alves IL, Terazaki H, Ando Y, Saraiva MJ. Comparative studies of two transthyretin variants with protective effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:1024-1028
42. Dobson CM. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* 1999;329-332
43. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanism of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003;349:583-596
44. Kim YS, Cape SP, Chi E, Raffin R, Wilkins-Stevens P, Stevens FJ, Manning MC, Randolph TW, Solomon A, Carpenter JF. Counteracting effects of renal solutes on amyloid fibril formation by immunoglobulin light chains. *J Biol Chem* 2000;276:1626-1633
45. Khurana R, Gillespie JR, Talapatra A, Minert LJ, Ionescu-Zanetti C, Millett I, Fink AL. Partially folded intermediates as a critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* 2001;27:3525-3535
46. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacl M, Whaley J, Swindlehurst C. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's disease β -peptide from biological fluids. *Nature* 1992;359:325-327
47. Benson MD, Liepnieks JJ, Uemichi T, Wheeler G, Correa R. Hereditary renal amyloidosis associated to mutant fibrinogen alpha-chain. *Nat Gen* 1993;3:252-255

48. Uemichi T, Liepnieks JJ, Yamada T, Gertz MA, Bang N, Benson MD. A frame shift mutation in the fibrinogen A alpha chain gene in a kindred with renal amyloidosis. *Blood* 1996;87:4197-41203
49. Burtneck LD, Koept EK, Grimes J, Jones EY, Stuart DI, McLaughlin PJ, Robinson RC. The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin sering, capping and nucleation. *Cell* 1997;90:661-670
50. Liepnieks JJ, Kluve-Beckerman B, Benson MD. characterization of amyloid A protein in human secondary amyloidosis: the predominant deposition of serum amyloid A1. *Biochem Biophys Acta* 1995;1270:81-86
51. De Beer MC, De Beer FC, McCubbin WD, Kay CM, Kindy MS. Structural prerequisites for serum amyloid A fibril formation. *J Biol Chem* 1993;268:20606-20612
52. Pepys MB, Tennent GA, Booth DR, Belloti V, Lovat LB, Tan SY, Persey MR, Hutchinson WL, Booth SE, Madhoo S, Soutar AK, Van Zyl-Smit R, Campistol JM, Fraser PE, Radford SE, Robinson CV, Sunde M, Serpell LC, Blake CC. Molecular mechanisms of fibrillogenesis and the protective role of amyloid P component: two possible avenues for therapy. *Ciba Found Symp* 1996;199:73-81;discussion:79-81
53. Hamasaki H. Amyloid P component promotes aggregation of Alzheimer's β -amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:349-353
54. Hawkins PN, Myers MJ, Lavender JP, Pepys MB. Diagnostic radionuclide imaging of amyloid: biological targeting by circulating human serum amyloid P component. *Lancet* 1988;1:1413-1418
55. Hawkins PN. Studies with radiolabelled serum amyloid P component provide evidence for turnover and regression of amyloid deposits in vivo. *Clin Sci (Colch)* 1994;87:289-295
56. Caceres J, Brandan E. Interaction between Alzheimer's disease β A4 precursor protein (APP) and extracellular matrix: evidence the participation of heparan sulfate proteoglicans. *J Cell Biochem* 1997;65:145-158
57. Snow AD, Bramson R, Mar H, Wight TN, Kisilevsky R. A temporal ultrastructural relationship between heparan sulfate proteoglicans and AA amyloid in experimental amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 1991;39:1321-1330
58. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease: a meta analysis. *JAMA* 1997;278:1349-1356
59. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow JE, Prosen L, Dean M, Steinberg AD, Pras M, Kastner DL. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992;326:1509-1513

60. Cuisset I, Drenth JP, Simon A, Vincent MF, van der Velde Visser S, van der Meer JW, Grateau G, Delpech M; International Hyper-IgD Study Group. Molecular analysis of MKV mutations and enzymatic activity in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Eur J Human Genet* 2001;9:260-266
61. Wallace MR, Conneally PM, Benson MD. A DNA test for Indiana/Swiss hereditary amyloidosis (FAP II). *Am J Hum Genet* 1988;43:182-187
62. Van Allen MW, Frohlich JA, Davis JR. Inherited predisposition to generalized amyloidosis: clinical and pathological study with a family with nephropathy, neuropathy and peptic ulcer. *Neurology* 1969;19:10-25
63. Nichols WC, Gregg RE, Brewer B Jr, Benson MD. A mutation in apolipoprotein A-I in the Iowa type of familial amyloidotic polyneuropathy. *Genomics* 1990;8:318-323
64. Maury CPJ. Gelsolin-related amyloidosis. Identification of amyloid protein in Finish hereditary amyloidosis as a fragment of variant gelsolin. *J Clin Invest* 1991;87:1195-1199
65. Saraiva MJ. Molecular genetics of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Peripheral Nervous System* 1996;1:179-188
66. Asl LH, Liepnieks J, Asl KH, Uemichi T, Moulin G, Desjoyaux E, Loire R, Delpech M, Grateau G, Benson MD. Hereditary cardiomyopathy caused by a variant apolipoprotein AI. *Am J Pathol* 1999;154:221-227
67. Yazaki M, Liepnieks J, Barats MS, Cohen A0H, Benson MD. Hereditary systemic amyloidosis associated with a new apolipoprotein AII stop codon mutation Stop78Arg. *Kidney Int* 2003;64:11-16
68. Benson MD, Liepnieks J, Uemichi T, Wheeler G, Correa R. Hereditary amyloidosis associated with a mutant fibrinogen α -chain. *Nat Genet* 1993;3:252-255
69. Nichols WC, Dwulet FE, Liepnieks J, Benson MD. Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156:762-768
70. Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Radford , Blake CC, Pepys MB. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 1997;385:787-793
71. Ghiso J, Pons-Estel B, Frangione B. Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain protein which is a variant of cystacin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;136:548-549
72. Levy E, Carman MD, Fernandez Madrid IJ, Power MD, Lieburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 1990;248:1124-1126

73. Goodman DS, Peters T, Robbins J, Schwick G. Prealbumin becomes transthyretin. Nomenclature committee. IUB and JCBN New letter. *J Biol Chem* 1981;12-14
74. Cavallaro T, Martone RL, Dwork AJ. The retinal epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the eye rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:497-501
75. Herbert J, Wilcox JN, Pham KT, Freneau RT Jr., Zeviani M, Dwork A, Soprano DR, Makover A, Goodman DS, Zimmerman EA, Roberts JL, Schon EA. Transthyretin: A choroids plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* 1986; 36: 900-911
76. Kanda Y, Goodman DS, Canfield RE, Morgan FJ. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem* 1974;249:6796-6805
77. Blake CC, Geisow MJ, Dwan ID, Rerat C, Rerat B. Structure of plasma prealbumin at 2.5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *J Mol Biol* 1974;88:1-12
78. Ingenbleek Y, Younger V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann Rev Nutr* 1994;14:495-533
79. Saraiva MJ, Costa PP, Goodman DS. Biochemical marker in familial amyloidotic polyneuropathy, portuguese type. Family studies on the transthyretin (prealbumin)-methionine-30 variant. *J Clin Invest* 1985;76:2171-2177.
80. Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Robertson EJ. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:2375-2379
81. Saraiva MJ. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat* 2001;17:493-503
82. Wallace MR, Naylor SL, Kluge-Beckerman B, Long GL, McDonald L, Shows TB, Benson MD. Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;129:753-758
83. Dwulet FE, Benson MD. Primary structure of an amyloid prealbumin and its plasma precursor in a hereditary familial polyneuropathy of Swedish origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:694-698
84. Sasaki H, Yoshioka N, Takagi Y, Sakaki Y. Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. *Gene* 1985;37:191-197
85. Atland K, Becker P, Banzhoff A. Paraffin oil protected high resolution hybrid isoelectric focusing for the demonstration of substitutions of neutral amino acids in denatured proteins: the case of four human transthyretin (prealbumin) variants associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis* 1987;8:293-297

86. Palha J, Moreira P, Olofsson A, Lundgren E, Saraiva MJ. Antibody recognition of amyloidogenic transthyretin variants in serum of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *J Mol Med* 2001;78:703-707
87. Ando Y, Ohlsson P-I, Suhr O, Nyhlin N, Yamashita T, Holmgren G, Danielsson A, Sandgren O, Uchino M, Ando M. A new simple and rapid screening method for variant transthyretin (TTR) related amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;228:480-483
88. Shaaact BK, Hendel HW, Gimsing P, Jonsson V, Pedersen H, Hesse B. 99mTc-aprotinin scintigraphy in amyloidosis. *J Nucl Med* 2003;44:177-183
89. Cardoso I, Pereira PJ, Damas AM, Saraiva MJ. Aprotinin binding to amyloid fibrils. *Eur J Biochem* 2000;267:2307-2311
90. Hawkins PN, Lavender JP, Pepys MB. Evaluation of systemic amyloidosis by scintigraphy with ¹²⁵I-labeled serum amyloid P component. *N Engl J Med* 1990;323:508-513
91. Sequeiros J, Saraiva MJ. Onset in the seventh decade and lack of symptoms in heterozygotes for the TTR Met30 mutation in hereditary amyloid neuropathy-type I (Portuguese, Andrade). *Am J Med Genetics* 1987;27:345-357
92. Sousa MM, Yan S, Fernandes R, Guimarães A, Stern D, Saraiva MJ. Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *J Neurosci* 2001;21:7576-7586
93. Jacobson DR, Pastore RD, Yaghoubian R, Kane I, Gallo G, Buck FS, Buxbaum JN. Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late onset cardiac amyloidosis in black Americans. *N Engl J Med* 1997;13:466-473
94. Wallace MR, Dwulet FE, Conneally PM, Benson MD. Biochemical and molecular characterization of a new variant pre-albumin associated with hereditary amyloidosis. *J Clin Invest* 1986;78:6-12
95. Alves IL, Jacobson DR, Torres MF, Coelho T, Holmgren G, Saraiva MJM. Compound heterozygosity in patients with TTR-related amyloidosis. *Neurom Disorders* 1996;8 (51):S19
96. Ventura A, Lobato L, Beirão I, Paiva A, Silvestre F, Coelho T, Guimarães S. Amiloidose hereditária por uma variante da transtirretina (TTR Pro52) – 1ª descrição da histopatologia renal. XIII Congresso Português de Nefrologia, Castelo Branco, Junho 1999
97. Carvalho M, Moreira P, Evangelista T, Ducla-Soares JL, Bento M, Fernandes R, Saraiva MJ. New transthyretin mutation V28M in a Portuguese kindred with familial polyneuropathy. *Muscle Nerve* 2000;23:1016-1021
98. Connors LH, Théberge R, Skare J, Costello CE, Falk RH, Skinner M. A new transthyretin variant (Ser23Asn) associated with familial amyloidosis in a Portuguese patient. *Amyloid*

1998;6:114-118

99. Davidson AM. The United Kingdom Medical Research Council's glomerulonephritis registry. *Contrib Nephrol* 1985;48:24-35

100. Pelo E, Prato LD, Ciaccheri M, Castelli G, Gori F, Pizzi A, Torricelli F, Marconi G. Familial amyloid polyneuropathy with genetic anticipation associated to a Gly47Glu transthyretin variant in an Italian kindred. *Amyloid* 2002;9:35-41

101. Lachmann HJ, Booth D, Booth S, Byee A, Gilberston J, Gillmore J, Pepys M, Hawkins P. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *N Engl J Med* 2002;23:1786-1791

102. Booth DR, Soutar AK, Hawkins PN, Reilly M, Harding A, Pepys MB. Three new amyloidogenic transthyretin gene mutations: advantages of direct sequencing. In: Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gaultie J, Muckle TJ, Young ID (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Parthenon Publishing, New York, 1993:pp456-458

103. Stangou AJ, Hawkins PN, Heaton ND, Rela M, Monaghan M, Nihoyannopoulos P, O'Grady J, Pepys MB, Williams R. Progressive cardiac amyloidosis following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy: implications for amyloid fibrillogenesis. *Transplantation* 1998;66:229-233.

104. Libbey CA, Rubinow A, Shirahama T, Deal C, Cohen AS. Familial amyloid polyneuropathy. Demonstration of prealbumin in a kinship of German/English ancestry with onset in the seventh decade. *Am J Med* 1984;76:18-24

105. Wallace MR, Dwulet FE, Williams EC, Conneally PM, Benson MD. Identification of a new hereditary amyloid prealbumin variant, Tyr-77, associated with autosomal dominant amyloidosis. *Am J Hum Genet* 1986;39:A22

106. Westermark P, Sletten K, and Olofsson BO. Prealbumin variants in the amyloid fibrils of Swedish familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Exp Immunol* 1987;69:695-701

107. Tawara S, Nakazato M, Kangawa K, Matsuo H, and Araki S. Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116:880-888.

108. Palacios SA, Bittencourt PL, Cancado EL, Farais AQ, Massarollo PC, Mies S, Kalil J, Goldberg AC. Familial amyloidotic polyneuropathy type I in Brazil is associated with the transthyretin Val30Met variant. *Amyloid* 1999;6:289-291.

109. Kincaid JC, Wallace MR, Benson MD. Late-onset familial amyloid polyneuropathy in an American family of English origin. *Neurology* 1989;39:861-863.

110. Munar-Ques M, Costa PP, Saraiva MJ, Viader-Farre C, Munar-Bernat C. Familial type I

(Portuguese form) amyloidotic polyneuropathy in Majorca. Study using the TTR (Met30) genetic marker. *Med Clin* 1988;91:441-444

111. Grateau G, Adams D, Malapert D, Viemont M, Delpech M, Said G. Late-onset familial amyloid polyneuropathy with the TTR Met 30 mutation in France. *Clin Genet* 1993;43:143-145

112. Saraiva MJ, Costa PP, Almeida MR, Banzhoff A, Altland K, Ferlini A, Rubboli G, Plasmati R, Tassinari CA, Romeo G. Familial amyloidotic polyneuropathy: transthyretin (prealbumin) variants in kindreds of Italian origin. *Hum Genet.* 1988;80:341-343.

113. Cohen AS, Skinner M, Anderson J, Simms RW. Hereditary greek amyloidosis. A study of six families. In: Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJ (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and other transthyretin related disorders*. Arquivos de Medicina, Porto, 1990:pp19-24

114. Skare J, Yazici H, Erken E, Dede H, Cohen A, Milunsky A, Skinner M. Homozygosity for the met30 transthyretin gene in a Turkish kindred with familial amyloidotic polyneuropathy. *Hum Genet* 1990; 86:89

115. Holt IJ, Middleton L, Said G, Harding AE, Chrysostomou G, King RHM, Thomas PK. Molecular genetics of amyloid polyneuropathy in Europe. *Lancet* 1989;524-525

116. Benson MD, Dwulet FE. Identification of carriers of a variant plasma prealbumin (transthyretin) associated with familial amyloidotic polyneuropathy type I. *J Clin Invest* 1985; 75:71-75

117. Drugge U, Holmgren G, Udd B. The first case of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP Met30) in the Finish population. *Hum Hered* 1992;42:184-188

118. Lendoire JC, Trigo P, Aziz H, Romero MC, Inventarza O, Ando Y, Tashima K, Ohlsson PI, Cederquist K, Holmgren G, Suhr OB. Variant transthyretin (TTR) amyloidosis in Argentina. Detection of the trait by electrospray ionization mass spectrometry of lyophilized TTR immunoprecipitate. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59:613-618

119. Kito S, Itoga E, Kamiya K, Kishida T, Yamamura Y. Studies on familial amyloid polyneuropathy in Ogawa Village, Japan. *Eur Neurol* 1980;19:141-151

120. Misu Ki, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda Si, Ando Y, Nakazato M, Takei Yi, Hanyu N, Usui Y, Tanaka F, Harada T, Inukai A, Hashizume Y, Sobue G. Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinicopathological and genetic features. *Brain* 1999;122:1951-1962

121. Holmgren G, Holmberg E, Lindstrom A, Lindstrom E, Nordenson I, Sandgren O, Steen L, Svensson, B, Lundgren E, von Gavin A. Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden by RFLP analysis. *Clin Genet* 1988;3:176-180

122. Holmgren G, Bergstrom S, Drugge U, Lundgren E, Nording-Sikstrom C, Sandgren O, Steen L. Homozygosity for the transthyretin-Met30-gene in seven individuals with familial amyloidosis with polyneuropathy detected by restriction enzyme analysis of amplified genomic DNA sequences. *Clin Genet* 1992;41:39-41
123. Sousa A, Andersson R, Drugge U, Holmgren G, Sandgren O. Familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden: geographical distribution, age of onset and prevalence. *Hum Hered* 1993;43:288-294
124. Yoshioka K, Furuya H, Sasaki H, Saraiva MJ, Costa PP, Sakaki Y. Haplotype analysis of familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for multiple origins of the Val-Met mutation most common to the disease. *Hum Genet* 1989;82:9-13
125. Sousa A. A variabilidade fenotípica da polineuropatia amiloidótica familiar: um estudo de genética quantitativa em Portugal e na Suécia. Tese de doutoramento, Universidade do Porto, 1995.
126. Coelho T. Comunicação ao Departamento de Doenças Neurológicas do Hospital Geral de Santo António. Porto, HGSA, Fevereiro de 2004.
127. Coelho T, Sousa A, Lourenço E, Ramalheira J. A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *J Med Gen* 1994;31:293-299
128. Lobato L, Teixeira F, Sousa A, Sequeiros J. Genetic study of late-onset in hereditary amyloid neuropathy (HAN) - Type I (Portuguese, Andrade). In: Isobe T, Araki A, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Plenum Press New York, 1988:pp441-446
129. Sousa A, Lobato L, Sequeiros J. Início tardio na neuropatia amiloidótica familiar - variação familiar e modelos genéticos. *Boletim do HGSA, Porto* 1988;3:63-69
130. Araki S, Ikegawa S, Murakami T, Nishiguchi S, Yi S, Ando Y, Miyazaki A, Watanabe S. Atypical cases of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) in Japan. In: Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Related Disorders*. Arquivos de Medicina, Porto, 1990:pp267-270
131. Munar-Qués M, Pedrosa JL, Coelho T, Gusmão L, Seruca R, Amorim A, Sequeiros J. Two pairs of proven monozygotic twins discordant for familial amyloid polyneuropathy (FAP) TTR Met30. *J Med Genet* 1999;36:629-632
132. Ribeiro do Rosário M, Antunes L, Barros F. Contribuição para o estudo clínico e laboratorial da paramiloidose de Corino de Andrade. *J Soc Cien Méd* 1961;75:1-46
133. Coutinho P, Martins da Silva A, Lopes Lima J, Resende Barbosa A. Forty years of experience with type I amyloid neuropathy (review of 483 cases). Glenner GG, Costa PP, Freitas AF (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Excerpta Medica, Amsterdam, 1980:pp88-98

134. Macedo E, Coutinho P, Morais R, Matos E. Familial amyloid polyneuropathy: a clinical scale for the evaluation of the peripheral neuropathy. In: Isobe T, Araki A, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Plenum Press, New York, 1988:pp419-423
135. Ducla-Soares J, Alves MM, Carvalho M, Póvoa P, Conceição I, Sales Luís ML. Correlation between clinical, electromyographic and dysautonomic evolution of familial amyloid polyneuropathy of the Portuguese type. *Acta Neurol Scand* 1994;90:266-269
136. Takahashi K, Kimura Y, Yi S, Araki S. Pathology of familial amyloidotic polyneuropathy occurring in Kumamoto. In: Isobe T, Araki A, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Plenum Press, New York, 1988:pp505-510
137. Yamamura Y, Kito S, Shimoyama M, Katayana S, Nakano T, Anzai N. Pathological studies on familial amyloidosis. In: Isobe T, Araki A, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Plenum Press, New York, 1988:pp511-516
138. Freitas AF. The heart in Portuguese amyloidosis. *Postgrad Med J* 1986;62:601-605
139. Fonseca C, Ceia F, Carvalho A, Sá-Nogueira J, Morais H, Conceição I, Luís ML, Luís AS. História natural do envolvimento cardíaco na polineuropatia amiloidótica familiar do tipo português. *Rev Port Cardiol* 1997;16:101-105
140. Saraiva MN. Alterações da função ano-recto-cólica na polineuropatia amiloidótica familiar. Tese de Doutoramento, Universidade do Porto, 1999.
141. Hofer P-Å, Andersson R. Postmortem findings in primary familial amyloidosis with polyneuropathy: a study based on six cases from northern Sweden. *Acta Path Microbiol Scand Sect A* 1975;83:309-322
142. Ando Y, Yi S, Nakagawa T, Ikgawa S, Hirota M, Miyazaki A, Araki S. Disturbed metabolism of glucose and related hormones in familial amyloidotic polyneuropathy: hypersensitivities of the autonomic nervous system and therapeutic prevention. *J Auton Nerv Syst* 1991;35:63-70
143. Andrade MJ. Alterações vesico-esfincterianas na polineuropatia amiloidótica familiar. Tese de Doutoramento, Universidade do Porto, 2001.
144. Andersson R, Bjerle P. Studies of urinary dysfunction in amyloidosis with polyneuropathy. *Acta Med Scand* 1975;197:117-223
145. Prisco R. Polineuropatia amiloidótica familiar. Disfunção erétil – programa de injeção de drogas vasoactivas. Comunicação às Jornadas de Paramiloidose 97, Porto, Outubro 1997
146. Ando E, Ando Y, Okamura R, Uchino M, Ando M, Negi A. Ocular manifestations of familial amyloidotic polyneuropathy type I: long term follow up. *Br J Ophtalmol* 1997; 81: 295-298

147. Sandgren O, Holmgren G, Lundgren E, and Steen L. Restriction fragment length polymorphism analysis of mutated transthyretin in vitreous amyloidosis. *Arch Ophthalmol* 1988;106:790-792.
148. Katsuki H, Ando Y, Ando E, Sandgren O, Hirata A, Nakamura M, Terazaki H, Tajiri T, Tanoue Y, Sun X, Okabe H, Tanihara H. Amyloid deposition in ocular tissues of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid* 2002;9:183-189
149. Lobato L, Beirão I, Azevedo R, Santos M, Ventura A, Silva M, Ribeiro P, Guimarães S. Inappropriately low levels of erythropoietin and correction of anaemia in familial amyloid polyneuropathy type I. *Nephrol Dial Transpl* 1999;14:9
150. Ando Y, Asahara K, Obayashi K, Suhr O, Yonemitsu M, Yamashita T, Tashima K, Uchino M, Ando M. Autonomic dysfunction and anemia in neurologic diseases. *J Auton Nerv Syst* 1996;35:145-148
151. Leite I, Correia M, Nunes B, Amado J, Coutinho P. The loss of weight in type I familial amyloidotic polyneuropathy: a preliminary study. In: Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Related Disorders*. Arquivos de Medicina Porto, 1990:pp341-344
152. Velho G. Dermatologia, aspectos clínicos. Comunicação ao VI Congresso Nacional de Paramiloidose para Técnicos de Saúde, Santarém, Maio 2003
153. Araki S, Ikegawa S, Ando Y, Shigehiro Yi, Miyazaki A. Experiences of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-DOPS) treatment for orthostatic hypotension and gastrointestinal disturbances in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. In: Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Related Disorders*. Arquivos de Medicina Porto, 1990:pp387-389
154. Sales-Luís ML, Galvão M, Carvalho M, Sousa G, Alves MM, Serrão R. Plasma exchange (PE) on the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) Portuguese type. In: Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJ (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Related Disorders*. Arquivos de Medicina Porto, 1990, pp:361-369
155. Lobato L, Costa PMP, Beirão I, Guimarães SM, Guimarães S. Transthyretin immunoadsorption for treatment of FAP type I. *Nephrol Dial Transpl* 1997;12:9
156. Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, Groth C-G, Ericzon B-G, Eriksson S, Andersen O, Karlberg I, Norden G, Nakazato M. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clin Genet* 1991;40:242-246
157. Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A, Richardson S, Hawkins PN, Pepys MB. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 1993;341:1113-1116

158. Adams D, Samuel D, Goulon-Goeau C, Nakazato M, Costa PM, Feray C, Planté V, Ducot B, Ichai P, Lacroix C, Stephane M, Bismuth H, Said G. The course and prognostic factors of familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Brain* 2000;123:1495-1504
159. Ikeda S, Takei Y, Yanagisawa N, Matsunami H, Hashikura Y, Ikegami T, Kawasaki S. Peripheral nerves regenerated in familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Ann Inter Med* 1997;127:618-620
160. Carvalho M, Conceição I, Bentes C, Sales Luís ML. Long-term quantitative evaluation of liver transplantation in familial amyloid polyneuropathy (Portuguese V30M). *Amyloid* 2002;9:126-133
161. Ando Y, Ando E, Tanaka Y, Yamashita T, Tashima K, Suga M, Uchino M, Negi A, Ando M. De novo amyloid synthesis in ocular tissue in familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation. *Transplantation* 1996;62:1037-1038
162. Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, Higashikata T, Koyama J, Higuchi K, Harihara Y, Baba S, Kametani F, Ikeda S. Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:702-706
163. Olofsson BO, Backman C, Karp K, Suhr OB. Progression of cardiomyopathy after liver transplantation in patients with familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. *Transplantation* 2002;73:745-751
164. Altland K, Winter P, Saraiva MJ, Suhr O. Sulfite and base for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy: two additive approaches to stabilize the conformation of human amyloidogenic transthyretin. *Neurogenetics* 2004;5:61-67
165. Cardoso I, Merlini G, Saraiva MJ. 4'-4'-deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters. *FASEB J* 2003;17:803-809
166. Almeida MR, Alves IL, Sakaki Y, Costa PP, Saraiva MJ. Prenatal diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for an early expression of the associated transthyretin methionine 30. *Hum Genet* 1990;85:623-626
167. Carvalho F, Sousa M, Fernandes S, Silva J, Saraiva MJ, Barros A. Preimplantation diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Prenatal Diagn* 2001;21:1093-1099
168. Schena FP, Pannarale G, Carbonara MC. Clinical and therapeutic aspects of renal amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:63-68
169. Cameron JS. Nephrotic syndrome in the elderly. *Semin Nephrol* 1996;16:319-329
170. Gertz MA, Kyle RA. Secondary systemic amyloidosis: response and survival in 64 patients. *Medicine* 1991;70:246-256

171. Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratorial features in 474 cases. *Semin Hematol* 1995;32:45-59
172. Zemer D, Livenh A, Langevitz P. Reversal of nephrotic syndrome by colchicine in amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Ann Intern Med* 1992;116:426
173. Nelson Sr, Pras M. The amyloidosis and familial Mediterranean fever. In: Morgan SH, Grünfeld JP (eds). *Inherited disorders of the kidney*. Oxford University Press, New York, 1998:pp412-426
174. Snanoudj R, Mamzer-Bruneel MF, Hermine O, Grünfeld JP, Chauveau D. Recovery of acute renal failure and nephrotic syndrome following autologous stem cell transplantation for primary (AL) amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2175-2177
175. Choukroun G, Goupy CH, Noël LH, Droz D, Grünfeld JP. Amyloses du rein et de l'appareil urinaire. In: Grateau G, Benson MD, Delpech M (eds). *Les Amyloses*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 2000:pp163-177
176. Duda SH, Raible RT, Risler T, Huppert PE, Brambs HJ, Gregor M. Therapeutic bilateral embolization in the nephrotic syndrome. *Dtsch Med Wochenschr* 1994;119:58-62
177. Falck HM, Tornroth T, Wegelius O. Predominantly amyloid deposition in the kidney in patients with minimal or no proteinuria. *Clin Nephrol* 1983;19:137-142
178. Hazenberg BPC, Van Rijswijk MH. Clinical and therapeutic aspects of AA amyloidosis. *Clin Rheumatol* 1994;8:661-690
179. Tuglular S, Yalcinkaya F, Paydas S, Oner A, Utas C, Bozfakioglu S, Ataman R, Akpolat T, Ok E, Sen S, Düsünsel R, Evrenkaya R, Akoglu E. A retrospective analysis for aetiology and clinical findings of 287 secondary amyloidosis cases in Turkey. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:2003-2005
180. Shokeir AA, Moustafa FE, Abol-Enein H, Dnia AF, Ghoneim MA. Renal amyloidosis without urinary abnormality in a potential live-kidney donor. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:1339-1340
181. Thervet E, Noël LH, Legendre C, Page B, Kreis H. Late histological recurrence of familial Mediterranean fever amyloid after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:218-219
182. Bagnolesi P, Rondine PP, Perri G, Romanogli C, Cilotti A. Renal amyloidosis. An echographic study of 7 cases. *Radio Med* 1988;76:434-437
183. Angelli G, Macarini L. Difficulty of the differentiation of renal parenchymal hyperechogenicity. *Radio Med* 1987;74:88-92
184. Reuben A, Hirsch M, Berlyne GM. Renal vein thrombosis as the major cause of renal failure in familial Mediterranean fever. *Q J Med* 1977;46:243-258

185. Kaaroud H, Ben Moussa F, Goucha R, Abderrahim E, Ben Hamida F, Ben Abdalla T, Younsi F, Kheder A, Ben Miaz H. Influence of surgery on renal amyloidosis. *Kidney Int* 1999;55:2117-2133
186. Honma K, Azuma M, Yamada T. Amyloid vascular disease and contracted kidneys. *Wien klin Wochenschr* 1984;96:629-633
187. Noël LH. La biopsie rénale dans les amyloses. In: Droz D, Lantz B (eds). *La Biopsie rénale*. Inserm, Paris, 1996:pp266-277
188. Mackay K, Striker L, d'Amico G, Striker G. Dysproteinemias and paraproteinemias. Renal pathology with clinical and functional correlations. In: Tisher C, Brenner B (eds). Lippincott, Philadelphia, 1989:pp1363-1416
189. Gubler MC, Naizot C. Renal amyloidosis in children: an ultrastructural study. *Appl Pathol* 1987;5:116-120
190. Martinez-Vea A, Garcia C, Carreras M, Revert L, Oliver JA. End-stage renal disease in systemic amyloidosis. Clinical course and outcome on dialysis. *Am J Nephrol* 1990;10:283-289
191. Gertz MA, Kyle RA, O'Fallon WM. Dialysis support of patients with primary systemic amyloidosis. A study of 211 patients. *Arch Intern Med* 1992;152:2245-2250
192. Merlini G. Treatment of primary amyloidosis. *Semin Hematol* 1995;32:60-79
193. Shetty A, Oreopoulos DG. Continuous ambulatory peritoneal dialysis in end-stage renal disease due to multiple myeloma. *Perit Dial Int* 1995;15:236-240
194. Heering P, Hetzel R, Grabensee B, Opeltz G. Renal transplantation in secondary amyloidosis. *Clin Transplantation* 1998;12:159-164
195. Hartmann A, Holdaas H, Fauchald P, Nordal KP, Berg KJ, Talseth T, Leivestad T, Brekke IB, Flatmark A. Fifteen years of experience with renal transplantation in systemic amyloidosis. *Transpl Int* 1992;5:15-18
196. Livneh A, Zemer D, Siegal B, Laor A, Sohar E, Pras M. Colchicine prevents kidney transplant amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Nephron* 1992;60:418-422
197. Hawkins PN. Hereditary systemic amyloidosis with renal involvement. *J Nephrol* 2003;423-421
198. Rixon MW, Chan WY, Davie EW, Chung DW. Characterization of a complementary deoxyribonucleic acid coding for the a-chain of human fibrinogen. *Biochemistry* 1983;22:3237-3244
199. Louache F, Debili N, Cramer E, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Fibrinogen is not synthesized in human megakaryocytes. *Blood* 1991;77:311-316

200. Uemichi T, Liepnieks JJ, Benson MD. Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *J Clin Invest* 1994;93:731-736
201. Uemichi T, Liepnieks JJ, Alexander F, Benson MD. The molecular basis of renal amyloidosis in Irish-American and Polish-Canadian kindreds. *Q J Med* 1996; 89:745-750
202. Gillmore JD, Booth DR, Rela M, Heaton ND, Rahman V, Stangou AJ, Pepys MB, Hawkins PN. Curative hepatorenal transplantation in systemic amyloidosis caused by Glu526Val fibrinogen alpha-chain variant in an English family. *QJM* 2000;93:269-275
203. Uemichi T, Liepnieks JJ, Yamada T, Gertz MA, Bang N, Benson MD. A frame shift mutation in the fibrinogen alpha chain gene in a kindred with renal amyloidosis. *Blood* 1996;87:4197-41203
204. Hamidi Asl, Liepnieks JJ, Uemichi T, Rebibou JM, Justrabo E, Droz D, Mousson C, Chalopin JM, Benson MD, Grateau G. Renal amyloidosis with a frame shift mutation in fibrinogen α chain producing a novel amyloid protein. *Blood* 1997;90:4799-4805
205. Arinami T, Hirano T, Kobayashi K, Yamanouchi Y, Hamaguchi H. Assignment of the apolipoprotein A-I gene to 11q23 based on RFLP in a case of partial deletion of chromosome 11, del(II) (q23. 3qter). *Hum Genet* 1990;8539-8540
206. Westermark P, Muchianno G, Marthin T, Jonhson KH, Sletten K. Apolipoprotein AI-derived amyloid in human aortic atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1995;147:703-708
207. Soutar AK, Hawkins PN, Vigushin DM, Tennent GA, Booth SE, Hutton T, Nguyen O, Totty NF, Feest TG, Hsuan JJ, Pepys MB. Apolipoprotein AI mutation Arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7389-7393
208. Booth DRA, Tan SY, Booth SE, Hsuan JJ, Totty NF, Nguyen O, Hutton T, Vigushin DM, Hutchinson WL, Pepys MB. A new apolipoprotein AI variant, Trp50Arg, causes hereditary amyloidosis. *QJM* 1995;88:695
209. Persey MR, Booth DR, Booth SE, van Zyl-Smit R, Adams BK, Fattaar AB, Tennent GA, Hawkins PN, Pepys MB. Hereditary systemic amyloidosis caused by a novel variant apolipoprotein A-I. *Kidney Int* 1998;53:276-281
210. Benson MD, Liepnieks JJ, Yazaki M, Yamashita T, Hamidi Asl K, Guenther B, Kluve-Beckerman B. A new hereditary amyloidosis: the result of a stop-codon mutation in the apolipoprotein AII gene. *Genomics* 2001;72:272-277
211. Yazaki M, Liepnieks JJ, Yamashita T, Guenther B, Skinner M, Benson MD. Renal amyloidosis by a novel stop-codon mutation in the apolipoprotein AII. *Kidney Int* 2000;60:1658-1665
212. Yoshimura K, Toibana A, Nakahaama K. Human lysozyme: sequencing of a cDNA, and

expression and secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;150:794-801

213. Zalin AM, Jones S, Fitch NJ, Ramsden DB. Familial non-neuropathic amyloidosis. Clinical features, immunohistochemistry and chemistry. *Q J Med* 1991;81:945-956

214. Lanham JG, Meltzer ML, De Beer FC, Hughes GR, Pepys MB. Familial amyloidosis of Ostertag. *Q J Med* 1982;51:25-32

215. Gillmore JD, Booth DR, Madhoo S, Pepys MB, Hawkins PN. Hereditary renal amyloidosis associated with variant lysozyme in a large English family. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2639-2644

216. Valleix S, Drunat S, Philit JB, Adoue D, Piette JC, Droz D, MacGregor B, Canet D, Delpech M, Grateau G. Hereditary renal amyloidosis caused by a new variant lysozyme W64R in a French family. *Kidney Int* 2002;61:907-912

217. Meretoja J. Familial systemic paramyloidosis with lattice dystrophy of the cornea, progressive cranial neuropathy, skin changes and various internal symptoms. *Ann Clin Res* 1969;1:314-324

218. Maury CP. Homozygous familial amyloidosis, Finnish type: demonstration of glomerular gelsolin-derived amyloid and non-amyloid tubular gelsolin. *Clin Nephrol* 1993;40:53-56

219. McDermott MF, Aksentjevich I, Galon J, McDermott E, Ogunkolade BW, Centola M. Germline mutations in the extracellular domains of the 55kDaTNF receptor, TNFRSF1A, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 1999;97:133-144

220. Dodé C, Cuisset L, Delpech M, Grateau G. TNFRSF1A-associated periodic syndrome (TRAPS), Muckle-Wells syndrome (MWS) and renal amyloidosis. *J Nephrol* 2003;16:435-437

221. Gertz M, Petit RM, Kyle RA. Autosomal dominant familial Mediterranean fever-like syndrome with amyloidosis. *Mayo Clin Proc* 1987;62:1095-1100

222. Aksentjevich I, Galon J, Soares M. The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Med Gen* 2001;69:301-314

223. Hoffman HM, Wanderer AA, Broide DH. Familial cold inflammatory syndrome: Phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever. *J Allergy Clin Immunol* 2000;108:615-620

224. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-wells syndrome. *Nat Genet* 2001;29:301-305

225. Bustorff M, Oliveira JP, Moura C, Carvalho E, Faria V, Guerra L. Muckle-Wells syndrome nephropathy: lack of response to colchicine therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:709-710

226. Hawkins PN, Lachmann HJ. Interleucine-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:2583-2584
227. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever: a survey of 470 cases and reviews of literature. *Am J Med* 1967;43:227-233
228. Méry JPh, Kenouch S. Familial Mediterranean fever-associated amyloidosis. *Renal Failure* 1993;15:379-384
229. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1972;28:1302
230. Akarsu AN, Saatci U, Ozen S, Bakkaloglu A, Besbas N, Sarfarazi M. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. *J Med Genet* 1997;34:573-578
231. Xavier E, Azevedo D. Estudo nefrológico da polineuropatia amiloidótica familiar (tipo Português). *Boletim do Hospital, Hospital Geral de Santo António* 1976;1:35-40
232. Freitas AF. Aspectos clínicos da polineuropatia amiloidótica familiar (tipo Andrade). *Boletim do Hospital, Hospital Geral de Santo António* 1976;1:17-25
233. Steen L, Wahlin A, Bjerle P, Holm S. Renal function in familial amyloidosis with polyneuropathy. *Acta Med Scand* 1982;212:233-236
234. Gertz MA, Kyle RA, Thibodeau SN. Familial Amyloidosis: a study of 52 North American-born patients examined during a 30-year period. *Mayo Clin Proc* 1992;67:428-440
235. Adler SG, Cohen AH, Glasscock RJ. Secondary glomerular diseases. In: Brenner BM (ed). *Brenner and Rector's The Kidney*, 5th ed. WB Saunders, Philadelphia, 1996;pp1515-1610
236. Ando Y, Suhr O. Autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid* 1998;5:288-300
237. Glasscock RJ, Cohen AH, Adler SG, Ward HJ. Secondary glomerular diseases. In: Brenner BM, Rector FC Jr (eds). *The Kidney*, 4th ed. (Philadelphia: WB Saunders), 1991;pp1392-1497

II - DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DEPÓSITOS RENAIIS DE AMILÓIDE

A descrição clássica da amiloidose renal na polineuropatia amiloidótica familiar foi baseada em estudos de autópsias, quando já havia uma longa evolução da doença e sem uma avaliação clínica sistemática prévia vocacionada para as manifestações renais. Não estava documentada a anatomopatologia renal no curso da doença, com ou sem a presença de proteinúria. A abordagem epidemiológica na PAF não se tornaria consistente sem definirmos se a nefropatia, a existir, representaria a expressão do envolvimento das diferentes estruturas renais.

Na amiloidose renal, a relação entre a morfologia e as manifestações clínicas foi realizada na amiloidose AL e AA. Nos primeiros estudos dedicados a este tema não havia disponibilidade de estabelecer o diagnóstico diferencial entre os diversos tipos de amiloidose a nível histológico, sendo a relação estabelecida numa classificação baseada em elementos de ordem clínica [1, 2]. Quando a caracterização histológica foi possível, com anticorpos monoclonais ou policlonais, por métodos imunohistoquímicos ou imunofluorescência, o predomínio dos depósitos vasculares na amiloidose AA foi descrito, mesmo na ausência de clínica renal [3]. Nas amiloidoses hereditárias, exceptuando a FMF, os estudos anatomopatológicos sistemáticos demonstraram casos isolados de amiloidose nefropática, mais vulgarmente por fibrinogénio [4, 5]. Essas descrições geralmente corresponderam a casos de insuficiência renal avançada.

No trabalho correspondente a este capítulo realizámos biópsias renais em doentes com a mesma mutação da TTR (V30M), mas com diferente expressão nefropática. Estudamos a distribuição dos depósitos de amiloide por microscopia óptica e definimos as lesões histológicas típicas desta variante. Para que inequivocamente ficasse demonstrada a patologia, caracterizamos por métodos imunohistoquímicos a proteína precursora presente. Os achados histológicos foram analisados no contexto da expressão renal, do envolvimento multiorgânico e da epidemiologia.

Na execução deste trabalho foi necessária a aprendizagem de técnicas de pesquisa de substância amiloide por microscopia óptica, realização de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais anti-TTR, anti-AA, policlonais anti-AL κ e λ e monoclonais anti- β 2 microglobulina. A aplicação destes anticorpos foi realizada sistematicamente em todos os fragmentos de biópsias. A leitura e a descrição da anatomopatologia renal na amiloidose, bem como a valorização dos resultados da imunohistoquímica foram uma segunda etapa de aprendizagem.

Este treino foi complementado com a aplicação das técnicas e observação de biópsias renais de doentes com amiloidose, PAF e insuficiência renal avançada (com histologia prévia a este estudo), bem como de outras amiloidoses com diferentes patologias subjacentes.

O laboratório de anatomopatologia renal do Hospital Necker, em Paris, e o laboratório de histologia do Centro de Estudos de Paramiloidose permitiram a aprendizagem e o treino das técnicas utilizadas.

1. Watanabe T, Saniter T. Morphological and clinical features of renal amyloidosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1975;366:125-135
2. Dikman SH, Churg J, Kahn T. Morphologic and clinical correlates in renal amyloidosis. *Human Pathol* 1981;12:160-169
3. Falck HM, Torroth T, Wegelius O. Predominantly vascular amyloid deposition in the kidney in patients with minimal or no proteinuria. *Clin Nephrol* 1983;19:137-142
4. Gillmore JD, Booth DR, Rela M, Heaton ND, Rahman V, Stangou AJ, Pepys MB, Hawkins PN. Curative hepatorenal transplantation in systemic amyloidosis caused by Glu526Val fibrinogen alpha-chain variant in an English family. *QJM* 2000;93:269-275
5. Hawkins PN. Hereditary systemic amyloidosis with renal involvement. *J Nephrol* 2003;16:443-448

Familial Amyloid Polyneuropathy Type I (Portuguese): Distribution and Characterization of Renal Amyloid Deposits

Luísa Lobato, MD, Idalina Beirão, MD, Serafim M. Guimarães, MD, Dominique Droz, MD,
Serafim Guimarães, MD, Jean-Pierre Grünfeld, PhD, MD, and Laure-Hélène Noël, MD

● Renal amyloidosis has been considered rare and late in the evolution of the transthyretin (TTR) familial amyloid polyneuropathy (FAP) of the Portuguese type (type I). Renal biopsy has been performed systematically in 14 patients with FAP type I before liver transplantation. In all patients, TTR Met30 mutation was shown. Seven had proteinuria or abnormal microalbuminuria, whereas seven others had no urinary abnormalities. All had renal amyloid deposition predominantly in the medulla. Glomerular and vascular involvement was more prominent in patients with urinary abnormalities. Patients with the most extensive renal lesions represented a subgroup with a low score of polyneuropathy disability, a high prevalence of nephropathy in the proband generation, or a late onset for relatives with nephropathy. Immunohistochemistry studies showed that the amyloid substance corresponded to transthyretin. We have shown that renal TTR-derived amyloid deposition is common in patients with FAP type I, even in the absence of urinary abnormalities. The clinical presentation of nephropathy is not a late occurrence in the disease.

© 1998 by the National Kidney Foundation, Inc.

INDEX WORDS: Familial amyloidosis; transthyretin; nephropathy; renal biopsy.

FAMILIAL AMYLOID polyneuropathy (FAP) type I (Portuguese type) is a form of systemic amyloidosis inherited in an autosomal dominant mode. The components of amyloid fibrils consist of transthyretin (formerly known as prealbumin) in which valine has been replaced by methionine at position 30 (TTR Met30).^{1, 2} The main expression of the disease is a polyneuropathy, first described by Andrade in families from northern Portugal.³ Since then, 1,233 cases belonging to 489 families have been observed at Centro de Estudos de Paramiloidose in Porto.⁴ Japan and Sweden are the second and third largest foci in the world.⁵

The therapeutic approach to the disease has been made with plasmapheresis,⁶ extracorporeal immunoadsorption,⁷ and liver transplantation.⁸ The renal involvement has been described as a

late occurrence and was considered clinically insignificant.⁹ It has become critical before liver transplantation to assess the extension of amyloid deposition, more particularly in the kidneys.

In the current study, we evaluated amyloid deposits in renal biopsy specimens from patients with FAP TTR Met30 mutation. We described the histomorphological findings, the distribution, and the characterization of amyloid deposits. We therefore related these findings with the clinical features, renal function, and proteinuria. We looked for the existence of nephropathy in the kindreds of these patients.

PATIENTS AND METHODS

Patients

From December 1995 until July 1996, every patient with FAP considered for liver transplantation was submitted for renal biopsy. Thus, we evaluated 14 Portuguese patients, nine men and five women, belonging to 14 unrelated families.

All patients had TTR Met30 mutation determined by DNA analysis. Family pedigrees were established. In patients and relatives, we collected data on age at onset, clinical presentation, and duration of the disease. In the clinical assessment of renal function, we used serum creatinine and urea, creatinine clearance, or ^{99m}TcDTPA clearance (mL/min/1.73m²). Proteinuria and microalbuminuria (when proteinuria was absent) were evaluated in a 24-hour urine collection in all patients.

A modified polyneuropathy disability scoring system¹⁰ was used as follows: score I, sensory disturbances in the extremities but preserved walking capacity; score II, difficulties in walking but without the need for a walking stick;

From the Department of Nephrology, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal; Centro de Estudos de Paramiloidose, Porto, Portugal; and the Department of Nephrology, Hôpital Necker, Paris, France.

Received May 2, 1997; accepted in revised form January 9, 1998.

Supported by Grant No. 42/95 from Comissão de Fomento da Investigação em Saúde, Portuguese Ministry of Health.

Address reprint requests to Luísa Lobato, MD, Centro de Estudos de Paramiloidose, Hospital Geral de Santo António, Rua D. Manuel II, 4050 Porto, Portugal. E-mail: nop33611@mail.telepac.pt

© 1998 by the National Kidney Foundation, Inc.

0272-6386/98/3106-0006\$3.00/0

score IIIA, one walking stick or one crutch required for walking; score IIIB, two walking sticks or crutches required; and score IV, patients in a wheelchair or bed confined.

METHODS

Renal biopsy was performed in all patients. One fragment was fixed in formol for classical histological methods, and another was frozen and stored at -70°C . The two specimens were cut to obtain sections of 3 to 4 μm in thickness and stained with Congo red and with a monoclonal anti-TTR antibody produced at Centro de Estudos de Paramiloidose.¹¹

Amyloidosis has a characteristic staining with Congo red and a yellow/green dichroism when examined with polarized light.

The nondiluted monoclonal antibody anti-TTR used was studied on a fixed and frozen specimen, by indirect immunoperoxidase technique.¹¹ In the fixed specimen, no digestion was necessary.

The amount of glomerular, tubular, interstitial, and vascular amyloid was graded on a scale from – (absent) to + + +. Amyloid deposits composed up to 25% of the structure involved were classified as +, 25% to 50% as + +, and more than 50% as + + +.

RESULTS

Clinical Findings

The mean age at onset of the symptomatic disease was 30.4 years (± 8.2 SD). When the renal biopsy was performed, the mean duration of the disease was 5.8 years (± 3.3 SD). On average creatinine clearance was 100.1 mL/min (normal, 80 to 120 mL/min) and $^{99\text{mTc}}$ DTPA

clearance 92.5 mL/min (normal, 80 to 140 mL/min). Serum creatinine and urea were on average 0.85 mg/dL and 31.2 mg/dL, respectively (normal values, 0.5 to 1.2 mg/dL for serum creatinine, and 10 to 50 mg/dL for serum urea). Clinical data on the patients are summarized in Tables 1 and 2. All patients had neurological symptoms with variable scores. In patient 3, peripheral sensitive neuropathy developed 2 years after appearance of urinary abnormalities. In three patients (nos. 11, 12, and 13), microalbuminuria was abnormally elevated (higher than 25 $\mu\text{g}/\text{min}$). In four patients, proteinuria was present. Seven patients had atrioventricular block. Gastrointestinal manifestations were present in 13 of 14 patients.

Three of the 14 families were remarkable because of prominent and early renal symptoms. Several FAP patients had clinical renal disease (families 2, 3, and 12) with chronic renal failure or nephrotic syndrome (Fig 1). The origin of these three cases was Braga/Barcelos, a region with lower FAP prevalence.

Pathological Data

Representative sections of cortex and medulla were found in 11 biopsy specimens, in two only renal cortex, and in one only the medullary zone,

Table 1. Clinical Data on 14 Patients Submitted for Renal Biopsy

Patient No.	Sex	Age at Onset (yr)	Duration of Disease* (yr)	Creatinine Clearance/ $^{99\text{mTc}}$ DTPA Clearance (mL/min)	Serum Creatinine (mg/dL)	Microalbuminuria ($\mu\text{g}/\text{min}$)	Proteinuria (g/d)
1	F	31	8	159/92	0.9	8.1	—
2	M	33	6	170/128	0.9	—	0.5
3	F	44	1	56/ND	1.4	—	4
4	M	26	6	91/100	0.8	6.5	—
5	M	31	3	91/114	0.9	5.8	—
6	F	28	4	98/65	0.7	20	—
7	M	26	6	119/89	0.9	—	0.3
8	M	23	15	112/ND	0.6	—	—
9	M	25	4	35/76	0.7	9.2	—
10	M	20	7	124/79	0.9	23.5	—
11	M	26	6	110/71	0.7	207	—
12	F	50	3	54.5/127	0.9	149	—
13	F	36	5	91/75	0.7	72	—
14	M	26	7	90/91	0.9	—	2

Abbreviation: ND, not determined.

*Duration of the disease from initial symptoms until the renal biopsy.

Table 2. Clinical Features of the Disease on Patients Submitted for Renal Biopsy

Patient No.	Initial Symptoms	Neuropathy Score	Disturbances in ECG	Echocardiogram	Gastrointestinal	FAP Parent	Number of Relatives With CRF or NS
1	Diarrhea	I	No	Normal	Diarrhea	Mother	0
2	Sensory symptoms of lower limbs	II	No	Left ventricular hypertrophy	Constipation, diarrhea	Mother	5
3	Proteinuria bradycardia	I	AV block	Normal	Absent	Father	3
4	Sensory symptoms of lower limbs	IIIA	AV block	Restrictive cardiomyopathy	Constipation, diarrhea	Father	0
5	Impotence	I	No	Normal	Constipation	Father	0
6	Sensory symptoms of lower limbs	I	No	Normal	Constipation	Mother	0
7	Sensory symptoms of lower limbs	II	AV block	Left ventricular hypertrophy	Diarrhea	Mother	0
8	Sensory symptoms of lower limbs	IIIA	AV block	—	Diarrhea	Father	0
9	Sensory symptoms of lower limbs	II	No	Normal	Constipation, diarrhea	Father	0
10	Anorexia, sensory symptoms of lower limbs	II	AV block	Normal	Diarrhea	Mother	0
11	Motor symptoms, weight loss	II	AV block	—	Constipation, diarrhea	Father	0
12	Sensory symptoms of lower limbs	I	No	Concentric left ventricular hypertrophy	Diarrhea	Mother	2
13	Weight loss	II	AV block	—	Diarrhea	Father	0
14	Impotence	IIIA	Reduction in voltage	—	Diarrhea	Father	0

Abbreviations: FAP, familial amyloid polyneuropathy; CRF, chronic renal failure; NS, nephrotic syndrome; AV, atrioventricular.

thus without glomeruli available for study. The number of glomeruli examined in 13 renal biopsy specimens ranged from 1 to 64, with an average of 15 per biopsy (Table 3).

Renal amyloid deposits were observed in all cases with Congo red staining. They predominated in interstitial tissue, and mainly in renal medulla. Immunohistochemical characterization showed the presence of TTR fixation in amyloid deposits but also in tubular droplets (Fig 2).

Glomerular Distribution

Glomerular amyloid deposits were found in all examined cases. Mesangial amyloid deposits were observed in 12 biopsy specimens. In nine biopsy specimens (75%), only some glomeruli were affected, and only a portion of each glomerulus exhibited amyloid segmental deposits. In the other three cases, corresponding to patients nos. 2, 3, and 12, the mesangial deposition was more

extensive, quantified as ++, +++, and ++, respectively. The biopsy specimen of patient no. 12 contained 14 glomeruli, among which eight were sclerosed. The arterioles of the juxtaglomerular apparatus (vascular pole) were involved in six biopsy specimens (46%), with greater amyloid deposition (++) in patients 2 and 3 (Fig 2A and B).

We did not find amyloid deposits along the glomerular basement membrane, the subendothelial or subepithelial space; however, only light microscopy study was available.

Tubular and Interstitial Distribution

Cortical interstitium and proximal convoluted tubules were spared of amyloid deposition. On a few biopsy specimens, rare deposits of amyloid were found along the outside aspect of the tubular basement membrane.

In contrast, large deposits of amyloid sub-

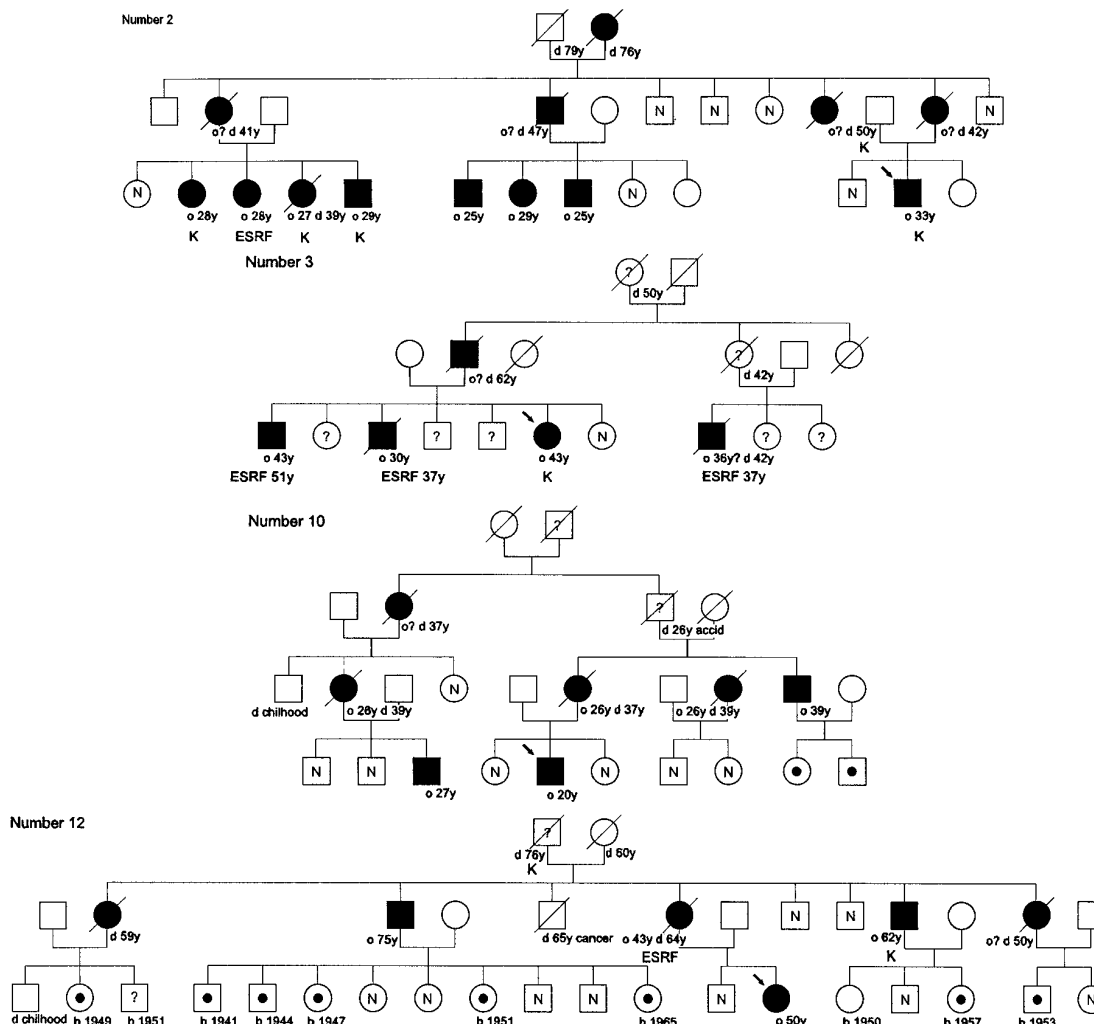


Fig 1. Family pedigrees. The family number corresponds to the used patient number. Families 2, 3, and 12 present late-onset cases and several relatives with renal disease. In contrast, family 10 presents a classic early onset and absence of nephropathy in the other members.

stance were detected in the renal medulla of 10 of 12 patients, in whom medulla could be studied (Fig 2C and D). Tubular amyloid deposits were observed in 11 of these 12 biopsy specimens (91.6%), mainly in the loops of Henle and distal segments. In patient 2, the amyloid extension could not be assessed.

Vascular Distribution

Amyloid deposition was observed in cortical arterioles of nine biopsy specimens. In seven cases, it was mild (+), and in patients 2 and 3 it was more important (++). Interlobular arteries

were involved only in patients 2, 3, and 12. When medullary infiltration was observed, vasa recta were often infiltrated, and in patient 3, numerous arterioles were also affected.

Clinicopathological Correlations

Patients with urinary abnormalities (proteinuria or microalbuminuria) had a more extensive glomerular (in the mesangium and vascular pole) and vascular amyloid involvement than those without clinical renal disease. Conversely, no association was found between proteinuria and tubular amyloid deposition. In fact, the three

Table 3. Distribution of Amyloid Deposits in the Kidney Using Congo Red and Immunoperoxidase With Anti-TTR Antibody Fixation

Patient No.	C/M	n:G	Glomeruli			Tubules	Interstitialium		Vessels	
			GBM	Mes	VP		Cortex	Medulla	ARL C/M	IA
1	C < M	4	—	+	—	+	—	+	—/—	—
2	C	64	—	+++	++	—	—	—	++/—	—
3	C < M	10	—	++	++	+	—	+	++/+	+
4	C > M	8	—	—	+	++	—	+	+/—	—
5	M	0	—	—	—	+	—	—	—/—	—
6	C > M	22	—	+	—	—	—	—	+/—	—
7	C > M	30	—	+	—	++	—	+	+/—	—
8	C < M	3	—	+	—	++	—	+	+/—	—
9	C < M	12	—	+	+	++	—	++	+/—	—
10	C = M	6	—	+	—	++	—	+	—/—	—
11	C < M	43	—	+	+	++	—	+++	+/—	—
12	C < M	14	—	++	+	++	—	++	++/—	+
13	C	15	—	+/++	—	—	—	—	—/—	—
14	C > M	6	—	+	—	+/—	—	+	—/—	—

Abbreviations: C/M, ratio of cortex and medulla; n:G, number of glomeruli by biopsy; GBM, glomerular basement membrane; Mes, mesangium; VP, vascular pole; ARL, arterioles; IA, interlobular arteries; —, absent; +, <25%; ++, 25%-50%; +++, >50%.

patients with weak tubular amyloid deposits had a variable range of proteinuria (Table 2), whereas no patient with more severe tubular amyloid deposits had proteinuria. Moreover, no association was observed between interstitial involvement and renal manifestations (Table 2).

DISCUSSION

Neuroautonomic disturbances are generally the presenting symptoms in FAP type I. This involvement causes orthostatic hypotension, cardiac arrhythmia, disturbances in gastrointestinal motility, anhidrosis, sexual impotence, and sphincter dysfunction.³ Some patients have motor symptoms from the beginning of the disease.⁴ In Portugal, the mean age at onset is 31.9 years in men and 35.6 years in women, although a group of later-onset patients has been identified.¹² The disease is progressive and highly disabling, and death occurs on average 11 years after the onset.¹³ One third of the families have their origin in Póvoa de Varzim and Vila do Conde, where the frequency of gene carriers was estimated to be 186×10^{-5} , one in every 538 individuals. A high penetrance of the disease is typical in that region.¹⁴

In 1964, Silva Horta¹⁵ showed that there was no nephrotic syndrome or renal failure in Portuguese patients. Itoh et al¹⁶ found a clinicopatho-

logical relationship between renal amyloid deposits and proteinuria or renal failure in 11 Japanese autopsy cases of nephropathy. Pyelonephritis lesions, present in 91% of their cases, were considered as an additional factor that influences renal dysfunction.

In contrast, in our center, we have observed several cases of nephrotic syndrome and end-stage renal failure (ESRF) in FAP TTR Met30.¹⁷ From June 1989 until January 1995, 22 patients belonging to 21 families initiated regular dialysis. Most of these patients had one or more relatives with nephropathy. In two thirds of these families, onset of the disease occurred later than in the common form, or there were old asymptomatic gene carriers. The same TTR Met30 mutation was documented in these families.¹⁷ Progressive renal involvement was also described in TTR Tyr77 and TTR Pro52 variants.¹⁸

However, renal disease is rare among patients with transthyretin amyloidosis. In this study, in which FAP patients had systematically renal biopsy before liver transplantation, 7 of 14 had no renal manifestation. One patient (patient 3) had proteinuria as a first sign of the disease. Amyloid deposits were present in all biopsy specimens, even when polyneuropathy was recently diagnosed. In all of these cases, medullary zone and tubules were infiltrated with variable extension.

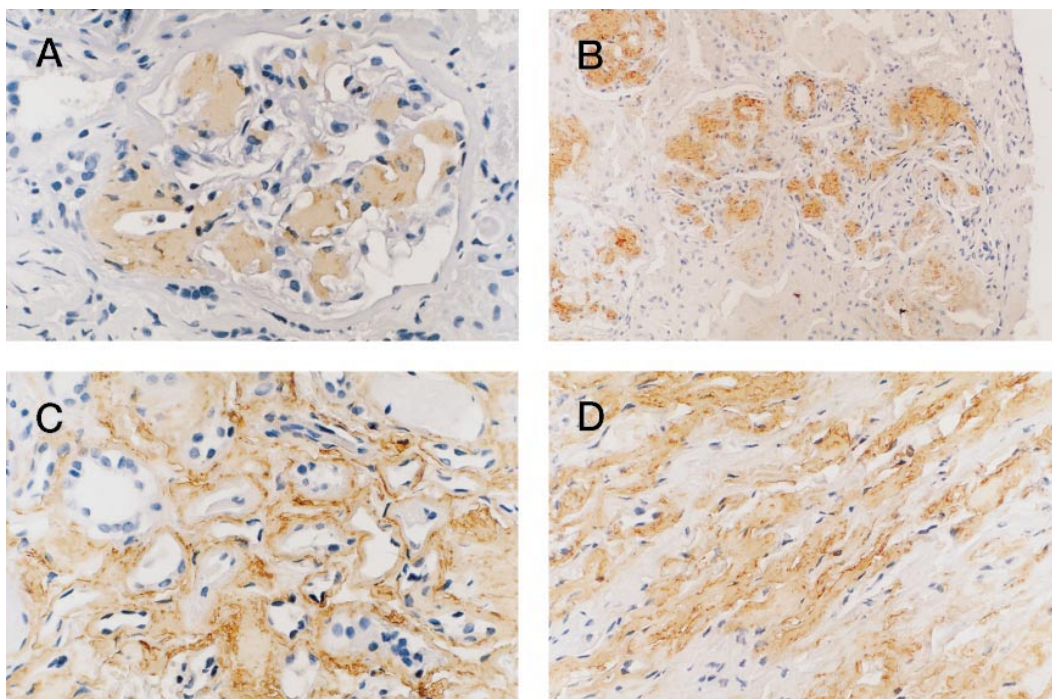


Fig 2. (A) Anti-TTR fixation in mesangial and in vascular pole of a glomerulus (immunoperoxidase technique, original magnification $\times 400$). (B) Anti-TTR fixation in glomerular and vascular structures and also in tubular droplets (immunoperoxidase technique, original magnification $\times 200$). (C) Anti-TTR fixation along tubular basement membranes in the medulla (immunoperoxidase technique, original magnification $\times 400$). (D) Anti-TTR fixation in the interstitial medulla (immunoperoxidase technique, original magnification $\times 400$).

Glomerular deposition was observed in 12 biopsy specimens, but the distribution was focal and segmental in nine and diffuse in three.

As expected, renal amyloidosis is TTR derived. The marked medullary renal involvement appears to be distinct from the renal involvement observed in other neuropathic and nonneuropathic forms of hereditary amyloidosis, which is mainly glomerular and vascular.¹⁹ Usually, renal biopsies are performed when there are renal symptoms. In familial Mediterranean fever (FMF), renal arteriolar amyloid deposits have been described without urinary abnormalities.²⁰ The recurrence of amyloid with vascular deposition has been observed after renal transplantation without clinical expression.^{21, 22} Renal AA amyloidosis, not related to FMF, was disclosed in interstitium, peritubular, and arteriolar, with scanty glomerular involvement and absence of proteinuria.²³

Renal manifestations are correlated with glomerular and vascular involvement and not with

tubulointerstitial involvement. Moreover, two different presentations of FAP can be distinguished regarding renal involvement. Indeed, the three patients with the most extensive renal lesions exhibited a low score of polyneuropathy disability, a high prevalence of nephropathy in the proband generation, and a late onset in relatives with nephropathy. All of those families had their origin in the same area. Unknown genetic or environmental factors probably predispose to this form. In the families from Braga, the disease did not seem to have atypical features of FAP, other than clinical renal disease in other family members. We should carry out further epidemiological study, namely concerning age at onset, penetrance of neuropathy, and prevalence of clinical nephropathy in Braga, comparing with data from the main area of FAP.

The serious and early amyloid deposition in some of our cases raised the problem of progression of renal dysfunction after liver transplantation. Renal biopsy joined with follow-up after

transplantation will give us guidelines for a combined kidney and liver transplantation.

TTR renal amyloidosis is characterized by early deposition in the medulla. TTR is catabolized and reabsorbed in the proximal convoluted tubules.²⁴ With the anti-TTR antibody, numerous droplets were observed in this segment. Renal medullary environment may accelerate amyloid substance formation and deposition or slow down its catabolism and proteolysis. Glycosaminoglycans, which are abundant in medulla, and the urinary concentration process may interfere with degradation and stability of TTR Met30. Renal urinary concentration capacity might be altered early in patients with renal TTR amyloidosis. Urinary concentration tests might be helpful for the early identification of these patients.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr Helena Pessegueiro in patient admissions, Dr José Vasconcelos in ultrasonography guidance for biopsies, and Dr Silva Caspurro on ceding some of the paraffin biopsy material.

REFERENCES

- Costa PP, Figueira A, Bravo F: Amyloid fibril protein related to prealbumin familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4499-4503, 1978
- Saraiva MJ, Costa PP, Goodman DS: Genetic expression of transthyretin mutation in typical and late onset Portuguese families with familial amyloidotic polyneuropathy. *Neurology* 36:1413-1417, 1986
- Andrade C: Familial atypical generalized amyloidosis with specific involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75:408-427, 1952
- Coelho T, Sousa A, Lourenço E, Ramalheira J: A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *J Med Genet* 31:293-299, 1994
- Tanaka M, Nakasato M, Kurihara T, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H: Abnormal transthyretin in familial amyloidotic polyneuropathy in Japan and in Sweden, in Isobe K, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds): *Amyloid and Amyloidosis*. New York, NY, Plenum Press, 1988, pp 323-328
- Coutinho P, Macedo E, Estácio A, Saraiva A, Costa PP, Saraiva MJM: Periodic plasma exchanges in the treatment of familial amyloid polyneuropathy: Preliminary results, in Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds): *Amyloid and Amyloidosis*. New York, NY, Plenum Press, 1988, pp 845-849
- Lobato L, Costa PMP, Castro R, Beirão I, Estácio A, Costa PP: In vivo immunoadsorption of transthyretin in familial amyloidotic polyneuropathy TTR Met 30: Preliminary clinical experience. *Neuromusc Disord* 6:S56, 1996 (suppl)
- Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A, Richardson S, Hawkins PN, Pepys MB: Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 341:1113-1116, 1993
- Alexander F, Atkins EL: Familial renal amyloidosis: Case reports, literature review and classification. *Am J Med* 59:121-128, 1975
- Suhr O, Holmgren G, Steen L, Wikström L, Norden G, Frimean S, Duraj FF, Groth CG, Ericzon BG: Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy: Follow-up of the first 20 Swedish patients. *Transplantation* 60:933-938, 1995
- Costa PMP: Amiloidoses transtirretínicas, da biopatologia à terapêutica. Porto University Medical Dissertation 74-77, 1993
- Lobato L, Teixeira F, Sousa A, Sequeiros J: Genetic study of late onset in hereditary amyloid neuropathy (HAN)-type I (Portuguese, Andrade), in Isobe K, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds): *Amyloid and Amyloidosis*. New York, NY, Plenum Press, 1988, pp 441-446
- Sousa A, Coelho T, Morgado R, Coutinho P: Statistical analysis of factors which may influence the duration of familial amyloidotic polyneuropathy type I. *Arquivos de Medicina* 3-sp issue:351-355, 1990
- Sousa A, Coelho T: A prevalence study of FAP in two areas of Portugal: Póvoa de Varzim/Vila do Conde and Unhais da Serra/Seia /Covilhã. *J Rheumatol* 20:190, 1993 (abstr)
- Horta JS, Filipe I, Duarte S: Portuguese polyneuritic familial type of amyloidosis. *Pathol Microbiol* 27:809-825, 1964
- Itoh N, Shigematsu H, Ikeda S, Oguchi H: Clinicopathological studies on nephropathy of familial amyloid polyneuropathy in Japan, in Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds): *Amyloid and Amyloidosis*. New York, NY, Plenum Press, 1988, pp 499-504
- Lobato L, Beirão I, Monteiro P, Saraiva MJM, Coelho T, Sousa A: Epidemiology and genetic analysis in patients with familial amyloid polyneuropathy (FAP) and end-stage renal disease: Can we predict renal involvement? *Neuromusc Disord* 6:S51, 1996 (suppl)
- Benson MD, Uemichi T: Transthyretin amyloidosis. *Amyloid. Int J Exp Clin Invest* 3:44-56, 1996
- Noël LH: La biopsie rénale dans les amyloses, in La biopsie rénale, Inserm 1996 (ed), pp 267-275
- Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H: Familial Mediterranean fever: A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 43:227-253, 1967
- Jacob E, Nathan N, Shapira Z, Gafni J: Renal transplantation in the Amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Arch Intern Med* 39:1135-1138, 1979
- Benson M, Skinner M, Cohen A: Amyloid deposition in a renal transplant in familial mediterranean fever. *Ann Intern Med* 87:31-34, 1977
- Shokeir AA, Moustafa FE, Enein HA, Donia AF, Ghoneim MA: Renal amyloidosis without urinary abnormality in a potential live-kidney donor. *Nephrol Dial Transplant* 9:1339-1340, 1996
- Jacobsson B, Lignellid H, Bergerheim UF: Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers of renal cell carcinoma. *Histopathology* 26:559-564, 1995

III - EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA RENAL

Os processos existentes no CEP continham informação neurológica e diversos exames analíticos. Desconhecíamos se a função renal e a proteinúria tinham sido avaliadas ao longo dos anos. Até 1987 a uremia foi descrita como causa de morte apenas em um dos 418 doentes registados como falecidos a nível nacional [1]. Assim, não sabíamos se a ausência de nefropatia clínica se devia a falta de registos, se os períodos de observação e análise tinham sido curtos, ou ainda se os nefropatas não eram reconhecidos porque a apresentação da doença era diferente.

No trabalho desenvolvido neste capítulo procurámos:

- diagnosticar a doença renal, estimar a sua frequência e progressão para a insuficiência renal crónica terminal;
- identificar factores ambientais e genéticos implicados na expressão do fenótipo nefropático;
- estudar a variabilidade fenotípica nas famílias com casos de insuficiência renal crónica terminal.

Definimos como áreas de pesquisa epidemiológica os locais que, em termos de origem de famílias, representavam as zonas de maior prevalência da doença no norte de Portugal. Esses locais foram a Póvoa de Varzim e Vila do Conde (que pela sua história e proximidade foram analisados em conjunto), Barcelos e Braga.

A primeira tarefa foi a revisão de todos os processos clínicos arquivados no CEP, desde 1939 até Dezembro de 1989, compreendendo um total de 461 doentes com origem naquelas áreas. Quando existia alguma informação de internamento ou observações noutros hospitais em doentes falecidos anteriormente ao nosso estudo, averiguamos a existência de exames analíticos. Verificámos que as avaliações de função renal (creatinina ou ureia séricas) e proteinúria tinham sido concretizadas em 92 doentes (20%).

O estudo prospectivo clínico e analítico realizou-se entre Janeiro de 1990 e Dezembro de 2000, na perspectiva de possuírmos um registo a longo prazo. A avaliação da função renal e proteinúria foi solicitada a todos os doentes com origem nas áreas de estudo. Na revisão final dos dados verificámos que, dos 423 indivíduos reconhecidos como doentes naquele período de tempo 403 foram observados, correspondendo a 150 famílias não relacionadas. Repetimos semestralmente a avaliação dos doentes até ao seu falecimento ou transplantação hepática. As informações regularmente actualizadas foram incluídas nas histórias familiares.

Assumimos como probando o primeiro insuficiente renal crónico terminal numa família a ter diagnóstico e seguimento na consulta, independentemente da área geográfica de origem. Os familiares doentes dos probandos foram estudados obedecendo ao mesmo tipo de registo clínico e analítico anterior. Avaliámos 60 probandos e suas famílias, 33 pertencentes às áreas de estudo epidemiológico e 27 com origem noutras partes do país. A associação familiar de doença renal foi pesquisada comparando a frequência da nefropatia nas famílias com casos índice IRCT, com a da população global com PAF estudada. Procurámos modelos que explicassem os nossos achados de epidemiologia clínica e genética.

A concretização deste trabalho implicou a aprendizagem de métodos de avaliação epidemiológica em doenças monogénicas. Na obtenção dos resultados foram fundamentais a selecção da amostra de população e o uso de fontes de investigação correctas. A análise familiar obrigou ao esforço permanente de agregar dados, com espírito crítico, mantendo a conduta ética exigida nestas circunstâncias.

O Departamento de Estudos de Populações do ICBAS possibilitou a aprendizagem epidemiológica. A experiência anterior na investigação de casos tardios com PAF e em aconselhamento genético foram essenciais para alicerçar o estudo.

Apresentamos o artigo submetido à revista *American Journal of Medical Genetics*, corrigido após as sugestões dos peritos revisores.

1. Sousa A, Coelho T, Morgado R, Coutinho P. Statistical analysis of factors which may influence the duration of familial amyloidotic polyneuropathy type I. In: Costa PP, Freitas AF, Saraiva MJM (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Related Disorders*. Arquivos de Medicina, Porto, 1990:pp351-355

Nephropathy is a common but overlooked finding in hereditary amyloidosis TTR VAL30MET

Luísa Lobato^{1, 2, 3}, *Idalina Beirão*^{1, 2}, *Manuela Silva*¹, *Paulo P Costa*², *Serafim Guimarães*¹, *Jorge Sequeiros*², *Alda Sousa*^{2, 3, 4}

1 Department of Nephrology, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal

2 Centro de Estudos de Paramiloidose, Porto, Portugal

3 UnIGENE, Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal

4 Department of Population Studies, ICBAS, University of Porto, Portugal

KEY WORDS: *amyloidosis, familial aggregation, hereditary, end-stage renal disease, nephropathy, neuropathy, proteinuria, transthyretin V30M*

ABSTRACT

Familial amyloid polyneuropathy type I (FAP), an autosomal dominant, is due to a Val30Met mutation in the transthyretin gene. Renal involvement has been considered incidental. We assessed frequency and familial predisposition to nephropathy and end-stage renal disease (ESRD) after a prospective survey in the 3 main areas of FAP in Portugal. Patients with ESRD from other districts and their affected relatives were also enrolled in this study. Proteinuria ≥ 0.3 g/l or renal insufficiency were criteria for 'nephropathy'. In the 3 districts, 403 patients (150 kindreds) had renal evaluation: nephropathy was present in 147 (53M/94F), from 82 kindreds; 47 had ESRD (11.7%, 15M/32F), in 33 kindreds.

Nephrotic proteinuria was found in 42%. Risk factors for nephropathy: women, onset ≥ 40 years, family history of nephropathy. We also examined 34 ESRD patients (27 kindreds) from other districts. Altogether, we scrutinize 276 patients from ESRD kindreds; 158 had nephropathy, 81 (31M/50F) of whom progressed to ESRD. Symptomatic bradycardia was the only manifestation exclusively encountered in patients who later developed ESRD. Frequency of nephropathy was higher in kindreds with than in kindreds without ESRD patients (RR: 1.8; 95% CI [1.3, 2.5]); nephropathy was ascertained in 54.5%, and ESRD in 20%, in sibs of ESRD probands. Renal disease is more common than previously accepted. Familial aggregation of renal disease clearly suggests the influence of additional (most probably genetic) factors.

INTRODUCTION

Transthyretin (TTR) associated (ATTR, MIM 176300) is the most frequent form of hereditary systemic amyloidosis (Saraiva et al., 1986; Benson, 2000). Over 80 TTR variants cause systemic familial amyloidoses (Benson, 2000). Tissue deposition of amyloid is not uniform, in patients with the same or different TTR mutations, and dysfunction of specific organs, including the kidney, varies widely from one family to another.

The disease in the TTR V30M kindreds was termed familial amyloid polyneuropathy (FAP) because early symptoms arose usually from peripheral neuropathy. The TTR V30M mutation has its largest world focus in Portugal. Póvoa de Varzim/Vila do Conde, Barcelos and Braga are contiguous districts in the north of the country, and the ones with higher prevalence of FAP. In Póvoa, where Andrade first described FAP (Andrade, 1952), the disease is rather homogeneous regarding age at onset and neurological manifestations, and shows very high penetrance (Sousa et al., 1995).

Since the identification of the disease as a new entity in 1939, neurologists from all country have referred patients to Hospital Geral de Santo António (HGSA), in Porto, where Andrade worked. Andrade created at HGSA a center for studies of familial amyloidosis (CEP), which had the assignment of ascertaining and following patients and kindreds from all country and it has never been interrupted. A multidisciplinary outpatient clinic was set up at CEP, together with a reference laboratory for genetic testing and research. In the areas of higher prevalence, general practitioners were trained to diagnose FAP and refer patients to CEP.

References to the clinical picture of ATTR Val30Met have considered kidney disease to be

very rare or absent (Alexander and Atkins, 1975; Nelson and Pras, 1998). Over the last 15 years, however, some departures from the usual clinical pattern became apparent (Sequeiros and Saraiva, 1985; Coelho et al., 1994; Tashima et al., 1997). Even so, frequency of renal manifestations has never been described, to this date, probably because FAP patients and families were mostly cared at neurological clinics.

Renal involvement by amyloid, whatever the chemical composition of the amyloid fibrils, may consist of mild or nephrotic range proteinuria, and in some instances renal dysfunction that could lead to end-stage renal disease (ESRD). Urinary sediment is usually normal, and in some rare cases may show a few red cells. Amyloidosis accounts for a very small percentage of patients subject to renal replacement therapy. Nonetheless, this is a clinically important problem, as this population has a high morbidity, even before dialysis.

The aim of this study was to estimate the frequency of nephropathy and of ESRD in patients with amyloidosis associated to the TTR V30M mutation in the three main areas of FAP in northern Portugal. Risk factors for kidney disease were also assessed. We have ascertained all cases of nephropathy in kindreds with at least one subject with ESRD and studied its epidemiological distribution. We then studied familial aggregation of nephropathy and tried to characterize any phenotypic differences that might be associated to progressive renal disease.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Ascertainment of patients and kindreds

In 1989, a nephrology outpatient clinic started at CEP. Since then, all alive patients and asymptomatic gene carriers from the three main districts of FAP, Póvoa de Varzim/Vila do Conde, Barcelos

and Braga, were asked to enter this study. This was also conveyed to the general practitioners of those districts. Nephrologists from other hospitals were asked to refer us FAP patients with ESRD.

Definitions

The origin of the kindred was defined as the place of birth of the earliest person known as affected with FAP (either observed or described by history), or clearly identified as a mutant gene carrier. When the disease was not known in previous generations, origin was considered to be the place of birth of the first patient, or of his/her parents if both had born at the same place.

Onset of FAP was assigned if one these criteria was present (a) symptoms of sensory or autonomic neuropathy, (b) an abnormal neurological examination, including a carpal tunnel syndrome, (c) typical electrocardiographic disturbances, (d) a weight loss greater than 10% without concurrent causes, (e) clinical nephropathy, or (f) vitreous opacities. Only subjects who were already affected were included in this study.

Study of frequency of nephropathy

The prospective survey was conducted between 1990 and 2000, by the same nephrology team (L.L., I.B. or M.S.) in patients whose origin was in those three districts, whatever their residence. These patients' kindreds were reviewed in order to scrutinize the number of subjects in whom biochemical evaluation of renal function and proteinuria was done before our study and to assess previous family history of nephropathy.

All patients received regular clinical examination and biochemical analysis, at least every 6 months, after informed consent. Whenever a new patient was registered, information was added to our initial pedigree sample.

We included data in our nephropathy registry when at least one evaluation of serum creatinine, or urea and urine analysis, were available

(‘informative patient’), after having excluded acute renal failure or urinary tract infections. An ‘informative kindred’ was the one with at least one informative patient; and a ‘nephropathic kindred’ was defined as one with renal disease due to FAP in one at least of its members.

Study of ESRD kindreds

End-stage renal disease was defined as the late stage of chronic renal failure, representing the death of the patient if a renal replacement therapy (dialysis or renal transplantation) was not been initiated. FAP patients with chronic renal failure, whatever their origin or residence, were followed at CEP since 1989. Patients from districts other than the three main areas, who developed ESRD, as well their FAP affected relatives, were also enrolled in the study until 2000. Thus, a separate registry was built with all kindreds ascertained with ESRD.

Familial aggregation of nephropathy

An ‘ESRD kindred’ was then defined as one where at least one patient developed that form of renal disease. We considered ‘ESRD proband’ the first patient in the kindred known to have progressed to ESRD. Pedigree analysis included the number of first, second and third-degree relatives of ‘ESRD probands’ and their disease status (affected, asymptomatic carrier, and still at risk). In the ‘ESRD kindreds’ we classified the clinical renal syndromes present in relatives, by the end of the study. For each affected relative, we registered date of birth, age at onset, mode of presentation, periodic analytic evaluations, age and causes of death, and excluded family history of renal disease due to other causes.

‘Early-onset’ was defined as presentation of FAP before age 30 years; ‘late-onset’ was that after age 50. ‘Anticipation in age-at-onset’ was defined as the onset of FAP at least 10 years earlier than in the affected parent. ‘Anticipation in age-

at-death' was defined as death occurring at least 10 years earlier than in the transmitting parent (after having excluded competitive causes of death). Complementary pairs for anticipation (of age-at-onset or age-at death) were defined as those having onset, or death, at least 10 years later in the patient than in his/her affected parent.

Methods

Renal evaluation and genetic analysis

The analytical evaluation consisted of regular measurements of serum creatinine, urea and hemoglobin; urinary sediment, dipstick urine test and culture; and 24-hours urine collection with microalbuminuria and proteinuria determination. If bacteriuria was present, urine analysis was repeated after it becoming sterile. Kidney ultrasound was performed when renal function or urine analysis were abnormal, to exclude cortical scarring or obstructive uropathy. In the presence of a neurogenic bladder, with incomplete emptying and hydronephrosis, intermittent or definitive bladder catheterisation was started and then evaluation repeated.

Microalbuminuria was defined as urinary albumin excretion between 20 and 200 mg/min, in a 24-hours urine collection (in two different samples, with a one-week interval); we defined proteinuria as urinary protein ≥ 0.3 g/l and < 3 g/l, by the dipstick test; massive proteinuria was considered if ≥ 3 g/l in the dipstick, or ≥ 3 g/day in 24-hours urine. Renal insufficiency was diagnosed when serum creatinine was > 1.2 mg/dl or serum urea > 50 mg/dl. We classified as clinical nephropathy any situation when proteinuria (or massive proteinuria) and/or renal insufficiency were present.

Renal biopsies were performed in 25 patients with clinical nephropathy belonging to 'ESRD kindreds'. Each renal biopsy was fixed in formol for Congo red staining, and frozen for indirect immunoperoxidase technique with anti-TTR mon-

oclonal antibody as described previously (Lobato et al., 1998).

Between 1984 and 1994, mutant TTR in the serum was the only test used to confirm FAP. After 1994, all patients had analysis of their DNA isolated from peripheral blood lymphocytes, using the polymerase chain reaction. All ESRD patients had DNA analysis except three, but in these a first-degree relative was studied. In any case, all families had at least one patient studied by DNA analysis.

Statistical analysis

Comparison between groups with nephropathy or ESRD, and without nephropathy, was performed with the chi-square statistic, in the case of categorical variables, and the Student t-test in the case of continuous variables. A binary logistic regression was performed in the patients belonging to the three districts of study to assess the predictive value of factors such as age of onset of clinical disease, gender, district of origin and previous familial history of renal disease in predicting the risk of developing nephropathy and ESRD. Descriptive statistics are shown as the mean $\pm$ one standard deviation (s.d.). All significance tests were performed using two-tailed analyses; p values of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Clinical epidemiology

Frequency of nephropathy and end-stage renal disease (ESRD)

One hundred and fifty informative kindreds with 403 patients were ascertained in the three districts. Frequency of nephropathy, ESRD, and its gender distribution is detailed in table I. About one in every three patients with FAP had proteinuria, or chronic renal insufficiency. Renal func-

tion progressed to ESRD in 11.6% of patients of the districts. The district with the lowest proportion of nephropathy and ESRD was Póvoa de Varzim /Vila do Conde, the area where FAP was first described, and the one with the greatest prevalence. The highest frequency of ESRD was found in Braga, where 18.1% of all patients needed renal replacement therapy.

Among the 147 patients with nephropathy nephrotic range proteinuria, associated or not to chronic renal failure, was found in 62 patients (42%), proteinuria between 1 and 3 g/day in 53 (36%) and between 0.3 and 1 g/day in 25 (17%); 7 patients (5%) presented proteinuria lower than 0.3 g/day and were classified with nephropathy because it was present renal insufficiency. Patients with nephrotic range proteinuria had a higher risk of developing ESRD than those with proteinuria between 0.3 and 3 g/day (29/62 versus 17/78 patients; OR=3.15).

Risk factors for nephropathy

Results of logistic regression with four risk factors (gender, age-at-onset, district of origin and previous family history of nephropathy) revealed that, when adjusted for the other risk factors included in the study:

- women patients have a higher risk of developing nephropathy (OR=1.96) than male patients
- no significant differences were found between the first two onset-groups (onset below 30 years or between 30 and 39 years), but patients with onset between 40 and 49 or after 50 yrs of age have a much higher risk of developing nephropathy (OR=3.66 and 3.43, respectively) when compared to patients with onset below 30 yrs
- previous family history of nephropathy was a risk factor (OR= 2.3)
- no significant differences were found according to district of origin

Nephropathy in homozygous and compound heterozygotes

Among the studied subjects there was one homozygous male, and two compound heterozygotes females (Val30Met/Thr119Met). In homozygous the age at onset of neuropathy was 24 years, well within the general distribution of onset; proteinuria appeared during the third year of evolution, and sudden death (syncope) occurred 5 years after onset, which is not at all an unusual history. No other family members presented nephropathy. Neither of two compound heterozygotes showed any signs of FAP including nephropathy, at age 49 and 40 years, although belonging to kindreds with renal disease, which may be explained by the protective effect of the second mutation on the TTR gene (Alves et al., 1996).

Onset and clinical manifestations in ESRD kindreds

We registered a total of 60 kindreds with ESRD (33 from the three main districts, and 27 with other origin). A total of 276 patients (140 males, 136 females) were re-evaluated. Frequency of nephropathy and ESRD in those kindreds is shown in table II.

Age at onset of FAP, in patients with ESRD, was significantly later than in patients who did not progress to ESRD (41.7 ± 12.9 years versus 33.7 ± 9.7 years; $p < 10^{-4}$). Onset in all patients from Braga (the district with higher frequency of renal disease) was significantly later when compared to patients from Póvoa/ Vila do Conde, Barcelos and other districts, whatever their renal function (37.9 ± 12 years, versus 32.0 ± 8.0 ; $p < 10^{-4}$).

Early-onset was documented in 20 (25%) ESRD patients, versus 50 (46%) patients with normal renal features ($p < 10^{-4}$); late-onset was found in 24 (30%) ESRD patients, versus 7 (8%) with normal renal features ($p = 0.0014$).

First manifestations of FAP in ESRD patients and in patients without renal features are com-

pared in table III. Symptomatic bradycardia (atrioventricular block or sinus node dysfunction) was the only initial manifestation, exclusively encountered in patients who later progressed to ESRD (3 males, 2 females).

In ESRD kindreds, nephropathy was the first manifestation of FAP in 17 patients (8 males, 9 females), either simultaneous with sensory neuropathy in 10, or isolated in 7. Evolution towards ESRD happened in 10 (59%) of these patients (4 males, 6 females).

Renal manifestations in ESRD kindreds

Outcome of renal involvement in patients from ESRD kindreds is detailed in table IV. By the end of follow-up, only one third of the patients still showed complete absence of renal manifestations. Renal function impairment, of varying severity, was observed in 42%.

The interval between detection of nephropathy and ESRD was, on average, 3.2 ± 2.2 years.

Subjects who later progressed towards ESRD had, at diagnosis of nephropathy, chronic renal failure associated to massive proteinuria (25 patients, 31%) or to proteinuria (21 patients, 26%) as the most prevalent clinical presentation; impaired renal function without proteinuria was observed in 4 (5%), massive proteinuria in 9 (11%), and isolated proteinuria in 14 (17%); 8 patients were referred in ESRD and emergent dialysis was implemented.

Histopathological evaluation of 25 patients with clinical nephropathy showed TTR-associated amyloidosis in kidneys of all patients, and absence of any other lesions that could have caused nephropathy.

Chronology of renal manifestations compared to neuropathy

In patients in whom we could document onset of nephropathy, renal features began, on average, 3.9 years (range: 1-10) after the onset of neuropathy.

The most precocious form of nephropathy (i.e, the first occurring after neuropathy) was massive proteinuria, which was detected, on average, 2.8 ± 2.7 years after the onset of neuropathy. Chronic renal failure established, on average, 6.5 ± 3.6 years after neuropathy, if renal impairment was associated to massive proteinuria, and after 8.5 ± 4.6 years if only a moderate proteinuria was present. The latest form was chronic renal failure without proteinuria, which established, on average, after 9.7 ± 3.7 years of evolution of neuropathy.

In patients who progressed towards ESRD the time between the first symptoms of neuropathy and detection of nephropathy was, on average, 7.2 ± 4.1 years. The first evaluation of renal function and proteinuria was done in 49/81 (60%) of ESRD patients after the fifth year of neuropathy. The period between onset of neuropathy and ESRD was, on average, 9.7 ± 4.2 years; it was significantly shorter in patients with origin in the Braga district when compared with the other areas (7.1 ± 3.6 years versus 10.3 ± 4.1 years; $p < 10^{-4}$).

Genetic epidemiology in end-stage renal disease kindreds

Nephropathy in affected relatives

Clinical nephropathy was present in 70/152 relatives of ESRD probands, versus 46/182 relatives from kindreds without ESRD cases indicating a nearly twofold risk (RR: 1.8; 95% CI [1.3, 2.5]) of developing nephropathy in families where the proband was an ESRD patient, versus families where the proband was not an ESRD patient.

We then studied renal manifestations in affected parents, sibs and other relatives of ESRD probands (table V). Frequency of clinical nephropathy (with or without ESRD) in affected parents, sibs and other relatives of ESRD probands is shown in table V. The percentage of overt renal disease was 49,4%, 37,9% and 46% respectively in first and second-degree relatives, and first cousins of an ESRD probands.

Analytical evaluation of affected parents was available only in 11 cases: 8 (4 fathers, 4 mothers) had nephropathy. In 6 additional cases, ESRD probands described anasarca and information of renal failure in their affected parents. Only 10 ESRD probands had already offspring affected with FAP (11 sons, 6 daughters), only 3 of which already had developed clinical nephropathy. We found a mother-daughter pair both in dialysis, and a father-son pair one in dialysis and other with advanced chronic renal failure.

Thirty-three ESRD probands had affected sibs (23 brothers, 32 sisters) available for study: 30 (11 brothers, 19 sisters) had clinical nephropathy. When compared to all other relatives taken together sibs had a significantly higher proportion of ESRD (11/55 versus 10/161; OR 3.8).

Gender and penetrance of neuropathy in transmitting parents

A family history of FAP was present in 91% of patients with ESRD when the family origin was in one of the three study districts, but only in 63% in other districts. Sibships with ESRD patients inherited the disease from their fathers in 21 cases, and from their mothers in 26 cases; in 13 sibships, the transmitting parent could not be determined, as both parents had died without having expressed FAP and no further family information was available.

Old asymptomatic parents, who carried a TTR Val30Met mutation or were obligate carriers by history, transmitted FAP to 13 ESRD probands, but only to 6 patients without renal disease ($p = 0.006$). In another 9 ESRD probands there was absence of family history and both parents died old.

If the transmitting parent was already affected, FAP would manifest in their offspring with ESRD, on average, at age 36.0 ± 8.4 years; however, if he/she was a proven carrier, but still asymptomatic at high age, FAP manifested much later in their offspring with ESRD (at age 54.7 ± 9.2 years, on average).

Age at onset of FAP (known in 23 parents of ESRD patients) was significantly later (50.5 ± 19.0 years for affected mothers and 36.5 ± 12.6 for affected fathers) than age-at-onset for FAP in Portugal (35.6 ± 9.0 and 31.9 ± 9.6 years, respectively; $p < 10^{-4}$ (source Sousa, 1995). Mean age at death of the transmitting (affected or asymptomatic) parent was 57.7, for mothers, and 50.8 years, for fathers; when the transmitting parent was unknown, age at death was registered in both parents: 71.6 ± 13.6 for mothers and 71.0 ± 12.3 for fathers.

Anticipation of age of onset in ESRD probands, seen in 7/19 (37%) pairs, was 24.1 ± 10.2 years, on average. Anticipation in age at death, recorded in 14/35 (40%) pairs, was 19.6 ± 7.0 years, on average. Neither the anticipating pairs had origin in Póvoa; on the other hand, complementary pairs for age of onset (2/19, 10.5%), or for age at death (5/35, 14.2%), had all origin in Póvoa.

Familial aggregation of nephropathy and ESRD, old asymptomatic carriers and anticipation were illustrated in the pedigree represented on figure 1.

DISCUSSION

This work represents a study for renal disease in a sample of patients observed at different stages of hereditary amyloidosis, all with the Val30Met mutation in the transthyretin gene. Only a small percentage of patients who were alive could not be examined, thus minimizing biases of reference.

During the past decade, nephropathy was first related to heavy glomerular and vascular amyloid deposits (Lobato et al., 1998). We have now shown that nephropathy in FAP is much more common than previously accepted, involving as much as 36% of the patients coming from the three main districts of the disease. In all familial polyneuropathies with TTR-derived amyloidosis,

renal involvement was described in 16% of the series from the Mayo Clinic, but several different mutations were included (Gertz et al., 1992). In other large foci of FAP TTR V30M, Japan and northern Sweden (Tawara et al., 1983; Holmgren et al., 1988; Benson, 2000), frequency of nephropathy and ESRD has not yet been clarified. A study of 36 Japanese patients, reported a visceral type of involvement, but did not distinguish electrocardiogram anomalies from proteinuria or renal failure (Tashima et al., 1997). One study from Sweden (Steen et al., 1982) comprised 24 patients with much later onset (mean age 58 years): 54% presented proteinuria and 60% showed decreased ⁵¹Cr-EDTA clearance, but follow-up and course to ESRD was not mentioned.

In our large series, nephropathy was not a late event, once massive proteinuria was present usually 3 years after the onset of neuropathy. Progression to ESRD affected one third of all nephropathic patients.

A consistent finding was the association between later age-at-onset and worse prognosis for nephropathy, as revealed by the logistic regression: patients with onset at or after 40 yrs have a higher risk of developing nephropathy, especially women. The majority of patients progressing to ESRD already had, at the time of their diagnosis, renal insufficiency, proteinuria, and more than 5 years of neuropathy. Later onset, absence of family history, and the slowly progressive character of neuropathy did not allow an earlier diagnosis. Renal disease was usually overlooked as a possible manifestation of FAP, contributing to delayed detection of nephropathy. Thus, the scarcity of peripheral sensory symptoms and the lack of family history, in the presence of renal disease, should not exclude FAP in the differential diagnosis, even in older patients. Complementary pairs (negative anticipation) were documented only in the area with earlier onset of FAP, again associating nephropathy with later nerve involvement. Late-

onset cardiac amyloidosis associated to other TTR variants was also present in patients without family history of amyloidosis (Jacobson et al., 1999), like these cases of nephropathy related to TTR V30M. The renal lesions of amyloidosis are due to deposits, but accumulation of extracellular matrix components, more common in older subjects, may have important contribution to mesangial expansion, interstitial expansion and glomerulosclerosis. Accumulation of advanced glycation end products (AGEs) with age may enhance the formation and stability of amyloid fibrils, like in Alzheimer disease (Vitek et al., 1994).

Although the proportion male-female in FAP is 1.3:1 (Sousa, 1995), we found 1:1.3 when nephropathy was present. This finding may be explained by hormonal effects on amyloid formation, like oophorectomy promotes islet amyloid formation in transgenic mouse model for type II diabetes (Kahan SE, et al, 2000).

There was a clear predisposition to develop nephropathy and ESRD in relatives of ESRD probands, particularly in their sibs, a situation similar to diabetes mellitus (Borch-Johnsen et al., 1992), where a higher prevalence of overt nephropathy was found in siblings of ESRD probands with diabetic renal disease, when compared in siblings of normoalbuminuric probands. We hypothesized that genetic factors associated to variations in age of onset may have a role in renal tissue damage. Environmental factors seemed not important in our study because what distinguish the differences in the areas was the age of onset.

Development of TTR amyloidosis and of its full clinical picture may implicate factors other than a single aminoacid substitution (Sequeiros and Saraiva, 1987; Sousa et al., 1991). The Val30Met mutation was found in Japan in association with three different haplotypes; one of these is found in all Portuguese and Swedish Val30Met patients (Yoshioka et al., 1980). Studies of the TTR gene expression and of protein structure in

late and early-onset FAP Val30Met have not evidenced differences associated to specific haplotypes (Saraiva et al., 1986). A previous study of anticipation in FAP Val30Met (Soares et al., 1999) considered that an unstable trinucleotide repeat was rather unlikely as a modifying gene. As shown in results of anticipation we found late-onset nephropathic probands who had early or late-onset offspring (with or without nephropathy), but no early-onset nephropathic probands with late-onset nephropathic offspring.

Renal disease affects both sexes, and father-son pairs both with ESRD were documented. Sex-linked modifiers are probably not involved. There was no gender difference among the parents of nephropathic probands; genomic imprinting, or other parent of origin effect, probably do not have a role in the manifestation of nephropathy among FAP patients.

It has been suggested that in the TTR Val30Met protein, a Cys at position 10 is more exposed and therefore more prone to undergo thiol conjugation (Kelly and Lansbury, 1994). Differences in Cys conjugation of TTR were found to be independent of geographic origin, age and presence of symptomatic amyloid disease (Suhr et al. 1999). Conjugated TTR Val30Met was higher in patients with younger age at onset and lower in asymptomatic carriers. This post-translational change of TTR may implicate higher nerve toxicity or increased susceptibility to amyloid formation. On the other hand, the mesangium or the basement glomerular membrane could be more prone than nerve to lesion by the unconjugated TTR variant, thus explaining the later onset of nephropathy and some protection to renal disease in the district of Póvoa/Vila do Conde, where onset is usually earlier. This hypothesis, however, does not explain the familial clustering of renal disease.

Familial aggregation of renal disease suggests the influence of additional genetic factors, either alone or combined with some environmental fac-

tors. The higher proportion of families seen in Braga cannot be dissociated from the fact this is the district with later age-at-onset of FAP. A genetic model for nephropathy should also explain its severity manifesting as ESRD. A multifactorial model is probably more adequate to explain the expression of renal disease in FAP-I.

Candidates for modifier genes of renal disease in FAP could be those encoding for basement membranes proteins, such as heparan sulphate proteoglycans (HSPs), type IV collagen, laminin and entactin, proteins present in the glomeruli. It has been suggested that abnormal synthesis of basement membrane may contribute to amyloidogenesis (Wooddrow et al., 1999). HSPs were postulated to be important molecules for the development of amyloidosis in Alzheimer disease (A β) and in amyloidosis in general (Snow and Castillo, 1997). Laminin is synthesized by normal mesangial cells and its affinity for apoSAA, A β and β -2-microglobulin has been documented, supporting the idea that it may be implicated in the genesis of other amyloidoses (Ancsin and Kisilevsky, 1999). Laminin-binding activity is increased in the presence of ZnCl₂, possibly mediated by zinc-finger-like domains (Ancsin and Kisilevsky, 1996); it may act as an enhancer of amyloidosis or as a potent inhibitor (Castillo et al., 2001). As in AA amyloid, laminin could contribute to amyloidosis, by sequestering TTR and providing a surface on which perlecan can initiate fibrillogenic nucleation (Bronfman et al., 1998). A polymorphism in laminin, or in other matrix-molecules genes, could contribute to these phenotypic differences.

Distinct patterns of proteoglycans expression may be related to modulation of specific growth factor activity (Stokes et al., 2000). Transforming growth factor beta (TGF- β) regulates important matrix-associated genes (Okuda et al., 1990). TGF- β activity can stimulate secretion of extracellular matrix proteins, inhibits mesangial cell growth and promote glomerulosclerosis, impor-

tant issues in progression to ESRD (Zhu et al., 1995). TGF- β (TGF- β isoforms) gene mutations could have a pathogenetic role in development and progression of TTR nephropathy.

In transgenic mice carrying the Val30Met mutation for human TTR, fibrillar amyloid deposits were found in different tissues including the kidney, but not in peripheral nervous system (Yi, 1991). Experiences with transgenic mice encoding both wild-type and TTR Leu55Pro (an highly amyloidogenic allele) demonstrated that the protein does not deposit in these animals, unless the gene is highly over-expressed and large amounts of the amyloidogenic protein are in the circulation; peripheral nerve deposition of amyloid fibrils has not been identified, but occurrence of renal disease is uniform (Buxbaum, 2001). Since resistance to fibril formation is not homogeneous, susceptibility to renal deposition probably has subjacent physiologic mechanisms that have not been clarified until now.

In conclusion, this study suggests that severity of nephropathy is related to familial factors, and that genetic modifiers encompassing an increased susceptibility to kidney amyloidosis, sclerosis and altered function, may play a role.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants No. 42/95 and 257/97 from Comissão de Fomento da Investigação em Saúde, Portuguese Ministry of Health. We thank Professor Denisa Mendonça from ICBAS for help in regression analysis. The excellent help with patients and families of Mrs. Helena Pereira, Mrs. Isabel Friães and Mrs. Laurinda Teixeira, from CEP, is gratefully acknowledged. We also thank Mr. Domingos Rodrigues from the archives of Hospital de Geral de Santo António for his support in the study.

REFERENCES

- Alexander F, Atkins EL. 1975. Familial renal amyloidosis: Case reports, literature review and classification. *Am J Med* 59:121-28.
- Alves IL, Jacobson DR, Torres MF, Coelho T, Holmgren G, Saraiva MJM. 1996. Compound heterozygosity in patients with TTR-related amyloidosis. *Neurom Disorders* 8:S19.
- Ancsin J B, Kisilevsky R. 1996. Laminin interactions important for basement membrane assembly are promoted by zinc and implicate laminin zinc finger-like sequences. *J Biol Chem* 27:6845-6851.
- Ancsin J B, Kisilevsky R. 1999. Laminin interactions with the apoproteins of acute-phase HDL: preliminary mapping of the laminin binding site on serum amyloid A. *Amyloid* 6:37-47.
- Andrade C. 1952. A peculiar form of peripheral neuropathy: familial atypical generalized amyloidosis with specific involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75:408-427.
- Benson MD. 2000. Polyneuropathie amyloïde familiale. In: Grateau G, Benson MD, Delpech M, editors. *Les Amyloses*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, p 445-456.
- Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen ER, Jensen JS, Deckert T. 1992. Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney Int* 41:719-722.
- Bronfman F C, Alvarez A, Morgan C, Inestrosa NC. 1998. Laminin blocks the assembly of wild type A β and the Dutch variant peptides into Alzheimer's fibrils. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 5:16-23.
- Buxbaum J. 2001. The transthyretin amyloidoses. Abstracts book of IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest, p 122-123.
- Castillo G M, Choi P Y, Cummings J A, Snow A D. 2001. Sulfated glycosaminoglycans and matrix molecules in the pathogenesis and treatment of amyloidosis in Alzheimer's disease. Abstracts book of IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest, p 172.
- Coelho T, Sousa A, Lourenço E, Ramalheira J. 1994. A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *J Med Gen* 31:293-299.
- Gertz M A, Kyle R A, Thibodeau S N. 1992. Familial amyloidosis: a study of 52 North American-born patients examined during a 30-year period. *Mayo Clin Proc* 67:428-440.
- Gertz M A, Kyle R A, O'Fallon W M. 1992. Dialysis support of patients with primary systemic amyloidosis. A study of 211 patients. *Arch Intern Med* 152:2245-2250.

- Holmgren G, Holmberg E, Lindström A, Nordenson I, Sandgren O, Steen L, Svensson B, Lungren E, Von Gabain A. 1988. Diagnosis of familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden by RFLP analysis. *Clin Genet* 33:176-180.
- Jacobson D R, Kane I, Gertz M A, Gallo G, Pan T, Tufau P, Buxbaum J N. 1998. Transthyretin variants in late-onset cardiac amyloidosis: distinguishing familial amyloid cardiomyopathy from senile amyloidosis. In: Kyle R A, Gertz M A, editors. *Amyloid and Amyloidosis*. New York: The Parthenon Publishing Group, p 344-346.
- Kahan SE, Andrikopoulos S, Verchere CB, Wang F, Hull RL, Vidal J. 2000. Oophorectomy promotes islet amyloid formation in a transgenic mouse model of Type II diabetes. *Diabetologia* 43:1309-1312.
- Kelly J, Lansbury P. 1994. A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and β -protein amyloid fibril formation. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1:186-205.
- Lobato L, Beirão B, Guimarães SM, Droz D, Guimarães S, Grünfeld JP, Noël LH. 1998. Familial amyloid polyneuropathy type I (Portuguese): distribution and characterization of renal amyloid deposits. *Am J Kidney Dis* 6:940-946.
- Nelson S R, Pras M. 1998. The amyloidosis and familial Mediterranean fever. In: Morgan S H, Grünfeld JP, editors. *Inherited disorders of the kidney*. London: Oxford University Press, p 412-426.
- Okuda S, Languino L R, Ruoslahti E, Border W. 1990. Elevated expression of transforming growth factor- β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis: possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 86:453-462.
- Saraiva MJM, Costa P P, Goodman D S. 1986. Genetic expression of a transthyretin mutation in typical and late-onset families. *Neurology* 1986 36:1413-1417.
- Sequeiros J, Saraiva MJM. 1987. Onset in the seventh decade and lack of symptoms in heterozygotes for the TTR Met30 mutation in hereditary amyloid neuropathy type I (Portuguese, Andrade) *Am J Med Genet* 27:345-347.
- Snow A D, Castillo G M. 1997. Specific proteoglycans as potential causative agents and relevant targets for therapeutic intervention in Alzheimer's disease and other amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 6:135-141.
- Soares M, Buxbaum J, Sirugo G, Coelho T, Sousa A, Kastner D, Saraiva MJ. 1999. Genetic anticipation in Portuguese kindreds with familial amyloidotic polyneuropathy is unlikely to be caused by triplet repeat expansions. *Hum Gen* 104: 480-485.
- Sousa A, Coelho T, Lobato L, Sequeiros J. 1991. Parenteral transmission and anticipation of age of onset in FAP-I. *Am J Hum Genet* 49:Suppl A2757.
- Sousa A. 1995. A variabilidade fenotípica da polineuropatia amiloidótica familiar: um estudo de genética quantitativa em Portugal e na Suécia. PhD thesis, Universidade do Porto, Porto.
- Sousa A, Coelho T, Barros J, Sequeiros J. 1995. Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) – Type I in Póvoa do Varzim and Vila do Conde (North of Portugal). *Am J Med Gen* 60:512-521.
- Steen L, Wahlin A, Bjerle P, Holm S. 1982. Renal function in familial amyloidosis with polyneuropathy. *Acta Med Scand* 212:233-236.
- Stokes M B, Holler S, Cui Y, Hudkins K L, Eitner F, Fogo A, Alpers C. 2000. Expression of decorin, biglycan and collagen type I in human renal fibrosing disease. *Kidney Int* 57:487-498.
- Suhr O, Svendsen I H, Ohlsson PI, Lendoire J, Trigo P, Tashima K, Ramløv, Ando Y. 1999. Impact of age and amyloidosis on thiol conjugation of transthyretin in hereditary transthyretin amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 6:187-191.
- Tashima K, Ando Y, Ando E, Tanaka Y, Ando M, Uchino M. 1997. Heterogeneity of clinical symptoms in patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP TTR Met30). *Amyloid* 4:108-111.
- Tawara S, Nakazato M, Kangawa K, Matsuo H, Araki S. 1983. Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* 116:880-888.
- Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. 1994. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4766-4770.
- Wooddrow S I, Stewart R J, Kisilevsky R, Gore J, Young I D. 1999. Experimental AA amyloidosis is associated with differential expression of extracellular matrix genes. *Amyloid* 6:22-30.
- Yi S, Takashashi K, Naito M, Tashiro F, Wakasugi S, Maeda S, Shimada K, Yamamura K, Araki S. 1991. Systemic amyloidosis in transgenic mice carrying the human mutant transthyretin (Met30) gene. Pathologic similarity to human familial amyloidotic polyneuropathy, type I. *Am J Pathol* 138:403-412.
- Yoshioka K, Furuya H, Sasaki H, Saraiva MJM, Costa PP, Sasaki Y. 1980. Haplotype analysis of familial amyloidotic polyneuropathy. *Hum Genet* 82:9-13.
- Zhu L, Herrera G A, Murphy-Ullrich J E, Huang Z, Sanders P W. 1995. Pathogenesis of glomerulosclerosis in light chain deposition disease – role for transforming growth factor- β . *Am J Pathol* 147:375-385.

Nephropathy in transthyretin amyloidosis

Table I.

Clinical nephropathy by district and gender

Districts	Number of informative kindreds	No. of kindreds with nephropathy (%)	No. of patients studied M/F	No. of patients with nephropathy M/F	No of patients with ESRD (M/F)	Proportion FAP with nephropathy :FAP	Proportion ESRD:FAP with nephropathy
Braga	24	17 (71)	48/40	20/17	7/9	1:2.4	1:2.3
Barcelos	42	21 (50)	54/56	15/27	6/8	1:2.6	1:3
Póvoa/ V.Conde	84	44 (53)	95/110	18/50	2/15	1:3.0	1:4
Total	150	82 (55)	197/206	53/94	15/32	1:2.7	1:3.1

ESRD: end-stage renal disease; M: males; F: females; FAP:familial amyloid polyneuropathy

Table II.

Frequency of clinical nephropathy in kindreds with end-stage renal disease (ESRD) patients.

Districts	No. of kindreds with ESRD	No. of informative patients M/F	No. of informative patients with nephropathy M/F	No of patients with ESRD M/F	Proportion patients: patients with nephropathy
Braga	10	28/28	16/14	7/9	1:1.9
Barcelos	8	32/26	18/18	6/8	1:1.6
Póvoa/ V. Conde	15	32/39	11/26	2/15	1:1.9
Other districts	27	48/43	23/32	16/18	1:1.6
Totals	60	140/136	68/90	31/50	1:1.7

ESRD: end-stage renal disease; M: males; F: females

Table III.

**Presenting features in end-stage renal disease (ESRD) patients
and in subjects without nephropathy**

	ESRD Total 81 patients No. of patients (%)	No nephropathy Total 92 patients No. of patients (%)	
Isolated sensory neuropathy	17 (21%)	38 (41%)	p = 0.005
Sensory neuropathy and other features	44 (54%)	34 (37%)	p = 0.02
Motor neuropathy	3 (4%)	1 (1.1%)	NS
Weight loss	26 (32%)	21 (23%)	NS
Constipation/ diarrhea	30 (37%)	22 (24%)	NS
Nausea vomiting	2 (3%)	13 (14%)	p = 0.007
Neurogenic bladder	9 (11%)	3 (3%)	NS
Symptomatic bradycardia	5 (6%)	0 (0%)	^a
Nephropathy	10 (12%)	0 (0%)	-
Vitreous opacities	1 (1%)	0 (0%)	-

^aall patients with symptomatic bradycardia at presentation developed end-stage renal disease (ESRD)

Table IV.

**Outcome of renal involvement in patients from end-stage
renal disease (ESRD) kindreds**

Outcome	No. of patients M/F Total 142 M/ 134 F	% (n=276)
Normal renal function and absence of proteinuria	52/40	33.3
Microalbuminuria	18/8	9.4
Proteinuria	18/18	13
Massive proteinuria	2/4	2
RF	3/3	2
RF and proteinuria	11/7	7
RF and massive proteinuria	7/4	4
ESRD	31/50	29.3

M: males; F: females; RF: renal failure without end-stage; ESRD: end-stage renal disease.

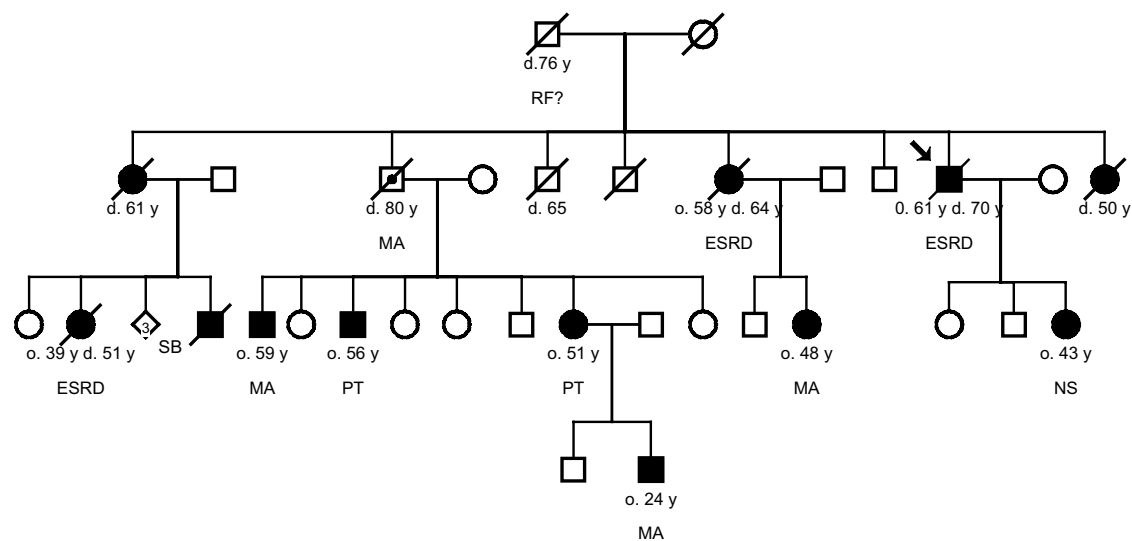
Table V.

**Nephropathy in FAP-affected relatives of patients with FAP
and end-stage renal disease (ESRD).**

Kinship	No. of patients studied	Normoalbuminuria No. (%)	Microalbuminuria No. (%)	Clinical nephropathy without ESRD No. (%)	ESRD No. (%)
First-degree relatives	83	34 (41.0%)	8 (9.6%)	28 (33.7%)	13 (15.7%)
Parents	11	3 (27.3%)	-	7 (63.7%)	1 (9.0%)
Sibs	55	19 (34.5%)	6 (11.0%)	19 (34.5%)	11 (20.0%)
Offspring	17	12 (70.5%)	2 (12.0%)	2 (11.7%)	1 (5.8%)
Second-degree relatives	29	13 (44.8%)	5 (17.4%)	10 (34.4%)	1 (3.4%)
Uncle, aunt	4	1 (25.0%)	-	3 (75.0%)	-
Nephew, niece	24	11 (45.8%)	5 (20.8%)	7 (29.2%)	1 (4.2%)
Grandchildren	1	1	-	-	-
First- cousins	50	22 (44.0%)	5 (10.0%)	17 (34.0%)	6 (12.0%)
Other relatives	54	23 (42.6%)	8 (14.8%)	22 (40.7%)	1 (1.9%)
Total	216	92 (42.6%)	26 (12.0%)	77 (35.7%)	21 (9.7%)

ESRD: end-stage renal disease.

Figure 1.

Kindred with hereditary amyloid polyneuropathy TTR Val30Met.

Renal disease was present in several relatives, and anticipation of age-at-onset is seen in two consecutive generations. The ESRD proband, his sister and a niece had end-stage renal disease (ESRD); the ESRD proband described renal failure (RF) in his father; the presentation of FAP in the daughter of the ESRD proband included nephrotic syndrome (NS), and proteinuria (PT) in two other relatives. Microalbuminuria (MA) was detected in two symptomatic members, and in one old asymptomatic gene carrier (heterozygote); o.: age-at-onset of FAP; d.: age-at-death.

IV - DETECÇÃO PRECOCE DA NEFROPATIA

A relação causa-efeito entre a deposição de amilóide e a disfunção do órgão tem sido assumida na amiloidose renal, particularmente quando há envolvimento glomerular e vascular. A interacção das fibrilas com os receptores dos produtos de glicolização avançada (RAGE) parece concorrer para o *stress* celular e para a toxicidade da TTR [1]. Na diabetes *mellitus* a acumulação de produtos finais de glicosilação avançada (AGE) contribui para o desenvolvimento de complicações, nomeadamente a nefropatia diabética [2]. A nível patológico, tanto na diabetes *mellitus* como na amiloidose podemos encontrar alterações estruturais na membrana basal glomerular e expansão mesangial [3]. Assim, em alguns aspectos, parece existir alguma afinidade entre as lesões de diabetes e as da amiloidose.

Em exames analíticos correntes (*dipstick test*) a detecção de proteinúria só é possível a partir de 300 a 500 mg/dia. Uma técnica mais sensível consiste no uso de um teste específico para a excreção de albumina. A albuminúria patológica designa-se por microalbuminúria, correspondendo a valores de excreção de albumina entre 20 a 200 µg/min. Na diabetes *mellitus* a microalbuminúria é considerada um marcador precoce de nefropatia, reflectindo as primeiras alterações da permeabilidade da membrana basal glomerular. O diagnóstico de nefropatia baseado na presença de proteinúria reflecte um estado definitivo de lesão (nefropatia declarada).

Neste trabalho investigamos se a microalbuminúria, por analogia com a diabetes, seria um marcador pré-clínico de lesão glomerular na PAF. Procurámos avaliar se a presença de microalbuminúria poderia:

- antecipar o diagnóstico clínico de nefropatia;
- relacionar um marcador analítico de lesão glomerular com os achados histopatológicos;
- contribuir para a definição da história natural da nefropatia;
- ser considerada um marcador analítico renal que se anteciparia aos sintomas neurológicos.

A primeira fase do trabalho foi a revisão dos processos de indivíduos portadores assintomáticos da mutação V30M registados no CEP, com conhecimento do seu estado genético, que pelo menos um vez tivessem vindo a uma consulta na unidade de paramiloidose. Posteriormente, organizámos a observação clínica e exames analíticos regulares destes portadores. Os indivíduos sintomáticos que participaram na avaliação já frequentavam as consultas passando a ser regularmente observados por nefrologistas.

No caso dos doentes tratados por transplante hepático no decurso do estudo, considerámos fim de seguimento a última avaliação antes do transplante. Sempre que possível, realizámos uma biópsia renal antes da transplantação hepática. A metodologia de observação histopatológica foi sobreponível à descrita no segundo capítulo.

1. Sousa MM, Du Yan S, Fernandes R, Guimarães A, Stern D, Saraiva MJ. Familial amyloidotic polyneuropathy: receptor for advanced glycation end-products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *J Neurosci* 2001;21:7576-7586
2. Yang CW, Vlassara H, Peten EP, He CJ, Striker GE, Striker LJ. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9436-9440
3. Ziyadeh FN. Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease. *Miner Electrolyte Metab* 1995;21:292-302

Original Article

Familial ATTR amyloidosis: microalbuminuria as a predictor of symptomatic disease and clinical nephropathy

Luísa Lobato^{1,2,3}, Idalina Beirão^{1,3}, Manuela Silva¹, Fernanda Bravo⁴, Frederico Silvestre⁵, Serafim Guimarães¹, Alda Sousa^{2,3,6}, Laure-Hélène Noël⁷ and Jorge Sequeiros²

¹Department of Nephrology, Hospital Geral de Santo António, Porto, ²Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, ³Centro de Estudos de Paramiloidose, Porto, ⁴Department of Clinical Pathology, Hospital Geral de Santo António, Porto, ⁵Department of Pathology, Hospital Geral de Santo António, Porto, ⁶Department of Population Studies, ICBAS, Universidade do Porto, Portugal and ⁷Service de Nephrologie, Hôpital Necker, Paris, France

Abstract

Background. Portuguese type familial amyloid polyneuropathy (FAP) is a neuropathic amyloidosis caused by a mutant transthyretin (TTR). Varying degrees of renal involvement have been reported. Our aim was to assess the value of microalbuminuria (MA) for predicting clinical neurological disease and overt nephropathy in TTR-related amyloidosis.

Methods. All subjects had the TTR Val30Met mutation, and were recruited between 1993 and 1999. We have prospectively evaluated 22 asymptomatic gene carriers (7 male, 15 female; mean age 41.6 ± 9.6 years) and 32 patients with neuropathy (14 male, 18 female; 36.8 ± 8.8 years, on average, 33.0 ± 9.3 years at the onset of neuropathy). We measured urinary albumin excretion every year, if asymptomatic, or every 6 months if already affected. Kidney biopsies were performed in patients with normal urinary albumin excretion, MA, and overt nephropathy, respectively.

Results. In asymptomatic carriers, persistent MA was detected in eight (36%) subjects. The presence of MA in asymptomatic gene carriers, compared with those having normal urinary albumin excretion, conferred a 4.8-fold risk of developing neuropathy, usually within the subsequent 3 years. Once neurological signs appeared, nephropathy, manifested as MA, progressed to overt nephropathy in one-half of subjects. In patients with neuropathy, 24 (75%) had MA during follow-up: evolution towards clinical renal disease occurred in 14 (58%) and renal failure occurred in five (21%), always after a course of MA. Proteinuria or renal failure without prior persistent MA were never observed in the present patient cohort. Histopathological evaluation did not reveal glomerular lesions

other than amyloid deposits to explain abnormal urinary albumin excretion. The amount of mesangial and vascular-pole amyloid deposits was correlated with the degree of albuminuria.

Conclusions. Microalbuminuria represents the first stage of clinical TTR amyloid nephropathy and is premonitory of neuropathy. Its presence identifies a subgroup of patients who are more prone to develop overt nephropathy. Screening of MA may be important to assess disease onset and to recommend liver transplantation in individuals at risk.

Keywords: amyloidosis; glomerular; kidney; microalbuminuria; proteinuria; transthyretin

Introduction

Familial amyloidoses are genetic disorders often caused by mutations in the transthyretin (TTR) gene [1]. The majority of TTR mutations are associated with amyloid neuropathy, cardiomyopathy, or nephropathy. To date more than 60 TTR amyloidogenic mutations have been found, but TTR Val30Met (familial amyloid polyneuropathy type I, FAP) is by far the most frequent [2]. The TTR Val30Met mutation has a worldwide distribution, and Portugal is the main geographic focus of this disease. Hereditary forms of amyloidosis involving the kidney were also related to mutations of apolipoprotein A-I and A-II [3,4], fibrinogen [5], lysozyme [6], and gelsolin [7] genes. Familial Mediterranean fever (FMF), and Muckle-Wells syndrome are the two hereditary varieties of AA amyloidosis, and in both, proteinuria and renal failure may complicate the clinical course [8,9]. All are inherited in an autosomal dominant mode, except for FMF, which is transmitted as an autosomal recessive

Correspondence and offprint requests to: Luísa Lobato, MD, Centro de Estudos de Paramiloidose, Hospital Geral de Santo António, Rua D. Manuel II, 4050-345 Porto, Portugal. Email: llobato@netcabo.pt

trait. An autosomal dominant periodic fever occasionally associated with AA amyloidosis was also reported in families of European origin, revealing missense mutations in the gene encoding the tumour necrosis factor receptor [10,11].

The pre-clinical stage of amyloid-associated nephropathy can be detected only by histological examination. The number of patients at this stage is unknown, as repeated urinalysis showed no abnormalities in biopsy-proven renal amyloidosis [8,12].

Early detection of organ dysfunction caused by amyloid deposits has particular emphasis in TTR-related amyloidosis (ATTR), as it may determine prognosis and allocation in liver transplant programmes, which is the specific treatment for this disease [13].

FAP usually manifests as a sensorimotor neuropathy with autonomic dysfunction. Life-span of this disease, before liver transplantation was accepted as a treatment, was on average 11 years. Renal features of amyloid glomerular involvement can affect one-third of ATTR Val30Met patients [14]. Nephropathy occurs commonly with progression of the neurological disease, but in some instances may be present from the onset [15].

The aim of this study was to assess the value of microalbuminuria as a predictor of neuropathy and nephropathy in ATTR amyloidosis. In addition, we explored whether different levels of urinary albumin excretion may reflect differences in glomerular amyloid deposition, establishing a correlation of microalbuminuria with pathological findings. We excluded confounding factors in the interpretation of microalbuminuria, such as high blood pressure, diabetes, and obesity.

Subjects and methods

Patients

Asymptomatic gene carriers and patients who had already developed neuropathy, all with TTR Val30Met mutation, were recruited from the registries of Centro de Estudos de Paramiloidose (CEP), during the period 1993–1999, and were prospectively followed.

As mean age-at-onset of neuropathy is 31.9 (17–78) years, in males, and 35.6 (20–74) years, in females [14], we asked for the participation of asymptomatic subjects older than 25 years. All subjects had a preliminary contact in which we explained our objectives, and consented to come regularly for a medical nephrological evaluation.

Exclusion criteria were clinical or laboratory evidence of other disease (including hyperglycaemia, glycosuria, and obesity), and patients receiving angiotensin-converting-enzyme inhibitor and other medication affecting blood pressure. We registered symptoms, age at onset, neurological examination, and electrocardiogram disturbances. Patients were then asked to collect 24-h urine samples and to avoid exercise prior to the test. Urine collection was repeated if bacteriuria or pyuria were present. Twenty-nine asymptomatic and 38 patients with neuropathy participated in this study.

Subjects were re-examined every year, if asymptomatic, or every 6 months if with overt disease. Blood-pressure measurement (in the morning, after rest, in the seated position,

by mercury sphygmomanometer), 24-h urine collection, and blood sample analysis were repeated at each visit. Patients who developed any of the exclusion criteria mentioned above, or had a serum creatinine ≥ 1.3 mg/dl, or serum urea ≥ 50 mg/dl, or proteinuria in the first evaluation, were excluded from follow-up. Kidney ultrasound was performed whenever an abnormal urine analysis was detected, excluding cortical scarring or obstructive uropathy. Our follow-up ended in December 2000 or when the patient underwent orthotopic liver transplantation. If this was the case, kidney biopsies were performed as part of the pre-operative evaluation, after obtaining written informed consent.

Assays

DNA analysis by PCR amplification was used to detect the TTR Val30Met mutation in all subjects. Urinary albumin excretion (UAE) was measured by immunoturbidimetric method (Roche Diagnostics), with a limit of detection of 0.6 mg/dl and an interassay variation of 4.3%. Microalbuminuria (MA) was defined as $\text{UAE} \geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$ and $\leq 200 \mu\text{g}/\text{min}$ in two measurements with a week's interval. Overt nephropathy was defined as $\text{UAE} > 200 \mu\text{g}/\text{min}$.

Serum and urinary creatinine concentrations were measured by standard colorimetric methods. Creatinine clearance was used as an index of glomerular filtration rate. We considered there to be renal failure when the creatinine clearance was $< 80 \text{ ml}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$.

Each renal biopsy was fixed in formol for Congo-red staining, and frozen for indirect immunoperoxidase technique with anti-TTR monoclonal antibody [15,16]. The presence and amount of amyloid, graded on a scale from – (absent) to +++ (more than 50% of the structure involved) was analysed in the glomerular structures by light microscopy, as described previously [15].

Statistical analysis

Comparisons between groups with nephropathy or ESRD and without nephropathy were performed with the chi-square statistic, in the case of categorical variables, and the Student *t*-test in the case of continuous variables; relative risk (RR) to develop neuropathy was expressed with 95% confidence interval (CI). Descriptive statistics were given as average $\pm$ SD; $P < 0.05$ was regarded as statistically significant.

Results

In the first evaluation, we studied 29 asymptomatic gene carriers (9 males/20 females), and 38 patients with neuropathy (16 males/22 females). Overt nephropathy was diagnosed in one asymptomatic subject and three patients. Nine subjects showed exclusion criteria for follow-up. Our analysis was thus based on 22 asymptomatic carriers (7 males/15 females), and 32 patients (14 males/18 females).

Microalbuminuria: prevalence and evolution to overt nephropathy

Asymptomatic carriers. Table 1 details clinical characteristics at first examination, and Figure 1 resumes the evolution during follow-up. Neuropathy

developed, on average, 2.3 ± 2.2 years after detection of microalbuminuria. One subject developed microalbuminuria ($34.2 \mu\text{g}/\text{min}$) on the third and last year of follow-up, and was still asymptomatic.

Development of neuropathy in asymptomatic gene carriers with microalbuminuria was significantly more frequent than in those with normal urinary albumin excretion ($7/8$ vs $6/14$; $P=0.04$). The relative risk for asymptomatic gene carriers with microalbuminuria developing neuropathy was 4.8 (95% CI, 0.7–32.9), meaning that among asymptomatic carriers, there was a 4.8-fold risk of becoming neuropathic, compared to subjects with normal urinary albumin excretion.

When microalbuminuria preceded the onset of neurological symptoms, evolution to overt renal disease occurred in three of seven cases, and in all of them during the first year of neurological symptoms. None of the cases starting neurological symptoms with normal urinary albumin excretion evolved to clinical nephropathy, after a period of 2–6 years of observation from the onset of neuropathy.

No sex differences were registered respecting presence or development of microalbuminuria.

Patients with neuropathy. Table 1 shows clinical characteristics of patients when the study began. In

Table 1. Clinical characteristics of asymptomatic carriers and patients with neuropathy at first urine collection

	Asymptomatic	Neuropathy
<i>n</i> subjects (M/F)	22 (7/15)	32 (14/18)
Age (years)	41.6 ± 9.6	36.8 ± 8.8
No microalbuminuria		
<i>n</i> subjects	19	19
UAE ($\mu\text{g}/\text{min}$)	8.8 ± 4.0	8.0 ± 4.3
sBP (mmHg)	130.0 ± 22.9	112.1 ± 14.7
dBP (mmHg)	83.1 ± 10.1	72.9 ± 9.9
Microalbuminuria		
<i>n</i> subjects	3	13
UAE ($\mu\text{g}/\text{min}$)	122.5 ± 56.6	83.9 ± 68.6
sBP (mmHg)	124.0 ± 19.7	112.0 ± 13.1
dBP (mmHg)	73.3 ± 5.7	73.8 ± 9.3
Follow-up (years)	6.1 ± 1.3	3.7 ± 1.9

n, number; M, males; F, females; sBP, systolic blood pressure; dBP, diastolic blood pressure; UAE, urinary albumin excretion.

13 patients (4 males/9 females) microalbuminuria was detected at the beginning of the study, and in 11 (5 males/6 females) microalbuminuria developed subsequently, on average, after 3.2 ± 1.7 years of follow-up.

Figure 2 summarizes the evolution of renal disease in neuropathic patients. Evolution to overt nephropathy occurred in 13 (3 males/9 females) of the 24 patients in whom microalbuminuria was detected; conversely, renal disease was absent in the 10 subjects (5 males/5 females) maintaining normal urinary albumin excretion during the follow-up ($P=0.006$). First urinary albumin excretion $> 30 \mu\text{g}/\text{min}$ had a significantly higher rate of progression to overt nephropathy, compared with urinary albumin excretion between 20 and $30 \mu\text{g}/\text{min}$ ($9/10$ vs $0/3$; $P<0.001$), within the same time of follow-up (respectively 3.7 ± 2.2 vs 3.3 ± 1.2 years; $P=\text{NS}$). The urinary albumin excretion was initially $< 30 \mu\text{g}/\text{min}$ in the two patients who evolved having UAE $< 20 \mu\text{g}/\text{min}$ at the end of follow-up.

Overall evolution to overt nephropathy and renal failure.

In our series, overt nephropathy was found in 16/32 subjects with a previous course of persistent microalbuminuria, but was absent in the 24 subjects maintaining normal urinary albumin excretion ($P<0.0001$). The mean time between detection of microalbuminuria and overt nephropathy was 2.0 ± 1.7 years; in these cases, the first determination of albumin excretion was $97.8 \pm 74.6 \mu\text{g}/\text{min}$.

Renal failure was found in five of 16 subjects, and occurred 1–5 years after detection of microalbuminuria; in four patients, renal failure developed after overt nephropathy and in one it occurred during the course of microalbuminuria, but was never associated with normal urinary albumin excretion.

Renal disease, evolution of neuropathy and age. Microalbuminuria appeared, on average, after 4.6 ± 3.8 years of neuropathy (4.1 ± 3.5 years for women, and 5.8 ± 4.5 years for men; $P<10^{-4}$); it was most likely to appear during the first years of neuropathy (Figure 3), 78% in the first 7 years. Evolution to clinical nephropathy occurred after a mean duration of neuropathy of 6.8 ± 4.7 years.

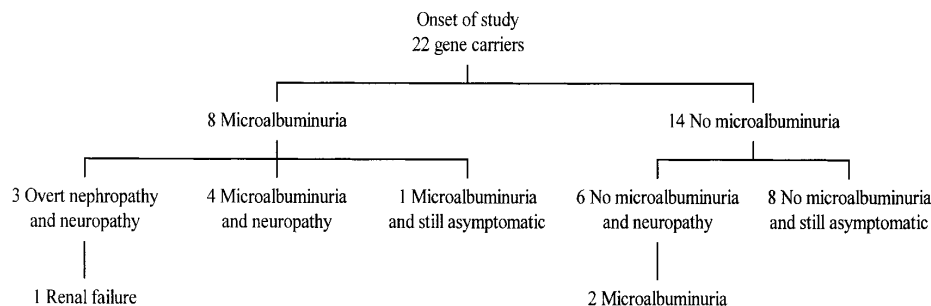


Fig. 1. Asymptomatic gene carriers: evolution to neuropathy and nephropathy during a mean follow-up of 6.1 ± 1.3 years. Numbers of subjects with each clinical condition.

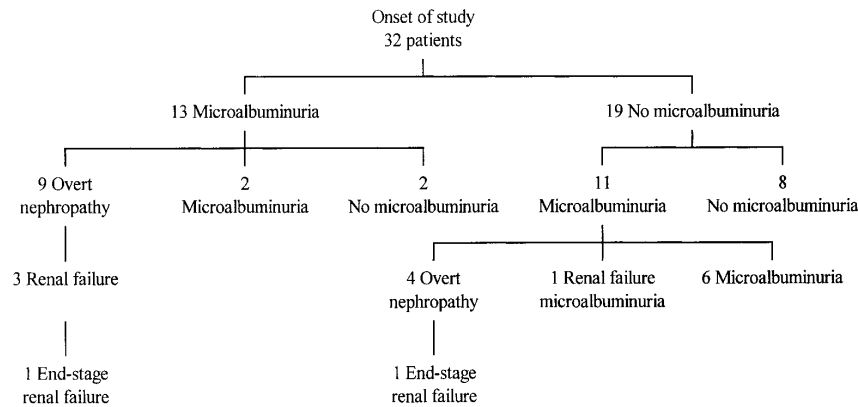


Fig. 2. Patients with neuropathy: albuminuria and evolution of nephropathy during a mean follow-up of 3.7 ± 1.9 years. Numbers of patients with each clinical condition.

The age at onset of neuropathy was not different in subjects with $\text{UAE} < 20$ and with $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$ (37.8 ± 11.4 vs 35.6 ± 11.4 years; $P = \text{NS}$), but when these values were $> 100 \mu\text{g}/\text{min}$ the onset was significantly later (48.0 ± 14.9 vs 35.6 ± 10.5 years; $P = 0.01$).

Microalbuminuria and blood pressure. We analysed systolic and diastolic blood pressure in asymptomatic

carriers and patients with neuropathy, at the beginning of the study and at the end (Tables 1 and 2). Blood pressure lowered when neuropathy was established, even in the presence of microalbuminuria. Thereafter, renal failure, not just proteinuria, was associated with an increase in systolic and diastolic blood pressure.

Serum albumin, lipids, and uric acid. Establishment of neuropathy sloped down serum albumin, total serum cholesterol, serum triglycerides, and uric acid. Patients with microalbuminuria had a lower serum albumin level and higher uric acid level, but the same lipid concentration compared to those with normal urinary albumin excretion. Progression to overt nephropathy was associated with a tendency toward elevation in serum triglycerides and uric acid, and a decrease in serum albumin; total cholesterol raised only in the presence of renal failure. Analytic data are shown in Table 2.

Renal biopsies. Renal biopsy was performed in 14 patients, all undergoing liver transplantation: three with normal albumin excretion, seven with

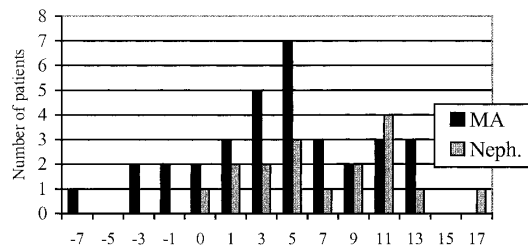


Fig. 3. Distribution of microalbuminuria and nephropathy during evolution of neuropathy in years; negative values represent years before onset of neuropathy. MA, microalbuminuria; Neph., proteinuria or renal failure.

Table 2. Clinical data of 54 subjects at the end of follow-up

	No neuropathy	Neuropathy			
		No microalbuminuria	Microalbuminuria	Proteinuria	Proteinuria and renal failure
%, n M/F	16.6, 4/5	26, 7/7	27.8, 5/10	18.5, 4/6	11.1, 2/4
Systolic BP (mmHg)	133.1 ± 12.6	118.1 ± 15.1	114.4 ± 30.1	102.3 ± 26.3	144.7 ± 23.7
Diastolic BP (mmHg)	86.9 ± 7.5	76.0 ± 7.3	72.6 ± 14.1	66.9 ± 18.0	87.9 ± 14.5
Creat. clear. (ml/min/1.73 m ²)	122.6 ± 13.9	97.4 ± 20.0	98.4 ± 19.2	104.1 ± 20.0	28.8 ± 18.5
Plasma albumin (g/dl)	4.79 ± 0.3	4.5 ± 0.4	3.9 ± 0.5	3.8 ± 0.6	3.6 ± 0.6
Serum cholesterol (mg/dl)	219.6 ± 35.0	167.0 ± 48.1	171.4 ± 53.3	170.3 ± 41.8	230.1 ± 79.8
Serum triglycerides (mg/dl)	125.4 ± 38.9	84.4 ± 30.0	88.1 ± 32.0	127.5 ± 75.5	143.3 ± 69.3
Serum uric acid (mg/dl)	4.7 ± 1.1	4.4 ± 1.0	5.3 ± 1.8	5.9 ± 2.3	6.9 ± 2.0

n, number; M, males; F, females; BP, blood pressure; Creat. clear., creatinine clearance.

Table 3. Clinical data and quantification of amyloid in the glomeruli after renal biopsy ($n = 14$)

Urine findings ^a Albuminuria $\mu\text{g}/\text{min}$ or Pt g/day	Duration of neuropathy in years ^a	Years of follow-up ^a	Number of glomeruli	Glomerular basement membrane	Mesangium	Vascular pole
5.3 $\mu\text{g}/\text{min}$	1	6	18	—	—	—
7 $\mu\text{g}/\text{min}$	4	4	12	—	—/+	—/+
19.9 $\mu\text{g}/\text{min}$	2	1	22	—	+	—
27.3 $\mu\text{g}/\text{min}$	3	5	25	—	++	—/+
31.6 $\mu\text{g}/\text{min}$	3	6	48	—	+	—/+
46.2 $\mu\text{g}/\text{min}$	4	3	7	—	—/+	—/+
72.0 $\mu\text{g}/\text{min}$	5	1	15	—	++	—
91.9 $\mu\text{g}/\text{min}$	7	2	31	—	++	++
148.8 $\mu\text{g}/\text{min}$	5	2	14	—	++	+
168.9 $\mu\text{g}/\text{min}$	2	7	20	—	++	+
1 g/day	0.5	7	28	—/+	—	+
1.5 g/day	5	3	28	—	+++	++
2 g/day	1	7	23	+	+	+
4 g/day	5	3	24	—	+++	++

^aPrior to biopsy; Pt, proteinuria; —, absent; —/+, very mild; +, <25%; ++, 25–50%; +++, >50%.

microalbuminuria, and four with overt nephropathy after a course of microalbuminuria. Table 3 details the presence and amount of glomerular amyloid deposits.

Normal urinary albumin excretion corresponded to absent or very clear involvement. The presence of microalbuminuria corresponded to mesangial or vascular pole deposition in all cases. The level of albuminuria generally correlated with the extension of mesangial deposits as described previously [15]. Arterioles of the juxtaglomerular apparatus (vascular pole) were not involved or had only mild deposits when microalbuminuria was <90 $\mu\text{g}/\text{min}$.

In one patient with overt nephropathy, who entered the study as an asymptomatic carrier with microalbuminuria, we observed a less extensive mesangial deposition when compared with other patients with microalbuminuria: he had amyloid vascular deposits in the arterioles and interlobular arteries, and deposition in subendothelial spaces.

We never found glomerular or vascular lesions other than amyloid deposits.

Discussion

The most frequent presentation of amyloid nephropathy is proteinuria, with variable degrees of renal insufficiency [17]. Although the pathogenic mechanism in diabetes and amyloid nephropathy are different, some common structural defects [18] could have similar consequences. Increased protein excretion, manifested as microalbuminuria, is the earliest clinical finding of diabetic nephropathy [19]. These observations prompted investigation of urinary albumin excretion in ATTR Val30Met amyloidosis.

Microalbuminuria precedes neuropathy and overt renal disease

In the current study, the diagnosis of microalbuminuria prior to the first complaints of FAP, was made

in 32 percent of carriers. The presence of microalbuminuria in asymptomatic gene carriers, compared with those having normal urinary albumin excretion, gave a 4.8-fold risk of developing neuropathy, usually within the next 3 years. The follow-up of individuals at risk showed that once neurological signs have appeared, nephropathy (manifested as early microalbuminuria) progressed to overt renal disease in almost one-half of the cases.

The analysis of subjects that already had neuropathy when microalbuminuria was detected showed also that one-half developed overt nephropathy later. Progression to clinical nephropathy was associated with urinary albumin excretion levels >30 mg/min , which probably has a higher discriminatory value for predicting outcome than the level of 20 $\mu\text{g}/\text{min}$. Levels of urinary albumin excretion >100 $\mu\text{g}/\text{min}$ at presentation occurred in patients with later onset of neuropathy, so special attention must be devoted to follow-up of older subjects.

Subjects maintaining normal urinary albumin excretion during the follow-up did not evolve to clinical nephropathy.

Time between detection of microalbuminuria and overt renal disease was 2 years. First urinary albumin excretion had a level near 100 mg/min on those who progressed, suggesting that a higher interval of progression from sub-clinical to overt nephropathy could have been obtained if our starting point had been earlier.

We think it is advisable that an asymptomatic gene carrier with repeated urinary albumin excretion >30 $\mu\text{g}/\text{min}$ should be put on a liver transplant list.

Renal failure occurring after a course of microalbuminuria

Renal failure on TTR Val30Met amyloidosis developed in 18.8% of the subjects with a previous course of microalbuminuria and in one-third of those with overt nephropathy, but did not emerge with normal urinary

Microalbuminuria in hereditary transthyretin amyloidosis

537

albumin excretion. Renal failure always occurred after neuropathy began.

Microalbuminuria was not associated with an increase in blood pressure or dyslipidaemia

FAP patients with microalbuminuria did not show an increase in blood pressure or serum lipids; only overt nephropathy later changed these parameters. We did not register either the highly significant effect of hypertension on microalbuminuria of FAP, as seen in diabetes mellitus [20], or the association to hyperlipidaemia as described in essential hypertension [21]. Other risk factors for early nephropathy in FAP should be investigated. Modifications of the transthyretin catabolism or intracellular environment, interactions of the amyloid precursor with mesangium or basement membrane components may represent the clues for renal disease.

The extent of glomerular amyloid deposits was related to microalbuminuria

The amount of mesangial and vascular pole amyloid deposits showed correlation with the level of albumin in the urine. The arterioles of the juxtaglomerular apparatus were more extensively involved when microalbuminuria was >90 mg/min. Therefore, although hypertension was not related with microalbuminuria, vascular pole amyloidosis may have a functional impact on glomerular capillary pressure and a prognostic value for the evolution of nephropathy.

Autonomic dysfunction did not explain microalbuminuria. In other diseases with autonomic dysfunction such as familial dysautonomia (Riley-Day syndrome), lower creatinine clearances were related to disturbed renal haemodynamics, not to specific glomerular disease [22]. A study of renal disease in familial dysautonomia [23] identified excess glomerulosclerosis as a frequent finding on autopsy or biopsy cases; renal disease was attributed to ischaemia due to hypotension and subsequent sclerosis of glomeruli. Our biopsy findings in patients with microalbuminuria did not reveal sclerosis of glomeruli, suggesting that albumin excretion did not correlate with ischaemia. Variation on renal haemodynamics, however, can explain how two patients with microalbuminuria reached the end of follow-up with normal albuminuria, although both had had urinary albumin excretion levels <30 μ g/min at first determination. This fact reinforces the discrimination value of albuminuria >30 μ g/min in predicting outcome.

Autonomic symptoms can become manifest after the onset of FAP, and dysautonomia becomes more severe as the disease progresses. However, microalbuminuria and subsequent nephropathy occur mostly during the first 7 years of FAP, with new cases sparsely thereafter.

In summary, the findings of the current study are consistent with the conclusion that microalbuminuria represents a first stage of clinical amyloid nephropathy and could be premonitory of neuropathy. Elevated

levels of urinary albumin appeared during the first years of FAP, disclosing a subpopulation with higher risk of developing renal disease.

Liver transplantation currently appears to be the only treatment for FAP, and should be performed during the early phases of disease. The organ damage caused by amyloid seems to be irreversible, and the mortality and morbidity for patients transplanted in later stages are unacceptably high [24]. Screening for microalbuminuria may be important for therapeutic decisions in individuals at risk, identifying who will benefit from early liver transplantation.

We recommend the systematic and regular measurement of urinary albumin excretion in asymptomatic gene carriers and patients, instead of renal biopsy, as a non-invasive method for estimating the progression of glomerular transthyretin amyloidosis.

Acknowledgements. This study was supported by grant 257/97 from the Ministry of Health, Comissão de Fomento para a Investigação. The authors wish to thank Mrs Teresa Barandela and Mr Carlos Gouveia for their technical support in the immunohistochemistry of renal biopsies.

References

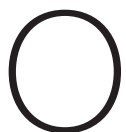
1. Benson MD. Polyneuropathie amyloïde familiale. In: Grateau G, Benson MD, Delpach M ed. *Les Amyloses*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, France: 2000; 445-456
2. Connors LH, Richardson AM, Thériberge R, Costello CE. Tabulation of transthyretin (TTR) variants as of 1/1/2000. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 2000; 7: 54-69
3. Persey M, Booth D, Booth S et al. Hereditary nephropathic systemic amyloidosis caused by a novel variant apolipoprotein A-1. *Kidney Int* 1998; 53: 276-281
4. Benson MD, Liepnieks JJ, Yazaki M et al. A new human hereditary amyloidosis: the result of a stop-codon mutation in the apolipoprotein AII gene. *Genomics* 2001; 72: 272-277
5. Uemichi T, Liepnieks JJ, Benson M. Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *J Clin Invest* 1994; 93: 731-736
6. Pepys M, Hawkins P, Booth D et al. Human lysosome gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 1993; 362: 553-557
7. Maury C. Homozygous familial amyloidosis, Finnish type: demonstration of glomerular gelsolin-derived amyloid and non-amyloid tubular gelsolin. *Clin Nephrol* 1991; 40-53
8. Pras M. Amyloidosis of familial Mediterranean fever and the MEFV gene. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 2000; 7: 289-293
9. Linke R, Heimann K, Nathrath W, Eulitz M. Identification of amyloid A protein in a sporadic Muckle-Wells syndrome. N-terminal amino acid sequence after isolation from formalin-fixed tissue. *Lab Invest* 1983; 48: 698-704
10. McDermott MF, Aksentjevich I, Galon J et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 1999; 97: 133-144
11. Jadoul M, Dodé C, Cosyns JP et al. Autosomal-dominant periodic fever with AA amyloidosis: Novel mutation in tumor necrosis factor receptor 1 gene. *Kidney Int* 2001; 59: 1677-1682
12. Shokeir AA, Moustafa FE, Enein HA, Doria AF, Ghoneim MA. Renal amyloidosis without urinary abnormality in a potential live-kidney donor. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 9: 1339-1340
13. Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG et al. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 1993; 341: 1113-1116

14. Lobato L, Beirão I, Monteiro P, Saraiva MJM, Coelho T, Sousa A. Epidemiology and genetic analysis in patients with familial amyloid polyneuropathy (FAP): can we predict renal involvement? *Neuromusc Disord* 1996; [Suppl] 6: S51.
15. Lobato L, Beirão B, Guimarães SM *et al.* Familial amyloid polyneuropathy type I (Portuguese) distribution and characterization of renal amyloid deposits. *Am J Kidney Dis* 1998; 6: 940–946
16. Costa PMP. *Amiloidoses transtirretinicas, da biopatologia à terapêutica*. Porto University Medical Dissertation. 1993; 74–77
17. Choukroun G, Goupy CH, Noël LH, Droz D, Grünfeld JP. Amylose du rein et de l'appareil urinaire. In: Grateau G, Benson MD, Delpech M ed. *Les Amyloses*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, France: 2000; 163–177
18. Vaamonde C, Pérez G, Pardo V. Dysproteinemias: multiple myeloma, amyloidosis and related disorders. In: Schrier R, Gottschalk C ed. *Diseases of the Kidney*, 5th edn. Little, Brown, Boston, MA: 1992; 2189–2237
19. Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987; 31: 673–689
20. Østerby R, Parving HH, Hommel E, Jorgensen HE, Løkkegaard. Glomerular structure and function in diabetic nephropathy. Early to advanced stages. *Diabetes* 1990; 39: 1057–1063
21. Campese Vito M, Bianchi S, Bigazzi R. Association between hyperlipidemia and microalbuminuria in essential hypertension. *Kidney Int* 1999; 56 [Suppl] 71: S10–S13
22. Axelrod FB, Glickstein JS, Weider J, Gluck MC, Friedman D. The effects of postural change and exercise on renal haemodynamics in familial dysautonomia. *Clin Auton Res* 1993; 3: 195–200
23. Pearson J, Gallo G, Gluck M, Axelrod F. Renal disease in familial dysautonomia. *Kidney Int* 1980; 17: 102–112
24. Suhr OB, Herlenius G, Friman S, Ericzon BG. Liver transplantation for transthyretin amyloidosis. *Liver Transplant* 2000; 6: 263–276

Received for publication: 28.9.01

Accepted in revised form: 17.9.02

V - TRATAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÓNICA


 perfil de declínio da função renal, a preparação para terapêutica substitutiva (diálise ou transplantação renal) e a morbilidade associada à diálise são importantes em qualquer patologia associada a insuficiência renal crónica. Na PAF, uma doença com tempo de vida limitado após o seu início sintomático, a terapêutica dialítica poderia ser considerada um tratamento supérfluo. No entanto, nesta doença não há perda de capacidade mental que comprometa a decisão de um indivíduo acerca do seu próprio tratamento. A preservação da vida e irreversibilidade da IRCT angustiam o doente, a família e o médico quando, como no caso da PAF, o prognóstico da doença é desanimador.

O nefrologista deve dar a perspectiva da diálise ao insuficiente renal crónico, informação a ser ajustada à comorbilidade e agressividade que pode representar esse tratamento. A diálise não era proposta regularmente aos doentes com PAF. Os dados clínicos e analíticos dos doentes com PAF e IRCT nunca foram pesquisados nem estudados.

Neste capítulo caracterizaremos os doentes com IRCT a quem propusemos diálise e os factores que determinaram o início desse mesmo tratamento. Estudámos as complicações e a mortalidade nessa população. Procurámos indicadores de morte precoce após diálise e fazer o reconhecimento de características favoráveis à proposta de transplantação renal. A orientação e preparação para início de terapêutica substitutiva de função renal foi assumida pela consulta, sempre que possível. Após início de terapêutica mantivemos o seguimento dos doentes em consulta ou nos centros de hemodiálise não hospitalares. O registo e revisão de todos os internamentos completou o trabalho anterior. Os internamentos realizaram-se preferencialmente no Serviço de Nefrologia do Hospital Geral de Santo António.

Numa patologia sistémica como a amiloidose, a modificação do curso da nefropatia inclui habitualmente a terapêutica da doença base. O sucesso da transplantação renal nas amiloidoses é prejudicado pelas complicações infecciosas e recidiva da doença no enxerto [1, 2]. Na ATTR, os tratamentos dirigidos à redução do precursor proteico, modificação do meio favorável à formação de fibrilas, ou ainda à estabilização da proteína precursora, irão provavelmente modificar a evolução da doença renal.

A transplantação hepática, ao diminuir drasticamente a variante amiloidogénica da TTR circulante, poderá ser integrada no tratamento da nefropatia de dois modos:

- ao impedir a progressão da proteinúria;
- ao permitir a ausência de recidiva da amiloidose no enxerto renal.

Prosseguimos, então, o estudo do tratamento da nefropatia por transplantação simultânea de rim e fígado como alternativa à diálise, tentando evitar o precursor amiloidogénico circulante. Finalmente, avaliámos o efeito do transplante hepático numa fase mais precoce de nefropatia.

1. Karakayali H, Demirag A, Moray G, Ersoy E, Turan M, Bilgic N, Haberal M. Impact of amyloidosis on long-term survival in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:3221-3223
2. Heering P, Hetzel R, Grabensee B, Opelz G. Renal transplantation in secondary systemic amyloidosis. *Clin Transplantation* 1998;12:159-164

End-stage renal disease and dialysis in hereditary amyloidosis TTR V30M: presentation, survival and prognostic factors

Luísa Lobato^{1,2,3}, Idalina Beirão^{1,3}, Manuela Silva¹, Isabel Fonseca¹, José Queirós¹, Guilherme Rocha¹, António Moraes Sarmiento¹, Alda Sousa^{2,3,4} and Jorge Sequeiros²

1. Department of Nephrology, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal
2. UnIGENE, Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal
3. Centro de Estudos de Paramiloidose, Porto, Portugal
4. Department of Population Studies, ICBAS, University of Porto, Portugal

Key Words: Amyloidosis, dialysis, end-stage renal disease, familial, kidney, neuropathy, survival, transthyretin

Abbreviations: AA = amyloid A; AL = light chain amyloid; FAP = familial amyloid polyneuropathy; FAP-I = familial amyloid polyneuropathy type I; ESRD = end-stage renal disease; RRT = renal replacement therapy; TTR = transthyretin; V = valine; M = methionine; LT = liver transplantation; PD = peritoneal dialysis; PTH = parathyroid hormone

Abstract

Classical familial amyloid polyneuropathy may have a course with progressive renal impairment. We studied 62 patients (24 males, 38 females) with FAP, transthyretin variant V30M, and end-stage renal disease (ESRD) treated with hemodialysis, all referred to a single center over a period of 11 years. Clinical course, morbidity and survival after dialysis were analyzed. Patient's mean age at first dialysis was 51.5 ± 10.7 years, and mean duration of neuropathy was 10.2 ± 3.8 years. The most frequent form of presentation of FAP nephropathy was nephrotic proteinuria with renal dysfunction. In the year prior to dialysis, renal function declined rapidly, and fluid overload was the main indication to initiate treatment. The presence of decubitus ulcers, significant disability, venous catheter for definitive vascular access for long-term treatment, and permanent bladder catheter, were related to death during the first year of dialysis. The mean duration of renal replacement therapy was 21 months,

with a 54.5% one year, and 38.4% two year treatment survival. However, when the duration of neurological symptoms at first dialysis exceeded 10 years, survival was significantly lower. Infections, (41% were decubitus ulcers with sepsis) were the cause of early, as well as late mortality. Early creation of vascular access for hemodialysis, surveillance of skin wounds, and for intervention on neurogenic bladder are essential to improve the prognosis of ESRD in FAP.

Introduction

Chronic renal failure is common and represents a major cause of death in systemic amyloidosis. Dialysis improves the prognosis and survival^{1–4}, but morbidity and mortality are higher than in other populations given this treatment⁵. Prevalence of end-stage renal disease (ESRD), rate of progression towards renal replacement therapy (RRT), and outcome of dialysis, all

Correspondence: Dr. Luísa Lobato, Centro de Estudos de Paramiloidose, Hospital Geral de Santo António, Rua D. Manuel II, 4050–345, Porto, Portugal
Tel: + 351 22 6068114 Fax: + 351 22 6066106 E-mail: llobato@netcabo.pt

Submitted: July 10, 2003

Revision Accepted: October 5, 2003

© 2004 Parthenon Publishing. A member of the Taylor & Francis Group
DOI: 10.1080/13506120410001673884

vary according to the type of amyloidosis. The median time of survival for patients starting dialysis is reported as between 8.2 and 31.4 months for acquired systemic amyloidosis complicating B-cell dyscrasias (AL type)^{1,6}. When chronic inflammatory diseases predominates (AA amyloidosis), the median time of survival from the start of RRT is 25 to 52 months². Eventually, most patients die of progressive systemic amyloidosis, rather than of complications of dialysis⁷.

ATTR V30M FAP⁸ was first reported by Andrade in the north of Portugal⁹. The clinical picture of this disease is a peripheral sensorimotor neuropathy, autonomic dysfunction causing orthostatic hypotension, cardiac arrhythmias, gastrointestinal dysmotility, and sphincter disturbances. The disease is slowly progressive and disabling with death occurring, on average, 11 years after onset¹⁰.

In this form of FAP, renal disease is characterized by early amyloid deposition of TTR in the medulla, however, clinical manifestations correlate with glomerular and vascular involvement¹¹. The frequencies of clinical nephropathy and ESRD in FAP in northern Portugal are estimated as 39% and 9.5%, respectively (L Lobato, unpublished data). Management and long-term follow-up of FAP patients after renal replacement therapy have not yet been reported.

Therefore, this study was undertaken to assess demographic characteristics, clinical presentation, and morbid conditions in FAP (TTR V30M) associated with ESRD. Survival and prognostic factors for early death after initiation of dialysis were also assessed.

Materials and Methods

Data collection

The Centro de Estudos de Paramiloidose (CEP) is a center with the responsibility of ascertainment of patients and families with FAP (TTR V30M) at the national level. A nephrology team from Hospital Geral de Santo António (L.L., I.B. and M.S.) developed an outpatient clinic at CEP to follow these patients with chronic renal failure. Nephrologists from other hospitals were asked to refer patients with chronic renal failure and FAP to CEP.

End-stage renal disease (ESRD) was defined as the late stage of chronic renal failure, causing the death of the patient if renal replacement therapy (dialysis or transplantation) was not initiated. The registry of FAP patients on dialysis was started on June 1989. For this study we analyzed the data until December 2000. The registry included FAP patients with ESRD, followed at CEP before and after dialysis. Those patients who had undergone liver transplantation¹², previous to dialysis

therapy, were not included. Age-at-onset of FAP was defined as the age of initial neurologic features, disturbed cardiac conduction, renal features, ocular manifestations or loss of weight characteristic of this type of amyloidosis. The TTR mutation was confirmed by DNA analysis, in all ESRD patients, except in 3 cases where this was done on a first-degree relative. Renal-biopsy specimens were available from 12 patients. The specimens were tested for the presence of amyloid by Congo-red staining and a search for green birefringence under cross-polarized light microscopy. Immunohistochemical staining was performed with monoclonal anti-TTR antibodies, as previously described¹¹.

Data collected included gender, age-at-onset, clinical features, time of referral to a neurologist and a nephrologist before RRT. Renal ultrasonography, vascular access for hemodialysis, urgent or elective dialysis, and indications for starting dialysis were also registered, as well as morbidity after RRT, date and cause of death. Follow-up after dialysis consisted of evaluations every 6 months, and whenever clinically indicated.

Patients were classified according a modified disability scoring system¹³ before RRT; score I: sensory disturbances in the extremities, but preserved walking capacity; score II: difficulties in walking but without the need for a walking stick; score IIIA: one walking stick or one crutch required for walking; score IIIB: two walking sticks or crutches required; and score IV: patient in a wheelchair or bed confined.

The modality of RRT chosen for all patients was in-center, staff-dependent hemodialysis.

Pre-dialysis management

Due to its simplicity and easy availability, plasma creatinine concentration, was used as the measurement of glomerular filtration rate. Creatinine clearance, based on 24-h creatinine excretion, was not used to estimate glomerular filtration rate, since neurogenic bladder with advanced neuropathy may represent a frequent cause of error in urine volume determination. The creatinine clearance was estimated using the Cockcroft and Gault formula¹⁴. The presence of paraparesia or tetraparesia, and difficulty in weighing patients due to advanced neuropathy disturbed the application of the formula. Previous analysis of our data in 1995¹⁵, led to the decision of constructing arterio-venous (AV) fistula when serum creatinine was higher than 2.5 mg/dl, in 2 determinations with a 2-week interval, and after urinary obstruction was excluded. Initiation of dialysis was indicated if serum creatinine concentration was ≥ 5.0 mg/dl.

Calcium supplementation was given whenever serum calcium concentration was less than 2.2 mM/l or serum phosphorus levels were higher than 1.8 mM/l; calcitriol

was administered if the serum calcium level could not be maintained at 2.2–2.4 mM/l using oral supplementation of calcium, or if serum parathyroid hormone (PTH) level (intact hormone) exceeded 200 pg/ml. Aluminium compounds were avoided.

The autologous AV fistula was the first choice for permanent vascular access for hemodialysis, when there was a timely referral to a nephrologist. Whenever possible, the AV fistulas were created on the contralateral side of pacemaker insertion. The renal diet was personalized, as anorexia, chronic diarrhea, dysphagia, and sensation of repletion were present in more than half of FAP patients¹⁶.

Postdialysis management

The frequency of dialysis in stabilized patients was 3 times a week, and each treatment lasted 190 to 240 min. The dose of dialysis was calculated by multiplying the urea clearance (K) by the treatment duration (t), and dividing it by the urea distribution volume (V), in which V is approximately equal to the volume of total body water (Kt/V); a Kt/V of 1.2 was the minimum accepted. All patients had sudden episodes of diarrhea and hypotension related to their autonomic neuropathy therefore the weight at the end of each dialysis treatment was the estimated dry weight plus 0.5 to 1 kg. Food ingestion during hemodialysis was avoided, and dialysis solution temperature was kept at 35.5° C to prevent hypotension.

Data analysis

Differences between groups were analyzed with the Pearson's chi-square test, in case of categorical variables, and with the Student t-test, in case of continuous variables. Factors associated with mortality during the first year of dialysis treatment were analyzed using chi-square tests for statistical differences between groups and expressed in relative risk (RR) with 95% confidence intervals (CIs). For analysis of death during the first year of RRT and after it, all patients alive with less than one year of RRT were excluded. Gender, age-at-onset, age at first dialysis, years of evolution of disease, disability score, hemoglobin, serum albumin, cholesterol, triglycerides, vascular access for dialysis, pacemaker insertion, decubitus ulcers, and indwelling bladder catheter were all evaluated as possible predictors of poor outcome. For this analysis we attributed a quantifiable value to the disability scoring system as follows: score I=1, score II=2, score IIIA=3, score IIIB=3.5, and score IV=4. Linear regression analysis was used to relate changes in PTH level to other disease characteristics. Descriptive statistics are given as the average $\pm$ one standard deviation (SD). All significance tests were performed using two-tailed analyses, and P values of less than 0.05 were considered

significant. Statistical analysis of mortality after renal replacement therapy was performed by the Kaplan-Meier method; the comparison of the survival distribution for FAP patients with ESRD according the duration of disease at the onset of dialysis was performed using the log-rank test. The first day on dialysis was taken as the starting point for analysis of patient survival; follow-up time was to death.

Results

Patient description

There were 62 patients, 38 females and 24 males, belonging to 50 unrelated families. In 13 (21%) of those cases, the patient with end-stage renal disease was the proband or the index case, i. e., the first subject in the family described as affected with FAP. The age-at-onset of FAP was 41.4 ± 12.8 years, with a range of 25–82 years; in 18 patients (29%) onset of FAP was after the sixth decade. Index cases were older at onset, i.e., 50.2 ± 11.7 years when first features of amyloidosis appeared. We did not have any diabetic patients. Time between first manifestations of FAP and initiation of dialysis was 10.2 ± 3.8 years, with a range of 2–18 years. The mean age at start of RRT was 51.5 ± 10.7 years, with a range of 36–84 years. Index cases had RRT 59.2 ± 9.5 years, and with less disability (mean score 2.69 ± 1.10) than the patients with previous family history (mean score 3.23 ± 0.87). Table 1 details demographic and clinical characteristics of the patients.

Clinical presentation, renal features and progression towards ESRD

Forty-four ESRD patients (71%) presented with peripheral sensory neuropathy as their first manifestation of FAP; weight loss, gastrointestinal disturbances and bradycardia were also found as isolated manifestations at onset; the majority of the patients (81%) had 2 or more features at presentation. Weight loss was significantly more frequent in women. Nausea and vomiting were absent as initial manifestations. Table 2 details the clinical presentation of FAP.

The development of ESRD was preceded by proteinuria in 90% of the patients (range 0.3 to 14 g/day). Urine albumin levels were $71.7 \pm 10.6\%$ of the total urine protein content. The renal features at first observation by the nephrologist are shown in Table 3. A sex difference was found for presentation of nephropathy: nephrotic range proteinuria and elevated serum creatinine were significantly more common in women; isolated nephrotic proteinuria at presentation was seen in women only. Microscopic hematuria was detected in 2 patients;

Lobato *et al.***Table 1.** Demographic data of patients with familial amyloid polyneuropathy TTR Val30Met submitted to dialysis therapy.

	Total (n = 62) Mean $\pm$ SD	Men (n = 24) Mean $\pm$ SD	Women (n = 38) Mean $\pm$ SD
Age-at-onset of FAP (years)	41.4 $\pm$ 12.8	40.6 $\pm$ 13.7	41.8 $\pm$ 12.4
Age at first dialysis (years)	51.5 $\pm$ 10.7	50.9 $\pm$ 11.8	51.9 $\pm$ 10.1
Evolution of disease when referred to a neurologist (years)	3.1 $\pm$ 2.7	2.4 $\pm$ 2.1	3.6 $\pm$ 3.0
Evolution of disease when referred to a nephrologist (years)	7.3 $\pm$ 4.0	7.1 $\pm$ 3.3	7.4 $\pm$ 4.4
Time between diagnosis of nephropathy and dialysis (months)	34.8 $\pm$ 27.4	40.6 $\pm$ 29.0	30.9 $\pm$ 26.1
Evolution of disease at first dialysis (years)	10.2 $\pm$ 3.8	10.4 $\pm$ 3.3	10.1 $\pm$ 4.0
Neurological score at first dialysis	3.1 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 1.0
Duration on dialysis (months)	21.1 $\pm$ 27.3	23.1 $\pm$ 34.5	19.8 $\pm$ 22.4

Table 2. Clinical presentation of FAP in end-stage renal disease patients.

	No. of patients (%) (n = 62 patients)	No. of men (%) (n = 24)	No. of women (%) (n = 38)	Significance (P)
Isolated sensitive neuropathy	11 (17.7%)	4 (16.6%)	7 (18.4%)	NS
Sensitive neuropathy	33 (53.2%)	12 (50%)	21 (55.3%)	NS
Constipation/ diarrhea	28 (45.2%)	11 (45.8%)	17 (44.7%)	NS
Weight loss	22 (35.5%)	3 (12.5%)	19 (50%)	0.003
Motor neuropathy	1 (1.6%)	—	1	—
Impotence	7 (11.3%)	7	—	—
Neurogenic bladder	7 (11.3%)	4 (16.6%)	3 (7.8%)	NS
Nephropathy	7 (11.3%)	2 (8.3%)	4 (10.5%)	NS
Symptomatic bradycardia	4 (6.5%)	2 (8.3%)	2 (5.3%)	NS

*Comparison made between the number of men and women

#NS: not significant

Table 3. Renal features of FAP patients on dialysis at first observation by the nephrologist.

	No. of patients (%) (n = 62 patients)	No. of men (%) (n = 24)	No. of women (%) (n = 38)	Significance* (P)
End-stage renal disease	3 (4.8%)	1 (4.2%)	2 (5.2%)	NS
Renal failure and proteinuria $\geq$ 3g/l	25 (40.3%)	5 (20.8%)	20 (52.6%)	0.01
Renal failure and proteinuria $\geq$ 0.3 and $<$ 3 g/l	13 (21%)	8 (33.3%)	5 (13.2%)	NS
Renal failure without proteinuria	1 (1.6%)	1 (4.2%)	—	—
Proteinuria $\geq$ 3 g/l	5 (8.1%)	—	5 (13.2%)	—
Proteinuria $\geq$ 0.3 and $<$ 3 g/l	11 (17.7%)	6 (25%)	5 (13.2%)	NS
Microalbuminuria (20–200 μ g/min)	4 (6.5%)	3 (12.5%)	1 (2.6%)	NS

*Comparison made between the number of men and women

#NS: not significant

gross hematuria, without bacteriuria, appeared in 2 subjects with advanced renal failure; glucosuria was never found.

Mean systolic blood pressure at first observation by the nephrologist was 127.0 ± 29.7 mmHg, and mean diastolic pressure was 76.4 ± 16.4 mmHg. Before RRT,

12 patients had a systolic blood pressure above 140 mmHg, and 3 patients had a diastolic pressure higher than 90 mmHg.

Kidney ultrasonography was performed at the diagnosis of nephropathy in all patients. Kidney size was conserved in 52 subjects (84%), 32 of them (62%)

with established chronic renal failure. When the kidney size was decreased due to reduced cortical thickness (10 patients, 16%) there was chronic renal failure in all. After excluding the 3 subjects with ESRD at first sonography, a corticomedullary differentiation was preserved in 17 of the 39 patients (43.6%) with presence of chronic renal failure at first observation.

Moderate hydronephrosis, with absence of cortical scarring, was verified in 4 patients; bladder catheterization improved the renal function only transiently.

Recurrent urinary tract infections before dialysis were present in 34 subjects (55%), 12 males and 22 females ($P=0.54$). Permanent or intermittent bladder catheterization, after episodes of sudden urinary retention, was needed before dialysis in 9 males and 11 females. The time of progression of neuropathy to ESRD, and the delay between the diagnosis of nephropathy and first dialysis, according to clinical presentation of nephropathy, are detailed in Table 4.

Evolution of mean predialysis serum creatinine levels is shown in Figure 1. Six months before dialysis was indicated, serum creatinine was, on average, 2.6 ± 0.8 mg/dl, and blood urea was, on average, 115.0 ± 41.7 mg/dl. Gender was not found to be a significant factor on time of progression towards ESRD after the diagnosis of nephropathy (3.3 ± 2.5 years for males, 2.5 ± 2.2 years for females; $P=0.58$).

Renal pathology

Six patients were biopsied close to dialysis, and other 6 one to five years before ESRD. An extensive mesangial, vascular pole, and vascular amyloid involvement was found in patients close to dialysis. Several glomeruli were completely obliterated by amyloid or sclerosed; interstitial fibrosis, tubular atrophy, and some degree of leucocyte infiltration in peri-glomerular areas (as in patients with advanced renal failure of other etiologies) were also present; one patient presented amyloid deposits in vascular walls and obsolescent glomeruli. In the other 6, the deposits had the same distribution, with enlarged

glomeruli partially or totally occupied by amyloid. Extensive deposition of amyloid in the medullary zone was found in all biopsy specimens. Cortical interstitium and proximal convoluted tubules were spared. In all specimens, the amyloid deposits stained specifically with anti-TTR antibodies.

Cardiac involvement

Rhythm disturbances (sinus node bradycardia or atrial-ventricular block) motivated a definitive pacemaker implantation either before or after dialysis in 35 (12 males, 23 females) and 11 (5 males, 6 females) patients, respectively. Evolution of FAP until pacemaker implantation was 10.1 ± 4.9 years in men and 7.9 ± 3.6 years in women.

Doppler echocardiography was performed 6 months before dialysis, in 20 patients (aged 50.7 ± 8.9 years, with 9.1 ± 3.3 years of evolution of neuropathy). The left atrial dimension was increased in 14 patients (70%), with a mean value of 42.2 ± 6.0 mm (half of these patients had a neurological score between 1 and 2). Posterior left ventricular wall thickness was above normal in 9 (45%) cases, and left ventricular concentric hypertrophy was

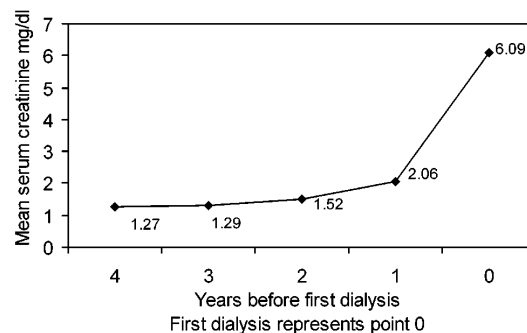


FIGURE 1: Evolution of mean pre-dialysis serum creatinine levels.

Table 4. Time of progression to end-stage renal disease according to clinical presentation of nephropathy. Delay between diagnosis of nephropathy, first features of neuropathy and dialysis.

Clinical presentation of nephropathy	Time between diagnosis of nephropathy and dialysis (years)	Time between onset of neuropathy and dialysis (years)
Pt < 3g/l, normal renal function	5.0 ± 2.4	11.7 ± 4.1
Pt ≥ 3 g/l, normal renal function	3.7 ± 2.3	7.0 ± 3.4
Pt < 3g/l, renal failure	2.9 ± 2.3	10.3 ± 4.2
Pt ≥ 3 g/l, renal failure	1.7 ± 1.6	9.8 ± 3.6

*Pt: Proteinuria

diagnosed in 4. Interventricular septum dimension was enlarged in 10 (50%) subjects, with a mean value of 12.4 ± 3.0 mm. Impaired diastolic function was detected in 2 patients. Dilated, restrictive cardiomyopathy or systolic ventricular dysfunction was not found.

Calcium and phosphorus metabolism

Before dialysis, the mean serum calcium level was low (2.04 ± 0.2 mmol/l) and serum phosphorus level was high (1.7 ± 0.5 mmol/l), although calcium carbonate was supplemented. Only one patient was treated with aluminium compounds (aluminium hydroxide) to avoid an elevated calcium-phosphorus product. Serum parathyroid hormone (PTH) level at initiation of dialysis was documented in 48 patients, with a mean value of 98.4 ± 99.3 pg/ml, ranging from 2.4 to 490.0 pg/ml. Twenty-three of these patients (48%) with established ESRD showed serum PTH level ≤ 65 pg/ml, without previous calcitriol therapy. No correlation between duration of neuropathy and PTH level was found, neither between PTH level and predialysis serum calcium or phosphorus levels.

Vascular access for hemodialysis

Autologous AV fistulas were constructed in 40 (64.5%) patients, when mean serum creatinine was 3.2 ± 1.1 mg/dl 6.3 $\pm$ 6.4 months before RRT. Thirty-seven (60%) subjects had a functioning AV fistula at first dialysis. Adequate blood flow and fistula development to cannulation were obtained in 36 patients (25 elbow-brachiocephalic and 11 wrist radiocephalic fistula). In 11 subjects the first AV fistula was performed after dialysis had been initiated, in 9 an adequate AV fistula (5 elbow, 4 wrist) was obtained. One patient had 2 arteriovenous grafts in the upper arm: first one excised for infection and the other suffered extensive thrombosis after emergent pacemaker implantation. Temporary venous catheters

were used in 24 patients to initiate RRT, while cuffed venous catheters were used in 2.

In subjects alive after 3 months of dialysis (43 patients) the vascular access was an AV fistula in 35 (26 elbow, 9 wrist), or cuffed venous catheters in 8; all patients with cuffed catheters had previous AV fistulas that failed. Symptomatic intradialytic hypotension was present in 18 patients (51.4%) with AV fistulas and in 7 (87.5%) with cuffed catheter. In 8 cases, AV fistulas or graft and permanent pacemaker were placed on the same side: 6 developed important edema of the extremity, caused by venous hypertension, and 4 of them lost their vascular accesses.

Initiation of dialysis

The main indications for dialysis are detailed in Table 5. Elective hemodialysis was started in 30 patients (8 males, 22 females) with a mean plasma creatinine concentration of 4.9 ± 1.5 mg/dl, a mean creatinine clearance 12.2 ± 4.0 ml/min, and a mean plasma urea level of 209.4 ± 61.6 mg/dl. In the other 32 subjects, dialysis was implemented urgently with a mean creatinine of 7.3 ± 3.0 mg/dl, mean creatinine clearance 9.9 ± 5.0 ml/min, and mean urea 224.2 ± 90.6 mg/dl; 20 of these subjects had concomitant bacterial infection. Bacterial infections were present in 21 patients at first dialysis, associated with sepsis in 15 cases. Urinary tract infections (UTI) predominated (11 cases), followed by infected wounds of extremities or erysipelas (6 cases), and pneumonia (3 cases); in one patient a spontaneous peritonitis caused by a group A *Streptococcus* was found. The cause of UTI was *Enterobacteriaceae* (mainly *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*); in 4 cases more than one microorganism was found.

Outcome after dialysis

Infections were the leading cause of morbidity after dialysis, in relation to vascular access, lung or decubitus ulcers. Urinary tract infections persisted after dialysis, but only pyocystis (present in 4 patients) required hospitalization. Fifteen patients were never hospitalized after RRT, but 40 had 2.0 ± 1.2 re-admissions. The death of 7 patients (5 males, 2 females) occurred during their first hospital admission, when dialysis treatment was started; all had been admitted with sepsis. Ocular complications were due to painful cornea erosions and keratitis, acute glaucoma, vitreous opacities, and endophthalmitis. Two patients, over 60 years, were diagnosed with cancer: a carcinoma of the bladder, and a carcinoma of the oral cavity, respectively 9 and 15 months after initiation of dialysis. Recurrent symptomatic intradialytic hypotension occurred in 75% of the males and 53% of the females,

Table 5. Indications for dialysis in patients with FAP TTR V30M

	Total 62 patients No. of patients (%)
Fluid overload	26 (41.9%)
Severe metabolic acidosis	11 (17.7%)
Uncontrollable hyperkalemia	3 (4.8%)
Exacerbation of anorexia or nausea/vomiting	14 (22.6%)
Uremic encephalopathy	1 (1.6%)
Pericarditis	1 (1.6%)
Serum creatinine > 6 mg/dl without other complication	6 (9.7%)

none of them was on antihypertensive medication. In 4 subjects, without volume overload, hypertension was maintained after RRT.

Clinical characteristics of subjects surviving less than one year on RRT are compared with patients surviving more than one year in Table 6; on univariate analysis, the highest risk of death was attributed to the presence of decubitus ulcers before starting dialysis, to a neurological score higher than 3, or to the absence of a AV fistula or graft for long-term treatment, implying the use of permanent catheter.

Death occurred in 46 patients (16 males, 30 females). It was related to infection in 14/26 (54%) patients who died during the first-year of treatment, and in 8/20 (40%) thereafter. Decubitus ulcers with sepsis, corresponding to 41% of all infections, were the leading cause of death, followed by catheter sepsis and pneumonia (each 18%); pyocystis was the cause of death in 3 patients.

The most common agents of infected skin ulcers were Gram-negative organisms (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Morganella sp*); *Enterococcus faecalis* was found in the bloodstream in a catheter sepsis, and in a lung infection; in 2 patients, *Candida albicans* was the cause of pulmonary infection. Patients with decubitus ulcers were younger at first dialysis (45.6 ± 7.3 versus 54.7 ± 11.4 years, $p < 0.0001$), and had a longer evolution of neurological disease (12.4 ± 3.1 versus 9.7 ± 3.9 years, $P < 0.001$). Sudden death occurred in 7

patients (15%), 2 had pacemakers. Cachexia with untreatable hypotension leading to circulatory failure was the cause of death in 7 patients (15%). One, two and three years survival after RRT were 54.5%, 38.4% and 29.5%, respectively (Figure 2). The Kaplan-Meier survival curves showed a significant difference between patients who had ≤ 10 years and > 10 years interval between the onset of neuropathy and RRT: $P < 0.02$ by the log rank test (Figure 3).

Discussion

This study shows that Portuguese FAP patients progressing towards ESRD had a wide range of age-at-onset: it was documented since the third decade, but in one third, the onset was after the sixth decade and it could be delayed until the ninth. Cases without a previous family history of FAP represented 20% of ESRD patients. The high frequency of non-familial cases in Sweden has been attributed to incomplete penetrance and variable expressivity of the FAP gene¹⁷.

Women predominated in the evolution to ESRD, as well as in the clinical presentation with nephrotic range proteinuria before developing ESRD. This was unexpected, since FAP affects more males than females, both in the Portuguese and Swedish population¹⁷, and ESRD is more prevalent in males¹⁸.

Table 6. Mortality during the first 12 months of renal replacement therapy: patients characteristics and risk for death.

	Death during first 12 months No. of patients (%) n = 26 (46%)	Alive after 12 months No. of patients (%) n = 31 (54%)	Significance (P)	RR* (95% CI**)
Gender (males/females)	11/15	11/20	NS [#]	
Age-of-onset (years)	39.6 ± 14.7	42.5 ± 10.7	NS	
Duration of disease at first dialysis (years)	11.1 ± 4.2	9.8 ± 3.4	NS	
Catheter as vascular access for first dialysis	17 (65.4%)	8 (25.8%)	0.003	2.5 (0.3–1.6)
Catheter as definitive vascular access for long-term dialysis	11 (42.3%)	2 (6.5%)	0.001	6.6 (1.5–3.3)
Serum creatinine at first dialysis (mg/dl)	5.9 ± 3.0	6.4 ± 2.4	NS	
Hemoglobin (g/dl)	8.6 ± 1.6	8.7 ± 2.0	NS	
Serum albumin at first dialysis < 3 g/dl	18 (69.2%)	8 (35.5%)	0.01	2.0 (0.12–1.2)
Serum triglycerides (mg/dl)	99.2 ± 41.1	108.8 ± 44.7	NS	
Serum cholesterol (mg/dl)	115.7 ± 45.7	156.0 ± 75.5	NS	
Decubitus ulcers before dialysis	13 (50%)	2 (6.5%)	<0.001	7.8 (0.7–3.4)
Permanent bladder catheter	13 (50%)	5 (16%)	0.006	3.1 (0.2–2.0)
Absence of pacemaker	10 (38.5%)	4 (12.9%)	0.025	1.9 (1.1–1.6)
Neurological score > 3	22 (84.6%)	11 (35.5%)	<0.001	4.0 (1.6–10.1)

*RR: relative risk; **CI: confidence interval

[#]NS: not significant

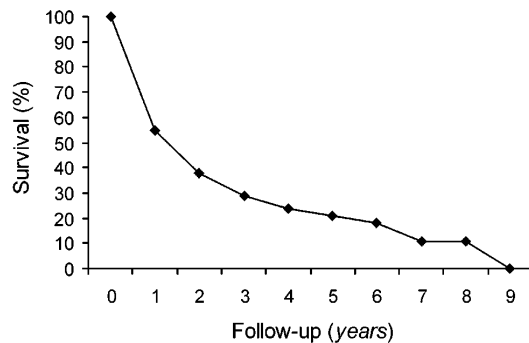


FIGURE 2: Kaplan-Meier analysis of survival in patients with familial amyloid polyneuropathy submitted to dialysis.

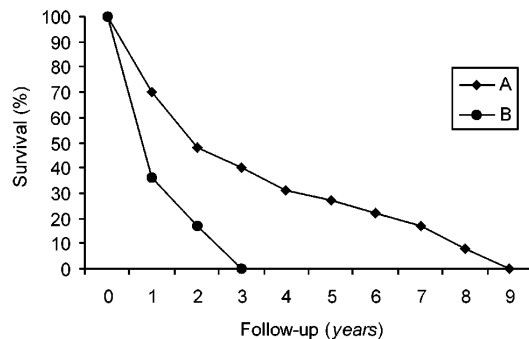


FIGURE 3: Kaplan-Meier analysis: comparison of the survival distribution in patients with FAP submitted to dialysis according to the duration of disease. A: duration ≤ 10 years; B: duration > 10 years. There is a significant difference between A and B ($P=0.02$).

The referral to the nephrologist was late, when impairment of renal function was present in 68% of the patients. Renal failure has been emphasized as an important complication after liver transplantation (LT) in FAP¹⁹. We advocate early LT, with priority in the liver transplant waiting list, when nephrotic syndrome associated to mild renal insufficiency is present. Proteinuria may remit²⁰ although, the risk of worse renal function after transplantation exists. This approach, and the appropriate use of renal-sparing immunosuppressive protocols, may be the best way to treat nephropathy. When chronic renal failure progress, only liver-kidney transplantation will be adequate, an extra organ will be necessary, and the general status of most patients did not allow the procedure.

Artificial pacing was necessary in the majority of the patients before dialysis. Cardiac conduction disturbances, with need for a pacemaker, occurred earlier in women, although on average, females had a lower neurological score. These data are consistent with the description of a visceral involvement in FAP, with renal and heart disease²¹. Left atrial enlargement was the most frequent finding (70%) on echocardiogram of FAP patients with ESRD. In a previous study of the natural history of heart involvement in FAP-I (Fonseca *et al*, unpublished data) only 3 patients among 110 had left atrial enlargement, all of the 3 with advanced neurological disease. In another report of echocardiographic evaluation in 14 patients with FAP, dilated atrial cavities was also associated with advanced forms of FAP²². However, to the contrary, left atrial enlargement was present in subjects involved in our study from the early stages of disease. Echocardiographic studies of patients with FAP submitted to liver transplantation²³ also showed a progressive increase in left atrial dimension, but its mean diameter (38.9 mm) was lower than in our findings (42.2 mm). In normotensive patients (as our group) on continuous ambulatory peritoneal dialysis, a high prevalence of left atrial dilatation was also described²⁴. In FAP, left ventricular dilatation and systolic dysfunction are absent, i.e., different from ESRD of other etiology²⁴. Thus, early left atrial enlargement seems to characterize FAP patients with ESRD.

Laboratory findings concerning evaluation of renal osteodystrophy showed elevated phosphate levels and reduced calcium levels, but normal serum PTH in half of the patients. Adynamic bone disease due to aluminium deposition is not likely before dialysis, since aluminium gels were prescribed only in one patient. Deposition of amyloid in parathyroid glands has been documented in autopsies of FAP patients²⁵. Infiltration of parathyroid by amyloid, and very low levels of PTH were reported also in a patient with familial Mediterranean fever and ESRD²⁶. Therefore, infiltration of parathyroid glands is a likely explanation for the absence of an appropriate elevation of serum PTH. Low serum PTH has been related to poor nutritional status by some²⁷. In FAP, malnutrition caused by inadequate protein intake, diarrhea, and malabsorption may explain the tendency to low PTH. Autonomic dysfunction, another possibility for interference with PTH secretion, is not probable because in diabetic or non-diabetic hemodialysis patients dysautonomia was not correlated with PTH levels^{28,29}.

Unexpectedly, an adequate autologous arteriovenous fistula was obtained in 90% of the patients in whom the vascular access was programmed timely before dialysis. Three months after initiating RRT, the majority of living patients (81.4%) were using an AV fistula. In FAP, we recommend the referral to a surgeon when serum

creatinine is above 2.6 mg/dl, i.e., earlier than the usual criteria of 4 mg/dl³⁰, since this was the mean value 6 months before obligatory dialysis. Similar to what was found in rheumatoid arthritis patients with amyloidosis³¹, in FAP renal function declined rapidly in the last year before dialysis was started. The timing of the transition from pre-dialysis to dialytic care may be particularly important to patient survival. The decision for starting dialysis was taken mostly after uncontrolled fluid balance. Uremic signs were present only in one fourth of the patients. However, this might be due to misdiagnosis, as FAP itself (even in the presence of normal renal function) causes anorexia, weight loss, weakness, nausea, and vomiting. Muscle weakness, due to neuropathy and infections, could contribute to metabolic acidosis, a life-threatening condition, which was also a common reason to start dialysis. In our opinion, FAP patients must be selected for early initiation of dialysis, as they are a group of malnourished patients, with chronic diarrhea, and benefit from intra-dialytic nutritional supplements near the beginning of renal replacement therapy. In this study, a serum albumin concentration below 3 mg/dl, at the initiation of dialysis, was significantly related to death on the first year of treatment, consistent with previous findings on dialysis patients^{32,33}.

Morbidity after RRT in FAP was related to skin, vascular access, urinary tract, and lung infections. The stronger prognostic markers for death during the first year of dialysis were presence of decubitus ulcers, venous catheters as the definitive vascular access, and permanent bladder catheters. These represent starting points for potential infection, which is the commonest cause of death in FAP patients during RRT.

Among patients with FAP and ESRD, death was attributed to infection in 48%, and sudden death accounted for 15%. Conversely, cardiac causes and infection account for 48% and 15%, respectively, of all deaths reported for the adult ESRD population in general³⁴. The most common causes of death in AL amyloidosis with ESRD is from extrarenal amyloid deposits in the heart, followed by deposits in the liver³⁵. Experience with RRT in AA amyloidosis³⁶ showed that death was largely related to infection (39%), whilst cardiac causes were less common (17%). In FAP, death due to infection is even more frequent, reflecting the sensorimotor neuropathy with disruption of the skin barrier, and the autonomic neuropathy with defunctionalized bladder. Therefore, with respect to the urinary tract, we propose antimicrobial prophylaxis with trimethoprim-sulfamethoxazole during the first 3 months after initiating dialysis in oliguric patients without bladder catheter, when there is a previous history of recurrent urinary tract infections. If the patient has a permanent bladder catheter

prior to dialysis we recommend maintaining it awaiting a urine volume under 300 ml/day, followed by intermittent catheterization until anuria occurs. Oliguric or anuric patients should receive regular ultrasonographic study to evaluate urine residue. To prevent pyocystitis, we recommend prompt bladder drainage and urine culture when residue exceeds 300 ml or in the presence of foul-smelling urethral discharge. The patient should be educated to prevent skin burns on the extremities. Early physiotherapy is desirable to avoid decubitus ulcers. Colostomy pre-dialysis is probably a good option when profuse diarrhea and fecal incontinence represent a problem for adequate skin care.

In patients with TTR V30M amyloidosis submitted to dialysis, the severity and duration of neuropathy were related with early death and worse survival. A high drop out rate (16%) in the first month of RRT was found in FAP, but lower than that reported in AA amyloidosis³. In conclusion, this study demonstrates that dialysis prolonged the life for, on average, 21 months, in patients with FAP and end-stage renal disease. In general, FAP progressed over 10 years until ESRD. End-stage renal disease usually occurred within 3 years after the diagnosis of nephropathy, and renal function declined rapidly in the year prior to dialysis. This finding emphasized the early identification of subjects with nephropathy, so that they can receive early the vascular access for hemodialysis.

Strategies to improve prognosis of ESRD must include intervention on skin wounds, decubitus ulcers and neurogenic bladder. In our view, nutritional intervention should be started pre-dialysis; chronic malnutrition probably justifies the utilization of intradialytic total parenteral nutrition. Because long-term survival of FAP patients treated by dialysis is poor, those with characteristics of longer survivors should be evaluated for combined liver-kidney transplantation.

Acknowledgments

This work was supported by grants No. 42/95 and 257/97 from Comissão de Fomento da Investigação em Saúde, Portuguese Ministry of Health. We gratefully acknowledge Dr. Caldeira Gomes, Dr. António Castro Henriques, Dr. Eva Xavier and staff from the dialysis units of Vila do Conde, Braga and S. Francisco for their collaboration. We thank Dr. Mergulhão Mendonça and Dr. Norton de Matos for prompt help with arterio-venous fistulas in FAP. The authors also would like to thank Centro de Estudos e Apoio à Paramiloidose, from Santa Casa da Misericórdia da Póvoa de Varzim, for the excellent support to FAP patients with ESRD.

References

- 1 Gertz MA, Kyle RA, O'Fallon WM (1992). Dialysis support of patients with primary systemic amyloidosis. A study of 211 patients. *Arch Intern Med* **152**, 2245–2250
- 2 Martinez-Vea A, Garcia C, Carreras M, Revert L, Oliver JA (1990). End-stage renal disease in systemic amyloidosis: Clinical course and outcome on dialysis. *Am J Nephrol* **10**, 283–289
- 3 Moroni G, Banfi G, Montoli A, Bucci A, Bertani T, Ravelli M, Pozzi C, Leonelli M, Lupo A, Volpi A, Pasquali S, Salvadeo A (1992). Chronic dialysis in patients with systemic amyloidosis: The experience of northern Italy. *Clin Nephrol* **38**, 81–85
- 4 Cantaluppi A (1988). CAPD and systemic diseases. *Clin Nephrol* **30**, S8-S12
- 5 Choukroun G, Goupy CH, Noël LH, Droz D, Grünfeld JP (2000). Amylose du rein et de l'appareil urinaire. In Grateau G, Benson MD, and Delpech M (eds.) *Les Amyloses*, pp 163–177 (Médecine-Sciences Flammarion, Paris)
- 6 Merlini G (1995). Treatment of primary amyloidosis. *Semin Hematol* **32**, 60–79
- 7 Tan SY, Pepys MB, Hawkins PN (1995). Treatment of amyloidosis. *Am J Kidney Dis* **26**, 267–285
- 8 Saraiva MJM (2001). Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat* **17**, 493–503
- 9 Andrade C (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy: familial atypical generalized amyloidosis with specific involvement of the peripheral nerves. *Brain* **75**, 408–427
- 10 Sousa A, Coelho T, Morgado R, Coutinho P (1990). Statistical analysis of factors which may influence the duration of familial amyloidotic polyneuropathy type I. In Costa PP, Falcão de Freitas A, and Saraiva MJ (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, pp. 351–355 (Arquivos de Medicina, Porto)
- 11 Lobato L, Beirão B, Guimarães SM, Droz D, Guimarães S, Grünfeld JP, Noël LH (1998). Familial amyloid polyneuropathy type I (Portuguese): distribution and characterization of renal amyloid deposits. *Am J Kidney Dis* **6**, 940–946
- 12 Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A, Richardson S, Hawkins PN, Pepys MB (1993). Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* **341**, 1113–1116
- 13 Suhr O, Holmgren G, Steen L, Wikström L, Norden G, Friméan S, Duraj FF, Groth CG, Ericzon BG (1995). Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy: follow-up of the first 20 Swedish patients. *Transplantation* **60**, 933–938
- 14 Cockcroft DW, Gault MH (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* **16**, 31–35
- 15 Beirão I, Lobato L, Silva M, Coelho T, Xavier E, Guimarães S (1996). Clinical course and outcome in Patients with FAP TTR Met 30 on regular hemodialysis. *Neuromuscular Disord* **8**, 56
- 16 Fonseca I, Lobato L, Deirão I, Guimarães S (1999). Nutritional support in familial amyloidotic polyneuropathy type I patients. In Robert A Kyle and Morie Gertz (eds) *Amyloid and Amyloidosis* pp. 291–293 (The Parthenon Publishing Group, USA)
- 17 Sousa A, Andersson R, Drugge U, Holmgren G, Sandgren O (1993). Familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden: geographical distribution, age of onset and prevalence. *Hum Hered* **43**, 288–294
- 18 US Renal Data System: Excerpts from the USRDS 2001 Annual Data Report (2001). *Am J Kidney Disease* **38** (Suppl 3), S1–S248
- 19 Carvalho M, Conceição I, Bentes C, Sales Luís ML (2002). Long-term quantitative evaluation of liver transplantation in familial amyloid polyneuropathy (Portuguese V30M). *Amyloid: J Protein Folding Disord* **9**, 126–133
- 20 Carvalho MJ, Lobato L, Ventura A, Beirão I, Rocha G, Seca R, Miranda HP, Silvestre F, Pereira MC, Guimarães S (2000). Remission of proteinuria following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy TTR Met30. *Transplant Proc* **32**, 2664–2666
- 21 Tashima K, Ando Y, Ando E, Tanaka Y, Ando M, Uchino M (1997). Heterogeneity of clinical symptoms in patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP TTR Met30). *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* **4**, 108–111
- 22 Maciel L, Carvalho MJ, Cotter J, Freitas J, Mota JC, Puig J, Falcão de Freitas A (1990). The heart in familial amyloidotic polyneuropathy: an overview. In Costa PP, Falcão de Freitas A, and Saraiva MJ (eds). *Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders*, pp. 285–289 (Arquivos de Medicina, Porto)
- 23 Olofsson BO, Backman C, Karp K, Suhr O (2002). Progression of cardiomyopathy after liver transplantation in patients with familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. *Transplantation* **73**, 745–751
- 24 Hüting J, Kramer W, Reittinger J, Kuhn K, Wizeman V, Schutterle G (1990). Cardiac structure and function in continuous ambulatory peritoneal dialysis: influence of blood purification and hypercirculation. *Am Heart J* **119**, 334–352
- 25 Furtado D, Gonçalves A, Carvalho O (1952). Paramiloidose de forma nevítica. *Jornal do Médico* **XX**, 977–983
- 26 Keven K, Öztas E, Aksoy H, Duman N, Erbay B, Ertürk Ş (2001). Polyglandular endocrine failure in a patient with amyloidosis secondary to familial Mediterranean fever. *Am J Kidney Dis* **38**, E39
- 27 Avram MM, Mittman N, Myint MM, Fein P (2001). Importance of low serum intact parathyroid hormone as a predictor of mortality in hemodialysis and peritoneal patients: 14 years of prospective observation. *Am J Kidney Dis* **38**, 1351–1357

- 28 Ning J, Sun M, Ikeda T (1999). Relationship between hypotension during hemodialysis and autonomic dysfunction in diabetic hemodialysis patients. *Hum Yi Ke Xue Xue Bao* **24**, 572–574
- 29 Zocalli C, Mallanci F, Tripepi G, Benedetto FA (2001). Autonomic neuropathy is linked to nocturnal hypoxaemia and concentric hypertrophy and remodeling in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 10–77
- 30 Besarab A, Raja RM (2001). Vascular access for dialysis. In J Daugirdas, PG Blake, TS Ing (eds). *Handbook of Dialysis*, pp 67–101 (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins)
- 31 Hezemans RL, Krediet RT, Arisz L (1995). Dialysis treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Neth J Med* **47**, 6–11
- 32 Lowrie EG, Lew NL (1990). Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and evaluation of death rate differences between facilities. *Am J Kidney Dis* **15**, 458–482
- 33 Churchill DN (1997). An evidence-based approach to earlier initiation of dialysis. *Am J Kidney Dis* **30**, 899–906
- 34 Churchill DN, Taylor DW, Cook RJ, LaPlante P, Barre P, Cartier P, Fay WP, Goldstein MB, Jindal K, Mandin H (1992). Canadian hemodialysis morbidity study. *Am J Kidney Dis* **19**, 214–234
- 35 Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A (2002). Immunoglobulin light chain amyloidosis and the kidney. *Kidney Int* **61**, 1–9
- 36 Ylinen K, Gronhagen-Riska C, Honkanen E, Ekstrand A, Metsarinne K, Kuhlback B (1992). Outcome of patients with secondary amyloidosis in dialysis treatment. *Nephrol, Dial and Transplant* **7**, 908–912



OUTCOMES

End-Stage Renal Disease in Familial Amyloidosis ATTR Val30Met: A Definitive Indication to Combined Liver-Kidney Transplantation

L. Lobato, A. Ventura, I. Beirão, H.P. Miranda, R. Seca, A.C. Henriques, M. Teixeira, A.M. Sarmiento, and M.C. Pereira

AUTOSOMAL dominant amyloidoses characterized so far are most commonly associated with transthyretin (TTR), a plasma protein synthesized by the liver.¹ The single gene for TTR² is located on human chromosome 18; more than 70 TTR mutations have been documented.³

The most common type of hereditary amyloidosis is familial amyloid polyneuropathy type I (FAP, Portuguese type), a neuropathic form associated with a substitution of methionine for valine at position 30 of the TTR gene, TTR Val30Met.⁴ The largest number of patients and families with this mutation has been identified in Portugal, but now it has been recognized worldwide.³

FAP in Portugal usually begins in the third or fourth decade of life with death occurring about 11 years later.⁵ The clinical disease usually starts as a sensory neuropathy in the lower extremities, but autonomic and gastrointestinal features may occur early. Motor neuropathy usually manifests itself later with cardiac conduction disturbances frequently leading to the need for artificial pacing. Vitreous deposits of amyloid have been reported, most particularly in Swedish families.⁶ Cachexia has been described as a significant factor in mortality.³ Orthotopic liver transplantation (OLT) is widely recommended for patients affected by FAP; it is recognized as the only specific treatment for this disease.⁷ Virtually all TTR is produced by the liver, and, therefore, OLT halts the supply of variant amyloidogenic TTR (ATTR).

Amyloid proteins have different organ specificity, leading to variations in clinical features. Classically, nephropathic and nonneuropathic autosomal dominant amyloidoses are associated with apolipoprotein A-I and A-II, fibrinogen

A α -chain, and lysozyme.⁸ Renal amyloidosis also has been described in FAP.⁹ In Portugal, approximately one third of FAP patients have clinical renal features with varying degrees of proteinuria and renal failure. The progression to end-stage renal disease (ESRD) occurs in 10% of Portuguese patients, more than 10 years after the onset of symptoms (Lobato et al, unpublished data). Although dialysis may prolong life, it does not prevent the progression of systemic amyloid involvement; death occurred, on average, at 22 months after renal replacement therapy. The cause was infection in one half of the patients (Lobato et al, unpublished data).

The first successful renal transplantation in a patient with renal amyloidosis was reported in 1968,¹⁰ but until now this treatment has been associated with poor graft and patient survival.¹¹ Most published series concerning renal transplantation in amyloidosis deal with familial Mediterranean fever or other forms of reactive amyloidosis (AA type).¹² The results of kidney transplantation in ATTR have not been described.

In patients with FAP undergoing dialysis, the potential advantages of simultaneous liver-kidney transplantation instead of isolated kidney transplantation are to avoid the progression of systemic manifestations and the recurrence of renal amyloidosis. The obstacles to renal transplantation

From the Department of Nephrology, and Liver Transplantation Program, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal.

Address reprint requests to L. Lobato, MD, Department of Nephrology, Hospital Geral de Santo António, Largo Professor Abel Salazar, 4050, Porto, Portugal. E-mail: llobato@nctcabo.pt

0041-1345/03/\$—see front matter
doi:10.1016/S0041-1345(03)00331-2

© 2003 by Elsevier Science Inc.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

in these patients are the presence of postural hypotension, advanced motor deficits, neurogenic bladder, and decubitus ulcers related to the long duration of the disease.

We report here on two Portuguese patients with familial amyloid neuropathy, TTR Val30Met, who underwent combined liver-kidney transplantation for ESRD caused by amyloidosis. Both patients have been followed up for more than 18 months after surgery. We analyzed their clinical course and main complications after the procedure.

PATIENTS AND METHODS

Selection of Patients

The reported patients were selected from a cohort of 22 subjects with FAP, all carrying the TTR Val30Met mutation and receiving dialysis during 1999. The two patients had family history of FAP, TTR amyloidosis in renal biopsy specimens shown by congophilic deposits with green birefringence under polarized light, and positive immunolabelling by anti-TTR monoclonal antibodies. Our conditions for combined liver-kidney transplantation were as follows: (1) ability to walk without aid or no more than one crutch to walk; (2) absence of permanent bladder catheter, (3) absence of neurogenic or decubitus nonhealing ulcers; (4) absence of dialysis-related syncope or persistent vomiting due to autonomic neuropathy; and (5) general conditions suitable for kidney and liver transplantation.

Immunosuppressive Protocol

Induction therapy included rabbit antithymocyte globulin (ATG; 3 mg/kg/d), cyclosporine (6 mg/kg/d), azathioprine (2 mg/kg/d), and prednisolone (500 mg intravenously followed by tapering doses until 0.5 mg/kg/d oral at day 6 after transplantation). Cyclosporine was adjusted to obtain trough blood levels between 150 ng/mL and 250 ng/mL (whole-blood, fluorescent polarization immunoassay) for the first 8 weeks. The long-term immunosuppressive regimen included cyclosporine maintaining trough blood levels between 100 and 150 ng/mL (using the same measurement technique), azathioprine (0.5–1 mg/kg/d), and prednisolone (10 mg/d during the first 2 years, 5 mg/d thereafter).

Antimicrobial Prophylaxis

Immediate posttransplantation antimicrobial prophylaxis consisted of teicoplanine (6 mg/kg/d every 72 hours for 1 week), aztreonam (500 mg every 8 hours for 3 days), trimethoprim (160 mg) and sulfamethoxazol (800 mg) every 24 hours, and nystatin mouth wash for 6 months. Antiviral therapy with ganciclovir 500 mg every 12 hours for 3 months was used to prevent cytomegalovirus infection. One year after transplantation, we started antimicrobial prophylaxis for urinary tract infection (UTI) with oral first generation cephalosporin or amoxicillin every 24 hours.

Clinical Procedures and Evaluation

The patients were offered combined liver and kidney transplantation using a single cadaveric donor who was ABO blood group compatible of 0 HLA match and with a negative crossmatch. A ureteral stent was placed at the time of renal transplantation and removed between the second and the third week after surgery. Our policy was to remove the urinary catheter at 1 or 2 weeks after removal of the ureteral stent, to avoid precocious urinary tract obstruction due to a neurogenic bladder in the presence of a stent.

Patients were discharged from the hospital when they were able to walk (alone or with aid) and to feed themselves. Daily physiotherapy was initiated 1 week after surgery and carried out during the first hospital stay; physiotherapy was maintained twice per week in the first 3 months after transplantation.

An accurate examination of the skin was performed routinely after transplantation. Superficial wounds, particularly in the extremities, were treated with topical chlorhexidine and fusidic acid adjunctive.

Patients were categorized according to a modified disability scoring system¹³ before transplantation and at the end of follow-up: score I, sensory disturbances in the extremities but preserved walking capacity; score II, difficulties walking without the need for a walking stick; score IIIA, one walking stick or one crutch required for walking; score IIIB, two walking sticks or crutches required; and score IV, patients in a wheelchair or bed-confined.

The symptoms of autonomic neuropathy were systematically questioned. Measurements of blood pressure and pulse rate in the recumbent and standing positions were recorded on each visit. Urinalysis with screening of proteinuria and bacteriuria were assessed at all visits. Criteria for antimicrobial therapy in UTIs included all positive cultures with more than 10⁵ bacterial colonies during the first 6 months, and symptomatic bacteriuria thereafter (pyuria and fever). One single urethral catheterization was recommended in case of a UTI with urinary residue.

Evaluation of amyloid involvement within the vitreous humor of the eye and two-dimensional and M-mode echocardiography were performed at least 6 months before transplantation and during the follow-up.

RESULTS

Patients' Characteristics

Patient 1. Patient 1 was a 44-year-old woman when first evaluated in 1994 and is of Portuguese ancestry. She had sinus bradycardia, hypertension, and nephrotic syndrome. Sensory neuropathy of the lower limbs and constipation began 1 and 2 years later, respectively. Renal biopsy specimen revealed extensive TTR amyloidosis. She had a strong family history of FAP (proved TTR Val30Met) and renal failure. Two years after presentation, a cardiac pacemaker was needed. Recurrent UTI and urinary incontinence were present since 1996; postvoid residual urine was estimated at 100 mL. The renal impairment progressed to ESRD and the patient commenced hemodialysis in December 1997. She became progressively fatigued, with alternating diarrhea-constipation and nocturnal fecal incontinence. Weight loss was estimated at 2 kg. Before transplantation she was score I for motor neuropathy, and, by this time, she showed palsy of dorsiflexion of the toes. Combined liver-kidney transplantation was performed in January 2000.

Patient 2. Patient 2, a man of Portuguese origin, was found to have sexual impotence at 32 years of age (1986). Inquiries revealed a younger sister with a peripheral neuropathy; TTR Val30Met mutation was identified in both. One year later he admitted constipation and disturbed micturition. Hyposthesia of the lower limbs began in 1991 and later diarrhea; when he was 37 years old. Difficulty in walking slowly progressed until one crutch was necessary in 1998 at which time he experienced daily and nocturnal

Table 1. Clinical Characteristics of Patients With FAP-I Who Underwent LKT

	Patient 1	Patient 2
Age at LKT (y)	50	46
Duration of disease at LKT (y)	6	14
Time on dialysis before LKT (mo)	25	12
Serum creatinine at 1 year after LKT (mg/dL)	1.4	1.0
Serum creatinine at end of follow-up (mg/dL)	1.3	1.3
Aspartate aminotransferase/serum alkaline phosphatase at end of follow-up (U/L)	35/31	29/67
Posttransplantation proteinuria	Absent	Absent
Hemoglobin at end of follow-up (g/dL)	11.8	14.4
Serum albumin before/after LKT (g/dL)	3.4/3.5	3.6/3.7
Hospital admissions related with infections	3	1
Time of follow-up after LKT (mo)	27	18
Outcome	Alive	Alive

Abbreviation: LKT, combined liver-kidney transplantation.

diarrhea. Proteinuria was detected during the year 6 of the disease, but by year 10 he had hypertension, urinary incontinence, nephrotic syndrome, and renal failure. Renal biopsy specimen showed vascular and mesangial amyloid deposits (ATTR) with advanced glomerulosclerosis. He reached end-stage renal failure and initiated hemodialysis in October 1999. Insertion of a cardiac pacemaker in the presence of first-degree atrioventricular block was performed in preparation for transplantation. Intermittent self-catheterization for optimal bladder drainage was initiated after 2 episodes of pyocystis in 2000; no urinary reflux was shown. Three months after dialysis was initiated, he developed a crisis of vomiting. The weight loss since disease onset was 9 kg (17%). His score for motor neuropathy was IIIA. He underwent simultaneous liver-kidney transplantation in October 2000.

Table 1 summarizes the clinical characteristics and outcomes after combined liver-kidney transplantation.

Posttransplantation Management and Morbidity

The early postoperative period was uneventful; the patients were admitted to the intensive care unit and discharged after 48 hours. Perioperative blood transfusions were 8 and 2 u for patients 1 and 2, respectively. The allografts had immediate function, although one short hemodialysis session was necessary to correct severe metabolic acidosis in patient 1. The native livers were found to be normal with scarce vascular amyloid deposits.

Both patients developed septicemia in the first week after transplantation (pulmonary and central catheter related) and urinary Candidiasis in the second week. No special problems were related to the management of surgical wounds. There were no episodes of rejection of either the renal or liver grafts. The patients were discharged with good graft function at 4 and 3 weeks after transplantation, respectively.

Patient 1 presented with a skin infection of the right foot after an accidental water burn in the second month after transplantation, which required surgical debridement, anti-

Table 2. Echocardiographic Measurements Before and After LKT

	Patient 1 Before LKT/After 24 mo	Patient 2 Before LKT/After 14 mo
Left ventricular end-diastolic diameter (N < 54 mm)	55/55	52/50
Posterior left ventricular wall thickness (N < 11 mm)	10/13	14/12
Interventricular septum (N < 11 mm)	12/13	13/13
Aortic root dimension (N < 39 mm)	24/27	34/37
Left atrial dimension (N < 38 mm)	44/45	49/48

Abbreviations: LKT, combined liver-kidney transplantation; N, normal value in adults.

biotics, and skin graft. Patient 2 developed a maleolar neurogenic ulcer during the first hospital admission, which completely healed with local care.

The postvoid residual urine volume was evaluated after urinary catheter removal; intermittent catheterization was performed if that volume exceeded 150 mL, or when ureteral dilation or hydronephrosis of the renal graft was present. Both patients developed recurrent UTI. There were four hospital readmissions, all caused by infections (UTI and skin), exclusively during the first posttransplantation year. The antimicrobial prophylaxis for UTI decreased the episodes of bacteruria and associated febrile episodes did not recur. Episodes of low blood cyclosporine levels were found to be related to transient uncontrollable diarrhea. We did not observe posttransplantation hypertension or hyperlipidemia. Treatment with human recombinant erythropoietin was suspended at 2.5 months after transplantation.

FAP Manifestations After Combined Liver-Kidney Transplantation

The clinical motor score and sensory deficits remained unchanged. Transient postural hypotension appeared concomitant with some UTI episodes during the first year after transplantation. We verified a progressive amelioration of bladder emptying; at the end of follow-up the postvoid urine volume was <50 mL. At the last observation, the patients continued to experience alternating diarrhea and constipation. A vomiting crisis appeared in patient 2 in the presence of a UTI. Both patients gained weight, 8 kg for patient 1 and 4 kg for patient 2. An active life was possible for patient 1, although with fatigue. Patient 2 ameliorated his social life and tolerance to effort.

Echocardiographic studies, before transplantation and after 24 and 14 months of follow-up, for patients 1 and 2 respectively, are detailed in Table 2. A "speckled" appearance of the myocardial wall was not observed and diastolic left ventricular function was considered normal. None of the patients showed vitreous opacities, glaucoma, or other ocular complications before or after transplantation.

DISCUSSION

ATTR Val30Met With ESRD is an Indication for Combined Liver-Kidney Transplantation

We have shown that simultaneous liver-kidney transplantation is useful for treatment of ESRD associated with the TTR Val30Met mutation. Technical problems during the liver or kidney transplantation have not been observed, neither have they required a long stay in the intensive care unit.

In general, patients with amyloidosis undergoing renal transplantation tolerate complications poorly and are at high risk of dying within the first 3 months.¹⁴ Deaths after isolated liver transplantation in FAP often occurred within 6 months after surgery (57%).¹⁵ Therefore, although our follow-up did not exceed 27 and 18 months, respectively, an important finding was the absence of early death, encouraging us to continue this therapy. Combined liver-kidney transplantation has been used for diseases that lead to end-stage failure of both organs, or in inherited metabolic disorders in which the primary defect is hepatic and leads to renal damage.¹⁶ This approach to systemic hereditary amyloidosis was detailed in two patients but both also had progressive liver dysfunction: one with fibrinogen α -chain Glu526Val mutation, and another with apolipoprotein AI Gly26Arg mutation.^{17,18} In familial amyloidosis related to TTR Val30Met mutation, liver amyloid deposits are scarce and progressive hepatic failure absent; OLT was done only to reduce the supply of amyloid fibrils.

In both patients, there was immediate graft function and an absence of rejection episodes. Abdominal pain and muscle weakness after renal transplantation have been reported in patients with amyloidosis, associated with high doses of cyclosporine.¹⁹ Induction therapy with ATG and long-term triple immunosuppressive regimen provide an option that allows early low cyclosporine doses and diminishing risks of rejection.

Early Posttransplantation Complications are Urinary and Skin Infections

Autonomic neuropathy causing urinary retention or incontinence represents an additional problem in kidney transplantation. The neurogenic bladder may exert deleterious effects on the renal graft. In patients with FAP with isolated liver transplantation, the origin of lethal septicemia was urinary in 71%, and urinary incontinence was associated with higher transplant mortality.¹⁵ Our policy of systematic evaluation of bacteriuria, intermittent self-catheterization in patients with incomplete voiding, surveillance of skin wounds, and long-term antimicrobial prophylaxis may explain the low number of hospital admissions related to infections. Urinary Candidiasis was observed early in the posttransplantation period, therefore prompt removal of ureteral stents is advisable. On the other hand, no other sources of infection were observed except the urinary tract and the skin.

Potential Benefits of Combined Liver-Kidney Transplantation in FAP

In patients with ESRD and FAP who underwent combined liver-kidney transplantation, we expect neither recurrence of amyloidosis in kidney graft nor deterioration of neuropathy. Although kidney transplantation has been described for severe amyloid TTR nephropathy,¹⁵ the outcome of the renal transplantation was not specified.

The recurrence rate of amyloidosis in the renal allograft, based on evidence from biopsy specimens, may reach 26% in patients who survive beyond 12 months after transplantation.¹² The recurrence of renal ATTR after liver-kidney transplantation in FAP is not expected: several reports consistently confirm a rapid and steady decrease of circulating mutated TTR in the serum after liver transplantation.^{12,20} Meanwhile, the progression of cardiomyopathy after liver transplantation among patients with FAP, TTR Val30Met, has been attributed to deposition of wild-type TTR-amyloid.²¹ The amyloid fibrils in the hearts of patients with FAP (including ATTR Val30Met), which died of terminal cardiac failure after liver transplantation, were composed of wild-type TTR and variant TTR at a ratio of 1:1.²² The kidney allograft, unlike the heart, is a genetically different organ without previous deposits, and thus recurrence of amyloidosis seems less probable.

In our experience, 50% of patients with FAP on regular hemodialysis die during the first year of therapy, and neuropathy progresses in all subjects (unpublished data). In ATTR liver-kidney recipients no deterioration of the motor deficit has been observed at present. Autonomic nervous dysfunction is a well-recognized complication of ESRD, whatever the etiology. A recent study failed to show complete normalization of the autonomic nervous system testing after kidney transplantation; however, there was a tendency to improve with the longevity of normal renal function.²³ Then, in FAP, the renal transplantation may represent an extra benefit for dysautonomy.

The long-term prognosis of patients with renal amyloidosis would appear to be dependent on the presence of cardiac amyloidosis and amyloidosis of the adrenals.¹² In both patients, echocardiographic findings before transplantation showed abnormal values in the left atrial dimension and in the interventricular septal thickness whereas signs of cardiomyopathy were present, the disorder did not represent a problem during the early posttransplantation period. In one patient, the left atrial dimension was increased and the thickness of the septal and left ventricular dimension increased after transplantation, as was previously described in the Swedish study with isolated OLT.²¹ Curiously, that was the patient with a shorter duration of disease and a lower score for motor neuropathy. More follow-up will be necessary to clarify whether those findings have a deleterious impact on renal graft function or patient survival.

In conclusion, the available data in selected patients, suggest that combined liver-kidney transplantation is recommended for ESRD in FAP TTR Val30Met. Early treat-

ment of UTI and skin infections after transplantation is mandatory to diminish early mortality. Autonomic dysfunction of the bladder represents an additional problem, but does not contraindicate transplantation. Recurrence of amyloidosis in the renal graft is not expected.

REFERENCES

- Costa RH, Lai E, Darnell JE: *Mol Cell Biol* 6:4697, 1986
- Wallace MR, Naylor SL, Kluve-Beckerman B, et al: *Biochem Biophys Res Commun* 129:753, 1985
- Benson MD: In: Scriver CR, Beaudet AK, Sly WS, et al (eds): *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2001p 5354
- Saraiva MJM, Birken S, Costa PP, et al: *J Clin Invest* 74:104, 1984
- Sousa A, Coelho T, Morgado R, et al: *Arquivos de Medicina* 3(suppl):351, 1990
- Sandgren O, Drugge U, Holmgren G, et al: *Clin Genet* 40:452, 1991
- Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, et al: *Lancet* 341:1113, 1993
- Uemichi T, Benson MD: In: Grateau G, Benson MD, Delpech M (eds): *Les Amyloses*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion; 2000, p 456
- Lobato L, Beirão B, Guimarães SM, et al: *Am J Kidney Dis* 6:940, 1998
- Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, et al: *N Engl J Med* 278:608, 1968
- Bleyer AJ, Donaldson LA, McIntosh M, et al: *Am J Kidney Dis* 37:1152, 2001
- Heering P, Hetzel R, Grabensee B, et al: *Clin Transplant* 12:159, 1998
- Suhr OB, Holmgren G, Steen L, et al: *Transplantation* 60:933, 1995
- Isoniemi H, Kyllonen L, Ahonen J, et al: *Transpl Int* 7(suppl 1):S298, 1994
- Adams D, Samuel D, Goulon-Goeau C, et al: *Brain* 123:1495, 2000
- Jeyarajah DR, McBride M, Klintman GB, et al: *Transplantation* 64:1091, 1997
- Gillmore J, Booth D, Rela M, et al: In Kyle RA, Gertz M (eds): *Amyloid and Amyloidosis*. Rochester, Minn: The Parthenon Publishing Group; 1999, p 270
- Gillmore J, Stangou A, Tennent G, et al: *Transplantation* 71:986, 2001
- Cohen SL, Boner G, Shmueli D, et al: *Nephrol Dial Transplant* 4:201, 1989
- Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, et al: *Clin Genet* 40:242, 1991
- Olofsson BO, Backman C, Karp K, et al: *Transplantation* 73:745, 2002
- Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, et al: *Biochem Biophys Res Commun* 274:702, 2000
- Kveder R, Kanolus A, Bren AF, et al: *Transplant Proc* 33:3394, 2001



Remission of Proteinuria Following Liver Transplantation for Familial Amyloid Polyneuropathy TTR Met30

M.J. Carvalho, L. Lobato, A. Ventura, I. Beirão, G. Rocha, R. Seca, H.P. Miranda, F. Silvestre, M.C. Pereira, and S. Guimarães

THE COMMONEST form of hereditary amyloidosis is familial amyloid polyneuropathy (FAP), inherited in an autosomal dominant mode. Portugal is the location of the world with the highest prevalence of the disease. The amyloid precursor transthyretin (TTR) is predominantly expressed in the hepatocytes. In Portugal the mutation TTR Val30Met is associated with almost all registered cases of FAP. Orthotopic liver transplantation (OLT) leads to the production of normal TTR and should arrest the pathologic process. OLT is regarded as the treatment of choice for this disease.¹

A peripheral sensitive motor and autonomic neuropathy is the main clinical picture. Amyloid transthyretin-related nephropathy was recognized in this decade. About 30% of the patients of the main areas of FAP have renal manifestations (renal failure, proteinuria).² Nephropathy can occur early in disease presentation. Proteinuria is correlated, upon renal biopsy, with extensive glomerular and vascular amyloid deposition. Tubular and interstitial involvement of renal medulla were present in all FAP patients and were not related to kidney features.³

Preoperative renal dysfunction, nephrotoxicity of agents used, and infectious disease can predispose the OLT receptor to acute renal failure and progression to chronic renal failure. In our program renal insufficiency and proteinuria > 1 g/d were usually exclusion criteria to OLT for FAP.

The aim of this study was to analyze the effect of renal disease on OLT amyloid receptors. For this purpose we selected four patients with FAP TTR Val30Met, proteinuria >1 g/d, and glomerular and vascular amyloid deposition on renal biopsy. We report their clinical evolution after transplantation.

PATIENTS AND METHODS

In our institution, the first liver transplantation for FAP dates from April 1996. Since then 67 patients (39 men, 28 women) aged 24 to 53 years were operated. Mean evolution of the disease was 5 years. Autonomic and sensorial neuropathy was present in all and only three patients had absence of motor neuropathy.

Preoperative evaluation and follow up was performed by the same nephrology, neurology, and transplant team. One of our patients was referred and transplanted in the Toronto Hospital, but was studied and followed by us. In the clinical assessment of renal disease we used serum creatinine and urea, microalbuminuria and proteinuria, creatinine clearance, glomerular filtration rate estimated by ^{99m}TcDTPA, and renal and bladder ultrasonography with estimation of residual urine volume. Renal histomorphologic findings were evaluated in all patients. Biopsy specimens were submitted to Congo red staining and immunohistochemistry with a monoclonal anti-TTR antibody.

The induction immunosuppressive regimen was cyclosporine A (CsA), azathioprine (Aza), and prednisolone (Pred). Maintenance immunosuppression was based on CsA.

The studied patients were aged 33 to 47 years at the OLT. The evolution of FAP was 4 to 7 years before OLT. The recipients were followed between 10 and 38 months.

From the Department of Nephrology, Liver Transplantation Program, and Department of Pathology, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal.

Supported by grant 257/97 from the Ministry of Health, Comissão de Fomento para a Investigação.

Address reprint requests to Maria João Carvalho, MD, Department of Nephrology, Hospital Geral de Santo António, Largo Professor Abel Salazar, 4050, Porto, Portugal. E-mail: llobato@esoterica.pt.

Table 1. Renal Data on Four Patients With Proteinuria Submitted to OLT

Patient	Pre-OLT Proteinuria (g/d)	Pre-OLT Creatinine (mg/dL)/GFR-DTPA (mL/min)	Follow up (mo)	Post-OLT Proteinuria	Post-OLT Creatinine (mg/dL)/Creatinine Clearance (mL/min)
1	1.7	1.4/78	—	—	—
2	1.7	0.8/81	23	0.3 g/L	1.1/37
3	2.1	1.0/91	38	Absent	1.7/36
4	6.0	1.1/91	10	0.2 g/d	1.8/24

RESULTS

The clinical and pathologic findings, and postoperative outcome are presented. The data are summarized in Table 1.

Case 1

A 44-year-old male had autonomic and sensorial symptoms since 1992, and motor manifestations since 1995. One year later proteinuria was detected. There is a history of two urinary tract infections (UTI) in 1997. The patient had normal blood pressure, without orthostatic hypotension. There was a family history of several relatives with nephropathy; the patient's father died with chronic renal failure.

Laboratory values before OLT were proteinuria 1.7 g/d, serum creatinine 1.4 mg/dL, creatinine clearance 78 mL/min, and glomerular filtration rate estimated by ^{99m}Tc -DTPA 84 mL/min. Renal features were normal on ultrasound scan; residual urine volume was 190 mL. Renal biopsy disclosed extensive TTR amyloid deposition in more than 50% of the mesangium, vascular pole and arteriolar structures; involvement of interlobular arteries.

OLT was performed on October 12, 1997. The patient died during surgery due to technical complications.

Case 2

A 41-year-old male had autonomic and sensorial symptoms since 1989. In 1995 he had motor neuropathy with preserved walking ability. Proteinuria had been known since 1996. There was an absence of UTIs. The patient had orthostatic hypotension. Standing blood pressure (BP) was 110/60 mm Hg. The patient's family history was positive for FAP; renal disease was not evaluated in the deceased father (the affected parent).

Laboratory values before OLT were proteinuria 1.7 g/d, serum creatinine 0.8 mg/dL, creatinine clearance 46 mL/min, and glomerular filtration rate estimated by ^{99m}Tc -DTPA 81 mL/min. Renal features were normal on ultrasound scan; residual urine volume was 156 mL. Renal biopsy revealed extensive TTR amyloid deposition in more than 50% of mesangium, vascular pole, and arteriolar structures.

OLT was performed on November 21, 1997. There was initial poor graft function, recovered 15 days post-OLT; there was no acute rejection. There were no episodes of acute renal failure. He had recurrent UTI, with urinary residue and long-term catheterization. We verified absence of motor neuropathy progression and improvement of gastrointestinal disturbances, gaining 4 kg body weight. Standing BP was 122/80 mm Hg.

Twenty-three months after OLT, laboratory values were as follows: proteinuria 0.3 g/L (microalbuminuria 76 mg/g creatinine), serum creatinine 1.1 mg/dL, creatinine clearance 37 mL/min (24 hours urine with bladder catheter); CsA 83 ng/mL. Good graft function was observed. Maintenance immunosuppressive therapy was with CsA and Pred.

Case 3

A 33-year-old male had autonomic and sensorial symptoms since 1989. In 1995 the patient needed one walking strike.

Proteinuria had been known since 1995. There was an absence of UTI. There was normal BP without orthostatic hypotension. The family history was positive for FAP; renal disease was not evaluated in the deceased father (the affected parent).

Laboratory values before OLT were proteinuria 2.1 g/d, serum creatinine 1.0 mg/dL, creatinine clearance 90 mL/min, and glomerular filtration rate estimated by ^{99m}Tc -DTPA 91 mL/min. Renal features were normal on ultrasound scan; residual urine volume was 52 mL. Renal biopsy showed TTR amyloid deposition in 25% of mesangial areas and vascular pole structures.

OLT was performed on July 14, 1996. One acute rejection episode was treated with methylprednisolone pulses. There was no acute renal failure. There was an absence of UTI. We verified stabilization of motor neuropathy. Complete relief from lancinating pain in the legs and improvement of autonomic nervous system complaints. BP was normal. The patient was extremely sensitive to lower levels of CsA; for good graft function levels usually higher than 190 ng/mL.

Thirty-eight months after OLT, laboratory values were as follows: microalbuminuria 13.2 mg/g creatinine, serum creatinine 1.7 mg/dL, creatinine clearance 36 mL/min, and CsA 220 ng/mL. Good graft function was observed. Maintenance immunosuppressive therapy was with CsA and Aza.

Case 4

A 47-year-old male had autonomic and sensitive symptoms since 1994. There was an absence of motor neuropathy. The patient had proteinuria in 1998. There was an absence of UTI. There was normal BP, without orthostatic hypotension. The patient's family history was negative for FAP, but the father was an old asymptomatic gene carrier of the same TTR mutation.

Laboratory values before OLT were proteinuria 6 g/d, serum creatinine 1.1 mg/dL, creatinine clearance 111 mL/min, and glomerular filtration rate estimated by ^{99m}Tc -DTPA 81 mL/min. Renal features were normal on ultrasound scan; there was no residual urine volume. Renal biopsy disclosed extensive TTR amyloid deposition in 50% to 100% of mesangial areas, vascular pole and arteriolar structures, with interlobular arteries involvement; absence of sclerosed glomeruli.

OLT was performed on November 24, 1998. There were no acute rejections episodes. There was an absence of acute renal failure and UTI. Improvement of gastrointestinal complaints was observed. Sensory neuropathy did not progress and the patient remains without motor neuropathy. He presented a raised blood pressure (160/100 mm Hg), requiring therapy with nifedipine CR 30. Full working ability was maintained.

Ten months after OLT laboratory values were as follows: proteinuria 0.2 g/d, serum creatinine 1.8 mg/dL, creatinine clearance 24 mL/min, and CsA 256 ng/mL. There was good graft function. Maintenance immunosuppression was with

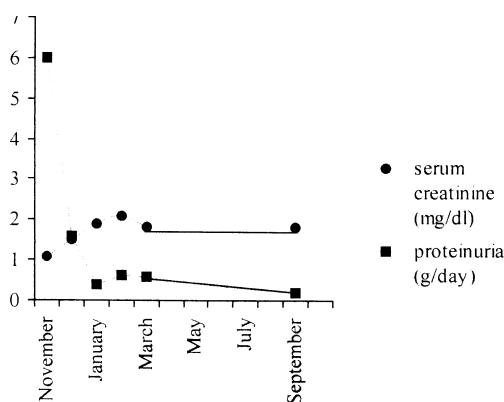


Fig 1. Evolution of serum creatinine and proteinuria after OLT. OLT was performed on November 1998; at the 2nd month we verified a relevant decrease of proteinuria and elevated serum creatinine.

CsA and Pred. Evolution of serum creatinine and proteinuria after OLT is detailed in Fig 1.

DISCUSSION

Since liver transplantation was introduced as a treatment for FAP, follow-up data of transplant recipients with Val30Met mutation showed stabilization or improvement of peripheral and autonomic neuropathy.⁴ Concerning kidney disease, consensus was that acute renal failure superimposed in a previously damaged organ led to morbidity in the postoperative period. Renal failure and renal failure requiring dialysis are associated, in some circumstances other than FAP, with lower post-OLT patient and graft survival.⁵ We could expect that the serious (cases 1, 2, and 4) and early (case 4) amyloid deposition in the kidney might be related to higher rates of posttransplant dialysis. Following OLT, in FAP TTR Val30Met, the course of heavy proteinuria with predominant glomerular and vascular TTR amyloid deposition was not described. We reported four patients in the last clinical and pathologic conditions.

In our experience the history of FAP nephropathy manifested as proteinuria higher than 2 g/d was end-stage renal failure in the next 2 to 5 years. This course was usually accompanied by low serum albumin levels, poor nutritional state and, as expected, progressive neuropathy.

Amyloid deposits imaged by serial serum amyloid P component (SAP) scintigraphy indicate that visceral deposition, as in the kidney, remained stable or gradually regressed after OLT; the amyloidogenic processing of TTR (namely wild-type TTR) seems not to progress in the kidney of TTR Val30Met patients.⁶ We know that renal distribution and extent of amyloid deposits, based on biopsy observations,³ varied among FAP patients. Deposition in the medulla could be established early but there was no correlation with renal impairment. Serious glomerular and

vascular involvement did not correlate with neurologic disease and, as in cases 1 and 4, nephropathy or old asymptomatic carriers were found in the family; in cases 2 and 3, renal study of the affected parent was not possible. SAP scintigraphy also corroborates that the quantity of tracer in the visceral organs did not correlate with neurological impairment,⁷ but with regard to the kidneys distribution of deposits, they were not clarified.

This study showed that proteinuria had no important effect on posttransplant morbidity; the liver graft maintains a good function and extracorporeal depurative methods were unnecessary. The death of case 1 was not attributable to nephropathy.

The remission of proteinuria, early in the posttransplant period (see Fig 1) could not be attributed to amyloid regression. Proteinuria related to amyloid was not sensitive to steroids. Cyclosporine therapy may cause time-related nephrotoxicity associated with different forms of clinical and pathologic findings. Considering the absence of acute renal failure, low values of proteinuria, and deterioration of renal function, a vascular-interstitial form of CsA toxicity superimposed on functional toxicity may explain our findings. The patient with more serious renal lesions developed hypertension. Stimulation of the adrenergic system with increased renal nerve activity was not expected in FAP as part of functional CsA toxicity.

Slowly progression deterioration of renal function occurred. Serum creatinine and creatinine clearance were not sensitive to detect nephron loss.⁸ Extensive glomerular and arteriolar lesions in FAP proteinuric patients could represent an handicap to long-term kidney survival. Immunosuppressive regimens using high conventional levels of CsA 2 months post-OLT are common. These patients could represent a group for alternative therapy trying to avoid CsA toxicity during the first year after OLT.

Early detection of FAP nephropathy, before progression to chronic renal failure, was necessary to minimize the deleterious effects of CsA. This point could attribute to these candidates a different allocation in the transplant lists. Patients with proteinuria seemed to benefit with OLT, specially if we considered natural history of nephropathy.

REFERENCES

1. Lewis WD, Skinner M, Simms RW, et al: *Clin Transplantation* 8:107, 1994
2. Lobato L, Guimarães SM, Beirão I, et al: In Kyle RA, Gertz MA (eds): *Amyloid and Amyloidosis*. Rochester, Minn: Parthenon Publishing; 1998, p 270
3. Lobato L, Beirão I, Guimarães SM, et al: *Am J Kidney Dis* 31:940, 1998
4. Bergethon PR, Sabin TD, Lewis D, et al: *Neurology* 47:944, 1996
5. Brown RS, Lombardero M, Lake JR: *Transplantation* 62:1788, 1996
6. Stangou AJ, Hawkins PN, Heaton ND, et al: *Transplantation* 66:229, 1988
7. Rydh A, Suhr O, Hietala S, et al: *Eur J Nucl Med* 25:209, 1998
8. Myers BD: *Kidney Int* 30:964, 1986

VI - DISCUSSÃO GLOBAL

 reconhecimento da existência da nefropatia na PAF definiu uma expressão fenotípica até agora desconhecida. O estudo morfológico, a epidemiologia clínica e genética levaram ao reconhecimento das características que predisõem às manifestações renais na PAF. As opções terapêuticas abriram agora uma nova perspectiva na adversidade da doença renal crônica.

1. O padrão estrutural do rim

A morfologia renal por depósitos de amiloide associados à TTR constitui um suporte fundamental para definir a nefropatia como entidade. Compromisso estrutural do rim sem expressão clínica, era o paradigma prévio ao trabalho desenvolvido nesta tese.

O nosso estudo (artigo 1) demonstrou que os locais preferenciais de deposição na ATTR V30M são o mesângio e a medula. Os depósitos renais de amiloide estavam presentes em todos os doentes. O envolvimento mesangial e vascular associou-se à presença de nefropatia clínica. A ausência de relação desta com o envolvimento tubular ou intersticial foi inequívoca, esclarecendo assim uma questão antiga.

Outros trabalhos já abordaram a relação entre a morfologia renal e a clínica nas amiloidoses. Nas formas AA e AL a correlação entre a extensão do envolvimento renal por amiloide e a excreção de proteínas não tem sido concordante [1, 2, 3]. Considera-se que no tipo AA as lesões vasculares e tubulointersticiais são mais marcadas, não se relacionam com proteinúria grave, mas determinam a evolução para a IRCT [4, 5]. No tipo AL tem sido descrita uma deposição mesangial difusa, ao longo das duas vertentes da membrana basal glomerular, com predomínio da síndrome nefrótica [2]. Estas análises foram realizadas em doentes com estados avançados de expressão clínica. Em nenhum estudo anterior ao nosso foram pesquisados os depósitos renais na amiloidose por TTR, numa fase pré-clínica e na de nefropatia manifesta (artigos 1 e 3).

A deposição glomerular na ATTR V30M inicia-se na matriz mesangial, pois na fase de microalbuminúria já há evidência de substância amiloide neste local (artigos 1 e 3). O envolvimento de vasos de médio calibre surge geralmente na presença de nefropatia clínica. Estas alterações são partilhadas pelas formas AA e por algumas das amiloidoses nefropáticas hereditárias [6]. Já o compromisso medular na ATTR V30M é uma característica

que a distingue das outras amiloidoses hereditárias. O frustre envolvimento dos tubos contornados proximais e a ausência de depósitos no interstício cortical são outras das suas particularidades. O tropismo da TTR por determinadas estruturas renais pode ter origem em diferenças de concentração do precursor amiloidogénico, em factores intrínsecos à proteína ou em condições tecidulares.

2. Mecanismos que podem intervir na distribuição dos depósitos

Abordaremos as hipóteses que poderão explicar as afinidades da variante TTR V30M pela medula renal e as circunstâncias subjacentes à variação individual dos depósitos glomerulares.

2.1 Deposição medular

No rim humano normal não foi detectado o ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) da TTR, mas foi documentada a imunoreactividade para aquela proteína nas células epiteliais do tubo proximal [7, 8]. A internalização da TTR no tubo proximal é atribuída à megalina [9], uma glicoproteína expressa nas membranas apicais destes tubos. Com técnicas imunohistoquímicas de microscopia óptica também demonstrámos a presença de TTR nas células epiteliais proximais de doentes com PAF, corroborando a reabsorção da proteína no filtrado glomerular (artigo 1). No entanto, no rim normal, a filtração pelo tamanho implica que substâncias acima de 60 kDa sejam retidas pela barreira glomerular. O tetrâmero da TTR tem cerca de 60 kDa, estando no limite da filtração. Nos doentes com PAF, a dissociação da TTR mutante em monómeros poderia permitir uma filtração glomerular mais elevada da proteína perturbando a sua internalização pela megalina. Uma das hipóteses que poderia explicar a deposição de TTR mutante em locais mais distantes do nefrónio seria uma concentração muito elevada da proteína amiloidogénica no fluido tubular da medula, admitindo que o seu normal metabolismo de reabsorção estivesse alterado.

A riqueza da medula em glicosaminoglicanos e colagénio tipo I pode concorrer também para um meio favorável à estabilidade de fibrilas e aumento progressivo dos depósitos. O próprio meio medular pode ser propício à amiloidogénese pela concentração de ureia neste local. A ureia reduz o tempo de formação do núcleo com rápido crescimento da fibrila [10]. Sabe-se ainda que o pH influencia a formação de agregados fibrilares tanto de cadeias leves como de TTR V30M [11, 12]. O ambiente ácido da medula contribuiria para

a deposição local, pois a acidez desestabiliza as proteínas, acelera a sua cinética e agregação [13].

2.2 Deposição glomerular

Os depósitos glomerulares na ATTR V30M predominam na área mesangial; apenas num caso os depósitos vasculares não estiveram associados aos anteriores. Na fase de microalbuminúria já existem lesões estruturais no rim. Tentaremos explicar os mecanismos subjacentes às lesões histopatológicas iniciais encontradas nos doentes com microalbuminúria.

A proteinúria glomerular resulta de alterações da permeabilidade e selectividade da parede capilar glomerular. À microalbuminúria associam-se distúrbios na barreira iónica dos capilares glomerulares. A detecção de proteinúria já implica uma perturbação da selectividade pelo tamanho e alterações estruturais glomerulares mais importantes [14]. A membrana basal glomerular (MBG) desempenha um papel fundamental na manutenção da carga electrostática da parede capilar. Uma das doenças em que a microalbuminúria se relaciona com perturbações da constituição da MBG é a diabetes *mellitus* [15].

O aparecimento precoce de depósitos mesangiais de amiloide poder-se-á associar a factores intrínsecos àquela estrutura renal. As variações morfológicas individuais podem ter origem em perturbações do meio ambiente próximo da MBG, na arquitectura do meio mesangial e dos seus componentes próprios, ou em componentes extrínsecos ao meio.

Perturbações próximas à MBG

Como hipótese, a microalbuminúria seria condicionada pela deposição inicial de amiloide junto à MBG. A doença clínica renal manifestar-se-ia quando um conjunto de factores modificadores de progressão se mantivessem e os depósitos se expandissem ao mesângio. No entanto, sabemos que na fase de microalbuminúria já existem depósitos mesangiais de amiloide (artigo 1 e 3), implicando que as alterações de permeabilidade e selectividade teriam de acontecer ainda numa fase mais precoce. A histopatologia do nervo realizada em portadores assintomáticos pode ajudar a esclarecer a sequência de eventos tecidulares. Na PAF, a extensão de amiloide endoneural não parece ter uma relação clara com o grau de perda de fibras [16]. O estudo de fragmentos de biópsia do nervo sural de porta-

dores assintomáticos da mutação mostrou a existência de TTR na forma de pequenos agregados não fibrilares, com fibras de densidade normal e sem degenerescência [17]. Estes agregados foram considerados citotóxicos pela presença de marcadores de inflamação. Tal como no nervo, no rim poderiam existir fenómenos inflamatórios locais por agregados não fibrilares de TTR, favorecedores de lesões na MBG, microalbuminúria e de progressão de lesão.

Perturbações da arquitectura mesangial e dos seus componentes

Outra explicação possível residiria nas variações dos componentes da matriz extracelular induzidas pelos agregados de TTR, fossem elas aumento de produção ou diminuição do *turn-over*. Os depósitos de amilóide a nível tecidular são complexos, sendo comum a co-deposição de apolipoproteína E (apoE), componente P, proteoglicanos (geralmente heparano-sulfato ou condroitina-sulfato), colagénio, laminina e entactina [18]. À excepção da apoE, todos estes componentes são constituintes da matriz mesangial podendo contribuir para a iniciação e progressão da amiloidose no mesângio.

Os proteoglicanos, nomeadamente o heparano-sulfato, têm sido descritos como importantes componentes na promoção da fibrilogénese [19, 20]. O glomérulo, particularmente a MBG, é rico em proteoglicanos. Se retirarmos alguns ensinamentos da nefropatia diabética, o papel do heparano-sulfato pode tornar-se controverso na amiloidose renal. A redução do heparano-sulfato induzida pela hiperglicemia leva a perturbações da barreira iónica de filtração da membrana basal glomerular permitindo a passagem de albumina para o filtrado glomerular [21, 22]. Na amiloidose, não esperamos que haja redução do heparano-sulfato na membrana basal pelos mesmos mecanismos da diabetes, mas a existência de microalbuminúria como manifestação inicial faz-nos supor que aquela não possui as suas propriedades normais de filtração. Os agregados não fibrilares de amilóide podem, senão reduzir o heparano-sulfato, alterar a sua organização, favorecendo modificações da barreira glomerular.

A correlação entre manifestações histológicas e a permeabilidade capilar também foi estudada na nefropatia por imunoglobulina A (IgA) [23]. Neste trabalho, as alterações da permeabilidade capilar glomerular correlacionaram-se com o grau de esclerose mesangial. Na ATTR os mecanismos de microalbuminúria e proteinúria poderão relacionar-se com esclerose precoce, induzida por agregados não fibrilares.

Outros estudos serão necessários, nomeadamente imunohistoquímicos e ultraestruturais, para caracterizar os componentes de membrana basal eventualmente ausentes, o excesso de proteínas de matriz, e a existência de agregados não fibrilares em fases precoces de nefropatia.

Componentes extrínsecos ao meio

Componentes não fibrilares associam-se à proteína precursora nos depósitos de amiloide. O componente P, com importância aparente nas formas AA, não foi considerado primordial na progressão da amiloidose renal. O estudo de ratinhos transgénicos portadores da mutação humana da TTR e do gene humano do componente P (este em hetero ou homozigotia) não demonstrou diferenças na progressão, nem na distribuição tecidual de amiloide, incluindo a deposição renal [24].

Uma hipótese para explicar o envolvimento glomerular precoce e sua progressão poderia residir na existência de receptores dos produtos de glicolização avançada (RAGE) e de produtos de glicolização avançada (AGE) na MBG e no mesângio. Estes produtos resultam da exposição de proteínas ou lípidos a glicolização não enzimática e a oxidação. Os AGE têm importante contributo na glomerulopatia diabética [25]. Em estudo imunohistoquímico do tracto gastrointestinal de doentes com PAF, a distribuição dos RAGE e AGE correlacionou-se com a distribuição dos depósitos de amiloide, sendo proposta uma interacção RAGE-AGE ou RAGE-TTR como um mecanismo etiopatogénico na disfunção gastrointestinal [26]. Estudo anterior já demonstrava que a TTR tinha afinidade para os RAGE e subsequentemente induzia a activação do factor de transcrição nuclear κB (NF- κB), um marcador de apoptose [27]. As fibrilas de TTR associadas às superfícies celulares dos doentes com PAF, ao contribuírem para a activação do NF- κB seriam promotoras de neurodegeneração. No rim de doentes com PAF não foi ainda estudada a distribuição RAGE-AGE, RAGE-TTR e a presença do marcador de apoptose NF- κB . Seria interessante comparar esta distribuição nos doentes com e sem nefropatia.

A procura dos factores que possam condicionar a progressão das lesões renais tem de ser integrada nas características epidemiológicas da população com PAF e nefropatia.

3. Redefinição da nefropatia

A sequência de trabalhos desenvolvidos nesta tese permitiu a identificação clara de doença renal em cerca de um terço dos doentes (artigo 2), contrariando em absoluto a descrição anterior da sua raridade. A revisão exaustiva de todas as histórias familiares pertencentes à Póvoa de Varzim, Vila do Conde, Barcelos e Braga permitiu identificar 39 doentes com nefropatia e 3 insuficientes renais crónicos terminais, entre 461 doentes registados no CEP e falecidos antes de 1989. Estes números reflectem a ausência anterior de avaliação sistemática da proteinúria e da função renal.

O estudo epidemiológico definiu um grupo de doentes propensos à apresentação de nefropatia e IRCT. A sua identificação equaciona a necessidade de um seguimento específico dos portadores assintomáticos da mutação e, na presença de proteinúria, impõe opções terapêuticas atempadas (artigo 6). Identificamos o curso da doença, as complicações possíveis associadas à IRCT e à diálise, de modo a obter linhas de orientação para tratamento a longo prazo (artigos 4 e 5).

3.1 Interpretação dos resultados da epidemiologia clínica

Os resultados que obtivemos, diferentes dos anteriormente descritos, não foram dissociados da metodologia aplicada. As medidas utilizadas para avaliar o número de doentes com nefropatia foram baseadas no estudo de áreas geográficas bem definidas e locais de origem familiar mais frequentes no norte de Portugal [28]. A duração do estudo foi prolongada (11 anos), com data de início de colheita de dados suficientemente remota, permitindo que maior número de casos fosse reconhecido. As informações obtidas não tiveram origem unicamente no registo hospitalar, mas também nos médicos de família, outros hospitais e centros de hemodiálise. A equipa fixa de estudo assegurou um diagnóstico e uma classificação fenotípica homogénea. Os dados foram sempre integrados em contexto familiar, de modo a determinar em portadores sintomáticos a variabilidade intrafamiliar do fenótipo patológico. No entanto, podemos ter ainda falhado diagnósticos em portadores assintomáticos idosos ou em indivíduos mais jovens conhecedores do seu estado de portador mas que nunca frequentaram a consulta da unidade. Estes factos não podiam ser eticamente superáveis.

No conjunto das três áreas geográficas a proporção de doentes com *versus* sem nefropatia foi 1:2,7 e em cada 3 sujeitos nefropatas um evoluiu para a IRCT. Nas famílias em

que o probando era insuficiente renal crónico terminal a proporção de doentes com nefropatia foi mais elevada, 1:1,7 (artigo 2). O sexo (feminino), a idade de início (aos 40 anos ou mais) e a história familiar (positiva) de nefropatia foram as variáveis independentes associadas ao desenvolvimento de doença renal (artigo 2). Discutiremos a preferência da doença renal pelo sexo feminino e idades mais avançadas, e em seguida os modelos que possam integrar a história familiar como factor de risco para a nefropatia.

Diferenças entre sexos

Na Póvoa de Varzim e Vila do Conde, maior foco de doença em Portugal, a proporção homens-mulheres foi avaliada em 1,3:1 [28]. No nosso estudo, na mesma área, verificamos que nos doentes com nefropatia houve, pelo contrário, um predomínio de mulheres (proporção 1:2,8), diferença que se esbateu no local de origem dos sujeitos com idades de início mais tardias (1,2:1 em Braga). Esta semelhança, entre o número de homens e mulheres afectados por nefropatia na área com a média de idades de início mais avançadas, poderá estar associada a uma penetrância mais baixa nas mulheres, sobressaindo o número de homens. Nos outros locais poderá haver representação de maior número de mulheres nefropatas porque, sendo a penetrância da doença mais elevada, a probabilidade de estarem doentes é maior. No entanto, apesar desta hipótese servir para explicar variações nos diferentes locais de estudo, o risco aumentado de nefropatia nas mulheres não fica esclarecido.

No Japão foram comparados os probandos de início tardio (mais de 50 anos) e origem nas áreas não endémicas de PAF, com os doentes de início precoce provenientes das áreas endémicas [29]. Os autores descreveram uma preponderância do sexo masculino (proporção de homens-mulheres 10,7:1) nos probandos com início tardio. Naquele trabalho é interessante o predomínio de mulheres (1:1,8) entre os irmãos dos probandos portadores da mutação e sem sintomas, metade deles com mais de 50 anos. Nas áreas endémicas do Japão a proporção de homens-mulheres foi determinada em 1,7:1. Os estudos bioquímicos de sangue e urina foram considerados normais por aqueles autores, embora não tenham sido especificados os valores de função renal ou de proteinúria. Este estudo reforça a menor de penetrância da neuropatia nas mulheres.

Como explicar então a preponderância da doença renal no sexo feminino? As mulheres podem apresentar uma distribuição inicial dos depósitos tecidulares diferente, com

deposição orgânica mais precoce que a neurológica. Essa deposição originaria uma doença renal mais agressiva, sendo o curso com proteinúria nefrótica e insuficiência renal mais frequente (artigo 2). A associação do sexo feminino ao envolvimento orgânico parece exprimir-se também pela necessidade de implantação de *pacemaker* mais cedo, em fases menos avançadas de neuropatia (artigo 4). Em estudos de autópsia de doentes japoneses, as alterações patológicas de maior relevo em três casos de início tardio foram a deposição cardíaca, renal e tireóideia proeminentes, com depósitos ligeiros a moderados nos nervos periféricos e autonómicos [30]. Estes achados corroboram a distribuição não uniforme da amilóide.

Na amostra global dos doentes com PAF, o sexo masculino associou-se a idades de início e morte mais precoces [28]. No nosso estudo não encontramos diferenças significativas entre os sexos na idade de início da doença, na idade de início de diálise, e no tempo de progressão para a IRCT (artigo 4). Os dados obtidos reforçam que as mulheres, habitualmente com início mais tardio, quando apresentam nefropatia estão menos protegidas e, ao contrário ao que é descrito noutras doenças renais, não tiveram uma progressão mais lenta para a IRCT.

As observações em animais de experimentação e em humanos têm mostrado que a progressão da doença renal é influenciada pelo sexo. A deterioração da função renal é mais acelerada nos homens, independentemente do valor da tensão arterial, dos níveis séricos de colesterol e da ingestão proteica [31, 32]. Uma meta-análise envolvendo 68 estudos e 11345 doentes mostrou que nos homens, independentemente da etiologia da doença renal, o declínio da função renal é mais rápido do que nas mulheres [33], determinando um predomínio do sexo masculino nos doentes em diálise. Também em indivíduos normotensos diabéticos, o sexo masculino foi considerado um factor independente para a progressão da nefropatia [34].

Na nefropatia de IgA, doença com particular envolvimento mesangial, o sexo masculino e a idade de início tardia foram considerados factores de pior prognóstico [35]. A maioria dos estudos na nefropatia de IgA tiveram como base uma análise univariada, mas quando pesquisamos trabalhos usando análise multivariada encontramos no sexo feminino um maior risco de progressão para a IRCT [36, 37].

Na doença renal poliquística autossómica dominante (DRPAD) a média de idades no início de diálise foi descrita como sendo cinco a seis anos mais tarde nas mulheres em rela-

ção aos homens [38]. Em estudo japonês sobre DRPAD, os homens iniciaram diálise mais precocemente que as mulheres, mas a diferença de idades foi menor do que nas outras nefropatias, sugerindo uma menor protecção do sexo feminino nesta patologia. No entanto, nenhuma explicação foi avançada para explicar estes dados [39].

Vários são os estudos em que há tentativa de esclarecimento da susceptibilidade do sexo masculino para a doença renal e sua progressão. Além das diferenças genéticas inerentes aos dois sexos, as hormonas sexuais parecem intervir directamente na patogenia da progressão da doença renal. Os mecanismos implicados incluem efeitos mediados pelos receptores de hormonas sexuais na hemodinâmica glomerular e proliferação celular mesangial, bem como a acumulação de matriz mesangial através de alterações da síntese ou degradação de colagénio e proteoglicanos [40]. Os estrogénios podem ser renoprotectores exercendo acção anti-oxidante no ambiente mesangial, pelo efeito que têm na síntese ou libertação de citocinas e factores de crescimento [40]. O estradiol reverte o efeito na apoptose das células mesangiais pelo TGF- β 1, bem como a estimulação da síntese de colagénio IV [41]. Ao estradiol foi também atribuída a estimulação da expressão do *vascular endothelial growth factor* (VEGF), associado à manutenção de uma vascularização intra-renal normal [42].

Já tínhamos sugerido no artigo 2, como explicação para o desenvolvimento de nefropatia, alterações na expressão do TGF. O TGF pode regular a expressão dos genes associados à secreção de proteínas de matriz, inibir o crescimento celular mesangial e promover a glomerulosclerose [43]. No modelo animal de ratinho propenso e resistente à glomerulosclerose foi avaliada a expressão dos receptores alfa e beta dos estrogénios. Os glomérulos e as células mesangiais dos animais propensos à glomerulosclerose possuíam uma diminuição da expressão daqueles receptores [44]. Na DRPAD foi admitida que a produção endógena da sintetase do óxido nítrico (SON), e consequentemente do óxido nítrico, seria dependente de estrogénios [45]. O óxido nítrico é um potente vasodilatador, e a diminuição da sua produção no glomérulo pode levar à acumulação de TGF- β .

Como hipótese, poderíamos admitir a existência de uma diminuição dos receptores dos estrogénios nas células mesangiais das mulheres com PAF, conferindo maior risco de nefropatia, e antecipando-a num grupo que deveria estar protegido. Continuando com este modelo, a modificação dos receptores de estrogénios noutros órgãos representaria um dos

factores adversos para o aparecimento de doença nas mulheres mais cedo do que o esperado. A idade de início seria então semelhante nos dois sexos quando a nefropatia progredisse até à IRCT, facto por nós verificado (40,6 nos homens, 41,8 nas mulheres).

A hipótese de relacionar variações nas hormonas sexuais com a progressão da amiloidose orgânica foi anteriormente explorada. O estudo do *hamster* sírio mostrou uma predisposição maior para amiloidose na fêmea em relação ao macho; os machos castrados adquiriram amiloidose em idade muito precoce, semelhante à das fêmeas; a administração de testosterona inibia a amiloidose na fêmea prolongando-lhe a vida [46]. Esta hipótese, em que as hormonas masculinas protegeriam da amiloidose não é compatível com a anterior explicação, em que seriam as hormonas femininas as protectoras de progressão da nefropatia. Investigação posterior, em que foi utilizado como modelo o ratinho transgénico para a diabetes tipo 2, provou que a ooforectomia promovia a formação de amiloide nas ilhotas de Langerhans, sendo atribuído um papel protector às hormonas femininas [47]. Estes achados já seriam compatíveis com a nossa conjectura, em que uma deplecção dos receptores de estrogénios nos glomérulos susceptibilizariam o sexo feminino à doença renal.

Idade de início

Os indivíduos que adoecem tardiamente, isto é, os doentes mais idosos, parecem estar mais protegidos para a doença neurológica e serem mais susceptíveis ao envolvimento renal. Esta susceptibilidade pode advir de factores genéticos, ou ser intrínseca ao parênquima renal. Nenhuma destas hipóteses é mutuamente exclusiva. Podemos estar perante uma situação mista, ou seja, factores genéticos poderiam condicionar a agregação familiar de nefropatia, mas a sua expressão fenotípica seria mais comum nos indivíduos mais velhos por condições tecidulares mais propícias relacionadas com a idade.

Os factores patofisiológicos que participam nas lesões glomerulares e tubulo-intersticiais relacionadas com a idade mimetizam as alterações da nefropatia diabética. Alguns destes mediadores, como o TGF- β e os AGE, também foram mencionados como tendo efeito na fibrilogénese e progressão da amiloidose [27, 43]. O TGF- β aumenta a produção de glicosaminoglicanos, podendo ser estimulado por estiramento mesangial, elevação dos AGE e *stress* oxidativo. As consequências poderão ser a progressão da esclerose glomerular [48] e da amiloidose.

A acumulação de AGE nas membranas basais do endotélio vascular resulta numa vasodilatação inapropriada pelo óxido nítrico [49]. Os níveis de óxido nítrico e da SON endotelial estão diminuídos no rim de animais de experiência em idades mais avançadas, contribuindo para a glomerulosclerose e isquemia tubulo-intersticial. Com a idade, o aumento da produção de radicais livres ou uma deficiência das enzimas antioxidantes leva ao *stress* oxidativo e lesão tecidual [50]. Na doenças renais poliquísticas, hereditárias ou adquiridas, há uma redução do ARNm de enzimas anti-oxidantes extracelulares. Encontram-se níveis mais baixos das enzimas nos casos de doenças quísticas de evolução rápida [51]. Os níveis dos marcadores de *stress* oxidativo e inflamação em doentes com insuficiência renal crónica moderada a grave foram mais elevados do que em indivíduos saudáveis [52]. Os níveis destes marcadores foram mais elevados nos doentes com diabetes *mellitus* e hipercolesterolemia.

A formação de amilóide ou modificação pós-fibrilar parece ser um mecanismo em que há interferência do *stress* oxidativo [53]. A superóxido dismutase (SOD) tipo I converte o superóxido em peróxido de hidrogénio, uma molécula pro-oxidante. O aumento da concentração de peróxido de hidrogénio leva a excesso de radicais hidroxilo, produtos oxidantes. A SOD tipo I pode ter a sua actividade nos glóbulos rubros aumentada nos doentes com PAF, estando o potencial anti-oxidante plasmático nestes mesmos doentes reduzido [54]. Um estudo referiu um doente com PAF, com uma mutação (Arg213Gly) na superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), e amiloidose cardíaca e renal extensas [55]. Neste caso o nível sérico da EC-SOD era mais elevado do que noutros doentes com PAF.

Analisando o que foi exposto, o envelhecimento acompanha-se de modificações que se podem sobrepor às que favorecem a amiloidose. O aparecimento e a progressão da doença renal poderão depender da expressão dos genes que codificam factores de crescimento, proteínas de matriz, SON, e enzimas anti-oxidantes. Provavelmente, não haverá um único mecanismo que explique o aparecimento de nefropatia em idades mais avançadas, mas a conjugação de vários factores que criam um meio favorável à sua expressão.

Agregação familiar de nefropatia

A doença renal, em particular a sua forma mais grave, parece ter uma expressão fenotípica com um componente genético próprio. A história familiar prévia de doença renal conferia ao doente um risco aumentado para a sua expressão (*odds ratio* 2,3) e o risco de IRCT nos irmãos dos probandos insuficientes renais crónicos terminais era cerca de 4

vezes superior ao dos restantes familiares. Na PAF, ao contrário de muitas outras doenças renais, factores como a hipercolesterolemia e hipertensão arterial, que têm componente familiar, não parecem desempenhar um papel fulcral no desenvolvimento de nefropatia, pois raramente se encontram (artigo 4).

Documentámos pares mãe-filha em diálise e pares pai-filho, um em diálise e o outro com insuficiência renal avançada. Não encontramos diferenças no sexo dos progenitores dos probandos com IRCT, mesmo quando os pais tiveram doença renal comprovada. Assim, não parece haver efeitos parentais na “transmissão” de nefropatia.

A susceptibilidade genética a formas comuns de doença renal (não hereditárias), com aparecimento de famílias com mais do que um elemento com insuficiência renal foi descrita num estudo de base populacional que englobou 471 probandos de origem caucasiana com IRCT [56]. Neste estudo foram registados 5780 familiares em primeiro grau, tendo 67 (1,2%) evoluído também para a IRCT, número significativamente superior ao dos controlos (0,4%); no entanto, as causas com maior percentagem de IRCT nos familiares em primeiro grau foram a doença hipertensiva e a nefropatia diabética, patologias que não estão associadas no nosso estudo.

Em Itália, o risco de IRCT na nefropatia de IgA foi avaliado em 19 famílias não relacionadas com mais do que um caso desta doença glomerular [57]. Em 8 famílias, a doença foi detectada na mesma geração, e em 11 em várias gerações; o risco de doença foi mais elevado nos familiares em primeiro grau. Neste mesmo estudo, os casos familiares evoluíram significativamente pior em comparação com os casos esporádicos, com uma proporção maior de doentes em diálise.

A agregação familiar de doença renal foi analisada nos Estados Unidos em 689 doentes em diálise, em comparação com 361 controlos (após exclusão de doenças hereditárias, retirando a história familiar de diabetes e hipertensão) [58]. Os autores concluíram que, tendo o doente em diálise um familiar em primeiro grau com doença renal, o *odds ratio* de IRCT aumentou para 1,3 em relação aos controlos, e havendo dois ou mais familiares em primeiro grau com nefropatia o *odds ratio* elevou-se para 10,4. No nosso estudo, atendendo a que a avaliação analítica esteve disponível em 11 progenitores dos 60 probandos com IRCT (artigo 2) e destes só 10 tinham filhos doentes, estamos provavelmente a subestimar a agregação familiar de nefropatia.

Investigação recente realizada em portadores da mutação V30M, portugueses e suecos, permitiu identificar 10 novos polimorfismos de regiões não transcritas da TTR, 8 resultando de substituições de aminoácidos e 2 de inserção/delecção em sequências de dinucleotídeos repetidos [59]. Os autores sugeriram que o início dos sintomas poderia ser modulado ao longo do gene da TTR no cromossoma normal. A possibilidade destes polimorfismos serem responsáveis pela variabilidade da doença renal não está esclarecida.

A base para a agregação familiar de nefropatia (seja genética ou por exposição a meio ambiente propício) parece então ser partilhada por outras doenças renais. Na PAF essa agregação é ainda mais evidente pois, nos irmãos dos probandos com IRCT a doença neurológica cursou com envolvimento renal em 55% dos casos.

A substituição de um aminoácido na transtirretina, neste caso a TTR V30M, não explica por si só a variabilidade do fenótipo nefropático. Genes modificadores podem exercer um efeito protector ou deletério a nível renal. Um modelo compatível com as características da nefropatia seria digénico: existência de uma alteração genética a condicionar a idade de início da doença (favorecendo ou não lesão renal precoce) com subsequente progressão da nefropatia na dependência de outro gene.

A existência de genes candidatos à determinação do fenótipo nefropático é a questão que em seguida se coloca. Discutimos anteriormente o papel de determinados elementos na progressão tanto da esclerose glomerular como da amiloidose. Os componentes da matriz extracelular pertencem a esse grupo, podendo acumular-se na MBG e ser a principal causa de expansão de matriz mesangial. A modulação destes componentes depende de variados factores de crescimento. Como hipótese, polimorfismos nesses moduladores exerceriam influência na expressão da nefropatia.

Que mecanismos propomos?

Na análise epidemiológica, observámos que a nefropatia e a sua forma de expressão mais grave (a IRCT) atingem especialmente os irmãos dos probandos em diálise. Este facto, pode ser compatível com a existência de génotipos de 2 loci (o da TTR e outro) estreitamente ligados e herdados em bloco (haplótipos). Procurámos, então, genes no cromossoma 18 próximos do da TTR, com potencial influência na doença renal.

O gene da TTR situa-se na posição 18q.44, estando próximos os genes do *TGF- β 1* res-

ponse element (18q.30) e da laminina α -3 (18q.39). A progressão da nefropatia poderia depender do produto de qualquer um dos genes, transmitido em conjunto com o da TTR, resultando em acumulação de matriz extracelular. O *TGF- β 1 response element* actua como um indutor do TGF- β [61]. Uma mutação nesse indutor poderia modificar a actividade do TGF- β . As isoformas dos TGF- β e os seus receptores estão presentes em todas as células glomerulares [62] e a sua presença já foi identificada nos tecidos de amiloidose de diálise [61]. A síntese das isoformas da laminina pode ocorrer nas células mesangiais, epiteliais e endoteliais do glomérulo [63], tendo sido demonstrada a sua deposição aberrante em doenças como o síndrome de Alport [64, 65]. Mutações na laminina proporcionariam a sua anormal deposição glomerular favorecendo a amiloidose.

A expressão diferencial dos genes de matriz extracelular na amiloidogénese e a riqueza em matriz no glomérulo criam inúmeras hipóteses de trabalho. A componente genética da nefropatia constituiria, por si só, uma importante área de investigação.

3.2 Aspectos clínicos

As grandes séries clínicas de amiloidose baseiam-se na experiência nos tipos AL e AA [66, 67]. Em Portugal, o número de doentes com ATTR V30M atribui-nos responsabilidade na definição do seu quadro e clareza de prognóstico. O trabalho desenvolvido ao longo desta tese foi o primeiro estudo prospectivo sobre o curso da doença renal nas amiloidoses por transtirretina, especificamente na mutação V30M.

Manifestações renais

Tal como outras amiloidoses, a associada à TTR V30M teve como expressão renal proteinúria de grau variável e insuficiência renal crónica. A proteinúria predominou na apresentação estando presente em 95% dos casos, sendo nefrótica em 44%.

Nas áreas incluídas no estudo epidemiológico (artigo 2) a proporção de nefropatas com evolução para IRCT foi sobreponível à proporção encontrada na amiloidose AL, classicamente relacionada com comportamento agressivo a nível renal [68]. A comparação deste curso com o de outros tipos de amiloidoses hereditárias nefropáticas torna-se difícil de estabelecer pois, à excepção da FMF, as outras doenças são raras [69]. Na FMF, a nefropatia surge em cerca de 60% dos doentes, evoluindo em mais de metade dos casos para

IRCT. Este panorama foi modificado pela terapêutica com colchicina [70]. A IRCT na PAF tem mais impacto do que nas outras amiloidoses nefropáticas *clássicas*, tanto pela sua frequência em Portugal, como pela impossibilidade (em oposição à FMF) de terapêutica dirigida para a doença renal.

Ao longo do trabalho tentamos traçar o perfil evolutivo da doença. Observámos que a infiltração glomerular por amiloide precedeu as manifestações clínicas, à semelhança da amiloidose AA [71].

A microalbuminúria revelou-se como um marcador precoce de nefropatia, levando-nos a propor que esta pesquisa se torne uma análise de rotina nos portadores assintomáticos.

A distribuição da microalbuminúria e da nefropatia ao longo dos anos (artigo 3) sugere-nos a existência de duas populações, uma em que estas manifestações surgiram até aos sete anos de neuropatia e outra (que correspondeu só a 22% dos nefropatas) em que a proteinúria se instalou após longa evolução de doença neurológica (um dos casos com 17 anos de evolução). Esta cronologia das manifestações renais poderá em parte explicar os achados de autores portugueses que, pelo facto de observarem alguns doentes com muitos anos de amiloidose sem nefropatia, concluíram pela sua inexistência [72]. Os nossos resultados são concordantes com os de Eva Xavier e Domingos Azevedo [73], que encontraram proteinúria com menos de 5 anos de evolução de neuropatia, embora discordantes na gravidade e frequência da doença renal. Os dados obtidos no nosso trabalho aproximam-se da descrição sueca, em que a proteinúria foi detectada em 50% dos casos, e a IRCT contribuiu para a morte em 15% [74]. Esta série era pequena (28 casos), relata doentes com média de idades de início aos 58 anos (bem diferente da população portuguesa) e não deu a perspectiva da evolução da doença renal.

Demonstrámos que a nefropatia clínica pode ser detectada antes de qualquer outro envolvimento sistémico pela doença (artigos 3 e 4), progredindo mais rapidamente para a IRCT (em 7 anos) quando se exprimiu precocemente e por proteinúria nefrótica (artigos 3 e 4). Na ATTR metade dos insuficientes renais crónicos terminais tiveram um curso com proteinúria nefrótica, o que está de acordo com a evolução da maioria das doenças glomerulares [74]. Nestas doenças, a insuficiência renal crónica raramente evolui sem proteinúria [75], o que correspondeu ao que encontramos na nossa série isto é, só 5% dos sujeitos incluídos no estudo epidemiológico tiveram aquela apresentação, e de todos os progre-

ram para a IRCT só 5% não tiveram proteinúria (artigos 2 e 4). Colocamos a hipótese que a deposição de amiloide nestes casos seja predominantemente vascular, tal como descrevemos na ATTR S52P [76].

Uma das dificuldades para estabelecer correctamente a história natural da nefropatia foi a observação tardia dos doentes com IRCT. Só 6% dos dializados foram observados quando ainda não tinham nefropatia clínica instalada; 68% já tinham insuficiência renal na primeira consulta de nefrologia (artigo 4). Nesta população, não conseguimos determinar quanto tempo houve de nefropatia prévia, mas se assumirmos como início da PAF a neuropatia, então a evolução para a IRCT demorou cerca de 10 anos, o que se assemelha à amiloidose por fibrinogénio G526V (a nefropática mais comum) [77].

A referência tardia dos insuficientes renais não se dissociou das características especiais deste grupo, em que o número de casos esporádicos e idades de início mais avançadas não permitiram um diagnóstico precoce da doença neurológica. Quando o probando com IRCT foi originário de áreas com menor prevalência de doença, a história familiar esteve ausente em 63% dos casos (artigo 4). É plausível que este factor tenha concorrido com frequência para a falha de diagnóstico.

Alguns autores atribuíram à pielonefrite crónica por infecções bacterianas e refluxo vesico-ureteral um papel determinante na insuficiência renal crónica [72, 78]. Este diagnóstico é completamente desvalorizado pelos nossos dados. As infecções contribuem para agravamento da função renal, como em qualquer amiloidose. A existência prévia de proteinúria nefrótica e insuficiência renal crónica susceptibilizam à disfunção renal aguda, como nas outras doenças glomerulares.

As descrições histológicas renais na ATTR demonstrando infiltrado, sinais inflamatórios e fibrose intersticial carecem de especificidade para as atribuir a pielonefrite crónica [79]. O estado do glomérulo pode ajudar no diagnóstico diferencial entre a evolução da pielonefrite crónica e da doença glomerular antes da instalação da IRCT. Na pielonefrite crónica os glomérulos podem estar hialinizados nas zonas cicatriciais, mas nos outros locais do rim estão normais ou hipertrofiados. A histologia que observámos não mostrou aspectos correspondentes aos de pielonefrite crónica (artigo 4).

O estudo de Huland e Busch [80] que envolveu a revisão de 15291 casos classificados como pielonefrite crónica demonstrou que, quando as infecções urinárias recorrentes se iniciaram na vida adulta não houve evidência de prejuízo de função renal. Também Par-

ker e Kunin [81], nas infecções recorrentes de início no adulto, só encontraram insuficiência renal progressiva no caso de litíase e ingestão prolongada de analgésicos, nunca a documentaram no refluxo vesico-ureteral. Proteinúria superior a 100 mg/dia raramente foi encontrada nas infecções urinárias do adulto e, quando se verificou, existia uma outra doença renal associada [79]. Nos doentes com PAF que evoluíram para a IRCT a ecografia também não mostrou características de pielonefrite crónica, pois os rins eram de tamanho normal em 82% dos casos e não apresentavam cicatrizes nem áreas de hipertrofia compensadora (artigo 4).

O sedimento urinário, na ausência de bacteriúria, foi semelhante ao descrito nas outras amiloidoses. Como seria de esperar numa amiloidose neuropática, a hipertensão arterial não caracterizou o quadro clínico; contudo, valores de tensão arterial sistólica superior a 140 mmHg, ou diastólica superior a 90 mmHg, não devem excluir a amiloidose por TTR porque na primeira observação 25% dos doentes que vieram a desenvolver IRCT apresentaram valores tensionais acima dos referidos.

Manifestações extra-renais

O longo tempo de evolução da neuropatia dá à doença um desfecho uniforme, mas o quadro clínico inicial não é monomórfico.

Nos insuficientes renais não foi a apresentação que se alterou, mas sim a frequência das síndromes clínicas (artigo 2). A neuropatia sensitiva isolada e as queixas digestivas altas (náuseas, vómitos) foram mais raras nos insuficientes renais crónicos, quando comparados com os doentes das mesmas famílias que nunca desenvolveram nefropatia.

A bradicardia sintomática na apresentação foi encontrada exclusivamente nos nefropatas. Admitimos que, antes deste estudo, houvesse falha de diagnósticos de nefropatia por perda de doentes no grupo em que o quadro inaugural foi síncope (artigo 4). Também a ausência de *pacemaker* foi um factor de risco para morte precoce em diálise. Uma vez que naqueles casos não se verificou uma indicação consensual de *pacemaker*, propomos a sua implantação no insuficiente renal crónico terminal com disritmia, mesmo que não exista uma condição obrigatória para a sua colocação.

A comparação dos doentes portugueses, com os japoneses e suecos não foi possível, pois não encontramos trabalhos em que fosse analisado o quadro clínico na presença de nefropatia. Em Portugal foram publicados 159 casos de PAF sem antecedentes familiares

(o que também encontramos em alguns insuficientes renais), mas a descrição foi omissa em relação a nefropatia [82].

A avaliação ecocardiográfica próxima da diálise foi realizada num terço dos doentes. Na PAF estes resultados só são passíveis de serem comparados com os obtidos nos estudos que relacionam a evolução da doença cardíaca com a neurológica, pois a presença de insuficiência renal não tem sido especificada (artigo 4). A análise dos nossos resultados permitiu-nos inferir que a dilatação precoce da aurícula esquerda foi específica deste grupo de doentes (artigo 4). Estes achados podem colocar problemas aos insuficientes renais candidatos a transplante hepático, pois em alguns casos a deposição de amiloide cardíaca continua, podendo agravar a dilatação auricular [83]. O seguimento ecocardiográfico deverá ser realizado após diálise regular, de modo a estabelecer um padrão clínico neste grupo.

Um achado imprevisto foi a normalidade do nível sérico da hormona das paratiróides (PTH) na presença de insuficiência renal crónica avançada, ausência de prescrição de compostos com alumínio ou calcitriol (artigo 4). Apesar da hiperfosfatemia e da hipocalcemia a PTH sérica não se elevou. Na diabetes *mellitus* foi descrito este estado hipoparatiroideu mas esse achado foi atribuído à hiperglicemia [84, 85]. Esta explicação não é plausível na PAF. A aparente falência de secreção de PTH chama a atenção para a possibilidade de doença óssea adinâmica precoce e criteriosa prescrição de calcitriol. Discutimos no trabalho correspondente (artigo 4), as hipóteses de infiltração da glândula por amiloide, a influência do estado nutricional e da disfunção autonómica. Só um estudo mais detalhado do metabolismo ósseo nos ajudaria a esclarecer este ponto.

4. Intervenção terapêutica na doença renal crónica

O tratamento dialítico na amiloidose por transtirretina tem sido considerado como um tratamento sintomático, ou uma medida terapêutica não específica que pode prolongar a vida [86].

Que sintomas trata? É uma terapêutica inespecífica? Prolonga a vida?

Alguns doentes receberam um transplante renal ou cardíaco após o transplante hepático, mas não há estudos a avaliar previamente a extensão da amiloidose nestes órgãos [69].

Se o transplante renal foi realizado após o hepático terão estes tratamentos em simultâneo algum lugar após o curso natural da doença para a IRCT? Como evolui a função renal após o transplante hepático na presença de depósitos renais extensos?

4.1 Diálise

Tentamos esclarecer algumas destas dúvidas no nosso trabalho. Os sintomas urémicos não constituíram o principal motivo prescrição de diálise, mas sim a sobrecarga de volume e a acidose metabólica (artigo 4). Na PAF, a preparação para a diálise teve particularidades. Salientamos a importância da avaliação frequente do ritmo e da condução cardíacas e do suporte nutricional específico. O acesso vascular para hemodiálise deve ser indicado precocemente, com valores de creatinina sérica de, aproximadamente, 3 mg/dl. Aconselhamos a construção da fístula arterio-venosa para hemodiálise no membro superior contra-lateral ao local de implantação do *pacemaker*; caso contrário, pode surgir hipertensão venosa proximal à fístula e perda do acesso vascular.

Em todos os doentes optámos por hemodiálise. A diálise peritoneal iria transmitir maior dependência do doente em relação à sua família, pois, na maioria dos casos, a neuropatia motora e a diminuição da acuidade visual, incapacitavam a aprendizagem e a prática da técnica pelo próprio; as alterações digestivas e dos esfíncteres comprometem a utilização da diálise peritoneal automática.

A progressão para a insuficiência renal crónica e instituição de diálise nas amiloidoses assenta nas análises da amiloidose AL e AA. Na amiloidose AL o tempo médio de vida após o início de diálise é de 8 meses na experiência da Mayo Clinic [87]; a principal causa de morte durante o primeiro ano de tratamento é o envolvimento cardíaco pela amilóide. A observação de 64 casos de amiloidose AA, na mesma instituição, indicou que a variável mais fortemente associada a baixa sobrevivência foi o nível sérico de creatinina superior a 2 mg/dl na apresentação; estes doentes viveram em média 11 meses, enquanto aqueles com valores inferiores a 2 mg/dl viveram 56,9 meses; a principal causa de morte foi infecciosa [67]. Na PAF observámos que a diálise foi instituída após uma média de 10 anos de evolução de doença sistémica, e um ano antes do início do tratamento o nível de creatinina sérica era 2 mg/dl. Consideramos que os nossos resultados poderão ser considerados melhores que o esperado pois os doentes mantiveram-se em diálise, em média, 21 meses.

A curva de sobrevivência no fim do primeiro de diálise nos doentes com menos de 10 anos de evolução de neuropatia assemelha-se à dos doentes diabéticos dos registos americanos de 1987 [88]. Deveremos realizar um esforço adicional para correcção dos factores de risco para a morte durante o primeiro ano de tratamento, atribuída em metade dos casos a infecções. Aqueles factores não são sobreponíveis aos habitualmente descritos nos hemodialisados (diabetes *mellitus*, hiperlipidemia, hipertensão arterial) à excepção do valor sérico da albumina [89]. Conhecida a morbilidade talvez consigamos aumentar a sobrevivência, tal como aconteceu com a diabetes.

A remoção de monómeros de TTR poderia ter efeito na progressão da amiloidose nos doentes com PAF em diálise. Em trabalho anterior avaliámos a influência da hemodiálise e hemofiltração nos níveis plasmáticos de TTR em doentes com PAF em diálise [90]. Estes níveis não se alteraram significativamente no início, durante e no fim das sessões; a adsorção de TTR pelas membranas de diálise foi inferior a 2 mg. Recentemente foi desenvolvido um modelo de remoção intracorporal de β 2-M, proteína de eliminação renal que atinge níveis séricos muito elevados na IRCT. A β 2-M é a precursora proteica de uma forma de amiloidose cuja extensão se relaciona com longo tempo em diálise, se associa a síndrome do canal cárpico, quistos ósseos e artropatia crónica [91]. A implantação de células que exprimem a megalina poderá ter, segundo os autores, aplicação na remoção de β 2-M [92]. A megalina é responsável pela internalização de β 2-M nas células do tubo contornado proximal aonde é degradada. A internalização da TTR no tubo proximal também é atribuída à megalina [9], e colocando-se a hipótese da implantação de células para metabolização de toxinas urémicas, seria interessante avaliar o seu efeito na remoção de TTR.

4.2 Transplantação na insuficiência renal crónica terminal

Após um curso natural de doença para insuficiência renal crónica e diálise não se colocou habitualmente a questão da indicação para transplante de fígado. A neuropatia motora e autonómica tinha demasiado tempo de evolução, o índice de massa corporal era baixo e eram comuns as úlceras de decúbito. A encarar a hipótese de transplantação, esta deveria ser reservada a dialisados com factores de bom prognóstico, e idealmente o doente receberia também um enxerto renal.

As dificuldades da transplantação renal na PAF nunca foram esclarecidas. No Hospital Geral de Santo António, em 1991, foi realizado o primeiro transplante renal (isolado) num doente com PAF, em diálise desde 1987 (registo do Serviço de Nefrologia e observa-

ção pessoal); teve morte súbita um ano depois. Não encontramos outros relatos de transplantação renal isolada na PAF.

Na análise de 10 anos de transplantação renal da *United Network for Organ Sharing* (UNOS), em 2001, compreendendo 74476 doentes, a amiloidose tinha 83 casos registados [93]. Nesta doença, a sobrevivência do enxerto depois do primeiro e terceiro ano de transplantação renal era respectivamente de 79,5% e 71,1%. As únicas patologias com pior prognóstico do que a amiloidose eram a necrose cortical e a nefrite por radiação e quimioterapia; na morte do doente e perda do enxerto, a amiloidose era respectivamente a terceira e primeira patologia de maior risco.

Nas amiloidoses nefropáticas por fibrinogénio e apolipoproteína A I, precursores amiloidogénicos de produção hepática, foram descritas (em 2000 e 2001) transplantações de rim e fígado em simultâneo [94, 95]. No caso da mutação do fibrinogénio havia história de perda do primeiro enxerto renal por recorrência da amiloidose.

Na publicação dos resultados dos primeiros 20 transplantados hepáticos por PAF, na Suécia, há descrição de 3 transplantações de fígado e rim em simultâneo; 2 doentes faleceram [96]. Em Coimbra [97], esta abordagem foi concretizada em dois doentes com PAF em hemodiálise e com neuropatia avançada; ambos faleceram. Em 2000 foi publicado o registo francês de transplantação na PAF incluindo 2 doentes com transplantes de fígado e rim em simultâneo [98]. O ‘Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Register’ (acessível em www.fapwtr.org), de Junho de 2000, relatou 13 transplantes de fígado e rim associados; não foi especificada a mutação da TTR, nem se a transplantação foi simultânea ou se sucedeu a insuficiência renal crónica após transplantação hepática. No mesmo registo internacional, em Dezembro de 2001, já foram mencionados 17 transplantes de fígado e rim, 14 com a mutação TTR V30M. Manteve-se a ausência de informação se eram simultâneos, mas já foi referida uma sobrevivência do doente de 65% um ano após o transplante (no hepático isolado foi 87,4%). Nenhum destes registos descreveu as complicações imediatas e a médio prazo, os protocolos de imunossupressão utilizados, nem a função dos enxertos.

Os nossos resultados (artigo 4) sugeriram-nos que existe um conjunto de dialisados com características compatíveis com a transplantação renal e hepática simultânea, tratamento detalhado no artigo 5. No nosso trabalho, esclarecemos a morbilidade e resultados desta abordagem a médio prazo.

Qualquer que seja o precursor proteico nas amiloidoses, a mortalidade após transplantação renal foi descrita como infecciosa [99]. A nossa experiência foi semelhante, mas com a particularidade do maior número de infecções cutâneas associadas a ulcerações (artigo 5).

Na experiência francesa, a morte precoce e tardia por septicemia teve ponto de partida urinário em 71% dos casos, desaconselhando-se a transplantação hepática no caso de incontinência urinária prévia. Após dois anos de seguimento, as nossas observações permitem afirmar que a incontinência urinária não deve ser motivo de exclusão para a transplantação renal e hepática. Este grupo de doentes deverá realizar profilaxia de infecções do trato urinário a longo prazo, tendencialmente suspender corticoterapia e realizar baixas doses de imunossupressores de modo a prevenir complicações infecciosas.

Não verificámos existência de proteinúria até cerca de 2 anos após o transplante de fígado e rim em simultâneo. Com a transplantação hepática a produção do precursor amiloidogénico pára, não sendo de supor a recorrência de amiloidose no enxerto renal.

4.3 Transplantação hepática na nefropatia

No doente com nefropatia prévia, o que se pode pressupor após o transplante hepático isolado? Colocamos como hipóteses a ausência de progressão de lesão renal por amilóide (consequente ao desaparecimento do precursor), o aumento da extensão da amiloidose renal por deposição *de novo* (associada a TTR normal, tal como a nível cardíaco) ou a remoção gradual dos depósitos.

A nível clínico, conseguiríamos monitorizar algum efeito da transplantação pela excreção de proteínas ou variação de função renal. No entanto, as alterações de função renal podem estar relacionadas com a utilização de inibidores da calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), imunossupressores de base na transplantação hepática mas com nefrotoxicidade [100]. A toxicidade aguda é geralmente associada a elevados níveis sanguíneos dos fármacos, surge no período de pós-transplante precoce e reverte com o ajuste da dose. Na toxicidade aguda da ciclosporina, as principais estruturas envolvidas são os epitélios tubulares e os capilares peritubulares. Embora por mecanismo não completamente conhecido, a ciclosporina tem um efeito vasoconstritor renal [101]. A toxicidade crónica dos inibidores da calcineurina ocorre mais tardiamente e não reverte com facilidade; as lesões caracterizam-se pelo envolvimento de arteríolas e artérias interlobulares, com deposição

de miócitos necrosados, espessamento da íntima e redução do lúmen vascular; surgem fibrose intersticial cortical e atrofia tubular; os glomérulos sofrem isquemia crónica, espessamento das membranas basais e aumento da matriz mesangial, podendo progredir para a esclerose [101].

Na PAF, a susceptibilidade para o desenvolvimento de disfunção renal após o transplante hepático relaciona-se, provavelmente, com a sobreposição de lesões de toxicidade crónica de fármacos inibidores da calcineurina às alterações morfológicas da amiloidose glomerular e vascular extensa (artigo 6).

Na experiência de um dos centros de transplante hepático [97], a insuficiência renal não representou um problema no pós-operatório dos doentes com PAF. Na nossa avaliação (ainda limitada), em que documentamos a extensão e localização da amiloidose renal, a nefropatia prévia (proteinúria) não se associou a necessidade de técnicas dialíticas no pós-operatório, mas sim a disfunção renal crónica. A utilização precoce de imunossuppressores não nefrotóxicos, na tentativa de evitar doses elevadas de inibidores da calcineurina, será aconselhável nos doentes com nefropatia prévia à transplantação.

Os nossos dados coincidem com os sugeridos por outro estudo, com 4 casos de insuficiência renal crónica terminal entre o primeiro e segundo ano após transplante [102]. No entanto, os autores associaram a longa evolução da doença neurológica à disfunção renal. No mesmo artigo, são referidos outros 3 casos com situação neurológica idêntica aos anteriores, mas sem complicações nefrológicas; foi sugerido que, nestes casos, o curso da doença sistémica foi alterado porque não surgiu insuficiência renal. No nosso trabalho, expusemos que a existência de nefropatia não dependia da evolução neurológica. Provavelmente, foram comparados no estudo anterior doentes que não tinham uma situação renal semelhante antes da transplantação.

Numa revisão de 289 transplantados hepáticos sem PAF, 30,9%, 41,5 % e 38,9% dos doentes apresentaram, respectivamente, no primeiro, no quinto e no décimo terceiro anos após transplante, creatinina sérica superior a 1,3 mg/dl, valor a partir do qual os autores consideraram insuficiência renal [103]. A disfunção renal prévia à transplantação foi considerada factor de risco para doença renal crónica. Nos nossos casos (artigo 6) houve disfunção renal crónica após transplante apesar de normal função renal prévia. Será admissível que alguns destes doentes venham a evoluir para IRCT.

A remissão sustentada da proteinúria após o transplante hepático não era um resultado esperado. No doente com expressão renal mais grave, a remissão estabeleceu-se preco-

cimento (em 2 meses), facto que poderemos relacionar com o efeito hemodinâmico intra-renal da ciclosporina e não com a remissão de amilóide.

Na PAF, a evidência histológica da remoção dos depósitos de amilóide não foi documentada. Após transplante hepático, os estudos cintilográficos quantitativos, através de SAP marcado com iodina 123, foram publicados na revista *Lancet* como referência para a regressão de amilóide [104]. Com base na cintilografia, os autores apontaram uma diminuição dos depósitos renais de amilóide, 24 meses após transplante num doente, e dos depósitos esplénicos e supra-renais 13 meses depois num outro. Descreveram outro caso, com síndrome nefrótica e IRCT, submetido a transplante de fígado e rim; verificaram o desaparecimento da síndrome nefrótica e, no cintilograma, diminuição dos depósitos renais 10 meses depois da cirurgia. Estes achados não são, na nossa opinião, necessariamente compatíveis com a regressão da amilóide, pois torna-se duvidosa a solubilidade tão rápida ou degradação acelerada por macrófagos em pouco tempo. No doente com transplante renal, o desaparecimento da síndrome nefrótica resultou, provavelmente, do efeito isquémico imediato do pós operatório (foi documentada necrose tubular aguda do enxerto) e da imunossupressão com os inibidores da calcineurina em rins com baixa função residual; a vascularização dos rins nativos diminuiu após a transplantação, facto que poderá ter influenciado o resultado das imagens no cintilograma.

Uma publicação posterior descreve a avaliação de 8 doentes através de cintilograma pré-transplante hepático; foi verificada uma captação anormal do isótopo no rim em todos os casos (o que coincide com os nossos achados histológicos, com presença de amilóide em todos os doentes, artigo 1). Nos doentes que completaram as avaliações cintilográficas até ao quinto ano após o transplante, foi descrita uma substancial regressão dos depósitos de amilóide em 2, ligeira melhoria em 3 e estabilidade em 2; como controlos foram estudados simultaneamente 5 portadores assintomáticos, com demonstração de captação renal em 3 deles (o que pode reforçar os nossos resultados clínicos, com evidência de microalbuminúria em portadores assintomáticos). Os mesmos autores realizaram, noutros tipos de amiloidose, uma correlação entre os resultados do cintilograma e a quantificação histológica de amilóide, obtendo apenas uma sensibilidade de 50% para os rins [105].

Um modelo para a possibilidade da regressão de substância amilóide é a amiloidose por β_2 -M após a transplantação renal. Quando há um enxerto com boa função, o nível sérico de β_2 -M baixa rapidamente. Diferentes grupos de trabalho, baseados em dados radio-

gráficos e histológicos, documentaram ausência de regressão da amiloidose após transplante renal [106, 107]. Na avaliação da amiloidose por $\beta 2$ -M, o cintilograma com componente P marcado mostrou resultados de interpretação difícil; em 5 doentes foi descrita a ausência de captação após transplante renal funcionante (entre 0.8 e 2.4 anos), mas o exame falhou na identificação da $\beta 2$ -M em 63% dos doentes sintomáticos [108]. A demonstração da “remoção” de amiloide pelo cintilograma foi atribuída por outro grupo de investigadores à diminuição da actividade da doença amiloidótica [109].

No actual momento, pensamos que a interpretação do cintilograma após transplante hepático na PAF deve ser cautelosa.

Na amiloidose AA secundária a doenças reumáticas, após tratamento a longo prazo dirigido para a doença base, foi também documentada a remissão de síndrome nefrótica por amiloidose [110]. Contudo, não foi repetida a histologia renal. Na amiloidose AL, a remissão de síndrome nefrótica e insuficiência renal aguda foram descritas após transplantação de células estaminais [111].

A possibilidade de remissão morfológica dos depósitos renais de amiloide por TTR deverá, se possível, ser investigada. Nos doentes com depósitos renais glomerulares e vasculares extensos, é difícil esperar uma mobilização da ATTR, quantificável a nível histológico. No entanto, nos doentes com deposição menos grave, a remoção poderá acontecer e ser mais fácil de quantificar; pensamos que os doentes mais informativos serão os que mantêm boa função renal após transplante e que previamente tinham desde microalbuminúria até proteinúria inferior a 1 g/dia.

5. Envolvimento da nefropatia no aconselhamento genético

Não é indiferente a um indivíduo em risco se um familiar próximo faleceu em diálise. A percepção da doença pode tornar-se mais marcada. O compromisso da família é ainda maior quando a escolha do insuficiente renal é não realizar diálise, apesar da uremia.

A história familiar de nefropatia foi um dos factores de risco individual para a vir a desenvolver. O risco dos irmãos dos doentes insuficientes renais crónicos terminais terem o mesmo curso de doença foi maior do que nos outros familiares. Havendo uma componente genética na doença renal, então esta terá de ser enquadrada no aconselhamento.

Tendo por base o que é entendido como aconselhamento genético, a nefropatia deverá ser transmitida como uma das consequências da doença, particularmente nas famílias em que já houve casos graves e precoces, isto é, com doença renal inaugural ou de aparecimento nos primeiros anos de neuropatia. O portador da mutação TTR V30M com maior risco de doença renal deve ser encorajado a realizar exames analíticos anuais, como a pesquisa de microalbuminúria. Esta posição deve ser interpretada não como um excesso de vigilância, mas como uma tranquilidade, tal como a recomendação do exame neurológico regular [112]. A doença renal não manifesta sintomatologia específica excepto numa fase avançada, colocando mais dificuldades de identificação pelo próprio indivíduo do que a neuropatia.

A normalidade de função renal ou apenas ligeiro aumento de proteínas na urina beneficiará as perspectivas de tratamento.

6. Bibliografia

1. Noël LH. La biopsie rénale dans les amyloses. In: Droz D, Lantz B (eds). La Biopsie rénale. Inserm, Paris, 1996:pp266-277
2. Dikman SH, Churg J, Kahn T. Morphologic and clinical correlates in renal amyloidosis. *Hum Pathol* 1981;12:160
3. Shiiki H, Shimokama T, Yoshikawa Y, Toyoshima H, Kitamoto T, Watnabe T. Renal amyloidosis. Correlations between morphological, chemical types and amyloid protein and clinical features. *Virchows Arch A Pathol Histopatol* 1988;412:197-204
4. Sasatomi Y, Kiyoshi Y, Uesugi N, Hisano S, Takebayashi S. Prognosis of renal amyloidosis: a clinicopathological study using cluster analysis. *Nephron* 2001;87:42-49
5. Tavares I, Lobato L, Soares C, Bustorff M, Barandela T, Costa PP, Elísio A. Renal AA amyloidosis: prognostic relevance of kidney vascular deposits. Abstracts of XXXVII Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association 2001;pp90
6. Lachmann HJ, Booth DR, Both SE, Bybee A, Gilbertson JA, Gillmore J, Pepys MB, Hawkins PN. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *N Engl J Med* 2002;23:1786-1791
7. Jacobsson B. Localization of transthyretin-mRNA and of immunoreactive transthyretin in the human fetus. *Virchows Arch A Pathol Histopatol* 1989;415:259-263
8. Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim US. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology* 1995;26:559-564
9. Sousa MM, Norden AG, Jacobsen C, Willnow TE, Chistensen EI, Thakker RV, Verroust PJ, Moestrup SK, Saraiva MJ. Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. *J Bio Chem* 2000;49:38176-38181
10. Kim YS, Cape SP, Chi E, Raffin R, Wilkins-Stevens W, Stevens FJ, Manning MC, Randolph TW, Solomon A, Carpenter JF. Counteracting effects of renal solutes on amyloid fibril formation by immunoglobulin light chains. *J Bio Chem* 2001;276:1626-1633
11. Khurana R, Gillespie JR, Talapatra A, Minert LJ, Ionescu-Zanetti C, Millett I, Fink AL. Partially folded intermediates as a critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* 2001;27:3525-3535
12. Altland K, Winter P, Saraiva MJ, Suhr O. Sulfite and base for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy: two additive approaches to stabilize the conformation of human amyloidogenic transthyretin. *Neurogenetics* 2004;5:61-67
13. Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJ, Brito RMM. Tetramer dissociation and monomer

partial folding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J Bio Chem* 2001;276:27207-27213

14. Glasscock RJ. Hematuria and proteinuria. In: Greenberg A (ed). *Primer on kidney diseases*, third edition. Academic Press, California and London, 2001:pp38-54

15. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Djurup J, Deckert M. Glomerular size and charge selectivity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1988;33:100-106

16. Guimarães A, Viana Pinheiro A, Leite I. Sural nerve biopsy in familial amyloidotic polyneuropathy. In: Natvig JB, Forre O, Husby G, Husenbeek A, Skogen B, Sletten K, Westmark P (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Kluwer Academic Publishers, London, 1990:pp493-498

18. Sousa MM, Cardoso I, Fernandes R, Guimarães A, Saraiva MJ. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for toxicity of non-fibrillar aggregates. *Am J Pathol* 2001;159:1993-2000

19. Kisilevsky R. The relation of proteoglycans, serum amyloid P and Apo E to amyloidosis current status, 2000. *Amyloid* 2000;7:23-25

20. Ancsin JB. Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans. *Amyloid* 2003;10:67-79

21. Raats CJ, Van Den Born J, Berden JH. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int* 2000;57:385-400

22. Jensen T. Pathogenesis of diabetic vascular disease: evidence for the role of reduced heparan sulfate proteoglycan. *Diabetes* 1997;46 Suppl 2:S98-100

23. Ikegaya N, Nagase M, Honda N, Kumagai H, Hishida A. Correlation between histological features and glomerular permeability in membranous nephropathy and immunoglobulin A nephropathy. *J Lab Clin Med* 1994;123:94-101

24. Tashiro F, Yi S, Wakasugi S, Maeda S, Shimada K, Yamamura K. Role of serum amyloid P component for systemic amyloidosis in transgenic mice carrying human mutant transthyretin gene. *Gerontology* 1991;37 Suppl 1:56-62

25. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988;318:1315-1319

26. Matsunaga N, Anan I, Forsgren S, Nagai R, Rosenberg p, Horiuchi S, Ando Y, Suhr OB. Advanced glycation end products (AGE) and the receptor for AGE are present in gastrointestinal tract of familial amyloidotic polyneuropathy patients but do not induce NF-kappaB activation. *Acta Neuropathol* 2002;104:441-447

27. Sousa MM, Yan SD, Stern D, Saraiva MJ. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB)

activation. *Lab Invest* 2000;80:1101-1110

28. Sousa A. A variabilidade fenotípica da polineuropatia amiliodótica familiar: um estudo de genética quantitativa em Portugal e na Suécia. Tese de doutoramento, Universidade do Porto, 1995

29. Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda S, Ando Y, Nakasato M, Takei Y, Hanyu N, Usui Y, Tanaka F, Harada T, Inukai T, Hashimuze Y, Sobue G. Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinicopathological and genetic features. *Brain* 1999;122:1951-1962

30. Takahashi K, Sakashita N, Ando Y, Suga M, Ando M. Late onset familial amyloidotic polyneuropathy: presentation on three autopsy cases in comparison with 19 autopsy cases of the ordinary type. *Pathol Int* 1997;47:353-359

31. Silbiger SR, Neugarten J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1995;25:515-533

32. Seliger SL, Davis C, Stehman-Breen C. Gender and progression of renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:219-225

33. Neugarten J, Acharya A, Silbiger SR. Effect of gender on the progression of non-diabetic renal disease: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:319-329

34. Jacobsen P, Rossing K, Tarnow L, Rossing P, Mallet C, Poirier O, Cambien F, Parving HH. Progression of diabetic nephropathy in normotensive type 1 diabetic patients. *Kidney Int Suppl* 1999;71:S101-105

35. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *Am J Kidney Dis* 2000;36:227-237

36. Frimat L, Briancon S, Heston D, Aymard B, Renoult E, Huu TC, Kessler M. IgA nephropathy: prognostic classification of end-stage renal failure. *L'Association des Nephrologues de l'Est. Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2569-2575

37. Donadio JV, Bergstralh EJ, Grande JP, Rademacher DM. Proteinuria patterns and their association with subsequent end-stage renal disease in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1197-1203

38. Choukroun G, Itakura Y, Albouze G, Christophe JL, Man NK, Grünfeld JP, Jungers P. Factors influencing progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:1634-1642

39. Ishikawa I, Maeda K, Nakai S, Kawaguchi Y. Gender difference in the mean age at the induction of hemodialysis in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J*

Kidney Dis 2000;35:1072-1075

40. Neugarten J, Silbiger SR. Effects of sex hormones on mesangial cells. *Am J Kidney Dis* 1995;26:147-151
41. Negulescu O, Bognar I, Lei J, Devarajan P, Silbiber S, Neugarten J. Estradiol reverses TGF-beta1-induced mesangial cell apoptosis by a casein kinase 2-dependent mechanism. *Kidney Int* 2002;62:1989-1998
42. Kang DH, Yu ES, Yoon KI, Johnson R. The impact of gender on progression of renal disease: potential role of of estrogen-mediated vascular endothelial growth factor regulation and vascular protection. *Am J Pathol* 2004;164:679-688
43. Zhu L, Herrera GA, Murphy-Ulrich JE, Huang Z, Sanders PW. Pathogenesis of glomerulosclerosis in light chain deposition disease – role for the transforming growth factor- β . *Am J Pathol*;147:375-385
44. Potier M, Karl M, Zheng F, Elliot SJ, Striker GE, Striker LJ. Estrogen-related abnormalities in glomerulosclerosis-prone mice: reduced mesangial cell estrogen receptor expression and prosclerotic response to estrogens. *Am J Pathol* 2002;160:1877-1885
45. Yoshida I, Bengal R, Torres VE. Gender-dependent effect of L-NAME on polycystic kidney disease in HAN:SPRD rats. *Am J Kidney Dis* 2000;5:930-936
46. Coe JE, Ross MJ. Amyloidosis and female protein in the Syrian hamster. Concurrent regulation by sex hormones. *J Exp Med* 1990;17:1257-1267
47. Kahan SE, Andrikopoulos S, Verchere CB, Wang F, Hull RL, Vidal J. Oophorectomy promotes islet amyloid formation in a transgenic mouse model of Type II diabetes. *Diabetologia* 2000;43:1309-1312
48. Ruiz-Torres MP, Bosch R, O'Valle F, Del Moral RG, Ramirez C, Masseroli M, Perez-Caballero C, Iglesias MC, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. Age-related increase in expression of TGF- β 1 in the rat kidney: relationship to morphologic changes. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:782-791
49. Hogan M, Cerami A, Bucala R. Advanced glycosylation end products block the antiproliferative effect of nitric oxide. *J Clin Invest* 1992;90:1110-1115
50. Choudhury D, Levi M. Renal function and disease in the aging kidney. In: Schrier RW (ed). *Diseases of the kidney and urinary tract – 7th edition*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2001:pp2387-2420
51. Maser RL, Vassmer D, Mgenheimer BS, Calvet JP. Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:991-999
52. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J.

Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic renal disease. *Kidney Int* 2004;65:1009-1016

53. Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, Holmgren G, Uchida K, el Sahly M, Yamashita T, Terasaki H, Nakamura M, Uchino M, Ando M. Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:497-502

54. Fizman ML, Di Egidio M, Ricart K, Repetto MG, Borodinsky LN, Llsuy SF, Saizar R, Trigo PL, Riedstra S, Costa PP, Villa AM, Katz N, Lendoire JC, Sica REP. Evidence of oxidative stress in familial amyloidotic polyneuropathy type I. *Arch Neurol* 2003;60:593-597

55. Sakashita N, Ando Y, Marklund SL, Nilsson P, Tashima K, Yamashita T, Takahashi K. Familial amyloidotic polyneuropathy type I with extracellular superoxide dismutase mutation: a case report. *Hum Pathol* 1998;29:1169-1172

56. O'Dea DF, Murphy SW, Hefferton D, Parfrey P. Higher risk for renal failure in first-degree relatives of white patients with end-stage renal disease: a population-based study. *Am J Kidney Dis* 1998;32:794-801

57. Schena FP, Cerullo G, Rossini M, Lanzilotta SG, D'Altri C, Manno C. Increased risk of end-stage renal disease in familial IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:453-460

58. Lei HH, Perneger TV, Klag MJ, Whelton PK, Coresh J. Familial aggregation of renal disease in a population-based case-control study. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1270-1276

59. Soares ML, Coelho T, Sousa A, Holmgren G, Saraiva MJ, Kastner DL, Buxbaum J. Haplotypes and DNA sequence variation within and surrounding the transthyretin gene: genotype-phenotype correlations in familial amyloid polyneuropathy (V30M) in Portugal and in Sweden. *Eur J Hum Genet* 2004;12:225-237

60. Mauer M, Fioretto P, Yalem W, Friedman E. Diabetic nephropathy. In: Schrier RW (ed). *Diseases of the kidney and urinary tract – 7th edition*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2001:pp2083-2127

61. Matsuo K, Ikizler TA, Hoover RL, Nakamoto M, Yasunaga C, Pupim LB, Hakim RM. Transforming growth factor-beta is involved in the pathogenesis of dialysis related amyloidosis. *Kidney Int* 2000;57:697-708

62. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 1993;42:450-456

63. Minner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, Copeland NG, Sanes JR. The laminin α chains: expression, development transitions, and chromosomal locations of α 1-5, identification of heteromeric laminins 8-11, and cloning of a novel α 3 isoform. *J cell Biol* 1997;137:685-701

64. Sayers R, Kalluri R, Rodgers KD, Shield CF, Meehan DT, Cosgrove D. Role for TGF- β in Alport disease progression. *Kidney Int* 1999;56:1662-1673
65. Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A, Kalluri R. Integrin $\alpha 1\beta 1$ and transforming growth factor factor $\beta 1$ play distinct roles in Alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 2000;157:1649-1659
66. Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features of 474 cases. *Semin Hematol* 1995;32:45-59
67. Gertz MA, Kyle RA. Secondary systemic amyloidosis: response and survival in 64 patients. *Medicine (Baltimore)* 1991;70:246-256
68. 75 Gertz MA, Kyle RA, O'Fallon WM. Dialysis support of patients with primary systemic amyloidosis. A study of 211 patients. *Arch Intern Med* 1992;152:2245-2250
69. Benson MD. Amyloses héréditaires. In: Grateau G, Benson MD, Delpech M (eds). *Les Amyloses*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 2000:pp445-495
70. Méry JPh, Kenouch S. Familial Mediterranean fever-associated amyloidosis. *Renal Failure* 1993;15:379-384
71. Thervet E, Noël LH, Legendre C, Page B, Kreis H. Late histological recurrence of familial Mediterranean fever amyloid after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:218-219
72. Freitas AF. Aspectos clínicos da polineuropatia amiloidótica familiar (tipo Andrade). *Boletim do Hospital, Hospital Geral de Santo António* 1976;1:17-25
73. Xavier E, Azevedo D. Estudo nefrológico da polineuropatia amiloidótica familiar (tipo Português). *Boletim do Hospital, Hospital Geral de Santo António* 1976;1:35-40
74. Andersson R. Familial amyloidosis with polyneuropathy: a clinical study based on patients living in Northern Sweden. *Acta Med Scand* 1976;Suppl 590:1-64
75. Hunt LP, Short CD, Mallick NP. Prognostic indicators in patients presenting with nephrotic syndrome. *Kidney* 1988;34:382-388
76. Ventura A, Lobato L, Beirão I, Paiva A, Silvestre F, Coelho T, Guimarães S. Amiloidose hereditária por uma variante da transtirretina (TTR Pro52) – 1ª descrição da histopatologia renal. XIII Congresso Português de Nefrologia, Castelo Branco, Junho 1999
77. Uemichi T, Liepnieks JJ, Benson MD. Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *J Clin Invest* 1994;93:731-736
78. Itoh N, Shigematsu H, Ikeda S, Oguchi H. Clinicopathological studies on nephropathy of familial amyloid polyneuropathy in Japan. In: Isobe T, Araki S, Uchino F, Kito S, Tsubura E (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Plenum Press, New York, 1988:pp499-504

79. Ronald AR, Nicollé LE. Infections of the urinary tract and the kidney. In: Schrier RW (ed). Diseases of the kidney and urinary tract – 7th edition. Lippincott William s and Wilkins, Philadelphia, USA, 2000:pp941-969
80. Huland H, Busch R. Chronic pyelonephritis as a cause of end-stage renal disease. J Urol 1982;127:642-643
81. Parker J, Kunin C. Pyelonephritis in young women. JAMA 1973;224:585-590
82. Coelho T, Sousa A, Lourenço E, Ramalheira J. A study of 159 patients with familial amyloidotic neuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. J Med Genet 1994;31:293-299
83. Olofsson BO, Backman C, Karp K, Suhr OB. Progression of cardiomyopathy after liver transplantation in patients with familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Transplantation 2002;73:745-751
84. Hercz G, Pei Y, Greenwood C, Manuel A, Saiphoo C, Goodman WG, Segre GV, Fenton S, Sherrar DJ. Aplastic osteodystrophy without aluminium: the role of “suppressed” parathyroid function. Kidney Int 1993;44:860-866
85. Sugimoto T, Ritter C, Morrissey J, Hayes C, Slatopolsky E. Effects of high concentrations of glucose on PTH secretion in parathyroid glands. Kidney Int 1990;37:1522-1527
86. Benson MD. Amyloidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease, Eight Edition. McGraw Hill Book Co, New York, 2001:pp5345-5378
87. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Immunoglobulin light chain amyloidosis and the kidney. Kidney Int 2002;61:1-7
88. Agodoa LY, Eggers PW. Renal replacement therapy in the United States: data from the United States renal data system. Am J Kidney Dis 1995;25:119-133
89. Avram MM, Mittman N, Bonomini L, Chattopadhyay J, Fein P. Markers for survival in dialysis: a seven-year prospective study. Am J Kidney Dis 1995;26:209-219
90. Beirão I, Lobato L, Riedra S, Costa PMP, Pimentel S, Guimarães S. Ineffectiveness of dialysis in transthyrein (TTR) clearance in familial amyloidotic polyneuropathy type I, in spite of lower stability of the TTR Met30 variant. Clin Nephrol 1999;51:45-49
91. Bardin T, Zingraff J, Kuntz D, Drücke T. Dialysis related amyloidosis. Nephrol Dial Transplant 1986;1:151-154
92. Saito A, Kazama JJ, Iino N, Cho K, Sato N, Yamazaki H, Oyama Y, Takeda T, Orlando RA, Shimizu F, Tabata Y, Gejyo F. Bioengineered implantation of megalin-expressing cells: a potencial intracorporeal therapeutic model for uremic toxin protein clearance in renal failure. J

Am Soc Nephrol 2003;14:2025-2032

93. Blyer A, Donaldson LA, McIotosh M, Adams PL. Relationship between underlying disease and renal transplantation outcome. *Am J Kidney Dis* 2001;37:1152-1161
94. Gillmore JD, Booth DR, Rela M, Heaton ND, Rahman V, Stangou AJ, Pepys MB, Hawkins PN. Curative hepatorenal transplantation in systemic amyloidosis caused by the Glu526Val fibrinogen alpha-chain in an English family. *QJM* 2000;93:269-260
95. Gillmore JD, Stangou AJ, Tennent GA, Booth DR, O'Grady J, Rela M, Heaton ND, Wall CA, Keogh JA, Hawkins PN. Clinical and biochemical outcome of hepatorenal transplantation for hereditary systemic amyloidosis associated with apolipoprotein AI Gly26Arg. *Transplantation* 2001;71:986-992
96. Suhr OB, Holmgren G, Steen L, Wikstrom L, Norden G, Friman S, Duraj FF, Groth CG, Ericzon BG. Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy. Follow-up of the first 20 Swedish patients. *Transplantation* 1995;60:933-938
97. Viana JS. Alterações cardio-circulatórias nos doentes com polineuropatia amiloidótica familiar durante o transplante hepático. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, 2001
98. Adams D, Samuel D, Goulon-Goeau C, Nakazato M, Costa PM, Feray C, Planté V, Ducot B, Ichai P, Lacroix C, Stephane M, Bismuth H, Said G. The course and prognostic factors of familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Brain* 2000;123:1495-1504
99. Hartmann A, Holdaas H, Fauchald P, Nordal KP, Berg KJ, Talseth T, Leivestad T, Brekke IB, Flatmark A. Fifteen years of experience with renal transplantation in systemic amyloidosis. *Transplant Int* 1992;5:15-1891
100. Platz KP, Mueller AR, Blumhardt G, Bachmann S, Bechstein WO, Kahl A, Neuhaus P. Nephrotoxicity following orthotopic liver transplantation: a comparison between cyclosporine and FK506. *Transplantation* 1994;58:170-174
101. Chan L, Wang W, Kam I. Outcomes and complications of renal transplantation. In: Schrier RW (ed). *Diseases of the kidney and urinary tract – 7th edition.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2001:pp2871-2938
102. Carvalho M, Conceição I, Bentes C, Sales Luís ML. Long-term quantitative evaluation of liver transplantation in familial amyloid polyneuropathy (Portuguese V30M). *Amyloid* 2002;9:126-133
103. Morena JM, Cuervas-Mons V, Rubio E, Pons F, Herreros de TA, Turrión VS, Millán I. Chronic renal dysfunction after liver transplantation in adult patients: prevalence, risk factors, and impact on mortality. *Transplant Proc* 2003;35:1907-1908
104. Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, Wallin BG, Seymour A,

Richardson S, Hawkins PN, Pepys MB. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 1993;341:1113-1116

105. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Comparison of histology with SAP scintigraphy for evaluation of amyloidosis. In: Kisilevsky R, Benson MD, Frangione B, Gauldie J, Muckle TJ, Young ID (eds). *Amyloid and Amyloidosis*. Parthenon Publishing, New York, 1994:pp685-687

106. Mourad G, Argiles A. Renal transplantation relieves the symptoms but does not reverse beta2-microglobulin amyloidosis. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:798-804

107. Zingraff J, Bardin T, Noël LH, Drüeke T. Lack of haemodialysis-associated amyloidosis. *Lancet* 1991;338:1089

108. Nelson SR, Hawkins PN, Richardson S, Lavender JP, Sethi D, Gwer PE, Pugh CV, Winearls CG, Oliver DO, Pepys MB. Imaging of haemodialysis-associated amyloidosis with 123I-serum amyloid P component. *Lancet* 1991;338:335-339

109. Jadoul M, Drüeke T, Zingraff J, van Ypersele de Strihou C. Does dialysis-related amyloidosis regress after transplantation? *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:655-657

110. Komatsuda A, Morita K, Ohtani H, Yamaguchi A, Miura AB. Remission of the nephrotic syndrome in a patient with renal amyloid due to rheumatoid arthritis treated with prednisolone and methotrexate. *Am J Kidney Dis* 1998;32:E7

111. Snanoudj R, Mamzer-Bruneel MF, Hermine O, Grünfeld JP, Chauveau D. Recovery of acute renal failure and nephrotic syndrome following autologous stem cell transplantation for primary (AL) amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2175-2177

112. Sequeiros J. Genetic counselling in hereditary amyloid neuropathy type I (Portuguese, Andrade). In: Sales-Luís ML, Almeida LB, Costa PP (eds). *Symposium on Peripheral Neuropathies*. Lisbon, 1986:pp265-271

VII - CONCLUSÕES

1. O diagnóstico histológico

A deposição renal de amilóide associada à variante da transtirretina V30M está presente em todos os doentes com polineuropatia amiloidótica familiar. Esta amiloidose é caracterizada pela deposição medular numa fase precoce da doença. O envolvimento dos tubos contornados distais e ansas de Henle revela-se típico. A deposição glomerular, sem evidência analítica de patologia renal, apresenta-se como focal e segmentar. O envolvimento das arteríolas do pólo vascular e do córtex encontra-se em metade dos doentes sem proteinúria detectável. Na presença de proteinúria, a distribuição mesangial dos depósitos é difusa, o pólo vascular é mais atingido e as arteríolas corticais e artérias interlobulares mostram um envolvimento por amilóide mais extenso. Na insuficiência renal crónica avançada, os glomérulos apresentam-se totalmente ocupados por amilóide ou esclerosados e a deposição arteriolar é importante. As manifestações clínicas renais relacionam-se com a gravidade da amiloidose glomerular e vascular, e não com o envolvimento tubulointersticial. Nos casos estudados, o interstício cortical e os tubos contornados proximais não foram ocupados por depósitos. Através de métodos imunohistoquímicos, o tipo de proteína identificada nos depósitos é a TTR.

Neste estudo, cumprimos o primeiro objectivo da investigação. Esclarecemos a frequência e a distribuição dos depósitos renais de amilóide; definimos a relação entre a expressão clínica de nefropatia e o padrão de deposição renal; demonstrámos a associação desta amiloidose renal à TTR.

2. Epidemiologia clínica

A nefropatia na PAF, proteinúria ou insuficiência renal crónica, atinge um terço dos doentes (36%). A progressão para a insuficiência renal crónica terminal (IRCT) surge em 12%, ou seja, um em cada três doentes que se apresentam com nefropatia necessitará de métodos de substituição de função renal. Assume-se que a nefropatia representa uma das expressões da PAF.

Metade das famílias das regiões de maior prevalência da doença têm elementos com nefropatia. A IRCT estabelece-se em pelo menos um doente em 22% das famílias; mas, se a área de origem é Braga, o número de famílias com um ou mais elementos com IRCT aumenta para 42%.

Os factores de risco independentes para a apresentação de nefropatia são o sexo femi-

nino, a idade de início da doença neurológica mais tardia e a história familiar de doença renal. A idade de início, aos 40 anos ou mais, revela-se como o factor de associação mais forte pois, em relação aos doentes com início de doença antes daquela idade, confere um risco 3,5 vezes superior para a sua manifestação.

Existe uma grande amplitude de idades de início da doença neurológica nos insuficientes renais terminais (entre a terceira e a nona década de vida). A neuropatia inicia-se após a sexta década de vida num terço dos doentes em diálise. O efeito geográfico da origem familiar perde-se, pois a aparente área de maior risco de nefropatia (Braga) coincide com a localização de doentes com idades de início mais avançadas.

O segundo objectivo da investigação, determinar a frequência da doença renal e os factores de risco para o seu desenvolvimento, foi concluído.

3. Epidemiologia genética

Os probandos com IRCT, quando pertencem às áreas de maior prevalência da doença, têm história familiar de PAF em 90% dos casos. Em contraste, fora daqueles locais, a história familiar está ausente em 27% dos doentes. Na ausência de antecedentes familiares, os insuficientes renais têm o início da doença neurológica, em média, aos 50 anos, ou seja, 15 anos mais tarde que a amostra global dos doentes portugueses. Com o mesmo fenótipo renal sugerem-se dois tipos de famílias, umas com elevada penetrância de PAF e outras com penetrância mais baixa e eventual dificuldade de identificação do insuficiente renal. A antecipação da idade de início dos probandos com IRCT em relação aos seus progenitores está presente em cerca de um terço dos casos e é, em média, de 20 anos; os pares complementares de antecipação só são encontrados em 10% daqueles probandos.

Há predisposição familiar ao desenvolvimento de nefropatia e de IRCT. Os irmãos dos probandos com IRCT apresentam um risco 3,8 vezes superior ao dos outros familiares para a mesmo tipo de evolução nefropática; metade dos familiares em primeiro grau manifestam também doença renal. O sexo do progenitor transmissor não tem influência na expressão do fenótipo renal.

Sugerimos que uma mutação noutra gene, em locus eventualmente próximo do da transtirretina, condicione uma alteração do meio fisiológico renal, proporcione um ambiente favorável à deposição de amiloide e glomerulosclerose. Possíveis candidatos seriam os genes do *TGF- β 1 response element* e da laminina α -3. O seus produtos poderão

resultar em acumulação de matriz extra-celular, característica que se associa à progressão da nefropatia e da amiloidose.

O terceiro objectivo a que nos propusemos foi cumprido. Reconhecemos as características epidemiológicas das famílias dos insuficientes renais crónicos terminais. Pesquisamos e demostramos a agregação familiar de nefropatia; estabelecemos possíveis mecanismos para a susceptibilidade intrafamiliar de doença renal.

4. Apresentação e curso da doença renal

A microalbuminúria representa o primeiro estágio clínico da nefropatia. A microalbuminúria persistente pode ser detectada em cerca de um terço dos portadores assintomáticos da mutação, após os 25 anos de idade. Os portadores assintomáticos com microalbuminúria têm um risco 4,8 vezes superior de vir a apresentar neuropatia, em relação àqueles com excreção normal de albumina. A doença sintomática surge entre o segundo e terceiro anos após a detecção de microalbuminúria.

Nos indivíduos em que a microalbuminúria surge antes da neuropatia, estabelece-se progressão para a proteinúria em metade dos casos. Esta progressão acontece durante o primeiro ano de doença neurológica. Quando a microalbuminúria surge durante o curso da neuropatia, a evolução para proteinúria surge também em 50% dos doentes e, em média, 2 anos depois.

A nefropatia manifesta-se por proteinúria em 95% dos doentes e evolui para nível nefrótico em metade dos casos. A persistência de proteinúria superior a 3 g/dia, em comparação com os valores entre 0,3 e 3 g/dia, confere um risco 3 vezes superior para o desenvolvimento de IRCT. A proteinúria nefrótica é significativamente mais frequente nas mulheres, o que está de acordo com a gravidade da disfunção renal no sexo feminino.

A doença renal manifesta-se, em média, 7 anos depois da neuropatia começar. Nos doentes que desenvolvem IRCT, a doença renal inicia-se mais cedo, durante o quarto ano de neuropatia; se a apresentação inicial é a proteinúria nefrótica, então há uma antecipação de um ano, isto é, a doença renal surge no terceiro ano de neuropatia. No extremo, estão os doentes cujo quadro inicial da PAF é nefrótico; 59% destes casos evoluem para a IRCT.

O declínio da função renal estabelece-se rapidamente no ano que antecede a IRCT e a hipervolemia constitui a principal indicação para começar diálise. A IRCT instala-se, em média, 10 anos após o início da doença neurológica; quando a nefropatia se apresenta

como proteinúria nefrótica, a IRCT surge, em média, 7 anos depois dos primeiros sintomas de neuropatia.

Identificámos um marcador de lesão renal em fase pré-clínica; o curso natural da nefropatia foi delineado. O quarto e quinto objectivos desta investigação foram cumpridos.

5. A nefropatia no contexto da doença sistémica

A manifestação inaugural que encontramos exclusivamente nos insuficientes renais terminais (quando comparados com os seus familiares que nunca apresentaram nefropatia) é a disritmia sintomática. A bradicardia sinusal ou o bloqueio aurículo-ventricular motivam implantação de *pacemaker* a 75% dos insuficientes renais em diálise. No curso da doença, as mulheres que progridem até à IRCT necessitam de *pacemaker* mais cedo do que os homens. Na avaliação ecocardiográfica do insuficiente renal, a dilatação da aurícula esquerda surge como a alteração mais frequente, não se estabelecendo uma relação entre a presença deste achado e o avanço da doença neurológica.

A análise das primeiras manifestações de neuropatia nos doentes insuficientes renais crónicos (em comparação com aqueles sem doença renal), permite afirmar que a neuropatia sensitiva isolada é significativamente menos frequente e surge em simultâneo com a neuropatia autonómica, emagrecimento ou sintomas gerais; as queixas digestivas altas (náuseas e vómitos) são menos comuns. No conjunto dos doentes com IRCT, o emagrecimento é significativamente mais frequente nas mulheres.

O conhecimento das manifestações sistémicas associadas à nefropatia completa o quinto objectivo ao qual nos propusemos.

6. Tratamento da doença renal crónica

A insuficiência renal crónica terminal na PAF tem sido tratada com hemodiálise. As infecções, com origem no acesso vascular, nos tecidos moles ou nos pulmões, complicam o curso da doença após aquele tratamento.

A sobrevivência no fim do primeiro ano de hemodiálise é de 54,5%. As infecções constituem a principal causa de morte. Os factores de maior risco para a morte durante o primeiro ano de hemodiálise são a existência de úlceras de pressão, a marcha impossível

ou com apoio bilateral e a dependência de cateter central como acesso vascular para hemodiálise. Embora com menos significado, os outros factores que conferem risco de morte são a necessidade de sonda vesical permanente prévia ao desenvolvimento de IRCT, a ausência de *pacemaker* e o valor sérico de albumina inferior a 3 g/dl.

Os doentes com PAF podem ser candidatos a transplante renal. Os critérios de selecção devem ter por base a exclusão dos doentes com os factores de risco mencionados. As infecções mantêm-se como as principais complicações após transplante, predominando as infecções urinárias e as dos tecidos moles. Os candidatos a transplante renal têm indicação para transplante hepático em simultâneo, de modo a evitar a recorrência da amiloidose no enxerto e a progressão da doença neurológica. Nos doentes com nefropatia e função renal normal, pode existir remissão da proteinúria após transplante hepático isolado. Essa remissão, por ser precoce, não implica a remoção de amiloide, podendo estar associada a um efeito hemodinâmico intra-renal por fármacos imunossupressores.

O sexto objectivo do trabalho foi cumprido. As opções terapêuticas na nefropatia foram desenvolvidas; descrevemos as complicações do tratamento da IRCT e o curso da doença após hemodiálise ou transplantação renal e hepática em simultâneo.

7. A informação às famílias

A PAF é uma doença da vida adulta, autossómica dominante, com idade de início e expressão variáveis. Uma das manifestações é a nefropatia. A informação sobre o padrão familiar da nefropatia deve ser abordado com os familiares em primeiro grau de um doente com IRCT. A possibilidade de haver um marcador precoce de doença renal, não invasivo e de fácil repetição, pode interessar aos portadores assintomáticos.

Os nefrologistas devem participar na informação dada nos centros de genética e manter o esforço de esclarecer a história familiar de doença renal.

VIII - SUGESTÕES PARA INVESTIGAÇÃO FUTURA

Este trabalho foi desenvolvido em ambiente clínico, na tentativa de esclarecer a nefropatia numa amiloidose neuropática que, classicamente, não se associava a doença renal. Alguns dos resultados abrem perspectivas para estudos posteriores.

Sugerimos algumas hipóteses de investigação:

1. Estudo da distribuição dos RAGE-AGE e RAGE-TTR, laminina e TGF- β no rim de doentes com e sem nefropatia, procurando bases patofisiológicas para a deposição de amiloide mesangial, extensa nos nefropatas.

2. Estudo da susceptibilidade do sexo feminino para a doença renal. Um dos caminhos seria aplicar o modelo do animal transgénico para a TTR V30M e observar efeitos das variações hormonais na deposição e distribuição de amiloide renal. A marcação imuno-histoquímica dos receptores de estrogénios no rim com amiloidose seria outra possibilidade de investigação.

3. Aumentar a informação epidemiológica nas famílias dos insuficientes renais crónicos. O aumento do número de elementos informativos talvez possibilitasse o estudo de modelos de “transmissão” de doença renal.

4. Identificar os factores envolvidos no estado hipoparatiroideu. Estudo da relação da 25-hidroxivitamina D com a hormona das paratiróides e marcadores da renovação óssea.

5. Avaliar, através da histologia, a hipótese de remoção tecidual de amiloide renal após transplante hepático. A comprovação da solubilização de fibrilas *in vivo* contribuirá para o conhecimento da amiloidogénese.

IX - RESUMOS

Resumo

A polineuropatia amiloidótica familiar do tipo português (PAF) é uma forma de amiloidose sistêmica de transmissão autossômica dominante, com início entre terceira e a quarta décadas de vida. Nesta doença, as fibrilas de amilóide são compostas por uma variante da transtirretina (TTR) em que uma valina é substituída pela metionina na posição 30 da molécula (TTR V30M). O gene que codifica a TTR localiza-se no cromossoma 18. O fígado é o principal local de síntese desta proteína. A PAF é a amiloidose hereditária mais comum e tem o seu maior foco no norte de Portugal. As principais manifestações da doença são consequência da polineuropatia sensitiva, motora e autonómica. Há mais homens do que mulheres doentes. O único tratamento considerado específico é o transplante hepático porque leva ao desaparecimento da proteína mutante. O desenvolvimento de doença renal era considerado raro ou mesmo ausente. As manifestações da amiloidose renal, qualquer que seja a proteína precursora, consistem em proteinúria desde ligeira a síndrome nefrótica, por vezes associada a insuficiência renal. Esta pode evoluir para insuficiência renal crónica terminal (IRCT).

Pesquisámos a distribuição de amilóide em fragmentos de biópsia renal de 14 doentes com PAF. A infiltração renal por amilóide foi observada em todos os doentes estudados, e caracterizou-se por envolvimento do interstício, membranas basais tubulares e *vasa recta* da medula. Na presença de manifestações clínicas renais a deposição glomerular e vascular foi mais extensa. O estudo imunohistoquímico associou a amilóide renal à TTR. Sugerimos que factores intrínsecos próprios do meio medular e modificações nos componentes de matriz extracelular do glomérulo, possam favorecer diferentes localizações dos depósitos e mudanças no quadro clínico renal.

Em estudo prospectivo, desde 1990 até 2000, descrevemos a frequência de proteinúria (excreção urinária $\geq 0,3$ g/l) e insuficiência renal crónica (creatinina $> 1,2$ mg/dl ou ureia sérica > 50 mg/dl), nas três áreas de maior prevalência da PAF no norte de Portugal (Póvoa de Varzim e Vila do Conde, Barcelos e Braga), correspondendo ao seguimento de 403 doentes (150 famílias não relacionadas). A nefropatia esteve presente em 147 doentes (36%; 53 homens, 94 mulheres) e a evolução para a IRCT em 47 (11,7 %; 15 homens, 32 mulheres). Os factores de risco para doença renal foram o sexo feminino, a idade de início ≥ 40 anos e a história familiar de nefropatia. Avaliámos também, durante o mesmo período,

do de tempo, as famílias dos probandos com IRCT (60 famílias), quer pertencessem às áreas de estudo ou a outros concelhos do país. Nestas famílias, quando a nefropatia surgiu como primeira manifestação da PAF, a progressão para IRCT aconteceu em 59% dos casos. Verificámos que, em relação aos probandos, 49,4% dos familiares em primeiro grau tinham nefropatia e 20% dos irmãos evoluíram para IRCT. Os achados sugerem a influência de factores genéticos adicionais.

Avaliámos a microalbuminúria (excreção de albumina na urina entre 20 e 200 $\mu\text{mg}/\text{min}$) em 22 portadores assintomáticos da mutação V30M e em 32 doentes. A microalbuminúria representou o primeiro estágio de nefropatia. Na presença de doença sintomática, a microalbuminúria evoluiu para proteinúria, em metade dos casos, após um período de 2 anos. Nos portadores assintomáticos, a microalbuminúria conferiu um risco 4,8 vezes superior para o desenvolvimento de neuropatia nos 3 anos seguintes. Estes achados podem ser compatíveis com quebra da barreira de filtração glomerular por lesão precoce da membrana basal, na presença de pequenos depósitos de amiloide no mesângio.

Estudámos 62 doentes (24 homens, 38 mulheres) com IRCT, em hemodiálise, entre 1990 e 2000. O tratamento iniciou-se, em média, aos 51,5 anos com 10,2 anos de evolução neuropática. A sobrevivência após o primeiro ano de tratamento foi 54,5%. Indicámos a transplantação renal e hepática em simultâneo nos doentes com melhor prognóstico na diálise. As principais complicações deste tratamento foram infecciosas. Não verificámos recorrência de proteinúria após transplante. Pensámos que, até ao momento actual, esta é a abordagem terapêutica mais válida no doente com IRCT. Após transplante hepático isolado, a proteinúria teve uma remissão rápida em doentes com função renal normal, sugerindo um efeito hemodinâmico de fármacos (ciclosporina) e não a mobilização de amiloide.

Demonstrámos de modo inequívoco a existência de nefropatia na PAF. Delineámos a sua história natural e tratamento.

Abstract

Familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type (FAP), is a form of systemic amyloidosis inherited in an autosomal dominant mode, with onset between the third and fourth decades of life. The components of amyloid fibrils consist of transthyretin (TTR), in which valine has been replaced by a methionine at position 30 of the molecule (TTR V30M). The gene for TTR is located on chromosome 18, and the plasma protein is mainly synthesized by the liver. FAP is the most common form of hereditary amyloidosis, and has its largest world focus in Portugal. The disease progresses with peripheral sensorimotor and autonomic neuropathy. Men are more affected than women. The only specific treatment is liver transplantation, which results in the disappearance of mutant TTR from the plasma. References to the clinical picture of FAP have considered renal disease very rare or absent. Renal involvement by amyloid (nephropathy), whatever the chemical composition of amyloid fibrils, may consist of mild to nephrotic range proteinuria, and, in some instances, renal dysfunction that could lead to end-stage renal disease (ESRD).

In this study we evaluated the distribution of amyloid deposits in renal biopsy specimens from 14 FAP patients. All patients studied had renal amyloid deposits, predominantly in the interstitium, tubular basement membranes, and *vasa recta* of the medulla. Glomerular and vascular involvement was more prominent in patients with urinary abnormalities. Immunohistochemical studies showed that the amyloid substance corresponded to TTR. Renal medullary environment and modifications in glomerular extracellular matrix proteins may accelerate amyloid formation and change the clinical presentation.

The frequency and familial predisposition to proteinuria ≥ 0.3 g/l or renal dysfunction (serum creatinine > 1.2 mg/dl or serum urea > 50 mg/dl) and ESRD have been assessed after a prospective study (1990 – 2000) in the 3 main areas of FAP in Portugal (Póvoa de Varzim and Vila do Conde, Barcelos and Braga). Four hundred and three patients (150 kindreds) had renal evaluation; 147 had nephropathy (36%; 53 males, 94 females) and 47 had ESRD (11.7%; 15 males, 32 females). Risk factors for nephropathy were gender (women more affected), age of onset ≥ 40 years and previous family history of nephropathy. During the same period of time, we evaluated ESRD probands and their kindreds, from the areas of study and from all over the country. When nephropathy was the first feature of FAP, 59% of the patients from those kindreds progressed towards ESRD. Nephropathy was ascertai-

ned in 49.4% of first degree relatives of probands, and ESRD in 20% of their sibs, suggesting additional genetic factors.

Investigation concerning an early marker of nephropathy was given by microalbuminuria (urinary albumin excretion between 20 e 200 $\mu\text{mg}/\text{min}$), as analysed in 22 asymptomatic gene carriers and 32 patients. Microalbuminuria represented the first stage of clinical amyloid nephropathy. One half of the patients with microalbuminuria developed proteinuria, usually after 2 years. Asymptomatic gene carriers with microalbuminuria had a 4.8 fold risk of developing neuropathy, within the subsequent 3 years. These findings may be related to disruption of glomerular barrier by small amyloid deposits in the mesangium interacting with glomerular basement membrane.

Sixty two patients (24 males, 38 females) with ESRD treated by hemodialysis were followed between 1990 and 2000. Age at first dialysis was 51.5 years, and mean duration of neuropathy was 10.2 years. The survival at the end of first year of treatment was 54.5%. Infections were the leading cause of early and late mortality. After definition of the factors associated to early death on dialysis, we selected 2 patients for simultaneous liver-kidney transplantation. The main complications were related to infections, but recurrence of proteinuria was absent. Probably this is the best option to treat ESRD. Early remission of proteinuria after isolate liver transplantation was documented in patients with normal renal function, suggesting not amyloid removal, but a hemodynamic effect of cyclosporine on renal vasculature.

In this work, FAP nephropathy was definitively established. The natural history and treatment of renal disease were clarified.

Résumé

La polyneuropathie amyloïde familiale de type portugais (PAF) est une amylose généralisée, de transmission autosomique dominante débutant entre la troisième et la quatrième décennie de la vie. La formation de cette amylose est causée par le dépôt d'une transthyrétine anormale touchant son monomère (TTR) avec mutation ponctuelle remplaçant une valine par une méthionine en position 30 (V30M). Le gène de la TTR a été localisé sur le chromosome 18. Le foie est le lieu principal de la synthèse de TTR plasmatique. La plupart des patients touchés par cette amylose sont originaires du Portugal. La principale manifestation est une neuropathie sensitivo-motrice et végétative. Les hommes sont plus souvent atteints que les femmes. Le seul traitement efficace est la transplantation hépatique, qui entraîne la disparition rapide de la TTR mutée circulante. Habituellement, quelle que soit l'origine des dépôts amyloïdes, l'expression clinique rénale est une protéinurie avec ou sans insuffisance rénale. L'atteinte rénale au cours des amyloses à la TTR est considérée comme exceptionnelle.

Dans un groupe de 14 malades avec PAF, nous avons évalué la distribution des dépôts amyloïdes dans le rein sur une biopsie rénale faite systématiquement avant une transplantation hépatique. Les dépôts étaient présents chez tous les malades, prédominant dans l'interstitium, le long des membranes basales tubulaires, et dans les *vasa recta* de la médullaire. L'atteinte glomérulaire et vasculaire était observée dans le group de malades avec protéinurie. L'amylose était caractérisée à l'aide de techniques immunohistochimiques comportant l'étude de la distribution de la TTR. L'environnement de la médullaire, les modifications des protéines de la matrice extra-cellulaires dans le glomerulus peuvent favoriser les dépôts et modifier les manifestations cliniques.

La fréquence et la pré-disposition familiale à développer une néphropathie dans la PAF a été étudiée dans 3 régions du nord du Portugal, là où la maladie est la plus fréquente (Póvoa de Varzim et Vila do Conde, Barcelos, Braga). Cette étude prospective faite entre 1990 à 2000 comprenait l'observation de 403 malades (197 hommes, 206 femmes) appartenant à 150 familles. L'atteinte rénale était évaluée avec la présence d'une protéinurie permanente ≥ 0.3 g/l, et/ou une créatinine sérique $> 1,2$ mg/dl, une urée sérique > 50 mg/dl. La néphropathie était retrouvée chez 147 malades (36%; 53 hommes, 94 femmes). Quarante sept patients (11.7%, 15 hommes, 32 femmes) développaient progressivement une insuffisance rénale avec évolution vers l'insuffisance rénale terminale (IRT). Les facteurs

de risque retrouvés chez les patients avec atteinte rénale étaient le sexe féminin, l'âge moyen de début de la PAF ≥ 40 ans, et une histoire familiale de néphropathie.

Dans cette même période, à partir de 60 familles comportant un membre ayant évolué vers l'insuffisance rénale terminale, nous avons pu remarquer qu'ils étaient originaires de plusieurs régions. Par ailleurs, si dans ces familles les premières manifestations de la PAF était une néphropathie, la progression vers l'IRT était observée chez 59% des sujets. De plus, l'étude montrait que la néphropathie atteignait 49,4% des patients apparentés au premier degré et, qu'enfin 20% de la fratrie avec PAF avait aussi une atteinte de la fonction rénale et développaient IRT. Ces résultats suggèrent que des facteurs génétique s'ajoutent à la mutation de la TTR.

Nous avons essayé de chercher un marqueur précoce d'atteinte rénale en recherchant une microalbuminurie (excretion d'albumine urinaire entre 20 et 200 $\mu\text{mg}/\text{min}$) chez 22 porteurs asymptomatiques et 32 malades. La moitié des malades avec microalbuminurie développait une protéinurie. La microalbuminurie avait aussi une valeur prédictive concernant la neuropathie. Les porteurs asymptomatiques de la mutation qui présentaient une microalbuminurie persistante avaient un risque 4,8 fois supérieur de développer une neuropathie si on les comparait à ceux sans microalbuminurie. Cette phase initiale de l'atteinte rénale chez les porteurs asymptomatiques était probablement le fait de petits dépôts dans le mésangium avec anomalie de la perméabilité de la membrane basale glomérulaire (MBG) ayant pour mécanisme l'interaction des fibrilles amyloïdes avec les composants de la MBG.

Cette étude prospective comprenait 62 malades (24 hommes, 38 femmes) traités par hémodialyse périodique. L'âge moyen de début du traitement était 51,5 ans, avec une durée moyenne de neuropathie de 10,2 ans. La survie des malades dialysés était de 54,5% après un an. Les infections ont été les principales causes de décès précoce ou tardif. Deux malades, n'ayant pas de risque élevé de décès, ont subi une double transplantation rein-foie. Les principales complications observées étaient des infections, mais sans réapparition d'une protéinurie. Chez les patients avec protéinurie et fonction rénale conservée, à qui une transplantation hépatique seule a été proposée, une très rapide disparition de la protéinurie a été observée. Ce fait suggère plutôt un effet hémodynamique de la ciclosporine sur la vascularisation rénale qu'une résolution de l'amylose.

Ce travail décrit la néphropathie associée à la PAF, ses caractéristiques et son traitement.

X - APÊNDICE

Histórias familiares

O estudo epidemiológico correspondeu ao registo e actualização regular de 177 genealogias, durante o período de 1990 a 2000. Em sessenta dessas famílias, um ou mais elementos apresentaram IRCT. Na revisão dos antecedentes familiares usamos informações dos arquivos hospitalares e dos clínicos dos centros de saúde, exames analíticos, cartas de alta e certidões de óbito cedidas pela família. Os arquivos do Hospital Geral de Santo António e do CEP foram as principais fontes de informação.

Apresentamos algumas histórias familiares que serviram de base ao nosso trabalho. Pretendem ilustrar a agregação familiar de nefropatia, a penetrância incompleta da PAF nas famílias com insuficientes renais e a antecipação de idade de início da doença.

Abreviaturas utilizadas nas histórias familiares

I. – idade de início dos sintomas

yr – anos

D. – idade à data da morte

PT – proteinúria

RF - insuficiência renal

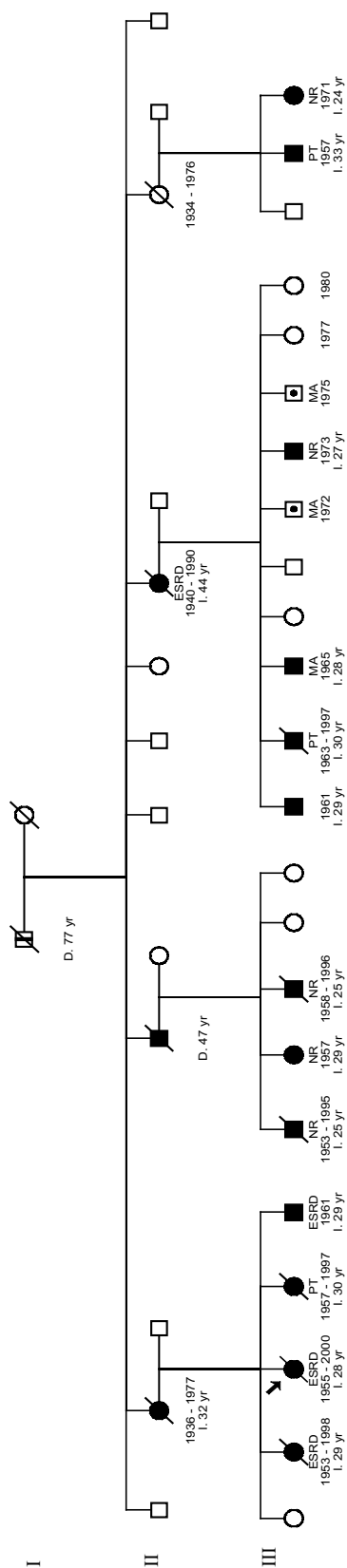
ESRD – insuficiência renal crónica terminal

MA – microalbuminúria

NR – sem alterações renais

As datas abaixo dos símbolos representam o ano de nascimento e o ano de morte

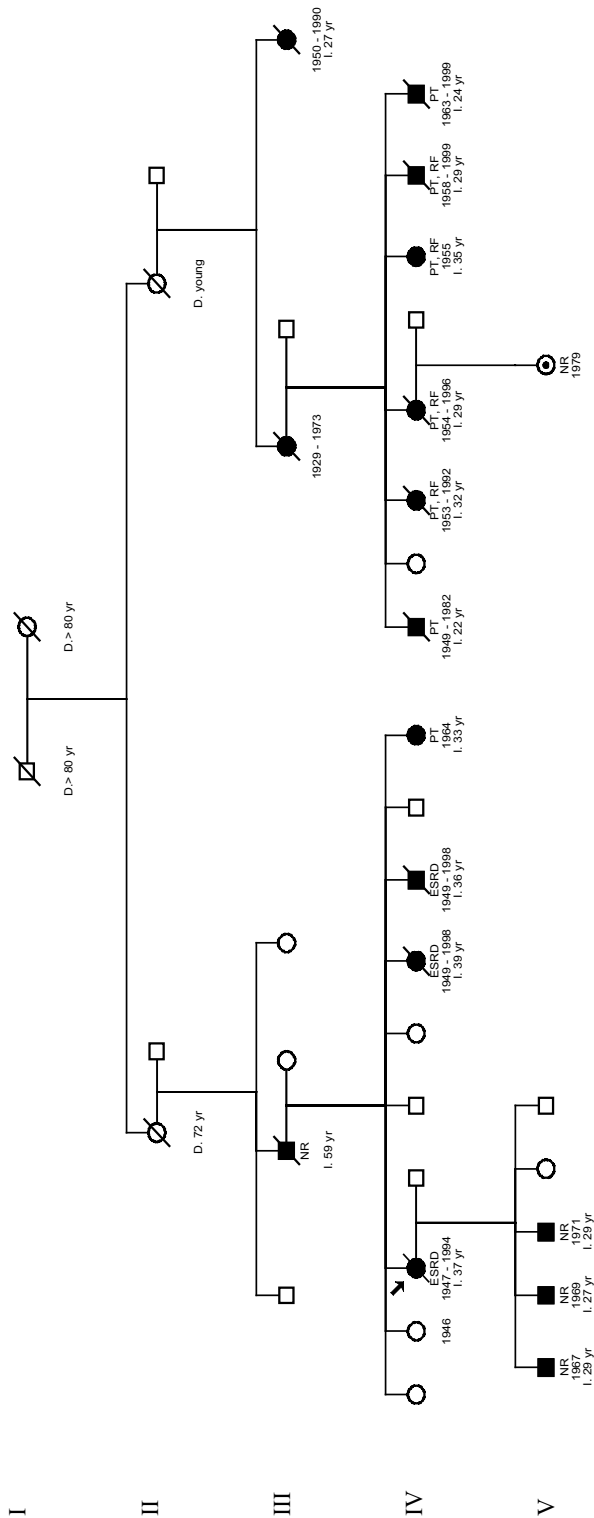
História familiar 1



Agregação familiar de nefropatia

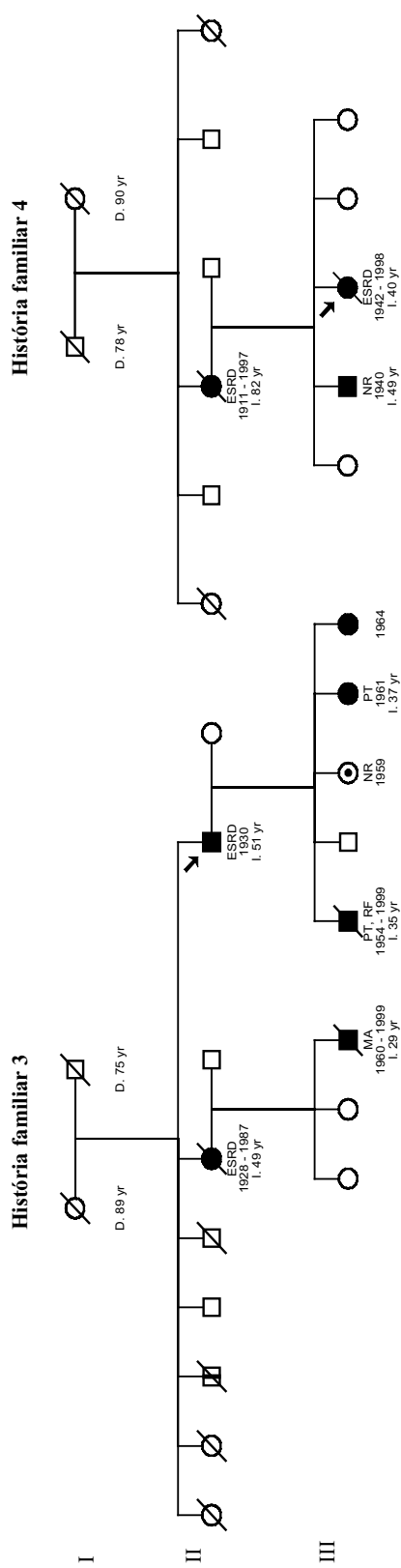
Nesta família, podemos observar que o probando com insuficiência renal crônica terminal (ESRD) teve dois irmãos e uma tia com ESRD; uma irmã e 2 primos apresentaram proteinúria. A idade de início do progenitor transmissor (mãe) foi próxima da dos seus descendentes (*clássica*, antes dos 35 anos). No entanto, o avô materno (1ª geração) foi descrito como doente após a 7ª década de vida.

História familiar 2



Agregação familiar de nefropatia

Nesta família, na geração do probando, todos os doentes apresentaram nefropatia. Dois dos irmãos do probando desenvolveram ESRD; uma irmã teve nefropatia como primeira manifestação da PAF; em 3 primas a doença associou-se a insuficiência renal crónica grave. Não há descrições de doença na 1ª e 2ª gerações.

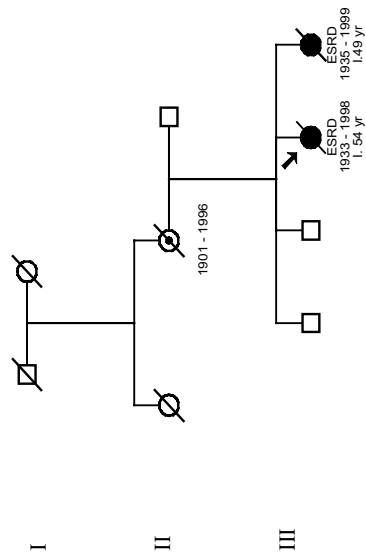


Pares: pai-filho e mãe-filha com insuficiência renal crônica
Antecipação de idade de início da doença

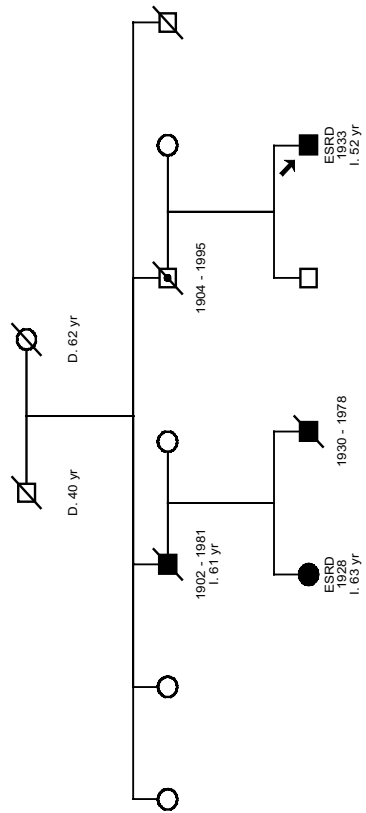
O filho do probando da história familiar 3, quando faleceu, apresentava insuficiência renal crônica grave; o probando teve uma outra filha com proteinúria e uma irmã falecida por ESRD; da 2ª para a 3ª geração observamos uma antecipação de idade de início da doença entre os 16 e os 20 anos.

Na história familiar 4 podemos observar que o probando adoeceu mais cedo do que o progenitor, tendo ambos (mãe e filha) desenvolvido ESRD; a antecipação de idade de início foi de 42 anos.

História familiar 5



História familiar 6



ESRD e progenitores assintomáticos idosos

Na história familiar 5 podemos observar que duas irmãs tiveram ESRD e início de doença após os 40 anos. A mãe, a progenitora transmissora, faleceu aos 95 anos sem evidência de doença neurológica ou renal.

Na história familiar 6 verificamos que o progenitor transmissor do probando faleceu aos 91 anos, sem doença neurológica ou renal. O tio e a prima do probando (com ESRD) iniciaram a doença na 7ª década de vida.

Abreviaturas mais utilizadas no texto

PAF – polineuropatia amiloidótica familiar tipo português

TTR – transtirretina

TTR V30M – transtirretina com substituição da valina por metionina na posição 30

ATTR – amiloidose associada à transtirretina

ATTR V30M - amiloidose associada à transtirretina com a mutação V30M

RBP – proteína de ligação ao retinol (retinol binding protein)

SAP – componente sérico amilóide P (serum amyloid P)

β 2-M – β 2-microglobulina

FMF – febre Mediterrânea familiar

ANF – amiloidose familiar nefropática

AGE – produtos de glicolização avançada (advanced glycation end products)

RAGE – receptores dos produtos finais de glicolização avançada (receptors for advanced glycation end products)

TGF – factor de crescimento transformador (transforming growth factor)

MBG – membrana basal glomerular

IRCT – insuficiência renal crónica terminal

ADN – ácido desoxiribonucleico

ARNm – ácido ribonucleico mensageiro

CEP – Centro de Estudos de Paramiloidose

