

# Do Genoma Humano à Prática Clínica #

## From the Human Genome to Clinical Practice

Amândio S. Tavares \*

### Resumo

*De forma resumida, descreve-se a situação presente quanto ao conhecimento do genoma humano, e procura-se definir quais são, de momento, as possibilidades reais para o clínico prático de o aplicar aos seus doentes. Existe hoje um grande desvio entre o que se tem prometido (e corresponde, sobretudo, a programas de investigação em curso ou previstos para um futuro próximo) e o que é oferecido pelos serviços de Genética no campo do diagnóstico e tratamento. Sem entrar na análise dos problemas bioéticos em Genética Médica, define-se a eficácia e limites dos testes genéticos na clínica, chamando a atenção para a necessidade da obediência a um protocolo bem definido na hora de pedir um desses testes: o protocolo deve incluir a definição do quadro hereditário da doença e as alternativas de diagnóstico e terapêutica a que o teste irá responder. O clínico deve ter informação sobre os testes que podem ser efectuados, saber as suas indicações formais e preparar-se para as dificuldades eventualmente postas pela interpretação dos resultados.*

*De momento e perante os nossos doentes, as novas técnicas de diagnóstico podem ser muito úteis, sobretudo quando forem aplicadas com método. Todavia, mais do que em qualquer outra área, é preciso saber quando e como proceder a estes exames: o seu uso deve ser enquadrado num protocolo de estudo e follow-up.*

Palavras chave: *Genoma, consulta de genética*

### Abstract

*Current knowledge of the human genome is briefly described, as well as the limitations of its practical use by the clinician in patients. There is presently a large gap between what the molecular geneticists*

*promise, (such promises are included in research projects under way or still in a blue-print stage) and what is really available for diagnosis and treatment. Bioethical issues aside, practitioners should be aware of the usefulness and limitations of genetic testing in clinical practice, and the need for a well-defined set of rules before requesting a given test. This includes a precise definition of the heredity pattern for each condition and the diagnostic and treatment alternatives suggested by each result. Practitioners should have working information about the tests currently offered, know the exact indications for each one, and be prepared for the issues eventually raised by the interpretation of expected results.*

*New diagnostic molecular tests will be very helpful, especially when used judiciously. However, more than in any other medical field, it is necessary to know when and how to request these tests: their use should be included in a strict scheme of study and follow-up.*

Key words: *Genome; Genetic Consultations*

### Introdução

O desenvolvimento da tecnologia molecular, aplicada ao estudo do genoma humano, permitiu alcançar a meta que todos os cientistas ambicionavam, a definição da sequência de bases inscritas no DNA humano. Daí, o compreensível entusiasmo que rodeou a notícia veiculada pelos jornais de que estava na mão do Homem a mágica “receita para fazer homens” – notícia comentada com mais paixão que prudência, levantando falsas expectativas na população.

Parece pois adequado, ao abrir as Jornadas de Medicina Interna, situar este avanço no seu correcto contexto e analisar, ainda que de forma sucinta, o seu significado para o clínico prático e as perspectivas que se lhe põem na tarefa de acompanhar e tratar os seus doentes. Deixarei de lado as questões bioéticas, que já têm sido profusamente tratadas por distintas personalidades, provenientes dos mais diversos quadrantes e especialidades, e procurarei centrar-me nalguns pontos muito simples e de interesse prático.

### O conhecimento do genoma humano

Que significa para nós o genoma humano, tal como o conhecemos no presente momento? Que interesse tem esse conhecimento, aqui e hoje, para o diagnóstico e tratamento de doenças?

Aquilo de que dispomos agora é a série de nucleotídeos (com adenina, timina, citosina e guanina), onde a experiência nos permite encontrar os pontos de início e fim de cada gene, as regiões a montante e a jusante que funcionam como moduladores, intensificando ou reduzindo o seu efeito,

# - Conferência nas XVIII Jornadas de Medicina Interna do Porto, 6 de Novembro de 2001

\* - Centro de Genética Clínica, Porto; Professor Catedrático (aposentado) da Faculdade de Medicina do Porto

e as zonas aparentemente inúteis, os chamados intrões. Torna-se necessário, primeiro, verificar, em grupos suficientemente representativos das populações, quais são os segmentos comuns à espécie, eliminando os segmentos específicos de cada grupo, de cada família ou de cada indivíduo (muito úteis para investigações de paternidade, na análise da agregação familiar ou nos estudos antropológicos), e depois, recorrendo à Genética comparada, definir os genes que correspondem a proteínas de estrutura ou enzimáticas. O número de genes identificados na espécie humana deve situar-se entre trinta mil e cinquenta mil, aparentemente muito mais baixo do que a princípio se pensava: não se deve esquecer que um segmento de DNA, definido como “gene” pela presença do código inicial, pode produzir dois ou mais polipeptídeos consoante a sua configuração de momento e os factores de estimulação; portanto, o número de polipeptídeos que podem ser produzidos será muito maior. O exemplo típico deste fenómeno é o gene da calcitonina, onde pode também ser lida a katalcicina ou CGRP (peptídeo relacionado com o gene da calcitonina), que está concentrada no *locus ceruleus*, possui grande actividade hemo-dinâmica e foi descoberta apenas por técnicas de recombinação molecular.

O exemplo escolhido mostra ainda como se irá conseguir identificar genes que produzem proteínas até agora desconhecidas, com existência fugaz, de segundos, ou presentes apenas em determinadas condições ou em locais inacessíveis. Este será o efeito mais dramático, mas também o de manifestação mais lenta: os conhecimentos que se estão a desenvolver neste campo terão um importante efeito na Fisiologia e, conseqüentemente, na Fisiopatologia e na Farmacologia. Quando este desiderato for atingido, saberemos que substâncias se produzem, em que momento elas aparecem durante o desenvolvimento do ser humano, desde o ovo até depois da morte, os mecanismos íntimos de predisposição e génese de doenças, e saberemos também quais os melhores fármacos e quais os mais eficazes para cada situação. Todavia, esse estadio do conhecimento médico-biológico não está próximo: o médico encontra-se agora numa situação similar à do seu antepassado do século XVI, que podia definir as estruturas do organismo mas apenas adivinhava a forma como elas funcionavam e agiam entre si. O problema reside na ideia, expandida entre o público (e os próprios médicos), do imediatismo da aplicação do genoma humano ao diagnóstico e ao tratamento das doenças: o paciente e o clínico assistente não gostam de ouvir que as informações respigadas nos jornais ou na Internet correspondem a programas de investigação futura ou a experiências em curso, por vezes reduzidas ainda a um número limitado de casos.

O terceiro passo nos estudos do genoma humano consiste na identificação de doentes e portadores de genes que provocam doença ou favorecem o seu aparecimento. Não é simples fazê-lo: é indispensável ter um diagnóstico

correcto dos casos bem identificados, e aqui o papel do clínico torna-se inestimável, garantindo um diagnóstico diferencial seguro indicando quais os elementos da família que devem ser examinados e facilitando as relações entre o geneticista molecular e os indivíduos estudados, sempre receosos do significado e impacto dos exames no seu quotidiano.

No passo seguinte, o estudo das populações, pretende-se fazer a comparação da estrutura do DNA entre grupos humanos diferentes, cotejando-a com a epidemiologia específica de cada população. Somente depois de tudo isto efectuado, será possível voltar ao estudo molecular dos fármacos – agora na Farmacogenética —, para isolamento de genes “benéficos” ou “normais” (por oposição aos genes “doentes” ou mutações nocivas) e tentativa de sua inserção nos indivíduos doentes ou, mediante fertilização *in vitro*, nos ovos provenientes de casais em alto risco de descendência afectada.

### Um problema de momento

Contudo, a literatura médica está já cheia de informação sobre a aplicação da genética molecular ao estudo de numerosas situações clínicas, com numerosas propostas de rastreio de indivíduos em risco. Em princípio, parece lógico separar na população geral o grupo de pessoas que apresentam uma tendência elevada de desenvolver no futuro determinada doença: afinal, é o sonho da Medicina Preventiva e este sistema permitiria concentrar recursos e verbas na revisão aturada dessas pessoas. Rastreios do género têm sido propostos e alguns mostram-se muito eficientes na definição das pessoas que é necessário acompanhar com mais atenção. Uma questão séria é a aplicação pré-sintomática do método a doenças de aparecimento tardio e sem terapêutica adequada (exemplo, a doença de Huntington), porque um resultado positivo tem um grave impacto sociológico (discriminação, exclusão laboral, etc.) e acarreta graves perturbações psicológicas.

Contudo, o próprio sonho da eficácia desfaz-se quando recordamos, por exemplo, que o rastreio do gene HPC1 é positivo numa pequena percentagem de cancros da próstata e os genes BRCA1 e BRCA2, tão falados nas neoplasias malignas da mama (os portadores desses genes têm uma probabilidade de 50 a 85 % de desenvolver cancro), definem apenas as formas hereditárias, que correspondem somente a cinco ou 10 % de todos os cancros mamários: quer dizer, na melhor das hipóteses, o teste permite prever 8,5 % dos cancros da mama e será falso-negativo em 90 % das pacientes. Então, mesmo aqui, o papel do clínico é fundamental, definindo as famílias atingidas de cancro hereditário da mama, e para essas, sim, é formal a indicação do estudo molecular. Quanto às formas esporádicas, o efeito de outros genes (ou outras mutações naqueles genes) terá de ser pesquisado, num número suficiente de pacientes.

A aplicação dos testes de rastreio ao diagnóstico não é

isenta de riscos. Isto é bem conhecido dos pediatras e pneumologistas que lidam com as diversas formas de fibrose cística ou mucoviscidose, porque cada agregado populacional tem o seu conjunto de mutações, com frequências diversas. Cerca de metade dos casos, na nossa população, deve-se à presença da mutação  $\Delta F508$ , em homozigotia, no gene da proteína que forma os canais de passagem de iões entre a célula e o exterior – CFTR –, mas um painel de 15 mutações (o conjunto habitualmente usado num exame de rotina) define apenas 70 % das situações, e para atingir o nível de 80 % de sensibilidade será preciso estudar outras 15. Na população heterogénea dos E. U. A., são necessárias 63 mutações para atingir os 95 % de sensibilidade (excepto os indivíduos de origem asiática). Em termos práticos, sair do teste “habitual” só se justificará, em termos de relação custo-efeito, se houver um estudo molecular anterior (por exemplo, identificação de uma mutação rara num familiar do indivíduo em questão), uma convicção muito forte quanto ao diagnóstico ou a informação de que se trata de um paciente com diferente origem étnica (atenção aos falsos pruridos “anti-raciais” na hora de identificar essa origem étnica, indispensável para um correcto raciocínio genético).

Outro exemplo de dificuldades aparentemente inesperadas reside no síndrome do segmento QT longo (LQTS). Para este síndrome hereditário, caracterizado por taquiarritmia, síncope e eventual morte súbita, estão identificados seis *loci*, com numerosas mutações em cada um dos polipeptídeos formados: para o gene *KCNQ1*, por exemplo, estão já identificadas 76 mutações em 202 doentes do grupo europeu de referência (secretariado por Larsen), mas somente uma aparece em mais de 25 casos. Aliás, toda a análise genética da patologia cardiológica é prejudicada pelo facto de ser muito elevado o número de genes que podem ser expressos no aparelho cardio-vascular, entre 21 e 27 mil.

### Testes genéticos – Fazer o quê?

Vejamus então que testes poderemos realizar nos nossos doentes. Os métodos actuais permitem-nos já, com alguma facilidade e com custos mais baixos do que se poderia pensar há dez anos, aplicar à clínica de todos os dias exames moleculares que definem:

1. a identificação de sequências anormais de DNA (ex.: mutação na fibrose cística)
2. os marcadores cromossómicos, i.e. sequências específicas situadas muito perto de genes (de que não conhecemos ainda a estrutura) e que são herdadas em conjunto com eles
3. o estado de funcionamento de um segmento de DNA: um gene pode existir, mas só provoca doença quando está activado (ex: nível de funcionamento do gene que produz a 21-hidroxilase, no metabolismo dos esteróides supra-renais)

Do que fica dito, facilmente se concluirá que ao clínico pertence, com o eventual apoio de especialistas, definir a conveniência de solicitar um determinado exame molecular, avaliando a sua utilidade no doente em estudo: aqui, como, de resto no recurso a todos os outros meios auxiliares de diagnóstico e terapêutica, é indispensável distinguir a investigação da rotina clínica, decidir da aplicabilidade do exame e ainda verificar se daí resulta alguma alteração substancial no diagnóstico, no estabelecimento do prognóstico e na instituição da terapêutica.

Os meios de que dispomos hoje para fazer os testes genéticos estão já a passar do laboratório de investigação para a rotina, o que significa uma redução notável de custos – embora um estudo de genética molecular possa ainda ser dos exames mais dispendiosos em bioquímica. Quando conhecemos a mutação, sobretudo se estamos em presença de doentes que pertencem a famílias já identificadas como possuindo essa mutação, podemos recorrer à hibridação por sondas específicas (método hoje facilitado pelo uso de sistemas “multiteste” ou *multiarrray*), ao corte do DNA em locais específicos, com enzimas de restrição, etc., à ligação de oligonucleotídeos (OLA), à polimerização por diversas técnicas (SSP, ASA, ARMS, GBA, PASA, etc.) e, finalmente, à sequenciação do segmento de DNA que nos interessa.

Se a mutação não é conhecida (situação habitual nos doentes sem história familiar), elas podem ser procuradas por complementação ou sequenciação da região do gene (DNAc, DNAg), o teste da proteína truncada (PTT), estudo da conformação específica da sequência do DNA (SSCP, DOVAM, etc.), etc. Por certo, é mais rápido e mais fácil pesquisar uma alteração que já foi observada num agregado familiar, mas convém não esquecer cinco regras fundamentais na hora de escolher o teste a pedir e ao fazer a interpretação do resultado (*Quadro I*).

Um dos exemplos que melhor ilustra as dificuldades que se levantam ao clínico é o das expansões de repetições de trinucleotídeos, alteração que aparece em várias afecções (*Quadro II*): na doença de Steinert, por exemplo, um resultado que se situe entre os valores normais e os que têm sido descritos nos doentes não permite definir com clareza a situação do paciente, doente ou normal; quando isto acontece, será preciso reavaliar o doente e, se o diagnóstico se confirma, modificar os limites de anormalidade. Aliás, tal como nos restantes exames bioquímicos, um valor intermédio faz sempre pensar numa doença em estadió pré-clínico. Neste exemplo, um resultado desses pode corresponder a uma pré-mutação: é normal a presença de algumas repetições do triplete GCT (entre 11 e 34); uma pequena expansão dessa sequência constitui uma alteração anterior à doença (pré-mutação), que predispõe o seu portador para novas expansões nesse ponto, e a doença poderá aparecer em descendentes seus.

Quando se pretende solicitar um teste genético, deve-se

### Quadro I - Riscos de erro de interpretação

1. Nenhuma técnica mostra todas as mutações (se bem que muitas das mutações descritas na literatura sejam casos isolados ou então limitados a uma família não relacionada ou uma população afastada).
2. Nenhuma técnica é aplicável a todos os genes, pelo que é preferível indicar qual é o gene que se pretende pesquisar ou, melhor, qual é a situação do doente, e deixar ao laboratório o trabalho de seleccionar o teste.
3. As técnicas usadas variam de um laboratório para outro, e nem sempre os resultados são directamente transponíveis.
4. A comparação de resultados obtidos com técnicas diferentes pode ser difícil.
5. Técnicas muito sofisticadas podem fornecer resultados de interpretação delicada e, por vezes, até sem significado clínico.

### Quadro II - Expansões de repetições 3n

Doença	Trinucl.	Normal	Doentes
Huntington	CAG	11-34	40-100 e + acima de 100
DM Steinert	GCT	5-30	40-52
Ataxia Medul Esp. Bulbar, ligX	GCT	17-26	43-81
Ataxia EspinoCerebelosa	CAG	19-36	200 e +
FRAXA*	CCG ou CGG	6-50	200 e +
FRAXE**	GCC	6-25	200 e +
Ataxia DentoRubrPalido Lu.	CAG	7-25	49-75

\*Síndrome de X frágil, tipo A

\*\*Síndrome de X frágil, tipo E

### Quadro III - Perguntas antes de pedir um teste genético

1. DEFINIÇÃO DO QUADRO HEREDITÁRIO
  - a. Já inquiri da história familiar? A presença de um ou mais doentes já estudados simplifica o trabalho, se dispusermos da informação da mutação presente.
  - b. Já esbocei a árvore genealógica? Ela é indispensável para indicar quais os eventuais diagnósticos diferenciais e quais os indivíduos que deverão fazer o teste, se ele for positivo no nosso doente.
  - c. Os critérios de heredabilidade são aplicáveis? No cancro colo-rectal hereditário não polipóide (HNPCC), os "critérios de Amsterdam" exigem a presença de cancro em pelo menos três familiares (um deles com relação do 1º grau com os outros dois), distribuídos por duas gerações, pelo menos, e aparecendo antes dos 50 anos pelo menos num caso).
  - d. Tenho a certeza de que os sintomas não correspondem, nalguns casos, ao efeito de uma causa ambiental? Os factores não hereditários podem muitas vezes mimetizar uma doença genética, transmitida de acordo com as regras das leis de Mendel ou outra regra genética (imprinting, por exemplo).
  - e. Tenho a certeza de que a doença é a mesma em todos os que apresentam sintomas similares? Um erro de diagnóstico pode anular o valor de uma árvore genealógica.
2. INDICAÇÃO DO TESTE
  - a. As alternativas de diagnóstico, de acordo com o resultado, estão bem definidas e têm significado para o meu doente e/ou para a família.
  - b. A realização do teste pode ser útil para estabelecer o tratamento e o prognóstico: sem o resultado do teste, não posso decidir-me pelo tratamento x ou y, e tenho as respostas alternativas consoante o resultado.
  - c. Este doente vai fazer um tratamento de alto risco ou com efeitos secundários graves.
  - d. Pretendo ministrar um medicamento para o qual está descrita uma susceptibilidade herdada
  - e. O teste é praticável, existe em rotina e tenho informação do laboratório sobre as condições e requisitos do exame.
  - f. A técnica tem alta fiabilidade, com uma boa relação entre a especificidade e a sensibilidade.

seguir um dos protocolos correntes em Genética Médica (*Quadro III*). Se atentarmos bem, ele não é específico desta especialidade, mas corresponde, afinal, ao raciocínio que um médico consciencioso faz antes de solicitar qualquer meio auxiliar de diagnóstico.

### Exemplo: o rastreio da tendência hereditária para a trombose

Como exemplo, apliquemos este protocolo a uma situação clínica prática, a predisposição hereditária para desenvolver trombose venosa, onde estão envolvidos factores genéticos de risco, além de factores ambientais conhecidos, como os excessos alimentares, o uso de tabaco e o *stress*.

Há um número elevado de genes que participam na cascata metabólica da trombose venosa e na sua facilitação local, mas desses há três com mutações mais frequentemente associadas a trombose hereditária:

1. mutação no gene do factor V de Leiden, que leva à resistência à proteína C reactiva e existe em 2 a 5 % da população. Enquanto os indivíduos heterozigotos para esta mutação apresentam um risco cinco a dez vezes maior de ter uma trombose venosa, os homozigotos têm um risco 50 a 100 vezes maior do que a população geral.

2. mutação no gene da protrombina, cujos níveis se encontram aumentados no plasma. Uma mutação, presente em cerca de 2 % da população, dá aos heterozigotos um risco 3 a 8 vezes maior de trombose venosa e aos homozigotos um risco muito superior.

3. mutação do gene da NTHFR.

A presença simultânea de mutações em dois destes genes (ou em todos) aumenta a gravidade da doença, que se manifesta mais cedo do que se houver apenas uma mutação.

As mutações estão identificadas, existem sondas para elas e as técnicas de exame estão em rotina. São candidatas a este rastreio:

1. A população adulta para identificação de portadores de mutações

2. Indivíduos assintomáticos com história familiar de trombose venosa

3. Mulheres candidatas a contracepção oral

4. Doentes com trombose venosa profunda ou embolia pulmonar

5. Doentes candidatos a grande cirurgia

O resultado positivo neste rastreio constitui uma indicação formal para a aplicação de terapêutica profiláctica com anticoagulantes em situações de risco.

### Conclusão

Os conhecimentos que se irão desenvolver nos próximos anos nesta área (e, por arrastamento, no que começa a ser conhecido como Medicina Molecular, uma aproximação moderna à interpretação fisiopatológica da doença e dos caminhos para a terapêutica) vão ser extraordinários e

muito úteis. Contudo, torna-se necessário compreender que é indispensável ainda aplicar muito esforço na investigação, e o médico prático tem um importante papel a desempenhar, ajudando a clarificar os aspectos clínicos que somente ele pode definir para o investigador.

De momento e perante os nossos doentes, as novas técnicas de diagnóstico podem ser muito úteis, sobretudo quando forem aplicadas com método. Todavia, mais do que em qualquer outra área, é preciso saber quando e como proceder a estes exames: o seu uso deve ser enquadrado num protocolo de estudo e *follow-up*.

### Bibliografia

- Atkan-Collan K et al. – Comprehension of cancer risk one and 12 months after predictive genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2001; 38: 787-792.
- Barash CI – Barriers and drivers in adopting innovation. *Medscape Pharmacotherapy* 2001.
- Hall JG – Molecular and clinical genetics for the practicing pediatrician. *Ped. Conf Summ, Medscape* 2000.
- Heim RA et al. – Improved detection of cystic fibrosis mutations in the heterogenous population using an expanded, pan-ethnic mutation panel. *Gen Med* 2001; 3: 168-176.
- Holtzman NA & TM Marteau – Will genetics revolutionize medicine? *N Engl J Med* 2000; 343: 141-144.
- Larsen LA - comunicação pessoal 2001.
- Lewis R – *Human Genetics* (4<sup>a</sup> ed.). New York. McGraw-Hill 2001.
- Offit K – *Clinical cancer genetics – Risk counseling and management*. New York Wiley-Liss 1998.
- Petersen G & AM Codori – *Genetic testing for familial cancer*. New York, McGraw-Hill 1998.
- Peterson C – *Genomica and managed care: preparing for the revolution*. *Healthplan*, 2000; 41: 14-20.
- Vogelstein B & KW Kinzler – *The genetic basis of human cancer*. New York, McGraw-Hill 1998.
- Weiland AJ – *The challenges of genetic advances*. *Healthplan* 2000; 41: 24-30.
- Wolpert ChM – *Human genomics in clinicval practice: bridging the gap*. *Clinicians Rev* 2000; 10: 67-86.